

基于网络药理学和分子对接分析二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制及实验验证

董梦雪, 李涛, 赵泽宇, 王瑾源, 刘海朝, 张翟轶*

天津中医药大学 中西医结合学院, 天津 301600

摘要: **目的** 应用网络药理学和分子对接方法预测二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的相关作用靶点以及潜在的作用机制, 并进行实验验证。 **方法** 检索中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 筛选出二至丸的有效成分以及作用靶点, 通过检索 GEO 数据库得到代谢相关脂肪性肝病的相关差异基因。利用 Cytoscape 3.7.2 软件进行调控网络以及蛋白相互作用 (PPI) 网络的构建, 利用 R 包开展基因本体 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 分析, 并利用 AutoDockTools 软件进行分子对接验证。分别用不同浓度 (0.1、0.5、1、5、10、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 二至丸醇提物培养液作用于肝细胞 L02, 根据吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖率。将肝细胞 L02 分为对照组、模型组、二至丸醇提物各剂量 (1、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组, 采用油红 O 染色法, 通过显微镜进一步观察各组细胞内的脂滴堆积情况。采用酶标仪测定各组细胞内总三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的含量, 并以 qPCR 法检测肝细胞 L02 白细胞介素-6 (IL-6) 和 JUN mRNA 表达情况。 **结果** 共筛选出二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病 11 个主要的靶点基因和 12 个活性成分, GO 功能富集提示治疗代谢相关脂肪性肝病的生物学过程主要有急性期反应、调节血管生成、神经炎症反应的调节等; KEGG 通路主要涉及晚期糖基化终末化产物 (AGE)-晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路外, 还作用于 C 型凝集素受体信号通路、白细胞介素 (IL)-17 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路和 Toll 样受体信号通路等; 分子对接验证结果显示, 木犀草素、槲皮素、 β -类固醇、山柰酚与转录因子 AP-1 (JUN)、IL-6 能稳定结合。实验表明, 二至丸可以显著改善代谢相关脂肪性肝病模型的肝细胞 L02 的脂质堆积以及炎症反应。 **结论** 二至丸 2 味药中的木犀草素、槲皮素、 β -类固醇、山柰酚在抗氧化应激、炎症相关通路下, 作用于前列腺素内过氧化物酶 2 (PTGS2)、透明质酸合酶 2 (HAS2)、JUN、IL-6 等靶点发挥对代谢相关脂肪性肝病的治疗作用。

关键词: 二至丸; 代谢相关脂肪性肝病; 网络药理学; 木犀草素; 槲皮素; β -谷甾醇; 山柰酚; 白细胞介素-6; 转录因子 AP-1

中图分类号: R975 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)01-0037-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.01.006

Mechanism and experimental verification of Erzhi Pills in treatment of metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease based on network pharmacology and molecular docking analysis

DONG Meng-xue, LI Tao, ZHAO Ze-yu, WANG Jin-yuan, LIU Hai-chao, ZHANG Zhai-yi

College of Integrated Chinese and Western Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China

Abstract: Objective To predicted the relevant targets and potential mechanisms of action of Erzhi Pills in treatment of metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease by network pharmacology and molecular docking methods. **Methods** The active components and targets of Erzhi Pills were screened by searching the TCM Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the differential genes related to metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease were obtained by searching GEO database. Cytoscape 3.7.2 software was used to construct regulatory networks and protein interaction networks. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis were carried out using R package, and molecular docking verification was performed using AutoDockTools software. Hepatocyte L02 was treated with alcohol extract medium with different concentrations (0.1,

收稿日期: 2022-10-07

基金项目: 天津中医药大学中西医结合学院 2020 年度研究生创新基金 (ZYXCXLX202017)

作者简介: 董梦雪, 研究生, 研究方向为糖脂代谢中医药研究。E-mail: 1969886936@qq.com

*通信作者: 张翟轶, 硕士生导师, 从事糖脂代谢的中医药研究。E-mail: 3461285155@qq.com

0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of Erzhi Pills, and cell proliferation rate was calculated according to the value of absorbance (A). Hepatocytes L02 were divided into control group, model group, and Erzhi Pills alcohol extract (1, 2, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) groups. Oil red O staining method was used to observe the accumulation of lipid droplets in each group. The contents of total triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL-C), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in each group were determined by enzyme-labeled instrument. mRNA expressions of L02 interleukin-6 (IL-6) and JUN were detected by qPCR. **Results** Eleven potential target genes and 12 active components were screened out for Erzhi Pills in treatment of metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease GO enrichment suggested that the biological process of treatment for metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease mainly includes acute phase reaction, regulation of angiogenesis, and regulation of neuroinflammatory response. KEGG pathway mainly involves AGE- RAGE signaling pathway, C-type lectin receptor signaling pathway, IL-17 signaling pathway, TNF signaling pathway, and Toll-like receptor signaling pathway, etc. Molecular docking verification results showed that luteolin, quercetin, β -steroid, kaempferol could stably bind JUN and IL-6. The experiment showed that Erzhi Pills can significantly improve the lipid accumulation and inflammatory response of liver cells L02 in the model of metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease. **Conclusion** Luteolin, quercetin, β -steroid, and kaempferol in Erzhi Pills on the targets of peroxidase 2 (PTGS2), hyaluronic acid synthase 2 (HAS2), transcription factor AP-1 (JUN), and IL-6 in the anti-oxidative stress and inflammation-related pathways to exert the therapeutic effect on metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease.

Key words: Erzhi Pills; metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease; network pharmacology; luteolin; quercetin; β -sitosterol; kaempferol; JUN; IL-6

代谢相关脂肪性肝病是世界范围内重要的肝病之一，在未来几十年可能成为终末期肝病的主要病因，成人和儿童均可发生代谢相关脂肪性肝病^[1]。代谢相关脂肪性肝病是一种由代谢相关脂肪性肝病到代谢相关脂肪性肝病炎的肝异常病变，具有可变的病程，可导致肝硬化和肝癌^[2]。代谢相关脂肪性肝病的特征是非饮酒引起的肝脏脂肪沉积过多^[3]，最常见的危险因素包括肥胖、胰岛素抵抗和代谢综合征^[4]。调查研究显示，美国 2015 年代谢相关脂肪性肝病患者达到 8 310 万例（约占人口的 25%），预计 2030 年将达到 1.009 亿例^[5]。由于代谢相关脂肪性肝病及其晚期的代谢相关脂肪性肝病炎对世界卫生的影响越来越大，严重影响人们的生活，且发病人群日趋年轻化，因此引起了人们的极大兴趣。二至丸出自清代汪昂所著的《医方集解》，其用药组成及其配比为女贞子和墨旱莲 1:1 构成，归肝、肾经，主治肝肾阴虚、口苦咽干、头昏眼花、失眠多梦、腰膝酸软、下肢痿软、遗精、早年发白等。二至丸临床用于治疗妇科疾病^[6-8]、皮肤病^[9-11]、血液疾病^[12]、肾脏疾病^[13-14]、肝脏疾病^[15]等且效果较好。本研究采用网络药理学和分子对接方法^[16]，探究二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制和分子靶点，并进行实验验证。

