

· 数据挖掘 ·

降糖消脂片治疗NAFLD的分子作用机制分析

侯敏^{1,2}, 高文静², 杜阳^{1,2}, 王攀², 彭菊琴², 蔺亚东², 张伏芝^{1,2}, 任钧国^{2*}, 刘建勋²

(1. 北京中医药大学, 北京 100029;

2. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

[摘要] 目的:运用网络药理学和分子对接方法探讨降糖消脂片治疗非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的分子作用机制。方法:借助中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP),中医药综合数据库(TCMID),中医药百科全书数据库(ETCM)和中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)获取降糖消脂片各药味的化学成分,于SwissTargetPrediction和STITCH数据库预测化学成分的靶点;借助人类基因数据库(GeneCards),在线《人类孟德尔遗传》数据库(OMIM),治疗靶标数据库(TTD)和疾病相关的基因与突变位点数据库(DisGeNET)筛选NAFLD靶点,并与降糖消脂片活性成分的靶点进行交集分析,获得降糖消脂片治疗NAFLD的靶点。借助STRING 11.0构建治疗靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,并利用DAVID 6.8对治疗靶点进行富集分析。最后基于分子对接验证降糖消脂片关键成分与核心治疗靶点的作用特征。结果:降糖消脂片治疗NAFLD的关键成分包括槲皮素、木犀草素、山柰酚、小檗碱、异鼠李素、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、芒柄花黄素和己糖醇,核心靶点为丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1),Jun原癌基因(JUN),MAPK3,蛋白激酶B1(AKT1或者Akt1),肿瘤蛋白p53(TP53),E1A结合蛋白P300(EP300),Fos原癌基因(FOS),肿瘤坏死因子(TNF), β -淀粉样前体蛋白(APP)和细胞色素P450家族成员2E1(CYP2E1)。富集分析表明降糖消脂片主要通过外源代谢、氧化还原和胆固醇代谢等生物过程,调节磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路,MAPK信号通路,NAFLD及胰岛素信号通路发挥对NAFLD的治疗作用。分子对接结果显示降糖消脂片关键成分与降糖消脂片治疗NAFLD核心靶点有较好的亲和力。结论:降糖消脂片可通过多种活性成分、多个关键靶点及多种作用途径治疗NAFLD。

[关键词] 网络药理学; 分子对接; 降糖消脂片; 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD); 槲皮素; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK); 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)

[中图分类号] R22;R256.4;R96;R28; [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)05-0147-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202349

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200907.1633.003.html>

[网络出版日期] 2020-9-9 9:52

Molecular Mechanism Analysis of Jiangtang Xiaozhi Tablets in Treatment of NAFLD

HOU Min^{1,2}, GAO Wen-jing², DU Yang^{1,2}, WANG Pan², PENG Ju-qin², LIN Ya-dong²,

ZHANG Fu-zhi^{1,2}, REN Jun-guo^{2*}, LIU Jian-xun²

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine,

Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital,

China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the molecular mechanism of Jiangtang Xiaozhi tablets (JTXZT) in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by means of network pharmacology and molecular docking. **Method:** With the help of traditional Chinese medicine (TCM) Systems Pharmacology Database and

[收稿日期] 20200615(005)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301018);中国中医科学院基本科研业务费自主选题(ZZ11-027,ZZ110324)

[第一作者] 侯敏,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:610471238@qq.com

[通信作者] *任钧国,研究员,博士生导师,从事中药药理学研究,Tel:010-62835612,E-mail:reek2003@163.com

Analysis Platform (TCMSP), TCMs Integrated Database (TCMID), Encyclopedia of TCM (ETCM) and Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of TCM (BATMAN-TCM), the chemical compositions of medicinal materials in JTXZT were obtained, the compound targets were predicted in SwissTargetPrediction database and STITCH database. The targets of NAFLD were searched by The Human Gene Database (GeneCards), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Therapeutic Target Database (TTD) and DisGeNET, and intersection analysis was performed with the targets of the active ingredients to obtain the targets of JTXZT for treatment of NAFLD. Based on STRING 11.0 database, the protein-protein interaction (PPI) network of therapeutic targets was constructed, and the enrichment analysis of therapeutic targets was carried out by DAVID 6.8. Finally, the interaction characteristics of key components and core therapeutic targets of JTXZT for treatment of NAFLD were verified based on molecular docking. **Result:** The key components of JTXZT for treatment of NAFLD were quercetin, luteolin, kaempferol, berberine, isorhamnetin, betulinic acid, oleanolic acid, ursolic acid, formononetin and hexitol, and the core targets of JTXZT for treatment of NAFLD were mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), Jun proto-oncogene, activator protein-1 (AP-1) transcription factor subunit (JUN), MAPK3, protein kinase B1 (AKT1 or Akt1), tumor protein p53 (TP53), E1A binding protein p300 (EP300), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), tumor necrosis factor (TNF), amyloid beta precursor protein (APP) and cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1 (CYP2E1). Biological function and pathway enrichment analysis showed that JTXZT mainly through xenobiotic metabolic process, oxidation-reduction process, cholesterol metabolic process and other biological processes, regulating phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway, MAPK signaling pathway, NAFLD and insulin signaling pathway to play a role in the treatment of NAFLD. The results of molecular docking showed that the active components of JTXZT had a good affinity with the core targets of JTXZT for the treatment of NAFLD. **Conclusion:** JTXZT treats NAFLD through multiple active components, multiple key targets and multiple action pathways.

[Key words] network pharmacology; molecular docking; Jiangtang Xiaozhi tablets; non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); quercetin; mitogen-activated protein kinase (MAPK); phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt)

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是最常见的肝脏疾病,包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪性肝炎,脂肪性肝纤维化,肝硬化甚至肝癌的一系列临床病理改变^[1];NAFLD的易感因素如生活方式、遗传、肥胖和2型糖尿病等单独或共同作用,可使NAFLD发生这一系列严重病理改变。随着肥胖及其相关代谢综合征呈现全球化流行的趋势,NAFLD发病率也同步上升,并可能在未来几十年内成为青少年和成年人终末期肝病的主要原因之一^[2],因此,早期识别和管理NAFLD的发展至关重要^[3]。目前,临床治疗NAFLD的药物有吡格列酮、奥利司他等^[4-5];然而,这些药物不仅作用靶点单一,且具有潜在的不良反应,如增加心血管疾病的风险以及停药后肝酶的反跳等^[6],不能满足临床需要。因此,有必要从多靶点治疗的角度研究更安全、有效的NAFLD治疗策略。

