

基于网络药理学及分子对接技术探讨补气消脂方治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制

王卓媛^{1,2}, 李爽², 黄兰蔚², 苟小军² (1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 上海市宝山区中西医结合医院消化科, 上海 201999)

摘要: **目的** 利用网络药理学和分子对接技术预测补气消脂方治疗非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的主要活性成分和目标基因靶点, 并探讨其潜在的作用机制。**方法** 通过检索中药系统药理技术平台(TCMSP)、OMIM、GeneCards 等数据库, 查找补气消脂方活性成分、作用靶点以及 NAFLD 相关靶点, 以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为标准筛选活性成分, 并查阅文献补充文献报道中常见的中药活性成分, 汇总得到活性成分库, 并利用 STRING 数据库平台分析各靶点之间的相互作用, 构建蛋白互作网络。利用 Cytoscape 3.7.2 软件进行“活性成分-疾病靶点”网络分析, 在此基础上采用 R 4.0.3(依托于“clusterProfiler”“org.Hs.eg.db”以及“pathview”程序包)进行 GO 与 KEGG 基因功能富集分析。筛选出补气消脂方关键活性成分和靶基因后, 利用 Autodock-vina 软件进行分子对接, 选择蛋白互作网络中度值排名前 6 位的重要的靶点进行分子对接, 验证结合活性。**结果** 通过筛选发现了补气消脂方中共有 98 种活性成分和 229 种相应靶点, NAFLD 靶点 1 283 个。最终筛选获得 103 个关键靶点和 30 个重要的信号通路, 如癌症通路、AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路等。补气消脂方治疗 NAFLD 的主要成分为槲皮素、木犀草素、丹参酮 II A、山柰酚等, 关键靶点为 IL-6、FOS、CXCL8、RELA、STAT3、AKT1 等。通过分子对接得到结合能 $\leq -6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的“靶点蛋白-活性分子”16 个, 与排名前 6 位的关键靶点均有较好的亲和力。**结论** 补气消脂方中的活性成分槲皮素、木犀草素、丹参酮 II A、山柰酚、柚皮素等可能通过作用于多个靶点和调控多条通路治疗 NAFLD。

关键词: 补气消脂方; 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD); 网络药理学; 分子对接技术

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1797-10

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.009

Based on Network Pharmacology and Molecular Docking to Discuss the Mechanism of *Buqi Xiaozhi* Prescription in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

WANG Zhuoyuan^{1,2}, LI Shuang², HUANG Lanwei², GOU Xiaojun² (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046 Shaanxi, China; 2. Department of Gastroenterology, Baoshan District Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai 201999, China)

Abstract: **Objective** To predict the main active ingredients and target genes of *Buqi Xiaozhi* prescription in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by using network pharmacology and molecular docking technology, and to explore its potential mechanism of action. **Methods** The active ingredients, targets and NAFLD-related targets of *Buqi Xiaozhi* recipe were found through searching databases, such as TCM System Pharmacology Technology Platform (TCMSP), OMIM and GeneCards, etc. The active ingredients fulfilled the criteria ($OB \geq 30\%$

收稿日期: 2021-04-01

作者简介: 王卓媛, 女, 硕士研究生, 研究方向: 临床药学。Email: 949920078@qq.com。通信作者: 黄兰蔚, 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 消化病临床与机制研究。Email: blue28325@163.com; 苟小军, 男, 博士, 主任药师, 研究方向: 临床药学与体内代谢研究。Email: gouxiaojun1975@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82074083); 宝山区特色专科建设计划(BSZK-2018-A03)。

and $DL \geq 0.18$) and the common active ingredients of traditional Chinese medicine supplemented by literature were used to build the active ingredient library. The interaction between the targets was analyzed by STRING database platform to build a PPI protein interaction network. Then, “active ingredients–disease targets” network analysis was conducted by Cytoscape 3.7.2 software. On this basis, R 4.0.3 (relying on “clusterProfiler”, “org.Hs.eg.db” and “pathview” package) was performed for GO and KEGG gene function enrichment analysis. After screening the key active ingredients and target genes of *Buqi Xiaozhi* recipe, we carried out molecular docking by Autodock-vina software. Namely, top 6 targets ranked by degree value of PPI were selected for molecular docking to verify the binding activity. **Results** It was found that 98 active ingredients and 229 corresponding targets in *Buqi Xiaozhi* prescription, and 1 283 NAFLD targets were obtained by screening. Finally, 103 key targets and 30 important signal pathways were screened, such as cancer pathway, AGE–RAGE signal pathway, TNF signal pathway and HIF–1 signal pathway etc. The main components of *Buqi Xiaozhi* prescription in the treatment of NAFLD are quercetin, luteolin, tanshinone II A, kaempferol, etc. The key targets are IL–6, FOS, CXCL8, RELA, STAT3, AKT1, etc. 16 active ingredients with binding energy $\leq -6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ were obtained through molecular docking. The active ingredients have good affinity with the top 6 key targets. **Conclusion** The active ingredients in *Buqi Xiaozhi* recipe, including quercetin, luteolin, tanshinone II A, kaempferol, naringenin, etc., may treat NAFLD by acting on multiple targets and regulating multiple pathways.

Keywords: *Buqi Xiaozhi* prescription; non–alcoholic fatty liver disease (NAFLD); network pharmacology; molecular docking technology

非酒精性脂肪性肝病 (non–alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 目前是全球主要的公共卫生问题, 世界范围内患病率逐年上升, 并且可能存在严重的后遗症^[1]。NAFLD 与肥胖、胰岛素抵抗或 2 型糖尿病和其他代谢异常有关, 例如血脂异常和高血压, 统称为代谢综合征^[2]。NAFLD 包括从简单的脂肪变性到更严重的非酒精性脂肪性肝炎 (non–alcoholic steatohepatitis, NASH) 等范围广泛的肝病, 可能发展为肝硬化或肝细胞癌^[3]。NAFLD 的标志是甘油三酯 (Triglyceride, TG) 在肝脏细胞质中的积累^[4]。NAFLD 患者易引发心血管疾病且也是其死亡的主要原因^[5]。目前, 西医临床治疗 NAFLD 以合理饮食、控制体质量、适当运动为主, 可对 NAFLD 起到预防以及改善的作用。部分患者在有效控制腹围、体质量后, NAFLD 往往可得到好转, 但容易反复; 另外相当一部分患者患有高脂血症, 单纯控制体质量的方法无效, 加用他汀类降脂药物又容易引起新的肝功能损伤^[6–7]。而中药复方成分众多, 可发挥多途径、多靶点的优势, 对 NAFLD 的治疗具有较好的疗效。

