

基于网络药理学和实验验证探讨甘草防治非酒精性脂肪肝病及肥胖的作用机制

李 云¹, 刘天宇², 袁恒杰¹, 李正翔^{1*}

1. 天津医科大学总医院 药剂科, 天津 300052

2. 天津医科大学总医院 消化科, 天津 300052

摘要: 目的 基于网络药理学和实验验证探讨甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 防治非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 及肥胖的活性成分、作用靶点及潜在机制。方法 采用 TCMSP 数据库结合已发表文献筛选获得甘草主要活性化学成分及其作用靶点, GeneCards 数据库获取 NAFLD 及肥胖靶点, 分别用 String 平台、Cytoscape 3.9.1 软件分析并构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。借助 Metascape 平台分析交集靶点并进行基因本体 (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, 采用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“甘草成分-疾病靶点-通路”网络, 进一步采用分子对接验证预测的关键成分与靶点之间的结合能力与亲和力, 通过动物实验证实关键成分对靶点通路的调控作用。结果 甘草主要通过核心活性成分槲皮素、甘草酸、山柰酚、柚皮素和芒柄花素等作用于前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)、一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2) 及糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3B) 等关键靶点蛋白, 经脂质与动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 信号通路、PPAR 信号通路、T 细胞受体信号等通路发挥防治 NAFLD 及肥胖的功效。活性成分甘草酸可以缓解高脂饮食小鼠肝脏脂肪变性, 显著减轻小鼠体重增加 ($P < 0.05$), 明显改善血脂及肝功能水平 ($P < 0.05, 0.01$), 同时显著增加肝脏视黄酸受体 α (retinoic acid receptor RXR-alpha, RXRA)、PPARG 及胆固醇 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1) 的 mRNA 及蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 甘草通过多成分、多靶点、多途径干预 NAFLD 及肥胖, 其主要活性成分甘草酸能通过激活高脂饮食小鼠肝脏 RXRA/PPARG/CYP7A1 信号通路发挥抗 NAFLD 及肥胖药效作用。

关键词: 网络药理学; 甘草; 非酒精性脂肪肝病; 肥胖; 高脂饮食小鼠; 甘草酸; 柚皮素; 芒柄花素; RXRA/PPARG/CYP7A1 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)15-4882-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.15.014

Mechanism of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* against non-alcoholic fatty liver disease and obesity based on network pharmacology and experimental verification

LI Yun¹, LIU Tian-yu², YUAN Heng-jie¹, LI Zheng-xiang¹

1. Department of Pharmacy, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

2. Department of Gastroenterology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Abstract: Objective To explore the active ingredients, targets and potential mechanism of Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) in the prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and obesity based on network pharmacology and experimental verification. **Methods** The main chemical active constituents and their action targets of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* were screened by TCMSP database combined with published literature, and the targets of NAFLD and obesity were obtained from

收稿日期: 2023-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82100574); 天津市卫生健康科技项目 (TJWJ2022QN010)

作者简介: 李 云, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为消化性疾病中药药理学。Tel: 18322186706 E-mail: 15210690439@163.com

*通信作者: 李正翔, 男, 本科, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向为医院药学与临床药理学。E-mail: 13820893896@163.com

GeneCards database. The protein-protein interaction (PPI) network was following analyzed and constructed using String platform and Cytoscape 3.9.1 software, respectively. Then, the intersection targets were analyzed by Metascape platform, and gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. In addition, Cytoscape 3.9.1 software was used again to construct the “component of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*-disease target-pathway” network. Molecular docking was further used to verify the binding ability and affinity between the predicted key components and targets. And finally, the regulatory effect of key components on the target pathway was confirmed by animal experiments. **Results** *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* mainly acted on key targets such as prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), estrogen receptor 1 (ESR1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), nitric oxide synthase 2 (NOS2) and glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3B) through core active components like quercetin, glycyrrhizic acid, kaempferol, naringin and formononetin. And it might prevent and treat NAFLD and obesity via lipid and atherosclerosis, insulin resistance, adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway, PPAR signaling pathway, T cell receptor signaling and other pathways. The active ingredient glycyrrhizic acid could alleviate liver steatosis, dramatically reduce weight gain ($P < 0.05$), observably improve blood lipid level as well as liver function ($P < 0.05, 0.01$), and significantly increase both hepatic mRNA and protein expressions of retinoic acid receptor RXR- α (RXRA), PPARG and cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in high fat diet mice ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* could effectively intervene in NAFLD and obesity with the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway. And its main active ingredient glycyrrhizic acid could play a role in anti-NAFLD and obesity by activating hepatic RXRA/PPARG/CYP7A1 signaling pathway in high fat diet mice.

Key words: network pharmacology; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; nonalcoholic fatty liver disease; obesity; high fat diet mice; glycyrrhizic acid; naringin; formononetin; RXRA/PPARG/CYP7A1 signaling pathway

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 及肥胖在全世界的发病率迅速增加, 二者已成为慢性炎症性疾病及代谢性疾病病死率的重要危险因素, 并成为新的全球卫生问题之一^[1-2]。NAFLD 及肥胖均由遗传背景和环境因素共同作用引起, 发病隐匿。NAFLD 病理改变包括肝脏单纯脂肪变性、脂肪性肝炎、肝硬化甚至可发展为肝细胞性肝癌, 肥胖往往由高脂高糖饮食引起, 以脂肪过度堆积为特征, 脂肪沉积在肝脏则表现为脂肪肝。NAFLD 的病理生理学机制复杂, 目前并未完全阐明, 临床尚无专一对症药物治疗, 常以抗炎、降酶、保肝药物等辅助改善症状^[3]; 肥胖临床治疗药物种类有限, 选择性少, 且多见胃肠道及营养素缺乏等不良反应^[4]。与此同时, 多项临床回顾研究指出 NAFLD 的全球患病率约 25%^[5], 而在当今肥胖流行的情况下则持续上升, 约 36.1%^[6], 二者关系密切, 同时具备两者特征的群体背后常具有相同的诱因和发病机制^[7]。临床目前针对 NAFLD 及肥胖的主流治疗方式仍为生活方式饮食干预、控制体质量及血糖。因此, 针对诱因及病机相同的 NAFLD 和肥胖患病人群寻找可用于改善二者的中药及中药活性成分并加以合理研究利用具有重要社会价值。

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根及根茎, 味甘, 性平。甘草最早收载于

《神农本草经》, 并列为上品, 明代李时珍《本草纲目》中更将其列为百药之首。临床上具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛和调和诸药等功效, 因而也是我国最常用的大宗药材之一, 在民间素有“国老”之称。甘草中主要有效成分为甘草酸皂苷类和黄酮类化合物^[8]。现代临床和药理研究表明, 甘草粗提物具有减轻体质量、抵抗 NAFLD、改善糖脂代谢等多种作用^[9-12], 临床上也将各类甘草酸制剂应用于 NAFLD 的治疗, 并取得较好的疗效^[13-14], 近来研究发现甘草酸制剂可减轻高脂饮食诱导的小鼠肥胖^[15]。然而代谢性疾病临床病理变化复杂, 且甘草的药效物质基础及其作用机制尚不明确。因此, 系统整体地研究甘草抗 NAFLD 及肥胖生物活性成分及其潜在分子作用机制, 可为临床用药的选择和创新提供参考依据。

网络药理学是从整个生物网络角度去探究疾病机制和药物作用机制的新兴学科, 在整合了医学、生物学、计算机科学、生物信息学等多学科基础理论的基础上, 可系统预测中药有效活性成分及药物作用机制。本研究运用网络药理学研究思路和方法, 结合分子对接验证与动物实验药效评价, 探讨了甘草抗 NAFLD 及肥胖的主要活性成分及作用靶点, 揭示其潜在的作用机制, 对阐释甘草抗 NAFLD 及肥胖的科学内涵、推广其临床应用、挖掘临床防治 NAFLD 及肥胖的中药活性成分具有重要意义。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 4 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 15 只, 体重(20±2) g, 购自北京华阜康生物科技有限公司, 许可证号 SCXK(京)2019-0008, 饲养于天津医科大学 SPF 级实验动物中心。动物实验经天津医科大学总医院实验动物福利伦理委员会批准(批准号 IRB2022-DWFL-353)。

