

基于网络药理学和分子对接技术探讨越鞠丸治疗非酒精性脂肪肝病的潜在靶点和作用机制

彭小园,王 月,彪雅宁,李易水,王 杨,步 洁,张一昕*

河北中医学院药学院,河北省高校中药组方制剂应用技术研究中心,石家庄 050200

摘要:本文通过运用网络药理学和分子对接技术探究越鞠丸治疗非酒精性脂肪肝病的主要活性成分及作用靶点,分析其治疗非酒精性脂肪肝病的分子机制。通过 TCMSp 数据库筛选越鞠丸中各味药物的化学成分信息及作用于人体的靶点,使用 OMIM、GeneCards 疾病数据库收集非酒精性脂肪肝病的疾病基因。将 NAFLD 靶点与预测药物靶点进行映射,获得越鞠丸治疗非酒精性脂肪肝的最终靶标。DAVID 富集分析数据库进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析并结合文献对相关通路进行分析;Cytoscape 3.7.2 平台构建“越鞠丸-成分-NAFLD 靶点-通路”网络图,进行网络拓扑分析并制作“PPI 蛋白互作图”;PyMOL、Auto DockTools 1.5.6、Discovery Studio 3.5 软件将靶标蛋白与关键化合物的小分子进行对接,以验证其治疗作用。网络药理学分析发现越鞠丸中共有 31 个有效成分可用于治疗非酒精性脂肪肝病,涉及 59 个靶基因及 26 条信号通路。查阅文献分析预测到越鞠丸可以通过调控 PI3K-Akt 信号通路、cAMP 信号通路、胰岛素抵抗等通路治疗非酒精性脂肪肝病。分子对接结果显示越鞠丸有效成分关键靶蛋白 NOS3 与 8-isopentenyl-kaempferol、MAPK14 与异鼠李素具有良好的结合性。综上所述,本研究通过网络药理学预测了越鞠丸治疗非酒精性脂肪肝病可能的药效物质基础及其作用机制,并使用分子对接技术进行验证,为进一步挖掘越鞠丸的药效成分和临床应用提供新思路。

关键词:网络药理学;分子对接;越鞠丸;非酒精脂肪肝病

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021) Suppl-0127-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.S.015

Study on the potential targets and mechanism of Yueju pills in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease based on network pharmacology and molecular docking

PENG Xiao-yuan, WANG Yue, BIAO Ya-ning, LI Yi-shui, WANG Yang, BU Jie, ZHANG Yi-xin*

School of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Application Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine Prescription in University of Hebei Province, Shijiazhuang 050200, China

Abstract: In order to explore the possible mechanism of Yueju pills in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), the active components and potential targets of Yueju pills were screened by network pharmacology and molecular docking technology. TCMSp database was used to screen the chemical composition information of each drug in Yueju pills and its target on human body. NAFLD target information was obtained by combining OMIM and GeneCards and disease databases. The NAFLD targets were mapped to the predicted Chinese medicines targets to obtain the final targets of Yueju pills for the treatment of NAFLD. The potential targets were analyzed by GO function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis with DAVID platform, and the related pathways were analyzed combined with literatures. The network diagram of "Yueju pills-components-NAFLD targets-pathways" was constructed on Cytoscape 3.7.2 platform, the network topology analysis was carried out, and made the "PPI proteins interaction diagram" was made. PyMOL, Auto Docktools 1.5.6 and Discovery Studio 3.5 softwares was used to dock the target proteins with the small molecules of the key compounds to verify its therapeutic

收稿日期:2021-01-18 接受日期:2021-01-21

基金项目:河北省自然科学基金(H2020423028);河北省中医药管理局科研计划(2019036)

* 通信作者 Tel: 86-311-89926316; E-mail: hbzyx123@163.com

tic effect. The 31 active compounds, 26 signaling pathways and 59 targets of Yueju pills in the treatment of NAFLD were obtained through network pharmacology analysis, the KEGG and literature analysis showed that Yueju pills can play a role by regulating many related pathways, such as PI3K-Akt signaling pathway, cAMP signaling pathway, insulin resistance and so on. The molecular docking indicated that the key target protein NOS3 with 8-isopentenyl-kaempferol, and MAPK14 with isorhamnetin of Yueju pills had high binding energy. In summary, this study predicted the possible pharmacodynamic substance basis and action mechanism of Yueju pills in the treatment of NAFLD through network pharmacology, and verified it by molecular docking technology, which providing a new idea for further mining the pharmacodynamic components of Yueju pills and its clinical application.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Yueju pills; nonalcoholic fatty liver disease

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指非酒精所导致的、以肝脏内脂肪沉积过度为主要特征的病理综合征^[1]。近年来, 其发病率增长迅速, 全球的患病率约为 25%, 而在我国 NAFLD 的患病率约为 15.0%^[2], 已成为第一大慢性肝病, 且较多研究结果显示: 在未来几十年内有可能成为造成终末期肝病的主要诱因之一^[3]。鉴于 NAFLD 是慢性代谢综合征损伤肝脏的表现, 其发病机制较为复杂, 目前尚缺乏理想的治疗药物和方法, 故亟需寻找和挖掘新的治疗策略和靶点^[4,5]。

越鞠丸出自《丹溪心法》, 由川芎、苍术、香附、栀子、神曲组成, 具有肝脾同调, 气血痰湿诸郁俱除之功^[6], 刘宇等认为肝脾失调, 痰瘀互结为 NAFLD 的主要病机, 调和肝脾, 消痰化痰为其有效治法^[7], 因此, 越鞠丸的组方用药与 NAFLD 的病机特点密切吻合, 故可作为防治 NAFLD 的治疗方剂。实验研究发现, 越鞠丸能明显降低高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠的血脂和肝脏脂质含量, 减轻肝脏脂肪变性, 抑制肝组织 PPAR α mRNA 的表达^[8]。临床研究表明^[9,10], 越鞠丸治疗 NAFLD 疗效显著。因此, 深入探讨分析越鞠丸的作用靶点和相关信号通路, 可以为阐明其防治 NAFLD 的作用机制及临床治疗提供资料和信息。