祖国医学尚无脂肪肝这个病症, 其主要症状表现为疲劳、肝区疼痛和肝肿大。其发病机理是由于饮食无节制、过食肥甘厚味、劳逸失调及情志不畅而引起的, 可将其归属于“肝癖”“胁痛”“肥气”“积

聚”“肝着”“宿满”等中医病名范畴^[8]。目前对 NAFLD 尚无统一的辨证分型标准, 据众多医家临床辨证可分为痰瘀互结型、湿热内蕴型、肝郁脾虚型、血瘀气滞型及肝肾亏虚型^[9]。补气消脂方源自上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所徐列明教授的临床经验方, 主要由蜜黄芪 20 g、白术 10 g、丹参 20 g、郁金 10 g、姜黄 10 g、虎杖 15 g、山楂 30 g 组成, 临床治疗 NAFLD 效果良好, 但是其治疗机制尚不明确, 需要进一步的研究和开发。

网络药理学是基于系统生物学理论的一门新兴学科, 探讨药物通过作用于多个靶点, 进而从多途径调节信号通路, 最终产生提高药物疗效、降低毒副作用的效果^[10]。对降低新药临床试验的失败率, 节约药物的研发费用具有积极作用。网络药理学强调信号通路的多组分、多靶点、多途径调节, 从分子生物学的角度分析中药活性成分与靶基因是连锁的^[11], 可以从“药物–靶点–蛋白”层面提供中药复方作用机制研究的新方法, 并探索哪些靶点是与组织因子密切相关, 从基因和蛋白层面找到补气消脂方的靶点与组织因子内在的联系, 可为补气消脂方治疗 NAFLD 提供新的科学依据和线索, 为研究补气消脂方的治疗机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 补气消脂方主要活性成分及作用靶点的收集 补气消脂方主要由蜜黄芪、白术、丹参、郁金、姜黄、虎杖、山楂七味中药组成。利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)^[12], 获取补气消脂方 7 味中药的活性成分, 并设置口服吸收利用度(oral bioavailability, OB)≥30%, 药物相似性(drug-likeness, DL)≥0.18^[13]进行筛选。通过 TCMSP 数据库进一步预测活性成分的相关靶点, 最终得到补气消脂方活性成分的作用靶点。

1.2 NAFLD 疾病相关靶点及共同靶点的获取 以“Non-alcoholic fatty liver disease”为关键词, 通过 OMIM 数据库^[14]与 GeneCards 数据库^[15]检索筛选 NAFLD 的疾病靶点, 并将获取的结果筛选汇总后去重。利用 R 4.0.3 制作中药活性成分作用靶点与疾病靶点相交的韦恩(Venn)图, 最终得到 NAFLD 疾病靶点与补气消脂方活性成分作用靶点的共同靶点。

1.3 “药物-活性成分-作用靶点”相互作用网络的构建 将“1.1”项下获得的补气消脂方活性成分与药物作用靶点进行汇总, 并用 Cytoscape 3.7.2 构建“药物-活性成分-作用靶点”的模型网络。

1.4 构建补气消脂方与 NAFLD 蛋白互作(PPI)网络 将“1.2”项下得到的共同靶点在线导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>), 构建蛋白-蛋白相互作用网络图, 分析交集网络中节点的属性值, 筛选后最终获得补气消脂方治疗 NAFLD 的关键靶点。

1.5 GO 与 KEGG 富集分析 将蛋白通过 R 4.0.3 中“clusterProfiler”“org. Hs. eg. db”“pathview”程序

包进行分析, 从而得到 GO 与 KEGG 的富集分析。
1.6 分子对接验证 选取蛋白互作网络中 6 个重要靶点与补气消脂方活性成分进行分子对接, 在 PubChem 数据库中(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载补气消脂方活性成分化合物的 sdf 结构的文件, 导入到 ChemBio 3D14.0 软件中调整活性成分的空间构象, 计算能量的最优化, 并以 mol2 格式保存, 经 AutoDockTools 1.5.6 处理后将文件保存为 pdbqt 格式。从 PDB(<https://www.rcsb.org/>)蛋白数据库中下载目标蛋白的三维晶体结构(PDB ID 分别为 4L13、1ALU、5D14、3QXY、3ZMM、6HHI), 利用 Nottedad2 将目标蛋白中水分子以及有机物除去, 再将目标蛋白导入 AutoDockTools 1.5.6 加氢、分配电荷、添加原子类型后保存为 pdbqt 格式文件。利用 AutoDock Vina 进行分子对接, 用 Pymol 对得到的对接结果进行绘图。

2 结果

2.1 补气消脂方主要活性成分筛选与作用靶点获取结果 基于 TCMSP 数据库, 本研究以生物利用度≥30%, 类药性≥0.18 筛选出蜜黄芪、白术、丹参、郁金、姜黄、虎杖、山楂七味中药中的活性成分。共筛选得到 114 个活性成分, 通过 TCMSP 数据库进一步预测补气消脂方有效成分作用疾病的相关靶点, 有 16 个化学成分无作用疾病的相关靶点, 将其删除后得到 98 个化学成分, 见表 1; 最终筛选出 720 个补气消脂方作用疾病靶点, 有 491 个重复靶点, 去重后得到 229 个补气消脂方作用疾病靶点。

表 1 补气消脂方主要活性成分信息表

Table 1 Information on active ingredients in *Buqi Xiaozhi* recipe

序号	MOL ID	编号	主要活性成分	来源药物	序号	MOL ID	编号	主要活性成分	来源药物
1	MOL000072	BZ1	8β-ethoxy atractylenolide III	白术	52	MOL000569	DS46	digallate	丹参
2	MOL000049	BZ2	3β-acetoxyatractylone	白术	53	MOL007068	DS47	Przewaquinone B	丹参
3	MOL000022	BZ3	14-acetyl- 12-senecioid- 2E, 8Z, 10E-atractylentriol	白术	54	MOL007050	DS48	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	丹参
4	MOL000033	B1	(3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10, 13-dimethyl-17-[(2R, 5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	白术	55	MOL007130	DS49	prolithospermic acid	丹参
5	MOL007085	DS1	salvilenone	丹参	56	MOL007155	DS50	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1, 6-dimethyl-8, 9-dihydro- 7H-naphtho[8, 7-g]benzofuran- 10, 11-dione	丹参
6	MOL007145	DS2	salviolone	丹参	57	MOL007105	DS51	epidanshenspiroketallactone	丹参
7	MOL007059	DS3	3-beta-Hydroxymethyllenetanshiquinone	丹参	58	MOL007120	DS52	miltionone II	丹参
8	MOL007143	DS4	salvilenone I	丹参	59	MOL007058	DS53	formyltanshinone	丹参
9	MOL007036	DS5	5, 6-dihydroxy-7-isopropyl-1, 1-dimethyl-2, 3-dihydrophenanthren-4-one	丹参	60	MOL007150	DS54	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8, 9-dihydro- 7H-naphtho[8, 7-g]benzofuran- 10, 11-quinone	丹参