中医药具有多途径、多靶点的特点,且毒副作用

用小,在防治NAFLD方面有独特优势。中医认为NAFLD属本虚标实之证,以肝脾肾亏虚为本,痰湿瘀互结为标^[7];治疗注重辨证,多以疏肝健脾、清热祛湿、化痰散结及活血通络之法联合使用^[8]。降糖消脂片源于临床经验方,是以中国中医科学院西苑医院魏子孝教授的临床实践为基础,后经工艺改进而研制的院内复方制剂,临床广泛用于治疗2型糖尿病及代谢相关疾病^[9-10]。该制剂由女贞子、黄芪、黄连、姜黄、荔枝核和昆布6味中药组成,以益气养阴、化痰祛瘀为治则,滋肾阴降妄火、补脾气助运化以治其本,祛痰化瘀、疏理肝气、调达气血以治其标^[9]。现代研究表明,该制剂具有明显的减重、降血糖、降血脂和抗脂质过氧化作用;能减少肝脏甘油三酯、胆固醇及游离脂肪酸堆积,改善胰岛素抵抗(IR)和肝脏脂肪变性,保护肝脏,缓解NAFLD^[10-14]。降糖消脂片治疗2型糖尿病疗效明显,还能显著改善NAFLD和肥胖^[13-14];同时,该制剂的不良反应低,

具有较好的应用前景,但其治疗NAFLD的分子机制尚不十分清楚。

网络药理学通过高通量分析与计算对生物网络进行综合分析,有助于探索中药活性成分及其作用靶点,在分子网络背景下确定其功能、阐释药物作用机制^[15-16]。分子对接则是将药物小分子成分与疾病的靶点蛋白进行形状、能量匹配,预测其结合模式和亲和力的一种理论模拟方法^[17]。基于此,本实验拟结合网络药理学和分子对接技术对降糖消脂片进行系统分析,以充分阐明其对NAFLD的可能作用机制,绘制研究工作流程图,见图1。

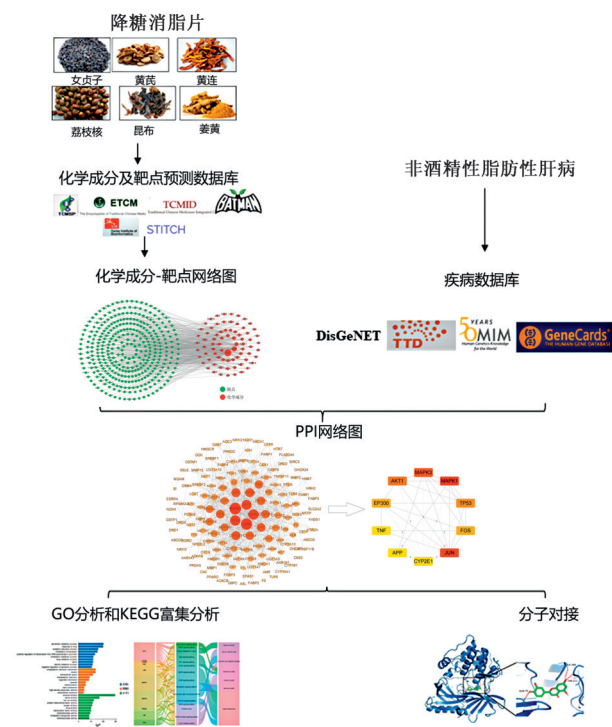


图1 降糖消脂片治疗NAFLD的分子作用机制研究流程
Fig. 1 Flow chart of molecular mechanism of Jiangtang Xiaozhi tablets in treatment of NAFLD

1 材料与方法

1.1 降糖消脂片活性成分的收集 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>), 中医药综合数据库(TCMID, <http://119.3.41.228:8000/tcmid/>), 中医药百科全书数据库(ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/>)和中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)检索降糖消脂片中女贞子、黄芪、黄连、姜黄、荔枝核和昆布所含的化学成分。其中, TCMSP检索条件为药物口服生物利用度(OB)≥30%^[18], 药物相似性(DL)≥0.18^[19]。将收集的化学

成分于PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>)确证,进行化学成分的标准化并下载Canonical SMILES序列。

1.2 降糖消脂片潜在作用靶点的预测与筛选 将降糖消脂片中化学成分的Canonical SMILES序列导入SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)和STITCH数据库(<http://stitch.embl.de/>)进行作用靶点预测、筛选。筛选规则为probability≥0.9的靶点(SwissTargetPrediction数据库)^[20], combined score≥0.7的靶点(STITCH数据库)^[21]。

1.3 降糖消脂片“活性成分-靶点”网络的构建 将降糖消脂片活性成分及其靶点上传至Cytoscape 3.8.0(<http://www.cytoscape.org/>)平台,构建降糖消脂片“活性成分-靶点”相互作用网络,运用NetworkAnalyzer功能对该网络进行拓扑分析。根据度值(degree)来分析核心节点,度值表示与某一节点相连接的其他节点的数目,度值越大,说明该节点在整个网络中越重要,越有可能是关键的活性成分或者靶点;选择度值最高的前十位节点作为核心节点。

1.4 NAFLD相关基因的收集 借助人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>), 在线《人类孟德尔遗传》数据库(OMIM, <http://www.omim.org>), 治疗靶标数据库(TTD, <http://db.idrblab.net/ttd/>), 疾病相关的基因与突变位点数据库(DisGeNET, <http://www.disgenet.org/>), 通过检索关键词“non-alcoholic fatty liver disease”或“nonalcoholic fatty liver disease”或“NAFLD”或“fatty liver, nonalcoholic”或“liver, nonalcoholic fatty”或“livers, nonalcoholic fatty”或“nonalcoholic fatty liver”或“nonalcoholic steatohepatitis”或“steatohepatitis, nonalcoholic”收集疾病相关基因。利用UniProt数据库将疾病靶点进行标准化。通过在线网站Jvenn^[22](<http://www.bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn/index.html>)构建降糖消脂片药物靶点与NAFLD疾病靶点维恩图,获得降糖消脂片治疗NAFLD的靶点。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将降糖消脂片治疗NAFLD的靶点导入STRING(<https://string-db.org/>, version 11.0), 设置蛋白种类为“Homo sapiens”, combined score为0.9, 构建降糖消脂片治疗NAFLD的PPI网络。将网络中节点交互作用关系参数导入Cytoscape 3.8.0绘制网络图,