网络药理学不再局限于单一疾病、单个靶标、单个成分, 而是基于药物与药物之间在结构、功效等方面的相似性, 并考虑到机体内靶标分子、生物效应分子的多种相互作用关系, 从整体出发通过构建药物-药物、药物-疾病等网络, 来预测药物的功效以及特定功效对应的药物^[11]。分子对接是一种主要通过电场力分析受体配体的性质特征以及相互作用来预测受体和配体的结合模式的一种模拟方法, 主要用于基于受体和配体结构的药物设计和筛选, 预测结合亲和力, 确定小分子是否有成为候选药物的潜力^[12]。该研究策略的整体性和系统性特点, 与中医

基础理论从整体观念论治疾病以及方剂复方的多成分、多靶点、多途径的协同作用的原理非常契合^[13]。因此, 本项研究借助网络药理学方法探讨越鞠丸防治 NAFLD 的可能机制, 以期为进一步深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 越鞠丸活性成分的收集

本次研究借助中药系统药理学技术平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TC-MSP) 检索苍术、香附、川芎、栀子的成分, 以同时满足口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-like, DL) ≥ 0.18 为筛选标准提取活性成分进行分析, 并从该数据库中收集与所筛选生物活性化合物相关的蛋白靶点。因六神曲是由青蒿、苍耳、面粉、赤豆、杏仁、辣蓼和麦麸混合后按照一定比例混合后发酵制成, 属于中成药。因此无法在 TCMSp 数据库中获取该药物的活性成分, 不适用于使用该技术进行分析。

1.2 疾病靶点的筛选及与药物靶点的匹配

以“nonalcoholic fatty liver disease、NAFLD”为关键词在 GeneCards、OMIM 疾病数据库中搜索与 NAFLD 相关的基因, 并查阅文献对靶点进行补充。利用 UniProt 数据库对“1.1”部分中获取的药物靶点的蛋白名称进行标准化处理, 统一成为基因靶点名称, 通过筛选重复部分寻找两者共同靶基因。

1.3 蛋白-蛋白互作用网络 (PPI) 的构建及核心基因的筛选

将越鞠丸有效活性成分与 NAFLD 靶点取交集后的共同靶基因信息上传至 STRING 数据库 (<https://string-db.org>), 蛋白种类设置为“Homo sapiens”, minimum required interaction score 为 0.400, 将 STRING 数据库中获取的节点信息导入 Cytoscape 3.7.2 平台构建越鞠丸治疗 NAFLD 的蛋白互作用网络图, 使用“Network analyzer”功能进行网络拓扑分

析,根据 Degree 数值筛选 PPI 网络图中核心靶点。

1.4 富集分析

在 DAVID 富集分析数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 中导入药物与疾病共同靶基因信息,物种选择为“Homo sapiens”,阈值 $P < 0.01$,进行基因本体(GO)功能富集分析和基于京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,根据 P 值筛选显著性高的 GO 富集功能(生物学过程、细胞组分、分子功能)和 KEGG 信号通路。结果使用 Origin 绘图软件以柱状图和气泡图的形式对富集分析进行可视化处理。

1.5 药物-有效活性成分-疾病靶点-通路的网络构建及可视化处理

将越鞠丸中有效活性成分、NAFLD 的靶点基因、KEGG 通路进行编码导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化处理,构建“越鞠丸-成分-疾病靶点-通路”可视化网络图并进行网络拓扑分析筛选关键活性成分。其中可调控网络图中活性成分、靶点、通路用节点来表示,各个节点的相互作用关系用边线代表。

1.6 分子对接

通过 RSCB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 选择相应的基因靶点蛋白结构下载 3D 结构 pdb 格式文件,在 ZINC (<http://zinc.docking.org/>) 中直接下载相应有效成分的 mol2 文件,然后用 Discovery Studio 3.5、PyMol 软件对蛋白文件进行处理。通过 AutoDock 软件将靶点蛋白和小分子配体进行

处理,AutoDock-Vina 计算结合能,PyMol 进行数据可视化。结合能 binding energy 为对接值的评价标准,结合能 < 0 ,表明活性成分与关键靶点能自发地结合;对接结合能 ≤ -5.0 kcal/mol,表明活性成分与关键靶点具有一定的结合活性;对接结合能 ≤ -7.0 kcal/mol,表明两者具有良好的结合活性。

1.7 检索肠道菌群、肠黏膜机械屏障的相关靶点

通过 GeneCards (<https://www.genecards.org/>),TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库,以“intestinal flora”“intestinal mucosal barrier”为检索词,收集肠道菌群、肠黏膜机械屏障的相关靶点,为了进一步分析越鞠丸与肠道菌群、肠黏膜机械屏障的靶点之间的关系,将越鞠丸治疗 NAFLD 的共同靶点与肠道菌群、肠黏膜机械屏障靶点之间取交集,利用在线工具 venny 2.0 制作韦恩图,Cytoscape 3.7.2 平台制作网络图。

2 结果

2.1 活性化合物的筛选与药物-疾病靶点预测

根据设置的筛选条件 ($OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$),在 TCMS 数据库中检索并剔除无靶点化合物成分,结果显示,川芎有 6 个化合物信息,苍术 4 个化合物信息,香附 16 个化合物信息,栀子 11 个化合物信息,除去重复成分共 31 个有效化合物,各化合物基本信息(见表 1)。通过 Excel 表格操作将 79 个药物靶点与 1 591 个疾病靶点基因进行匹配,剔除重复靶点,得到药物-疾病共同靶点基因共 59 个。