(续表 1)

序号	MOL ID	编号	主要活性成分	来源药物	序号	MOL ID	编号	主要活性成分	来源药物
10	MOL007049	DS6	4-methylenemiltirone	丹参	61	MOL007132	DS55	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyloxy]propionic acid	丹参
11	MOL007127	DS7	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	丹参	62	MOL007064	DS56	przewalskin b	丹参
12	MOL007107	DS8	C09092	丹参	63	MOL013281	HZ1	6,8-Dihydroxy-7-methoxyxanthone	虎杖
13	MOL002222	DS9	sugiol	丹参	64	MOL013287	HZ2	Physovenine	虎杖
14	MOL000006	A1	luteolin	丹参	65	MOL013288	HZ3	Picalinal	虎杖
15	MOL007121	DS10	multipolone	丹参	66	MOL002268	HZ4	rhein	虎杖
16	MOL001771	DS11	poriferast-5-en-3beta-ol	丹参	67	MOL000358	E1	beta-sitosterol	虎杖
17	MOL007061	DS12	methylenetanshinquinone	丹参	68	MOL000492	HZ5	(+)-catechin	虎杖
18	MOL007063	DS13	przewalskin a	丹参	69	MOL000006	A1	luteolin	虎杖
19	MOL007100	DS14	dihydrotanshinlactone	丹参	70	MOL000098	C1	quercetin	虎杖
20	MOL001601	DS15	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	丹参	71	MOL000211	HQ1	Mairin	黄芪
21	MOL007122	DS16	Miltirone	丹参	72	MOL000239	HQ2	Jaranol	黄芪
22	MOL007093	DS17	dan-shexinkum d	丹参	73	MOL000296	HQ3	hederagenin	黄芪
23	MOL007124	DS18	neocryptotanshinone ii	丹参	74	MOL000033	B1	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-ylotlan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	黄芪
24	MOL007071	DS19	przewaquinone f	丹参	75	MOL000354	D4	isorhamnetin	黄芪
25	MOL007041	DS20	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	丹参	76	MOL000371	HQ4	3,9-di-O-methylnisoslin	黄芪
26	MOL007070	DS21	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	丹参	77	MOL000378	HQ5	7-O-methylisomucronulatol	黄芪
27	MOL007151	DS22	Tanshindiol B	丹参	78	MOL000379	HQ6	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-beta-D-glucoside	黄芪
28	MOL007152	DS23	Przewaquinone E	丹参	79	MOL000380	HQ7	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	黄芪
29	MOL007142	DS24	salvianolic acid j	丹参	80	MOL000387	HQ8	Bifendate	黄芪
30	MOL007077	DS25	sclareol	丹参	81	MOL000392	HQ9	formononetin	黄芪
31	MOL002651	DS26	Dehydrotanshinone II A	丹参	82	MOL000417	HQ10	Calycosin	黄芪
32	MOL001659	DS27	Poriferasterol	丹参	83	MOL000422	D3	kaempferol	黄芪
33	MOL007045	DS28	3alpha-hydroxytanshinone II a	丹参	84	MOL000433	HQ11	FA	黄芪
34	MOL007101	DS29	dihydrotanshinone I	丹参	85	MOL000442	HQ12	1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	黄芪
35	MOL007115	DS30	manool	丹参	86	MOL000098	C1	quercetin	黄芪
36	MOL001942	DS31	isoimperatorin	丹参	87	MOL000449	D1	Stigmasterol	姜黄
37	MOL007141	DS32	salvianolic acid g	丹参	88	MOL000493	JH1	campesterol	姜黄
38	MOL007156	DS33	tanshinone VI	丹参	89	MOL000953	JH2	CLR	姜黄
39	MOL007048	DS34	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	丹参	90	MOL000354	D4	isorhamnetin	山楂
40	MOL007098	DS35	deoxyneocryptotanshinone	丹参	91	MOL000359	D2	sitosterol	山楂
41	MOL007119	DS36	miltionone I	丹参	92	MOL000422	D3	kaempferol	山楂
42	MOL007154	DS37	tanshinone iia	丹参	93	MOL000449	D1	Stigmasterol	山楂
43	MOL007111	DS38	Isotanshinone II	丹参	94	MOL000073	SZ1	ent-Epicatechin	山楂
44	MOL007094	DS39	danshenspiroketallactone	丹参	95	MOL000098	C1	quercetin	山楂
45	MOL007088	DS40	cryptotanshinone	丹参	96	MOL000358	YJ1	beta-sitosterol	郁金
46	MOL007079	DS41	tanshinaldehyde	丹参	97	MOL000359	D2	sitosterol	郁金
47	MOL007125	DS42	neocryptotanshinone	丹参	98	MOL004328	YJ2	naringenin	郁金
48	MOL007108	DS43	isocryptotanshinone	丹参					
49	MOL007069	DS44	przewaquinone c	丹参					
50	MOL007082	DS45	Danshenol A	丹参					
51	MOL007081	DS46	Danshenol B	丹参					

2.2 NAFLD 的疾病靶点 以“Non-alcoholic fatty liver disease”为检索关键词,检索 GeneCards 数据库

与 OMIM 数据库,将搜索得到的靶点通过汇总分析并去除重复靶点,最终得到 1 283 个和 NAFLD 相关

的疾病靶点。

2.3 “药物-疾病”的共同靶点 见图 1。将得到的 1 283 个疾病靶点与 229 个补气消脂方活性成分作用靶点进行韦恩分析,通过 R3.5.2 绘制疾病靶点与药物靶点之间的韦恩图,并得到相关靶点的汇总结果,共得到 103 个共同靶点。

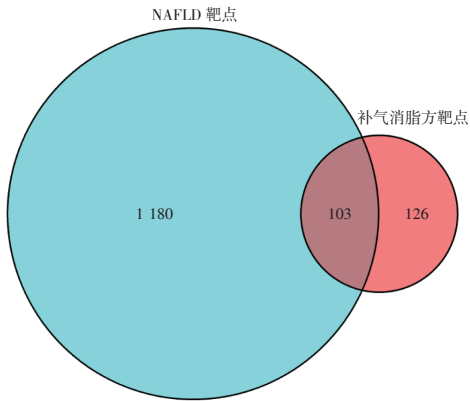


图 1 补气消脂方治疗非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 药物靶点与疾病靶点韦恩图

Figure 1 Venn diagram of drug targets and disease targets of *Buqi Xiaozhi* recipe in the treatment of non-alcoholic fatty liver (NAFLD)