并利用 cytoHubba 插件中的 degree 算法筛选 PPI 网络核心靶点。利用 DisGeNET 对核心靶点进行检索,得到靶点类型信息。

1.6 富集分析 将降糖消脂片治疗 NAFLD 的靶点导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>, version 6.8) 数据库进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。背景数据库和基因集限定物种为“Homo sapiens”, 阈值设置为 $P < 0.01$, 即得到功能富集分析中分子功能、生物过程、细胞组分以及信号通路富集分析结果。

1.7 分子对接验证 为了验证预测的降糖消脂片关键活性成分和核心治疗靶点的可信度,利用分子对接模拟软件 AutoDock Vina 1.1.2 对关键药效成分、阳性药与核心靶点进行受体-配体对接模拟计算。关键活性成分的 2D 结构来自 PubChem 数据库,并从 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库下载核心靶点的晶体结构,删除晶体结构中包含的配体,用单链受体蛋白与活性配体成分进行 AutoDock Vina 1.1.2 对接。NAFLD 常与肥胖、血脂紊乱、高血压及 2 型糖尿病等代谢综合征并存,故本文以奥利司他(Orlistat)和吡格列酮(pioglitazone)作为阳性药与核心靶点对接结果进行对照,完成全部的对接。对接值(结合能)可用于评估化学成分配体与靶点受体之间的结合程度,配体与受体结合的能量越低,构象越稳定,两者结合程度越高。对接值的评价标准设定为对接结合能 < 0 , 表明活性成分与靶点能自发地结合;对接结合能 $\leq -5.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明活性成分与靶点具有一定的结合活性;对接结合能 $\leq -7.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明两者具有良好的结合活性;对接结合能 $\leq -9.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 两者具有较强的结合活性^[23-24]。

2 结果

2.1 降糖消脂片的活性成分及潜在作用靶点 利用数据库共检索到降糖消脂片化学成分 607 个,其中 67 个化学成分来自 TCMSP, 313 个化学成分来自 TCMID, 96 个化学成分来自 ETCM, 131 个化学成分来自 BATMAN-TCM。经去除重复值、标准化处理后,共收集到降糖消脂片化学成分 369 个;其中女贞子 79 个,黄芪 93 个,黄连 38 个,姜黄 116 个,荔枝核 16 个,昆布 27 个,同时有 9 个化学成分来源于 2 味及 2 味以上中药,提示不同中药在治疗过程中存在协同作用。利用药物靶点数据库预测 369 个降糖消脂片成分,经靶点筛选、去除 2 个数据库重复的靶点后共得到 361 个靶点,其中 118 个靶点来自

SwissTargetPrediction 数据库, 275 个靶点来自 STITCH 数据库。预测的 361 个靶点来源于降糖消脂片中的 75 个活性成分,度值 ≥ 10 个的降糖消脂片活性成分的主要信息见表 1。

2.2 降糖消脂片活性成分-靶点作用网络 降糖消脂片活性成分-靶点的相互作用网络见图 2, 图中节点的大小表示度值的大小。该网络由 436 个节点(包括 75 个化合物节点, 361 个药物靶标节点)和 563 条边组成,度值最高的前十位成分是关键活性成分,即槲皮素、木犀草素、山柰酚、小檗碱、异鼠李素、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、芒柄花黄素和己糖醇。在该网络中,每个化合物可以作用于多个靶点,多个化合物也可以作用于一个靶点,网络中每种化合物的平均度值 7.51 个,平均最短路径 4.16,说明降糖消脂片中所含的活性成分可能作用于整个生物网络系统,反映了降糖消脂片多组分、多靶点的协同作用机制。

2.3 降糖消脂片治疗 NAFLD 的靶点 利用 GeneCards 收集到 NAFLD 靶点 1 709 个, OMIM 收集到 26 个靶点, TTD 收集到 12 个靶点及 DisGeNET 收集到 1 058 个靶点,合并和去除重复值后得到 NAFLD 相关靶点 2 246 个。通过绘制维恩图,得到 174 个降糖消脂片治疗 NAFLD 的靶点,见图 3。

2.4 降糖消脂片治疗 NAFLD 靶点的 PPI 网络构建与分析 PPI 网络由 151 个节点和 518 条边交互组成;依据 cytoHubba 筛选出核心治疗靶点,包括丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1), Jun 原癌基因(JUN), MAPK3, 蛋白激酶 B1(AKT1 或者 Akt1), 肿瘤蛋白 p53(TP53), E1A 结合蛋白 P300(EP300), Fos 原癌基因(FOS), 肿瘤坏死因子(TNF), β -淀粉样前体蛋白(APP)和细胞色素 P450 家族成员 2E1(CYP2E1), 见图 4, 图中节点的大小和颜色深浅的趋势表示度值大小。核心靶点类型是激酶、转录因子、信号和酶调节剂,见表 2。

2.5 降糖消脂片治疗 NAFLD 的基因功能和通路富集分析 利用 DAVID 数据库对降糖消脂片治疗 NAFLD 的 PPI 网络靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析。GO 功能富集分析结果包括 88 个生物过程, 31 个细胞组分, 66 个分子功能($P < 0.01$), 图 5 展示了 3 个条目显著性前十的 GO 富集分析结果。靶点的生物过程主要涉及外源代谢过程、药物反应、氧化还原过程等;细胞组分分析表明靶点主要与内质网膜、胞质溶胶、细胞外空间等有关;分子功能的分析结果表明,靶点主要涉及酶结合、血红素结合、

