

基于整合网络药理学和实验验证的人参皂苷 Rb₁ 抗代谢相关脂肪性肝病的作用机制探讨

梁玉琴, 付佳琪, 石云鹤, 高鑫, 卢芳, 刘树民*

黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150000

摘要: 目的 探究人参皂苷 Rb₁ (ginsenoside Rb₁, Rb₁) 治疗大鼠代谢相关脂肪性肝病 (MAFLD) 的作用靶点及机制。方法 采用网络药理学方法系统地预测 Rb₁ 治疗 MAFLD 的核心靶点, 通过 STRING 平台和 Cytoscape3.9.1 软件分别绘制蛋白质相互作用 (PPI) 网络图谱和 “Rb₁-MAFLD 靶点” 网络模型, 利用 DAVID 数据库对核心靶点进行基因本体 (GO) 功能富集与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。动物体内实验进行验证, 高脂饲料诱导建立实验性 MAFLD 大鼠模型。测定各组大鼠体质量、肝脏系数、肝功能指标 [天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)] 及血脂指标 [三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)]; HE 染色观察肝组织病理学变化; 酶联免疫吸附 (ELISA) 和实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 法分别检测大鼠血清和肝脏中炎症因子 [白细胞介素-6 (IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)] 表达水平以验证网络药理学预测结果; 16 S rDNA 测序分析评估 Rb₁ 对 MAFLD 大鼠肠道菌群组成的影响。结果 获得 134 个 Rb₁ 治疗 MAFLD 的潜在靶点, 富集分析显示 Rb₁ 干预 MAFLD 的生物学过程与转录调控、细胞增殖、炎症反应等相关, 作用的通路主要为癌症、炎症、脂质和动脉粥样硬化、糖尿病等途径。动物实验结果显示, 与对照组相比较, MAFLD 模型组大鼠肝脏系数、肝功能指标、炎症因子水平显著升高, 血脂代谢紊乱, 且肠道菌群结构紊乱。Rb₁ 可改善肝组织中脂肪变性炎症细胞浸润, 显著降低血清中 AST、ALT、TC、TG、LDL-C 水平, 增加 HDL-C 水平, 且有效抑制 MAFLD 大鼠中炎症因子的过表达; 此外, Rb₁ 改变了 MAFLD 大鼠的肠道菌群的组成, 以拟杆菌门、乳杆菌属、布劳特氏菌属富集和脱硫弧菌减少为特征。结论 Rb₁ 能通过改善血脂紊乱与肝功能、抑制炎症反应和调节肠道菌群的稳态, 最终发挥抗 MAFLD 的作用。

关键词: 人参皂苷 Rb₁; 代谢相关脂肪性肝病; 肠道菌群; 网络药理学; 血脂异常; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 12-2580-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.012

Integrating network pharmacology and experimental verification to explore mechanism of ginsenoside Rb₁ in treating metabolic associated fatty liver disease

LIANG Yuqin, FU Jiaqi, SHI Yunhe, GAO Xin, LU Fang, LIU Shumin

Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000, China

Abstract: Objective This study was carried out to investigate the targets and mechanisms of action of ginsenoside Rb₁ (Rb₁) in the therapy of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD) in rats. **Methods** The network pharmacology methods were used to systematically predict the core targets of ginsenoside Rb₁ for the treatment of MAFLD. PPI network and "Rb₁-MAFLD targets" networks were plotted using STRING platform and Cytoscape3.9.1 software, respectively. GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment analysis were performed on core targets using DAVID database. Further *in vivo* animal experiments were conducted for validation, an experimental MAFLD model was developed in rats by feeding them high-fat diet. Body mass, liver coefficient, liver function index (AST, ALT) and blood lipid index (TG, TC, LDL-C, HDL-C) were determined. HE staining was used to observe the pathological changes of liver tissue. The expression levels of inflammatory factors (IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β 1) in serum and liver of rats were detected by ELISA and real-time PCR, respectively, to validate the predicted results of network

收稿日期: 2023-07-13

基金项目: 黑龙江省中医药学会 2022—2024 年度青年人才托举工程项目 (2022-QNRC1-27); 中医药科研课题和国医大师学术思想传承科研课题项目 (ZHY2022-115); 黑龙江省自然科学基金项目 (ZD2020H006)

第一作者: 梁玉琴, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药性理论及药效物质基础研究。E-mail: K18089718076@163.com

*通信作者: 刘树民, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药性理论及药效物质基础研究。E-mail: keji-liu@163.com

pharmacology. 16S rDNA sequencing analysis was used to evaluate the effect of Rb₁ on gut microbiota composition in MAFLD rats. **Results** A total of 134 potential targets for Rb₁ treatment of MAFLD were obtained. Enrichment analysis indicated that Rb₁ interferes with the biological process of MAFLD, which is related to transcriptional regulation, cell proliferation and inflammatory response, and the action pathways are mainly cancer, inflammation, lipid and atherosclerosis and diabetes. The results of animal experiments indicated that compared with the normal group, rats in the MAFLD model group had conspicuously elevated liver coefficients, liver function indexes, inflammatory factors, disturbed lipid metabolism, and structural disorders of the intestinal microbiota. Rb₁ improved steatosis and inflammatory cell infiltration in liver tissues, conspicuously reduced serum levels of AST, ALT, TC, TG, and LDL-C, increased HDL-C levels, and effectively suppressed the overexpression of inflammatory factors in MAFLD rats. Furthermore, Rb₁ altered the composition of the gut microbiota in MAFLD rats, characterized by the enrichment of Bacteroidota, *Lactobacillus*, *Blautia* and the reduction of Firmicutes/Bacteroidota and *Desulfovibrio*. **Conclusion** Rb₁ can ultimately exert anti-MAFLD effects by improving dyslipidemia and liver function, suppressing inflammatory responses and modulating the homeostasis of the gut microbiota.

Key words: ginsenoside Rb₁; metabolic associated fatty liver disease; gut microbiota; network pharmacology; dyslipidemia; inflammatory response

代谢相关脂肪性肝病[MAFLD,曾用名非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)]已成为全球范围内流行率最高的慢性肝病,其全球患病率已超过25%,而中国的患病率高达32.9%,且其流行率逐年上升^[1-3]。肝细胞脂肪的过度沉积与变性是MAFLD的主要病理特征,可导致肝细胞损伤与纤维化,进而诱导非酒精性脂肪性肝炎(NASH),最终进展为肝硬化(HC)和肝细胞癌(HCC)^[4-5]。此外,持续的脂质代谢紊乱会伴随着多种肝外并发症的发生,包括糖尿病、慢性肾脏病、睡眠窒息症以及心血管疾病^[6-8]。目前,饮食调整、增强运动以及药物干预是防治MAFLD的主要方式。临床上用于MAFLD治疗的药物主要集中在快速降血脂方面,但仍有明显的局限性。因此,需要专注于研发治疗MAFLD和相关并发症安全有效的药物。