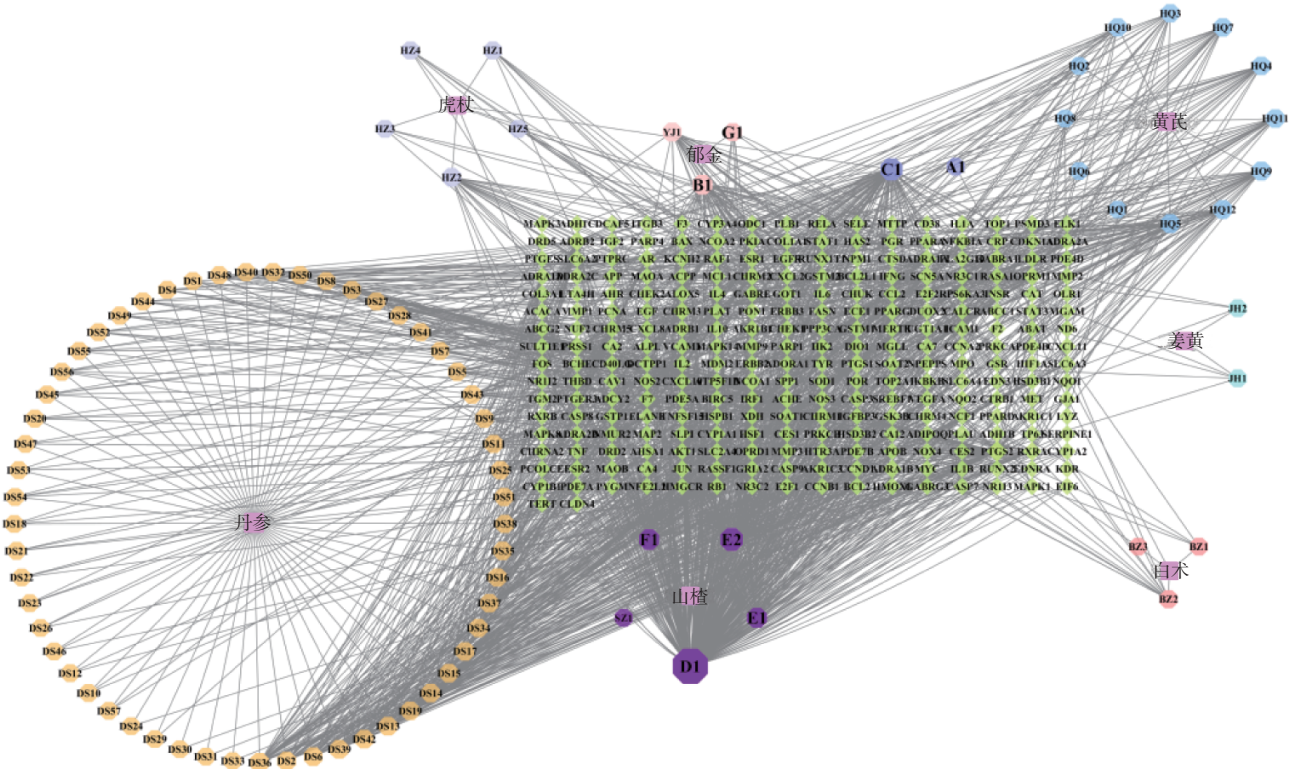
2.4 “药物-活性成分-作用靶点”相互作用网络的构建 见图 2。将补气消脂方的 98 个活性成分与

229 个药物作用靶点,采用 Cytoscape 3.7.1 构建“药物-活性成分-作用靶点”网络,用不同的节点表示筛选得到的不同活性成分以及对应的作用靶点。该网络包括 354 个节点和 1 806 条边。分析结果表明,补气消脂方具有多成分、多靶点的作用特点。

2.5 蛋白互作网络的构建 把补气消脂方与 NAFLD 的 103 个共同靶点输入 STRING 数据库中,构建蛋白互作网络图。结果表明,103 个共同靶点之间均存在直接或间接的作用关系,见图 3。根据度值进行排序,度值大的有 IL-6、FOS、CXCL8、RELA、STAT3、AKT1 等 6 个靶点,可以认为这些靶点在补气消脂方治疗 NAFLD 中起到主要的作用。

2.6 GO 与 KEGG 富集分析 见图 4。以 *P* value Cutoff=0.05 为标准,对补气消脂方与 NAFLD 的 103 个共同靶点数据实施 GO 功能富集性分析,得到包括生物过程(Bioproccess, BP)、细胞组成(Cell composition, CC)和分子功能(Molecular function, MF)在内的 3 个部分,并筛选各部分 *P* 值最小的前 10 个作为显著的生物过程,主要包括转录因子结合、蛋白激酶结合、细胞因子受体结合等多个细胞内生命活动密切相关过程。

