

基于网络药理学方法初探葛花解酒涤脂汤抗酒精性脂肪肝作用

吴雪莉¹,冯 晓²,郝 杰¹,易 旭²

摘要 目的 基于网络药理学方法初探葛花解酒涤脂汤(GJDD)治疗酒精性脂肪肝(AFLD)的潜在活性化合物及其可能的作用靶点。方法 建立 GJDD 药物-化合物数据集、化合物-靶点数据集、AFLD 靶点数据集,构建 GJDD 抗 AFLD 的“中药-化合物-靶点”交互网络图,并通过 Cytoscape 软件对网络进行分析,初探 GJDD 抗 AFLD 的潜在活性化合物及其可能的作用靶点。结果 GJDD 可能作用于 PIK3CA、PIK3R1、MAPK1、APP 等靶点,并通过炎症相关信号通路、激素相关通路、凋亡相关信号通路等多条通路达到其治疗目的。结论 该研究通过网络药理学再次肯定了 GJDD 治疗 AFLD 的有效性,为进一步研究 AFLD 发生及 GJDD 干预作用机制提供重要指导。

关键词 葛花解酒涤脂汤;酒精性脂肪肝;网络药理学;作用靶点;活性化合物

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0260-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.018

酗酒是世界范围内肝脏疾病的主要原因之一。大量乙醇摄入会加速肝脏脂肪生成、促进脂肪酸从血液进入肝脏,使脂蛋白滞留肝脏,肝细胞线粒体对脂肪酸的氧化功能减退、肝脏对脂肪消耗减少等不良作用,进而引起肝脏细胞损伤,导致酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver disease, AFLD)。

课题组经过长期临床积累,根据 AFLD 辩证论治、遣方用药的经验加以归纳总结,自拟出由葛花、葛根、白茯苓、绵茵陈、小青皮、甘草、决明子、山楂和明矾组成的葛花解酒涤脂汤,前期动物实验^[1-2]已

表明该方对酒精性脂肪肝有明显的治疗作用。但由于中药成分的多样性和作用机制多靶点、多环节等特点,葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 的主要作用机制仍不明确。与中医整体观念一致的网络药理学能系统地、整体地揭示疾病-疾病、疾病-靶点蛋白、靶点蛋白-药物、药物-药物之间的联系。近年来,网络药理学已被逐渐应用中医药研究中,对进一步发现药效物质、探索分子作用机制和阐释其科学内涵具有重要的价值^[3]。该研究运用网络药理学的方法初探葛花解酒涤脂汤治疗酒精性脂肪肝的潜在活性化合物及其可能的作用靶点,以期对葛花解酒涤脂汤后续的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 中药-化合物数据集的建立 自中国传统医学百科全书(the encyclopedia of traditional chinese medicine, ETCM, <http://www.nrc.ac.cn:9090/ETCM/>)和 SymMap(<https://www.symmap.org>)数据库对葛花解酒涤脂汤中所含 9 味中药进行化合物筛选。化合物的筛选条件为:ETCM 数据库中“Druglikeness Grading”为“Moderate”或“Good”;SymMap 数据库中口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%。选取符合条件的化合物作为候选化合物,建立中药-化合物数据集。

1.2 化合物-靶点数据集的建立 根据 1.1 中筛选得到的候选化合物的 CAS 号或 PubChem ID,于 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)查找化合物对应的“Canonical SMILES”结构。将化合物的该结构输入 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>),限定物种为人(Homo sapiens),依据成分的“Canonical SMILES”结构进行靶点预测,选取“Probability”大于 0 的靶点作为化合物对应的靶点,建立葛花解酒涤脂汤化合物-靶点数据集。

1.3 疾病数据集建立 以“alcoholic fatty liver”为检索词,于 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org>)获取 AFLD 相关靶点,建立 AFLD 靶点数据集。

2021-10-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660752);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(编号:QZYY-2019-055);贵州省教育厅自然科学研究项目(编号:黔教合 KY 字〔2015〕372 号);贵州中医药大学科研项目(编号:贵中医科学院〔2019〕37 号)

作者单位:¹ 贵州中医药大学第二附属医院中心实验室,贵阳 550003

² 贵州中医药大学第二临床医学院,贵阳 550025

作者简介:吴雪莉,女,硕士,技师;

