

基于网络药理学的人参治疗非酒精性脂肪肝病靶点研究

郑武娟, 周润昌, 周湘君, 黄卫娟, 陈丽英, 邓艳娴, 杨丽玲*

东莞市滨海湾中心医院/暨南大学医学院附属东莞医院 临床药学科, 广东 东莞 523907

摘要: 目的 基于网络药理学研究人参对非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的治疗靶点。方法 利用网络药理学分析平台 BATMAN-TCM 获取人参活性成分及其对应靶点, 使用 Cytoscape 软件对功能组-靶点基因-人参药物成分网络进行构建。对靶基因通过 STRING 平台构建出靶点群蛋白互作网络 (protein protein interaction network, PPI), 通过在线工具 metascape 对靶基因进行通路富集分析。从高通量基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 下载人 NAFLD 转录组表达数据 GSE89632, 表达量进行标准化处理, 使用双侧非配对 *t* 检验来检测表达差异的显著性。结果 人参药物成分对脂肪代谢有显著影响, 特别是脂肪酸降解。通过蛋白相互作用分析和通路富集分析, 发现了 31 个人参药物成分的关键靶基因 (ACADM、SCD、ACACA、ACSL1、NR1H3、LEP、PPARA、ADIPOQ、NR1H4、CEBPA、HMGCR、SREBF1、TNF、SREBF2、ESR1、ABCA1、INS、AKT1、AVP、RXRA、HSD17B6、SRD5A2、UGT1A1、CYP19A1、PTGS2、CYP2E1、HTR2A、HSD17B1、EDN1、CCL5、AGTR1) 和 NAFLD 发病过程紧密相关。其中胰岛素 (insulin, INS) 的节点数量远高于其他靶基因, INS 的 mRNA 表达量在 NAFLD 组织中显著上调 ($P < 0.0001$)。结论 INS 可能是人参治疗 NAFLD 的关键核心靶点之一。

关键词: 人参; 非酒精性脂肪肝病; 网络药理学; 靶点; 蛋白相互作用; 胰岛素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 10-1971-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.008

Explain therapeutic target of *Panax ginseng* for nonalcoholic fatty liver disease through network pharmacology system

ZHENG Wujuan, ZHOU Runchang, ZHOU Xiangjun, HUANG Weijuan, CHEN Liying, DENG Yanxian, YANG Liling

Department of Clinical Pharmacy, Binhaiwan Central Hospital of Dongguan /Dongguan Hospital, Dongguan 523907, China

Abstract: Objective To study the drug-target-pathway and its mechanism of *Panax ginseng* active ingredients in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) based on network pharmacology. **Methods** BATMAN-TCM, a network pharmacological analysis platform, was used to obtain *Panax ginseng* active ingredients and their corresponding targets. Cytoscape software was used to construct a functional group-target gene-ginseng drug component network. Target group protein interaction network (PPI) was constructed by STRING platform for target genes. Metascape was an online tool for channel enrichment analysis of target genes. Human NAFLD transcriptome expression data GSE89632 was downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. The expression level was standardized and the significance of expression difference was detected by bilateral unpaired *t* test. **Results** The components of *Panax ginseng* had significant effects on lipid metabolism, especially on fatty acid degradation. Through protein interaction analysis and pathway enrichment analysis, 31 key target genes (ACADM, SCD, ACACA, ACSL1, NR1H3, LEP, PPARA, ADIPOQ, NR1H4, CEBPA, HMGCR, SREBF1, TNF, SREBF2, ESR1, ABCA1, INS, AKT1, AVP, RXRA, HSD17B6, SRD5A2, UGT1A1, CYP19A1, PTGS2, CYP2E1, HTR2A, HSD17B1, EDN1, CCL5, AGTR1) of *Panax ginseng* drug components were found to be involved in NAFLD pathway, which were closely related to the pathogenesis of NAFLD. The number of INS nodes was much higher than other target genes. The expression of INS was significantly up-regulated in NAFLD tissues ($P < 0.0001$). **Conclusion** *Ginseng* has therapeutic effect on NAFLD, and INS may be the key target of ginseng in the treatment of NAFLD. **Key words:** *Panax ginseng* C. A. Meyer; non-alcoholic fatty liver disease; network pharmacology; target; protein interaction; INS