见图 5。通过采用 R 4.0.3(“clusterProfiler”“org.Hs.eg.db”“pathview”程序包)构建 KEGG 通路富集



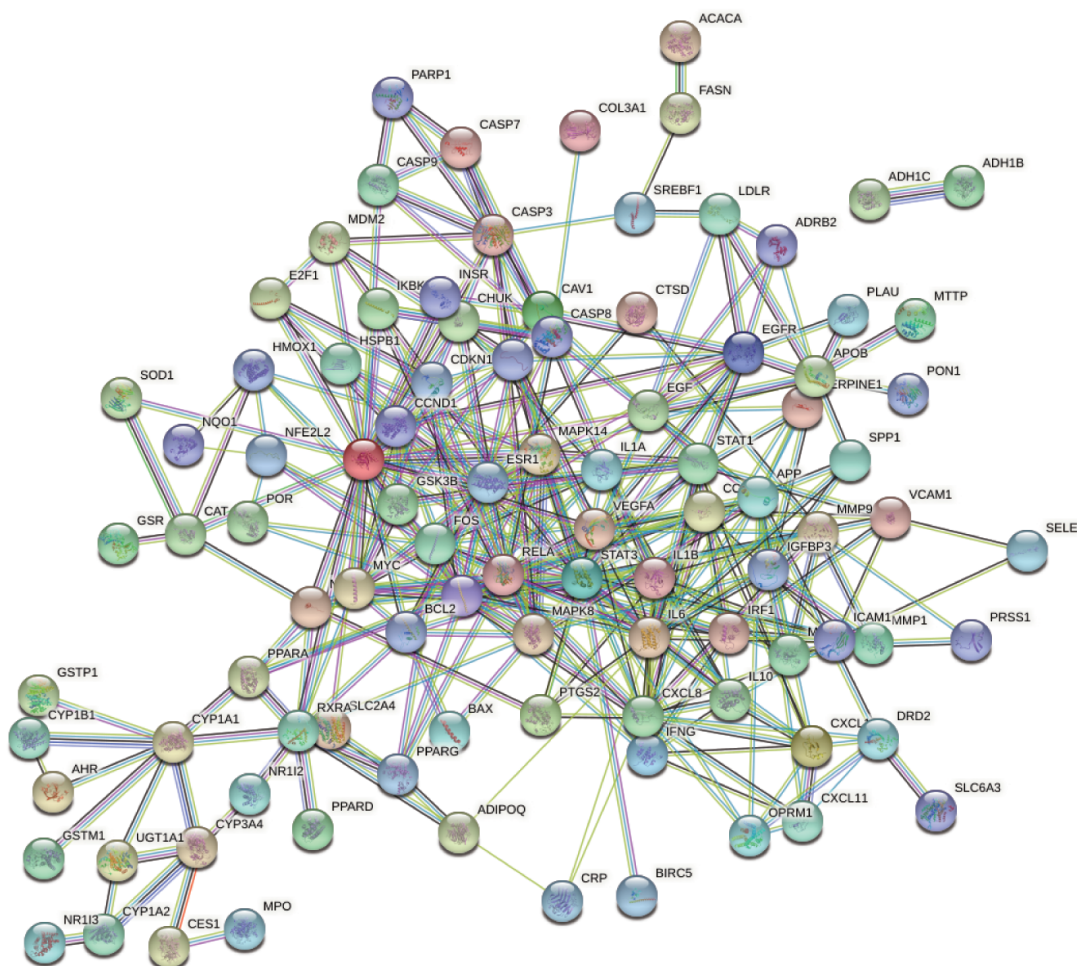


图3 补气消脂方与非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)共同靶点的蛋白互作网络

Figure 3 PPI network of the common targets of *Buqi Xiaozhi* recipe and NAFLD

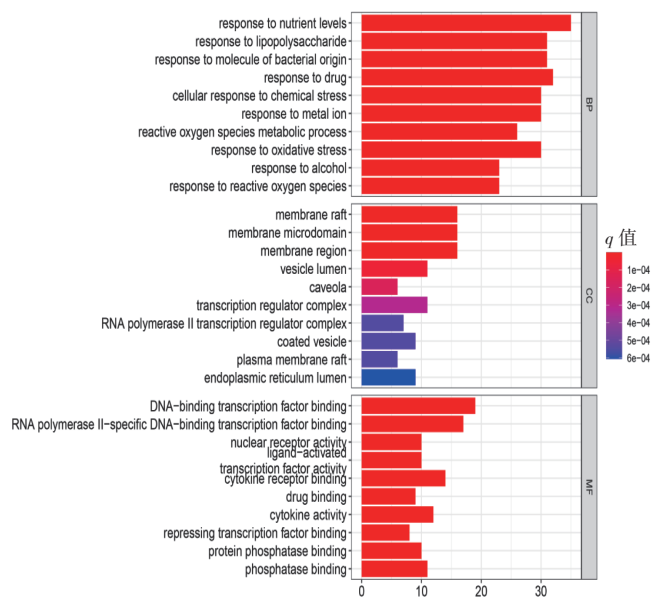


图4 补气消脂方治疗非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的GO富集分析

Figure 4 GO enrichment analysis of *Buqi Xiaozhi* prescription against NAFLD

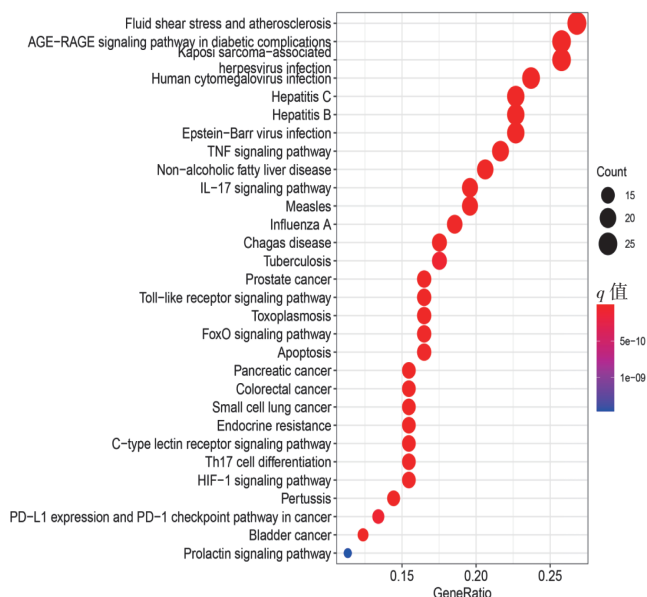


图5 补气消脂方治疗非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的KEGG通路富集分析

Figure 5 KEGG pathway enrichment analysis of *Buqi Xiaozhi* recipe against NAFLD

功能网络图，将靶点与通路之间的关系进行可视化。KEGG 功能富集分析结果表明，补气消脂方的活性成分影响 NAFLD，主要集中在癌症中的通路、TNF 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、丙型肝炎、非酒精性脂肪肝病、流体剪应力与动脉粥样硬化信号通路、IL-17 信号通路、乙型肝炎、巨细胞病毒感染、PI3K-Akt 信号通路等，说明补气消脂方在治疗 NAFLD 中有可能是通过这几个通路发挥作用。

2.7 分子对接验证 将蛋白互作网络筛选的度值较大的前 6 个重要靶点与药物中对应的活性成分进行分子对接验证，从 PDB 数据库获得所需文件：靶点 IL-6(PDBID: 1ALU)、FOS(PDBID: 4L13)、CXCL8(PDBID: 5D14)、RELA(PDBID: 3QXY)、STAT3(PDBID: 3ZMM)、AKT1(6HHI)，所有受体文件均做删除有机物、水分子及加氢分配电荷处理。通过 PyMOL 进行预处理，使用 AutoDockVina 进行分子对接，得到分子对接验证结果，见表 2。通过分子对接得到结合能 ≤ -6 kcal $\cdot$ mol $^{-1}$ 的“靶点蛋白-活性分子”16 个，与排名前 6 位的关键靶点均有较好的亲和力。选择 5 个结合能最小的“靶点蛋白-活性分子”绘制成对接模式图，如图 6 所示。结果表明，补气

消脂方中的柚皮素、山柰酚等活性成分与关键靶点之间有很好的亲和力，可通过作用于蛋白激酶受体等相关核心靶点治疗或改善 NAFLD。

表 2 补气消脂方的关键活性成分与关键靶点对接的结合能
Table 2 Binding energy of key active ingredients of *Buqi Xiaozhi* prescription docking with key targets

活性成分	化学式	相对分子质量	靶点	结合能/(kcal $\cdot$ mol $^{-1}$)
柚皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.24	CXCL8	-7.9
			FOS	-7.4
			IL-6	-6.8
			RELA	-9.0
			AKT1	-9.2
木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	IL-6	-7.1
			RELA	-8.8
			AKT1	-9.8
丹参酮 II A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294.34	RELA	-11.0
山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	RELA	-9.2
			AKT1	-9.5
柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	272.25	RELA	-10.8
			AKT1	-9.6
异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.26	RELA	-9.0
隐丹参酮	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	296.36	RELA	-8.9
			STAT3	-8.9