表 1 越鞠丸治疗 NAFLD 的活性成分信息

Table 1 Information of active components of Yueju pills in the treatment of NAFLD

序号 No.	MOLID	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	来源 Source
1	MOL002135	Myricanone	$C_{21}H_{24}O_5$	川芎
2	MOL002140	Perlyryrine	$C_{16}H_{12}N_2O_2$	川芎
3	MOL002157	Wallichilide	$C_{25}H_{32}O_5$	川芎
4	MOL000433	FA	$C_{31}H_{49}NO_2$	川芎
5	MOL001406	Crocetin	$C_{20}H_{24}O_4$	栀子
6	MOL001941	Ammidin	$C_{16}H_{14}O_4$	栀子
7	MOL004561	Sudan III	$C_{22}H_{16}N_4O$	栀子
8	MOL002883	Ethyl oleate	$C_{20}H_{38}O_2$	栀子
9	MOL003095	5-Hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) chromone	$C_{19}H_{18}O_7$	栀子
10	MOL007245	3-Methylkempferol	$C_{16}H_{12}O_6$	栀子
11	MOL000173	Wogonin	$C_{16}H_{12}O_5$	苍术
12	MOL000184	NSC63551	$C_{29}H_{48}O$	苍术
13	MOL000188	3 β -Acetoxyatractylone	$C_{17}H_{12}O_4$	苍术

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	MOLID	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	来源 Source
14	MOL000085	Beta-daucosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	苍术
15	MOL003044	Chryseriol	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	香附
16	MOL000354	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	香附
17	MOL003542	8-Isopentenyl-kaempferol	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	香附
18	MOL004053	Isodalbergin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	香附
19	MOL004058	Khell	C ₁₄ H ₁₂ O ₅	香附
20	MOL010489	Resivit	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	香附
21	MOL004068	Rosenonolactone	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	香附
22	MOL004071	Hyndarin	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	香附
23	MOL004074	Stigmasterol glucoside	C ₃₅ H ₅₈ O ₆	香附
24	MOL004077	Sugeonyl acetate	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	香附
25	MOL000006	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	香附
26	MOL001494	Mandenol	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	川芎、栀子
27	MOL000359	Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	川芎、香附
28	MOL000098	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	香附、栀子
29	MOL000358	Beta-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	香附、栀子
30	MOL000422	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	香附、栀子
31	MOL000449	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	香附、栀子

2.2 PPI 蛋白互作网络分析

将 59 个共同靶点, 导入 STRING 数据库进行 PPI 网络分析, 设置蛋白互作综合得分 > 0.4, 剔除 1 个游离靶点, 其余参数不变, 下载 PPI 网络信息数据, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 使用“Network analyzer”功能进行网络拓扑分析, 据 degree 数值制作 PPI 网络图(见图 1), 其中包括 58 个节点, 215 条边, 其

中节点表示蛋白, 每条边表示蛋白与蛋白之间的相互作用关系, degree 值越大, 节点越大, 颜色越深提示该蛋白越重要, 其中平均节点度值为 7.41。根据 degree 数值筛选 PPI 网络图中核心靶点, 最终得到排名前 5 位的 PPI 核心基因, 分别为 ESR1、NOS3、PTGS2、AR、MAPK14, 即为越鞠丸治疗非酒精性脂肪肝的核心基因。

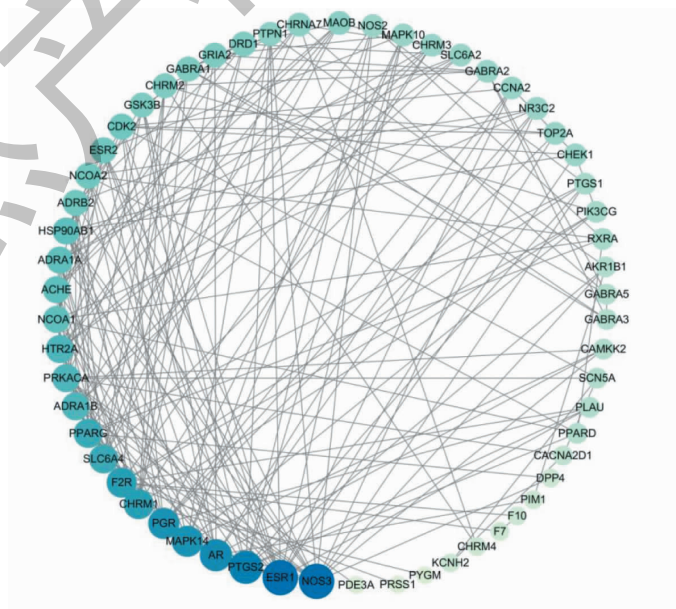


图 1 越鞠丸与非酒精性脂肪肝 PPI 网络图

Fig. 1 The PPI network of the common targets between Yueju pills and NAFLD

2.3 GO 和 KEGG 通路富集分析

对越鞠丸治疗 NAFLD 的 59 个共同靶点借助 DAVID 数据库平台进行富集分析,获得 GO 条目 86 个($P < 0.01$),分别包括生物过程(BP)49 个,细胞组成(CC)15 个,分子功能(MF)22 个,根据 count 值分别选取各自排名前 10 位条目绘制柱状图,富集生物过程(biological process, BP)结果显示,主要包括细胞信号转导、转录调控、药物反应等方面;富集细胞组成(cellular component, CC)结果显示,主要包括细胞器膜组成部分、膜的组成部分、细胞连接等方