表 1 降糖消脂片活性成分的基本信息

Table 1 Basic information of active ingredients in Jiangtang Xiaozhi tablets

化学成分	Canonical SMILES	OB/%	DL	度值/个	来源
槲皮素	<chem>C1=CC(=C(C=C1)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O</chem>	46.43	0.28	76	荔枝核、黄连、女贞子、黄芪
木犀草素	<chem>C1=CC(=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>	36.16	0.25	43	女贞子
山柰酚	<chem>C1=CC(=CC=C1)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>	41.88	0.24	25	女贞子、黄芪
小檗碱	<chem>COC1=C(C=C2C(=C1)CC[N+](=O)C2=C4C=CC5=C(C4=C3)OC(=O)OC</chem>	36.86	0.78	18	黄连
异鼠李素	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O</chem>	49.60	0.31	15	黄芪
白桦脂酸	<chem>CC(=O)C1CCC2(C1C3CCC4C5(CCC(C(C5CCC4(C3(CC2)C)C)(C)C)O)C(=O)O</chem>	55.38	0.78	12	黄芪
齐墩果酸	<chem>CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CCC(C5(C)C)O)C)C)C2C1)C)C(=O)O)C</chem>	29.02	0.76	11	女贞子
熊果酸	<chem>CC1CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CCC(C5(C)C)O)C)C)C2C1C)C)C(=O)[O-]</chem>	16.77	0.75	11	女贞子
芒柄花黄素	<chem>COC1=CC=C(C=C1)C2=COC3=C(C2=O)C=CC(=C3)O</chem>	69.67	0.21	11	黄芪
己糖醇	<chem>C(C(C(C(C(CO)O)O)O)O)O</chem>	15.46	0.03	10	女贞子
胆甾醇	<chem>CC(C)CCCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)O)C)C</chem>	37.87	0.68	10	昆布、姜黄
β -谷甾醇	<chem>CCC(CCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)O)C)C)C(C)C</chem>	36.91	0.75	10	荔枝核、黄芪、女贞子
甘露醇	<chem>C(C(C(C(C(CO)O)O)O)O)O</chem>	17.73	0.03	10	昆布、女贞子
毛蕊异黄酮	<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C2=COC3=C(C2=O)C=CC(=C3)O)O</chem>	47.75	0.24	10	黄芪
甜菜碱	<chem>C[N+](C)(C)CC(=O)[O-]</chem>	40.92	0.01	10	黄芪
叶酸	<chem>C1=CC(=CC=C1)C(=O)NC(CCC(=O)O)C(=O)O)NCC2=CN=C3C(=N2)C(=O)NC(=N3)N</chem>	68.96	0.71	10	黄芪
L-刀豆氨酸	<chem>C(CON=C(N)N)C(C(=O)O)N</chem>	54.95	0.03	10	黄芪
(5E,8E,11E,14E,17E)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenoic acid	<chem>CCC=CCC=CCC=CCC=CCCC(=O)O</chem>	45.66	0.21	10	昆布
花生四烯酸	<chem>CCCCC=CCC=CCC=CCCC(=O)O</chem>	45.57	0.20	10	昆布
岩藻黄质	<chem>CC(=CC=CC=C(C)C=CC=C(C)C(=O)CC12C(CC(C1(O2)C)O)(C)C)C=CC=C(C)C=C=C3C(CC(C3(O)OC(=O)C)(C)C</chem>	37.18	0.58	10	昆布

铁离子结合等分子功能;说明降糖消脂片主要通过这些过程来治疗 NAFLD。

KEGG 通路富集分析共得到 91 条通路 ($P < 0.01$), 主要涉及癌症、内分泌和代谢疾病、信号传导、内分泌系统和免疫系统等。富集最显著的前 15 条通路包括前列腺癌, 2 型糖尿病, 缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路, 胰岛素信号通路, 过氧化物酶体增殖剂激活受体 (PPAR) 信号通路, ErbB 信号通路, Toll 样受体信号通路, NAFLD, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路, 磷酸腺苷依赖的蛋白激酶 (AMPK) 信号通路, 脂肪细胞因子信号通路, MAPK 信号通路, 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路, 神经营养信号通路和胆碱在癌症中的代谢通路, 见图 6; 图中列出了富集最显

著的 15 条通路和相应的分类, 以及展示出核心靶点在其中的分布。其中, PI3K/Akt 信号通路, MAPK 信号通路, NAFLD 及胰岛素信号通路富集结果显著且靶点数最多, 说明这 4 条通路在降糖消脂片治疗 NAFLD 中发挥重要作用。综上分析, 说明降糖消脂片中化学成分的作用靶标分布在不同的代谢途径中, 并通过多成分、多靶点、多途径的相互调节作用机制来治疗 NAFLD。

2.6 分子对接 降糖消脂片中的关键活性成分与核心靶点结合能的均值为 $-29.23 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 提示这些活性成分与核心靶点蛋白的结合性较强, 其中熊果酸、山柰酚、木犀草素及阳性药吡格列酮与靶点对接活性最好, 见图 7。由图 8 可知, EP300 活性位点精氨酸 (ARG)-1410 与熊果酸、活性位点天冬氨酸

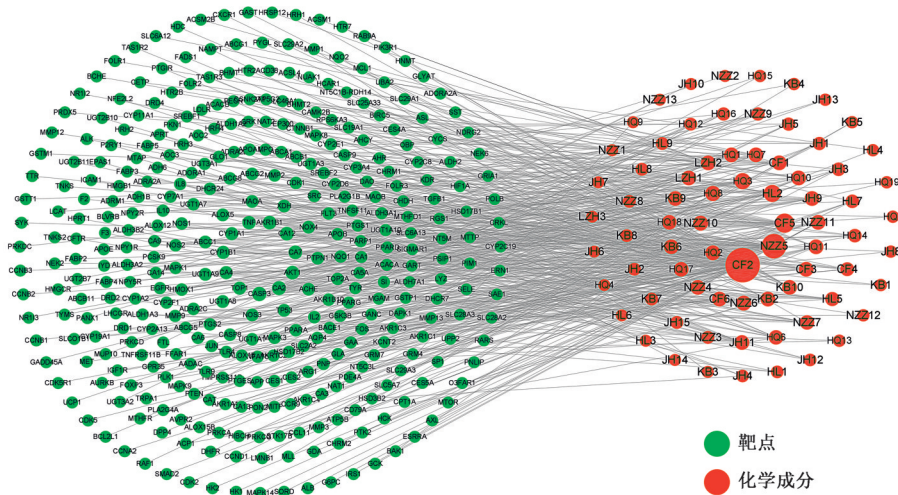
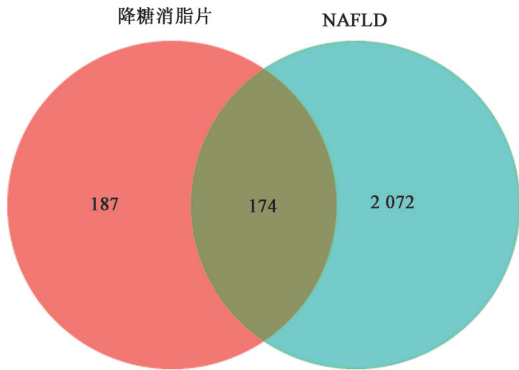


图2 降糖消脂片的化学成分-靶点网络

Fig. 2 Chemical composition-target network of Jiangtang Xiaozhi tablets



二者交集即为共有靶点

图3 降糖消脂片中活性成分靶点与NAFLD疾病靶点的Venn分析

Fig. 3 Venn analysis of active ingredient targets and NAFLD targets of Jiangtang Xiaozhi tablets

(ASP)-1399和丝氨酸(SER)-1400与吡格列酮形成的氢键相互作用是两者结合的主要作用力;AKT1活性位点ASP-274与木犀草素及活性位点谷氨酰胺(GLN)-79,异亮氨酸(ILE)-290,苏氨酸(THR)-211