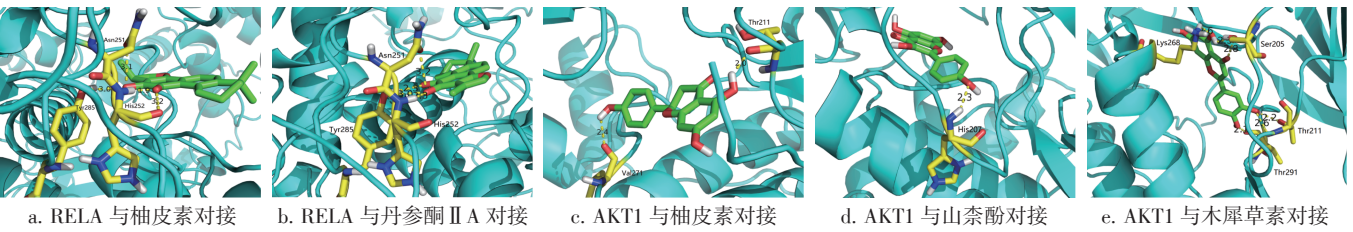


图 6 补气消脂方治疗非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的重要靶点与活性成分的分子对接
Figure 6 Molecular docking of important targets and active ingredients of *Buqi Xiaozhi* recipe against NAFLD

3 讨论

关于非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的健康问题日益严重，目前全球患病率超过 25%，高危人群患病率超过 60%^[16]。且该疾病可从简单的 NAFLD 发展为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和肝脏纤维化，最终可发展为肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[3]。NAFLD 及其相关合并症和并发症复杂多样，目前，西医治疗 NAFLD 主要依靠保肝降酶、降脂、抗氧化等，中医药基于辨证论治用药，对该病有明确的疗效^[17]。中医认为 NAFLD 的病机是肝气失疏、脾失健运。补气消脂方是由白术、蜜黄芪、虎杖、丹参、姜黄、山楂、郁金七味中药组成的方剂，主要运用于以脾虚

为主的 NAFLD。黄芪为君药，以益气补中、补脾气为主；白术为运脾药，以补气健脾为主；丹参能够活血，抗脂质过氧化；郁金主要功效为疏肝行气解郁；姜黄辛温相合，外能散风寒，内能行气血，能胜寒湿，能破瘀血；虎杖以清热利湿为主；山楂能消食，通过抑制肝脏胆固醇的合成，促进肝脏对血浆胆固醇的摄入而发挥降血脂作用^[18]。在临床上，补气消脂方能改善 NAFLD 患者的血压与血脂，是治疗 NAFLD 的一种安全有效的药物。

网络药理学方法本质上是聚类算法和网络拓扑的结合。由于复杂的数据交互关系可通过可视化的节点交互来完美地呈现，因此这种方法经常被用于分析中药^[19-20]。本研究通过 TCMS 数据库找到了补气

消脂方中 98 种化合物和 229 个相应的靶点, 通过 GeneCards 数据库与 OMIM 数据库搜索得到 1 283 个 NAFLD 疾病靶点, 采取 Cytoscape 3.7.1 构建补气消脂方“活性成分-疾病靶点”的模型网络, 对补气消脂方治疗 NAFLD 的潜在靶点基因进行富集分析。从化合物到靶点再到 NAFLD 的整个治疗过程组成了一个复杂的层次交叉化合物-靶点网络。

本研究通过对补气消脂方治疗非酒精性脂肪肝的 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析结果显示, 其主要富集于 IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等信号通路。IL-17 是促炎性细胞因子, 已被确定为 NASH 发病机理的一种非侵入性标志物, 它对体内多种过程都有影响, 包括宿主防御, 组织修复, 炎症疾病的发病机理和癌症进展^[21]。IL-17 可在高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 的 NASH 小鼠模型中高表达, 静脉注射 IL-17 通过促进肝细胞凋亡加剧了脂肪性肝病的进程^[22]。胰岛素的作用涉及一系列信号转导。信号转导由胰岛素与胰岛素受体 (insulin receptor, IR) 的结合触发, 从而触发受体自磷酸化和受体酪氨酸激酶的激活, 从而形成胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 的酪氨酸磷酸化。IRS 的磷酸化导致磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 的激活, 进而导致蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 的激活, 所有这些都是刺激胰岛素诱导的葡萄糖转运的重要步骤^[23]。有研究^[24]表明, 上调肝细胞中 miR-373 的水平可以有效抑制 AKT 信号, 并可用作治疗脂肪肝变性的策略。AKT 功能障碍会导致糖脂代谢紊乱, 进一步改变激酶或其他调节糖脂代谢的相关信号分子的下游功能^[25]。AKT 激活不仅参与葡萄糖代谢, 还能够调节低密度脂蛋白受体的表达^[26]。因此, AKT 信号通路与脂质代谢的调节密切相关。

通过 TCMSP 数据库搜索以及分子对接验证, 补气消脂方的主要活性成分有槲皮素、木犀草素、丹参酮 II A、山柰酚、柚皮素、异鼠李素等, 其中槲皮素、木犀草素均为黄酮类。目前, 已发现类黄酮对 NAFLD 中一些最重要的病理生理途径包括脂质代谢、胰岛素抵抗、炎症和氧化应激具有积极作用^[27]。槲皮素的抗氧化作用主要表现为保护血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VECs), 增加一氧化氮 (NO) 和总抗氧化力 (total antioxidant capacity, T-AOC)^[28]。槲皮素不仅具有抗氧化的作用, 还具有降血压、降血脂及抗血栓等作用^[29]。槲皮素能够调节肝

脏内脂质积累, 调节脂质代谢基因表达、细胞色素 P450 2E1 (cytochrome P450 2E1, CYP2E1) 依赖性脂质过氧化作用和相关脂质毒性, 从而降低胰岛素抵抗和 NAFLD 活性评分^[30]。已证明槲皮素具有降低大鼠胰腺组织病理学损伤中 RNA 的表达和 MAPK、TNF- α 、IL-6 及 IL-1B 的蛋白水平^[31]。临床研究^[32]表明, 木犀草素可有效改善乙醇诱导的肝脏脂肪变性和肝脏受损。黄酮诱导的各种综合效应表明, 木犀草素有助于控制 NAFLD 和心血管风险^[33]。丹参酮 II A 可显著降低肝脏脂肪堆积和血浆脂肪水平, 可抑制肝细胞凋亡, 可以通过靶向 PPAR-c 和 TLR4 改善 NAFLD, 从而达到降低血浆脂质和氧化应激的作用^[34]。山柰酚可以激活 PPAR α 和 PPAR δ , 通过蛋白激酶 B 减少 TG 的积累肝脏, 可与 PPAR α 结合刺激 FA 氧化信号抑制脂肪形成转录因子的积累和脂肪细胞中的脂质^[35-36]。柚皮苷可以降低脂质过氧化和蛋白质羰基化的生物指标, 提高抗氧化剂的防御能力, 清除活性氧, 调节与脂肪酸代谢相关的信号通路, 使细胞有利于脂肪酸氧化, 减少脂质积累^[37]。异鼠李素可以使罗格列酮 (一种 PPAR γ 激动剂) 诱导的脂肪细胞分化降低, 并减少由高脂饮食和瘦素缺乏引起的肥胖和肝脏脂肪变性的发展^[38]。