1 材料与方法

1.1 筛选二至丸活性成分及相关靶点

在中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)，以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药

性 (DL) ≥ 0.18 作为筛选条件，对二至丸的 2 味药女贞子、墨旱莲分别进行了活性成分和相关靶点的筛选。

1.2 筛选代谢相关脂肪性肝病相关靶点

代谢相关脂肪性肝病患者差异表达基因来自 GEO 数据库。以 P 值 < 0.005 、 $|\log_2\text{FC}| > 1$ 的基因作为具有显著差异表达及其靶基因。

1.3 蛋白相互作用 (PPI) 网络及网络拓扑分析

采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建并可视化二至丸的有效成分的靶点网络。利用 Cytoscape 插件 CytoNCA 计算其中心性 (DC) > 14 以及间中心性 (BC) $> 33.831\ 684$ 来筛选相互作用网络中具有拓扑重要性的节点^[17]。

1.4 基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

利用 DAVID 数据库进行 GO 分析，包括生物过程 (BP)、细胞成分 (CC) 和分子功能 (MF)，进行注释、可视化和集成发现，筛选前 20 个条目。采用 DAVID 的 KEGG 数据库进行通路分析。找出伪发现率 (FDR) < 0.05 显著变化通路进一步分析。

1.5 核心成分与关键靶基因的分子对接验证

选取分子对接的靶蛋白，并借助 PDB 数据库获取蛋白的 3D 结构；使用 ChemDraw20.0 构建二至丸中筛选的有效成分木犀草素、槲皮素、 β -谷甾醇、山柰酚等的二维结构，用 Chem3D20.0 转换为 3D 结构，用 AutodockTools15.6 软件和 PyMOL 软件进行分子对接和结果分析^[18]。

2 实验验证

2.1 材料

2.1.1 实验细胞 人肝细胞 L02 由天津中医药大学边育红教授组赠予。细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 置于 37 °C、5% CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养。

2.1.2 药品与试剂 二至丸醇提物由天津中医药大学中医药研究院制备。MTT (批号 M8180)、1640 培养基 (批号 C11875500BT)、胰蛋白酶 (批号 25200072) 购自美国 Gibco 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (批号 DP419)、FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 (批号 KR116-02) 购自北京天根生化科技有限公司; Servicebio™2×SYBR Green qPCR Master Mix (None ROX, 批号 G3320) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司; 油红 O 染色液 (批号 G1262) 购自北京索莱宝生物科技有限公司。

2.1.3 仪器 311 型 CO₂ 细胞培养箱、MK3 型多功能读板机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5418 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); E200 型荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); JJQ5 型荧光定量 PCR 仪 (美国伯乐 BIO-RAD 公司); K5500 型超微量紫外分光光度仪 (北京凯奥公司)。

2.2 方法

2.2.1 MTT 法检测细胞活性 将对数生长的肝细胞 L02 以每孔 3×10⁴ 细胞/mL 接种于 96 孔板。待细胞贴壁后, 加入不同质量浓度二至丸醇提物 0.1、0.5、1、5、10、50、100、200 μg/mL 培养液 100 μL, 每个浓度设 5 个平行孔, 培养 24 h 后, 加入配制好的 5 mg/mL MTT 试剂, 10 μL/孔, 在培养箱中继续孵育 4 h, 吸去培养上清液后每孔加入 DMSO, 150 μL/孔, 放置于摇床上低速避光震荡 10 min, 使结晶物充分溶解。用酶标仪测定 490 nm 处每孔吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖率。

$$\text{增殖率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}})$$

式中 A_{空白} 为空白组 (细胞、含血清的培养基、MTT) A 值, A_{实验} 为实验组 (细胞、含血清的培养基、不同浓度的药物、MTT) A 值, A_{阴性} (MTT) A 值

2.2.2 油红 O 染色 L02 肝细胞接种至 6 孔板中, 24 h 后给予细胞不同干预处理。将 L02 肝细胞分为对照组、模型组、二至丸醇提物各剂量 (1、2、4 μg/mL) 组。除对照组外, 模型组加入 0.35 mmol/L 游离脂肪酸干预; 二至丸组加入不同浓度二至丸醇提物进行干预。24 h 后去除培养基, PBS 冲洗细胞,

ORO Fixative 固定 30 min; 弃去固定液, 蒸馏水洗涤后加入 60% 异丙醇分化 5 min; 使用新配的 ORO Stem 染色 20 min; 弃去染液, 水洗 2~5 次, 直至没有多余染液; 加入 Mayer 苏木素染液, 复染核 2 min, 弃去染液水洗 2~5 次; 加 ORO Buffer 1 min; 加入双蒸水于倒置显微镜下拍照观察。

2.2.3 肝功能及脂质代谢相关指标检测 收集 L02 细胞于 EP 管中, 加入裂解液, 超声破碎, 按说明书以酶标仪测定细胞内总三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的含量。

2.2.4 qPCR 法检测 L02 肝细胞白细胞介素 (IL)-6 和转录因子 AP-1 (JUN) mRNA 表达 L02 肝细胞接种至 6 孔板中, 24 h 后给予细胞不同干预处理, 细胞分组同 2.2.2 项下。收集细胞, 用裂解液裂解细胞, 按照试剂盒说明书步骤提取 RNA, 检测 RNA 的纯度; 按照 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行翻转获得 cDNA, 逆转录条件: 42 °C 15 min、95 °C 5 min。以 cDNA 为模板, β-actin 为内参基因, 按照 Servicebio™2×SYBR Green qPCR Master Mix (None ROX) 试剂盒说明书步骤采用 qPCR 法检测目的基因的表达, 反应条件: 预变性 95 °C、30 s, 变性 95 °C、15 s, 退火 65 °C、10 s, 延伸 72 °C、30 s, 40 个循环。扩增反应后进行溶解曲线分析, 排除非特异性扩增。目的基因相对表达采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。每组设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。引物序列为 IL-6: 正向 5'-GCAGAAAA AGGTGGGTGTGT-3', 反向 5'-GCAGAAGAGAGC CAACCAAC-3'; JUN: 正向 5'-CCCCAAGATCCT GAAACAGA-3', 反向 5'-CCGTTGCTGGACTGGA TTAT-3'; β-actin: 正向 5'-CCACGAAACTACCTTC AACTCC-3', 反向 5'-GTGATCTCCTTCTGCATCC TGT-3', 引物由安徽通用生物工程公司合成。