与山柰酚形成的氢键相互作用是两者结合的主要作用力。对接结果说明降糖消脂片关键活性成分与核心靶点结合的能量低,相互之间的结合性好且成分生物活性高,是降糖消脂片治疗NAFLD的关键。

3 讨论

3.1 降糖消脂片组方分析 降糖消脂片全方以扶正为主,祛邪为辅,通补并行,方中女贞子养阴益肾、补气舒肝,黄芪补气固表,黄连清热燥湿,姜黄破瘀行气,附有荔枝核行气散结和昆布消痰软坚散结;共奏益气养阴、祛痰化瘀之功^[25]。现代药理研究表明女贞子中的齐墩果酸和熊果酸、黄连中的小檗碱、姜黄中的姜黄素等均有降血糖、调节脂代谢等功效,可改善IR,缓解NAFLD。前期临床与动物实验研究表明降糖消脂片可改善IR和肝脏脂肪变性^[14,26],这为降糖消脂片治疗NAFLD的分子机制研究奠定了理论基础。

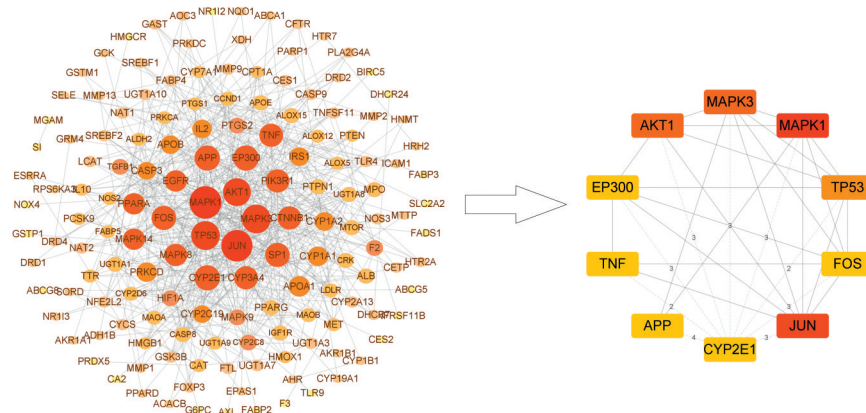


图4 降糖消脂片治疗NAFLD靶点的PPI网络(左)及其核心治疗靶点交互网络(右)

Fig. 4 PPI network (left) of NAFLD target treated with Jiangtang Xiaozhi tablets and interactive network of core targets (right)

表 2 降糖消脂片治疗 NAFLD 核心靶点的拓扑性质

Table 2 Topological properties of core targets of Jiangtang Xiaozhi tablets for treatment of NAFLD

基因	UniProt ID	基因名	靶点类型	度值/个
MAPK1	5594	mitogen-activated protein kinase 1	激酶	28
JUN	3725	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	转录因子	27
MAPK3	5595	mitogen-activated protein kinase 3	激酶	24
AKT1	207	AKT serine/threonine kinase 1	激酶	23
TP53	7157	tumor protein p53	转录因子	22
EP300	2033	E1A binding protein p300	-	19
FOS	2353	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	转录因子	19
TNF	7124	tumor necrosis factor	信号	17
APP	351	amyloid beta precursor protein	酶调节剂	17
CYP2E1	1571	cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	-	17

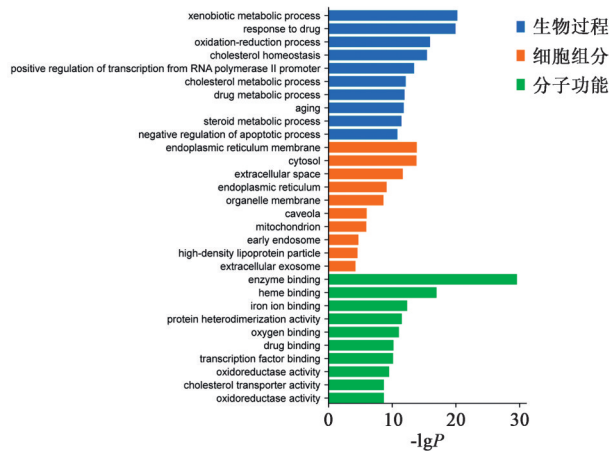


图 5 降糖消脂片治疗 NAFLD 靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 5 GO functional enrichment analysis of NAFLD targets treated with Jiangtang Xiaozhi tablets

3.2 降糖消脂片的成分分析 中药复方成分复杂,本研究借助数据库获得降糖消脂片活性成分 75 个,多成分可通过协同作用治疗 NAFLD。成分-靶点网络显示的关键活性成分包括黄酮类槲皮素、木犀草素、山柰酚、异鼠李素和芒柄花黄素,生物碱类小檗碱,五环三萜类白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸,糖醇类己糖醇等。药理研究发现,槲皮素具有降血糖,降低极低密度脂蛋白(VLDL),抑制炎症,缓解 IR 的作用^[27],还可通过内质网核信号转导蛋白 a1/剪切型 X-盒结合蛋白 1(IRE1a/XBP1s)通路促进肝脏 VLDL 转运和脂噬,从而减轻高脂饮食诱导的 NAFLD^[28]。木犀草素能减少活性氧和 TNF 分泌,从而通过抗氧化和抗炎机制来预防与肥胖,NAFLD 相关的代谢改变和血管功能障碍^[29]。山柰酚可通过抑制胆固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP1)活性,活化 PPARs,结合并诱导肝 X 受体(LXR)的反式激

活,降低肝脏和血脂的甘油三酯(TG)浓度来改善代谢综合征的症状^[30]。小檗碱可通过调节血管生成素样蛋白 2(Angptl2)来减轻高脂饮食诱发的 NAFLD 大鼠肝脏的肝炎反应^[31]。白桦脂酸缓解 NAFLD 与其对法尼醇 X 受体(FXR)的激活进而减少肝细胞内质网应激有关^[32]。熊果酸和齐墩果酸互为同分异构体,具有多种生物活性,如抗炎、降糖和保肝,熊果酸还可通过调节昼夜节律通路来缓解饮食诱导性肥胖小鼠的肝脏脂肪变性、纤维化和 IR^[33]。本研究建立的成分-靶点网络中关键活性成分治疗 NAFLD 的作用与文献报道一致。