补气消脂方可直接作用于 IL-6、CXCL8、STAT3、AKT1、RELA、FOS 等靶基因。研究发现, IL-6 是一种炎症介质, 不仅对于肝脏受损, 包括诱导炎症和肿瘤发生、调节免疫反应和支持造血等方面有明显作用, 具有保护作用 and 促炎作用^[39-41], 对于肝脏受损有良好的改善作用。AKT1 主要在细胞凋亡和葡萄糖代谢等细胞过程中发挥作用。AKT1 属于 AKT 家族, 能够通过调节生物功能, 如细胞存活、增殖、代谢和生长, 来影响癌症的生长^[42-43]。AKT 通过各种信号通路, 尤其是可通过 PI3K/AKT 信号通路参与多种类型癌症的治疗^[44]。且越来越多的证据表明, PI3K/AKT 信号通路是癌症中最常激活的信号转导通路之一, 涉及细胞周期、细胞增殖、生长、血管生成和凋亡^[45-47]。抑制 AKT 信号通路可降低 NAFLD 患者的肝组织脂肪变性程度, 从而使肝脏炎症状况改善。STAT3 是经典的转录因子, 可介导细胞之间的信号转导。它通过 Tyr705 的磷酸化激活, 易位至细胞核, 并与靶基因结合。作为转录因子, 它主要调节细胞凋亡, 中间代谢和免疫炎症反应; 作为各种炎症疾病的关键介质, STAT3 有助于 NF- κ B 的激活并上调多种促炎介质, 而炎症介质中的 IL-6

则激活 STAT3^[48]。STAT3 为有希望治疗肿瘤的靶点,对肿瘤细胞的增殖和存活起着重要作用,它在基质细胞(包括免疫细胞)中也起着至关重要的作用,这些细胞集中到肿瘤微环境中以促进肿瘤进展^[49]。它不仅影响多种癌症相关基因的表达,而且在许多致癌信号途径的转导中也发挥着作用^[50]。作为炎症和自噬的重要介质,STAT3 在肝脏的发病中起到重要的调节作用。RELA 也称为转录因子 P65,其中 NF- κ B 在起作用,而体内的 NF- κ B 通路可以促进肝星状细胞的生长同时也会释放炎症因子,使肝纤维化加速形成^[51]。控制 NF- κ B 通路的传导,可以减轻肝脏的炎症,减轻肝脏损伤^[52]。CXCL8 在主动脉组织中有高度表达,CXCL8 可以促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发展,CXCL8 的低表达可以延迟脉粥样硬化的发展^[53]。有研究^[54]表明,即使在代谢综合征和混杂疾病(高血压,糖尿病,心血管疾病和血脂异常)的情况下,NAFLD 患者也更容易发生脉粥样硬化。而抑制脉粥样硬化的发展,对于 NAFLD 患者的治疗是必不可少的。由此可知,补气消脂方治疗 NAFLD 的核心靶点参与了炎症反应、细胞凋亡以及代谢、免疫调节等方面。

综上所述,本研究旨在从网络药理学以及分子对接的角度分析补气消脂方治疗 NAFLD 的作用机制。结果表明,补气消脂方治疗 NAFLD 的主要活性成分可能为槲皮素、木犀草素、丹参酮 IIA、山柰酚、柚皮素、异鼠李素等,涉及的主要靶点有 IL-6、CXCL8、STAT3、AKT1、RELA、FOS,可能主要通过 IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等多条信号通路发挥治疗 NAFLD 的作用。本研究为补气消脂方进一步的实验验证以及临床上的应用提供了方向,为后续深入研究提供了理论依据。然而,这项研究也有不足之处,仅限于数据挖掘和数据分析,后续还需对活性成分、核心靶点进行实验验证,以明确补气消脂方治疗 NAFLD 的机制。

参考文献:

- [1] LOOMBA R, SANYAL A J. The global NAFLD epidemic[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2013, 10(1): 686-690.
- [2] 施晓敏, 吴朝明. 非酒精性脂肪肝病与2型糖尿病的相互作用机制研究进展[J]. *温州医科大学学报*, 2021, 51(1): 75-79.
- [3] 段文丽, 赵淑珍, 赵莉. 非酒精性脂肪性肝病的发病机制及其治疗研究进展[J]. *武警后勤学院学报*, 2019, 28(8): 79-84.
- [4] 韩伟佳, 刘霜, 段钟平, 等. 非酒精性脂肪性肝病中肝细胞脂肪变性分子机制的研究[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2018, 27(10): 1103-1109.
- [5] MAURICE J, MANOUSOU P. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Clinical medicine*, 2018, 18(3): 245-250.
- [6] 王丽娟, 孙苗芳. 非酒精性脂肪肝病运动疗法的研究进展[J]. *中华护理杂志*, 2014, 49(5): 588-592.
- [7] 杨雷雷, 李昌平. 非酒精性脂肪肝病的诊治进展[J]. *现代临床医学*, 2020, 46(1): 73-76, 80.
- [8] 陈峰. 逍遥散加减治疗肝郁脾虚型非酒精性脂肪性肝炎33例[J]. *福建中医药*, 2010, 41(3): 43.
- [9] 李少东, 李红山, 冯琴, 等. 脂肪肝中医证型分类的文献分析[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2006, 16(4): 255-257.
- [10] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [11] 邓燕君, 刘博文, 贺桢翔, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物研究[J]. *中草药*, 2020, 51(5): 1113-1122.
- [12] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMS: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminformatics*, 2014, 6(1): 13.
- [13] 田叶红, 赵建新, 邹超, 等. 基于网络药理学探索半夏泻心汤治疗胃癌的作用机制[J]. *辽宁中医杂志*, 2021, 48(1): 147-152, 221-222.
- [14] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCHIETTECATTE F, et al. OMIM.org: online Mendelian inheritance in man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D789-D798.
- [15] SAFRAN M, DALAH I, ALEXANDER J, et al. Gene cards version 3: the human gene integrator[J]. *Database(Oxford)*, 2010; baq020.
- [16] RUISSEN M M, MAK A L, BEUERS U, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a multidisciplinary approach towards a cardiometabolic liver disease[J]. *European journal of endocrinology*, 2020, 183(3): R57-R73.
- [17] 何亚伦, 王国栋, 彭浩. 393例非酒精性脂肪肝患者的中医体质分布特点分析[J]. *江西中医药*, 2019, 50(7): 45-47.
- [18] 于蓓蓓, 闫雪生, 孙丹丹. 山楂药理作用及其机制研究进展[J]. *中南药学*, 2015, 13(7): 745-748.
- [19] 陈娟, 顾俊菲, 汪春飞, 等. 组分结构中药与网络药理学: 病理机制网络的系统整体调控[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(4): 758-764.
- [20] 吴钉红. 网络药理学及其在中药领域的研究概述[J]. *广州化工*, 2017, 45(11): 216-218.
- [21] 丁梦梦, 高沿航. IL-17信号通路在酒精相关性肝癌发生、发展中的作用[J]. *肝脏*, 2020, 25(6): 562-564.
- [22] PAN Y J, REN X, ZHANG Y Y, et al. IL-17A-mediated ERK1/2/p65 signaling pathway is associated with cell apoptosis after non-alcoholic steatohepatitis[J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(3): 302-309.
- [23] BESSONE F, RAZORI M V, ROMA M G. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression[J]. *Cellular and molecular life sciences*, 2019, 76(1): 99-128.
- [24] LI C H, TANG S C, WONG C H, et al. Berberine induces miR-373 expression in hepatocytes to inactivate hepatic steatosis associated AKT-S6 kinase pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018,