2.2.5 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和重复测量资料方差分析。

3 结果

3.1 成分、靶点网络分析

从二至丸中共筛选出了 21 个候选化合物, 见表 1。从 GEO 数据库中识别出候选靶点, 绘制火山图和热图显示差异表达基因的分布, 见图 1、2。

利用筛选到的化合物及其靶点构建了二至丸

表 1 二至丸中的候选化合物

Table 1 Candidate compounds in Erzhi Pills

MOL 编号	有效成分	OB/%	DL	来源
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	女贞子
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	女贞子
MOL004576	taxifolin	57.84	0.27	女贞子
MOL005146	lucidumoside D	48.87	0.71	女贞子
MOL005147	lucidumoside D qt	54.41	0.47	女贞子
MOL005169	(20S)-24-ene-3 β ,20-diol-3-acetate	40.23	0.82	女贞子
MOL005190	eriodictyol	71.79	0.24	女贞子
MOL005195	syringaresinol diglucoside qt	83.12	0.80	女贞子
MOL005209	lucidusculine	30.11	0.75	女贞子
MOL005211	olitoriside	65.45	0.23	女贞子
MOL005212	qlitoriside qt	103.23	0.78	女贞子
MOL000006	luteolin	36.16	0.25	女贞子、墨旱莲
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	女贞子、墨旱莲
MOL003378	1,3,8,9-tetrahydroxybenzofurano[3,2-c]chromen-6-one	33.94	0.43	墨旱莲
MOL001689	acacetin	34.97	0.24	墨旱莲
MOL003398	pratensein	39.06	0.28	墨旱莲
MOL001790	linarin	39.84	0.71	墨旱莲
MOL003404	wedelolactone	49.60	0.48	墨旱莲
MOL003389	3'-O-methylorobol	57.41	0.27	墨旱莲
MOL002975	butin	69.94	0.21	墨旱莲
MOL003402	demethylwedelolactone	72.13	0.43	墨旱莲

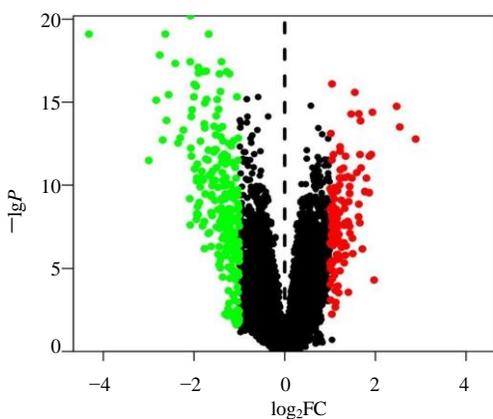


图 1 代谢相关脂肪性肝病差异表达基因火山图

Fig. 1 Volcano map of differentially expressed genes in nonalcoholic fatty liver

的化合物-靶点网络, 见图 3。度值越高, 其在调控网络中的作用越大。该网络包含 11 个潜在的靶点基因和 12 个活性成分。每个潜在的靶点基因都与多个活性成分相互作用, 体现了二至丸通过多途

径、多成分、多靶点来治疗代谢相关脂肪性肝病。

3.2 二至丸与代谢相关脂肪性肝病交集靶点 PPI 网络

利用 PPI 数据可视化二至丸确定的靶标和代谢相关脂肪性肝病的相关靶点的 PPI 网络, 如图 4 所示。以 $DC > 14$ 筛选候选靶点, 以 $BC > 33.831684$ 进一步筛选候选靶点, 共筛选出 518 个靶点。

3.3 GO 富集分析

先用 R 软件将靶点基因名称 (symbol) 转换为靶点基因 ID。对二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的核心靶点基因进行 GO 富集分析, 筛选 GO 显著富集的前 20 项 ($FDR > 1$), 绘制气泡图, 见图 5。

BP 的富集结果提示交集基因主要参与对脂多糖的反应、对源细菌分子的反应、白细胞介素-8 生产的正向调节、上皮细胞增殖、神经炎症共振等生物反应。CC 的富集结果提示交集基因主要分布在质膜筏、RNA 聚合酶 1 转录调节复合物、顶外侧等离子体膜、内质网腔、外侧质膜的固有成分等细胞



图 2 代谢相关脂肪性肝病差异表达基因热图

Fig. 2 Heat map of metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease differentially expressed genes

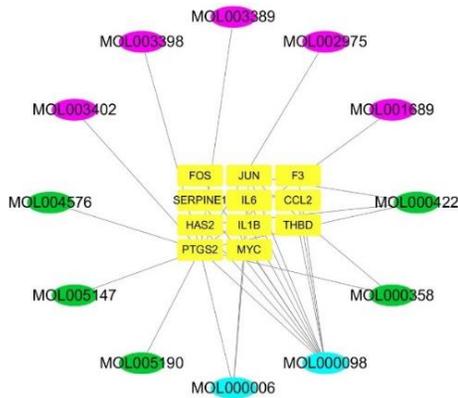


图 3 二至丸的化合物 - 靶点网络

Fig. 3 Compound-target network of Erzhi Pills

部位。MF 的富集结果提示交集基因主要通过与衍生转录因子结合、R-SMAD 结合、细胞因子活性、核心启动子序列-特异性 DNA 结合、RNA 聚合酶激活转录因子结合发挥其作用。

3.4 KEGG 通路富集分析

通过 KEGG 通路富集分析，选择前 20 条显著富集的信号通路 (FDR<0.05) 进行显示，其中包括

晚期糖基化终末产物 (AGE)-晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路、C 型凝集素受体信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路和 Toll 样受体信号通路等，见图 6。

3.5 基因的路径网络分析

基于显著富集的通路和调控这些通路的基因构建了基因通路网络，见图 7。

3.6 分子对接

分子与靶标蛋白的最低结合能均小于 0，分子对接的结合能结果为负表明配体与受体可以自发结合。二至丸中的活性成分与代谢相关脂肪性肝病的核心基因可以结合，其中作为主要成分的木犀草素、槲皮素、β-谷甾醇、山柰酚与 IL-6 和 JUN 的结合能如表 2 所示。通过 PyMOL 对对接结果进行可视化处理，见图 8。

3.7 二至丸对肝细胞 L02 增殖的影响

MTT 实验表明，与对照组比较，二至丸醇提物 (5~200 μg/mL) 对 L02 肝细胞的增殖率显著降低 (P<0.05、0.01)，说明二至丸有抑制 L02 肝细胞增