收稿日期: 2019-10-26

基金项目: 广东省中医药管理局面上科研项目(20171274); 广东省基础与应用基础研究基金(2019A1515110369)

第一作者: 郑武娟(1987—), 女, 本科, 主管药师, 研究方向为中药学。Tel: (0769)85010062 E-mail: zhengwujuan@126.com

*通信作者: 杨丽玲(1985—), 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药学。E-mail: yll138@126.com

非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除了酒精和其他明确损伤因素以外的,由于脂肪过量沉积在肝脏导致的临床病理综合征^[1-2]。近年研究表明,中药中的一些天然成分具有抗氧化和调节血脂、脂质沉积的作用,对于多种慢性代谢性疾病有良好的防治作用^[3]。人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科多年生草本植物,是中国传统中药材,中医认为人参具有大补元气、补脾益肺的功效。人参含有多种活性成分,如人参皂苷、多糖、黄酮类、挥发油、氨基酸和维生素^[4-5]。文献报道,人参及其有效成分对于 NAFLD 的治疗具有一定效果,但尚存在争议,而且药物作用机制报道多集中在离体细胞研究和动物实验,系统地分析人参及其有效成分作用靶点的报道较少^[6-7]。

近年来应用网络药理学方法来识别药物目标和潜在机制的研究越来越多^[8-9],本研究使用计算方法系统地阐明了人参的药理作用。对于人参成分-靶基因-功能富集和网络进行了深入挖掘,为临床使用人参有效成分治疗 NAFLD 打下理论基础。

1 方法

1.1 人参成分-靶基因-功能富集挖掘和网络构建

在中药分子机制生物信息学分析平台 BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/index.php/Home/Index/index>) 中搜索人参(REN SHEN, English name: Ginseng; Latin name: *Panax Ginseng* [Syn. *Panax Schinseng*])^[10],设置阈值 Score cutoff = 20,其他选项使用默认设置,获得药物成分和对应靶基因。使用 Cytoscape 软件对功能组靶点基因-人参药物成分网络进行构建和可视化。

1.2 蛋白互作网络构建

将“1.1”项中得到的相关靶基因通过 STRING 平台(<https://string-db.org>)构建出靶点群蛋白互作网络(protein protein interaction network, PPI network)^[11],设置物种为“Homo sapiens”,其他选项使用默认设置,最后使用 Cytoscape 软件对网络进行可视化。通过拓扑分析统计节点连接数大于20的靶基因。

1.3 通路富集分析

将 PPI 网络中连接数大于20的靶基因通过在线网络工具 metascape (<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)进行通路富集分析^[12],设置物种为“Homo sapiens”,其他选项使用默认设置。通路图和核心基因使用 KEGG (Kyoto Encyclopedia of

Genes and Genomes)数据库工具进行可视化。

1.4 转录组数据分析

人 NAFLD 转录组表达数据 GSE89632 获取自高通量基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),表达量进行标准化处理,使用双侧非配对 *t* 检验来检测表达差异的显著性。

2 结果

2.1 人参成分靶基因功能富集于脂代谢相关功能通路

在中药分子机制生物信息学分析平台 BATMAN-TCM 中挖掘人参成分和靶基因信息,获得符合要求的成分有133种,对应靶基因共有268个。平台的靶基因功能富集分析显示,这些靶基因在3个脂代谢功能组和通路中显著富集,包括脂代谢功能组、脂肪酸降解通路和脂肪酸代谢通路(图1)。结果表明,人参药物成分可能对脂肪代谢有显著影响,特别是脂肪酸降解活动。

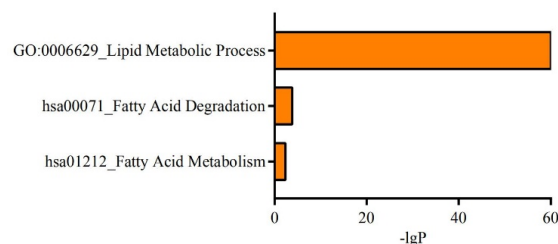


图1 人参成分靶基因功能富集

Fig. 1 Functional enrichment of ginseng component target genes

2.2 人参药物成分-靶点基因-脂代谢功能通路网络图

对 BATMAN-TCM 中挖掘到的人参成分、靶基因和3个脂代谢功能通路组进行网络构建和可视化(图2),桔黄色节点代表人参药物成分,绿色节点代表靶基因,3个蓝色节点代表3个脂代谢功能通路组。黑色线条代表靶点和药物成分之间的相互作用,蓝色线条代表靶基因所属的脂代谢功能通路。

