

基于超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱和网络药理学的甘枣宁治疗非酒精性脂肪性肝病药效物质基础研究

王婉先^{1,2}, 姚曼³, 余钦⁴, 李一璇¹, 凌昌全^{1,2,3*}

1. 上海中医药大学, 上海 201203

2. 海军军医大学中医系, 上海 200433

3. 海军军医大学附属长海医院 中医肿瘤科, 上海 200433

4. 上海中医药大学附属岳阳医院, 上海 200437

摘要: 目的 探究甘枣宁的主要活性成分, 预测并验证其治疗非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的主要物质基础。方法 采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS), 明确甘枣宁水煎液的化学成分。采用网络药理学方法检索甘枣宁活性成分及其潜在靶点, 将药物靶点与 NAFLD 相关靶点取交集, 进行蛋白质与蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI)、基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。考察甘枣宁水煎液及(S)-N-衡州乌药碱、(R)-N-衡州乌药碱、N-去甲基亚美罂粟碱、O-去甲基荷叶碱、(-)-表儿茶素和 N-去甲基荷叶碱 6 个关键活性成分对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 上清液一氧化氮水平的影响; 考察甘枣宁水煎液及 N-去甲基荷叶碱对 RAW264.7 细胞存活率的影响。结果 从甘枣宁水煎液鉴定出 96 个主峰成分, 网络药理学分析出甘枣宁治疗 NAFLD 的活性成分 31 个, 所对应的相关靶点 42 个, 其中一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase 3, NOS3)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等靶点关联性较强; 甘枣宁治疗 NAFLD 主要涉及糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 及其糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 通路、程序性坏死等通路。甘枣宁水煎液具有良好的抗炎活性, N-去甲基荷叶碱可能为其发挥抗炎作用的关键成分。结论 甘枣宁治疗 NAFLD 具有多成分、多靶点的特点, 其药效物质基础与抗炎相关。

关键词: 甘枣宁; 非酒精性脂肪性肝病; 超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱; 网络药理学; N-去甲基荷叶碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3591-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.016

Pharmacodynamic material basis of Ganzaoxing for treatment of non-alcoholic fatty liver disease based on ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and network pharmacology

WANG Wan-xian^{1,2}, YAO Man³, YU Qin⁴, LI Yi-xuan¹, LING Chang-quan^{1,2,3}

1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Department of Traditional Chinese Medicine Oncology, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

4. Yueyang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

Abstract: Objective To explore the main active ingredients of Ganzaoxing (甘枣宁), and predict and verify its main material basis for treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (UPLC-Q-TOF-MS/MS) was used to determine the chemical composition of Ganzaoxing

收稿日期: 2020-12-16

作者简介: 王婉先, 女, 硕士研究生, 研究方向为中医药综合防治肿瘤。E-mail: wwxliver@sina.com

*通信作者: 凌昌全, 教授, 研究方向为中医药综合防治肿瘤。E-mail: changquanling@smmu.edu.cn

Decoction. Network pharmacology was used to search for active ingredients and potential targets of Ganzaoing, drug targets and NAFLD-related targets were taken the intersection, protein-protein interaction (PPI) and gene ontology (GO) function enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis were performed. The effect of Ganzaoing Decoction and (*S*)-*N*-coclaurine, (*R*)-*N*-coclaurine, *N*-desmethyamine, *O*-nornuciferine, (-)-epicatechin, *N*-nornuciferine on NO levels in supernatant of RAW264.7 cells were investigated; Effect of Ganzaoing Decoction and *N*-nornuciferine on survival rate of RAW264.7 cells were investigated. **Results** A total of 96 main peak components were identified from Ganzaoing decoction, 31 active ingredients of Ganzaoing in treatment of NAFLD and 42 corresponding targets were identified by network pharmacology, nitric oxide synthase 3 (NOS3), interleukin-6 (IL-6) and other targets had a strong correlation. Ganzaoing in treatment of NAFLD mainly involved advanced glycation end products (AGEs) and its receptor for advanced glycation end products (RAGE) pathway, programmed necrosis and other pathways. Ganzaoing Decoction had a good anti-inflammatory activity, and *N*-nornuciferine may be a key component of its anti-inflammatory effect. **Conclusion** Ganzaoing has the characteristics of multiple components and multiple targets in the treatment of NAFLD, and its pharmacodynamic material basis is related to anti-inflammation.

Key words: Ganzaoing; non-alcoholic fatty liver; ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry; network pharmacology; *N*-nornuciferine

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 发病率日益升高, 已成为最常见的慢性肝脏疾病之一^[1]。海军军医大学附属长海医院中医研发的甘枣宁复方由大枣、山药、山楂、佛手、荷叶、玉米须 6 味中药组成, 具有疏肝、健脾、调脂的功效, 对 NAFLD 疗效显著^[2-3]。前期研究^[4]发现, 甘枣宁治疗 NAFLD 具有多成分、多靶点、多通路的特点, 涉及对营养物质水平的调节、抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的激活、调控活性氧代谢等生物学过程。由于网络药理学数据库主要基于文献报道, 在药材炮制过程中, 其所含化学成分与原饮片可能存在差异^[5]。因此, 本研究以超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 鉴定数据为依据, 进行网络药理学分析, 并考察甘枣宁关键活性成分的抗炎作用, 为系统分析甘枣宁治疗 NAFLD 的药效物质基础提供依据。

1 材料

1.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 饮片

大枣 (批号 200214-1)、山药 (批号 200505-1)、山楂 (批号 200417-1)、佛手 (批号 200417-1)、荷叶 (批号 200320-1) 购自安国市同德中药材有限公司, 玉米须 (批号 570180701) 购自北京宏济药业有限公司, 经中国科学院大连化学物理研究所杨小平副研究员鉴定分别为鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实、薯蓣科植物薯蓣

Dioscorea opposita Thunb. 的干燥根茎、蔷薇科植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实、芸香科植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarco-dactylis* Swingle 的干燥果实、睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶、禾本科植物玉蜀黍 *Zea mays* L. 的干燥花柱和柱头。