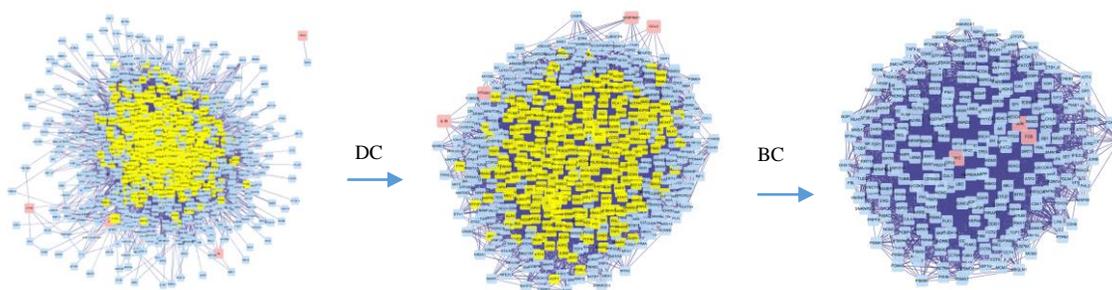


图 4 二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的候选靶点

Fig. 4 Candidate targets for treatment of metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease with Erzhi Pills

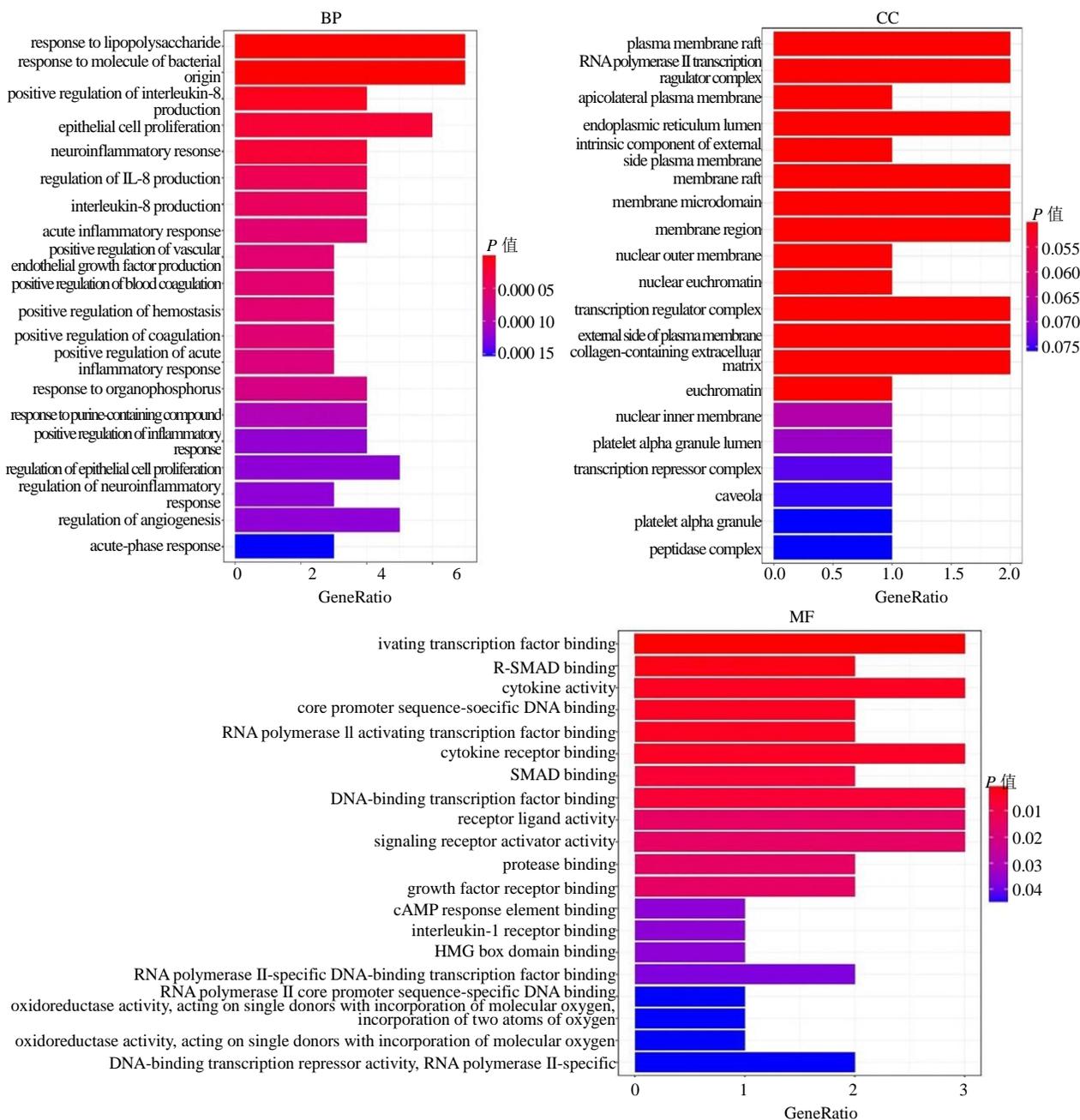


图 5 二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的 GO 富集分析图

Fig. 5 GO enrichment analysis of Erzhi Pills in treatment of metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease

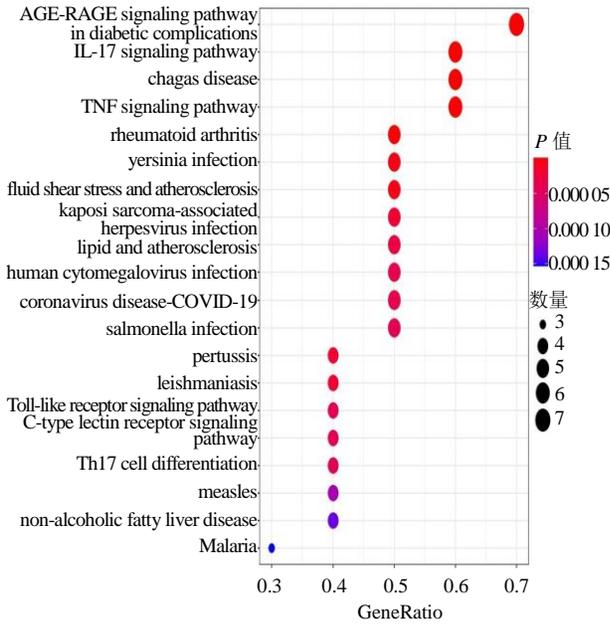


图 6 二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的 KEGG 富集分析
Fig. 6 KEGG enrichment analysis of Erzhi Pills in treatment of metabolic-dysfunction-associatedfatty liver disease