- 825: 107-118.
- [25] UKO N E, GÜNER O F, MATESIC D F, et al. Akt Pathway Inhibitors[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2020, 20 (10): 883-900.
- [26] PENG J, LI Q, LI K, et al. Quercetin improves glucose and lipid metabolism of diabetic rats: involvement of Akt signaling and SIRT1 [J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 3417306.
- [27] 王灵芳, 韩淇安, 杨沁南, 等. 类黄酮防治非酒精性脂肪肝的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(24): 391-396.
- [28] 黄海艳, 邹彦芬. 槲皮素抗氧化作用研究新进展[J]. *中国中西医结合皮肤性病杂志*, 2020, 19(1): 104-106.
- [29] 梁艳玲, 蒋威. 槲皮素的心血管保护作用研究进展[J]. *解剖学研究*, 2018, 40(5): 444-448.
- [30] 张超, 李昌平. 槲皮素治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2015, 26(5): 718-721.
- [31] CHEN S, JIANG H, WU X, et al. Therapeutic effects of quercetin on inflammation, obesity, and Type 2 diabetes[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 9340637.
- [32] 权彦, 李小蓉, 赵忠孝, 等. 木犀草素对急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. *西部中医药*, 2018, 31(6): 20-23.
- [33] 孙寒寒, 王兆丹, 孙桂菊, 等. 木犀草素对高血脂症SD大鼠肝脏脂肪变性及其抗氧化水平的影响[J]. *食品工业科技*, 2019, 40 (11): 308-312, 317.
- [34] 张谊, 王立晖, 王惠霞, 等. 丹参酮 II A 在肝脏疾病中的作用及其新剂型的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(5): 596-599.
- [35] HOANG M H, JIA Y, MOK B, et al. Kaempferol ameliorates symptoms of metabolic syndrome by regulating activities of liver X receptor- β [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(8): 868-875.
- [36] LEE B, KWON M, CHOI J S, et al. Kaempferol isolated from *Nelumbo nucifera* inhibits lipid accumulation and increases fatty acid oxidation signaling in adipocytes[J]. *J Med Food*, 2015, 18 (12): 1363-1370.
- [37] 金元宝, 刘萍, 刘小根, 等. 柚皮苷的生物活性研究进展[J]. *中国现代医药杂志*, 2018, 20(3): 92-97.
- [38] 滕丹, 栾新尧. 异鼠李素的药效学研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2016, 28(4): 593-596.
- [39] 张伟洁, 郑宏. IL-6介导免疫炎症反应作用及其与疾病关系的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(5): 699-703.
- [40] BRAUNERSREUTHER V, VIVIANI G L, MACH F, et al. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18(8): 727-735.
- [41] 王改平, 李晓芳, 陈莎莎, 等. 肝脏炎症反应与肝再生关系的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(8): 1115-1119.
- [42] 陈凡, 叶俊梅, 张玉彬. Akt在心血管疾病中的调控作用[J]. *药学研究*, 2018, 37(5): 291-294, 297.
- [43] 赵艳梅, 张建康, 蔡兆斌, 等. Akt抑制剂的临床研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(4): 625-630.
- [44] YANG L, WANG Q L, LI S, et al. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by downregulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 2019, 43(5): 575-584.
- [45] 余涛, 俞万钧, 王华英. PI3K/AKT信号通路在非小细胞肺癌中作用的研究进展[J]. *中国临床研究*, 2021, 34(2): 248-250, 254.
- [46] 宋艳玲, 韩鹏敏, 杜新春, 等. 抑制PI3K信号通路的抗肿瘤天然药物研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(6): 1156-1160.
- [47] 仇志富, 颜勇, 吴晓光. PI3K/Akt信号转导通路神经细胞凋亡研究进展[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2015, 32(10): 952-953.
- [48] 郑培永, 张莉, 柳涛, 等. 下丘脑STAT3在非酒精性脂肪性肝病大鼠发病中的作用及降脂颗粒的干预[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(8): 753-757.
- [49] YU H, LEE H Y, HERRMANN A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(11): 736-746.
- [50] 音金萍, 岳紫晨, 卓少元. STAT3: 慢性炎症介导肝癌进程的关键分子[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(4): 948-952.
- [51] GARCÍA-COMPEÁN D, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ J A, LAVALLE-GONZÁLEZ F J, et al. Current concepts in diabetes mellitus and chronic liver disease: clinical outcomes, hepatitis c virus association, and therapy[J]. *Digestive diseases and sciences*, 2016, 61(2): 371-80.
- [52] 周姗姗, 鄢素琪, 熊小丽, 等. 补骨脂抑制肝组织NF- κ B活性治疗幼龄小鼠脂肪肝的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (13): 2546-2551.
- [53] 周小明, 邓桂明, 龙云, 等. CXCL8对小鼠动脉粥样硬化发生发展的影响及其分子机制研究[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20 (6): 1057-1060.
- [54] GAGGINI M, MORELLI M, BUZZIGOLI E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease[J]. *Nutrients*, 2013, 5(5): 1544-1560.

(编辑: 修春)