作为与宿主共同进化的重要组成,肠道菌群被称作人类“第二基因组”,参与消化、能量代谢、胃肠道稳态和炎症等多种病理生理过程的调节^[9-10]。关于MAFLD与肠道菌群之间的联系,早在2010年前就已经被证实。目前,中药及其活性成分因多靶点、安全性高、结构稳定等优势而成为MAFLD治疗的新药研发领域的焦点^[11]。中药及其活性成分通过多种途径发挥抗MAFLD作用,通过抑制铁死亡、改善线粒体功能障碍、抑制炎症反应、干预肠道菌群、纠正脂肪代谢紊乱、调节自噬等,有效控制和延缓MAFLD及并发症的发展^[12-14]。人参皂苷Rb₁(Rb₁)是皂苷类主要活性成分,广泛存在于三七、人参等中药中,可通过抗氧化、抗凋亡及抗炎等多种机制,发挥降血糖、调血脂、抗病毒、心血管保护、神经系统保护等多种药理活性^[15-18]。有研究表明

Rb₁可以减轻肝细胞脂肪变性、改善胰岛素抵抗、抑制肝细胞凋亡、调节脂质代谢紊乱和肠道菌群失调,提示Rb₁对MAFLD具有潜在的治疗作用^[19-21]。然而,目前关于Rb₁治疗MAFLD的具体作用机制尚未明确。因此,本研究基于网络药理学预测Rb₁抗MAFLD的相关靶点及作用机制,并采用高脂饮食诱导的MAFLD大鼠模型验证Rb₁干预MAFLD的机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠40只,体质量(200±20)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001,饲养于黑龙江中医药大学中医药研究院,环境温度为(23±2)℃,湿度(55±5)%,光照12 h/12 h明暗周期循环,自由饮水摄食适应性喂养1周。本实验方案获得黑龙江中医药大学动物伦理委员会批准,伦理批号:DXLL2019081601。

1.2 药品与试剂

Rb₁(上海源叶生物科技有限公司,质量分数98%,批号41753-43-9);三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)生化测定试剂盒(南京建成生物有限公司);白细胞介素-6(IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和转化生长因子-β1(TGF-β1)ELISA试剂盒(南京建成生物有限公司);化滞柔肝颗粒(山东新时代药业有限公司,批号:0052006022,每袋8 g);高脂饲料(北京小泰有泰生物科技有限公司)。

1.3 仪器

Chemray 420 型全自动生化仪(深圳雷杜公司); Eclipse Ci-L 型正置白光拍照显微镜(日本 Nikon 公司); TGL16E 型离心机(长沙英泰仪器有限公司); A28137 型 qRT-PCR 仪(美国 Thermo 公司); M200pro 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

2 方法

2.1 基于网络药理学的 Rb₁ 治疗 MAFLD 的作用机制分析

2.1.1 Rb₁ 治疗 MAFLD 靶点的收集 利用 Pub Chem、PharmMapper、Swiss 数据库查询 Rb₁ 的潜在作用靶点。以“Non-alcoholic fatty liver disease”为检索词,检索 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)、Drugbank、National Center for Biotechnology Information (NCBI), DisGeNET、GeneCard 数据库,查询与 MAFLD 相关的基因。通过 Uniprot 数据库规范靶点蛋白。对 5 个数据库的 MAFLD 靶点取合集并绘制韦恩图,对 Rb₁ 的作用靶点和 MAFLD 靶点取交集并绘制韦恩图,获得 Rb₁ 治疗 MAFLD 的潜在核心靶点。

2.1.2 “Rb₁-MAFLD-靶点”网络和蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将得到的 Rb₁ 和 MAFLD 共同靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建“Rb₁-MAFLD-靶点”网络图。将共同靶点导入 STRING 网络平台(<https://cn.string-db.org/>),将物种定义为“Homo sapiens”,置信度设置为 >0.9 进行筛选,获得 PPI 网络,将获得的 PPI 数据导入 Cytoscape 3.9.1,根据中心度(DC)>2 倍中位数、中间中心度(BC)和紧密中心度(CC)大于各自中位数的筛选条件进行作用靶点筛选,进行可视化,获得 PPI 网络图。

2.1.3 交集靶点基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 把 Rb₁ 抗 MAFLD 的作用靶点导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) 数据库进行 GO 功能和 KEGG 通路的富集分析,并绘制气泡图以直观显示富集结果。

2.2 Rb₁ 对 MAFLD 模型大鼠的影响

2.2.1 造模、分组及给药 适应性喂养结束后,40 只 SD 大鼠随机分成对照组(10 只)和造模组(30 只),造模组通过高脂饲料(基础饲料+10%猪油+10%蛋黄粉+1%胆固醇)诱导建立 MAFLD 模型,造模时间持续 8 周,造模组大鼠眼眶采血,检测血脂水平以确定造模效果。将造模成功的大鼠随机分为模型组($n=9$)、Rb₁ 组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [19], $n=10$)和化滞柔肝颗粒组($2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n=9$)。造模第 9 周各给

药组 ig 相应药物($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),对照组($n=10$)和模型组大鼠 ig 等体积的生理盐水,每天 1 次,各组均连续给药 4 周。

2.2.2 样本采集 给药 4 周结束后,用 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠对所有大鼠进行深度麻醉,并快速收集血液和肝组织样本。称定肝脏质量,计算肝脏系数。分离血清用于血脂、肝功能指标的检测。部分肝组织用 4% 多聚甲醛固定液固定,用于病理形态学检测,剩下的部分保存在 -80°C 冰箱中,用于 ELISA、qRT-PCR 检测。收集大鼠结肠内粪便样品用于 16 S rDNA 测序分析。

2.2.3 大鼠肝组织病理学形态观察 将固定在 4% 多聚甲醛中的肝脏组织依次进行石蜡包埋、 $4 \mu\text{m}$ 厚连续切片、二甲苯透明、梯度乙醇脱蜡和水化。根据试剂盒的说明进行苏木精-伊红(HE)染色,并在光学显微镜下观察肝脏组织的病理学变化(放大倍数 $\times 200$)。

2.2.4 血脂和肝细胞代谢酶生化指标检测 血液样本在 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速下离心 10 min,收集血清。根据试剂盒的操作说明,用全自动生化分析仪测量大鼠血清中的 TC、TG、LDL-C、HDL-C、ALT、AST。

2.2.5 大鼠血清炎症因子测定 用 ELISA 试剂盒检测各组大鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6、TGF- β 1 和 IL-10 的水平,操作步骤严格按照说明书进行。

2.2.6 大鼠肝组织炎症因子 mRNA 表达水平检测 称取肝组织约 100 mg,TRIzol 法常规提取总 RNA。按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书合成 cDNA 后进行 qRT-PCR 分析。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算肝组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6、TGF- β 1 和 IL-10 的 mRNA 相对表达水平。引物序列见表 1。

2.2.7 大鼠粪便 16 S rDNA 测序分析 大鼠结肠内粪便 16 S rDNA 基因测序分析由上海派森诺生物技术有限公司进行,检测步骤包括总 DNA 提取与检测,16 S rRNA V3-V4 可变区 PCR 扩增,Illumina 平台进行双端(Paired-end)测序,原始序列进行去噪、拼接和取出嵌合体。利用 QIIME2 平台进行肠道菌群群落组成分析、 α 和 β 多样性分析。派森诺基因云平台建立差异菌群和血脂、炎症相关因子的相关性分析。