1.3 药品与试剂

对照品 (*S*)-*N*-衡州乌药碱、(*R*)-*N*-衡州乌药碱、*N*-去甲基亚美罂粟碱、*O*-去甲基荷叶碱、(-)-表儿茶素和 *N*-去甲基荷叶碱为本实验室自制, 经 HPLC 检测质量分数均 $\geq 98\%$; 质谱级乙腈 (批号 203500) 和甲酸 (批号 202674) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; DMEM 培养基 (批号 8120423) 购自美国 Gibco 公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 批号 ST1276)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒 (批号 11020201014) 购自碧云天生物技术有限公司; 青霉素-链霉素溶液 (批号 1936917)、PBS 缓冲液 (批号 2026067) 购自以色列 BI 公司; 胎牛血清 (批号 ST180125) 购自德国 PAN-Biotech 公司; LPS (批号 L6529) 购自美国 Sigma 公司; 小白菊内酯 (批号 I1206051) 购自阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.4 仪器

Acquity UPLC[®] I-Class 系统 (美国 Waters 公司); 1290 Infinity II UPLC、6545 Q-TOF-MS/MS (美国 Agilent 公司); BWS-27 型精密恒温水槽 (上海一恒科学仪器有限公司); L550 型台式离心机 (上海卢湘仪有限公司); 311 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); EnSight 酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); HYC-290 型医用冷藏箱 (青

岛海尔特种电器有限公司)。

2 方法

2.1 甘枣宁水煎液的制备

称取大枣饮片 240 g、山药饮片 240 g、山楂饮片 180 g、佛手饮片 180 g、荷叶饮片 120 g、玉米须饮片 120 g，加入 8 L 纯水，浸泡 30 min，100 °C 煎煮 30 min，收集水煎液；加入 8 L 纯水，100 °C 煎煮 20 min；合并 2 次水煎液，过 500 nm 陶瓷膜澄清，在进膜压 0.33 MPa、出膜压 0.26 MPa 的条件下进行澄清滤过，少量多次补水，收集透过液与截留液。将上述澄清液置于旋转蒸发仪中浓缩成相对密度为 1.0~1.2 的浸膏，于真空干燥箱中干燥。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品 (S)-N-衡州乌药碱、(R)-N-衡州乌药碱、N-去甲基亚美(杏黄)罂粟碱、O-去甲基荷叶碱、(-)-表儿茶素、N-去甲基荷叶碱适量，溶于 DMSO 分别配制成 100 mmol/L 对照品溶液。

2.3 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

2.3.1 色谱条件 BEH Shield RP₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)，流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B)，梯度洗脱：0~15 min，2%~90% B；体积流量为 0.4 mL/min；柱温为 30 °C；进样量为 1 μL。

2.3.2 梯度洗脱程序优化 在 BEH Shield RP₁₈ 色谱柱上调整梯度洗脱程序，优化对甘枣宁水煎液的分离效果。梯度 1：0~15 min，2%~90% B。梯度 2：0~9 min，2%~40% B；9~10 min，40%~0% B。梯度 3：0~2 min，0% B；2~10 min，0%~40% B；10~12 min，40%~90% B。梯度 4：0~2 min，0% B；2~4 min，0%~10% B；4~13 min，10%~35% B；13~15 min，35%~90% B。

2.3.3 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI)；正、负离子全扫描模式；干燥气温度为 320 °C；干燥气体积流量为 8 L/min；雾化气压力为 35 psi (1 psi=6.895 kPa)；鞘气温度为 350 °C；鞘气体积流量为 11 L/min；毛细管电压为 +3500 V 和 -3000 V；碎裂电压为 135 V；碰撞电压为 65 V；碰撞能为 20 eV；一级质量扫描范围为 m/z 100~1300，二级质量扫描范围为 m/z 50~1000；数据采集模式为 Auto-MS/MS。

2.3.4 化学成分鉴定 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对甘枣宁水煎液进行分析，比较甘枣宁水煎液在正

负离子模式下的提取离子流图，利用高分辨质谱的精确相对分子质量信息，确认化合物的分子式，随后利用二级质谱的碎片信息，结合文献报道的裂解规律对化合物结构进行推测，最后与文献中的化合物碎片信息比对确认。

2.4 甘枣宁提取液中活性成分及疾病靶点的筛选

采用 TCMSp 平台 (<https://tcmspw.com/tcmsp.php>)^[6]对甘枣宁水煎液鉴定出的化合物逐一进行靶点检索。以“NAFLD”作为关键词，通过 OMIM 平台 (<https://www.omim.org/>)、DisGeNET 平台 (<https://www.disgenet.org/>)^[7]、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[8]检索 NAFLD 相关靶点。DisGeNET 数据库纳入系统评分 >0.01 的靶点，GeneCards 数据库纳入系统评分 >45.475 的靶点，将各数据库靶点合并去重，名称格式统一，获得交集基因数据集。

2.5 蛋白质与蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建与关键靶点筛选

采用 STRING 数据库^[9]对甘枣宁潜在靶点与疾病靶点进行 PPI 分析，上传交集基因数据集，选择物种为“Homo sapiens”，隐藏游离节点，采用 Cytoscape 3.6.1 软件^[10]绘图。

2.6 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析

采用 Metascape 数据库对交集基因进行 GO 分析和 KEGG 分析^[11]，将所得结果进行绘图分析。采用 Cytoscape 3.6.1 软件 ClueGo 插件^[12]，录入潜在靶点和疾病潜在相关靶点交集，进行 GO 分析，得出生物过程 (biological process, BP)，选择物种为“Homo sapiens”，选择合并相似功能，统计 $P < 0.05$ 的通路，GO 网络连接评分选择 0.45，绘制关键 BP 富集图，将关键靶点与之联系，并根据占比情况绘制饼状图。

2.7 甘枣宁水煎液对 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的影响

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞，以 2×10^4 孔接种至 96 孔板中，培养 24 h。设置对照组、模型组、小白菊内酯 (5 μmol/L) 组、(S)-N-衡州乌药碱 (100 μmol/L) 组、(R)-N-衡州乌药碱 (100 μmol/L) 组、N-去甲基亚美罂粟碱 (100 μmol/L) 组、O-去甲基荷叶碱 (100 μmol/L) 组、(-)-表儿茶素 (100 μmol/L) 组、N-去甲基荷叶碱 (100 μmol/L)

组和甘枣宁水煎液 (2.5 mg/mL) 组。“2.2”项下各对照品溶液分别用培养基稀释至相应浓度;“2.1”项下甘枣宁水煎液样品用水配制成质量浓度为 100 mg/mL 的储存液,用培养基稀释至相应质量浓度。各给药组加入 90 μL 相应药物,预处理 1 h;模型组和各给药组再加入 10 μL LPS (1 μg/mL),对照组加入含 DMSO 的 DMEM 培养基,培养 24 h,按试剂盒说明书检测细胞上清液中 NO 水平。