1.2 药品与试剂

甘草酸(批号 200116, 质量分数>98%)由江苏正大天晴药业股份有限公司提供; 鼠源过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *PPARG*) 引物(F: 5'-GGAAGACCACTCGCATTCCTT-3', R: 5'-GTAAT-CAGCAACCATTGGGTCA-3')、胆固醇 7 α -羟化酶(cholesterol 7 α -hydroxylase, *CYP7A1*)引物(F: 5'-AGGCATTTGGACACAGAAG-3', R: 5'-ACAGAT-TGGAGGTTTTGCAT-3')、视黄酸受体 α (retinoic acid receptor RXR-alpha, *RXRA*)引物(F: 5'-ATGGACACCAAACATTTCTGC-3', R: 5'-CCAG-TGGAGAGCCGATTCC-3')、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)引物(F: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3', R: 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTGA-3')购自苏州金唯智生物技术有限公司; Trizol 试剂(批号 017E2231FA)、逆转录试剂盒(批号 7E691I2)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *PPARG* 兔单克隆抗体(批号 GR240085-9)、*CYP7A1* 兔多克隆抗体(批号 GR240038-2)、*RXRA* 兔单克隆抗体(批号 GR152085-14)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(批号 15044790-5)购自英国 Abcam 公司; β -actin 兔单克隆抗体(批号 F210094)购自上海泊湾生物科技有限公司; RIPA 裂解液(批号 20220416)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 20230206)购自北京索莱宝科技有限公司;

1.3 仪器

D37520 型低温高速离心机(德国 Kendro 公司); 7180 型全自动生化分析仪(日本 Hitachi 公司); 组织脱水机、石蜡包埋切片机(德国 Leica 公司); SZX7 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); DNA Thermal Cycle 480 扩增仪(美国 Perkin Elmer Cetus 公司); Realtime PCR 仪、5415D 型小型台式高速离心机(上海锐聪实验室设备有限公司);

Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪(奥地利 Infinite 公司); 电泳仪和转膜仪(美国 Bio-Rad 公司) ChemiScope 6200 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 甘草潜在活性成分及靶点的获取、NAFLD 及肥胖相关靶点的获取 利用 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)检索“甘草”活性成分及靶点, 将检索结果以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 及类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ^[16]的 2 个吸收、分布、代谢、排泄(absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME)参数为条件对甘草入血成分进行初步筛选, 得到其潜在活性成分及对应靶点信息。而后经 STITCH 数据库(<http://stitch.embl.de/>)设置置信度大于 0.4, 剔除不含相关信息化学成分, 同时查阅《中国药典》2020 年版和已发表的相关文献补充上述限制条件筛去或未预测到的甘草中含量较高、药理作用明确的主要活性成分。在 TCMSP 数据库中未查询到靶点的成分, 通过 PubChem 数据库下载 SDF 格式文件, 导入 PharmMapper 数据库(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/submitfile.html>), 设置 Normal Fit 值大于 0.6, 补充甘草成分靶点信息。将上述成分及靶点信息整合汇总去重后, 将蛋白名靶点在 Uniprot 数据库中匹配为基因名称, 即获得甘草的潜在活性成分及靶点。

以“nonalcoholic fatty liver disease”“obesity”为关键词分别进入 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org>)和 TTD 数据库(<https://db.idrblab.net/ttd/>), 进行检索, 搜集整理各数据库疾病靶点结果。在 GeneCards 数据库中, 当预测靶点结果过多时, 则可设定 relevance score 大于中位数的靶点为目标疾病的潜在靶点^[17]。合并汇总各数据库结果, 删去重复值取并集, 由此获得 NAFLD 及肥胖的潜在靶点。

2.1.2 甘草治疗 NAFLD 及肥胖的关键靶点蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建 将整理好的甘草成分的药物靶点、NAFLD 相关靶点及肥胖相关靶点导入 jvenn 在线作图软件平台做交集处理, 绘制 Venn 图, 三者的交集靶点即为甘草治疗 NAFLD 及肥胖的关键靶点。将交集得到的关键靶点提交至 String 在线平台

(<https://cn.string-db.org/>)，设定物种“Homo Sapiens”、最低相互作用阈值 0.4，构建 PPI 网络，下载数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件，进行拓扑分析，按度值排序构建关键靶点 PPI 网络。

2.1.3 甘草活性成分-NAFLD 及肥胖关键靶点功能与通路的富集分析 将关键靶点上传至 Metascape 平台 (<https://metascape.org/>)，物种设定为“Homo Sapiens”，设置 $P < 0.01$ 进行基因本体 (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，下载保存数据结果，分别选择排名前 10、20 的条目采用 bioinformatics 在线绘图平台进行数据可视化。

2.1.4 “甘草活性成分-NAFLD 及肥胖靶点-通路”网络构建 选择主要与 NAFLD 及肥胖相关的 KEGG 富集分析排名前 20 的信号通路，建立参与相关通路的成分及靶点之间的联系，导入 Cytoscape 3.9.1 构建“甘草活性成分-NAFLD 及肥胖靶点-通路”的相互关系网络。对其进行网络拓扑参数分析，以度值排序，判断发挥药效的主要活性成分及核心作用靶点。

2.1.5 分子对接验证 将上述获得的前 5 个核心成分及核心靶点进行分子对接验证。小分子的 3D 结构从 PubChem 数据库下载获得，对接使用的核心靶点蛋白晶体结构从 PDB 数据库中下载获得，使用 PyMol 2.5 软件对所有蛋白进行处理，包括去除水分子，盐离子以及小分子，采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接工作，PyMol 2.5 以及 Ligplus 2.2 将对接结果进行可视化。

2.2 动物实验验证

2.2.1 分组、造模与给药 C57BL/6J 雄性小鼠适应性喂养 1 周后，随机分为对照组、模型组和甘草酸 (150 mg/kg^[18]) 组，每组 5 只。对照组以含 10% 脂肪的常规饮食饲养，模型组和给药组以含 60% 脂肪的高脂饮食饲养，给药组隔日 ip 0.3 mL 甘草酸，对照组和模型组隔日 ip 等体积生理盐水，持续 14 周。

2.2.2 各组小鼠血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG) 水平和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性的测定 给药结束后称定质量，并于眼眶静脉丛取血，置试管中，室温放置 30 min 充分凝血，然后立即在 4 °C、3500 r/min 离心获得血清，采用全自

动生化分析仪检测血清中 TC、TG 水平和 ALT、AST 活性。

2.2.3 各组小鼠附睾白色脂肪和肝组织病理学观察 各组小鼠以异氟醚麻醉后处死，剥离肝脏、附睾白色脂肪组织，称定质量，用 4% 多聚甲醛固定，经脱水、透明、浸蜡、包埋后切片 (厚度 4 μm)，进行苏木素-伊红 (HE) 染色^[19]，于显微镜下观察肝脏脂肪变性程度及附睾脂肪形态并拍照。

2.2.4 qRT-PCR 检测各组小鼠肝脏组织 PPARG、CYP7A1 和 RXRA mRNA 表达 按照试剂盒说明书提取各组小鼠肝脏组织中总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析^[19]。

2.2.5 Western blotting 检测各组小鼠肝脏组织 PPARG、CYP7A1 和 RXRA 蛋白表达 取各组小鼠肝脏组织，加入 RIPA 裂解液提取总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后分别加入 PPARG (1:200)、CYP7A1 (1:200)、RXRA (1:200) 和 β -actin (1:200) 抗体，4 °C 孵育过夜后，加入 HRP 标记的 IgG 二抗 (1:5000)，室温孵育 1 h，电发光试剂盒显影，经蛋白凝胶成像仪进行曝光，采用 Image J 软件定量分析。

2.2.6 统计学分析 应用 GraphPad Prism 8 软件进行数据统计，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行统计学分析。