2.3 蛋白相互作用分析

为了探究靶基因间的相互作用关系,并挖掘关键核心靶基因,将3个脂代谢功能通路内的靶基因通过 STRING 平台构建出 PPI 网络(图3),通过拓扑分析统计节点连接数大于20的靶基因,31个红色节点显示了这些基因(ACADM、SCD、ACACA、ACSL1、NR1H3、LEP、PPARA、ADIPOQ、NR1H4、CEBPA、HMGCR、SREBF1、TNF、SREBF2、ESR1、ABCA1、INS、AKT1、AVP、RXRA、HSD17B6、

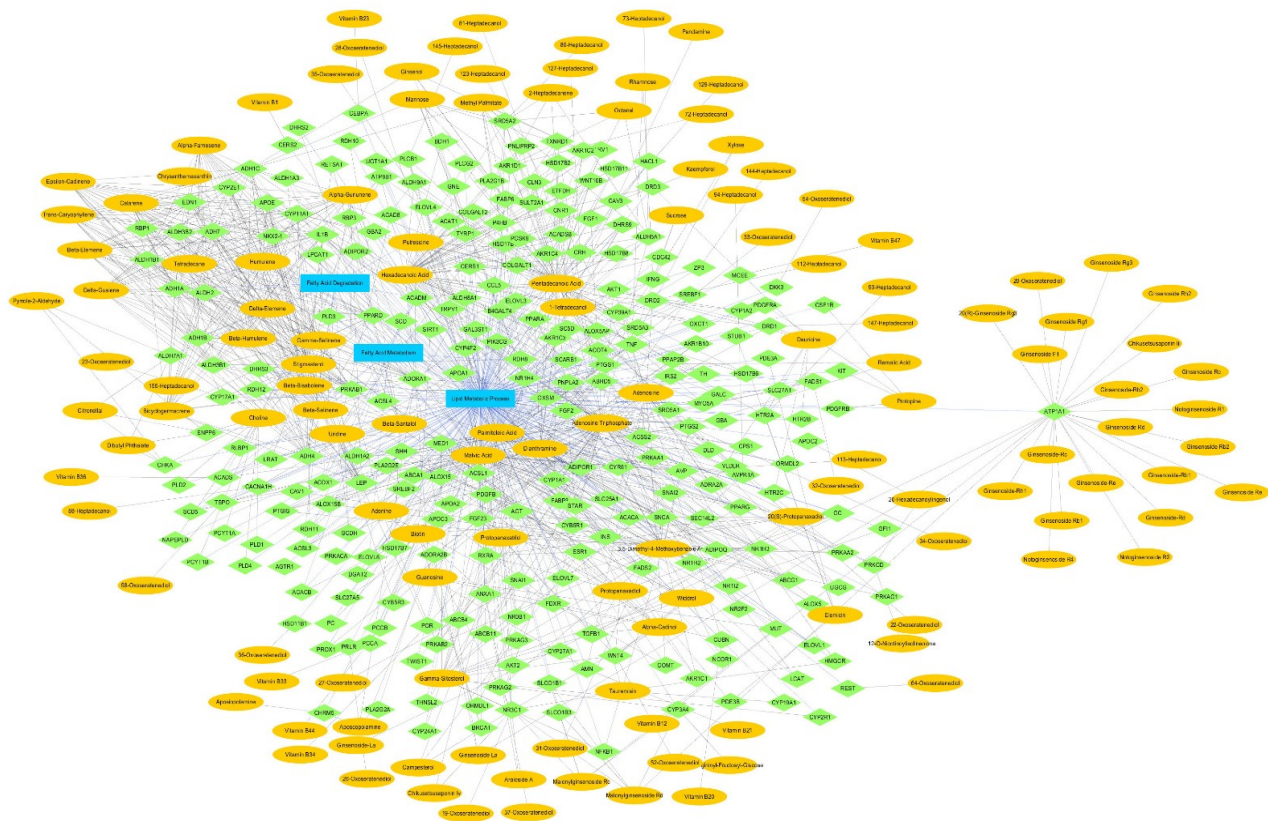


图2 人参药物成分-靶点基因-脂代谢功能通路网络

Fig. 2 Ginseng drug component-target gene-lipid metabolism functional pathway network map