2.3 统计学分析

采用派森诺基因云平台、GraphPad Prism 9 和 SPSS 26.0 软件进行统计分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单因素方差分析用于比较组间差异。16 S

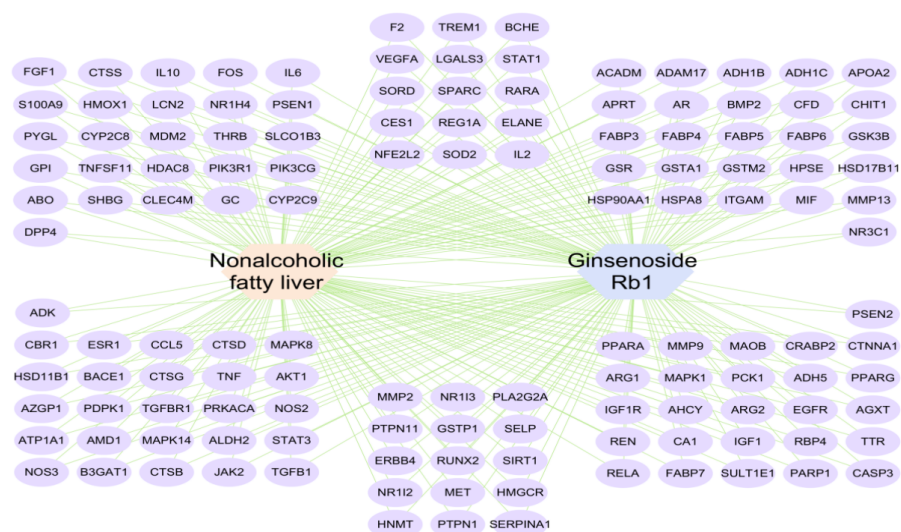


图2 Rb₁-MAFLD共同靶点网络

Fig. 2 Network diagram of ginsenoside Rb₁ and MAFLD common targets

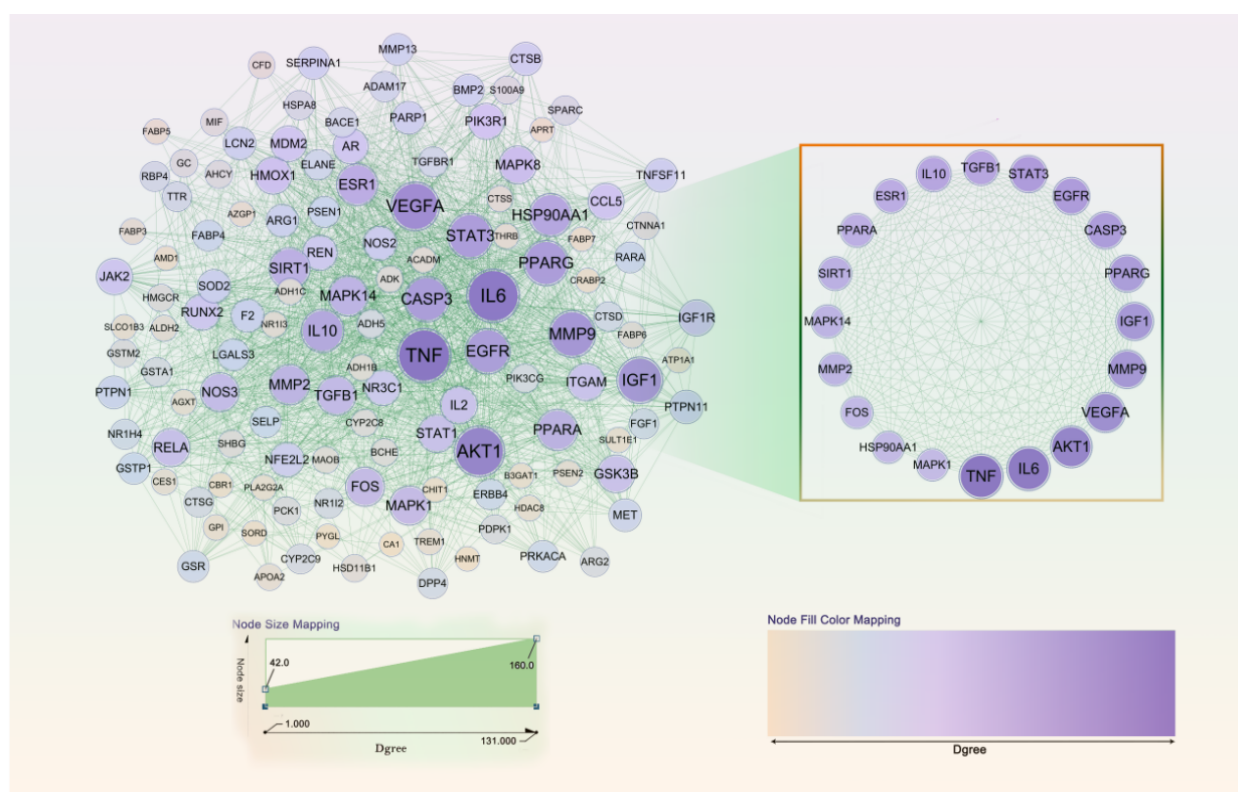


图3 Rb₁抗MAFLD相关靶点的PPI网络

Fig. 3 PPI network diagram of ginsenoside Rb₁ anti MAFLD related targets

胞外区 (extracellular region)、细胞表面 (cell surface)、细胞外泌体 (extracellular exosome) 等; 主要涉及的MF包括脂肪酸结合 (fatty acid binding)、RNA聚合酶II转录因子活性, 配体激活的序列特异性DNA结合 (RNA polymerase II transcription factor activity, ligand-activated sequence-specific DNA

binding)、蛋白磷酸酶结合 (protein phosphatase binding) 等, 见图4-A。KEGG通路富集筛选得到151条信号通路, 显著富集的主要为癌症 (pathways in cancer)、脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic

complications)、癌症中的蛋白聚糖(proteoglycans in cancer)等信号通路,见图4-B。

3.2 Rb₁对MAFLD大鼠的影响

3.2.1 Rb₁对大鼠体质量、肝脏系数与肝功能指标的影响 与对照组比较,模型组大鼠体质量、肝脏系数和血清ALT、AST水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,Rb₁、化滞柔肝颗粒干预后大鼠体质量和血清ALT、AST水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01),肝脏系数有下降趋势,但无统计学意义,见表2。提示Rb₁可在一定程度逆转MAFLD大鼠的肝功能受损。

3.2.2 Rb₁对MAFLD大鼠血清脂质指标的影响 与对照组比较,模型组大鼠血清TC、TG、LDL-C水平显著升高,且HDL-C水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,Rb₁、化滞柔肝颗粒干预后大鼠血清TC、TG、LDL-C和HDL-C水平均显著回调($P<0.05$ 、 0.01),提示Rb₁可纠正高脂诱导的