易 旭,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: yixu2013@yeah.net

1.4 药物-靶点-疾病数据集建立 通过 Venny 2.1 (<https://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), 将 1.2 中化合物-靶点数据集与 1.3 中 AFLD 靶点数据集进行映射, 得到葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 的作用靶点。

1.5 葛花解酒涤脂汤-靶点-AFLD 的 PPI 网络构建与分析 将映射后获得的葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 作用靶点经 STRING 数据库 (<https://string-db.org>) 分析获得蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 设置最低相互作用阈值为“High confidence(0.900)”, 其它参数均保持默认设置。随后将结果导入 Cytoscape (3.6.0) 软件构建葛花解酒涤脂汤靶点-AFLD 的 PPI 网络。运用 Cytoscape 软件中 Network Analyzer 分析葛花解酒涤脂汤-靶点-AFLD PPI 网络的自由度, 根据自由度筛选核心靶点, 将自由度 > 50 的靶点纳入筛选范围。

1.6 核心靶点生物功能和通路富集分析 运用 Cytoscape (3.6.0) 软件中的 ClueGo 插件对筛选得到的葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 核心靶点进行 GO 功能富集, 以了解方药可能的功能涉及。再结合 KEGG 通路富集分析, 拟获得方药治疗 AFLD 的相关信号通路。富集条件均设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 葛花解酒涤脂汤中候选化合物及其作用靶点筛选结果 根据候选化合物的筛选条件, 在 ETCM 和 SymMap 数据库中收集到的葛花解酒涤脂汤中候

选化合物数量分别如下: 葛花、葛根、白茯苓、绵茵陈、小青皮、甘草、决明子、山楂、明矾中分别有 74、6、6、33、13、49、15、4、1 个候选化合物。共计 201 个候选化合物。

在 Swiss Target Prediction 数据库中筛选出 201 个候选化合物对应靶点, 依据成分的 Canonical SMILES 结构进行靶点预测, 去除重复项后筛选出 900 个靶点作为葛花解酒涤脂汤的预测靶点。将所得的葛花解酒涤脂汤预测靶点与 GeneCards 数据库获取的 3 763 个 AFLD 相关靶点相映射, 筛选出葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 的候选作用靶点 575 个 (图 1)。

2.2 PPI 网络分析及葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 潜在活性化合物筛选结果 将葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 的 575 个候选作用靶点导入 String 数据库, 建立 PPI 网络数据。此网络共有 575 个节点, 3 841 条边, 网络平均节点数 13.4。通过 Cytoscape 软件, 对该 PPI 网络进行分析, 结果显示其中自由度 > 50 的靶点共有 17 个, 选取这 17 个靶点作为葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 的核心预测靶点 (表 1)。其中自由度 > 80 的靶点为 *PIK3CA*、*PIK3R1*、*MAPK1* 和 *APP*, 该结果表明葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 主要涉及 *PIK3CA*、*PIK3R1*、*MAPK1* 和 *APP* 四个关键靶点。这四个关键靶点涉及葛花解酒涤脂汤中的 66 个候选化合物, 中药-候选化合物-靶点网络图见图 2。但这 66 个候选化合物中, 因部分化合物暂无法分离得到单体, 因此葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 的潜在活性化合物共有 19 个 (表 2)。