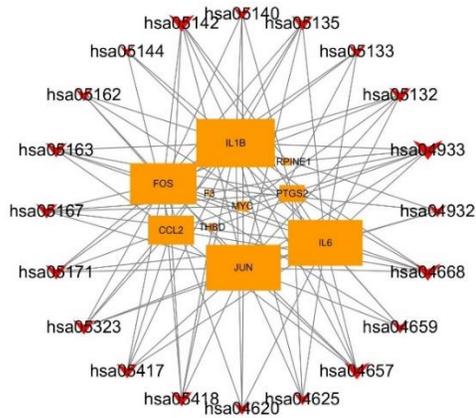


图 7 二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的基因通路网络
Fig. 7 Gene pathway network of Erzhi Pills in treatment of metabolic-dysfunction-associatedfatty liver disease

表 2 分子对接结合能

Table 2 Molecular docking binding energy

靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)			
	木犀草素	槲皮素	β-谷甾醇	山柰酚
IL-6	-6.3	-6.0	-3.8	-6.3
JUN	-8.2	-8.7	-8.3	-9.1

殖的作用，且呈剂量相关性，见图 9。故本研究后续实验分别采用 1、2、4 μg/mL 作为二至丸低、中、高剂量进行体外细胞研究。

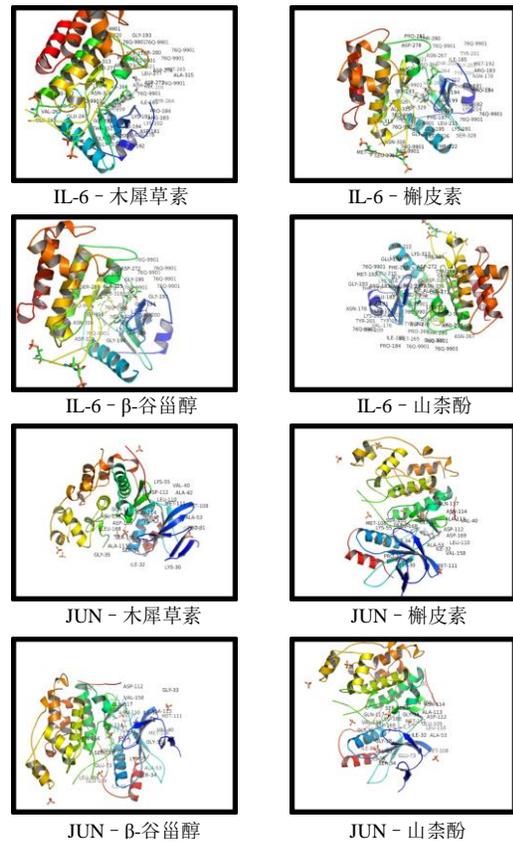
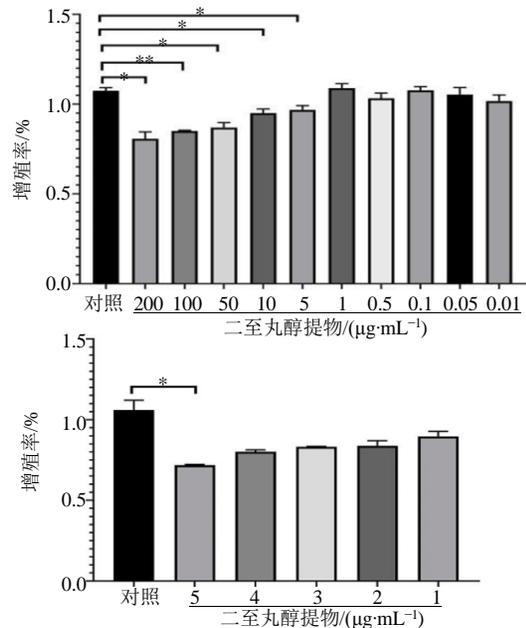


图 8 二至丸活性成分与代谢相关脂肪性肝病的核心基因分子对接
Fig. 8 Docking of the active ingredients in Erzhi Pills with the core genes of metabolic-dysfunction-associatedfatty liver disease



与对照组比较: *P<0.05

*P < 0.05 vs control group

图 9 二至丸对肝细胞 L02 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 9 Effect of Erzhi Pills on proliferation of hepatocyte L02 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 油红 O 染色结果

对照组中细胞边缘清晰,胞浆丰富;模型组中可见明显的红色脂滴堆积,表明造模成功。通过显微镜进一步观察各组细胞内的脂滴堆积情况,随着二至丸剂量的增加脂滴含量明显降低,见图 10。

3.9 二至丸对 L02 肝细胞肝功能及脂质代谢相关指标的影响

与对照组相比,模型组细胞中 TC、TG、ALT、AST 含量显著升高, HDL-C 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、

0.01); 与模型组相比,二至丸各剂量组 TC、TG、AST、ALT 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), HDL-C 显著升高 ($P < 0.01$), 见图 11。

3.10 二至丸对肝细胞 L02 IL-6 和 JUN mRNA 表达的影响

与对照组相比,模型组 IL-6 和 JUN mRNA 的表达量均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比,二至丸各剂量组 IL-6 和 JUN mRNA 的表达量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001) 见图 12。