3.3 核心靶点分析 降糖消脂片治疗 NAFLD 的 PPI 网络中 151 个靶点相互协调,度值大的靶点之间相互连通性更好,重要性也越突出。PPI 网络分析得到核心靶点 MAPK1, JUN, MAPK3 等,蛋白类型涉及激酶、转录因子、信号和酶调节剂。MAPK1/MAPK3 和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)是 MAPK 的亚型,能被不同的细胞外刺激激活,将信号从膜外传递到细胞及核内,从而产生广泛的生物学效应;JNK 是调控 JUN 的上游分子, JUN 蛋白和 FOS 蛋白组成二聚体复合物激活蛋白 1(AP-1)是细胞核内重要的转录因子,通过调节下游靶基因的转录表达,使细胞对外界刺激作出适应性的反应^[34]。NAFLD 在多种细胞外刺激的作用下通过磷酸化激活这 2 种亚型的信号传导通道,诱发相关脂质调节蛋白表达异常,引起肝脏脂质传导异常及 IR,从而导致 NAFLD 的发生与发展^[35]。Akt 是介导胰岛素敏感组织糖脂代谢重要的中间信号分子,其活性降低会加快 IR 进程;其还能调节低密度脂蛋白受体的表达,影响体内胆固醇与脂质的清除^[36],降低 Akt 磷酸化和氧化/

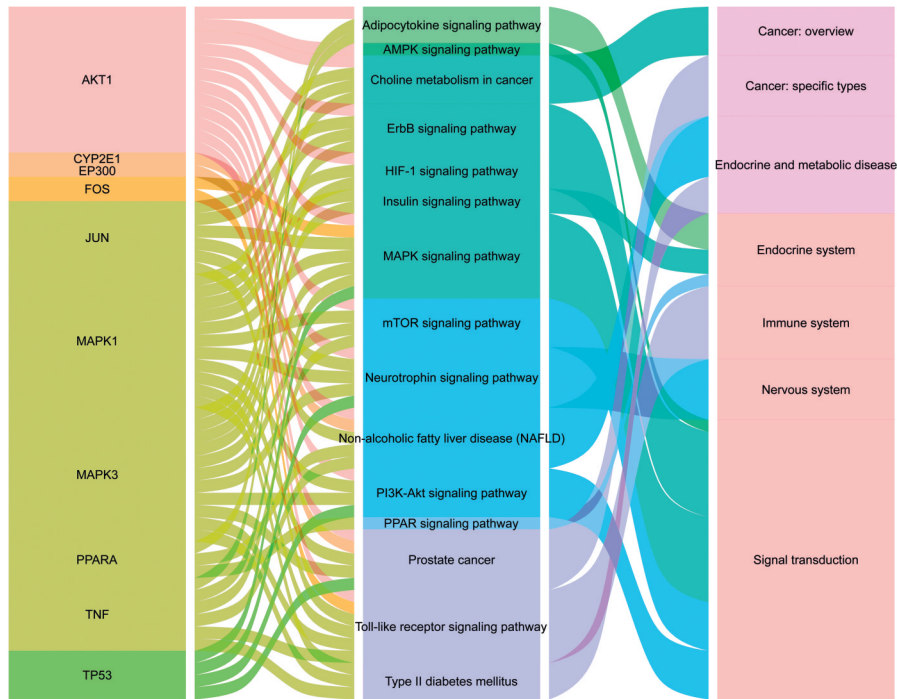


图 6 降糖消脂片治疗 NAFLD 靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis of NAFLD targets treated with Jiangtang Xiaozhi tablets

	结合能/kJ·mol ⁻¹									
	-14									-43
quercetin	-34.33	-21.35	-33.91	-38.51	-24.70	-38.51	-23.02	-28.88	-18.00	-33.91
luteolin	-37.67	-28.46	-36.00	-41.44	-32.65	-41.02	-27.21	-28.46	-20.51	-35.58
kaempferol	-35.16	-22.19	-33.91	-41.44	-24.70	-37.26	-23.86	-28.88	-19.67	-36.00
berberine	-35.16	-24.28	-34.74	-36.84	-29.72	-39.35	-24.70	-27.21	-20.51	-34.74
isorhamnetin	-33.49	-21.35	-34.74	-38.93	-23.86	-38.51	-22.60	-25.95	-18.00	-33.49
betulinic acid	-31.81	-22.60	-30.98	-40.19	-23.44	-36.00	-23.86	-27.21	-19.67	-31.81
oleanolic acid	-34.33	-21.35	-33.91	-38.51	-24.70	-38.51	-23.02	-28.88	-18.00	-33.91
ursolic acid	-34.74	-26.37	-32.23	-37.67	-31.40	-42.70	-25.95	-29.72	-20.93	-38.09
formononetin	-21.77	-14.23	-26.79	-22.60	-15.49	-24.28	-17.16	-21.77	-14.23	-21.35
hexitol	-33.49	-22.19	-33.07	-38.93	-24.28	-36.00	-23.44	-26.79	-18.00	-34.74
orlistat	-28.46	-21.77	-29.72	-33.07	-20.51	-33.91	-17.58	-22.60	-17.58	-35.58
pioglitazone	-36.00	-26.79	-37.67	-41.02	-28.05	-42.70	-23.44	-30.56	-21.77	-39.77
	MAPK1 (6G54)	JUN (1FOS)	MAPK3 (6GES)	AKT1 (3O96)	TP53 (1SAF)	EP300 (4PZS)	FOS (1FOS)	TNF (5MU8)	APP (5HOX)	CYP2E1 (3E4E)

括号内为晶体号;图中所有数值单位均为 kJ·mol⁻¹

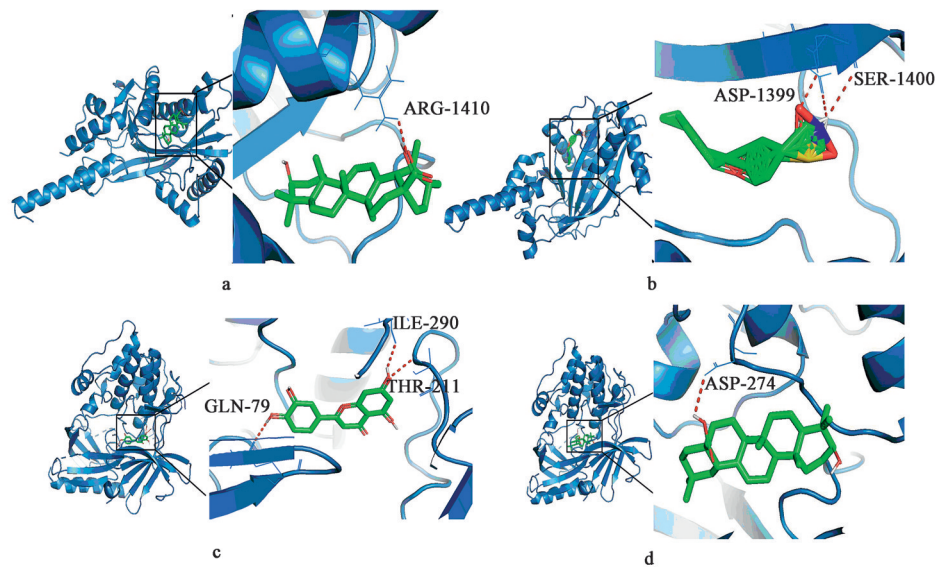
图 7 降糖消脂片治疗 NAFLD 的核心靶点与对应成分的对接结合能

Fig. 7 Binding energies between core targets and corresponding components of Jiangtang Xiaozhi tablets in treatment of NAFLD

