

基于网络药理学及计算机辅助药物设计研究护肝宁片治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制

陈 聪, 周香辉, 张 兵, 彭彦芬, 杨新平, 余启明*, 谭相端*

(桂林医学院药学院, 广西 桂林 541199)

摘要: 基于网络药理学与计算机辅助药物设计探讨护肝宁片 (Huganning tablet, HGNP) 治疗非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的作用机制。通过 TC MSP 数据库、Swiss Target Prediction 数据库、中国药典 (2015 版) 及文献检索确定 HGNP 的潜在活性成分及作用靶点, 并借助 GeneCards 数据库检索到的 NAFLD 疾病相关靶点进行交集整合, 获取 HGNP 治疗 NAFLD 的潜在作用靶点。运用 R 软件中 bioconductor 生物信息软件包对潜在作用靶点进行 GO (gene ontology) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集分析, 利用 Cytoscape 软件构建出“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络, 整体探究潜在活性成分与关键靶点、通路、疾病间的关联。基于上述分析结果, 采用 Discovery Studio 2020 软件将 HGNP 中的潜在活性成分与网络图中度值排名靠前的关键靶点进行分子对接分析, 并进行分子动力学模拟、结合自由能计算、类药性分析和 ADMET 性质预测。体外实验使用 HepG2 细胞构建脂肪变性模型, 根据细胞油红 O 染色与甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量检测实验, 验证 5 个关键化合物对肝细胞脂肪变性的改善作用。筛选获得 141 个潜在活性成分和 151 个潜在作用靶点, 通过 GO 和 KEGG 富集分析, 分别得到 2 526 个条目和 151 条通路。分子对接结果显示, 异鼠李素 (isorhamnetin)、丹酚酸 B (salvianolic acid B)、大黄素 (emodin)、白藜芦醇 (resveratrol)、大黄酸 (rhein) 5 个成分与关键靶点 [维甲酸受体 RXR- α (retinoic acid receptor RXR-alpha, RXRA)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、糖原合酶激酶 (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3B)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine-protein kinase 1, AKT1)] 显示出较强的结合能力, 推测为 HGNP 治疗 NAFLD 的关键化合物。根据分子动力学模拟学模拟和结合自由能计算结果, 进一步验证了异鼠李素、丹酚酸 B 与关键靶点的结合具有较好的结构稳定性及结合亲和力。通过类药性分析与 ADMET 性质预测结果, 更全面地分析 5 个关键化合物的类药性、药代动力学性质及毒性。体外实验表明, 异鼠李素、丹酚酸 B、大黄素、白藜芦醇、大黄酸均能改善 HepG2 细胞的脂肪变性情况, 证实了本研究的可靠性。综上, 本研究基于网络药理学、计算机辅助药物设计和体外实验验证, 在多层面上探讨了 HGNP 治疗 NAFLD 的作用机制, 为其临床应用提供依据。

关键词: 护肝宁片; 非酒精性脂肪性肝病; 网络药理学; 计算机辅助药物设计; 作用机制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)03-0695-16

Research of the mechanism of Huganning tablet in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease based on network pharmacology and computer-aided drug design

CHEN Cong, ZHOU Xiang-hui, ZHANG Bing, PENG Yan-fen, YANG Xin-ping, YU Qi-ming*, TAN Xiang-duan*

(College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract: In this study, we explored the mechanism of Huganning tablet (HGNP) in the treatment of

收稿日期: 2022-09-07; 修回日期: 2022-10-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060627); 广西自然科学基金项目 (2020GXNSFAA159149); 广西研究生教育创新计划项目 (YCSW2022367).

*通讯作者 Tel: 86-773-2303428, E-mail: qm_yu19@glmc.edu.cn; tandy@glmc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1046

nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) based on network pharmacology and computer-aided drug design. Firstly, the potential ingredients and targets of HGNP were identified from TCMSP database, Swiss Target Prediction database, Chinese pharmacopoeia (2015) and literatures, and then the targets of HGNP intersected with NAFLD disease targets that obtained in GeneCards database to acquired potential targets. The bioconductor bioinformatics package of R software was used for gene ontology (GO) enrichment and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. The network of “potential ingredient-key target-pathway” was formed in Cytoscape software to study the interactions between potential ingredients of HGNP, key targets, pathways and NAFLD. Based on the results of network pharmacology, the molecular docking analysis of the key targets and potential active ingredients in HGNP tablets with top degree in the network was conducted using Discovery Studio 2020 software, followed by molecular dynamics simulations, binding free energy calculation, drug-likeness properties analysis and ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) properties prediction. *In vitro*, HepG2 cells were used to establish steatosis model, and the effects of five key compounds on hepatocyte steatosis were analyzed by oil red O staining and triglyceride (TG) content determination. The results showed that 141 ingredients and 151 potential targets were obtained. A total of 2 526 items and 151 pathways were identified by GO and KEGG enrichment analysis. The molecular docking suggested that five components, isorhamnetin, salvianolic acid B, emodin, resveratrol and rhein, exhibited strong binding ability with key targets [retinoic acid receptor RXR-alpha (RXRA), tumor necrosis factor (TNF), glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3B), serine/threonine-protein kinase 1 (AKT1)]. It was further verified that isorhamnetin and salvianolic acid B bind to key targets with good structural stability and binding affinity based on molecular dynamics simulations and binding free energy calculations. The drug-likeness properties, pharmacokinetic properties and toxicity of five key compounds were more comprehensively analyzed through drug-likeness properties analysis and ADMET properties prediction. *In vitro*, all five compounds, isorhamnetin, salvianolic acid B, emodin, resveratrol, and rhein, improved hepatocyte steatosis of HepG2 cells, confirming the reliability of the present study. In conclusion, based on network pharmacology, computer-aided drug design and *in vitro* validation, this study investigated the mechanism of HGNP for the treatment of NAFLD at multiple levels and provided a basis for its clinical application.

Key words: Huganning tablet; nonalcoholic fatty liver disease; network pharmacology; computer-aided drug design; mechanism

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指并非由长期大量饮酒和其他明确的损肝因素所引起的, 以肝细胞中脂质蓄积为病理改变的肝脏代谢性疾病^[1]。NAFLD 患者由于肝脏代谢功能紊乱, 会导致大量脂质蓄积于肝细胞中 (单纯性脂肪肝), 从而引起脂肪变性、肝细胞损伤、非酒精性脂肪性炎症、肝硬化、肝纤维化等一系列病理现象产生^[2]。随着人们生活水平的不断提高, NAFLD 发病率逐年上升, 已成为全球最常见的慢性肝病, 在中国也已超过慢性乙型肝炎成为第一大慢性肝病^[3]。目前 NAFLD 的发病机制尚不完全清楚, 临床药物治疗如二甲双胍、吡格列酮等, 主要是针对 NAFLD 相关的代谢综合征、2 型糖尿病、心血管疾病等方面, 而对患者并存的非酒精性脂肪性肝炎及肝纤维化均无肯定的治疗效果^[4]。因此, 研究治疗 NAFLD 的中药复方, 从调血脂、抗氧化、抗炎、抗纤维化、改善胰岛素抵抗等多方面改善 NAFLD, 被认为是可行的治疗方案^[5]。

护肝宁片 (Huganning tablet, HGNP) 由虎杖

(*Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*)、垂盆草 (*Sedum sarmentosum* Bunge)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)、灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 4 味中药组成, 其中虎杖清热解毒、利湿退黄、化痰散瘀, 垂盆草利湿退黄, 丹参活血祛瘀、理气止痛, 灵芝补益肝肾、益气养血, 四药合用可共奏清热利湿、保肝退黄、活血化瘀、理气止痛之功效, 是治疗各种急、慢性肝炎的常用中成药, 能显著改善急、慢性肝炎患者的肝功能和临床症状^[6]。近年研究发现, HGNP 在治疗 NAFLD 方面亦有不错疗效, 可改善 NAFLD 患者的血脂、肝功能等生化指标及肝脏超声影像学, 且具有较好安全性^[7]。基础研究显示, HGNP 能改善 NAFLD 模型大鼠肝组织的脂肪变性、氧化应激、炎症和纤维化, 但其治疗 NAFLD 的具体作用机制尚未研究清楚^[8]。网络药理学是从生物网络的整体角度阐释疾病机制和药物作用机制的新兴学科, 其研究理念契合传统中医药的整体论理念。运用网络药理学, 构建中药复方成分、靶点、通路、疾病间的整体作用网络, 可系统预测药物治疗疾病的作用机制^[9]。计算机

辅助药物设计 (computer-aided drug design, CADD) 是在合理药物设计探索中迅速发展起来的一种新药研究与开发技术, 其以计算机为工具, 充分利用已有的相关药物和靶标的知识, 通过理论计算、模拟和预测来指导和辅助人们在药物发现、药物作用机制等方面的研究^[10]。