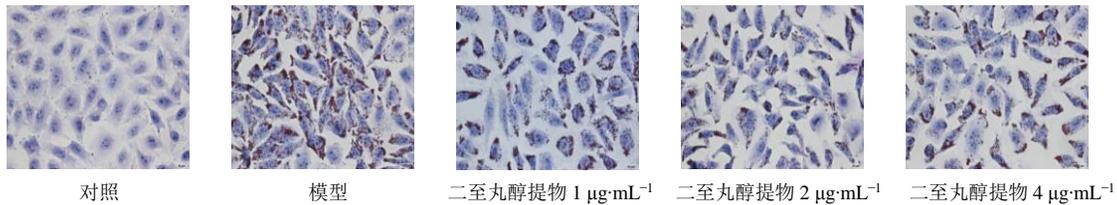
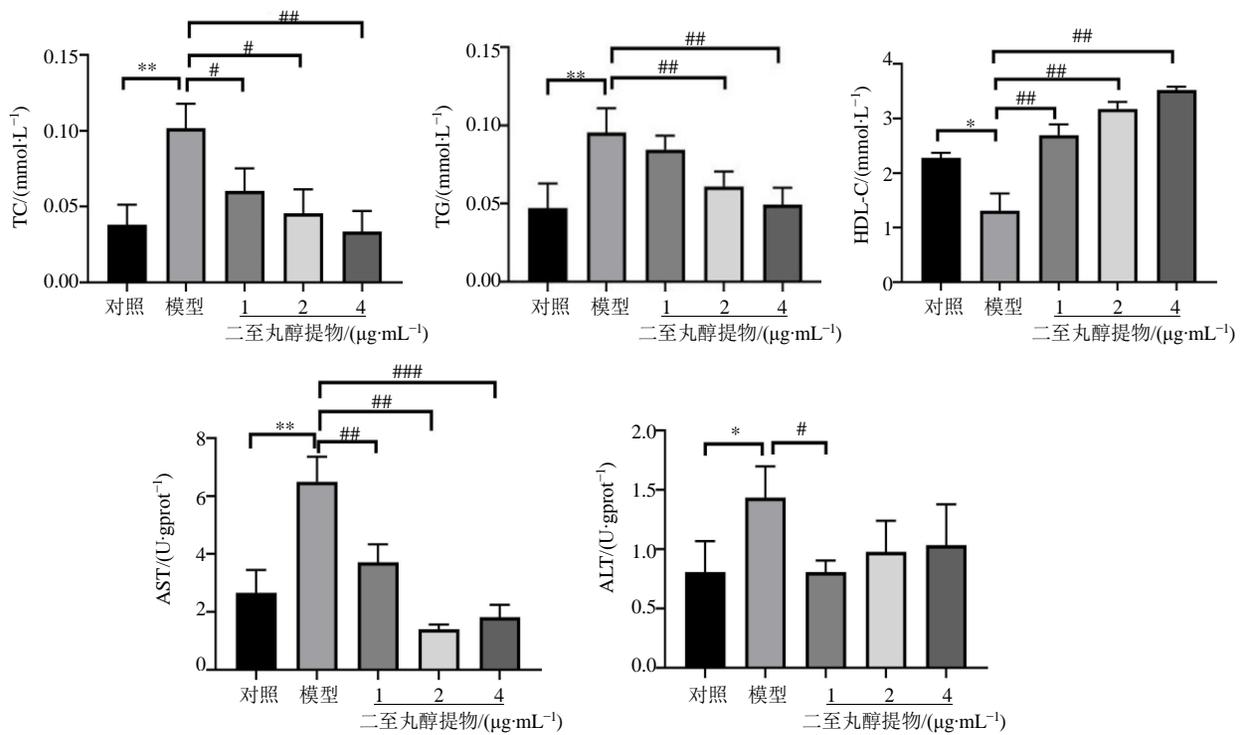


图 10 二至丸对肝细胞 L02 内脂滴含量的影响 (×200)

Fig. 10 Effect of Erzhi Pills on lipid droplet content in hepatocytes L02 (×200)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

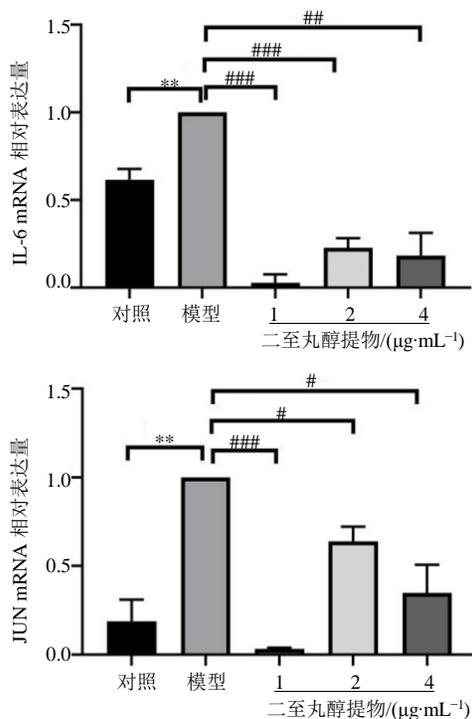
图 11 肝细胞 L02 肝功能以及脂质代谢相关指标 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Liver function and indicators related to lipid metabolism in hepatocytes L02 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

代谢相关脂肪性肝病是一种多系统疾病,影响肝外器官和调节通路,代谢相关脂肪性肝病增加了 2 型糖尿病、心血管和心脏疾病以及慢性肾脏疾病

风险^[17]。代谢相关脂肪性肝病的有效治疗迫在眉睫。代谢相关脂肪性肝病根据其症状特点在中医学领域属于“胁痛”“积聚”“症瘕”“肝癖”范畴^[18]。对于代谢相关脂肪性肝病在中医学的最早记载见



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

图 12 二至丸对肝细胞 L02 IL-6、JUN mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effect of Erzhi Pills on mRNA expression of IL-6 and JUN in hepatocytes L02 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

于《难经·五十六难》：“肝之积，名曰肥气”。根据许勇^[19]、史丹丹等^[20]、穆杰^[21]等学者的观点，对于代谢相关脂肪性肝病的中医病因病机的认识比较一致，病因可以总结为饮食不节、情志所伤、先天禀赋、劳逸失度。其病机可以概括为：肝脾失调为本，痰湿热瘀停滞于肝为标^[22]。中药在代谢相关脂肪性肝病的治疗方面显示出独特优势，黄连^[23]、丹参^[24-25]、大黄^[26]、栀子^[27-28]、决明子^[29]、虎杖^[30]、白芍^[31-32]、陈皮^[33]、三七^[34-35]、黄芪^[36-37]等在调节血脂、改善 TC、TG、减少脂质合成与沉积、抑制炎症、抗氧化等方面作用显著。中药复方对代谢相关脂肪性肝病的治疗方面的作用在临床上也得到相关验证。中医学认为人体是统一的整体，各脏腑之间相互影响相互作用，维持机体的相对平衡。中药复方通过相互配伍，协调作用提高治疗效果。因此中医药治疗代谢相关脂肪性肝病日益得到人们的关注，并且取得显著疗效。

女贞子，其主要成分多糖、三萜、环烯醚萜以

及黄酮类化合物能够通过增强胰岛素敏感性、改善胰岛素抵抗、保护胰岛 β 细胞；调控激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)、蛋白激酶 B (AKT)、蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 信号通路；调节免疫、抑制炎症因子的释放以及抗氧化等作用改善糖脂代谢紊乱^[38]。许多药理作用研究表明女贞子具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎镇痛、保肝、抗骨质疏松、免疫调节、降血糖调血脂、抗菌抗病毒等活性^[39-41]。墨旱莲在印度等国家将其作为传统的降血脂的药物，其在治疗代谢相关脂肪性肝病上具有较好的作用。相关研究表明，墨旱莲对肝脏脂肪变性的保护作用可能是通过降低 TC 和 TG 水平来实现的^[42]。女贞子和墨旱莲可有效调节大鼠激素水平和脂代谢指标，控制体质量^[43]。