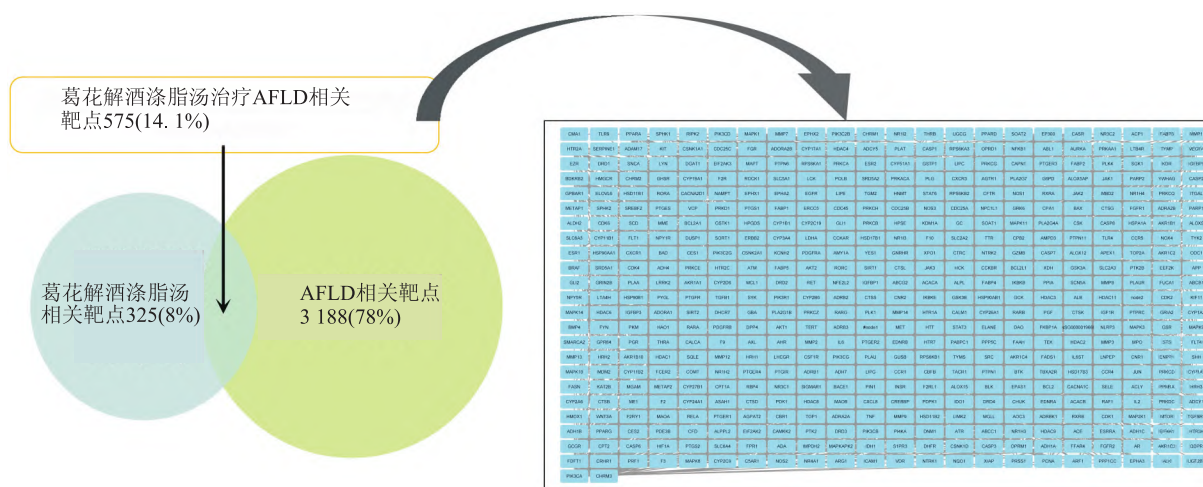


表1 葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 的核心预测靶点

编号	基因	靶点蛋白	Uniprot 数据库 基因编号	自由度	来源
1	<i>PIK3CA</i>	PI3-kinase p110-alpha subunit	P42336	93	葛花、绵茵陈、小青皮、甘草、决明子
2	<i>PIK3R1</i>	PI3-kinase p85-alpha subunit	P27986	92	葛花、绵茵陈、小青皮、甘草、山楂
3	<i>MAPK1</i>	MAP kinase p38 alpha	Q16539	85	葛花、葛根、绵茵陈、小青皮、甘草、山楂、白茯苓
4	<i>APP</i>	Beta amyloid A4 protein	P05067	83	葛花、葛根、绵茵陈、小青皮、甘草、山楂、决明子
5	<i>SRC</i>	Tyrosine-protein kinase SRC	P12931	78	葛花、葛根、绵茵陈、小青皮、甘草、山楂、决明子
6	<i>MAPK3</i>	MAP kinase ERK1	P27361	74	葛花、绵茵陈、甘草
7	<i>AKT1</i>	Serine/threonine-protein kinase AKT	P31749	70	葛花、小青皮、绵茵陈、山楂、甘草
8	<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	P40763	65	葛花、决明子、甘草
9	<i>EP300</i>	Histone acetyltransferase p300	Q09472	61	葛花、绵茵陈、甘草
10	<i>BDKRB2</i>	Bradykinin B2 receptor	P30411	56	绵茵陈
11	<i>CASR</i>	Calcium sensing receptor	P41180	56	葛花
12	<i>HSP90AA1</i>	Heat shock protein HSP 90-alpha	P07900	53	葛花、绵茵陈、决明子、甘草
13	<i>FYN</i>	Tyrosine-protein kinase FYN	P06241	52	葛花、绵茵陈、甘草
14	<i>MAPK8</i>	c-Jun N-terminal kinase 1	P45983	51	葛花、绵茵陈、小青皮、甘草、
15	<i>PRKCD</i>	Protein kinase C delta	Q05655	51	葛花、甘草
16	<i>F2</i>	Thrombin	P00734	50	葛花、决明子、小青皮、甘草、山楂
17	<i>CXCL8</i>	Interleukin-8	P10145	50	绵茵陈、白茯苓

表2 葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 的潜在活性化合物

编号	靶点	潜在活性化合物		来源
		英文名	中文名	
1	<i>PIK3CA</i>	Liquiritigenin	甘草素	葛花、甘草
2	<i>PIK3CA</i>	Maaackiain	高丽槐素	甘草
3	<i>PIK3CA</i>	Pinoembrin	乔松素	甘草
4	<i>PIK3CA</i> , <i>APP</i>	Naringenin	柚皮素	小青皮
5	<i>PIK3CA</i>	Chrysoobtusin	黄决明素	决明子
6	<i>PIK3CA</i>	Chrysophanol	大黄酚	决明子
7	<i>PIK3CA</i>	Obtusifolin	决明蒽醌	决明子
8	<i>PIK3CA</i>	Physcion	大黄素甲醚	决明子
9	<i>PIK3R1</i>	Licoﬂavonol	甘草黄酮醇	甘草
10	<i>PIK3R1</i> , <i>MAPK1</i> , <i>APP</i>	Sinensetin	甜橙黄酮	小青皮
11	<i>PIK3R1</i> , <i>APP</i>	Quercetin	槲皮素	葛花、山楂、绵茵陈
12	<i>PIK3R1</i> , <i>APP</i>	Isorhamnetin	异鼠李素	绵茵陈
13	<i>PIK3R1</i> , <i>APP</i>	Kaempferol	山奈酚	葛花
14	<i>MAPK1</i>	Scoparone	滨蒿内酯	葛花、葛根、绵茵陈
15	<i>APP</i>	Isoliquiritigenin	异甘草素	葛花、甘草
16	<i>APP</i>	Genkwanin	芫花素	绵茵陈
17	<i>APP</i>	Coumestrol	香豆雌酚	葛花
18	<i>APP</i>	Ferulic acid	阿魏酸	葛花
19	<i>APP</i>	Genistein	染料木素	葛根