3 结果

3.1 甘草活性成分及靶点的获取、NAFLD 及肥胖相关靶点的获取

通过 TCMSP 数据库检索甘草化学成分，共检索到 280 个化学成分，经 ADME 参数 ($\text{OB} \geq 30\%$ 、 $\text{DL} \geq 0.18$) 对甘草入血活性成分进行初步筛选，得到 92 个活性成分。然后经 STITCH 数据库置信度 > 0.4 剔除不含相关信息的成分，同时查阅相关文献补充重要化学成分，最终获得 89 个活性成分，具体信息见表 1。从 TCMSP 数据库检索甘草各化学成分的靶点信息，并通过 PharmMapper 数据库预测补充缺乏靶点信息的化合物，整合去重后获得 417 个药物靶点。

基于 Genecards 数据库通过关键词搜索，共获得 1195 个 NAFLD 靶点、9842 个肥胖靶点 (Score 值最大值为 77.40，最小值为 0.10)。Genecards 数据库中的 Score 值越高说明该靶点与疾病密切相关，针对过多的肥胖靶点，通过设定 Score 值大于中位

表 1 甘草活性成分

Table 1 Active components of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

编号	PubChem CID	成分	分子式	编号	PubChem CID	成分	分子式
GC1	91510	高丽槐素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	GC46	503737	甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉
GC2	114829	甘草素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	GC47	122851	甘草吡喃香豆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₇
GC3	64971	白桦脂酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	GC48	5317777	glyzaglabrin	C ₁₆ H ₁₀ O ₆
GC4	5320083	甘草酚	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	GC49	124052	光甘草定	C ₂₀ H ₂₀ O ₄
GC5	5318869	熊竹素	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	GC50	124049	光甘草宁	C ₂₀ H ₂₀ O ₄
GC6	336327	美迪紫檀素	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	GC51	480774	光甘草素	C ₂₀ H ₁₈ O ₄
GC7	5281654	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	GC52	5317652	光果甘草酮	C ₂₀ H ₁₆ O ₅
GC8	222284	β-谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	GC53	11558452	红花岩黄芪香豆雌酚 B	C ₁₆ H ₁₀ O ₆
GC9	5317480	黄羽扇豆魏特酮	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	GC54	5320092	新异甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉
GC10	10114	甘草次酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	GC55	5317300	黄甘草异黄酮 A	C ₂₀ H ₁₈ O ₅
GC11	5280378	芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	GC56	23724664	苜蓿紫檀素	C ₂₂ H ₂₄ O ₉
GC12	5280448	毛蕊异黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	GC57	73205	乌拉尔宁	C ₂₀ H ₂₀ O ₆
GC13	5280863	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	GC58	51666248	新甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉
GC14	932	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	GC59	193679	异补骨脂黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₄
GC15	197678	辛黄烷酮	C ₂₅ H ₂₆ O ₄	GC60	124050	异甘草醇	C ₂₁ H ₁₈ O ₆
GC16	5318591	异甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	GC61	5318585	异甘草黄酮醇	C ₂₀ H ₁₈ O ₆
GC17	480784	粗毛甘草素 B	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	GC62	3764	异芒柄花黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
GC18	392442	粗毛甘草素 F	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	GC63	480873	1-甲氧基菜豆素	C ₂₁ H ₂₂ O ₅
GC19	480859	粗毛甘草素 C	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	GC64	5316900	槲皮素-3,3'-二甲醚	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
GC20	5318679	异三叶醇	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	GC65	15228662	3'-羟基-4'-O-甲基光甘草定	C ₂₁ H ₂₂ O ₅
GC21	10881804	坎佐醇 B	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	GC66	5318998	甘草查耳酮 A	C ₂₁ H ₂₂ O ₄
GC22	15380912	坎佐醇 W	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	GC67	15228663	3'-甲氧基光甘草定	C ₂₁ H ₂₂ O ₅
GC23	638278	异甘草素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	GC68	9927807	4'-甲氧基光甘草定	C ₂₁ H ₂₂ O ₄
GC24	5481948	半甘草异黄酮 B	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	GC69	5318437	胀果香豆素甲	C ₂₀ H ₁₈ O ₄
GC25	5281619	鳞叶甘草素 A	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	GC70	5312521	顺式-5-二十碳烯酸	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
GC26	442411	鳞叶甘草素 B	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	GC71	101666840	坎佐醇 F	C ₂₆ H ₂₈ O ₅
GC27	162412	菜豆异黄烷	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	GC72	480865	甘草西定	C ₂₆ H ₃₂ O ₅
GC28	5317768	4-羟基-2,4'-二甲氧基查耳酮	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	GC73	25015742	7,2',4'-三羟基-5-甲氧基-3-苯基香豆素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
GC29	10542808	坎佐醇 U	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	GC74	268208	7-乙酰氧基-2-甲基异黄酮	C ₁₈ H ₁₄ O ₄
GC30	5318999	甘草查耳酮 B	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	GC75	17131	7-甲基香豆素	C ₁₀ H ₈ O ₂
GC31	5281426	伞形花内酯	C ₉ H ₆ O ₃	GC76	5460988	(E)-9-二十烯酸	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
GC32	10090416	甘草芳香豆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	GC77	177149	驴食草酚	C ₁₆ H ₁₆ O ₄
GC33	5319013	甘草酮	C ₂₂ H ₂₂ O ₆	GC78	480780	甘草宁 G	C ₂₁ H ₂₀ O ₅
GC34	5317478	甘草宁 A	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	GC79	5481949	甘草宁 H	C ₂₅ H ₂₄ O ₆
GC35	5317479	甘草宁 B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	GC80	15840593	甘蔗果苣素	C ₂₁ H ₂₂ O ₄
GC36	14604077	甘草宁 L	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	GC81	101664572	粗毛甘草素 M	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
GC37	14604078	甘草宁 M	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	GC82	5317765	甘草黄酮醇 A	C ₂₀ H ₁₈ O ₇
GC38	14604081	6-异戊烯基木犀草素	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	GC83	636883	甘蔗异黄酮	C ₂₀ H ₁₆ O ₅
GC39	480787	格里西轮	C ₂₂ H ₂₂ O ₆	GC84	13965473	芳香膜菊素	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
GC40	503731	利考香豆酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	GC85	44257530	菜豆醇	C ₂₀ H ₁₆ O ₅
GC41	5281789	甘草异黄酮 A	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	GC86	14769500	xambioona	C ₂₅ H ₂₄ O ₄
GC42	5481234	甘草异黄酮 B	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	GC87	480775	去氢粗毛甘草素 C	C ₂₁ H ₂₂ O ₅
GC43	392443	甘草异黄烷酮	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	GC88	5280343	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
GC44	10336244	新紫檀素	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	GC89	14982	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆
GC45	11267805	5-异戊烯基紫铆因	C ₂₀ H ₂₀ O ₅				

数, 筛选得到 1184 个肥胖靶点。TTD 数据库检索得到 7 个 NAFLD 靶点、81 个肥胖靶点。合并去重后, 获得 1195 个 NAFLD 靶点、1184 个肥胖靶点。

3.2 甘草治疗 NAFLD 及肥胖的关键靶点 PPI 网络的构建

将甘草成分靶点与 NAFLD 靶点及肥胖靶点取交集, 数据导入 jvenn 在线作图软件平台, 绘制韦恩图, 得到 106 个甘草治疗 NAFLD 及肥胖的关键靶点(图 1-A), 将交集靶点提交至 String 在线平台,

下载蛋白相互作用数据, 进一步通过 Cytoscape 3.9.1 进行拓扑分析, 按度值排序构建类似同心圆的 PPI 网络(图 1-B), 该网络共包括 106 个节点, 1961 条边。节点表示蛋白, 直线表示存在相互关系。节点的度值越大, 在图中颜色越深, 面积越大, 说明有更多的蛋白与其发生相互作用, 此节点蛋白在网络中的作用越重要。网络中关键节点蛋白主要是白蛋白(albumin, ALB)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL6)、

