

【实验研究】

基于网络药理学的逍遥散治疗代谢相关脂肪性肝病作用机制探讨及实验验证

洪菲惠^{1,2}, 陈雨婵¹, 陈洁欣³, 李慧敏³, 彭东辉¹, 夏永刚¹, 王秋红^{1,3}, 匡海学^{1*}

1. 黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 广州商学院健康医学院, 广东 广州 511300

3. 广东药科大学 药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 基于网络药理学预测逍遥散治疗代谢相关脂肪性肝病(MAFLD, 曾用名非酒精性脂肪性肝炎, NASH)相关机制, 并观察逍遥散对MAFLD模型小鼠肝损伤的保护作用及机制。方法 通过TCMSP数据库获取逍遥散各组成味药的活性成分及潜在靶点, 利用Gencards、OMIM数据库获取MAFLD疾病靶点, 构建蛋白质相互作用(PPI)网络, 进行基因本体论(GO)功能及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 构建成分-靶点-通路网络, 并对核心靶点和主要活性成分进行分子对接验证。通过喂食蛋氨酸及胆碱缺乏(MCD)饲料构建MAFLD小鼠模型, 给予多烯磷脂酰胆碱胶囊(178 mg·kg⁻¹·d⁻¹)或逍遥散低、中、高剂量(1.437、2.874、5.748 g·kg⁻¹·d⁻¹)进行干预, 测定各组小鼠血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性及三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)水平; HE染色考察各组小鼠肝组织病理变化; Western blotting法检测PTGS2、ESR1、NOS2及PPARG的蛋白表达情况。结果 经筛选得到逍遥散治疗MAFLD的作用靶点有133个, 核心成分主要有槲皮素、木犀草素、山柰酚、猪苓酸C等, 关键靶点为PTGS2、ESR1、NOS2及PPARG等, 主要的生物学通路为与肿瘤相关信号通路、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、IL-17信号通路及非酒精性脂肪肝相关信号通路等, 分子对接结果显示槲皮素、木犀草素及山柰酚与PTGS2、ESR1、NOS2及PPARG等均有较强的结合。体内动物实验表明, 与模型组比较, 逍遥散各组小鼠AST、ALT、TG、TC水平均显著降低($P<0.05$); 肝组织病理损伤均得到改善; 与模型组比较, 逍遥散中、高剂量组小鼠PTGS2、ESR1及NOS2蛋白表达显著降低($P<0.01$), PPARG蛋白表达显著升高($P<0.01$)。结论 逍遥散可能通过调控PTGS2、ESR1、NOS2及PPARG等靶标, IL-17信号通路及非酒精性脂肪肝相关信号通路等多种途径治疗MAFLD。

关键词: 逍遥散; 代谢相关脂肪性肝病; 非酒精性脂肪性肝炎; 网络药理学; 分子对接; 槲皮素; 木犀草素; 山柰酚; 猪苓酸C

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)12-2417-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.004

Mechanism of Xiaoyaosan on metabolic associated fatty liver disease based on network pharmacology and experiment verification

HONG Feihui^{1,2}, CHEN Yuchan¹, CHEN Jiexin³, LI Huimin³, PENG Donghui¹, XIA Yonggang¹, WANG Qihong^{1,3}, KUANG Haixue¹

1. Key Laboratory of Basic and Application Research of Beiyao, Ministry of Education, Key Laboratory of TCM Pharmacodynamic Material Base, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Department of Health and Medicine, Guangzhou Huashang College, Guangzhou 510006, China

3. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Xiaoyaosan in the treatment of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD, used to be known as nonalcoholic steatohepatitis, NASH) based on network pharmacology and *in vivo* experiments. **Methods** The

收稿日期: 2022-07-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1708801); 广东省重点领域研发计划(2020B1111120002); 黑龙江省“头雁”团队支持项目(黑龙江省头雁行动领导小组文件(2019)5号); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程—岐黄工程首席科学家支持项目(国中医药人教函(2021)7号); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者支持项目(国中医药人教函(2018)284号)

第一作者: 洪菲惠, 博士研究生, 主要从事中药及其复方的药效物质基础研究。E-mail: 13922474813@163.com

*通信作者: 匡海学, 男, 博士, 教授, 从事中药性味理论及中药药效物质基础研究。E-mail: hxkuang56@163.com

active components and potential targets of Xiaoyaosan were obtained from TCMSP database, and the disease targets of MAFLD were obtained from Gencards and OMIM database. A protein-protein interaction (PPI) network based on active components and disease common targets was constructed, Metascape platform was used for gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, the "component-target-pathway" network was constructed, and autodock software was used for molecular docking verification of key compounds and targets. MAFLD mouse model was established by feeding methionine and choline deficient *L*-amino acid diet (MCD). Polyene Phosphatidylcholine Capsules ($178 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) or Xiaoyaosan ($1.437, 2.874, 5.748 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) were given to intervene. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) in serum of mice in each group were measured, pathological changes of liver tissues of mice in each group were investigated by HE staining. The protein expressions of PTGS2, ESR1, NOS2 and PPARG were detected by Western blotting. **Results** 160 active components of Xiaoyaosan and 619 corresponding action targets were obtained, including 133 action targets for the treatment of MAFLD. The core components of Xiaoyaosan in the treatment of MAFLD were quercetin, luteolin, kaempferol and polyporenic acid C and so on, and the key targets were PTGS2, ESR1, NOS2 and PPARG etc. The main biological pathways are tumor related signaling pathways, AGE-RAGE signaling pathways in diabetic complications, IL-17 signaling pathways, and nonalcoholic fatty liver related signal pathways. Molecular docking results show that quercetin, luteolin and kaempferol are strongly associated with PTGS2, ESR1, NOS2 and PPARG. *In vivo* animal experiments showed that compared with the model group, the levels of AST, ALT, TG and TC in Xiaoyaosan group were significantly reduced ($P < 0.05$), and the pathological damage of liver tissue was improved. Compared with the model group, the expressions of PTGS2, ESR1 and NOS2 protein in the middle and high dosage groups of Xiaoyaosan were significantly decreased ($P < 0.01$), while the expression of PPARG protein was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Xiaoyaosan may treat MAFLD by regulating targets such as PTGS2, ESR1, NOS2 and PPARG, IL-17 signal pathway and nonalcoholic fatty liver related signal pathway.

Key words: Xiaoyaosan; metabolic associated fatty liver disease; non-alcoholic steatohepatitis; network pharmacology; molecular docking; quercetin; luteolin; kaempferol; polyporenic acid C

随着生活水平的提高,代谢相关脂肪性肝病[MAFLD,曾用名非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)]正成为慢性肝病的首要原因^[1]。MAFLD是指从非酒精性单纯性脂肪肝(NAFL)到非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和脂肪性肝硬化的广泛性肝脏损伤,其中,NASH是指与炎症、肝细胞损伤和纤维化有关的肝脏脂肪变性^[2]。据统计,普通成人MAFLD的患病率在6.3%~45%,其中有10%~30%为NASH,而NASH患者在10~15年内肝硬化发生率高达15%~25%^[3]。NASH发病机制复杂,研究认为与遗传因素、胰岛素抵抗、脂代谢、氧化应激和炎症细胞因子等相关^[4]。目前,对NASH的防治手段主要为改善饮食及加强锻炼,在临床上,现有的药物大多只能起辅助治疗作用^[3]。