2.8 甘枣宁水煎液对 RAW264.7 细胞存活率的影响

设置对照组、N-去甲基荷叶碱 (200、100、50 μmol/L) 组和甘枣宁水煎液 (10.0、5.0、2.5 mg/mL) 组。按“2.7”项下方法处理细胞,弃去培养基,避光加入 100 μL CCK8 溶液,培养 1 h,采用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

3 结果

3.1 甘枣宁水煎液中化学成分的鉴定

通过梯度条件的优化,确定了最佳的流动相条件为梯度 4,在质谱分析时为了确认样品在色谱柱上的残留情况,增加了 5 min 90% B 冲洗时间。甘枣宁水煎液的提取离子流图见图 1,甘枣宁水煎液在正离子模式下的响应优于负离子模式,正负离子模式下的离子化效率不同。通过对正负离子模式的成分解析,共获得 96 个主峰化合物,包括野漆树苷、山柰素-3-O-己糖苷、金丝桃苷和香叶木素-7-O-葡萄糖苷等 34 个黄酮类化合物,以及氨基酸类、单糖类、酚酸类、核苷类、花青素类、柠檬苦素类、生物碱类、有机酸类化合物。

3.2 甘枣宁治疗 NAFLD 的网络药理学分析

预测出的 31 个活性成分见表 1。如图 2 所示,

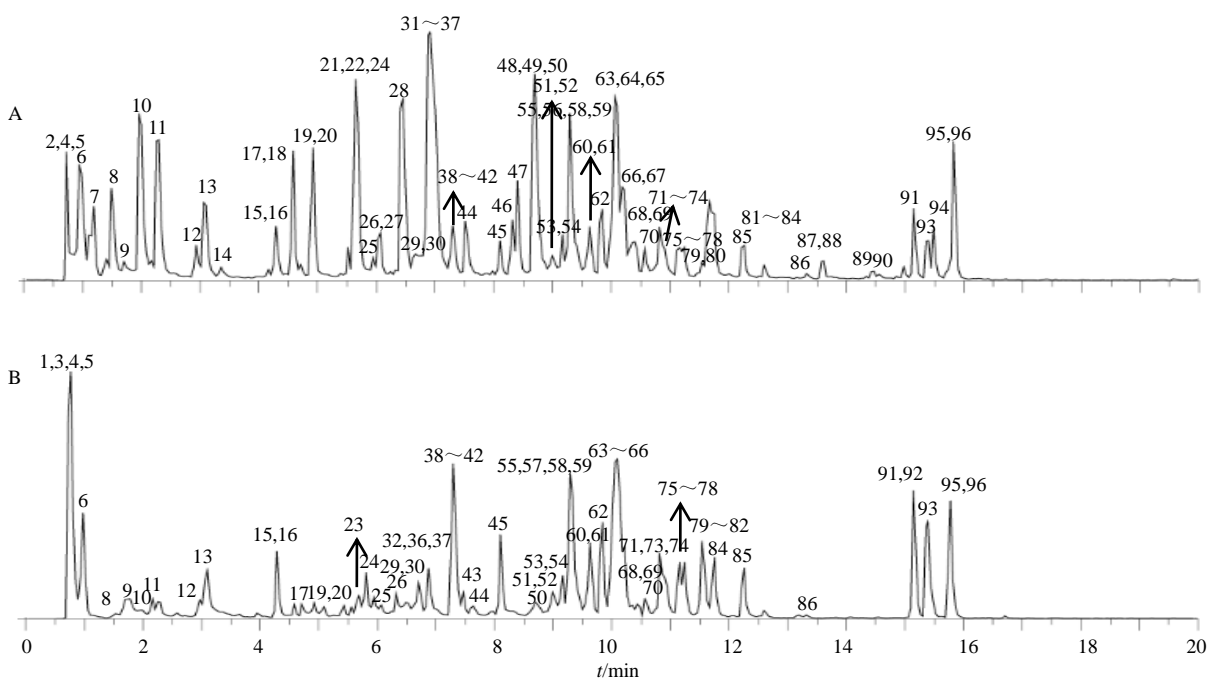


图 1 甘枣宁水煎液在正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下的提取离子流图

Fig. 1 Extraction ion chromatogram of Ganzaoning Decoction in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

表 1 甘枣宁活性成分

Table 1 Active compounds of Ganzaoning

名称	分子式	tr/min	离子模式	相对分子质量	误差/ (×10 ⁻⁶)	碎片离子(m/z)	化合物	来源	色谱峰
A	C ₅ H ₁₁ NO ₂	0.73	[M+H] ⁺	118.086 3	-4	102.054 8, 72.080 7, 58.065 2	L-valin	大枣、山药	2
B	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.81	[M-H] ⁻	341.109 2	-2	179.055 8, 89.024 5	sucrose	大枣、山药	5
E	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	6.71	[M-H] ⁻	289.071 8	5	245.08 15, 179.034 1, 151.039 6, 125.024 1	(-)-catechin	大枣、荷叶	30
F	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	10.06	[M+H] ⁺	465.104 4	2	303.050 2	hyperin	荷叶、山楂	64
G	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	11.24	[M+H] ⁺	493.097 8	2	317.065 4, 159.028 3	isorhamnetin-3-O-glucuronide	荷叶、山楂	77
H	C ₄ H ₆ O ₅	0.98	[M-H] ⁻	133.014 0	-2	115.003 2, 71.013 7	MLT	大枣、荷叶、玉米须、山楂	6