本研究通过数据库及相关软件，从活性成分、靶点基因以及信号通路的角度对二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制进行分析阐述。“化合物-靶点”的网络图可见，二至丸的部分化合物对多个靶点有作用，二至丸中治疗代谢相关脂肪性肝病的活性成分有槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇等，能够与多个靶点相互作用，通过改善脂代谢异常来达到降脂的目的。相关研究表明，脂质积累是代谢相关脂肪性肝病的主要原因，槲皮素、山柰酚以及异鼠李素等类黄酮成分通过调节长链脂肪酸 β -氧化过程降低脂质积累^[44]。槲皮素昔元经历了显著的生物反应，形成了葡萄糖醛酸化、硫酸化和加急代谢产物，表明尿苷 5-二磷酸葡萄糖醛酸转移酶、磺基转移酶和儿茶酚-O-甲基转移酶参与其中^[45]。研究表明葡萄糖醛酸化代谢产物在体内均具有抗氧化能力^[46-47]。山柰酚可以通过激活 AMPK/核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) /血红素加氧酶-1 (HO-1) 信号通路达到降低氧化应激与炎症反应的作用^[48]。另外，度值较高的成分还有刺槐素、紫柳素、红车轴草素、异去甲蟛蜞菊内酯、花旗松素、木犀草素、圣草酚等。

通过 PPI 核心图得到 PTGS2、JUN、IL-6、Fos、MYC、F3、IL-1 β 、CCL2、THBD、SERPINE1、HAS2 等多个与代谢相关脂肪性肝病疾病关系密切的靶点基因。有研究证明，IL-6 在病变早期通过抑制氧化应激和防止线粒体功能紊乱而对肝脏起保护作用^[49]，在随后的病理变化中也可能引起肝损伤，诱导肝细胞凋亡，发生胰岛素抵抗，参与代谢相关脂肪性肝病的发生、发展^[50]。JUN 家族中的成员 c-

jun 基因是转录因子 1 组成部分, 对于细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭等生物过程起到重要作用, 且与肝癌的发生也密切相关^[51]。

基于 KEGG 通路富集分析发现, 二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制直接作用于晚期糖基化终末化产物 (AGE)-晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路外, 还作用于 C 型凝集素受体信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路和 Toll 样受体信号通路等。凝集素受体信号通路参与了由树突状细胞 (DCs) 介导的针对肿瘤的非特异性免疫和特异性免疫, 激活表达于 DCs 上的 c 型凝集素受体 (CLRs) 可显著提升机体免疫系统对肿瘤的杀伤作用, 因此对于代谢相关脂肪性肝病的后续发展可能存在良好的抑制作用, 为后续相关研究提供可能。IL-17 信号通路中的 IL-17A 是 IL-17 家族中最重要的炎症因子, IL-17A 在非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪肝和代谢相关脂肪性肝病/酒精性脂肪肝相关性肝细胞癌中通过各种机制参与胰岛素抵抗、脂肪变性、炎症、纤维化、肿瘤恶变和肝细胞癌生长^[52]。Toll 样受体 (TLR) 是近年来发现 M ϕ 膜上占优势且能与多糖物质或脂多糖结合的主要受体之一, 尤其是 TLR4 受体一旦与脂多糖或多糖配体结合而激活 M ϕ , 使 M ϕ 体积增大而引发信号转导致炎症介质的释放, 从而激活固有免疫与获得性免疫系统来清除入侵的异物^[53]。

综上所述, 通过网络药理学和分子对接技术可以得到二至丸潜在的相关基因和通路治疗代谢相关脂肪性肝病, 其中槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇等成分充分发挥了降脂作用, 并且通过调控 PTGS2、JUN、IL-6、FOS、MYC、F3、IL-1 β 、CCL2、THBD、SERPINE1、HAS2 等基因和 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路以及 Toll 样受体信号通路对代谢相关脂肪性肝病的治疗发挥作用。观察其结果, 发现同一靶点可参与多条通路而发挥对代谢相关脂肪性肝病的治疗作用, 同时代表不同疾病的信号通路又包含相同的靶点, 这又体现了众多成分、多靶点的优势。

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, Anstee Q M, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(1): 11-20.

[2] Friedman S L, Neuschwander-Tetri B A, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.

[3] Chalasani N, Younossi Z, Lavine J E, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the study of liver diseases, American college of gastroenterology, and the American gastroenterological association [J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 2005-2023.

[4] Angulo P, Hui J M, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD [J]. *Hepatology*, 2007, 45(4): 846-854.

[5] Friedman S L, Neuschwander-Tetri B A, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.

[6] 汤明慧. 加味参脉饮合二至丸治疗更年期崩漏 60 例 [J]. *四川中医*, 2010, 28(3): 94-95.

[7] 冯光荣. 二至丸合丹栀逍遥丸加减治疗肾虚肝郁型经间期出血 50 例临床观察 [J]. *中医临床研究*, 2012, 4(2): 78-79.

[8] 黄冬菊, 代芳. 二至丸合大补阴丸加减治疗围绝经期综合症 30 例临床观察 [J]. *北方药学*, 2014, 11(1): 26-27.

[9] 安丽凤, 黄敬文, 吴俊荣, 等. 当归饮子合二至丸治疗血虚风燥型老年皮肤瘙痒症的疗效观察 [J]. *中国民族民间医药*, 2012, 21(12): 94.

[10] 江光明, 李鸣九, 榻国维. 知柏地黄丸合二至丸加减治疗脂溢性皮炎 90 例 [J]. *湖北中医杂志*, 2001(6): 35-36.

[11] 孙建红. 丹栀逍遥散合二至丸加味治疗迟发性痤疮 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2006(6): 377-378.

[12] 黄机运. 二至丸合归脾汤治疗血小板减少性紫癜 36 例 [J]. *湖南中医杂志*, 2003(1): 39.

[13] 孙亚南. 二至丸加味方治疗肾性血尿的临床观察 [J]. *山西中医*, 2005(2): 18-19.

[14] 邓宏韬, 时蔡林, 王国斌, 等. 补气活血益肾法治疗局灶节段肾小球硬化 43 例临床观察 [J]. *新中医*, 2006(11): 25-26.

[15] 汪静, 杨文信, 钟红卫, 等. 清热解毒养阴法治疗慢性乙肝合并痤疮 34 例临床观察 [J]. *辽宁中医杂志*, 2009, 36(5): 782-783.

[16] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.