本研究利用网络药理学方法, 对 HGNP 的化学成分、靶点进行数据挖掘, 构建出“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络, 并结合计算机辅助药物分子设计与体外实验验证, 探究 HGNP 治疗 NAFLD 的作用机制, 为阐明 HGNP 的药效提供思路和方法。

材料与方 法

数据库与软件 TCMSP 数据库 (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>), Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), CNKI 数据 (<https://www.cnki.net/>), PubMed 数据库 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>), GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>), Venny 2.1 在线软件作图工具平台 (<https://bioinfopg.cnb.csic.es/tools/venny/>), pkCSM 数据库 (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>), Cytoscape 3.9.0 软件, R. 4.1.2 软件, Discovery Studio 2020 软件, Gromacs 软件和 g_mmpbsa 软件。

HGNP 的潜在活性成分与靶点的获取 在 TCMSP 数据库中, 以 HGNP 的药材垂盆草、灵芝、丹参、虎杖为关键词进行检索, 对检索到的成分通过口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为标准进行筛选, 得到其潜在活性成分。为避免 HGNP 中关键的活性成分被上述条件筛去, 通过查阅中国药典 (2015 版)、CNKI 数据库与 PubMed 数据库中相关文献补充 4 味药材中的主要成分或具有明确药理活性的活性成分, 将补充成分整合到 TCMSP 数据库的筛选结果中。从 TCMSP 数据库中下载 HGNP 靶点信息, 并通过 Swiss Target Prediction 数据库对缺乏靶点信息的化合物进行靶点预测, 整合去重后获得 HGNP 靶点。

HGNP 治疗 NAFLD 的潜在靶点的获取 采用 GeneCards 数据库, 物种设置为“homo sapiens”, 输入关键词“nonalcoholic fatty liver disease”进行检索, 整合去重后获得 NAFLD 相关靶点。在 Venny 2.1 在线软件作图工具平台上分别导入 HGNP 的药物靶点与 NAFLD 相关靶点, 绘制韦恩图, 两者的交集靶点即为 HGNP 治疗 NAFLD 的潜在靶点。

潜在靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路分析 为深入了解 HGNP 治疗 NAFLD 的潜在靶点的功能及在信号通路中的作用, 应用 R.4.1.2 软件中的 bioconductor 生物信息软件包对潜在靶点进行 GO (gene ontology) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集分析, 分析结果以 $P < 0.05$ 作为筛选条件, 并通过微生物信作图网站进行可视化处理。

“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络的构建 为更直观地观察中药的潜在活性成分与关键靶点、通路间的关联, 将“潜在活性成分-关键靶点”、“关键靶点-通路”间的相互关系列于表格中, 然后将其导入 Cytoscape 软件中建立“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络关系图。利用 Network Analyzer 功能对网络进行拓扑学分析, 根据关键靶点的度值 (degree) 进行排序, 排名前 4 位的靶点将用于后续的分 子对接验证。

分子对接 采用 Discovery Studio 2020 软件构建关键靶点的分子对接模型, 与 HGNP 的潜在活性成分进行分子对接, 验证研究的可靠性, 并筛选出与关键靶点结合较好的成分。从 PDB 数据库下载关键靶点的蛋白晶体结构, 为保证对接的精度, 优先选择分辨率小于 3 Å 并包含共晶配体的晶体复合物。使用 Discovery Studio 2020 中 Prepare Protein 工具对蛋白进行除水、加氢等预处理。从 PubChem 数据库中下载 HGNP 潜在活性成分的结构, 导入 Discovery Studio 2020 后通过 Prepare Ligand 工具对潜在活性成分的进行结构优化。随后, 将关键靶点与潜在活性成分通过 CDOCKER 进行分子对接, 采用打分函数-CDOCKER ENERGY 对分子对接的结果进行评价。

分子动力学模拟 使用 Gromacs 软件进行分子动力学模拟研究, 进一步分析关键化合物与关键靶点间的结合稳定性及结合亲和力。采用 GROMOS96 立场产生蛋白质-配体复合物的拓扑文件。将复合物放入周期性边界为 1 nm 的立方体盒子中, 将 TIP3P 水模型作为溶剂, 并通过添加 Na⁺ 和 Cl⁻ 离子使得模拟体系中电荷达到平衡。在进行分子动力学模拟前, 首先对复合物进行能量最小化, 使其温度从 0 到 300 K 渐进加热, 然后再进行 2 个阶段的平衡: 100 ps 的恒温恒容平衡和 100 ps 的恒温恒压平衡。平衡后体系的密度达到最优状态, 进行时长为 10 ns 的分子动力学模拟。