随着中医药的现代研究,传统中药抗NASH的研究逐渐增多,其调治机制具有多途径、多靶点、安全性高等特点^[5]。逍遥散出自宋代《太平惠民和剂局方》,由柴胡、白术、白芍、薄荷、当归、茯苓、甘草和生姜组成,具有调和脾胃、疏肝解郁、养血健脾的功效,为调肝养血之名方,临床上多用于肝病的治疗^[6]。近年在临床应用中发现逍遥散在MAFLD治疗中,能有效控制疾病进一步发展^[7-9]。徐慧超等^[10]发现逍遥散可上调TLR4水平并下调TLR4/

TRIF/p65表达从而改善NASH症状。但因MAFLD发病机制复杂,针对逍遥散治疗MAFLD的相关机制尚未进行系统性报道。因此,本研究采用网络药理学结合体内动物实验的方法,分析逍遥散的物质基础,系统挖掘逍遥散治疗MAFLD的作用机制,为逍遥散临床应用及开发研究提供一定的理论基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6小鼠,体质量14~16 g,购于广东省医学实验动物中心,生产许可证号SYXK(粤)2022-0002,饲养于广东省医学实验动物中心SPF级动物房,通过广东省医学实验动物伦理委员会审查,伦理审查编号为C202205-2,符合实验动物伦理委员会规定。

1.2 药物及试剂

逍遥散组方药材柴胡、当归、白术、白芍、茯苓、炙甘草、生姜、薄荷均购自广州采芝林药业有限公司,经广东药科大学刘基柱教授鉴定,符合《中国药典》2020年版要求。

多烯磷脂酰胆碱胶囊购自北京赛诺菲制药有限公司(批号BBJD164,规格每粒228 mg);蛋氨酸及胆碱缺乏模型饲料(MCD)、蛋氨酸及胆碱缺乏对照饲料(MCS)购自南通特洛菲饲料科技有限公司;

苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自索莱宝公司;三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)试剂盒,丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)ELISA试剂盒购自泉州睿信生物科技有限公司;前列腺素G/H合成酶2(PTGS2)、雌激素受体(ESR1)、一氧化氮合酶(NOS2)及过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARG)一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;GAPDH抗体购自碧云天生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠抗体、HRP标记的山羊抗兔抗体、BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

JB-P5包埋机(武汉俊杰电子有限公司);JY92-IIN高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机有限公司);Epoch型酶标检测仪(美国BioTek公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Chem Studio PLUS型超敏多功能成像仪(德国Analytikjena公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 逍遥散相关靶点筛选 通过中药系统药理学(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)数据库^[11]检索逍遥散各组方中药柴胡、当归、白术、白芍、茯苓、炙甘草、生姜、薄荷的化学成分,根据口服生物利用度(OB)≥30%及类药性(DL)≥0.18的属性值对化学成分进行筛选,得到活性成分及其对应的蛋白质靶点,并通过已发表的文献报道及Swiss Target (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库^[12],补充及预测未筛选到的化合物及对应的靶点。将筛选得到的靶点统一在Uniprot蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org>)中进行基因名标准化处理。

2.1.2 逍遥散治疗MAFLD相关靶点筛选 以“nonalcoholic steatohepatitis”及“non-alcoholic fatty hepatocirrhosis”为关键词,在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM数据库(<https://omim.org>)进行疾病潜在靶点的检索。合并2个数据库靶点后,删除重复值,得到MAFLD的潜在疾病靶点。将筛选得到的成分靶点与预测的疾病靶点取交集并绘制韦恩图,进一步明确逍遥散治疗MAFLD的作用靶点。

2.1.3 逍遥散成分-MAFLD靶点蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将交集靶点上传至String 11.5数据库(<https://string-d.org>)^[13],物种设定为“Homo

sapiens”,设定最小互相作用阈值为“highest confidence”>0.9,下载PPI网络;采用Cytoscape 3.7.1软件构建PPI网络。

2.1.4 逍遥散成分-MAFLD靶点功能与通路的富集分析 将逍遥散调治MAFLD的潜在靶点录入Metascape在线分析平台(<http://metascape.org/gp/index.html>),对其进行基因本体论(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,物种设置为“sapiens”,设置 $P<0.01$,分析数据并借助微生信在线工具(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对其进行可视化处理。

2.1.5 逍遥散成分-MAFLD靶点-通路网络的构建 运用Cytoscape 3.7.1软件构建逍遥散成分-MAFLD靶点-通路网络,通过Cytoscape 3.7.1软件内置工具(Network Analyzer)分析成分及靶点的网络拓扑参数,包括度值(degree)、介度(betweenness)及紧密度(closeness)等,进而明确核心靶点及发挥主要药效的活性成分。

2.2 分子对接

为进一步探究逍遥散对MAFLD的调控作用,将筛选出的主要活性成分和核心靶点进行分子对接验证。从PubChem数据库下载主要活性成分的结构并保存为mol格式;从PDB数据库下载核心靶点的结构并保存为PDB格式,选择分辨率高,且有配体及结构相对完整的晶体结构;运用AutoDock Tools工具对靶蛋白受体和配体小分子进行常规预处理,运行Autogrid模块进行分子对接,得到结合能数据;并采用PyMol软件对结果进行可视化。

2.3 体内动物实验

2.3.1 逍遥散水煎液的制备 取柴胡30 g、当归30 g、白术30 g、白芍30 g、茯苓30 g、炙甘草15 g、生姜10 g、薄荷10 g,加入10倍量去离子水,浸泡30 min,加热提取2 h,重复2次,合并煎液,减压浓缩至含生药量 $1.8\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,于4℃冰箱保存备用。

2.3.2 分组、造模及给药 C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、多烯磷脂酰胆碱组及逍遥散低、中、高剂量组,每组6只,对照组小鼠给予MCS对照饲料喂养,其余各组给予MCD模型饲料喂养^[14],实验周期共8周,每2周从模型组小鼠中随机抽取2只,对肝组织进行HE染色评估模型,经证实第4周末模型小鼠出现MAFLD改变。于第5周开始,实验小鼠给药用量及方法参照《现代医学实验动物学》中的标准方程进行计算,逍遥散低、中、高剂量组ig给予逍遥散(水煎剂) $1.437, 2.874, 5.748\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;多烯磷

脂酰胆碱组 ig 给予 $178 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 多烯磷脂酰胆碱胶囊内容物(0.5% CMC-Na 悬浮溶解), 模型组及对照组 ig 给予等体积生理盐水, 连续4周。

2.3.3 取材及指标检测 于末次给药后, 所有小鼠禁食不禁水 12 h, ip 麻醉后眼眶取血, 分离得到血清, 检测血清中 ALT、AST 活性及 TG、TC 水平; 采集肝组织, 进行 HE 染色, 观察肝组织病理变化。

2.3.4 Western blotting 法检测小鼠肝组织相关蛋白的表达 取小鼠肝组织称质量, 于离心管中, 加入 RIPA 裂解液, 于冰上裂解 30 min, $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min, 吸取上清液, BCA 测定蛋白浓度, 蛋白变性后取 $40 \mu\text{g}$ 上样量, 至 SDS-PAGE 凝胶分离, $80 \sim 110 \text{ V}$ 恒压电泳, 1.5 h; 320 mA 恒流 3 h 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 4°C 一抗(1:1 000)孵育过夜, 室温二抗(1:2 000)孵育 1 h, 经 TBST 洗涤后将膜置于超敏多功能成像仪中, 曝光成像, 拍照记录并使用 Image J 软件进行灰度值分析对比。