MAFLD大鼠的血脂异常,见表3。

3.2.3 Rb₁对MAFLD大鼠肝脏病理变化的影响 与对照组比较,模型组大鼠肝脏组织中广泛存在大量肝细胞脂肪变性,胞质疏松且可见多个大小各异的圆形空泡,部分肝细胞肿胀,多处炎症细胞浸润;与模型组比较,Rb₁、化滞柔肝颗粒干预后大鼠肝脏组织中肝细胞脂肪变性明显减轻,肝细胞肿胀有所减少,仅见少量的炎症细胞浸润,见图5。提示Rb₁可改善MAFLD大鼠肝脏组织脂肪变性和抑制炎症反应。

3.2.4 Rb₁对MAFLD大鼠血清炎症因子水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠血清促炎因子TNF- α 、IL-6和TGF- β 1水平显著升高($P<0.01$),抗炎因子IL-10水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,Rb₁、化滞柔肝颗粒干预后大鼠血清TNF- α 、IL-6和TGF- β 1水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01),IL-10水平显著升高($P<0.05$),Rb₁与化滞柔肝颗粒改善效果接近,

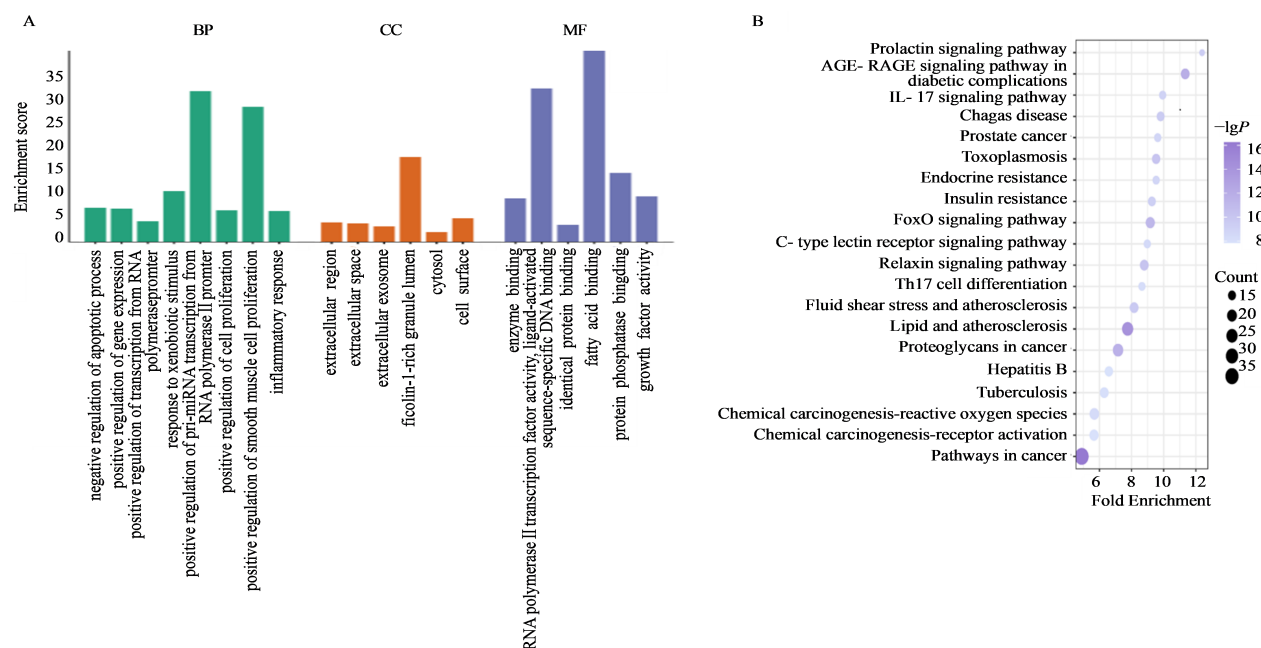


图4 Rb₁治疗MAFLD的GO功能(A)和KEGG通路(B)富集分析

Fig. 4 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment diagram of ginsenoside Rb₁ in treatment of MAFLD

表2 各组大鼠体质量、肝脏系数与肝功能指标($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Body mass, liver coefficient and liver function indexes of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝脏系数/%	体质量/g	ALT/(U·L ⁻¹)	AST(U·L ⁻¹)
对照	—	2.69±0.13	449.42±30.85	42.53±6.08	134.34±8.81
模型	—	3.27±0.25 ^{##}	548.91±31.60 ^{##}	75.48±9.99 ^{##}	191.26±11.79 ^{##}
Rb ₁	0.01	3.11±0.09	502.08±26.42*	61.89±5.24*	156.87±7.28**
化滞柔肝颗粒	2.5	2.14±0.09	492.64±30.04**	62.42±8.63**	160.21±12.80**

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

^{##} $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

表3 各组大鼠血脂水平($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 3 Lipid levels of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.67±0.12	0.54±0.12	0.39±0.07	1.27±0.09
模型	—	3.35±0.47 ^{##}	1.10±0.20 ^{##}	0.84±0.10 ^{##}	0.60±0.08 ^{##}
Rb ₁	0.01	2.81±0.29 ^{**}	0.76±0.10 ^{**}	0.66±0.13 [*]	0.81±0.14 ^{**}
化滞柔肝颗粒	2.5	2.23±0.34 ^{**}	0.72±0.15 ^{**}	0.64±0.12 ^{**}	0.87±0.11 ^{**}

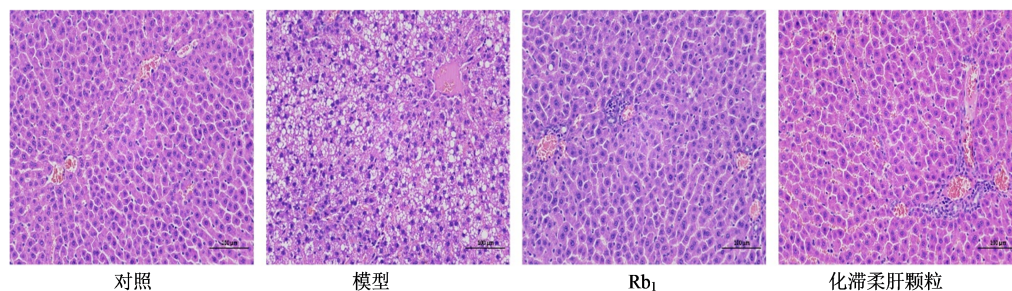
与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图5 各组大鼠肝脏组织病理学观察(HE染色, ×200)

Fig. 5 Histopathological observation of liver in each group of rats (HE staining, ×200)

提示Rb₁可逆转MAFLD大鼠血清异常炎症因子水平,见表4。

3.2.5 Rb₁对MAFLD大鼠肝组织炎症因子mRNA表达水平的影响 结果显示,与对照组比较,模型组大鼠肝组织*TNF-α*、*IL-6*和*TGF-β1*mRNA水平显著升高($P < 0.05$),*IL-10* mRNA水平显著降低($P <$

0.01); Rb₁和化滞柔肝颗粒干预后大鼠肝组织*TNF-α*、*IL-6* mRNA水平显著降低($P < 0.01$)。Rb₁组*IL-10* mRNA水平显著升高($P < 0.05$),*TGF-β1* mRNA水平有下调趋势但无显著性差异。提示Rb₁在抑制MAFLD大鼠肝组织中的炎症反应方面具有一定优势,见表5。