结合自由能的计算 本研究采用分子力学-泊松玻尔兹曼表面积法 (molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area, MM/PBSA), 计算蛋白质-配体复合物的结合自由能。将分子动力学模拟的结果文件导入 g_mmpbsa 程序中, 通过 MM/PBSA 法计算复合物的结合自由能, 并进行能量分解, 分析各个氨基酸的结

合自由能贡献值。结合自由能的计算如公式(1):

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{receptor}} + G_{\text{ligand}}) \quad (1)$$

其中, G_{complex} 代表蛋白-配体复合物的结合能, G_{receptor} 和 G_{ligand} 分别代表蛋白和配体在溶剂中的结合能。

类药性分析和 ADMET 性质预测 使用 pkCSM 数据库预测关键化合物的类药性及 ADMET 性质。在 PubChem 数据库下载关键化合物的结构文件, 并将其结构文件导入 pkCSM 数据库中。根据化合物的结构预测类药性和 ADMET 性质, 如分子质量 (molecular weight, MW)、脂水分配系数 (AlogP)、氢键受体 (hydrogen bond acceptor, HBA) 和氢键供体 (hydrogen bond donor, HBD) 的数量、可旋转键 (rotatable bond) 数量和极性表面积 (polar surface area, PSA)、水溶性 (water solubility)、Caco-2 细胞膜穿透性 (Caco-2 permeability)、肠道吸收 (intestinal absorption)、CYP2D6 酶的抑制作用 (CYP2D6 inhibitor) 及肝毒性 (hepatotoxicity)。

细胞与试剂 人肝癌细胞系 HepG2 细胞、人正常肝细胞系 L02 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 高糖 DMEM 培养基、1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 青-链霉素、噻唑蓝 (MTT)、油红 O 染色液 (细胞专用) (北京索莱宝公司); 0.25% 胰蛋白酶 (上海碧云天生物技术有限公司); 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青公司); 丹酚酸 B (salvianolic acid B)、大黄素 (emodin)、大黄酸 (rhein)、白藜芦醇 (resveratrol)、异鼠李素 (isorhamnetin)、牛血清白蛋白 (BSA)、油酸、棕榈酸 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 甘油三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒 (南京建成有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 游离脂肪酸 (FFA) 用油酸与棕榈酸 2:1 配制而成; 异丙醇 (国药集团化学试剂有限公司)。

主要仪器 二氧化碳培养箱 (德国艾本德公司); 多功能酶标仪 (美国赛默飞公司); DMi8 倒置显微镜 (德国徕卡公司)。

细胞培养 HepG2 细胞培养于含 10% FBS、1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养基中, L02 细胞培养于含 10% FBS、1% 青-链霉素的 1640 培养基中。细胞都于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中孵育。当细胞密度达到 80%~90% 时, 使用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按比例 1:2 传代。

细胞活力检测 取对数生长期的 HepG2、L02 细胞均匀接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 分别给予浓度为 0、10、20、40、80、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药物于细胞培养箱中培养 24 h。然后每孔加入 20 μL MTT 溶液反应, 避光孵育 4 h。结束孵育后吸出孔内培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 低速震荡, 使结晶充分溶解。在 570 nm 处测量各孔吸光度值。

细胞脂肪变性模型的构建 HepG2 细胞是人肝癌细胞, 保留了正常肝细胞的糖脂代谢等绝大多数生理功能, 且具有体外培养简易、可更好耐受脂毒性等优点, 常用于研究肝细胞脂肪变性^[11]。取对数生长期 HepG2 细胞均匀接种于 6 孔培养板, 待细胞于孔中达到 85% 密度后, 将细胞分为对照组、模型组与给药组。对照组细胞用高糖 DMEM 培养基培养; 模型组细胞用 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA 培养; 给药组细胞在建模后加入药物处理 24 h。

油红 O 染色 根据油红 O 染色试剂盒说明书, 将油红 O 染色 A 液与油红 O 染色 B 液按 3:2 比例混合, 静置 10 min, 过滤后得油红 O 染色工作液。吸出板内细胞培养基, 用 PBS 洗 2 次, 加 4% 多聚甲醛固定 30 min。60% 异丙醇浸洗 1 min 后, 加入新配制的油红 O 染色工作液染色 20 min。以 60% 异丙醇漂洗 30 s 至间质清晰。再用苏木素染色液, 复染核 2 min, 蒸馏水洗涤干净后在徕卡 DMi8 倒置显微镜下观察。