面;富集分子功能(molecular function, MF)结果显示,主要包括蛋白结合、酶结合、药物结合、类固醇激素受体活性、蛋白质苏氨酸激酶活性等方面(见图 2)。KEGG 通路富集分析结果得到 26 条通路,神经活动配体-受体相互作用、钙离子信号通路、癌症途径、PI3K-Akt 信号通路、cAMP 信号通路、胰岛素抵抗信号通路等是关键靶点蛋白主要富集的通路(见图 3)。查阅文献分析发现其中 PI3K-Akt 信号通路、cAMP 信号通路、胰岛素抵抗信号通路为治疗 NAFLD 的重要通路。

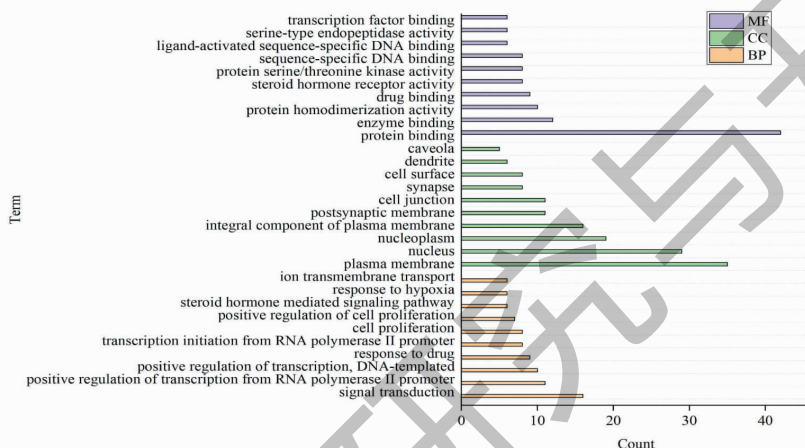


图 2 GO 富集分析结果

Fig. 2 The results of GO enrichment analysis

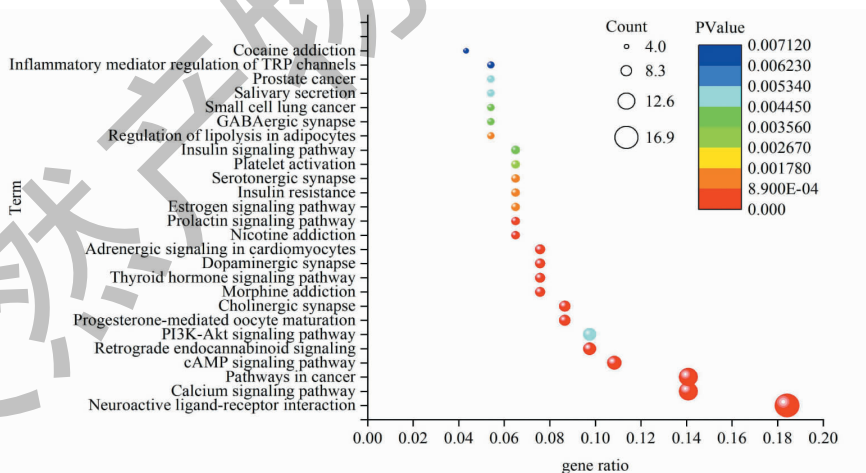


图 3 KEGG 富集分析结果

Fig. 3 The results of KEGG enrichment analysis

2.4 构建越鞠丸-成分-靶点-通路图

31 个药物成分,59 个交集靶点,26 条 KEGG 通路导入 Cytoscape 3.7.2 软件构建越鞠丸-成分-靶点-通路图,本次网络拓扑分析发现排名前 5 位的关

键化合物为豆甾醇(stigmasterol)、异鼠李素(isorhamnetin)、 β -谷甾醇(beta-sitosterol)、8-isopentenylkaempferol、杨梅酮(myricanone)。可调控网络图中药物用椭圆形表示,疾病靶点以菱形表示,化合物以

矩形表示,通路以八边形表示,不同颜色仅用来区分 不同部分无实际意义(见表2、图4)。

表2 越鞠丸中关键化合物信息

Table 2 Information on key compounds in Yueju pills

MOLID	化合物 Compound	度值 Degree
MOL000449	甾甾醇 Stigmasterol	33
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	31
MOL000358	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	29
MOL0003542	8-Isopentenyl-kaempferol	29
MOL002135	杨梅酮 Myricanone	26

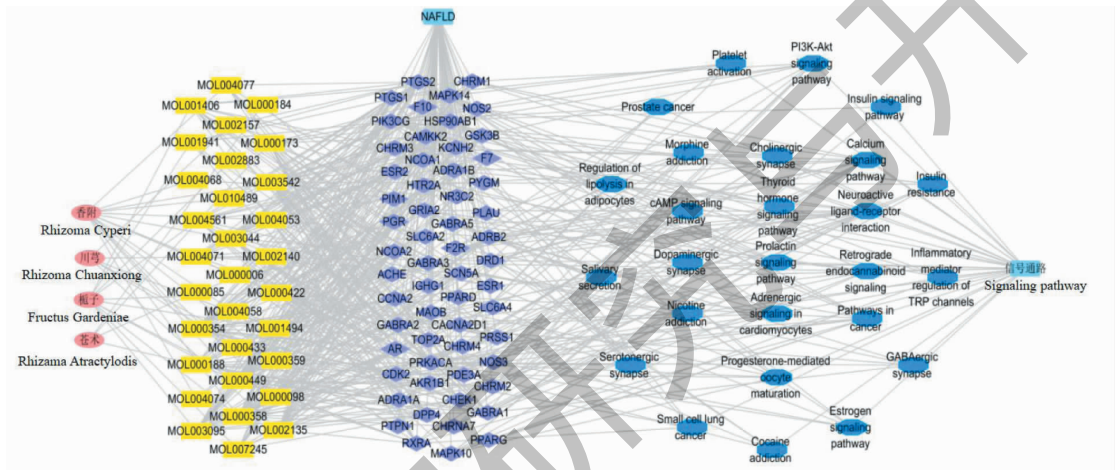


图4 越鞠丸-成分-靶点-通路图

Fig. 4 Diagram of Yueju pills-components-targets-pathways

2.5 核心活性成分与关键靶点的分子对接

利用 AutoDock Vina 软件对越鞠丸中甾甾醇、异鼠李素、 β -谷甾醇、8-isopentenyl-kaempferol、杨梅酮五种活性成分分别与关键靶蛋白 ESR1、NOS3、PTGS2、AR、MAPK14 进行分子对接。五种有效成分均能与靶蛋白 ESR1、NOS3、PTGS2、AR、MAPK14 成功对接。结合能小于 0,表明活性成分可与靶蛋白