表4 各组大鼠血清炎症因子水平($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 4 Levels of serum inflammatory factors of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TGF-β1/(ng·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	92.78±12.69	40.31±6.30	18.86±2.03	40.44±6.07
模型	—	186.58±13.08 ^{##}	95.15±13.61 ^{##}	46.09±7.53 ^{##}	23.90±5.81 ^{##}
Rb ₁	0.01	150.78±15.14 ^{**}	71.48±10.56 ^{**}	36.24±7.84 [*]	33.29±5.91 [*]
化滞柔肝颗粒	2.5	146.22±10.15 ^{**}	67.04±14.20 ^{**}	34.20±7.93 ^{**}	31.91±6.70 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group表5 各组大鼠肝组织炎症因子mRNA水平($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 mRNA levels of liver inflammatory factors of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量			
		<i>TNF-α</i>	<i>IL-6</i>	<i>TGF-β1</i>	<i>IL-10</i>
对照	—	1.07±0.13	1.08±0.09	0.94±0.05	1.03±0.07
模型	—	1.86±0.13 ^{##}	1.99±0.19 ^{##}	1.69±0.10 ^{##}	0.58±0.10 ^{##}
Rb ₁	0.01	1.51±0.14 ^{**}	1.53±0.10 ^{**}	1.59±0.08	0.74±0.09 [*]
化滞柔肝颗粒	2.5	1.60±0.14 ^{**}	1.47±0.10 ^{**}	1.47±0.07 ^{**}	0.66±0.09

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

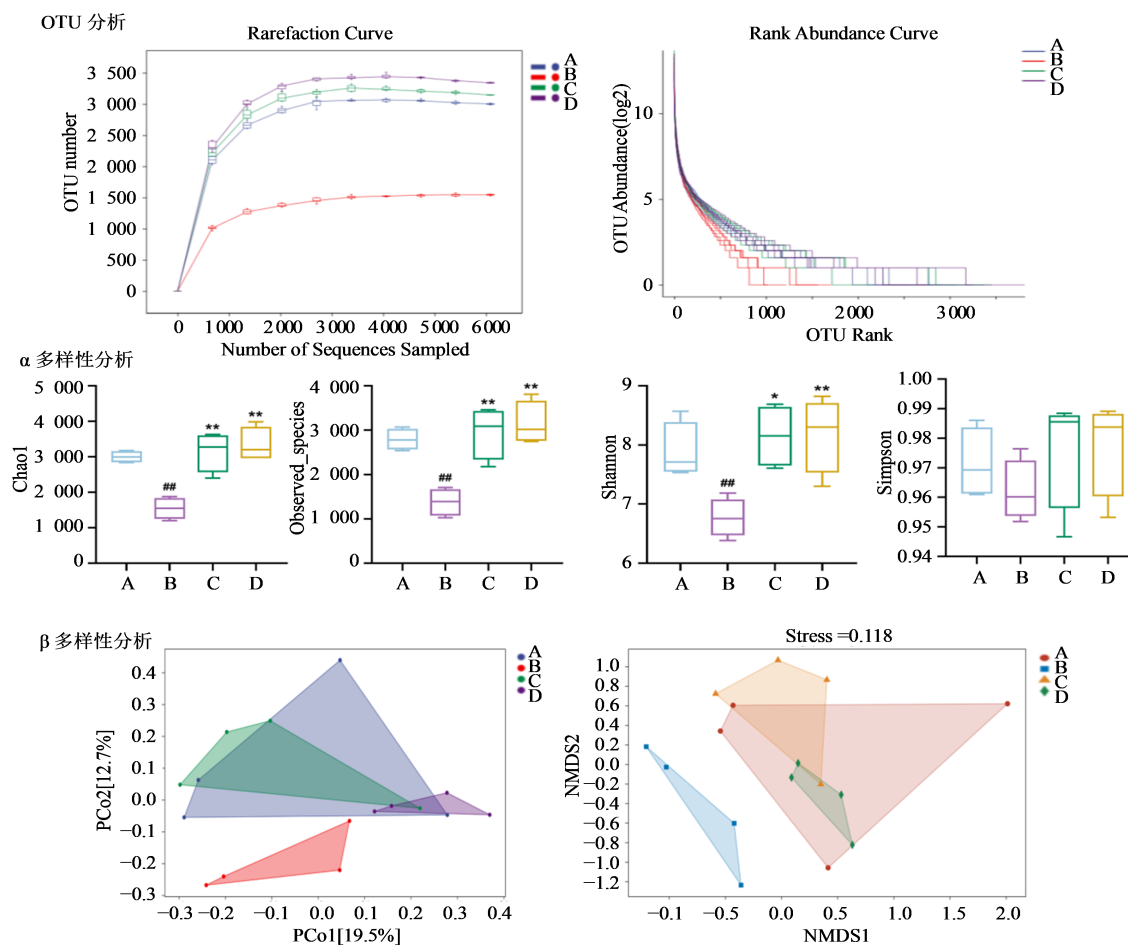
3.2.6 Rb₁对MAFLD大鼠肠道菌群的影响 为了说明测序深度的合理性做稀疏曲线,结果显示当前测序数据的量已足够反映当前样本的物种多样性信息;平缓的丰度等级曲线表明群落中OTU之间的丰度变化较小,物种均匀度较高,见图6。

通过 α 多样性指数 Chao1、Observed Species、Shannon 和 Simpson 评估各组大鼠肠道菌群的多样性和丰度。结果显示,Rb₁和化滞柔肝颗粒干预后在不同程度逆转 MAFLD 大鼠 Chao1、Observed Species 和 Shannon 多样性指数($P<0.05$),Simpson 多样性指数在模型组及各给药组均无明显变化趋势,提示Rb₁可上调MAFLD大鼠肠道菌群的丰富度以及多样性,见图6。

β 多样性分析指对不同样品的肠道菌群结构进行比较分析。在本研究中通过主坐标分析(PCoA)和非量度多维尺度分析(NMDS)来研究各组大鼠肠道菌群的相似性或差异性。结果显示对照组和模

型组的样本明显分离,表明MAFLD大鼠的肠道菌群发生明显变化;Rb₁和化滞柔肝颗粒干预后大鼠肠道菌群的分布有向对照组迁移的趋势,提示Rb₁对MAFLD大鼠肠道菌群结构组成有一定的调节作用,见图6。

在门水平上,厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)和变形菌门(Proteobacteria)为优势菌,其中厚壁菌门所占比例最高。与对照组相比,模型组大鼠厚壁菌门相对丰度和厚壁菌门与拟杆菌门比值(F/B)显著上调而拟杆菌门的相对丰度显著下调($P<0.05$);Rb₁和化滞柔肝颗粒干预后拟杆菌门相对丰度和F/B显著回调($P<0.05$),厚壁菌门相对丰度有下调趋势但无显著差异,见图7。在属水平上,与MAFLD相关的前四种优势菌分别为乳杆菌属(*Lactobacillus*),普氏菌属(*Prevotella*),布劳特氏菌属(*Blautia*)和脱硫弧菌(*Desulfovibrio*)。MAFLD造模下调了乳杆菌属、普氏菌属和布劳特