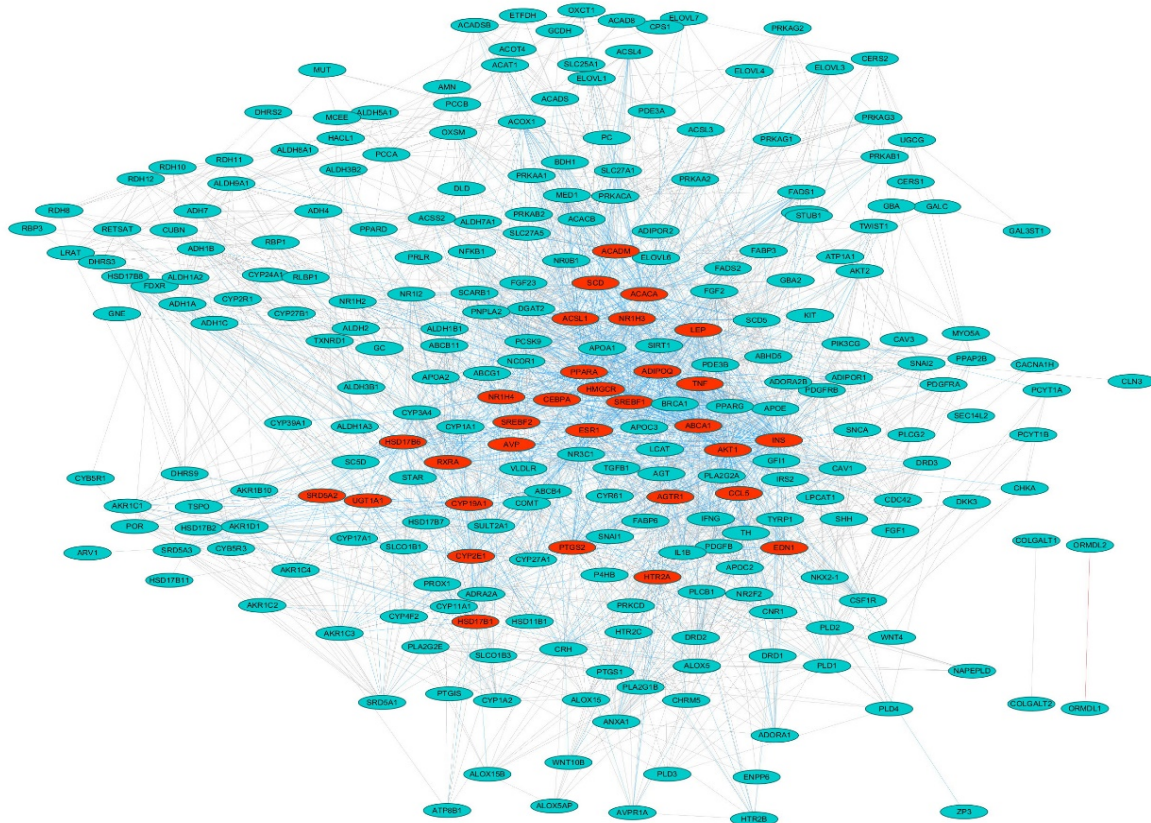


图3 蛋白相互作用分析

Fig. 3 Protein interaction analysis

SRD5A2、UGT1A1、CYP19A1、PTGS2、CYP2E1、HTR2A、HSD17B1、EDN1、CCL5、AGTR1)。这31个靶基因可能在人参靶基因蛋白互作网络中处于关键核心位置,是主要靶点。

2.4 核心靶基因富集于NAFLD通路

对31个关键核心靶基因进行通路富集分析,结果显示,排名第一的富集通路就是NAFLD通路(图4)。图5说明这31个人参药物成分的关键靶基因

参与NAFLD通路,和NAFLD发病过程紧密相关。

2.5 关键核心靶基因INS在NAFLD组织中高表达

对31个关键核心靶基因节点进行统计分析,发现胰岛素(insulin,INS)的节点数量排名第一并且远远高于后面的靶基因(图6-A)。使用NAFLD转录组表达数据对INS在人组织中的表达情况进行分析,发现INS的mRNA表达量在NAFLD组织中显著上调($P < 0.0001$)(图6-B)。INS可能是人参治