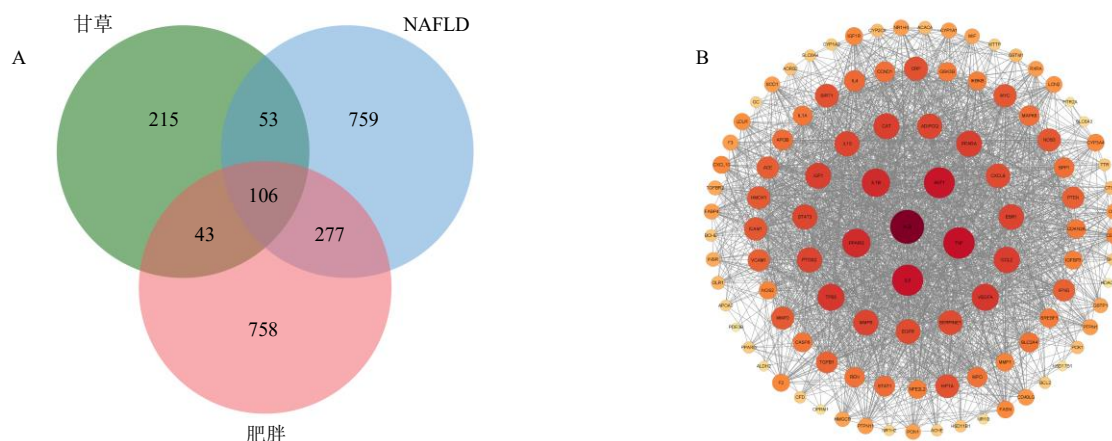


图 1 甘草治疗 NAFLD 及肥胖的交集靶点 Venn 图 (A) 及关键靶点 PPI 网络 (B)

Fig. 1 Venn diagram of intersection targets (A) and PPI network (B) of key targets of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in treatment of NAFLD and obesity

RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1)、PPARG、IL1B (表 2)。

表 2 关键节点蛋白信息

Table 2 Key nodes protein information

排序	Uniprot ID	基因名称	连接度	介度	紧密度
1	P02768	ALB	93	0.082 51	0.897 4
2	P01375	TNF	84	0.034 06	0.833 3
3	P05231	IL6	83	0.033 40	0.826 8
4	P31749	AKT1	82	0.050 08	0.820 3
5	P37231	PPARG	73	0.025 42	0.766 4
6	P01584	IL1B	73	0.016 16	0.766 4

3.3 关键靶点功能与通路的富集分析

采用 Metascape 数据平台对 106 个关键靶点进行生物学过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 部分的 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析。GO 富集共得到 1864 个条目, BP 包括对营养元素、激素、外源性物质刺激、脂质的应答, 调节小分子代谢进程, 炎症反应等共 1647 个, CC 包括细胞膜、囊腔、内质网腔、胞外基质、血浆脂蛋白、常染色质等 75 个, MF 包括信号受体、核受体、蛋白质二聚体激活, 蛋白酶、激酶、羧酸、血红素、磷酸酶、类固醇结合等 142 个。分别根据 *P* 值排序, 选择排名前 10 的用气泡图展示 (图 2-A)。通路富集共得到包含癌症信号通路、脂质与动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、IL-17 信号通路、缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 信

号通路、PPAR 信号通路、T 细胞受体信号通路在内的 175 个条目。说明甘草可能是通过多条通路达到治疗 NAFLD 及肥胖的作用, 选择前 20 条通路用气泡图展示 (图 2-B)。

3.4 “甘草活性成分-NAFLD 及肥胖靶点-通路”网络构建

根据参与前 20 条通路的成分及靶点之间的联系, 采用 Cytoscape 3.9.1 构建“甘草活性成分-NAFLD 及肥胖靶点-通路”网络 (图 3), 共有 188 个节点, 811 条边。其中节点表示靶点或成分, 直线表示相互作用, 图中绿色方形表示关键靶点, 橙色圆圈表示甘草活性成分, 粉红色三角形表示通路。通过 Cytoscape 3.9.1 内置的 Analyse Network 对该网络进行拓扑参数分析, 按度值排序, 节点的度值越高, 面积越大, 颜色越深, 说明此节点在网络中的作用越重要。通过分析发现, 甘草活性成分中槲皮素 (GC88)、甘草酸 (GC89)、山柰酚 (GC13)、柚皮素 (GC14) 和芒柄花素 (GC11) 度值、介度及紧密度均较高, 说明这些成分极有可能是甘草治疗 NAFLD 及肥胖的核心成分, 而前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、PPARG、一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2) 及糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3B) 的度值、介度及紧密度在众多靶点中排名相对靠前, 是主要的核心作用靶点, 可以初步认为甘草主要通过调节这些核心靶点产生效果, 具体信息见表 3。以上这些结果也体现出了甘草通过多成分、多靶点、多通路发挥治疗 NAFLD 及肥胖的药理作用。

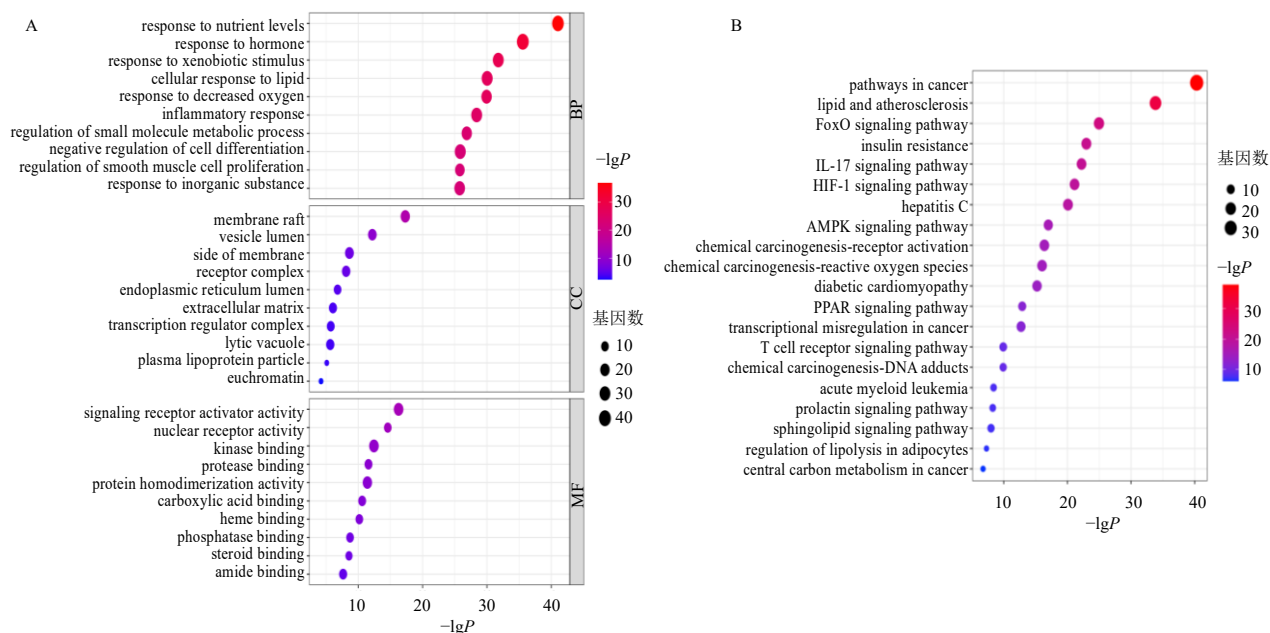
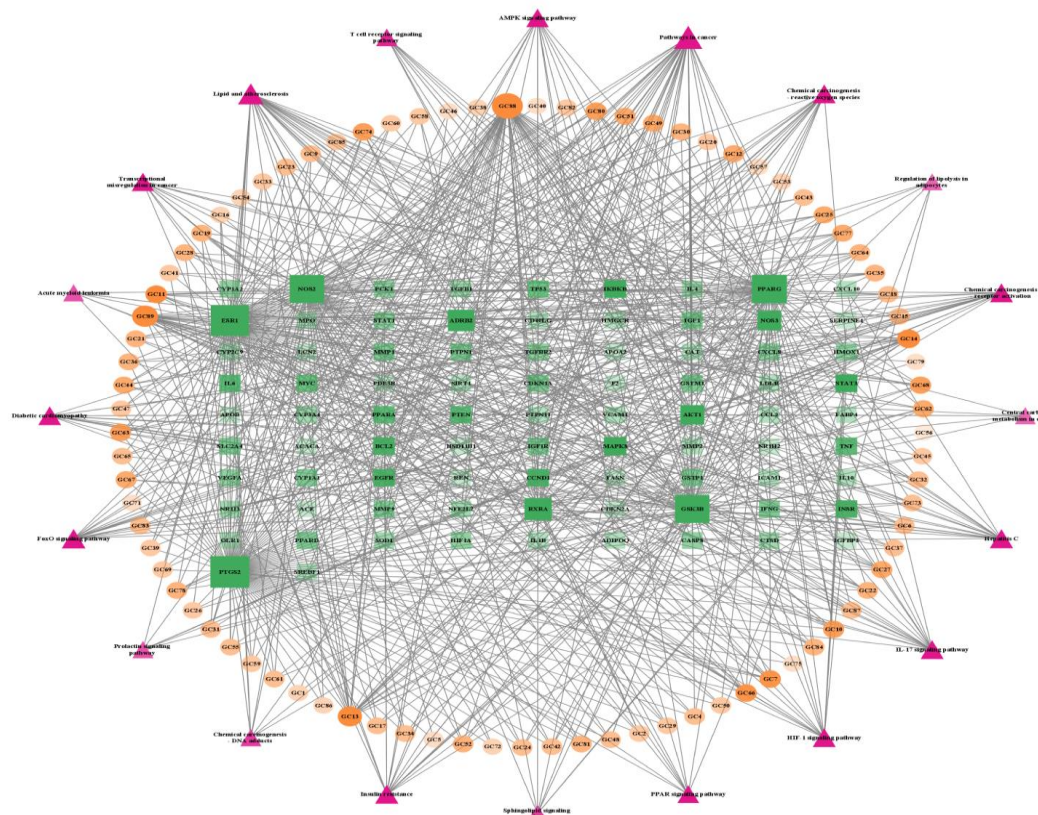