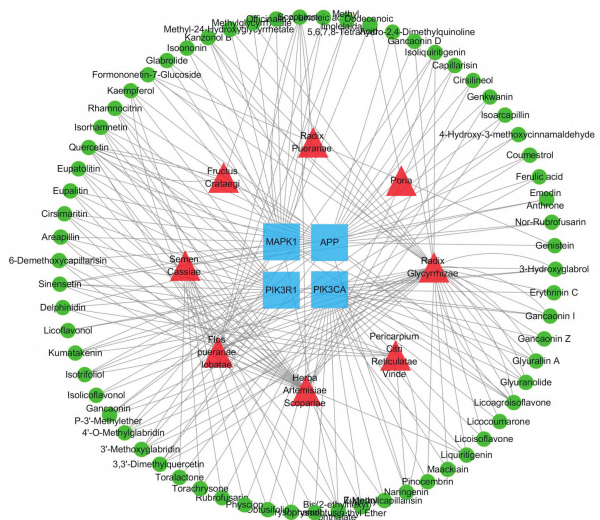


图2 中药-化合物-靶点网络图
△·中药;□·候选化合物;○·关键靶点

2.3 核心靶点的生物功能和通路富集分析 运用

Cytoscape(3. 6. 0) 软件中的 ClueGo 插件对筛选得到的葛花解酒汤治疗 AFLD 核心靶点进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析,见图4、5。在 GO 功能富集分析结果中,共确定了 46 个条目,其中与分子功能(molecular function)相关的有 6 条,涉及蛋白质磷酸化、蛋白质酪氨酸残基磷酸化、胰岛素受体底物结合、Tau 蛋白结合等分功能;与生物学过程(biological process)相关的有 40 条,其中排名前十的生物学过程主要涉及吞噬过程中免疫应答调节的细胞表面受体信号通路、吞噬过程中 $\text{Fc-}\gamma$ 受体信号通路、血管内皮生长因子受体信号通路、星形胶质细

胞分化等方面。通过 KEGG 通路富集分析,共得到 23 条相关通路,其中炎症相关通路有 7 条,激素相关通路 4 条;该结果提示葛花解酒涤脂汤治疗 AFLD 可能是通过炎症相关通路、激素相关通路、自噬、调节脂肪细胞脂解等信号通路调控。

3 讨论

在我国,酒精性肝病成为仅次于非酒精性脂肪肝的第二大导致肝硬化和肝细胞癌相关死亡的原

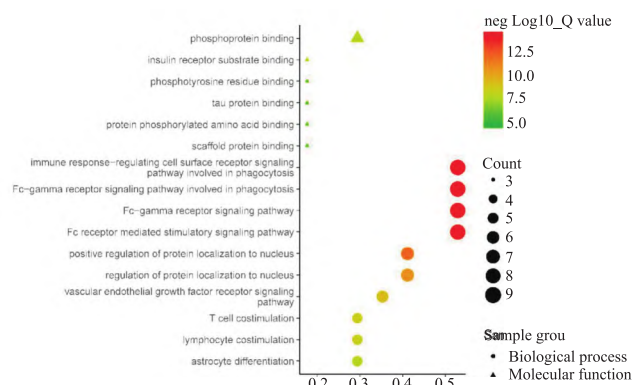


图3 GO功能富集气泡图

▲: 分子功能 (molecular function); ●: 生物学过程 (biological process)