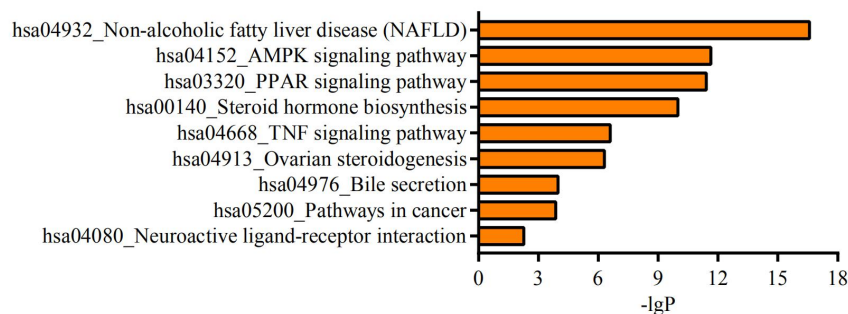
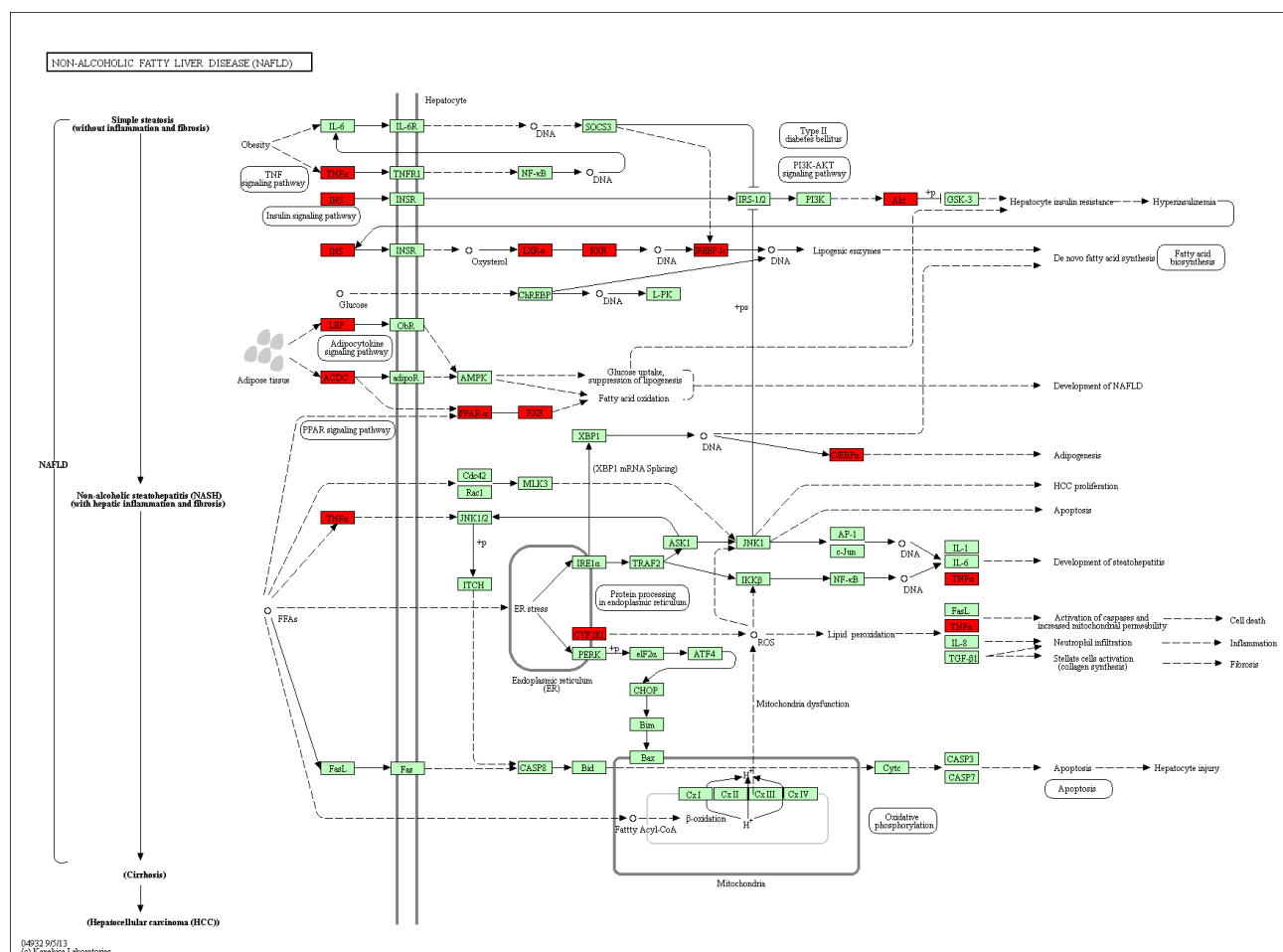