2.3.5 统计学分析 采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据采用单因素方差分析, 两组间数据采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 逍遥散活性成分及靶点的确定 通过 TCMSP 检索并经文献补充后, 得到逍遥散活性成分 172 个, 其中柴胡 17 个、当归 7 个、白芍 18 个、白术 8 个、茯苓 15 个、甘草 92 个、薄荷 10 个、生姜 5 个, 删除重复值后获得活性成分 160 个。通过 TCMSP 数据库获取及 Swiss Target 数据库预测的靶点经 Uniprot 数据库规范化处理, 得到活性成分作用靶点柴胡 200 个、当归 98 个、白芍 252 个、白术 79 个、茯苓 200 个、甘草 368 个、薄荷 126 个、生姜 141 个, 删除重复项后, 获得上述活性成分对应靶点 619 个。

3.1.2 逍遥散治疗 MAFLD 相关靶点的筛选结果 经 GeneCards 数据库及 OMIM 数据库共搜集得到 589 个 MAFLD 疾病靶点。将获得的药物靶点与疾病靶点取交集, 得到 133 个逍遥散治疗 MAFLD 的潜在作用靶点, 见图 1。

3.1.3 逍遥散活性成分-MAFLD 靶点 PPI 网络的构建 将交集靶点上传至 String 11.0 平台, 设定最小互相作用阈值为“highest confidence” > 0.9 , 并删除游离点, 最终得到 113 个潜在作用靶点参与 PPI 网络构建, 采用 Cytoscape 软件构建 PPI 网络, 见图 2。PPI 网络包含 113 个节点、359 条边, 节点为潜在作用

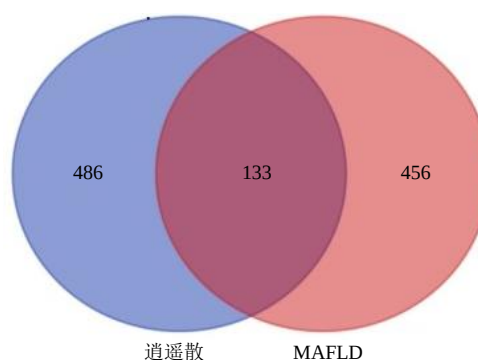


图 1 逍遥散活性成分靶点与 MAFLD 相关靶点韦恩图
Fig. 1 Venn diagram of Xiaoyaosan active ingredient targets and MAFLD related targets

靶点, 其大小及颜色深浅与度值呈正相关, 节点之间的连线表示靶点间存在潜在的作用关系。如图 2 所示, 逍遥散可能通过作用于转录因子 AP-1(JUN)、转录因子 p65(RELA)、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(AKT1)、信号转导和转录激活因子 3(STAT3)、视黄酸受体(RXRA)、肿瘤坏死因子(TNF)、细胞肿瘤抗原 p53(TP53)、白细胞介素 6(IL6)等靶点, 从而发挥治疗 MAFLD 的作用。

3.1.4 逍遥散活性成分-MAFLD 靶点 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 经 Metascape 平台分析得到 KEGG 通路富集结果 256 条, 选取 $P < 0.01$ 及排名前 20 的条目进行高级气泡图的绘制, 见图 3。逍遥散治疗 MAFLD 的通路可能与影响肿瘤相关通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、非酒精性脂肪肝(NAFLD)相关信号通路、丙型肝炎相关信号通路、肿瘤坏死因子通路、乙型肝炎

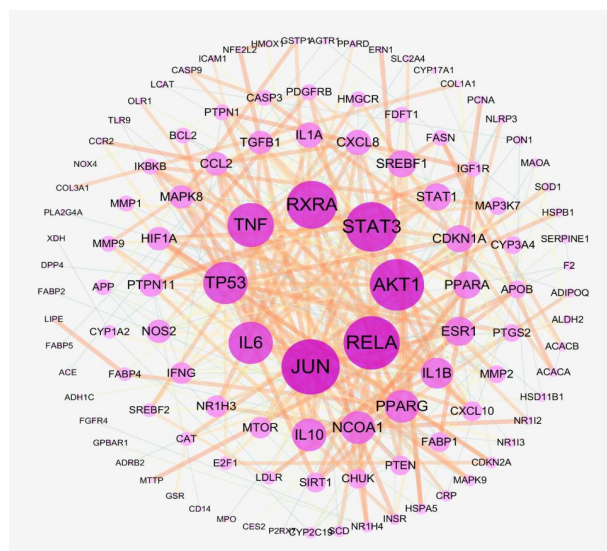


图 2 逍遥散治疗 MAFLD 靶点的 PPI 网络
Fig. 2 PPI network of targets of Xiaoyaosan in treatment of MAFLD

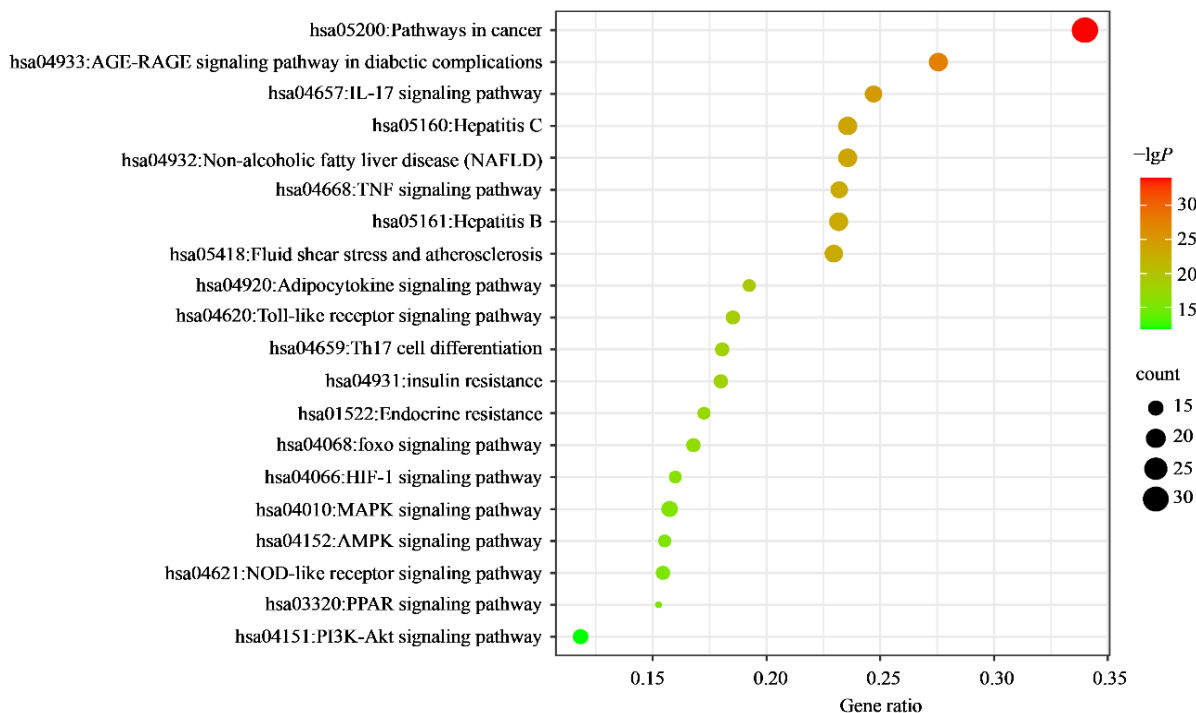


图3 逍遥散治疗MAFLD靶点的KEGG富集分析(前20)

Fig. 3 KEGG enrichment analysis of targets of Xiaoyaosan on treating MAFLD (top 20)