A-对照组;B-模型组;C-Rb₁组;D-化滞柔肝颗粒组

A-control group; B-model group; C-Rb₁ group; D-Huazhirougan Granule group

图6 各组大鼠肠道菌群多样性分析

Fig. 6 Analysis of diversity of gut microbiota of rats in each group

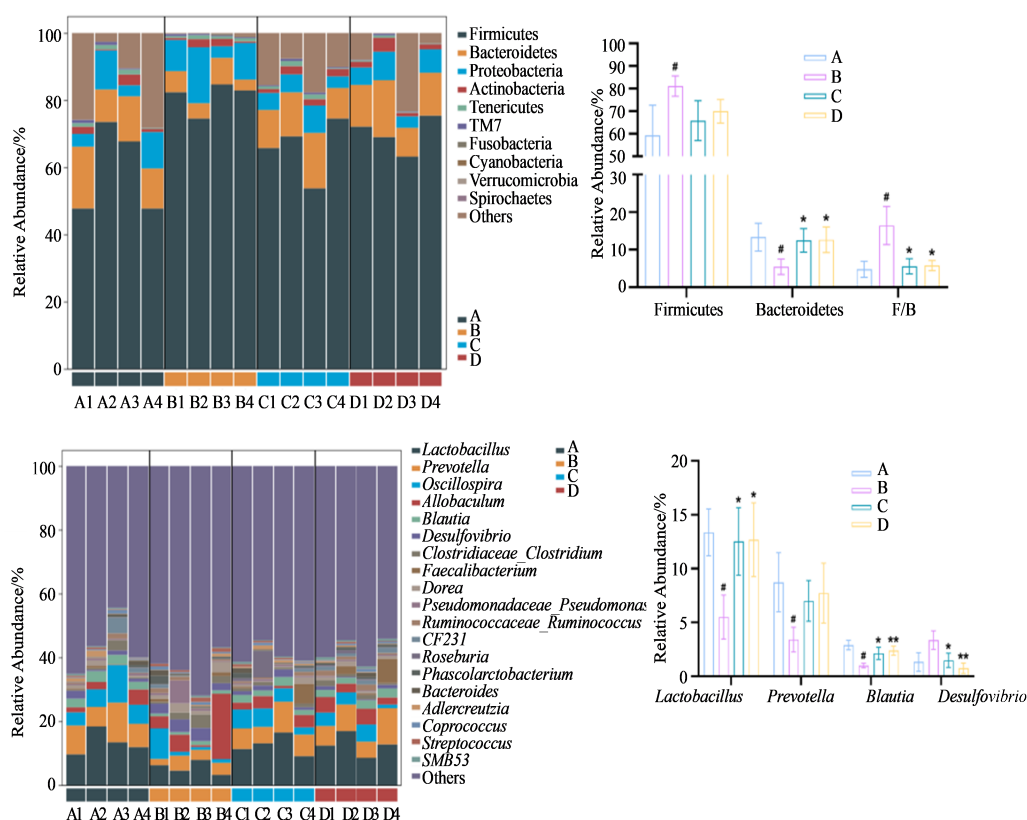
氏菌属且上调了脱硫弧菌的相对丰度($P<0.05$); Rb_1 和化滞柔肝颗粒干预显著逆转了乳杆菌属、布劳特氏菌属和脱硫弧菌相对丰度的变化($P<0.05$), 普氏菌属相对丰度有上调趋势但无显著差异, 见图7。

3.2.7 肠道菌群与血脂、炎症相关指标的相关性分析 选择与血脂、炎症反应相关的指标, 根据Spearman相关系数绘制大鼠门、属水平肠道菌群和血脂、炎症相关指标的关联热图。结果显示, 在门水平上厚壁菌门丰度与TC、TG、LDL-C、IL-6、TNF- α 、TGF- β 1呈显著性正相关, 与HDL-C、IL-10呈显

著性负相关; 拟杆菌门与TC、TG、IL-6、TGF- β 1呈显著性负相关, 与抗炎因子IL-10呈显著性正相关, 见图8-A。在属水平上乳杆菌属、普氏菌属和布劳特氏菌属与大多数血脂因子和促炎因子呈显著性负相关; 与IL-10呈显著性正相关; 而条件致病菌脱硫弧菌属丰度与TC、IL-6呈显著性正相关, 与HDL-C呈显著性负相关, 见图8-B。

4 讨论

在众多关于MAFLD的发病机制理论中, “二次打击”学说是学者们普遍认可的。由于胰岛素抵抗致使血液中过量的脂肪酸被运输并沉积在肝脏中,



A-对照组; B-模型组; C- Rb_1 组; D-化滞柔肝颗粒组

A-control group; B-model group; C- Rb_1 group; D-Huazhirougan Granule group

图7 各组大鼠肠道菌群的分类组成和差异菌分析

Fig. 7 Classification composition and differential bacterial analysis of GM in each group of rats

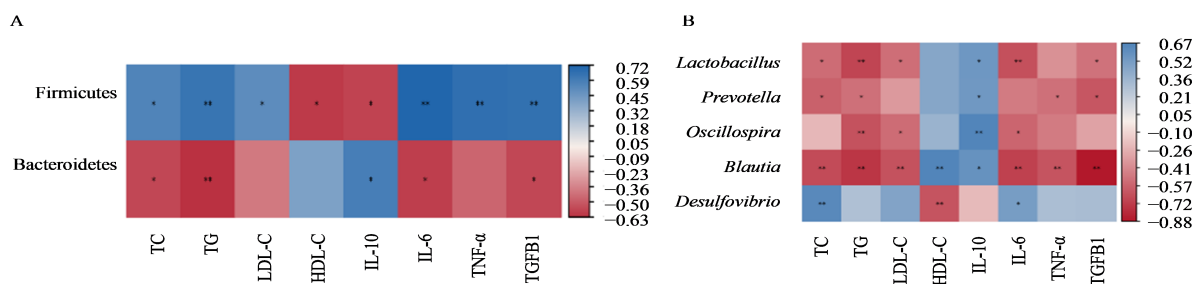


图8 相关性分析(A-门水平; B-属水平)

Fig. 8 Correlation analysis (A-phyllum level; B-genus level)

从而导致肝脏脂肪变性,这是“第一次打击”^[22-23]。肝脏长期的脂肪沉积过多可诱发内质网应激、线粒体功能障碍、氧化应激和炎症因子的过度分泌,导致肝细胞损伤加重,促进MAFLD发展为NASH,这是“第二次打击”^[24]。因此,纠正脂质代谢、抑制炎症反应和抗氧化是治疗MAFLD的有效治疗策略。皂苷是苷元为三萜或螺旋甾烷类化合物的一类糖苷,具有抗氧化、抗癌、抗炎、护肝、防治心血管疾病等多种药理作用^[25-27]。Rb₁是一种四环三萜皂苷,已有研究证明其可通过激活机体能量平衡感应器AMPK改善MAFLD大鼠的肝脏脂质沉积^[28]。在体外实验中,Rb₁还可改善脂肪细胞3T3-L1的脂质积累,从而改善胰岛素抵抗^[29]。本研究整合网络药理学和体内动物实验,预测并验证Rb₁抗MAFLD的靶点及机制,为Rb₁抗MAFLD的深入研究和合理临床应用提供理论依据。