图4 关键核心靶基因的通路富集分析

Fig. 4 Pathway enrichment analysis of key core target genes



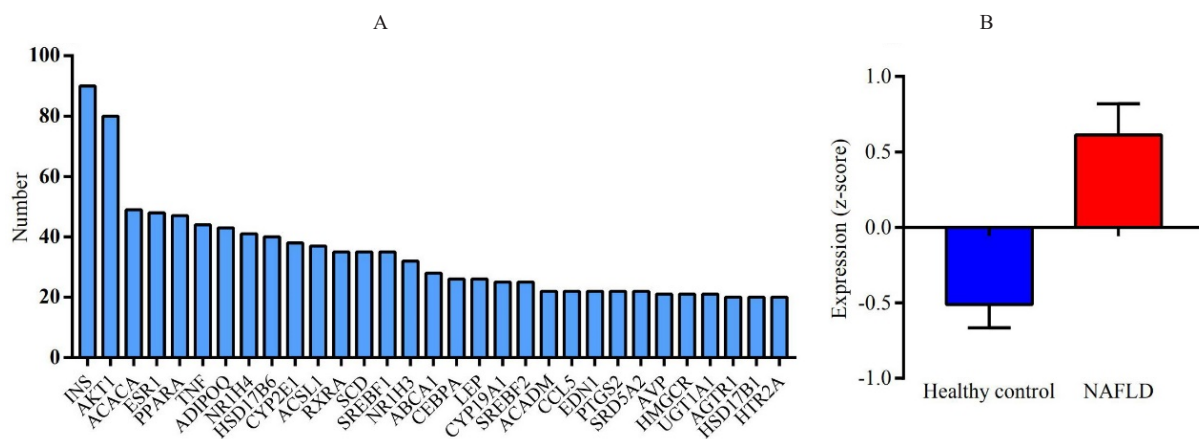


图6 关键核心靶基因节点统计(A)和INS在NAFLD组织中表达(B)
Fig. 6 Expression of key core target gene node (A) and INS in NAFLD (B)

疗NAFLD的核心靶点。

3 讨论

人参长期以来一直用于中国、日本和韩国等几个东亚国家,在传统医学中,人参通常通过煎制后服用。人参的治疗潜力已被广泛研究,人参皂苷可调节各种生理活性并治疗许多慢性疾病^[13-14]。已经报道了许多关于人参的临床研究以表征其药理学性质,包括改善身体表现和性功能以及治疗糖尿病、高血压、炎症疾病和癌症^[3,13]。传统中医在将个体或患者视为具有不同状态的系统方面具有悠久的历史,并且已经积累了许多草药配方。中医的整体哲学与新兴网络药理学和网络生物学的关键思想有很多的共同点。

提高药物利用率和减少毒副作用是药物发现和开发中代价高昂及迟缓的最重要因素。筛选中医药有效成分的网络药理学方法应用越来越广泛^[15]。网络药理学优先考虑疾病相关基因,预测草药化合物的目标谱和药理作用,揭示药物-基因-疾病共模块关联,以高通量方式筛选草药中的协同多种化合物,并解释草药配方的组合规则和网络调节效果。网络药理学方法为将传统中医药从基于经验的医学转化为循证医学系统提供了一种新的研究范式,该系统将加速中药的发现,并改善目前的药物发现策略。

本研究共获得符合要求的成分有133种。人参中的有效成分为人参总皂苷(包括人参皂苷Ra、Rb、Rc、Rd、Re、Rf和Rg等)和少量挥发油^[7]。文献报道人参总皂苷能够显著降低NAFLD大鼠血清血脂水平,改善胰岛素抵抗,改善肝功能,人参总皂苷对胆汁酸代谢及胰岛素抵抗的影响可能是其治疗NAFLD的主要机制^[7]。已有的文献报道,人参的主