炎相关信号通路、动脉粥样硬化相关通路、脂肪细胞因子信号通路等密切相关。

GO 功能富集分析如图4~6所示,生物过程(BP)富集结果主要涉及对无机物的反应、对营养水平的反应、对活性氧的反应、对细胞外刺激的反应、对氧化应激的反应、一元羧酸代谢过程、平滑肌细胞增殖、肌细胞增殖、对脂多糖的反应及平滑肌细胞增殖的调控等。分子功能(MF)富集结果主要涉及DNA结合转录因子结合、核受体活性、配体激活的转录因子活性、RNA聚合酶II特异性DNA结合转录因子结合、转录因子结合、蛋白激酶结合、激酶结合、一元羧酸结合、羧酸结合及血红素结合等。细胞成分(CC)富集结果主要涉及受体复合体、膜筏、膜微区、蛋白激酶复合物、膜侧、RNA聚合酶II转录调节复合物等。

3.1.5 逍遥散成分-MAFLD靶点-通路网络的构建 运用Cytoscape 3.7.1构建逍遥散成分-MAFLD靶点-通路网络,见图7。内置工具Network Analyzer分析成分及靶点的网络拓扑参数,即可得到核心成分和核心作用靶点。

网络拓扑学结果表明,槲皮素度值为35,介度为0.088 6,紧密度为0.492 2;木犀草素度值为17,介度为0.021 8,紧密度为0.453 6;山柰酚度值为16,介度为0.021 0,紧密度为0.449 9,预测此3个成分为

逍遥散治疗MAFLD的主要成分,其次为猪苓酸C、蓖麻酸C、柚皮素、乙酸、去氢土莫酸、 α -香树脂醇、茯苓新酸A、去氢齿孔酸、18 α -羟基甘草次酸等,见表1。

在构建的网络图中,前列腺素G/H合成酶2(PTGS2)度值为117,介度为0.372 9,紧密度为0.604 4;雌激素受体(ESR1)度值为90,介度为0.117 5,紧密度为0.464 1;一氧化氮合酶(NOS2)度值为82,介度为0.109 7,紧密度为0.474 1,预测此3个靶点为逍遥散治疗MAFLD的主要靶点。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、RXRA、RELA、AKT1、Caspase-3(CASP3)、丝裂原活化蛋白激酶8(MAPK8)、核因子 κ B激酶亚基 β (IKKBK)、IL6、JUN、丝裂原活化蛋白激酶9(MAPK9)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARA)、氧固醇受体LXR-alpha(NR1H3)等也为相对重要的靶点,见表2。

3.2 分子对接验证结果

将“3.1.5”项中筛选得到的度值高的核心靶点(PTGS2、ESR1、NOS2、PPARG)与主要活性成分(槲皮素、木犀草素、山柰酚),采用AutoDock进行分子对接验证,并利用PyMOL软件对结果进行可视化。一般认为,结合能越低,说明配体与受体的结合力越强,结合能 ≤ -20.92 kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ 表明药物分子与靶

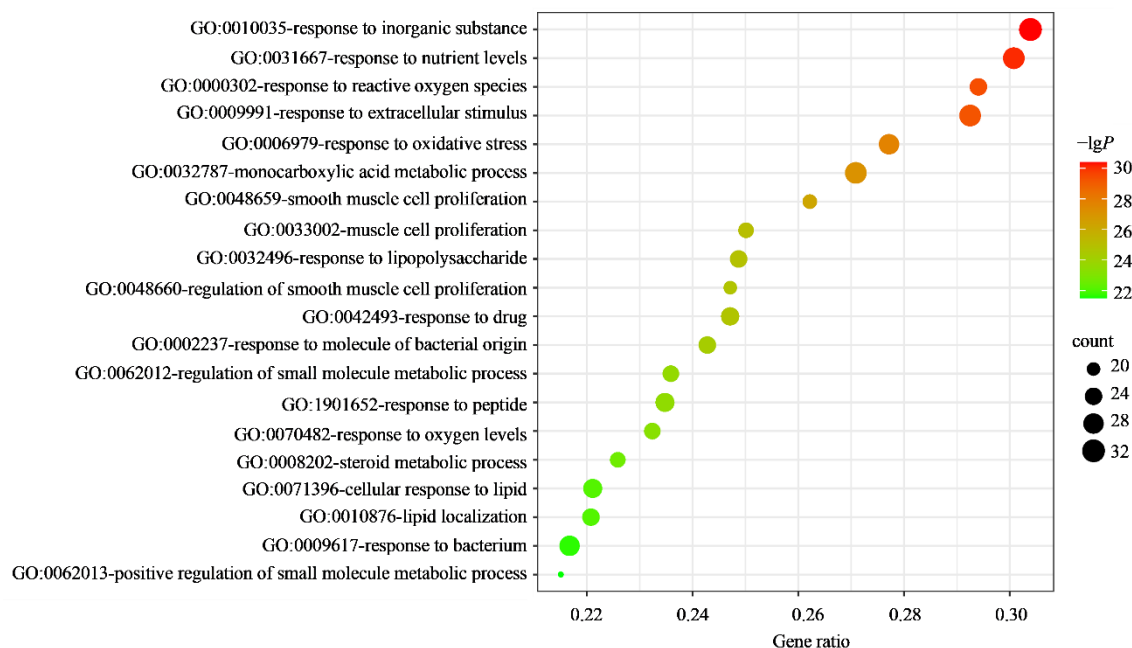


图4 逍遥散治疗MAFLD靶点的GO-BP富集分析(前20)

Fig. 4 GO-BP enrichment analysis of targets of Xiaoyaosan in treating MAFLD (top 20)

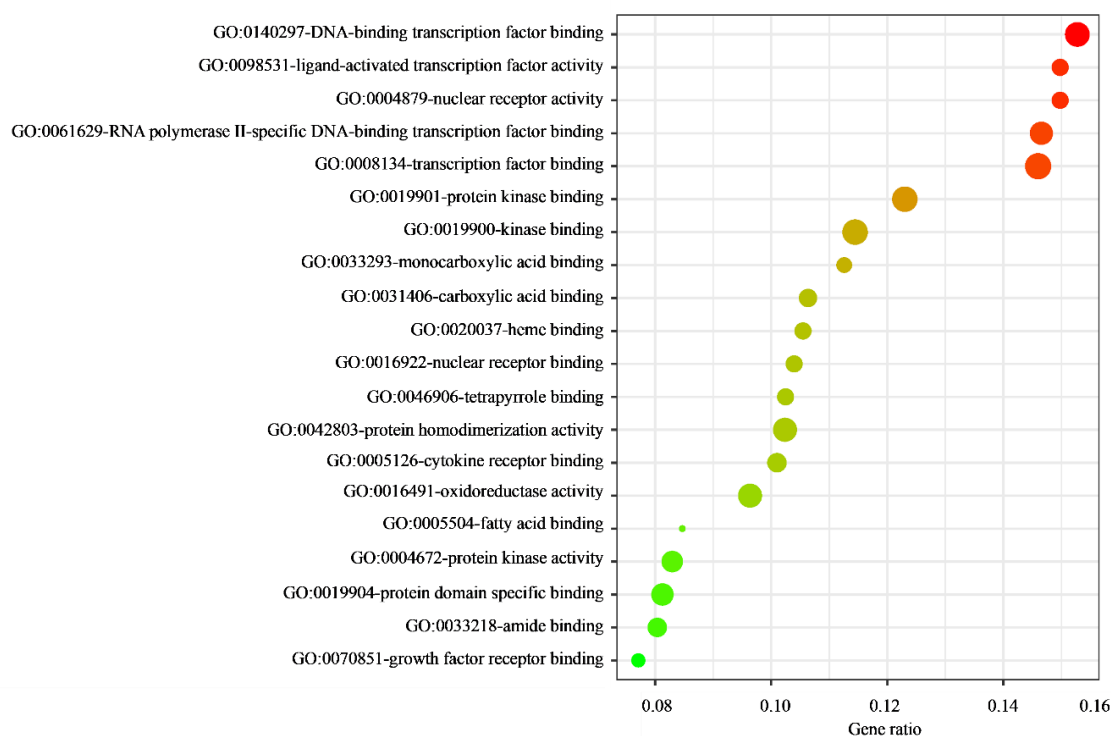


图5 逍遥散治疗MAFLD靶点的GO-MF富集分析(前20)