自发结合,结合能越低则对接效果越好(见表3)。其中对接性最好的为 NOS3 与 8-isopentenyl-kaempferol,结合能为-8.6 kcal/mol;MAPK14 与异鼠李素,结合能为-8.2 kcal/mol。对这两者进一步分析发现,8-isopentenyl-kaempferol 可以与 NOS3 中 ALA-266、ARG-372 等残基对接;异鼠李素可以与 MAPK14 中 PHE-169、VAL-38 等残基对接(见图5、6)。

表3 越鞠丸有效活性成分与 NAFLD 靶蛋白分子对接结果

Table 3 Docking results of active ingredients of Yueju pills with NAFLD target proteins

化合物 Compound	分子式 Molecular formula	结合能 Binding energy (kcal/mol)				
		ESR1	NOS3	PTGS2	AR	MAPK14
甾甾醇 Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	-6.3	-7.1	-4.7	-6.4	-7.6
异鼠李素 Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	-5.2	-7.5	-4.4	-5.8	-8.2
β -谷甾醇 Beta-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	-4.2	-6.1	-4.7	-6.0	-7.8
8-Isopentenyl-kaempferol	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	-7	-8.6	-4.7	-6.5	-5.9
杨梅酮 Myricanone	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	-7.6	-7.4	-4.7	-5.7	-4.1

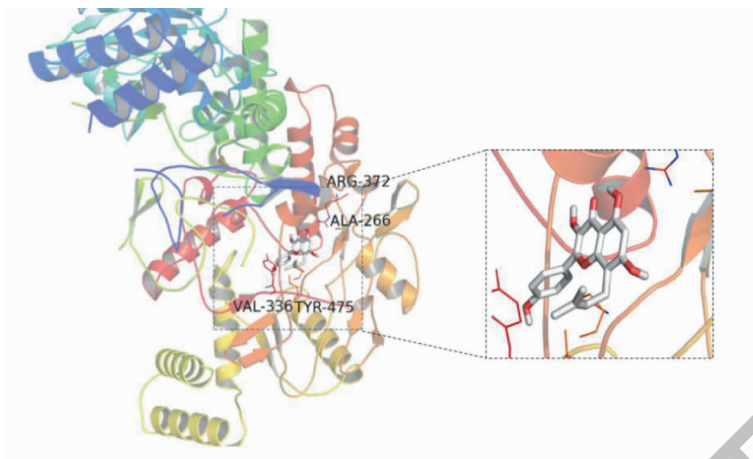


图5 NOS3 与 8-isopentenyl-kaempferol 的分子对接
Fig. 5 Binding mode of NOS3 with 8-isopentenyl-kaempferol

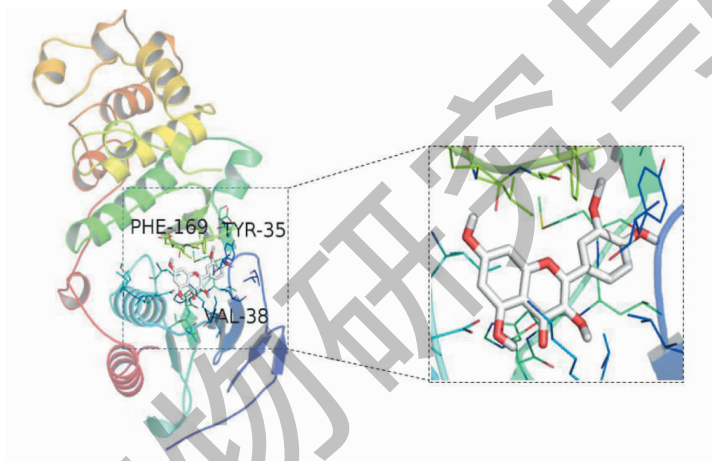


图6 MAPK14 与异鼠李素的分子对接
Fig. 6 Binding mode of MAPK14 with isorhamnetin

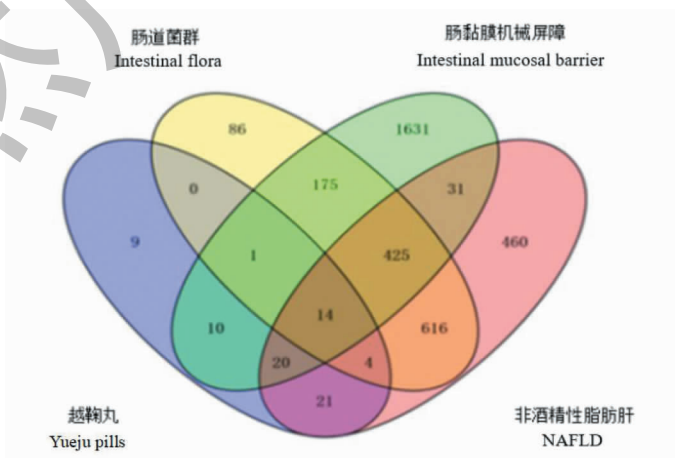


图7 越鞠丸-NAFLD 靶点与肠道菌群-肠黏膜机械屏障韦恩图
Fig. 7 Venn diagram of targets for Yueju pills-NAFLD and intestinal flora-mucosal barrier