图2 甘草治疗 NAFLD 及肥胖关键靶点 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 2 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of key targets of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in treatment of NAFLD and obesity



节点表示靶点或成分，直线表示相互作用，方形表示关键靶点，圆圈表示甘草活性成分，三角形表示通路；节点面积越大，颜色越深代表其度值越大，说明该节点越重要

nodes represent targets or components, lines represent interactions, squares represent key targets, circles represent active components of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, triangles represent pathways; Larger node areas and darker colors represent greater degree values, indicating the node is more important

图3 “甘草活性成分-NAFLD 及肥胖靶点-通路”网络

Fig. 3 “*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* active ingredient-NAFLD and obesity target-pathway” network

表 3 核心成分及靶点信息

Table 3 Core components and targets information

排序	编号	成分	连接度	介度	紧密度	排序	基因	连接度	介度	紧密度
1	GC88	槲皮素	51	0.160 2	0.523 8	1	<i>PTGS2</i>	85	0.190 0	0.582 6
2	GC89	甘草酸	29	0.099 8	0.459 5	2	<i>ESR1</i>	81	0.129 5	0.545 2
3	GC13	山柰酚	22	0.034 76	0.450 6	3	<i>PPARG</i>	68	0.134 3	0.545 2
4	GC14	柚皮素	15	0.043 12	0.437 9	4	<i>NOS2</i>	66	0.063 92	0.461 7
5	GC11	芒柄花素	10	0.009 929	0.422 1	5	<i>GSK3B</i>	65	0.106 3	0.506 8

3.5 分子对接验证

采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件将上述“成分-靶点-通路”网络中筛选出的前 5 个核心成分(槲皮素、甘草酸、山柰酚、柚皮素和芒柄花素)及核心靶点 PTGS2 (PDB ID: 5F19)、ESR1 (PDB ID: 7UJM)、PPARG (PDB ID: 8DSY)、NOS2 (PDB ID: 1NSI)、GSK3B (PDB ID: 4J1R) 进行对接验证,得到各小分子化合物与大分子蛋白的结合能。通常认为结合

能 <0 , 配体和受体能自发结合, 结合能越低, 亲和力越强, 发生作用的可能性越大。将获得的各成分与靶点的结合能结果以热图展示(图 4-A)。由结果可知, 各结合能均 <-5 kJ/mol, 均能自发结合, 其中甘草酸与各靶点蛋白结合能明显较低, 均 <-10 kJ/mol, 显示出较强的亲和力。选择甘草酸与 PTGS2、ESR1、PPARG 的分子对接图进行可视化展示(图 4-B~D)。

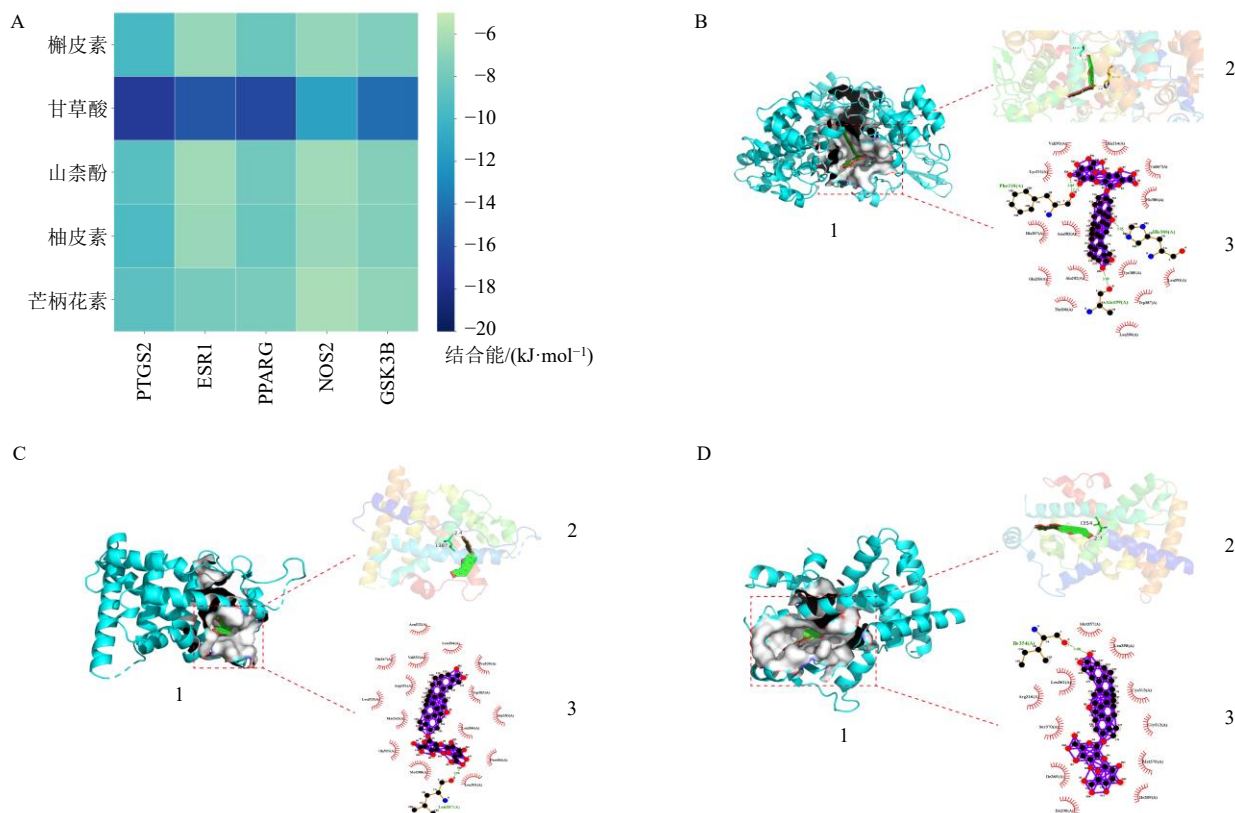


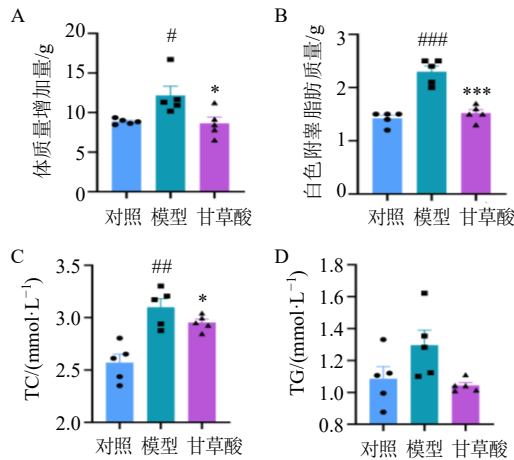
图 4 分子对接结果

Fig. 4 Molecular docking results

3.6 动物实验验证

上述分子对接实验表明甘草中的主要含量及活性成分甘草酸和各关键靶点蛋白显示出较强的结合能力,推测其可能是发挥抗 NAFLD 及肥胖的主要药效成分,进一步通过动物实验评价甘草酸药效。