Fig. 5 GO-MF enrichment analysis of targets of Xiaoyaosan on treating MAFLD (top 20)

点具有较好的结合活性,结合能 $\leq -29.29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表明药物分子与靶点具有强的结合活性^[15]。如表3和图8所示,槲皮素、木犀草素和山柰酚与核心靶点均具有较好的结合活性,结合能均 $< -20.92 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,其中槲皮素、木犀草素和山柰酚与

核心靶点PTGS2、ESR1的结合能均 $< -29.29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,表明活性成分与核心靶点均具有较强的结合活性。

3.3 体内动物实验

3.3.1 逍遥散对MAFLD小鼠血清中ALT、AST活

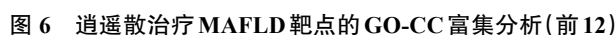


Fig. 6 GO-CC enrichment analysis of targets of Xiaoyaosan on treating MAFLD (top 12)

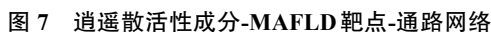


Fig. 7 Network of active ingredient-MAFLD target-pathway of Xiaoyaosan

水平明显降低($P<0.05$),逍遥散高剂量组小鼠血清中TG水平明显降低($P<0.05$),呈浓度相关性;多烯磷脂酰胆碱组小鼠血清中ALT、AST活性及TG、TC水平均明显降低($P<0.01$)。

表1 逍遥散主要活性成分网络节点特征参数

Table 1 Feature parameters of network nodes for main active components of Xiaoyaosan

编号	MOL ID	化合物名称	中文名称	度值	介度	紧密度	来源药材
E1	MOL000098	quercetin	槲皮素	35	0.088 6	0.492 2	柴胡、甘草
BH8	MOL000006	luteolin	木犀草素	17	0.021 8	0.453 6	薄荷
C1	MOL000422	kaempferol	山柰酚	16	0.021 0	0.449 9	柴胡、白芍
FL9	MOL000285	polyporenic acid C	猪苓酸C	16	0.015 7	0.408 2	茯苓
FL10	MOL000292	poricoic acid C	蓖麻酸C	14	0.012 4	0.405 2	茯苓
G1	MOL004328	naringenin	柚皮素	14	0.026 0	0.448 1	薄荷、甘草
FL11	MOL000287	eburcoic acid	齿孔菌酸	13	0.018 7	0.427 2	茯苓
FL8	MOL000280	dehydrotumulosic acid	去氢土莫酸	13	0.009 5	0.400 7	茯苓
BZ2	MOL000028	α -amyrin	α -香树脂醇	11	0.006 2	0.373 5	白术
FL13	MOL000290	poricoic acid A	茯苓新酸A	11	0.007 7	0.397 8	茯苓
FL15	MOL000300	dehydroeburcoic acid	去氢齿孔酸	11	0.008 6	0.400 7	茯苓
GC85	MOL005013	18 α -hydroxyglycyrrhetic acid	18 α -羟基甘草次酸	11	0.005 7	0.382 6	甘草
SJ3	MOL008698	dihydrocapsaicin	二氢辣椒素	11	0.001 0	0.299 3	生姜

表2 逍遥散主要活性成分靶点网络节点特征参数

Table 2 Characteristic parameters of target network nodes of main active components of Xiaoyaosan

靶点	度值	介度	紧密度
PTGS2	117	0.372 9	0.604 4
ESR1	90	0.117 5	0.464 1
NOS2	82	0.109 7	0.474 1
PPARG	75	0.111 7	0.480 3
RXRA	41	0.053 4	0.416 7
RELA	25	0.021 0	0.394 3
AKT1	20	0.013 6	0.390 1
CASP3	19	0.020 0	0.384 6
MAPK8	19	0.010 9	0.387 3
IKBKB	18	0.011 7	0.386 0
IL6	17	0.020 9	0.379 3
JUN	17	0.009 4	0.379 3
MAPK9	17	0.008 1	0.384 6
PPARA	17	0.013 1	0.379 3
NR1H3	16	0.022 3	0.365 4

表3 主要活性成分的分子对接

Table 3 Molecular docking of main active ingredients

活性成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)			
	PTGS2	ESR1	NOS2	PPARG
槲皮素	-33.97	-35.15	-30.88	-27.53
木犀草素	-32.80	-31.42	-28.62	-26.82
山柰酚	-31.46	-30.29	-29.46	-23.35

3.3.2 逍遥散对MAFLD小鼠肝组织病理变化的影响 如图10所示,对照组小鼠肝细胞形态正常,胞

核位于细胞中央且胞质染色均匀,无脂肪空泡和炎症细胞浸润;模型组小鼠多量肝细胞脂肪变性,胞浆可见圆形脂肪空泡,小叶见多处炎性细胞小灶性浸润;与模型组相比,多烯磷脂酰胆碱组及逍遥散低、中、高剂量组肝细胞损伤以及炎症浸润均有不同程度的改善,仅有少量肝细胞伴有脂肪变性,炎性细胞浸润现象减轻。

3.3.3 逍遥散对小鼠肝组织PTGS2、ESR1、NOS2、PPARG蛋白表达的影响 如图11所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中PTGS2、ESR1及NOS2蛋白表达显著上调($P < 0.01$),PPARG蛋白表达显著下调($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组肝组织中ESR1及NOS2蛋白表达显著下调($P < 0.05$ 、 0.01),逍遥散中、高剂量组肝组织中PTGS2蛋白表达显著下调,PPARG蛋白表达显著上调($P < 0.01$)。

4 讨论

MAFLD是一种慢性进行性肝病,其特征是脂肪在肝脏中堆积及炎症变化,通常会发展为肝硬化并增加患肝细胞癌的风险^[16-17]。MAFLD发病机制复杂,与胰岛素抵抗、脂质代谢改变、慢性氧化应激、炎症细胞因子等息息相关^[18-19]。传统中医学并无MAFLD的病名,但根据临床症状可将其归属于肝郁脾虚证、痰浊内阻证、湿热蕴结证及痰瘀互结证等^[20],其病因多为饮食失节、多卧少动、痰湿内阻、肝脾失调^[21]。逍遥散由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草、薄荷和生姜8味中药组成,具有疏肝养血、健脾和中的功效。方中柴胡疏肝解郁;当归、白