亚硝化应激,能改善 NAFLD^[37]。炎症因子 TNF 可引起 NAFLD 患者肝脏炎症反应,引起 IR,加重脂质沉积,抑制 TNF 能减轻炎症,进而改善 NAFLD^[38]。CYP2E1 是参与氧化应激和脂质过氧化过程中的关键酶,其高表达可作为 NAFLD 发病机制的一个重要危险因素;敲除 CYP2E1 后的小鼠在经高脂饮食诱导后,IR,氧化应激和脂质过氧化程度均减轻,产生抗 NAFLD 作用^[39]。另外,通过分子对接验证得到降糖消脂片关键成分与这些靶点蛋白结合活性较佳,表明成分和靶点之间作用力较强,成分与靶点之间较好的结合力是降糖消脂片发挥治疗作用的基础。以上结果提示 PPI 网络中关键成分可靠性

较好,可为下一步研究降糖消脂片治疗 NAFLD 的药效物质基础提供具体的思路与方向。

3.4 信息通路分析 NAFLD 的经典发病机制“二次打击”学说的 2 个重要环节为肝脏脂质堆积和炎症反应,这是 NAFLD 治疗的关键。GO 富集分析结果表明,降糖消脂片主要通过外源代谢、氧化还原、胆固醇代谢和药物代谢等生物过程影响体内脂质代谢。细胞组分分析表明 PPI 网络靶点主要涉及内质网、线粒体、高密度脂蛋白颗粒。内质网具有合成脂质和碳水化合物的功能,通过影响肝脏脂质代谢,上调 SREBP1 活性,参与 NAFLD 形成,并能与炎症和凋亡相关因子相互作用,促使 NAFLD 进一步



a. EP300与熊果酸分子对接; b. EP300与吡格列酮分子对接; c. AKT1与山柰酚分子对接; d. AKT1与木犀草素分子对接
图8 降糖消脂片治疗NAFLD的核心靶点与化学成分对接模型

Fig. 8 Docking models of core targets and chemical components of Jiangtang Xiaozhi tablets in treatment of NAFLD

恶化为非酒精性脂肪肝^[40]。线粒体是脂肪酸 β 氧化主要部位,功能受损将影响氧化应激与脂质过氧化,导致肝脏脂肪变性^[41]。KEGG通路富集分析中PI3K/Akt信号通路,MAPK信号通路,NAFLD及胰岛素信号通路富集显著性高且靶点数最多,这些通路具有改善糖脂代谢、促进肝脏组织修复的作用,是降糖消脂片治疗NAFLD的主要通路。NAFLD通路直接以疾病命名,又包括PPAR信号通路、胰岛素信号通路和TNF信号通路等子通路,可看出该疾病的发病机制复杂,需要从多途径分析治疗。PPAR信号通路中PPAR α 的激活能促进脂肪酸氧化,抑制TG的合成;PPAR γ 能促进脂肪细胞的分化以及调控脂质的贮存,同时PPAR γ 的高表达会导致脂肪酸合酶(FASN)的高表达并促进脂肪合成^[42],肝脏脂肪过度积累,可引起肝脏对胰岛素敏感性降低,导致IR^[43],加重肝脏脂质沉积。胰岛素信号通路激活的第一步是胰岛素与靶组织细胞膜上的胰岛素受体相结合,前期研究发现降糖消脂片能改善机体内环境,增加胰腺细胞的胰岛素受体 β (InsR β)及胰岛素受体底物1(IRS-1)的表达,增强组织靶细胞与胰岛素受体的敏感性^[27];结合这些研究结果说明本文的网络富集分析可靠性较好。

综上所述,本研究从网络药理学角度系统分析了降糖消脂片治疗NAFLD的分子机制,共获得75个活性成分,174个降糖消脂片治疗NAFLD的靶点,同时利用分子对接方法验证了降糖消脂片关键活性成分与该制剂治疗NAFLD关键靶点的结合性

较强,成分生物活性较好。降糖消脂片治疗NAFLD的关键活性成分包括槲皮素、木犀草素、山柰酚、小檗碱、异鼠李素、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、芒柄花黄素和己糖醇,通过核心靶点MAPK1, JUN, MAPK3, AKT1, TP53, EP300, FOS, TNF, APP, CYP2E1及PI3K/Akt信号通路,MAPK信号通路,NAFLD及胰岛素信号通路调节肝脏脂肪代谢,IR,炎症反应和氧化应激,从而治疗NAFLD。该研究对降糖消脂片的临床应用具有指导意义,并为抗NAFLD药物的研发提供了新线索。

[参考文献]

- [1] 步宏,李一雷. 病理学[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社,2018:386.
- [2] SIVELL C. Nonalcoholic fatty liver disease: a silent epidemic [J]. Gastroenterol Nurs, 2019, 42 (5) : 428-434.
- [3] KO J S. New perspectives in pediatric nonalcoholic fatty liver disease: epidemiology, genetics, diagnosis, and natural history [J]. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr, 2019, 22(6):501-510.
- [4] HARTLEY A, SANTOS-FERREIRA D L, ANDERSON E L, et al. Metabolic profiling of adolescent non-alcoholic fatty liver disease [J]. Wellcome Open Res, 2019, 3: 166.
- [5] AHADI S, GHAREKHANI A, SHIVA A. Treatments of nonalcoholic fatty liver disease in adults who have no other illness: a review article [J]. Arab J Gastroenterol, 2019, 20(4):189-197.