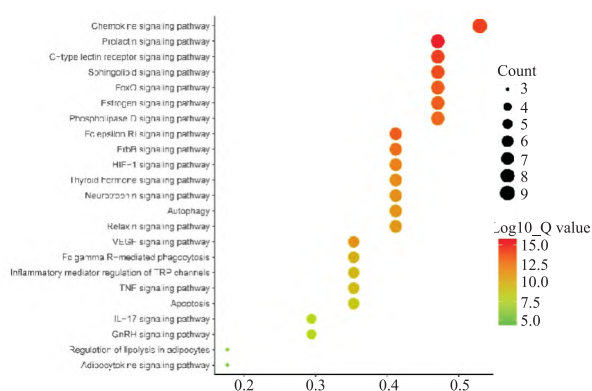


图4 KEGG通路富集气泡图

因。脂肪肝是90%以上酗酒者对过量饮酒最早的反应,是酒精性肝病发展为AFLD的重要因素。

课题组前期研究已表明^[1-2]葛花解酒涤脂汤对酒精性脂肪肝小鼠具有显著的治疗作用,但其治疗AFLD的活性物质不清且作用机制不明。如果继续沿用传统的“一个靶点,一种疾病,一个药物”的研究模式,已很难系统、整体地阐明葛花解酒涤脂汤治疗AFLD的作用机制,并且还会耗费大量的时间、精力。随着现代科技进入大数据时代,系统生物学和生物信息学等交叉学科的快速兴起,国内外学者开始从复杂网络的角度探索疾病与药物的系统性研究方式,“网络药理学”这一新学科由此开端并得到快速发展。它基于“疾病-基因-靶点-药物”相互作用的网络基础,通过分析基因网络库、蛋白网络库、疾病网络库、药物网络库等现有数据库的信息资料,结合从实验中获得的数据,利用专业网络分析软件及算法,系统、整体的揭示疾病-疾病、疾病表型-靶点蛋白、靶点蛋白-药物、药物-药物之间的联系。且网络药理学注重药物作用网络及生物网络的

整体性和系统性,关注基因、蛋白等在生物网络中的生物学地位和动力学过程,而并非对其作用单一靶标,认为药物作用的是疾病病理网络,以多维视角理解疾病和分析疾病,这一理念与中医整体观念一致。网络药理学能较好、较全面地运用于中药治疗疾病作用机制的研究,本研究采用网络药理学探索葛花解酒涤脂汤治疗AFLD的作用机制。结果显示,葛花解酒涤脂汤可能通过炎症反应相关通路、激素相关通路、凋亡相关信号通路等信号通路防治AFLD。

本研究中KEGG富集到葛花解酒涤脂汤干预AFLD的相关炎症通路共有7条,分别为Chemokine信号通路、C-type lectin receptor信号通路、Sphingolipid信号通路、FoxO信号通路、Inflammatory mediator regulation of TRP channels、TNF信号通路和IL-17信号通路。此外,还富集到凋亡、自噬和脂质代谢等通路,这些通路都可通过炎症反应发挥其在AFLD中的作用^[4-5],因此,课题组认为葛花解酒涤脂汤治疗AFLD主要是通过抗炎发挥其药效作用。已有研究表明AFLD患者体内炎症水平很高^[6],而改善肠道菌群是治疗AFLD的手段之一^[7],且这种治疗手段主要是通过抗炎发挥疗效^[8]。故而作者认为抗炎在葛花解酒涤脂汤治疗AFLD中发挥了重要作用。

另外,本研究运用网络药理学的方法对葛花解酒涤脂汤抗AFLD的潜在活性化合物进行初探。结果显示,葛花解酒涤脂汤中有19个化合物涉及PIK3CA、PIK3R1、MAPK1和APP四个核心靶点,所以作者认为这19个化合物可能是葛花解酒涤脂汤治疗AFLD的潜在活性化合物,而其中乔松素^[9]、柚皮素^[10]、大黄酚、决明子醌和大黄素甲醚^[11]、槲皮素^[12]、山奈酚^[13]、异甘草素^[14]、染料木素^[15]9个潜在活性化合物的抗AFLD活性已被相关文献证实。余下10个化合物的抗AFLD活性有待进一步研究。

综上所述,通过网络药理学的方法,从理论上不仅肯定了葛花解酒涤脂汤治疗AFLD的有效性,还揭示了葛花解酒涤脂汤抗AFLD的潜在活性化合物。这一结果为进一步研究AFLD发生及葛花解酒涤脂汤干预作用机制提供指导依据。