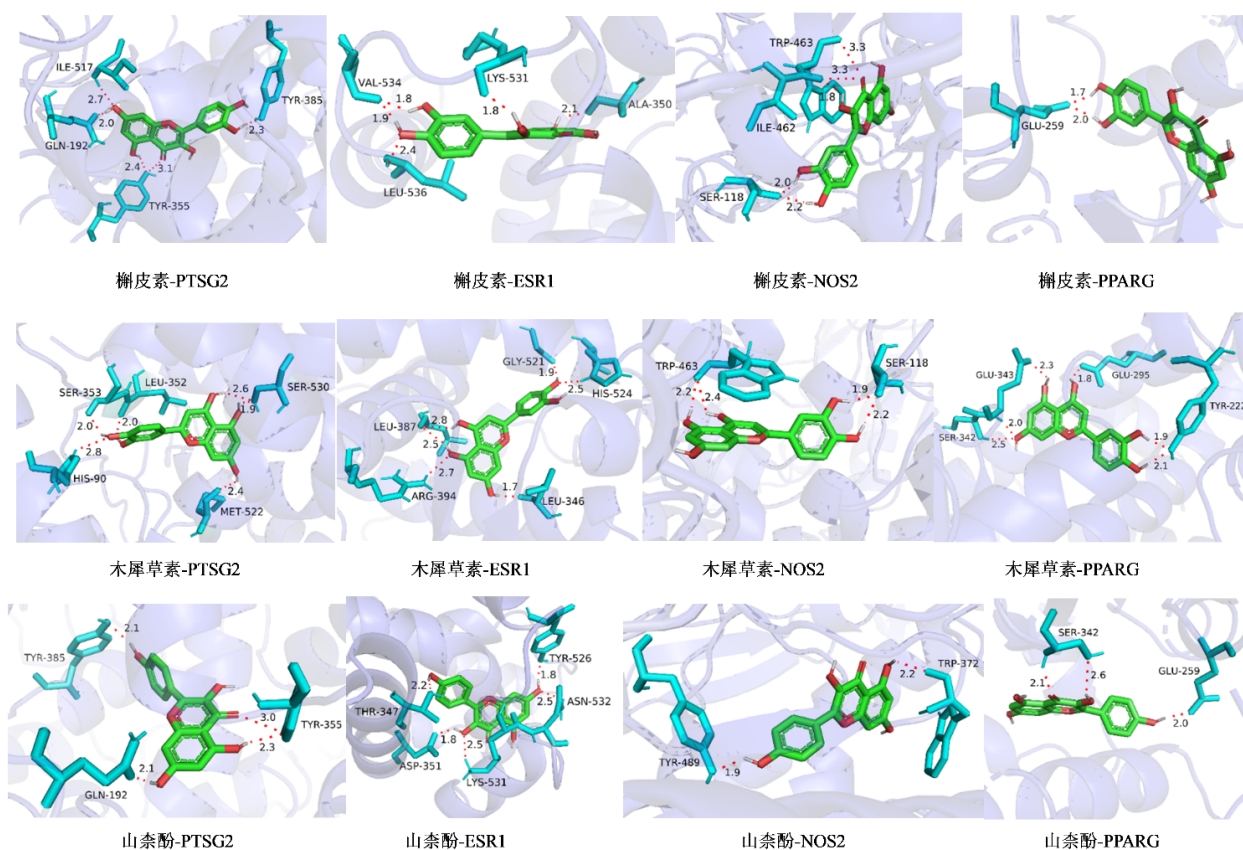
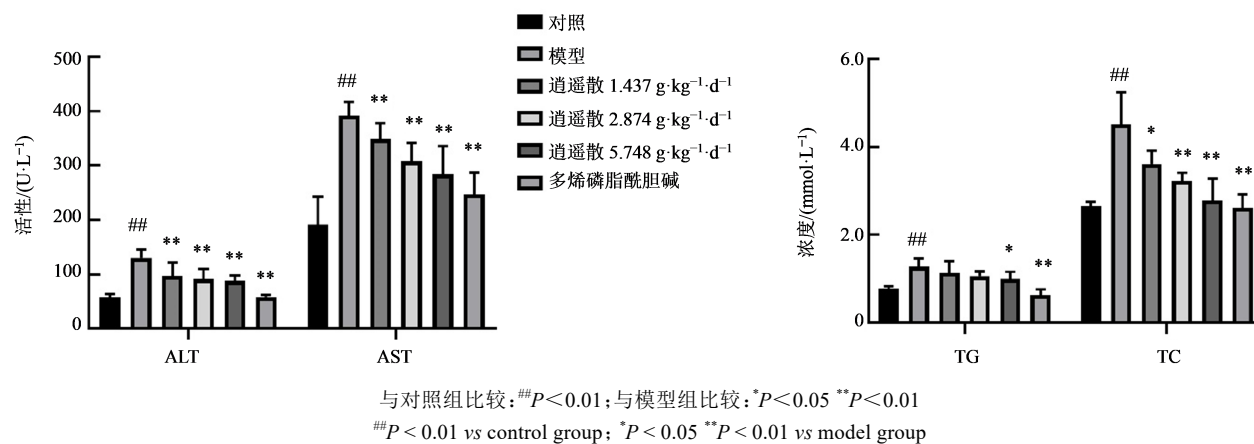


图8 逍遥散活性成分与核心靶点分子对接可视化结果

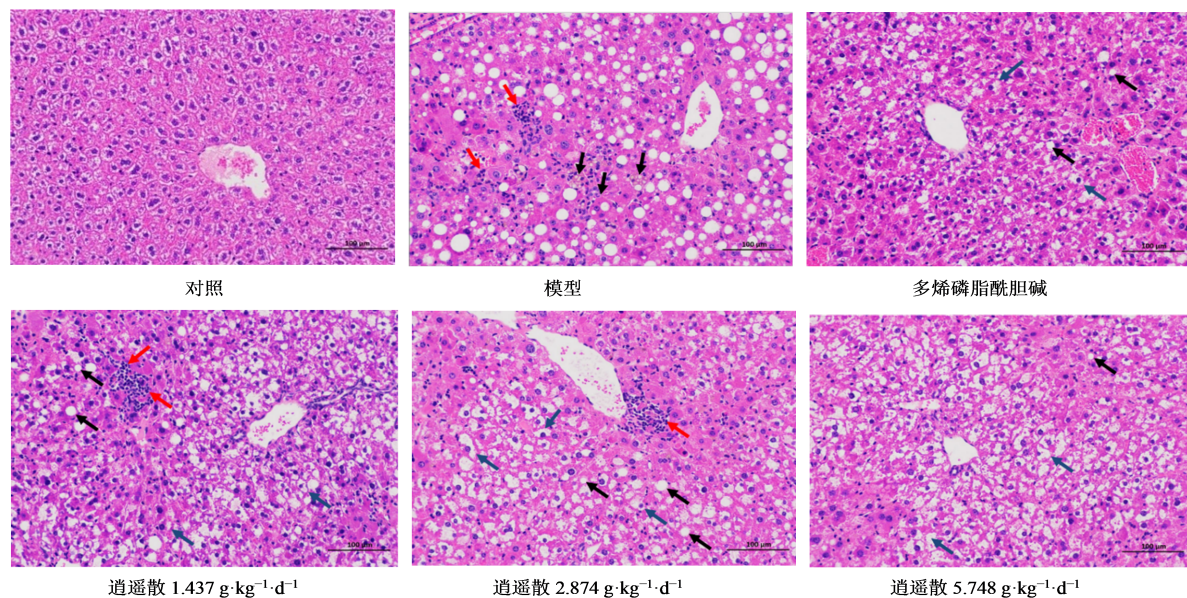
Fig. 8 Visualization of molecular docking between active ingredients of Xiaoyaosan and core targets

图9 逍遥散对MAFLD小鼠血清中ALT、AST活性及TG、TC水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 9 Effect of Xiaoyaosan on activities of ALT, AST and levels of TG, TC in serum of MAFLD mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