要活性成分人参皂苷Rg₁^[6]和Rb₁^[16]分别对细胞和小鼠NAFLD具有治疗效果。本研究首先发现了人参药物成分可能对脂肪代谢有显著影响,特别是脂肪酸降解活动。进一步分析了人参药物成分-靶点基因-脂代谢功能通路网络图,充分体现了人参药物多成分、多靶点和脂代谢紧密相关的特点。在药物发现中,靶基因鉴定是重要环节。越来越多的活性化合物或药物被证明与多种基因或蛋白质相互作用^[17]。已经开发了各种计算机目标识别方法,并广泛应用于此目的。本研究通过蛋白相互作用分析和通路富集分析,发现了31个人参药物成分的关键靶基因参与NAFLD通路,和NAFLD发病过程紧密相关,INS可能是人参治疗NAFLD的非常关键的核心靶点。目前普遍认为,胰岛素抵抗是NAFLD的主要发病机制,可能通过激活AMPK信号通路来促进NAFLD的发生发展^[18-19]。

本研究运用网络药理学的方法,对人参的有效成分、靶点、通路网络进行了系统的研究,为人参治疗NAFLD的研究前景及其在未来临床研究中的应用提供了新的见解。

参考文献

- [1] Harry S, Lee Lai L, Nik Mustapha N R, et al. Volumetric liver fat fraction determines grade of steatosis more accurately than controlled attenuation parameter in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(4): 945-953, e2.
- [2] El-Agroudy N N, Kurzbach A, Rodionov R N, et al. Are lifestyle therapies effective for NAFLD treatment ? [J]. Trends Endocrinol Metab, 2019, 30(10): 701-709.
- [3] Choi J, Kim T H, Choi T Y, et al. Ginseng for health care: a systematic review of randomized controlled trials in

- Korean literature [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e59978.
- [4] Mancuso C, Santangelo R. *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*: from pharmacology to toxicology [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 107(Pt A): 362-372.
- [5] Yu S E, Mwesige B, Yi Y S, et al. Ginsenosides: the need to move forward from bench to clinical trials [J]. J Ginseng Res, 2019, 43(3): 361-367.
- [6] 高月, 黄文祥, 章述军, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对非酒精性脂肪肝 HepG2 细胞脂质摄取和氧化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12): 100-106.
- [7] 阮君, 肖铁刚, 陈珺明, 等. 人参总皂苷调节非酒精性脂肪肝病大鼠糖脂代谢紊乱机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(8): 101-106, 269.
- [8] Boezio B, Audouze K, Ducrot P, et al. Network-based approaches in pharmacology [J]. Mol Inform, 2017, 36(10): 1-10.
- [9] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(2): 110-120.
- [10] Huang L, Xie D, Yu Y, et al. TCMID 2.0: a comprehensive resource for TCM [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D1117-D1120.
- [11] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [12] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523.
- [13] Leung K W, Wong A S. Pharmacology of ginsenosides: a literature review [J]. Chin Med, 2010, 5: 20.
- [14] Kim K H, Lee D, Lee H L, et al. Beneficial effects of *Panax ginseng* for the treatment and prevention of neurodegenerative diseases: past findings and future directions [J]. J Ginseng Res, 2018, 42(3): 239-247.
- [15] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.
- [16] 韩晓春, 张峰, 刘长虹, 等. 人参皂苷 Rb₁ 对小鼠非酒精性脂肪肝病的治疗作用及其机制 [J]. 山东医药, 2019, 59(8): 37-40.
- [17] Chen M, Zhu J, Kang J, et al. Exploration in the mechanism of action of licorice by network pharmacology [J]. Molecules, 2019, 24(16): 2959.
- [18] Petito-Da-Silva T I, Souza-Mello V, Barbosa-Da-Silva S. Empagliflozin mitigates NAFLD in high-fat-fed mice by alleviating insulin resistance, lipogenesis and ER stress [J]. Mol Cell Endocrinol, 2019, 498: 110539.
- [19] Yan H, Li T, Wang Y, et al. Insulin-like growth factor-binding protein 7 accelerates hepatic steatosis and insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2019, 46(12): 1101-1110.