续表 1

名称	分子式	<i>t_R</i> /min	离子模式	相对分子质量	误差/ (×10 ⁻⁶)	碎片离子(<i>m/z</i>)	化合物	来源	色谱峰
I	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	8.86	[M-H] ⁻	431.097 9	1	341.067 2, 311.054 5, 269.077 3	isovitexin	玉米须、山楂	50
SY1	C ₆ H ₁₃ NO ₂	1.20	[M+H] ⁺	132.102 0	-3	114.055 3, 69.033 6	L-Ile	山药	7
DZ1	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	6.71	[M-H] ⁻	289.071 8	5	245.081 5, 179.034 1, 151.039 6, 125.024 1	(+)-catechin	大枣	30
DZ2	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	6.88	[M+H] ⁺	286.144 6	1	269.117 2, 237.090 9, 209.096 1, 175.075 2, 107.049 1	(S)-coclaurine	大枣	34
DZ5	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	4.59	[M+H] ⁺	205.097 2	-2	188.096 4, 146.060 0	DTR	大枣	17
DZ7	C ₃ H ₆ O ₂	7.30	[M-H] ⁻	195.066 0	3	177.055 4, 151.076 4, 136.053 6, 121.029 4	tulipane	大枣	39
DZ10	C ₉ H ₁₀ O ₂	6.07	[M+H] ⁺	151.075 2	-4	91.054 2	HCl	大枣	27
HY1	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	5.65	[M+H] ⁺	300.161 9	7	237.090 9, 209.095 7, 175.074 9, 145.065 1, 107.040 9	(R)-N-methylcoclaurine	荷叶	22
HY3	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	8.40	[M+H] ⁺	282.149 1	-1	265.122 9, 250.098 5, 234.103 5, 207.080 1	N-nornuciferine	荷叶	47
HY4	C ₁₈ H ₁₇ NO ₂	8.70	[M+H] ⁺	280.134 2	2	249.090 9, 219.080 3, 191.085 3	remerin	荷叶	48
HY5	C ₁₇ H ₁₅ NO ₂	8.74	[M+H] ⁺	266.117 6	-2	249.090 7, 219.080 3, 191.084 9	anonaine	荷叶	49
HY6	C ₉ H ₈ O ₃	11.54	[M-H] ⁻	163.040 0	-2	119.0500, 93.0348	cis-p-coumarate	荷叶	80
SZ2	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	7.34	[M-H] ⁻	289.072 0	-1	245.081 8, 179.034 1, 151.039 6, 125.024 1	(-)-epicatechin	山楂	42
SZ3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	9.59	[M-H] ⁻	447.093 1	3	357.060 8, 327.049 0, 285.039 9, 284.032 6	isoorientin	山楂	60
SZ4	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	7.00	[M-H] ⁻	577.134 5	0	451.101 7, 425.087 6, 407.076 3, 289.070 9, 125.024 2	procyanidin b2	山楂	37
SZ5	C ₇ H ₈ O ₂	0.72	[M-H] ⁻	293.101 0	6	247.095 7	orcin	山楂	1
FS1	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	9.84	[M+H] ⁺	611.197 7	-1	449.142 7, 303.086 5, 177.054 9, 153.019 0	hesperidin	佛手	62
FS2	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	10.22	[M-H] ⁻	607.167 0	-1	299.056 3, 284.032 3	diosmin	佛手	66
FS3	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	13.70	[M+H] ⁺	207.065 4	1	192.041 6, 164.046 5, 121.064 5	limetin	佛手	88
FS4	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	13.70	[M+H] ⁺	207.065 4	1	192.041 6, 164.046 5, 121.064 5	scoparone	佛手	88
FS5	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	15.14	[M-H] ⁻	469.186 5	0	425.196 8, 321.113 1, 306.129 5, 199.112 1	limonin	佛手	91
FS6	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	11.67	[M+H] ⁺	317.101 9	-2	233.044 2, 203.033 6, 188.010 0, 175.038 7	byakangelicol	佛手	83
FS7	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	15.48	[M+H] ⁺	403.139 1	0	388.115 8, 373.091 6, 355.081 3	nobiletin	佛手	94
FS8	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	15.48	[M+H] ⁺	403.139 1	0	388.115 8, 373.091 6, 355.081 3	naringin	佛手	94
FS9	C ₁₀ H ₈ O ₄	5.94	[M+H] ⁺	193.049 5	-3	178.026 1, 165.054 3, 133.028 7	scopoletol	佛手	25



图 2 甘枣宁治疗 NAFLD 的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of Ganzaoning in treatment of NAFLD

甘枣宁治疗 NAFLD 共 42 个靶点，“中药-成分-靶点-通路”网络见图 3。如图 4 所示，PPI 网络分析得出白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、过氧化物酶体

增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARG)、趋化因子配体 2 (chemokine C-C motif ligand 2, CCL2)、一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase 3, NOS3) 等靶点相关性较强。

如图 5 所示，甘枣宁治疗 NAFLD 主要涉及糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 及其糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 通路、血流剪切应力与动脉粥样硬化、程序性坏死等通路。如图 6 所示，甘枣宁治疗 NAFLD 涉及外源性凋亡信号通路、细胞对 LPS