细胞 TG 含量检测 采用 TG 含量检测试剂盒, 通过 GPO-PAP 法测定细胞中 TG 含量。吸出孔中培养基, PBS 洗 2 次, 胰蛋白酶消化 2 min, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 加入裂解液 1% Triton X-100 裂解细胞 30 min, 充分裂解后, 根据 TG 试剂盒说明书, 将工作液 A 与工作液 B 按 2:1 混合, 取 2.5 μL 上清液与 250 μL 混合好的工作液, 在 37 °C 孵育 10 min, 于 510 nm 检测吸光度值。

统计学分析 应用 GraphPad Prism 8 软件进行数据统计, 结果以均数 \pm 标准误 (mean \pm SEM) 表示, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 方法进行统计学分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结果

1 HGNP 潜在活性成分与靶点的获取

从 TCMSP 数据库检索 HGNP 成分, 根据 OB \geq 30%、DL \geq 0.18 为标准进行筛选后结合中国药典 (2015 版) 与相关文献补充重要化合物, 最终得出 141 个潜在活性成分, 包括垂盆草 10 个化学成分、虎杖 13 个化学成分、灵芝 58 个化学成分、丹参 65 个化学成分。其中木犀草素为垂盆草、虎杖、丹参的共有成分, 槲皮素为垂盆草、虎杖的共有成分, β -谷甾醇为垂盆草、虎杖、灵芝的共有成分。HGNP 的潜在活性化合物信息见表 1。从 TCMSP 数据库中检索 HGNP 的靶点信息, 并通过 Swiss Target Prediction 数据库对缺乏靶点信息的化合物进行靶点预测, 根据 Probability 值对预测结果进行排序后取排名前 10 的靶点, 整合去重后获得 433 个药物靶点。

Table 1 General information of active ingredients of Huganning tablet (HGNP). MW: Molecular weight

No.	Compound	MW/g·mol ⁻¹
<i>Salvia miltiorrhiza</i>		
DS1	Trijuganone B	280.34
DS2	Poriferasterol	412.77
DS3	Clionasterol	414.79
DS4	Isoimperatorin	270.30
DS5	Sugiol	300.48
DS6	Dehydrotanshinone II A	292.35
DS7	Baicalin	446.39
DS8	Digallic acid	322.24
DS9	α -Amyrin	426.80
DS10	Arucadiol	298.41
DS11	2-Isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	264.34
DS12	3 α -Hydroxytanshinone II A	310.37
DS13	Tournefoliac acid A	312.29
DS14	4-Methylenemiltirone	266.36
DS15	2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	356.40
DS16	6- <i>o</i> -Syringyl-8- <i>o</i> -acetyl shanzhiside methyl ester	628.64
DS17	Formyltanshinone	290.28
DS18	3- β -Hydroxymethylenetanshinone	294.32
DS19	Methylenetanshinone	278.32
DS20	Przewalskin A	398.49
DS21	Przewalskin B	330.46
DS22	Przewaquinone B	292.30
DS23	Przewaquinone C	296.34
DS24	(6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-6,7-Dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7 <i>H</i> -naphtho[8,7- <i>g</i>]benzofuran-10,11-dione	312.34
DS25	Przewaquinone F	312.34
DS26	Sclareol	308.56
DS27	Tanshinaldehyde	308.35
DS28	Danshenol B	354.48
DS29	Danshenol A	336.41
DS30	Salvilenone	292.40
DS31	Cryptotanshinone	296.39
DS32	Dan-shexinkum D	336.41
DS33	Danshenspiroketallactone	282.36
DS34	Deoxyneocryptotanshinone	298.41
DS35	Dihydrotanshinolactone	266.31
DS36	Dihydrotanshinone I	278.32
DS37	Epidanshenspiroketallactone	284.38
DS38	Ferruginol	286.50
DS39	Isocryptotanshinone	296.39
DS40	Isotanshinone II A	294.37
DS41	Manool	290.50
DS42	Microstegiol	298.46
DS43	Miltionone I	312.39
DS44	Miltionone II	312.39
DS45	Miltipolone	300.43
DS46	Miltirone	282.41
DS47	Miltirone II	272.32
DS48	Neocryptotanshinone II	270.35
DS49	Neocryptotanshinone	314.41
DS50	Nortanshinone	280.29
DS51	Prolithospermic acid	314.31
DS52	(2 <i>R</i>)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-[(<i>Z</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl]oxy-propionic acid	360.34
DS53	(<i>Z</i>)-3-[2-[(<i>E</i>)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)vinyl]-3,4-dihydroxy-phenyl]acrylic acid	314.31
DS54	Salvianolic acid G	340.30
DS55	Salvianolic acid J	538.49
DS56	Salvilenone I	270.40
DS57	Salviolone	268.38
DS58	Tanshindiol A	312.34
DS59	Tanshindiol B	312.34
DS60	Przewaquinone E	312.34