参考文献

- [1] 易旭,游绍伟,龙毅,等. 自拟葛花解酒涤脂汤对酒精性脂肪肝小鼠肝脏脂肪沉积及PXR表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 36-42.
- [2] 易旭,游绍伟,龙毅,等. 葛花解酒涤脂汤对酒精性脂肪肝小鼠肝脏核受体PXR, CAR表达的影响[J]. 中国实验方

- 剂学杂志, 2016, 22(22): 134–9.
- [3] Su M, Guo C, Liu M, et al. Therapeutic targets of vitamin C on liver injury and associated biological mechanisms: a study of network pharmacology[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 66:383–7.
- [4] Ilyas G, Cingolani F, Zhao E, et al. Decreased macrophage autophagy promotes liver injury and inflammation from alcohol[J]. *Alcohol: Clin Exp Res*, 2019, 43(7):1403–13.
- [5] Parker R, Kim S J, Gao B. Alcohol, adipose tissue and liver disease: mechanistic links and clinical considerations[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(1): 50–9.
- [6] 费欢欢, 张 宝, 管石侠, 等. 男性脂肪性肝病患者肠道机械屏障功能变化的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(11): 1783–7.
- [7] Wang Y, Guan M, Zhao X, et al. Effects of garlic polysaccharide on alcoholic liver fibrosis and intestinal microflora in mice[J]. *Pharm Biol*, 2018, 56(1): 325–32.
- [8] Krishnan S, Ding Y, Saedi N, et al. Gut microbiota-derived tryptophan metabolites modulate inflammatory response in hepatocytes and macrophages[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(4): 1099–111.
- [9] Guo W W, Wang X, Chen X Q, et al. Flavonones from *Penthorum chinense* ameliorate hepatic steatosis by activating the SIRT1/AMPK pathway in HepG2 Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2555.
- [10] Lin H, Zhou Z, Zhong W, et al. Naringenin inhibits alcoholic injury by improving lipid metabolism and reducing apoptosis in zebrafish larvae[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 2877–84.
- [11] Dong X, Fu J, Yin X, et al. Cassiae semen: a review of its phytochemistry and pharmacology (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2331–46.
- [12] Zhu M, Zhou X, Zhao J, et al. Quercetin prevents alcohol-induced liver injury through targeting of PI3K/Akt/nuclear factor- κ B and STAT3 signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 6169–75.
- [13] Wang M, Sun J, Jiang Z, et al. Hepatoprotective effect of kaempferol against alcoholic liver injury in mice[J]. *Am J Chinese Med*, 2015, 43(2): 241–54.
- [14] Na A, Yang E, Jeon J M, et al. Protective effect of isoliquiritigenin against ethanol-induced hepatic steatosis by regulating the SIRT1-AMPK pathway[J]. *Toxicol Res*, 2018, 34(1): 23–9.
- [15] Zhao L, Zhang N, Yang D, et al. Protective effects of five structurally diverse flavonoid subgroups against chronic alcohol-induced hepatic damage in a mouse model[J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1754.

Study on anti-alcoholic fatty liver effect of Gehua Jiejiu Dizhi Decoction based on network pharmacology

Wu Xueli¹, Feng Xiao², Hao Jie¹, Yi Xu²

(¹Central Laboratory of The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003; ²The Second Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025)

Abstract Objective To explore the potential active compounds and effect targets of Gehua Jiejiu Dizhi Decoction (GJDD) for treatment of alcoholic fatty liver disease (AFLD) based on the network pharmacology. **Methods** The GJDD drug-compound data set, compound-target data set and AFLD target data set were established, the "TCM-compound-target" interactive network diagram of GJDD anti-AFLD was constructed, and the network was analyzed through Cytoscape to explore GJDD potentially active compounds of anti-AFLD and their possible targets. **Results** GJDD might act on *PIK3CA*, *PIK3R1*, *MAPK1*, *APP* and other targets, and achieve its therapeutic purpose through multiple pathways such as inflammation-related signaling pathways, hormone-related pathways, and apoptosis-related signaling pathways. **Conclusion** Through network pharmacology, this study confirms the effectiveness of GJDD in the treatment of AFLD, and provides important guidance for improving the occurrence of AFLD and the research on the intervention mechanism of GJDD.

Key words Gehua Jiejiu Dizhi Decoction; alcoholic fatty liver disease; network pharmacology; targets; active compounds