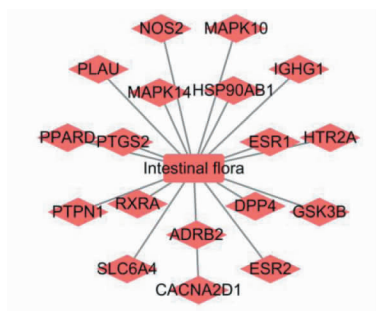


图8 越鞠丸治疗 NAFLD 的靶点与肠道菌群的共同靶点网络图

Fig. 8 Network diagram of common targets of Yueju pills in the treatment of NAFLD and intestinal flora

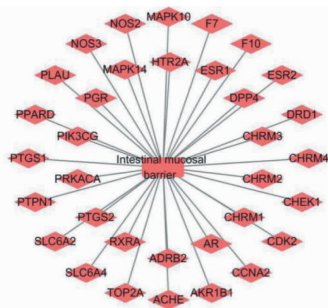


图9 越鞠丸治疗 NAFLD 的靶点与肠黏膜机械屏障的共同靶点网络图

Fig. 9 Network diagram of common targets of Yueju pills in the treatment of NAFLD and intestinal mucosal barrier

2.6 越鞠丸治疗 NAFLD 的药物靶点与肠道菌群、肠黏膜机械屏障靶点之间的关系

通过数据库检索到“intestinal flora”的相关靶点 1 321 个,“intestinal mucosal barrier”的相关靶点 2 307 个,与越鞠丸治疗 NAFLD 的 59 个靶点基因取交集。其中越鞠丸治疗 NAFLD 的靶点与肠道菌群有 NOS2、MAPK14 等 18 个共同靶点,与肠黏膜机械屏障有 MAPK10、PIK3CG 等 34 个共同靶点,制作韦恩图(见图 7)及网络图(见图 8、9)。

3 讨论

NAFLD 的发生多是由于过食精肥甘甜、所欲不遂、怠惰懒动等原因,致使脾失健运,湿聚痰生;肝失畅达,血行不畅,脉络瘀阻,痰浊瘀血互结于肝而发为本病^[14]。越鞠丸为治疗气、血、痰、火、湿、食六郁证的经典方剂,方中香附辛香入肝,行气解郁为君药,以治气郁;川芎辛温入肝胆,以治血郁,又可助香附行气解郁;栀子苦寒清热泻火,以治火郁;苍术辛苦性温,燥湿运脾,以治湿郁;神曲消食导滞以治食郁。诸药合用,肝疏气畅,脾运湿除,痰消食化,从而

达到消除病因,治疗 NAFLD 的目的。

网络药理学分析发现,越鞠丸中所含的豆甾醇、异鼠李素、 β -谷甾醇、8-isopentenyl-kaempferol、杨梅酮五种活性成分在对靶点基因的匹配中具有较高的自由度,为关键活性成分。豆甾醇与 β -谷甾醇均属于植物甾醇,它可抑制肠道上皮对胆固醇的吸收,降低肠道胆汁酸、肝总脂质、胆固醇、三酰甘油的水平^[15,16]。其中豆甾醇可以通过刺激网状内皮系统的增生,增强巨噬细胞的能力,发挥抗炎作用^[17]。Wan 等^[18]发现 β -谷甾醇能够降低血清中 TG、TC、ALT、AST 的含量或活性,减轻肝脏脂肪变性,阻止脂肪肝的进展,抑制肝纤维化进程。异鼠李素为黄酮类化合物,其作为 PPAR- γ 的拮抗剂会抑制脂肪细胞分解,发挥抗脂质聚集作用^[19]。Li 等^[20]发现异鼠李素可选择性抑制 NLRP3 和 AIM2 炎症小体的激活,下调促炎细胞因子的表达,缓解炎症反应。杨梅酮可抑制 NF- κ B 和 STAT3 调控的部分基因,包括增殖细胞周期蛋白 D1 和抗凋亡基因产物,诱导细胞凋亡缓解 NAFLD 进程^[21]。

根据 PPI 网络互作图分析找到与越鞠丸治疗 NAFLD 的核心靶点: ESR1、AR、MAPK14、PTGS2、NOS3(eNOS)等。ESR1 蛋白是雌激素受体、AR 是雄激素受体,雄激素与雌激素受体结合,一方面会通过诱导活化因子的相关基因的表达,调节内皮细胞 NO 的释放,使单核细胞加速与内皮细胞黏附,促进血管平滑肌增殖,增强血小板的聚集,调节脂质代谢;另一方面会加速细胞增殖和迁移并且可以通过激活 PI3K/Akt 通路、cAMP 通路,抑制细胞凋亡,加速增殖^[22]。MAPK14 属于丝裂原活化的蛋白激酶家族,可促进内皮细胞凋亡和泡沫细胞形成,调节脂肪细胞成熟与脂质沉积^[23,24]。PTGS2 是炎症诱导的氧化应激关键酶催化合成的前列腺素(PG),为肝损伤中的重要炎症介质,前列腺素的合成会引起或加剧炎症反应。越鞠丸的关键成分作用于 PTGS2 可以抑制引起炎症的前列腺素的合成^[25],从而对 NAFLD 的炎症状态起到显著的抑制作用,同时具有促进细胞增殖、促进血管生成等作用。NAFLD 可直接参与动脉粥样硬化性心血管疾病的发生,因此维持血管功能的稳定至关重要。NOS3(eNOS)是内皮型一氧化氮合成酶,主要产物为 NO,NO 作为气体信号分子能够保持血管张力,维持血管稳态,充分保护 NAFLD 患者心血管的健康。同时血管内皮功能障碍被认为是肠黏膜损伤的起始环节^[26],越鞠丸作用于 NOS3(eNOS)时,NO 释放增多,血管内皮功能受到调节,肠黏膜损伤修复,肠黏膜机械屏障得到改