本研究发现,Rb₁抗MAFLD的关键作用靶点有TNF、IL-6、AKT1、VEGFA、MMP9、IGF1、PPARG、CASP3、EGFR、STAT3、TGFβ1、IL-10。以上靶点多与炎症相关,提示Rb₁可能通过抑制炎症反应发挥抗MAFLD的作用。代谢紊乱和胰岛素抵抗可诱发机体内的慢性炎症,慢性炎症是MAFLD形成与发展的主要驱动因素^[30]。TNF-α是增强肝脏炎症和纤维化的关键促炎细胞因子,在多种肝脏类疾病中如MAFLD、NASH、HC、HCC均能观察到TNF-α表达水平升高^[31-33]。当肝脏存在炎症变化时,血清TNF-α水平升高,并促进肝脏脂质沉积和上调肝脏组织中TNF-α表达,加重肝细胞损伤^[34]。IL-6作为一种典型的炎症因子,参与代谢稳态、肝脏疾病以及胃肠道疾病等多种病理生理过程,有研究表明其与肝细胞损伤程度呈正相关^[35]。TGF-β1是一类与肝脏炎症呈强烈正相关的促纤维化细胞因子,炎症导致肝星状的激活,从而加速肝纤维化的进展^[36]。IL-10是一种具有免疫抑制功能的细胞因子,可通过抑制巨噬细胞分泌炎症因子发挥抗炎功能^[37-38]。有研究发现IL-10的缺失会导致血脂代谢紊乱、胰岛素抵抗、炎症的发生^[39]。与预期结果一致,在本研究中,Rb₁可有效逆转MAFLD大鼠血清与肝脏中炎症因子TNF-α、IL-6、TGF-β1和IL-10的变化趋势。

作为与宿主共同进化的重要组成组分,肠道菌群稳态失调可诱导多种病理异常。有研究表明其可通过调节脂质代谢和炎症反应参与MAFLD的发生发展,且在很大程度上受到饮食的影响^[40-41],且越来越多的药物以肠道菌群为靶点治疗多种疾病^[42-43]。

低α多样性和F/B的增加通常用作评估血脂代谢异常的特征,通常在MAFLD治疗后逆转,是多种代谢性疾病的重要指标^[44-45]。Rb₁有助于恢复MAFLD大鼠中肠道菌群多样性与F/B。乳杆菌属、布劳特氏菌属均具有调节脂质代谢紊乱和抗炎作用,可抑制IL-6、TNF-α的过度分泌,在MAFLD中发挥益生菌的作用^[46-47]。脱硫弧菌属促进内毒素产生,破坏肠道屏障功能并诱导全身炎症反应,在MAFLD患者中通常表现为更高的丰度^[48-49]。在本研究中,Rb₁干预增加了乳杆菌属、布劳特氏菌属的丰度,下调了脱硫弧菌属,与以往研究得出相同结论。最后进行了差异菌群和网络药理学筛选出来的炎症靶点的相关性分析,结果表明有害菌厚壁菌门和脱硫弧菌属的丰度与IL-6、TNF-α和TGF-β1呈显著性正相关,与IL-10呈显著性负相关;而益生菌拟杆菌门、乳酸菌属、普氏菌属和布劳特氏菌属与IL-6、TNF-α和TGF-β1呈显著性负相关,与IL-10呈显著性正相关。因此,推测Rb₁可能通过重塑肠道菌群从而改善血脂紊乱与炎症反应,从而发挥MAFLD保护作用,而MAFLD大鼠中菌群结构、血脂代谢与炎症因子水平的有利变化有力的支持了本观点。然而,需要进一步的定向重塑肠道菌群研究来验证Rb₁重塑肠道菌群治疗MAFLD的机制,以深入探究肝-肠轴的联系,有助于为MAFLD干预治疗提供新的见解。

本研究结果表明,Rb₁可以恢复高脂饮食引起的肠道菌群失调,调节脂质代谢并抑制炎症反应,从而减轻肝脏病理损害,达到延缓MAFLD进展的目的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Younossi Z M, Koenig A B, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [2] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018年更新版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(5): 947-957.
Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association, Fatty Liver Expert Committee, Chinese Medical Doctor Association. Guidelines of prevention and treatment for nonalcoholic fatty liver disease: A 2018 update [J]. *J Clin Hepatol*, 2018, 34(5): 947-957.
- [3] 陈智伟, 孙华. Nrf2: 非酒精性脂肪性肝病的新靶点 [J]. *药理学学报*, 2022, 57(11): 3268-3275.
Chen Z W, Sun H. Nrf2: A new target for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Acta Pharm Sin*, 2022, 57(11):