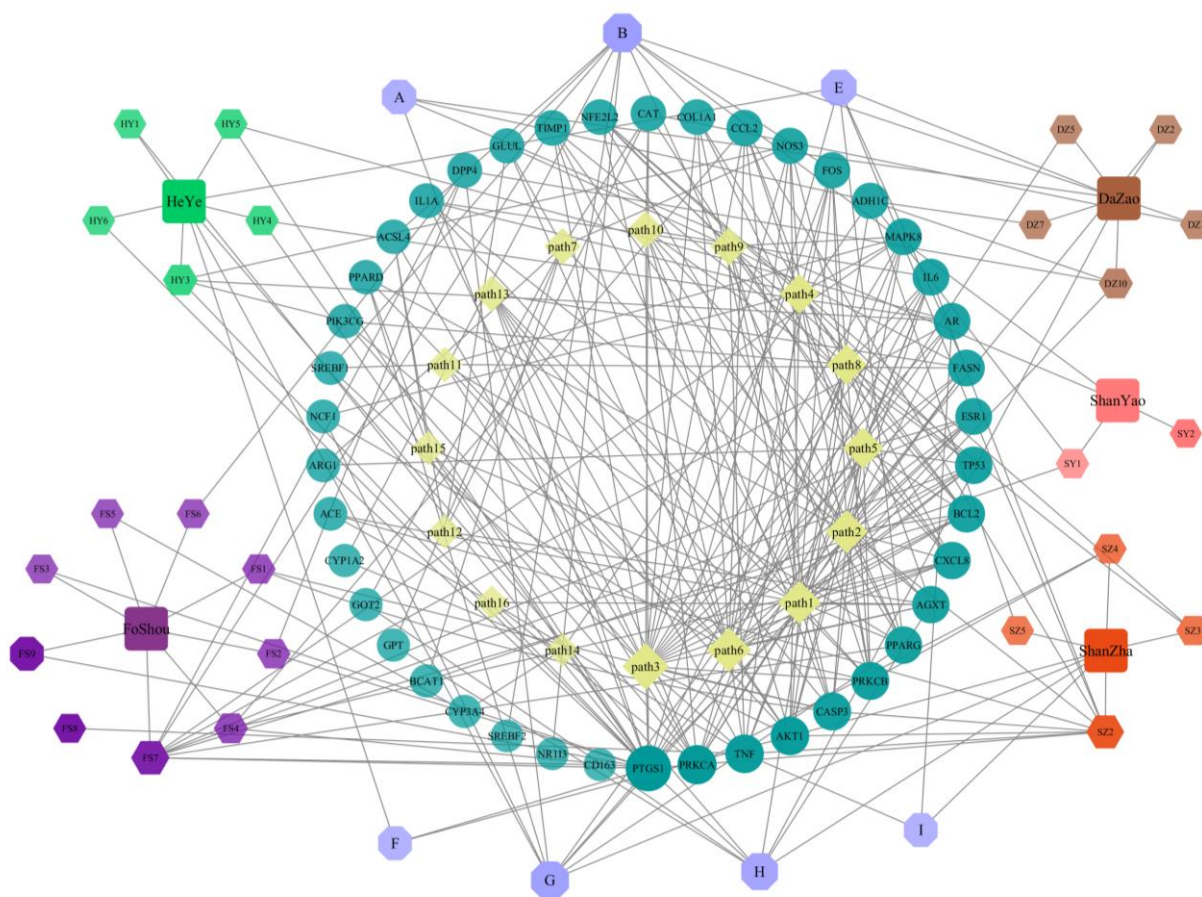


图3 “中药-成分-靶点-通路”网络

Fig. 3 “Traditional Chinese medicine-ingredient-target-pathway” network

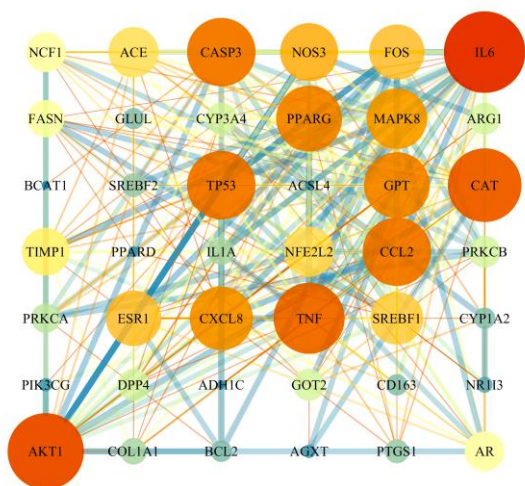


图4 甘枣宁治疗NAFLD的PPI网络

Fig. 4 PPI network of Ganzaoxing in treatment of NAFLD

反应、细胞对活性氧的反应等 20 个 BP 条目，神经元胞体、真空裂解、内吞小泡等 6 个细胞组成 (cellular component, CC) 条目，核受体活性、蛋白酶结合、转氨酶活性等 10 个分子功能 (molecular

function, MF) 条目。ClueGO 进一步对 BP 富集进行分析见图 7, NOS3 处于核心位置, 与细胞对 LPS 的反应密切相关。

3.3 甘枣宁水煎液对 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 NO 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 小白菊内酯、(S)-N-衡州乌药碱、O-去甲基荷叶碱、(-)-表儿茶素、N-去甲基荷叶碱和甘枣宁水煎液组细胞上清液中 NO 水平均显著降低 ($P < 0.001$), 表明 (S)-N-衡州乌药碱、O-去甲基荷叶碱、(-)-表儿茶素和 N-去甲基荷叶碱是甘枣宁抗炎的重要药效成分, 其中 N-去甲基荷叶碱抗炎活性最强。

对 N-去甲基荷叶碱和甘枣宁水煎液进行抗炎活性剂量检测, 如图 9 所示, 从剂量效应曲线计算获得 N-去甲基荷叶碱的 IC_{50} 值为 $(105.41 \pm 12.08) \mu\text{mol/L}$, 甘枣宁水煎液的 IC_{50} 值为 $(703.80 \pm 120.35) \mu\text{g/mL}$ 。

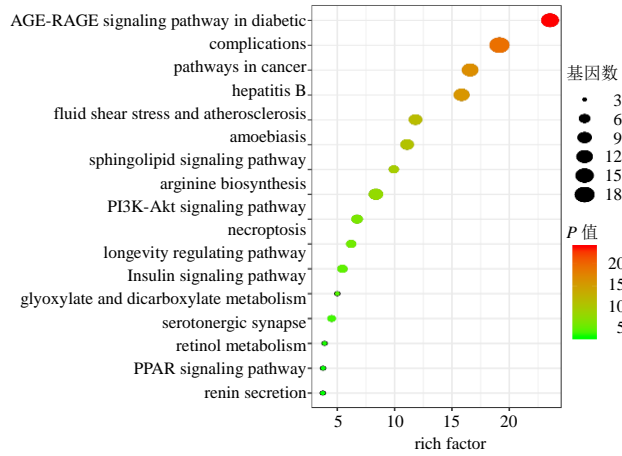


图5 甘枣宁治疗 NAFLD 的 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of Ganzaoing in treatment of NAFLD

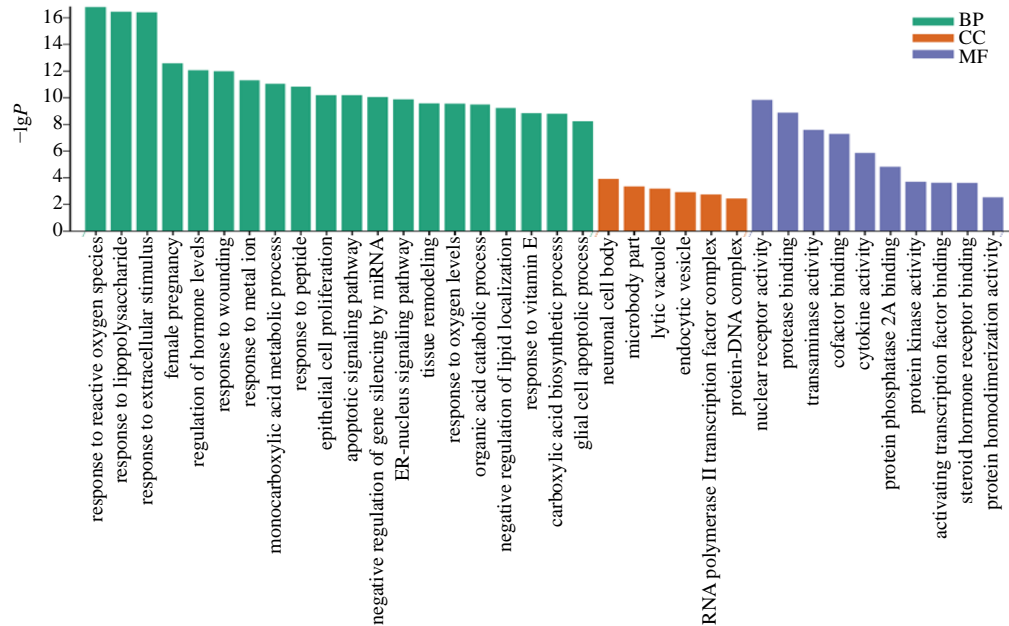


图6 甘枣宁治疗 NAFLD 的 GO 分析

Fig. 6 GO analysis of Ganzaoing in treatment of NAFLD

3.4 甘枣宁水煎液对 RAW264.7 细胞存活率的影响

如图 10 所示,与对照组比较, N-去甲基荷叶碱 (200、100 μmol/L) 组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 各剂量甘枣宁水煎液均无细胞毒性, 表明甘枣宁具有较好的安全剂量范围, 符合药食同源的特征。