3.6.1 甘草酸减轻高脂饮食小鼠体质量增加并抵抗肥胖 小鼠经 14 周高脂饮食喂养后,体质量和附睾白色脂肪质量均较对照组显著增加 ($P<0.05$ 、 0.001 , 图 5-A、B),血清 TC 水平显著高于对照组 ($P<0.01$, 图 5-C),TG 水平较对照组有升高趋势(图 5-D)。附睾白色脂肪形态较对照组明显增大,展现出肥胖表型(图 5-E)。甘草酸能够显著减轻高脂小鼠体质量 ($P<0.05$),减轻附睾白色脂肪堆积并减小脂肪形态 ($P<0.001$),显著降低高脂小鼠血清 TC 含量 ($P<0.05$),逆转 TG 升高现象。



与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$, 下图同
[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group, same as below figures

图 5 甘草酸对高脂饮食小鼠体质量 (A)、附睾白色脂肪质量 (B) 及血清 TC (C)、TG (D) 水平和附睾白色脂肪 HE 染色 (E) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 5 Effect of glycyrrhizic acid on body weight (A), epididymal white fat weight (B), levels of TC (C), TG (D) in serum and HE staining of epididymal white fat (E) in mice fed with high-fat diet ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

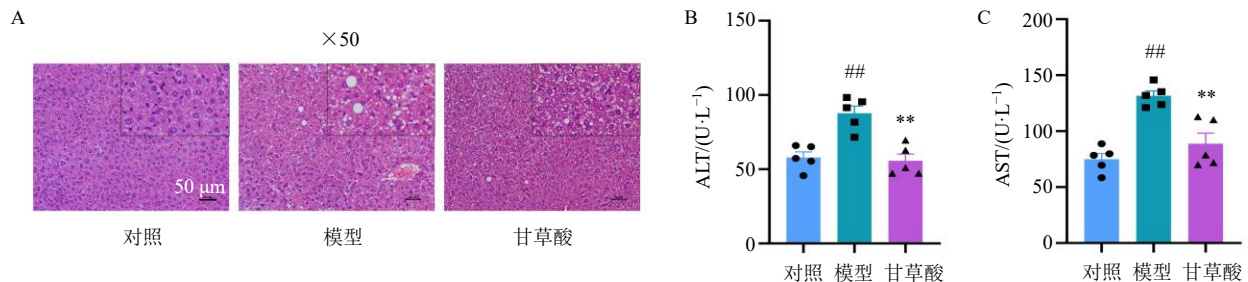


图 6 甘草酸对高脂饮食小鼠肝脏 HE 染色 (A) 及血清 ALT (B)、AST (C) 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 6 Effect of glycyrrhizic acid on HE staining of liver (A) and activities of ALT (B) and AST (C) in serum of mice fed with high-fat diet ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3.6.2 甘草酸改善高脂饮食小鼠肝脏脂肪变性并防治 NAFLD 高脂喂养 14 周后,病理组织学发现,高脂小鼠较对照组呈现出明显肝脏脂肪变性(图 6-A),表明小鼠 NAFLD 模型成功,同时伴随肝功能下降,血清 ALT、AST 活性明显升高 ($P<0.01$, 图 6-B、C)。甘草酸处理后能改善高脂小鼠肝脏脂肪变性程度,显著降低 ALT、AST 活性 ($P<0.01$),改善小鼠肝功能。

3.6.3 甘草酸对高脂饮食小鼠肝脏组织 PPAR γ 信号通路的影响 PPAR 信号通路在脂肪细胞分化、糖脂代谢、胰岛素抵抗和能量代谢方面发挥重要作用,与 NAFLD 及肥胖等代谢综合征关系密切^[20]。核激素受体 PPAR γ 能控制脂肪酸的过氧化物酶体 β -氧化途径,是脂肪细胞分化的关键调节因子。该受体调节基因转录的经典途径包括其通过与配体结

合的初始激活即与 RXR 的异二聚化,其下游能调控肝脏胆汁酸合成限速酶,参与肝脏胆固醇代谢,进而影响机体脂代谢^[21]。本研究根据网络药理学分析结果发现甘草防治 NAFLD 及肥胖的重要通路涉及 PPAR 信号通路,“成分-靶点-通路”网络中关键靶点涉及到 PPARG 及 RXRA,与此同时,甘草酸也表现出与 PPARG 蛋白靶点的高亲和力。qRT-PCR 实验结果显示甘草酸能显著激活高脂饮食小鼠肝脏 RXRA 及 PPARG 的 mRNA 表达($P<0.05$,图 7-A),

研究进一步发现甘草酸能明显增加 PPARG 下游调节因子 CYP7A1 的 mRNA 表达水平($P<0.01$)。Western blotting 结果也表明甘草酸能显著增加高脂小鼠肝脏中 RXRA、PPARG 及 CYP7A1 蛋白表达水平($P<0.05$,图 7-B)。以上结果说明甘草可以通过其主要活性成分甘草酸发挥抗 NAFLD 及肥胖作用,而其潜在作用机制可能是甘草酸通过激活高脂饮食小鼠肝脏 RXRA/PPARG/CYP7A1 信号通路,进而影响机体脂代谢,发挥抗 NAFLD 及肥胖作用。

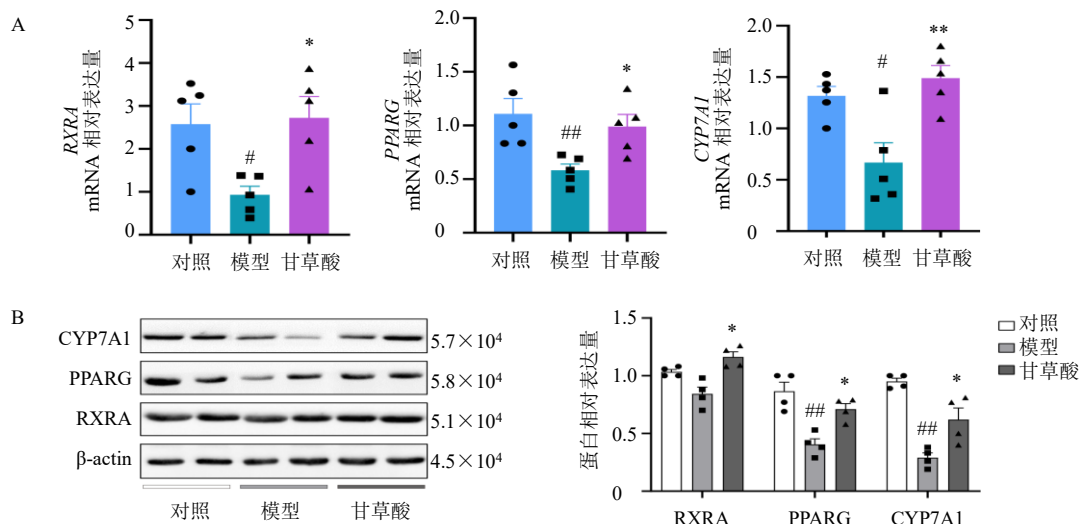


图 7 甘草酸对高脂饮食小鼠肝脏 RXRA/PPARG/CYP7A1 信号通路基因 (A) 及蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effect of glycyrrhizic acid on RXRA/PPARG/CYP7A1 signaling pathway gene (A) and protein (B) expressions in liver of mice fed with high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