善,NAFLD 病情得以缓解。上述结果表明越鞠丸对 NAFLD 的治疗作用并不体现在某个单体成分上,而是方中各单味药组方配伍综合作用的效果。

KEGG 富集分析所涉及的通路包括神经活动配体-受体相互作用通路、钙离子信号通路、癌症途径、PI3K/Akt 信号通路、cAMP 信号通路、胰岛素抵抗信号通路等,其中 PI3K/Akt 信号通路、cAMP 信号通路及胰岛素抵抗在 NAFLD 中发挥着重要的作用。Akt 是 PI3K 下游的一个关键因子,当 Akt 表达下降时会使胰岛 β 细胞凋亡过度^[27],胰岛素分泌降低,胰岛素敏感性下降,发生胰岛素抵抗,血液循环中葡萄糖无法有效代谢,循环血糖升高,过高的血糖在肝脏内合成大量的甘油三酯,沉积于肝脏造成 NAFLD。有学者^[28]发现,白藜芦醇可以触发 cAMP-PRKA-AMPK-SIRT1 信号通路诱导肝细胞发生自噬,减轻肝脏脂肪变性。因此越鞠丸可以通过调节 PI3K/Akt、cAMP 信号通路相关基因和蛋白的表达改善胰岛素抵抗,来调节糖脂代谢,改善 NAFLD 病情。

NAFLD 作为一种慢性代谢性疾病,其发病涉及到胰岛素抵抗、炎症细胞因子、氧化应激、肠道屏障损伤、内质网应激等诸多因素,近年来肠道屏障损伤作为重要的发病因素,日益受到研究者的广泛关注^[2]。在此过程中,肠肝之间的“对话”体现了肠-肝轴在 NAFLD 发病过程中的重要地位。现代医学的“肠-肝轴”与中医的肝脾相关理论具有相通之处,中医的“肝”包括现代解剖学上的肝脏,而现代医学“肠”的功能归属于中医“脾”的功能。肝脾相关可表现为现代医学的肝脏与肠道在生理、病理上的内在相关,“肠-肝轴”学说正是从这一角度补充和丰富了中医肝脾相关理论。肠黏膜屏障受损在 NAFLD 的发病机制中发挥着重要作用,NAFLD 患者常伴有肠道细菌过度增生、肠道通透性增加等病理改变。越鞠丸具有调和肝脾之功,网络药理学研究也发现越鞠丸治疗 NAFLD 的靶点与肠道菌群和肠黏膜机械屏障的靶点均有共同基因,表明越鞠丸可以通过调节肠道菌群,改善肠黏膜机械屏障,达到治疗 NAFLD 的目的。因此,基于肠-肝轴学说从肠道菌群-肠黏膜机械屏障入手,探讨越鞠丸防治 NAFLD 的物质基础和药理作用机制,不仅符合越鞠丸调和肝脾功效与肠-肝轴的契合性,而且也研究该方防治 NAFLD 的作用靶点和机制提供了新的可供借鉴的思路。

本研究基于网络药理学和分子对接的方法对越鞠丸治疗 NAFLD 的活性成分和作用机制进行了分

析,初步预测出豆甾醇、异鼠李素、 β -谷甾醇、8-isopentenyl-kaempferol、杨梅酮等成分作用于 ESRI、NOS3 (eNOS)、PTGS2、AR、MAPK14 等靶基因,调节 PI3K-Akt 信号通路、cAMP 信号通路、胰岛素抵抗等发挥平衡糖脂代谢、诱导细胞凋亡、调节肠道菌群、修复肠黏膜机械屏障等作用,显示出了多途径、多靶点治疗 NAFLD 的作用特点。并通过 AutoDock Vina 分子对接软件验证了越鞠丸活性成分与 NAFLD 疾病靶点之间具有高度的亲合性,证实了网络药理学预测靶点的可靠性,但其具体物质基础和作用机制还有待于实验研究进一步验证。

参考文献

- 1 Wen X, Sun YX, Jin LL, et al. Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease and development of new therapeutic drugs [J]. *Chin J Cell Biol (中国细胞生物学)*, 2020, 42: 499-506.
- 2 Xia F, Zhou BJ. Role of gut-liver axis dysfunction in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: Implications for treatment strategies [J]. *World Chin J Digest (世界华人消化杂志)*, 2018, 26: 1439-1447.
- 3 Sivell C. Nonalcoholic fatty liver disease: a silent epidemic [J]. *Gastroenterol Nurs*, 2019, 42: 428-434.
- 4 He J, Yang XF. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *World Chin J Digest (世界华人消化杂志)*, 2017, 25: 2480-2485.
- 5 Danford CJ, Lai M. NAFLD: a multisystem disease that requires a multidisciplinary approach [J]. *Gastroenterol*, 2019, 10(4): flgastro-2019-101235.
- 6 Yang YM, Zhang Y, Chang WJ, et al. Analysis on Yueju pill on regulating liver and spleen together [J]. *Chin J Bas Med Tradit Chin Med (中国中医基础医学杂志)*, 2020, 26: 378-380.
- 7 Liu Y, Guo JL, Liu CX, et al. Effects of Chinese medicine for dispersing phlegm and removing blood stasis on lipid metabolism and related gene expression in rats with nonalcoholic fatty liver [J]. *Hebei J Tradit Chin Med (河北中医学院)*, 2019, 34(1): 1-5.
- 8 Deng GX, Zhang JL, Gao W, et al. Effect of Yueju pills on expression of PPAR α in liver of rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin J Gerontol (中国老年学杂志)*, 2013, 31: 1219-1220.
- 9 Lei Q. 59 cases of fatty liver were mainly treated with Yueju pills [J]. *Henan Chin Tradit (河南中医)*, 2003, 21(3): 55.
- 10 Huang FZ, Xu Y. Clinical observation on 90 cases of fatty liver treated with modified Yueju pills [J]. *Gansu Chin Tradit (甘肃中医)*, 2008, 21(8): 21.
- 11 Hopkins AL. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*,