4 讨论

中草药调脂具有明显优势^[13]。甘枣宁能够显著改善 NAFLD 患者血脂水平, 经甘枣宁颗粒干预后的脂肪肝患者的中医证候积分明显低于对照组, 肝功能及血脂指标改善显著大于对照组^[2-3]; 甘枣宁显

著改善大鼠肝组织脂肪变性^[14]。目前针对甘枣宁的相关成分鉴定与药效基础研究尚浅, 本研究以 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析出甘枣宁所含 468 个化学成分, 鉴定了 96 个化学成分, 较此前单纯依据网络药理学数据库得到的 84 个成分, 更加丰富全面。金丝桃苷对抗化学损害、抗病毒、抑制自由基脂质过氧化、保肝护肝等具有显著作用^[15-16]; 异牡荆素可通过抑制炎症反应和氧化反应来防御 LPS/D-半乳糖胺诱导的肝损伤^[17]; 荷叶生物碱类化合物具有良好的抗炎^[18]、调脂, 抑制前脂肪细胞增殖的功能^[19], 可以显著抑制参与多种内源物和外源

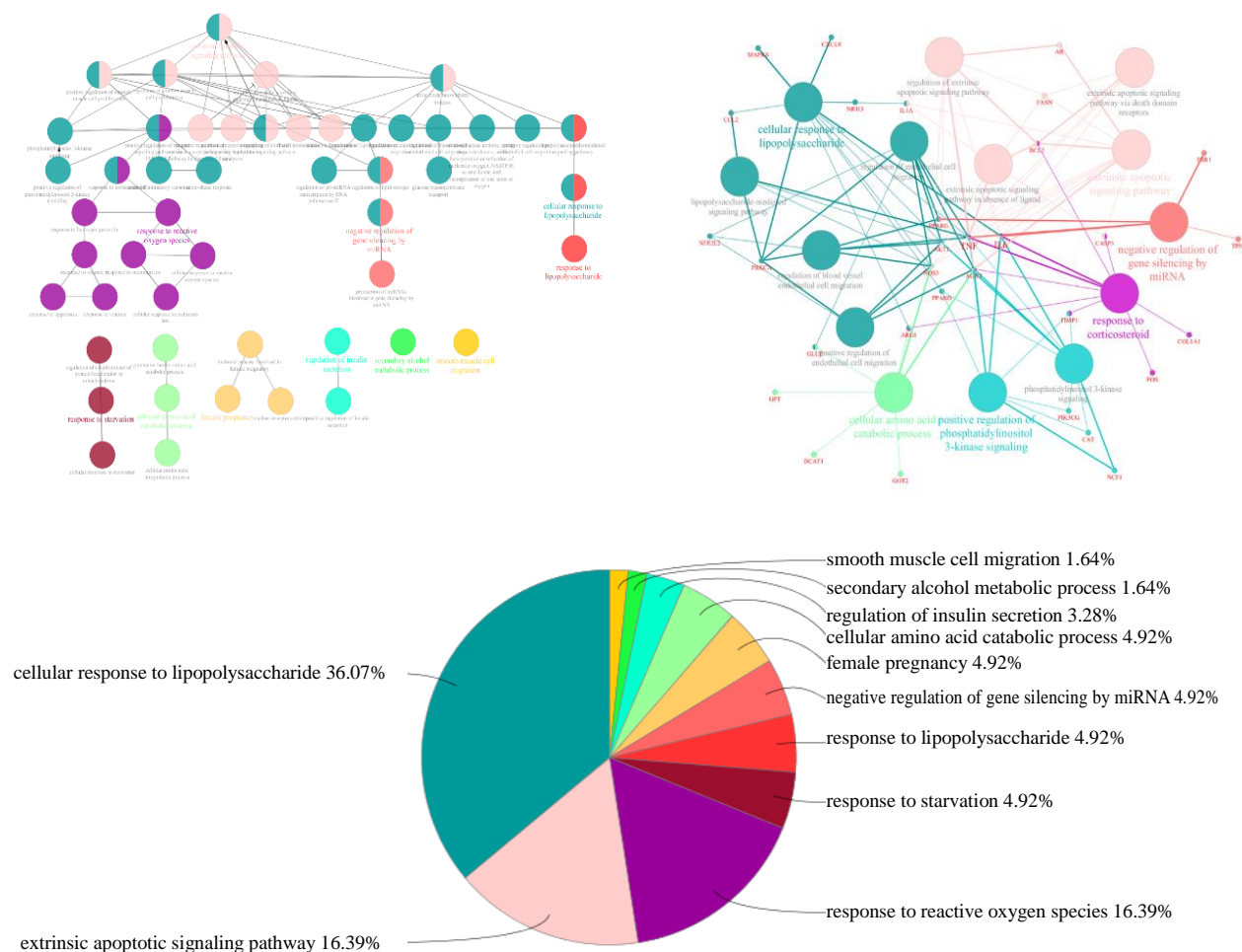
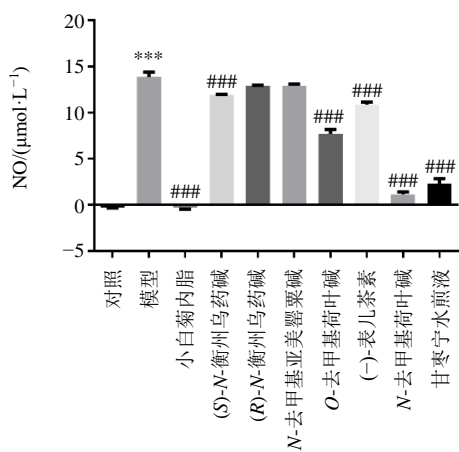