[17] Byrne C D, Targher G. NAFLD: A multisystem disease [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1 Suppl): S47-S64.

[18] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.

[19] 许勇, 陶颖, 苟小军. 代谢相关脂肪性肝病中医病因病机探析 [J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(11): 2586-2589.

[20] 史丹丹, 宓余强. 非酒精性脂肪肝中医病因病机研究 [J]. *吉林中医药*, 2012, 32(6): 545-546.

- [21] 穆杰, 王庆国, 王雪茜, 等. 论肝郁生痰为非酒精性脂肪肝病机 [J]. 环球中医药, 2017, 10(1): 34-36.
- [22] 胡冬威, 薛冬英. 非酒精性脂肪性肝病辩证治疗的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(28): 129-130.
- [23] 张琼方, 陈信, 赵文霞. 小檗碱防治非酒精性脂肪性肝病及相关脂肪细胞因子的作用机制 [J]. 中药材, 2014, 37(7): 1298-1301.
- [24] 薛冬英, 陈一奕, 叶军. 丹参酚酸 B 山楂黄酮联用对大鼠非酒精性脂肪性肝病相关因素的干预作用 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2012, 20(6): 245-248.
- [25] Ding C, Zhao Y, Shi X, *et al.* New insights into salvianolic acid A action: Regulation of the TXNIP/NLRP3 and TXNIP/ChREBP pathways ameliorates HFD-induced NAFLD in rats [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28734.
- [26] 余琳媛, 龚莉虹, 汤韵秋, 等. 基于 AMPK 信号通路的大黄素治疗非酒精性脂肪肝病研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 203-209.
- [27] 雷飞飞, 李云静, 李儒贵, 等. 绞股蓝皂苷干预 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝病的机制 [J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(30): 4169-4176.
- [28] 张宇, 程赛博, 周凤华, 等. 栀子苷对动脉粥样硬化并发非酒精性脂肪肝 ApoE^{-/-}小鼠炎症和氧化应激的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(5): 581-586.
- [29] 李博萍, 陈依雨, 潘竞镛, 等. 决明子提取物对非酒精性脂肪肝大鼠的护肝、拮抗胰岛素抵抗和抗氧化糖基化作用 [J]. 环球中医药, 2015, 8(10): 1171-1175.
- [30] 陈剑明, 张声声, 李琳, 等. 虎杖苷治疗非酒精性脂肪肝的肝脏病理评价及对脂质代谢酶 SERSP-1c 和 PPAR- α 的调节作用 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(7): 1701-1706.
- [31] 杨以琳, 郑琳颖, 古伟明, 等. 白芍总苷对非酒精性脂肪性肝病大鼠 HMGB1、RAGE 通路的调控作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(6): 611-616.
- [32] 李珊珊, 陈少彬, 龚先琼. 中药单体治疗非酒精性脂肪性肝病研究进展 [J]. 医学信息, 2018, 31(21): 24-27.
- [33] 汪娇, 蒋鹏, 周建伟. 川陈皮素对非酒精性脂肪肝细胞的保护作用 and IncLSTR 的调控机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(6): 1129-1133.
- [34] 劳雪玲, 陈华梅, 郑薇英, 等. 三七粉对非酒精性脂肪肝防治作用的实验研究 [J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(2): 182-183.
- [35] 冯晓异, 陈文慧, 武新一, 等. 三七总皂苷对 NAFLD 大鼠的降脂作用及 NO 影响研究 [J]. 现代中医药, 2018, 38(6): 140-143.
- [36] 杨小颖, 胡芳, 韦晓虹, 等. 黄芪甲苷 IV 对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏脂质代谢的作用 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(24): 4064-4067.
- [37] 袁前发, 唐思梦, 陈思羽, 等. 黄芪多糖对非酒精性脂肪肝病大鼠的治疗作用 [J]. 第二军医大学学报, 2018, 39(5): 573-578.
- [38] 王伟强, 朱彤彤, 戴永娜, 等. 女贞子调节糖脂代谢紊乱化学成分及作用机制研究进展 [J]. 天津中医药, 2022, 39(4): 533-537.
- [39] 刘美红, 邹峥嵘. 女贞子化学成分、药理作用及药动学研究进展 [J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(3): 446-460.
- [40] 李彦赞, 孙传腾, 贺凌飞, 等. 二至丸药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(9): 1922-1928.
- [41] 刘亚鸽, 戴璇, 刘田园, 等. 女贞子对去卵巢小鼠脂肪生成的抑制作用及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3680-3686.
- [42] 刘幸, 吴爱辉, 刘云霞, 等. 墨旱莲对高脂喂养小鼠肝脏脂代谢的影响 [J]. 药学服务与研究, 2020, 20(4): 261-265.
- [43] 陈马兰, 唐胤泉, 姜耘宙, 等. 女贞子和墨旱莲对更年期大鼠内分泌系统和脂代谢的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(10): 2366-2368.
- [44] Wei T, Xiong F F, Wang S D, *et al.* Flavonoid ingredients of Ginkgo biloba leaf extract regulate lipid metabolism through Sp1-mediated carnitine palmitoyltransferase 1A up-regulation [J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21(1): 87.
- [45] Costa L G, Garrick J M, Roqu e P J, *et al.* Mechanisms of neuroprotection by quercetin: Counteracting oxidative stress and more [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 2986796.
- [46] Moon J H, Tsushida T, Nakahara K, *et al.* Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30(11): 1274-1285.
- [47] Shirai M, Kawai Y, Yamanishi R, *et al.* Effect of a conjugated quercetin metabolite, quercetin 3-glucuronide, on lipid hydroperoxide-dependent formation of reactive oxygen species in differentiated PC-12 cells [J]. *Free Radic Res*, 2006, 40(10): 1047-1053.
- [48] 康桂兰, 景增秀. 山柰酚通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路缓解 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(4): 525-530.
- [49] 沈静雪, 刘宇, 张盈妍. 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病患者血清炎症因子水平的变化及意义 [J]. 山东医药, 2015, 55(37): 34-36.
- [50] Machado M V, Diehl A M. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(8): 1769-1777.
- [51] 廖楚, 李恒飞, 李晓东. 基于网络药理学及分子对接探讨芍药甘草汤治疗乙型病毒性肝炎肝损伤的作用机制 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(9): 1852-1861.
- [52] 丁梦梦, 高沿航. IL-17 信号通路在酒精相关性肝癌发生、发展中的作用 [J]. 肝脏, 2020, 25(6): 562-564.
- [53] 张宏方, 李文侠, 刘洋, 等. 调衡方多糖对巨噬细胞免疫调节作用及信号通路影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(7): 9-14.