- [6] ZHANG M, YUAN Y, ZHOU W J, et al. Network pharmacology analysis of Chaihu Lizhong Tang treating non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Comput Biol Chem*, 2020, 86: 107248.
- [7] 李峰, 罗水荣, 曾如雪, 等. 施维群教授辨治非酒精性脂肪肝经验浅析[J]. *天津中医药大学学报*, 2020, 39(1): 27-29.
- [8] 吕锦珍, 徐拥建, 胡世平, 等. 参苓白术散对NAFLD大鼠肝细胞mTORC1/STAT3信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(2): 6-12.
- [9] 陈筑红, 张广德, 魏子孝, 等. 降糖消脂颗粒对2型糖尿病气阴两虚, 痰瘀互阻患者的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(5): 544-548.
- [10] CHEN Z H, XIA C D, WEI Z X. Treatment of type 2 diabetes mellitus patients of qi-yin deficiency phlegm-stasis inter-obstruction syndrome by jiangtang Xiaozhi capsule and pioglitazone tablet: a non-inferiority randomized controlled trial [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 34(9): 1042-1046.
- [11] CHEN Z H, XIA C D, WEI Z X. Clinical study of Jiangtang Xiaozhi capsule in treating type 2 diabetes mellitus patients [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 32(7): 910-913.
- [12] SONG W, YUAN Y, YU N, et al. Antioxidant capacity of extract from Jiangtang Xiaozhi recipe *in vitro* [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 40(3): 393-400.
- [13] 金龙, 葛争艳, 董小霞, 等. 降糖消脂片对肥胖大鼠模型的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(1): 5-11.
- [14] 葛争艳, 金龙, 郭宇洁, 等. 降糖消脂片对胰岛素抵抗大鼠的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(24): 218-222.
- [15] JIANG Y Y, LIU N, ZHU S R, et al. Elucidation of the mechanisms and molecular targets of Yiqi Shexue formula for treatment of primary immune thrombocytopenia based on network pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1136.
- [16] QU Y, ZHANG Z, LU Y, et al. Network pharmacology reveals the molecular mechanism of Cuyuxunxi prescription in promoting wound healing in patients with anal fistula [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 3865121.
- [17] CLYNE A, YANG L P, YANG M, et al. Molecular docking and network connections of active compounds from the classical herbal formula Ding Chuan Tang [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8685.
- [18] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [19] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [20] SHENG S, YANG Z X, XU F Q, et al. Network pharmacology-based exploration of synergistic mechanism of guanxin II Formula (II) for coronary heart disease [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, doi: 10.1007/s11655-020-3199-z.
- [21] QU Y J, ZHEN R R, ZHANG L M, et al. Uncovering the active compounds and effective mechanisms of the dried mature sarcocarp of *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc. for the treatment of Alzheimer's disease through a network pharmacology approach [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 157.
- [22] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, et al. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer [J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(1): 293.
- [23] HSIN K Y, GHOSH S, KITANO H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [24] GAILLARD T. Evaluation of AutoDock and AutoDock Vina on the CASF-2013 benchmark [J]. *J Chem Inf Model*, 2018, 58(8): 1697-1706.
- [25] 郑咏秋, 葛争艳, 金龙, 等. 降糖消脂片对KK-A^y糖尿病肥胖小鼠胰岛素受体及底物表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(3): 175-179.
- [26] 葛争艳, 金龙, 杨斌, 等. 降糖消脂片对KK-A^y转基因小鼠胰岛素抵抗的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(3): 331-337.
- [27] 刘晟文, 刘建英. 槲皮素药理学作用的研究进展[J]. *中华肺部疾病杂志: 电子版*, 2020, 13(1): 104-106.
- [28] ZHU X H, XIONG T, LIU P Y, et al. Quercetin ameliorates HFD-induced NAFLD by promoting hepatic VLDL assembly and lipophagy via the IRE1 α /XBP1s pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 114: 52-60.
- [29] GENTILE D, FORNAI M, PELLEGRINI C, et al. Luteolin prevents cardiometabolic alterations and vascular dysfunction in mice with HFD-induced obesity [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1094.
- [30] HOANG M H, JIA Y, MOK B, et al. Kaempferol ameliorates symptoms of metabolic syndrome by regulating activities of liver X receptor- β [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(8): 868-875.
- [31] LU Z S, HE B H, CHEN Z Y, et al. Anti-inflammatory

- activity of berberine in non-alcoholic fatty liver disease via the Angptl2 pathway [J]. *BMC Immunol*, 2020, 21(1):28.
- [32] GU M, ZHAO P, ZHANG S, et al. Betulinic acid alleviates endoplasmic reticulum stress-mediated nonalcoholic fatty liver disease through activation of farnesoid X receptors in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(7):847-863.
- [33] KWON E Y, SHIN S K, CHOI M S. Ursolic acid attenuates hepatic steatosis, fibrosis, and insulin resistance by modulating the circadian rhythm pathway in diet-induced obese mice [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11):1719.
- [34] 朱宁,原继荣,王德莹. c-fos和c-jun与癌症关系的研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(2):6-7,116.
- [35] 彭孟云,朱晓宁,汪静. MAPK信号通路与非酒精性脂肪肝关系的研究进展[J]. *广东医学*, 2015, 36(5):804-806.
- [36] 王雨,郝洁,李婕,等. AKT信号通路参与并介导了虎杖苷对2型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(2):50-53.
- [37] PISONERO-VAQUERO S, MARTÍNEZ-FERRERAS Á, GARCÍA-MEDIAVILLA M V, et al. Quercetin ameliorates dysregulation of lipid metabolism genes via the PI3K/AKT pathway in a diet-induced mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(5):879-893.
- [38] ABDOLLAHI H, AZODI M Z, HATAMI B. Protein interaction mapping interpretation of none alcoholic fatty liver disease model of rats after fat diet feeding [J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2017, 10(Suppl1):S146-S153.
- [39] ENGSTLER A J, AUMILLER T, DEGEN C, et al. Insulin resistance alters hepatic ethanol metabolism: studies in mice and children with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Gut*, 2016, 65(9):1564-1571.
- [40] 王健,姜曼,辛永宁,等. 内质网应激在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(11):1229-1232.
- [41] SUNNY N E, BRIL F, CUSI K. Mitochondrial adaptation in nonalcoholic fatty liver disease: novel mechanisms and treatment strategies [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(4):250-260.
- [42] MARÉCHAL L, LAVIOLETTE M, RODRIGUEWAY A, et al. The CD36-PPAR γ pathway in metabolic disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5):1529.
- [43] MORÁN-SALVADOR E, LÓPEZ-PARRA M, GARCÍA-ALONSO V, et al. Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts [J]. *FASEB J*, 2011, 25(8):2538-2550.

[责任编辑 刘德文]