图 7 ClueGO BP 富集分析

Fig. 7 ClueGO biological process enrichment analysis



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

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

图 8 甘枣宁水煎液对 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的影响

Fig. 8 Effect of Ganzaoning Decoction on NO level in supernatant of RAW264.7 cells

物代谢的细胞色素 P4502D6 (cytochrome P4502D6, CYP2D6) 酶^[20]。

网络药理学分析发现甘枣宁治疗 NAFLD 的活性成分主要来自荷叶、山楂、佛手和大枣, 结合 PPI 分析发现 IL-6、TNF、PPARG、CCL2、NOS3 等靶点相关性较强。研究发现, NAFLD 形态学病变严重程度较高的 III 类肥胖患者在肝脏等白色脂肪组织中表现出较高的 IL-6 和 TNF- α 表达^[21]。脂肪变性的原代肝细胞以脂肪形成的特征释放促炎细胞因子 IL-6^[22]。NAFLD 中核因子的改变与脂肪变性、氧化应激和炎症介质 (如 TNF- α 、IL-6) 有关^[23]。患有 NAFLD 的病态肥胖患者血清中 TNF- α 水平显著升高^[24]。PPARG 是调节脂肪细胞分化、胰岛素敏感性和脂质代谢的核受体^[25]。在 NAFLD 发生期间, 肝脏中 CCL2 及其受体表达上调, 促进巨噬细胞蓄积, 从而发生炎症反应、纤维化和脂肪变性^[26]。

KEGG 富集分析甘枣宁治疗 NAFLD 主要涉及

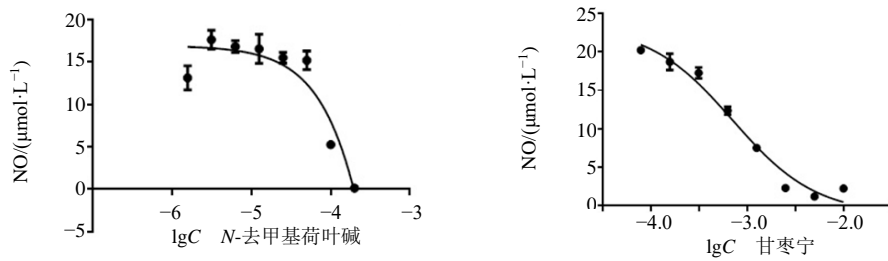
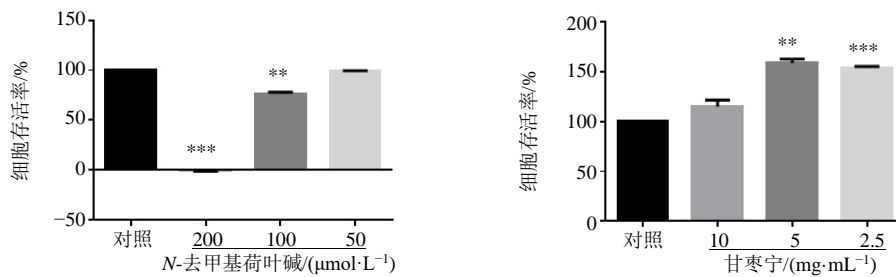


图9 不同剂量 *N*-去甲基荷叶碱和甘枣宁水煎液对 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的影响

Fig. 9 Effect of *N*-nornuciferine and Ganzaoning Decoction with different concentrations on NO level in supernatant of RAW264.7 cells



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图10 *N*-去甲基荷叶碱和甘枣宁水煎液对 RAW264.7 细胞存活率的影响

Fig. 10 Effect of *N*-nornuciferine and Ganzaoning Decoction on survival rate of RAW264.7 cells

糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 通路、癌症、乙型肝炎、血流剪切应力与动脉粥样硬化、程序性坏死等通路。AGEs-RAGE 轴参与肝损伤和 NAFLD 的发病机制^[27]。RAGE 途径能够调节肝损伤、炎症反应和纤维化^[28]。NAFLD 是非钙化斑块的独立危险因素^[29]。GO 分析发现甘枣宁治疗 NAFLD 涉及外源性凋亡信号通路、细胞对 LPS 反应、细胞对活性氧的反应等 BP 条目, 神经元胞体、真空裂解、内吞小泡等 CC 条目, 核受体活性、蛋白酶结合、转氨酶活性等 MF 条目。NAFLD 的发生与 LPS 水平升高有关, 动物长期 sc LPS 和高脂饮食可通过核因子- κ B 抑制物激酶 ϵ (nuclear factor- κ B inhibitor kinase ϵ , IKK ϵ)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号传导诱发 NAFLD^[30]。线粒体的改变是导致 NAFLD 的关键因素, β 氧化水平降低, 脂肪生成的增加, 会导致脂质在肝细胞中的积累, 随后产生活性氧和肝细胞损伤, 激活 Kupffer 细胞和肝星状细胞, 从而促进肝脏炎症反应和纤维化^[31]。NAFLD 中核受体如 PPAR、组成性雄甾烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR)、孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR)、肝 X 受体 (liver X

receptor, LXR) 和法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 的失调可能影响肝脏中内源性和外源性化学物质的代谢^[32]。

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 与网络药理学^[33]结果, 进一步考察甘枣宁及 6 种荷叶生物碱的抗炎活性。NO 是一种脂溶性气体物质, 在肝脏中存在典型的合成通路, 能够调节胃肠道平滑肌舒张功能, 增加通透性, 促使细菌内毒素入侵, 与 NAFLD 的发生发展密切相关^[34-35]。NO 由 NOS 催化产生, 在体内表现为神经型、诱导型和内皮型, 其中内皮型 NOS 能够通过干预肝脏线粒体影响 NAFLD 疾病进程^[36]。ClueGO 分析发现, NOS3 处于核心位置, 与细胞对 LPS 的反应密切相关。NOS3 是小鼠高脂喂养期间肝胰岛素抵抗和高胰岛素血症发生的关键调节剂, 同时也是影响 NF- κ B 活化的关键因子^[37], 与网络药理学预测结果一致, 甘枣宁可能通过 NOS3 发挥治疗 NAFLD 的作用。

中医药治疗肝脏疾病具有显著疗效^[38], 在探索甘枣宁治疗 NAFLD 的作用机制过程中, 面临着中药方剂多成分、多靶点的难点。本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 与网络药理学明确物质基础,