当下流行病学研究发现,快速发展的经济水平导致人们的饮食习惯与生活节奏发生变化,NAFLD 及肥胖患病率逐年升高,呈流行趋势^[2-3]。由于二者同属代谢性疾病,涉及的病理机制复杂,单一成分或靶点触发的通路较单一,往往只能改善部分指标,且易导致不良反应^[1,4]。而中药具有多成分、多途径、多靶点协同作用的特点,可从多方面改善 NAFLD 及肥胖。本研究通过数据库检索,运用网络药理学方法构建了“甘草成分-靶点-信号通路”网络,辅以分子对接验证和动物实验评价药效,探讨甘草治疗 NAFLD 及肥胖的主要活性物质和潜在作用机制。

结果显示,筛选得到的甘草活性成分达 89 个,说明甘草成分种类繁多,药效物质基础复杂。成分靶点与疾病靶点结果显示,甘草和 NAFLD 及肥胖的交集靶点有 106 个,说明甘草在治疗 NAFLD 及肥胖方面的活性成分所影响的相关蛋白的生物学功能、分子功能和这 2 种疾病的发生、发展过程存在

一定相关性。拓扑分析筛选得到的排名前 5 的活性成分依次为槲皮素、甘草酸、山柰酚、柚皮素和芒柄花素。研究发现,槲皮素可以通过恢复肠道菌群失衡,逆转相关内毒素血症诱导的 Toll 样受体 4 通路的激活,随后抑制炎症小体反应和网状应激通路的激活,进而导致脂质代谢基因表达紊乱来降低胰岛素抵抗和 NAFLD 活动度评分^[22]。甘草酸可以通过降低肠道胆盐水解酶相关菌群丰度,增加结合胆汁酸,抑制肠道法尼酯 X 受体 (farnesoid X-activated receptor, FXR),调节胆汁酸代谢,减轻高脂饮食诱导的小鼠体质量增加^[15]。山柰酚可有效控制血糖,调节血脂及 ALT、AST 活性,抑制脂质生成基因过度表达^[23];转录组学和代谢组学分析也表明,山柰酚具有改善与能量代谢、脂质代谢、氧化应激和炎症相关的 NAFLD 的能力^[24]。柚皮素可通过下调 Kupffer 细胞和肝细胞中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)/核因子-κB (nuclear

factor- κ B, NF- κ B) 信号通路来预防 NAFLD, 从而减轻小鼠肝脏中的炎症^[25], 也可以通过直接和间接激活 AMPK 来增加能量消耗和调节自噬来缓解 NAFLD 及肥胖^[26]。芒柄花素可以有效调节肠道微生物群, 改善宿主代谢和全身炎症, 调节参与肥胖的特定肝脏 miRNA 的表达, 并下调促炎细胞因子 IL-6、IL-22 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平来有效控制体质量、高血糖和胰岛素抵抗^[27]; 还可以激活 AMPK, 通过促进转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 介导的溶酶体生物发生和脂肪自噬来缓解肝脂肪变性^[28]。PPI 网络分析发现甘草防治 NAFLD 及肥胖的排名前 5 的核心靶点蛋白依次是 PTGS2、ESR1、PPARG、NOS2 及 GSK3B, 这些可能是甘草防治 NAFLD 及肥胖的重要靶点。PTGS2 参与介导疼痛, 在炎症反应中具有重要作用, 研究发现选择性髓系细胞 PTGS2 缺失导致单核细胞募集和巨噬细胞增殖增加, 导致促炎巨噬细胞增加, 吞噬能力降低, 致使体质量增加和肥胖, 外周胰岛素敏感性和葡萄糖利用率降低, 脂肪组织炎症和纤维化增加, 脂肪组织血管生成异常^[29]。类固醇激素受体 ESR1 在调节新陈代谢中起着重要作用, 能介导肝脏对雌激素的反应。ESR1 敲除雄性大鼠的肝转录组数据显示其参与碳水化合物和脂质代谢相关基因的表达改变^[30-31]。核激素受体 PPARG 能促进脂肪细胞分化以增强血糖摄取^[32]。NOS2 是一种信使分子, 参与炎症, 增强促炎介质如 IL-6、IL-8 的合成^[33]。GSK3B 通过磷酸化 PPAR α -Ser280 促进脂质合成代谢, 延缓肥胖诱发的脂毒性心肌病发生发展^[34-35]。动物和人类研究表明, 甘草会影响血糖、血脂和血压^[12]。棕色脂肪组织的主要功能是通过产热将多余的热量摄入消散成热能, 增加能量消耗, 而研究发现甘草提取物可以诱导脂肪细胞褐变, 增加棕色脂肪表型有效减少肥胖, 恢复代谢稳态^[10]。富含甘草提取物的一种膳食补充剂可改善肠道菌群, 增加肠屏障, 降低 Toll 样受体介导的炎症通路抵抗高脂高蔗糖饮食诱导的 NAFLD 形成^[11]。KEGG 通路分析主要涉及脂质与动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、IL-17 信号通路、HIF-1 信号通路、AMPK 信号通路、PPAR 信号通路、T 细胞受体信号通路。这些文献研究及网络分析结果充分说明, 甘草可通过多成分、多靶点、多通路协同发挥防治 NAFLD 及肥胖的作用。

将筛选得到的甘草中的主要活性成分和关键靶

点蛋白进行分子对接, 结果显示这些小分子成分都能自发较好地结合到关键靶蛋白的多个氨基酸残基上, 验证了网络药理学的筛选结果。同时发现甘草酸成分和各靶点蛋白均具有较强的亲和力, 且其为甘草中主要含量及活性成分, 提示其可能在甘草发挥抗 NAFLD 及肥胖方面贡献较大, 其中甘草酸展现出与 PPARG 之间较强的结合力。PPARG 作为一种核激素配体激活受体, 其经典途径通过与 RXR 的异二聚化激活该信号通路, 调控下游胆汁酸合成限速酶^[21], 胆汁酸在肝脏中由胆固醇主要通过经典途径合成, 该途径通过 CYP7A1 起始催化^[36]。因此, 这些限速酶能介导肝脏胆固醇转化生成胆汁酸, 从而影响胆汁酸代谢和胆固醇消耗, 调控脂质代谢, 参与代谢性疾病发生发展。基于网络药理研究与分子对接结果, 进一步运用动物实验评价了甘草酸对高脂饮食小鼠的药效活性, 并从基因及蛋白水平上发现甘草酸能通过激活高脂饮食小鼠肝脏 RXRA/PPARG 信号通路, 继而活化下游 CYP7A1, 改善机体血清 TC、TG 代谢, 降低血清 ALT、AST 活性, 防治 NAFLD, 抵抗肥胖 (图 8)。分子对接显示甘草酸能与 PPARG 等靶点蛋白结合, 表明其可能直接激活或抑制该靶点蛋白, Western blotting 实验结果发现甘草酸能显著抑制高脂饮食小鼠肝脏中这些靶点蛋白的减少, 相应增加其表达, 这也进一步佐证了分子对接的结论。本研究同时发现甘草酸也能显著促进高脂小鼠这些靶蛋白的 mRNA 转录水平, 说明甘草酸可能一方面能直接抑制高脂小鼠 PPARG 等靶点蛋白的减少, 另一方面还可能通过其他通路参与并调控这些靶点蛋白基因上游的某

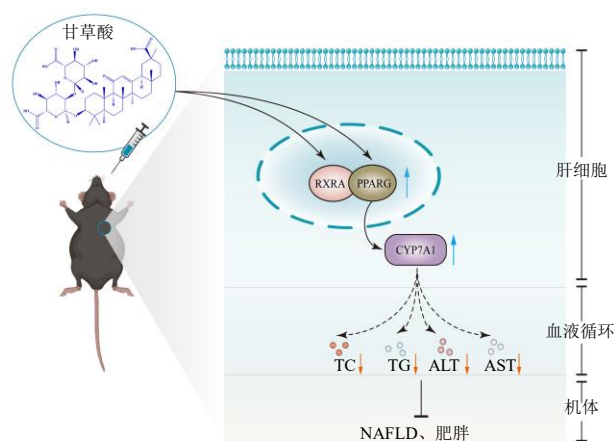


图 8 甘草酸防治 NAFLD 及肥胖的潜在机制

Fig. 8 Potential mechanisms of glycyrrhizic acid in prevention and treatment of NAFLD and obesity