- 3268-3275.
- [4] Sheka A C, Adeyi O, Thompson J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis [J]. JAMA, 2020, 323(12): 1175.
- [5] Gosis B S, Wada S, Thorsheim C, et al. Inhibition of nonalcoholic fatty liver disease in mice by selective inhibition of mTORC1 [J]. Science, 2022, 376(6590): eabf8271.
- [6] Younossi Z M. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective [J]. J Hepatol, 2019, 70 (3): 531-544.
- [7] Brouwers M C G J, Simons N, Stehouwer C D A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: Assessing the evidence for causality [J]. Diabetologia, 2020, 63(2): 253-260.
- [8] Adams L A, Anstee Q M, Tilg H, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases [J]. Gut, 2017, 66 (6): 1138-1153.
- [9] Agus A, Clément K, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders [J]. Gut, 2021, 70(6): 1174-1182.
- [10] Grice E A, Segre J A. The human microbiome: Our second genome [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2012, 13: 151-170.
- [11] Wu Q B, Chen Z H, Ding Y, et al. Protective effect of traditional Chinese medicine on non-alcoholic fatty liver disease and liver cancer by targeting ferroptosis [J]. Front Nutr, 2022, 9: 1033129.
- [12] Guo K X, Xu S S, Zeng Z F. "Liver-gut" axis: A target of traditional Chinese medicine for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 1050709.
- [13] Zhou H L, Ma C, Wang C, et al. Research progress in use of traditional Chinese medicine monomer for treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 898: 173976.
- [14] Shao M M, Lu Y F, Xiang H J, et al. Application of metabolomics in the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease and the treatment of traditional Chinese medicine [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 971561.
- [15] Zhou P, Xie W J, He S B, et al. Ginsenoside Rb1 as an anti-diabetic agent and its underlying mechanism analysis [J]. Cells, 2019, 8(3): 204.
- [16] Kang N X, Gao H W, He L, et al. Ginsenoside Rb1 is an immune-stimulatory agent with antiviral activity against enterovirus 71 [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 266: 113401.
- [17] Jiang L J, Yin X J, Chen Y H, et al. Proteomic analysis reveals ginsenoside Rb1 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting ROS production from mitochondrial complex I [J]. Theranostics, 2021, 11 (4): 1703-1720.
- [18] Gong L, Yin J Y, Zhang Y, et al. Neuroprotective mechanisms of ginsenoside Rb1 in central nervous system diseases [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 914352.
- [19] Li Y R, Zhang S C, Zhu Z W, et al. Upregulation of adiponectin by Ginsenoside Rb1 contributes to amelioration of hepatic steatosis induced by high fat diet [J]. J Ginseng Res, 2022, 46(4): 561-571.
- [20] Song B, Sun Y, Chu Y F, et al. Ginsenoside Rb1 alleviated high-fat-diet-induced hepatocytic apoptosis via peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. BioMed Res Int, 2020, 2020: 1-9.
- [21] Zou H, Zhang M, Zhu X T, et al. Ginsenoside Rb1 improves metabolic disorder in high-fat diet-induced obese mice associated with modulation of gut microbiota [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 826487.
- [22] Stefan N, Cusi K. A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2022, 10(4): 284-296.
- [23] Muzurović E, Mikhailidis D P, Mantzoros C. Non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance, metabolic syndrome and their association with vascular risk [J]. Metabolism, 2021, 119: 154770.
- [24] Tilg H, Adolph T E, Dudek M, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: The interplay between metabolism, microbes and immunity [J]. Nat Metab, 2021, 3(12): 1596-1607.
- [25] 陈少影, 李晶晶, 兰卫. 常用中药有效成分降脂作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(13): 241-253.
- Chen S Y, Li J J, Lan W. Lipid-lowering effect of active components in common Chinese medicine: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(13): 241-253.
- [26] 蔡强, 于婷, 唐海蛟, 等. 人参皂苷 Rh2 调节 TNF/MAPK 和 NF- κ B 信号通路抑制 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞活化 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(8): 1047-1054.
- Cai Q, Yu T, Tang H J, et al. Ginsenoside Rh2 regulates TNF/MAPK and NF- κ B signaling pathway to inhibit TGF- β 1 induced activation of LX-2 cells [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2022, 33(8): 1047-1054.
- [27] 郑恒, 张聪子, 徐金军, 等. 黄芪皂苷对病毒性心肌炎大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(23): 3521-3526.
- Zheng H, Zhang C Z, Xu J J, et al. Effects of saponins of astragalus on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and cardiomyocytes apoptosis in rats with viral myocarditis [J]. Chin J Nosocomiol, 2022, 32(23): 3521-3526.
- [28] Shen L, Xiong Y, Wang D Q H, et al. Ginsenoside Rb1

- reduces fatty liver by activating AMP-activated protein kinase in obese rats [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(5): 1430-1438.
- [29] Park S, Ahn I S, Kwon D Y, et al. Ginsenosides Rb1 and Rg1 suppress triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes and enhance β -cell insulin secretion and viability in Min6 Cells via PKA-dependent pathways [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(11): 2815-2823.
- [30] Wang H, Mehal W, Nagy L E, et al. Immunological mechanisms and therapeutic targets of fatty liver diseases [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(1): 73-91.
- [31] Govaere O, Martinez-Lopez N, Petersen S K, et al. Macrophage scavenger receptor 1 mediates lipid-induced inflammation in human obesity-related non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2020, 73: S20-S21.
- [32] Wu L, Yang F R, Xing M L, et al. Multi-material basis and multi-mechanisms of the Dahuang Zhechong pill for regulating Treg/Th1 balance in hepatocellular carcinoma [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154055.
- [33] Wijesundera K K, Izawa T, Tennakoon A H, et al. M1-/M2-macrophage polarization in pseudolobules consisting of adipophilin-rich hepatocytes in thioacetamide (TAA)-induced rat hepatic cirrhosis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(1): 133-142.
- [34] Jiang H, Mao T Y, Liu Y Y, et al. Protective effects and mechanisms of Yincheng Lingui Zhugan Decoction in HFD-induced nonalcoholic fatty liver disease rats based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 908128.
- [35] Giraldez M D, Carneros D, Garbers C, et al. New insights into IL-6 family cytokines in metabolism, hepatology and gastroenterology [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(11): 787-803.
- [36] Ahmed H, Umar M I, Imran S, et al. TGF- β 1 signaling can worsen NAFLD with liver fibrosis backdrop [J]. *Exp Mol Pathol*, 2022, 124: 104733.
- [37] Shi H Z, Guo J B, Yu Q Y, et al. CRISPR/Cas9 based blockade of IL-10 signaling impairs lipid and tissue homeostasis to accelerate atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 999470.
- [38] 苏洁之, 郑武平, 陈国平, 等. miRNA-186 调控 CDK6 和 IL-10 表达抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生长与转移机制的研究 [J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(3): 236-240.
- Su J Z, Zheng W P, Chen G P, et al. The inhibition of the cell growth and metastasis of breast cancer cell strain MCF-7 by miRNA-186 targeting CDK6 and IL-10 [J]. *Immunol J*, 2019, 35(3): 236-240.
- [39] Wu B N, Kuo K K, Chen Y H, et al. Theophylline-based KMUP-1 improves steatohepatitis via MMP-9/IL-10 and lipolysis via HSL/p-HSL in obese mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): 1345.
- [40] Ni Y M, Lu M N, Xu Y A, et al. The role of gut microbiota-bile acids axis in the progression of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 908011.
- [41] Forlano R, Sivakumar M, Mullish B H, et al. Gut Microbiota-A Future Therapeutic Target for People with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review [J]. *Inter J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8307.
- [42] 张艳鹤, 郑亚云, 芦超, 等. 余甘子鞣质对代谢相关脂肪性肝病小鼠脂质代谢及肠道菌群的调节作用 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(2): 287-293.
- Zhang Y H, Zheng Y Y, Lu C, et al. Effect and mechanism of tannin part of *Phyllanthus emblica* on lipid metabolism and intestinal flora in MAFLD mice [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(2): 287-293.
- [43] 郑礼胜, 邵文, 兰新新, 等. 基于肠道菌群新靶点的中药防治糖尿病研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(8): 1173-1181.
- Zheng L S, Tai W, Lan X X, et al. Research progress on traditional Chinese medicine against diabetes based on intestinal flora new targets [J]. *Drug Eval Res*, 2017, 40(8): 1173-1181.
- [44] Verhaar B J H, Prodan A, Nieuwdorp M, et al. Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: A review [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 2982.
- [45] Boulangé C L, Neves A L, Chilloux J, et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease [J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 1-12.
- [46] Li Y, Zhao D Y, Qian M Y, et al. Amlodipine, an anti-hypertensive drug, alleviates non-alcoholic fatty liver disease by modulating gut microbiota [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(9): 2054-2077.
- [47] Li Y D, Li J W, Su Q F, et al. Sinapine reduces non-alcoholic fatty liver disease in mice by modulating the composition of the gut microbiota [J]. *Food Funct*, 2019, 10(6): 3637-3649.
- [48] Zhang X L, Chen L, Yang J, et al. Vitamin D alleviates non-alcoholic fatty liver disease via restoring gut microbiota and metabolism [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1117644.
- [49] Yang Y F, Li M X, Wang Q, et al. *Pueraria lobata* starch regulates gut microbiota and alleviates high-fat high-cholesterol diet induced non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Food Res Int*, 2022, 157: 111401.