再通过体外实验验证,与临床实践互相印证,探讨了甘枣宁治疗 NAFLD 的药效物质基础,后续研究需将证候、药物配伍关系、量效等信息融入网络药理学^[39],完善数据库信息,衡量结果的可靠性,为今后进一步挖掘方剂的有效性奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li J, Zou B Y, Yeo Y H, *et al.* Prevalence, incidence, and outcome of non-alcoholic fatty liver disease in Asia, 1999-2019: A systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(5): 389-398.
- [2] 陆检英, 郑国银, 彭浩, 等. 甘枣宁颗粒治疗非酒精性脂肪肝临床疗效及安全性分析 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2017, 20(6): 709-712.
- [3] 张夏炎, 彭浩, 汪怀周, 等. 甘枣宁颗粒治疗非酒精性脂肪肝的疗效观察 [J]. *药学服务与研究*, 2018, 18(2): 123-126.
- [4] 余钦, 赵沙沙, 王婉先, 等. 甘枣宁治疗非酒精性脂肪肝的网络药理学机制 [J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(4): 691-699.
- [5] 孟凡翠, 汤立达. 中药网络药理学研究中存在的问题与发展展望 [J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2232-2237.
- [6] 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.
- [7] Piñero J, Ramírez-Anguaita J M, Saüch-Pitarch J, *et al.* The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(1): 845-855.
- [8] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, *et al.* The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinform*, 2016, 54(1): 1.30.1-1.30.33.
- [9] 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(1): 607-613.
- [10] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [11] Ogata H, Goto S, Sato K, *et al.* KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 29-34.
- [12] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, *et al.* ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1091-1093.
- [13] Farrington R, Musgrave I F, Byard R W. Evidence for the efficacy and safety of herbal weight loss preparations [J]. *J Integr Med*, 2019, 17(2): 87-92.
- [14] 张亚妮, 汪晨, 罗梅宏. 复方甘枣宁预防大鼠非酒精性脂肪肝的实验研究 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2012, 20(3): 119-122.
- [15] 黄凯, 杨新波, 黄正明. 金丝桃苷药理作用研究进展 [J]. *医药导报*, 2009, 28(8): 1046-1048.
- [16] 黄明春, 陈剑鸿, 胡小刚, 等. 金丝桃苷对 CCl₄ 诱导大鼠急性肝损伤抗氧化应激研究 [J]. *局解手术学杂志*, 2013, 22(6): 588-590.
- [17] Hu J J, Wang H, Pan C W, *et al.* Isovixetin alleviates liver injury induced by lipopolysaccharide/d-galactosamine by activating Nrf2 and inhibiting NF-κB activation [J]. *Microb Pathog*, 2018, 119: 86-92.
- [18] Zhang L N, Gao J H, Tang P, *et al.* Nuciferine inhibits LPS-induced inflammatory response in BV₂ cells by activating PPAR-γ [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 63: 9-13.
- [19] 刘晓琴. 荷叶生物碱单体的分离纯化及其对 3T3-L1 前脂肪细胞作用的构效关系研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [20] Ye L H, Kong L T, Yan M Z, *et al.* Lotus leaf alkaloid fraction can strongly inhibit CYP2D6 isoenzyme activity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 913-917.
- [21] Jorge A S B, Andrade J M O, Paraíso A F, *et al.* Body mass index and the visceral adipose tissue expression of IL-6 and TNF-alpha are associated with the morphological severity of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with class III obesity [J]. *Obes Res Clin Pract*, 2018, 12(Suppl 2): 1-8.
- [22] Lakhani H V, Sharma D, Dodrill M W, *et al.* Phenotypic alteration of hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(14): 1591-1599.
- [23] Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters [J]. *Drug Metab Rev*, 2017, 49(2): 197-211.
- [24] Paredes-Turrubiarte G, González-Chávez A, Pérez-Tamayo R, *et al.* Severity of non-alcoholic fatty liver disease is associated with high systemic levels of tumor necrosis factor alpha and low serum interleukin 10 in morbidly obese patients [J]. *Clin Exp Med*, 2016, 16(2): 193-202.
- [25] Gawrieh S, Marion M C, Komorowski R, *et al.* Genetic variation in the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene is associated with histologically

- advanced NAFLD [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(4): 952-957.
- [26] Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(3): 577-594.
- [27] Palma-Duran S A, Kontogianni M D, Vlassopoulos A, *et al*. Serum levels of advanced glycation end-products (AGEs) and the decoy soluble receptor for AGEs (sRAGE) can identify non-alcoholic fatty liver disease in age-, sex- and BMI-matched normo-glycemic adults [J]. *Metabolism*, 2018, 83: 120-127.
- [28] Leung C, Herath C B, Jia Z Y, *et al*. Dietary advanced glycation end-products aggravate non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(35): 8026-8040.
- [29] Lee S B, Park G M, Lee J Y, *et al*. Association between non-alcoholic fatty liver disease and subclinical coronary atherosclerosis: An observational cohort study [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(5): 1018-1024.
- [30] He Q, Zeng J, Yao K C, *et al*. Long-term subcutaneous injection of lipopolysaccharides and high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease through IKK ϵ /NF- κ B signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 532(3): 362-369.
- [31] Lee J, Park J S, Roh Y S. Molecular insights into the role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(11): 935-946.
- [32] Li X L, Wang Z M, Klaunig J E. Modulation of xenobiotic nuclear receptors in high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Toxicology*, 2018, 410: 199-213.
- [33] Zhang R Z, Zhu X, Bai H, *et al*. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: Review and assessment [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 123.
- [34] Anavi S, Madar Z, Tirosh O. Non-alcoholic fatty liver disease, to struggle with the strangle: Oxygen availability in fatty livers [J]. *Redox Biol*, 2017, 13: 386-392.
- [35] 张小瑞, 赵远红, 贾英杰, 等. 益肝降脂方预处理对酒精性脂肪肝 SD 大鼠诱导型一氧化氮合酶表达影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(3): 19-23.
- [36] Cunningham R P, Sheldon R D, Rector R S. The emerging role of hepatocellular eNOS in non-alcoholic fatty liver disease development [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 767.
- [37] Dick B P, McMahan R, Knowles T, *et al*. Hematopoietic cell-expressed endothelial nitric oxide protects the liver from insulin resistance [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 670-681.
- [38] Zhao C Q, Zhou Y, Ping J, *et al*. Traditional Chinese medicine for treatment of liver diseases: Progress, challenges and opportunities [J]. *J Integr Med*, 2014, 12(5): 401-408.
- [39] 张彦琼, 李梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883-892.

[责任编辑 李亚楠]