- 2007,25:1110-1111.
- 12 Li J, Fu A, Zhang L. An overview of scoring functions used for protein-ligand interactions molecular docking [J]. *Interdiscip Sci*, 2019, 11:320-328.
 - 13 Zhang YQ, Li X. Several advances in modern research on network pharmacology and traditional Chinese medicine [J]. *J Chin J Pharm Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2015, 29:883-892.
 - 14 Xu Y, Tao Y, Gou XJ, et al. Differentiation and analysis on TCM etiology and pathogenesis of nonalcoholic fatty liver [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2016, 34:2586-2589.
 - 15 Zhou HY, Tang W, Jiang J, et al. Effects of β -sitosterol and stigmasterol on nonalcoholic fatty liver disease *in vitro* [J]. *Acta Nutr Sin (营养学报)*, 2016, 38:456-461.
 - 16 Feng S, Dai Z, Liu AB, et al. Intake of stigmasterol and β -sitosterol alters lipid metabolism and all eviates NAFLD in mice fed a high-fat western style diet [J]. *Bba-Mol Cell Biol L*, 2018, 1863:1274-1284.
 - 17 Batta A K, Xu G, Honda A, et al. Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat [J]. *Metabolism*, 2006, 55:292-299.
 - 18 Wan X, Li XG, Li XX, et al. Beta-sitosterol inhibited TNF- α -NF- κ B and T β R1-Smad2/3 signaling pathway against hepatic fibrosis injury in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2020, 36(1):75-80.
 - 19 Ahn H, Lee GS. Isorhamnetin and hyperoside derived from water dropwort inhibits inflammasome activation [J]. *Phyto-medicine*, 2017, 24:77-86.
 - 20 Yan S, Nan XD, Ma SJ, et al. Research progress of isorhamnetin against atherosclerosis [J]. *Chin J Mod App Pharm (中国现代应用药学)*, 2020, 37:1771-1777.
 - 21 Paul A, Das S, Das J, et al. Diarylheptanoid-myricanone isolated from ethanolic extract of *Myrica cerifera* shows anticancer effects on HeLa and PC3 cell lines; signalling pathway and drug-DNA interaction [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 11:405-415.
 - 22 He YT, Zhou Q. Relationship between estrogen and its receptor and epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer [J]. *Oncol Prog (癌症进展)*, 2020, 18(7):649-652.
 - 23 Zhu G, Shen Q, Jiang H, et al. Curcumin inhibited the growth and in vasion of human monocytic leukaemia SHI-1 cells *in vivo* by altering MAPK and MMP signalling [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1):25-34.
 - 24 Zhai ZX, Li G. The detective value of APN, hs-CRP, ET-1 and NO in PH patients [J]. *Hunan J Norm Univ (湖南师范大学大学)*, 2017, 14(4):68-71.
 - 25 Jin Y, Renping L, Yaohui M, et al. Curcumin attenuates airway inflammation and airway remodeling by inhibiting NF- κ B signaling and COX-2 in cigarette smoke-induced COPD mice [J]. *Inflammation*, 2018;41:1804-1814.
 - 26 Wu X, Long ZJ. Effect of self-designed yukui decoction combined with mesalazine in the treatment of ulcerative colitis and its effects on intestinal mucosal barrier function, oxidative stress index and vascular endothelial cell function [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合)*, 2020, 29:1078-1081.
 - 27 Dai ZY, Dong YS, Ding PJ, et al. Effect of puerarin in reducing insulin resistance in HepG2 cells via PI3K/Akt/GSK-3 β signal transduction pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25(12):77-82.
 - 28 Carmine S, Rossella DC, Gelsomina M, et al. TFEb controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15:647-658.

(上接第 34 页)

- 16 Shi YJ, Li XL, Tang Y, et al. Study on metabolic differences of white quinoa from two areas based on GC-MS [J]. *Acta Agr Zhejiang (浙江农业学报)*, 2019, 31:869-877.
- 17 Dang B. Analysis on phenols and antioxidant activities of quinoa resources in Qinghai [J]. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)*, 2019, 40:30-37.
- 18 Xiong CW, Li XW, Xu DJ. Study on the determination of quercetin and kaempferol in quinoa [J]. *J Shanxi Agr Sci (山西农业科学)*, 2018, 46:529-533.
- 19 Zhao YD, Dang B, Yang XJ, et al. Ultrasonic extraction technology of saponins and its antioxidant activity in quinoa from Qinghai [J]. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)*, 2017, 38:45-51, 62.
- 20 Shao MF, Dou JF, Yang L. Analysis of zinc and magnesium in Qinghai *Chenopodium quinoa* by microwave digestion ICP-AES [J]. *J Anhui Agr Sci (安徽农业科学)*, 2018, 46:182-184.
- 21 Zhang Y, Gu XL, Wang Y, et al. Determination of 10 metallic elements in selenium-rich quinoa from Qinghai-Tibet Plateau by microwave digestion-ICP-MS [J]. *China Met Bull (中国金属通讯)*, 2019(12):125.
- 22 The Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 28050-2011 National Food Safety Standard; General Rules for Nutrition Labeling of Prepackaged Foods (GB 28050-2011 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则) [S]. Beijing: Standards Press of China, 2011.
- 23 Wang HQ. Production status and investigation of quinoa in Qinghai province [J]. *J Qinghai Agr Anim Husb (青海农牧业)*, 2019(2):13-16.