苟养血柔肝;白术、甘草、茯苓健脾养心;薄荷助柴胡以散肝郁;煨生姜温胃和中,诸药合用,可收肝脾并治,气血兼顾的功效。李红阁等^[22]通过临床研究表明,MAFLD患者同时服用辛伐他汀及丹栀逍遥散效果优于单用辛伐他汀,能改善患者肝功能并减少肝脏脂肪沉积。逍遥散可改善慢性应激大鼠血浆中血糖、胰岛素、胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇、

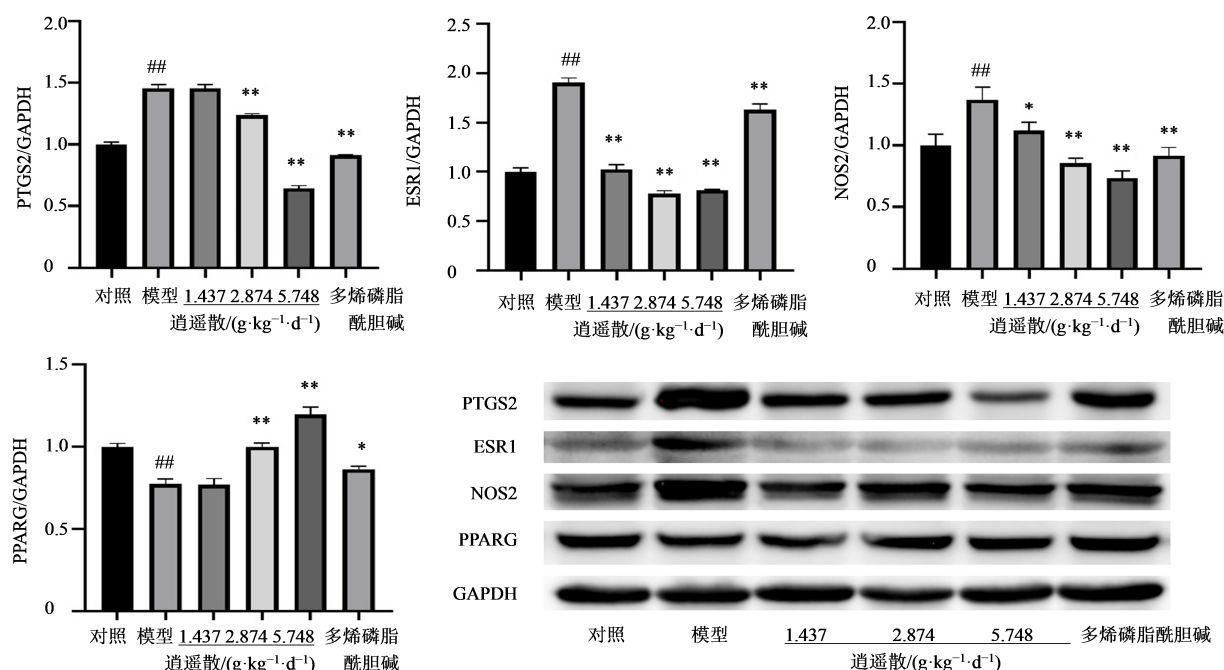
高密度脂蛋白胆固醇的异常水平,进一步研究发现,其机制可能与PI3K/Akt信号通路有关^[23]。

本研究通过网络药理学^[24]和分子对接方法初步确认逍遥散治疗MAFLD的活性成分为槲皮素、木犀草素、山柰酚及猪苓酸C等。槲皮素为柴胡和甘草的共有成分,能减少肝脏中脂质积累,进一步研究表明,槲皮素还可通过激活FXR1/TGR5信号



红色箭头-炎性细胞小灶性浸润;黑色箭头-脂肪空泡;蓝色箭头-胞浆疏松淡染或呈空泡状
red arrow-small focal infiltration of inflammatory cells; black arrow-fat vacuole; blue arrow-the cytoplasm was loose light stained or vacuolated
图 10 逍遥散对 MAFLD 小鼠肝组织病理变化的影响(HE, ×200)

Fig. 10 Effect of Xiaoyaosan on pathological changes of liver tissue in MAFLD mice(HE, ×200)



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 11 逍遥散对 MAFLD 小鼠肝脏中 PTGS2、ESR1、NOS2 及 PPARG 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 Effect of Xiaoyaosan on expression of PTGS2, ESR1, NOS2 and PPARG protein in liver of MAFLD mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

通路从而调节 MAFLD 的脂质代谢^[25]。木犀草素为薄荷的主要成分,能减少肝脏的炎症介质水平,增强 II 期酶活性,抑制 NF- κ B 和 AP-1 的激活,进而抑

制 MAFLD 的形成^[26]。山柰酚为柴胡、白芍、甘草的共有成分,可有效地减轻肝纤维化的形成,其机制与抑制肝星状细胞活化,进而抑制肝星状细胞胶原

蛋白的合成相关^[27]。猪苓酸C为茯苓的主要成分,文献报道^[28]其为潜在的RXR选择性激动剂,RXR激动剂具有治疗代谢疾病的潜力,能调节葡萄糖代谢及抑制炎症细胞因子表达^[29]。这些研究表明逍遥散可通过多种途径治疗MAFLD。

网络药理学结果表明,逍遥散治疗MAFLD的靶点主要集中于PTGS2、ESR1、NOS2、PPARG、RXRA、RELA等。PTGS2在花生四烯酸合成前列腺素途径中起关键作用。在受到细胞因子、细菌等多种炎症因子刺激后,PTGS2可引发炎症并促进前列腺素的合成,过度的炎症会造成肝损伤,导致肝纤维化或肝硬化^[30]。ESR1即雌激素受体 α ,其介导的雌激素信号传导在脂肪生成的调节中起重要作用,ESR1可通过减少肝脏中参与脂质合成的一些基因的表达来防止高脂血症的发生^[31]。NOS2为诱导性NOS,在细胞应激或炎症条件下,NOS2表达上调,持续产生高水平的NO,并且NOS2正向调节MMP-9表达,促进肿瘤细胞血管生成,促进肝癌的形成^[32]。PPAR属于核激素受体超家族,在葡萄糖和脂肪酸代谢中起着举足轻重的作用,其中PPARG在调节脂质代谢中起重要作用,PPARG可通过抑制TNF- α 生成和上调CD36及LPL的表达来调节脂质代谢^[33]。分子对接结果显示,槲皮素、木犀草素及山柰酚与靶点PTGS2、ESR1、NOS2、PPARG结合能力较好。

动物实验表明逍遥散可降低MAFLD小鼠肝组织AST、ALT、TG及TC水平,改善肝功能指标的作用。HE染色结果表明逍遥散可减缓MAFLD小鼠肝组织病理变化,肝细胞损伤以及炎症浸润均有不同程度的改善,其中逍遥散高剂量组疗效较优。基于网络药理学结果筛选出的靶点进行Western blotting实验,结果显示,与模型组相比,逍遥散中、高剂量组小鼠肝组织中PTGS2、ESR1及NOS2蛋白表达显著降低,PPARG蛋白表达显著升高,提示逍遥散可通过调控PTGS2、ESR1、NOS2及PPARG等靶点发挥治疗MAFLD作用。