些或某个分子来增加高脂小鼠体内这些靶点的 mRNA 转录水平,而其具体调控机制仍需实验探索验证。这些结果也反映出甘草酸这一成分可能通过多靶点、多通路来发挥抗 NAFLD 及肥胖作用。

综上,本研究基于网络药理学和整合生物信息学方法较为系统地分析预测了甘草防治 NAFLD 及肥胖的主要生物活性成分及潜在作用机制,通过结合当前相关文献研究结果进行印证,并采用分子对接方法验证了预测的关键活性成分与核心靶点蛋白之间的结合能力。动物实验结果揭示了重要活性成分甘草酸能通过调节肝脏 PPARG 信号通路产生抗 NAFLD 及肥胖的作用,进一步证实了网络药理学预测及分子对接的可靠性。然而,本研究得出的潜在作用机制仅局限于在动物基因及蛋白水平上,后续还需要更多的临床试验来进一步证实这些结论;与此同时,本实验也仅仅选用了其中的主要含量及活性成分甘草酸进行药效学验证,未能充分研究甘草防治 NAFLD 及肥胖的其他主要活性成分的药效作用和其他靶点通路的变化。总的来说,本研究将为促进传统中药甘草及其主要活性成分甘草酸的临床应用与机制研究提供科学依据,也为病机复杂且诱因相同的 NAFLD 及肥胖等代谢性疾病的防治思路提供参考借鉴。而具有“多成分、多靶点、多通路”作用特点的中药甘草防治 NAFLD 及肥胖的后续作用机制研究仍任重而道远。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Clark J M, Cryer D R H, Morton M, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease from a primary care perspective [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2023, 25(6): 1421-1433.
- [2] Serna-Gutiérrez A, Castro-Juarez A A, Romero-Martínez M, *et al.* Prevalence of overweight, obesity and central obesity and factors associated with BMI in indigenous Yaqui people: A probabilistic cross-sectional survey [J]. *BMC Public Health*, 2022, 22(1): 308.
- [3] Raza S. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH [J]. *Front Biosci*, 2021, 26(2): 206-237.
- [4] Ryan D H. Drugs for treating obesity [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2022, 274: 387-414.
- [5] Mundi M S, Velapati S, Patel J, *et al.* Evolution of NAFLD and its management [J]. *Nutr Clin Pract*, 2020, 35(1): 72-84.
- [6] Shaunak M, Byrne C D, Davis N, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and childhood obesity [J]. *Arch Dis Child*, 2021, 106(1): 3-8.
- [7] Hagström H, Simon T G, Roelstraete B, *et al.* Maternal obesity increases the risk and severity of NAFLD in offspring [J]. *J Hepatol*, 2021, 75(5): 1042-1048.
- [8] 裴玉琼, 石海培, 严辉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多成分一测多评法定量的炙甘草饮片质量评价研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(18): 4293-4304.
- [9] Armanini D, De Palo C B, Mattarello M J, *et al.* Effect of licorice on the reduction of body fat mass in healthy subjects [J]. *J Endocrinol Invest*, 2003, 26(7): 646-650.
- [10] Lee H E, Yang G, Han S H, *et al.* Anti-obesity potential of *Glycyrrhiza uralensis* and licochalcone A through induction of adipocyte browning [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 2117-2123.
- [11] Chen L, Kan J, Zheng N, *et al.* A botanical dietary supplement from white peony and licorice attenuates nonalcoholic fatty liver disease by modulating gut microbiota and reducing inflammation [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153693.
- [12] Jafari F, Jafari M, Moghadam A T, *et al.* A review of *Glycyrrhiza glabra* (licorice) effects on metabolic syndrome [A] // *Natural Products and Human Diseases* [M]. Cham: Springer International Publishing, 2021: 385-400.
- [13] Zhang R, Cheng K R, Xu S Z, *et al.* Metformin and diammonium glycyrrhizinate enteric-coated capsule versus metformin alone versus diammonium glycyrrhizinate enteric-coated capsule alone in patients with nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2017, 2017: 8491742.
- [14] 袁陈婷, 孙锦秀, 郭晶晶, 等. 还原型谷胱甘肽联合甘草酸二铵治疗非酒精性脂肪肝的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(2): 359-362.
- [15] Li Y, Hou H Q, Wang X L, *et al.* Diammonium glycyrrhizinate ameliorates obesity through modulation of gut microbiota-conjugated BAs-FXR signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 796590.
- [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] 但文超, 何庆勇, 曲艺, 等. 基于网络药理学的枳术丸调治血脂异常的分子机制研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2019, 21(11): 2396-2405.
- [18] Lee C H, Park S W, Kim Y S, *et al.* Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(10): 1898-1904.
- [19] Dai X, Wang C, Guo Z X, *et al.* Maternal sucralose exposure induces Paneth cell defects and exacerbates gut

- dysbiosis of progeny mice [J]. *Food Funct*, 2021, 12(24): 12634-12646.
- [20] Botta M, Audano M, Sahebkar A, *et al.* PPAR agonists and metabolic syndrome: An established role? [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1197.
- [21] Kökény G, Calvier L, Hansmann G. PPAR γ and TGF β —Major regulators of metabolism, inflammation, and fibrosis in the lungs and kidneys [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10431.
- [22] Porras D, Nistal E, Martínez-Flórez S, *et al.* Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 102: 188-202.
- [23] Guruvaiiah P, Guo H M, Li D X, *et al.* Preventive effect of flavonol derivatives abundant Sanglan Tea on long-term high-fat-diet-induced obesity complications in C57BL/6 mice [J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1276.
- [24] Lu Y F, Shao M M, Xiang H J, *et al.* Integrative transcriptomics and metabolomics explore the mechanism of kaempferol on improving nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Food Funct*, 2020, 11(11): 10058-10069.
- [25] Wang Q Y, Ou Y J, Hu G M, *et al.* Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the NLRP3/NF- κ B pathway in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(8): 1806-1821.
- [26] Yang Y, Wu Y, Zou J, *et al.* Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by enhancing energy expenditure and regulating autophagy via AMPK [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 687095.
- [27] Naudhani M, Thakur K, Ni Z J, *et al.* Formononetin reshapes the gut microbiota, prevents progression of obesity and improves host metabolism [J]. *Food Funct*, 2021, 12(24): 12303-12324.
- [28] Wang Y, Zhao H, Li X, *et al.* Formononetin alleviates hepatic steatosis by facilitating TFEB-mediated lysosome biogenesis and lipophagy [J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 73: 108214.
- [29] Pan Y, Cao S R, Tang J Q, *et al.* Cyclooxygenase-2 in adipose tissue macrophages limits adipose tissue dysfunction in obese mice [J]. *J Clin Investig*, 2022, 132(9): e152391.
- [30] Khristi V, Ratri A, Ghosh S, *et al.* Disruption of ESR1 alters the expression of genes regulating hepatic lipid and carbohydrate metabolism in male rats [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 490: 47-56.
- [31] Khristi V, Ratri A, Ghosh S, *et al.* Liver transcriptome data of *Esr1* knockout male rats reveals altered expression of genes involved in carbohydrate and lipid metabolism [J]. *Data Brief*, 2019, 22: 771-780.
- [32] Zhuang J L, Liu Y Y, Li Z Z, *et al.* Amentoflavone prevents ox-LDL-induced lipid accumulation by suppressing the PPAR γ /CD36 signal pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 431: 115733.
- [33] Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, *et al.* Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage-Mediator role of NO in leptin-induced PGE $_2$, IL-6, and IL-8 production [J]. *Mediat Inflamm*, 2009, 2009: 345838.
- [34] Welsh G I, Proud C G. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B [J]. *Biochem J*, 1993, 294(3): 625-629.
- [35] Nakamura M, Liu T, Husain S, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 α promotes fatty acid uptake and lipotoxic cardiomyopathy [J]. *Cell Metab*, 2019, 29(5): 1119-1134.
- [36] Jia W, Xie G, Jia W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(2): 111-128.

[责任编辑 李亚楠]