本研究通过网络药理学、分子对接及体内动物实验与传统中医药相结合的方法,发现逍遥散可通过多通路、多靶点方式治疗MAFLD,为临床运用逍遥散治疗MAFLD提供了科学依据,也有助于阐明逍遥散抗MAFLD的作用机制,为逍遥散的新药研发提供了理论依据和参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 朱红梅,王勤英.非酒精性脂肪性肝病肝纤维化的诊断和治疗进展[J].临床肝胆病杂志,2020,36(1):178-181.
Zhu H M, Wang Q Y. Advances in the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease-related liver fibrosis [J]. J Clin Hepatol, 2020, 36(1): 178-181.
- [2] Cariello M, Piccinin E, Moschetta A. Transcriptional regulation of metabolic pathways via lipid-sensing nuclear receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 11(5): 1519-1539.
- [3] 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会,中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组.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):939-946.
Fatty Liver Expert Committee, Chinese Medical Doctor Association, National Workshop on Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease, et al. Guidelines of prevention and treatment for alcoholic liver disease: A 2018 update [J]. J Clin Hepatol, 2018, 34(5): 939-946.
- [4] Feng G, Li X P, Niu C Y, et al. Bioinformatics analysis reveals novel core genes associated with nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. Gene, 2020, 742: 144549.
- [5] 钱坤,刘亚云,张艳,等.中药抗非酒精性脂肪肝病分子机制的研究进展[J].中草药,2020,51(19):5083-5092.
Qian K, Liu Y Y, Zhang Y, et al. Research progress on molecular mechanism of traditional Chinese medicine against non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(19): 5083-5092.
- [6] 柴智,杜珊,樊慧杰,等.逍遥散及其加减治疗肝病的临床应用及现代研究进展[J].中华中医药杂志,2017,32(8):3631-3634.
Chai Z, Du S, Fan H J, et al. Clinical application and modern research progress of treatment of liver diseases by Xiaoyao Powder and its modification [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(8): 3631-3634.
- [7] 黄琛,石磐.逍遥散加减治疗非酒精性脂肪肝患者的临床效果观察[J].临床合理用药杂志,2019,12(11):65-66.
Huang C, Shi Q. Clinical observation on nonalcoholic fatty liver by the treatment of Xiaoyaosan plus/minus prescription [J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2019, 12(11): 65-66.
- [8] 石友.逍遥散合当归芍药散治疗非酒精性脂肪肝临床观察[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(46):148-149.
Shi Y. Clinical observation on the treatment of

- nonalcoholic fatty liver with Xiaoyaosan and Danggui Shaoyao Powder [J]. World Latest Med Inf, 2018, 18(46): 148-149.
- [9] 王海燕, 吕建林, 吕文婷, 等. 加味逍遥散治疗肥胖型青少年非酒精性脂肪肝的疗效评价 [J]. 中医临床研究, 2019, 11(27): 18-21.
Wang H Y, Lv J L, Lv W T, et al. Efficacy evaluation of Modified Xiaoyao Powder in the treatment of nonalcoholic fatty liver in obese adolescents [J]. Clin J Chin Med, 2019, 11(27): 18-21.
- [10] 徐慧超. TLR4基因甲基化对非酒精性脂肪性肝炎肝郁脾虚证作用机制的影响 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2020.
Xu H C. Effect of *TLR4* gene methylation on the mechanism of liver stagnation and spleen deficiency syndrome in non-alcoholic steatohepatitis [D]. Taiyuan: Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [11] 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.
- [12] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [13] 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.
- [14] 陈艳珍, 陈成良, 田 兴, 等. 基于非酒精性脂肪性肝病机制及治疗的动物模型研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(12): 2457-2461.
Chen Y Z, Chen C L, Tian X, et al. Research advances in animal models based on the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Clin Hepatol, 2017, 33(12): 2457-2461.
- [15] 单丽芳, 康国娇, 张 超, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨四物汤抗乳腺癌的作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3943-3953.
Shan L F, Kang G J, Zhang C, et al. Mechanism of Siwu Decoction on breast cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(13): 3943-3953.
- [16] Perumpail B J, Khan M A, Yoo E R, et al. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(47): 8263-8276.
- [17] Povsic M, Wong O Y, Perry R, et al. A structured literature review of the epidemiology and disease burden of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. Adv Ther, 2019, 36(7): 1574-1594.
- [18] Parthasarathy G, Revelo X, Malhi H. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: An overview [J]. Hepatol Commun, 2020, 4(4): 478-492.
- [19] 倪家敏, 周 飞, 黄暨生, 等. 高糖高脂诱导大鼠代谢相关脂肪性肝病模型的建立 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(3): 487-491.
Ni J M, Zhou F, Huang J S, et al. Establishment of metabolic associated fatty liver disease model in sprague-dawley rats by high-sucrose-fat diet [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(3): 487-491.
- [20] 李军祥, 陈 諝, 王允亮. 非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗共识意见 (2017年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(11): 805-811.
Li J X, Chen J, Wang Y L. Consensus on diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease with integrated traditional and western medicine (2017) [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2017, 25(11): 805-811.
- [21] 王邦才, 王玲玲, 袁建芬, 等. 泄浊化瘀方治疗非酒精性脂肪性肝病的临床研究 [J]. 世界中医药, 2016, 11(8): 1468-1470.
Wang B C, Wang L L, Yuan J F, et al. Clinical observation on expelling turbid and removing stagnation formula in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. World Chin Med, 2016, 11(8): 1468-1470.
- [22] 李红阁, 苏和平. 辛伐他汀联合丹栀逍遥散治疗非酒精性脂肪肝81例 [J]. 西部中医药, 2017, 30(6): 98-100.
Li H G, Su H P. Treating 81 cases of non alcoholic fatty liver disease by simvastatin and Danzhi Xiaoyao Powder [J]. West J Tradit Chin Med, 2017, 30(6): 98-100.
- [23] Pan Q X, Wu J J, Liu Y Y, et al. Involvement of hepatic SHIP₂ and PI3K/Akt signalling in the regulation of plasma insulin by Xiaoyaosan in chronic immobilization-stressed rats [J]. Molecules, 2019, 24(3): 480.
- [24] 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.
Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [25] Yang H, Yang T T, Heng C, et al. Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice [J]. Phytother Res, 2019, 33(12): 3140-3152.
- [26] Park C M, Song Y S. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside protect against acute liver injury through regulation of inflammatory mediators and antioxidative enzymes in GalN/LPS-induced hepatic ICR mice [J]. Nutr Res

- Pract, 2019, 13(6): 473-479.
- [27] Xu T F, Huang S, Huang Q R, et al. Kaempferol attenuates liver fibrosis by inhibiting activin receptor-like kinase 5 [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(9): 6403-6410.
- [28] Xu H, Wang Y C, Zhao J N, et al. Triterpenes from *Poria cocos* are revealed as potential retinoid X receptor selective agonists based on cell and in silico evidence [J]. Chem Biol Drug Des, 2020, 95(5): 493-502.
- [29] Hiebl V, Ladurner A, Latkolik S, et al. Natural products as modulators of the nuclear receptors and metabolic sensors LXR, FXR and RXR [J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(6): 1657-1698.
- [30] Hu Y, Yang X F, Wu S D, et al. COX-2 in liver fibrosis [J]. Clin Chim Acta, 2020, 506: 196-203.
- [31] Kur P, Kolasa-Wołoskiuk A, Misiakiewicz-Has K, et al. Sex hormone-dependent physiology and diseases of liver [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(8): 2620.
- [32] Wang R H, Geller D A, Wink D A, et al. NO and hepatocellular cancer [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(24): 5459-5466.
- [33] Skat-Rørdam J, Ipsen D H, Lykkesfeldt J, et al. A role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019, 124(5): 528-537.

[责任编辑 刘东博]

~~~~~

## •公益广告•