No.	Compound	MW/g·mol ⁻¹	Continued
DS61	Tanshinone II A	294.37	
DS62	Tanshinone II B	310.37	
DS63	Tanshinone VI	296.34	
DS64	Salvianolic acid B	718.60	
<i>Ganoderma lucidum</i>			
LZ1	(+)-Ganoderic acid Mf	512.80	
LZ2	(+)-Methyl ganolucidate A	514.77	
LZ3	Methyl lucidenate F	470.66	
LZ4	22,23-Dimethylene ganodermic acid S	578.86	
LZ5	22 β -Acetoxy-3 α ,15 α -dihydroxylanosta-7,9(11),24-trien-26-oic acid	528.90	
LZ6	Campesta-7,22E-dien-3 β -ol	398.74	
LZ7	5 α -Lanosta-7,9(11),24-triene-15 α ,26-dihydroxy-3-one	454.76	
LZ8	Epoxyganoderiol A	472.78	
LZ9	Epoxyganoderiol B	454.76	
LZ10	Epoxyganoderiol C	456.78	
LZ11	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one	406.71	
LZ12	Ergosta-4,7,22-trien-3,6-dione	408.68	
LZ13	Ergosta-7,22-dien-3 β -yl palmitate	637.20	
LZ14	Ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 α -triol	430.74	
LZ15	Ergosta-7,22-diene-3 β -yl linoleate	661.22	
LZ16	Ergosta-7,22-diene-3 β -yl palmitate	637.20	
LZ17	Ergosta-7,22-diene-3 β -yl pentadecanoate	623.17	
LZ18	Ergosta-7,9(11),22-trien-3 β ,5 α ,6 α -triol	442.75	
LZ19	Peroxyergosterol	428.72	
LZ20	Ganoderal B	440.73	
LZ21	Ganoderan B	454.76	
LZ22	Ganoderic acid beta	500.74	
LZ23	Ganoderic acid DM	468.74	
LZ24	Ganodermic acid R	554.84	
LZ25	Ganoderic acid Mi	528.85	
LZ26	(<i>E</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5-Acetoxy-6-[(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-3-hydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-2-methylhept-2-enoic acid	512.80	
LZ27	Ganoderic acid TQ	524.81	
LZ28	Ganoderic acid TR	468.74	
LZ29	Ganoderic acid V	528.80	
LZ30	Ganoderic acid V1	512.75	
LZ31	Ganoderic acid X	512.80	
LZ32	Ganoderic acid Y	454.76	
LZ33	Ganoderic acid Z	456.78	
LZ34	Ganoderic aldehyde A	454.76	
LZ35	Ganoderiol F	454.76	
LZ36	Ganodermanondiol	456.78	
LZ37	Ganoderatriol	456.78	
LZ38	Ganodermenonol	438.76	
LZ39	Ganodermic acid T-Q	512.80	
LZ40	Ganodermic acid T-O	512.80	
LZ41	Ganolucidic acid E	484.74	
LZ42	Ganosporelactone B	530.72	
LZ43	Lanosta-7,9(11),24-trien-15 α -acetoxy-3 α -hydroxy-23-oxo-26-oic acid	526.78	
LZ44	Lanosta-7,9(11),24-trien-3 α -acetoxy-15 α -hydroxy-23-oxo-26-oic acid	526.78	
LZ45	Lanosta-7,9(11),24-trien-3 α -acetoxy-26-oic acid	496.80	
LZ46	Lucialdehyde A	438.76	
LZ47	Lucialdehyde B	452.74	
LZ48	Lucialdehyde C	454.76	
LZ49	Lucidenic acid A	458.65	
LZ50	Lucidone A	402.58	
LZ51	Lucidumol A	458.80	
LZ52	Methyl ganoderic acid DM	482.77	
LZ53	Methyl ganoderic acid TR	482.77	
LZ54	Methyl lucidenate Q	474.70	
LZ55	Cerevisterol	430.74	

No.	Compound	MW/g·mol ⁻¹
LZ56	Ergosta-7,22E-dien-3β-ol	398.74
LZ57	Oleanic acid	456.70
<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge		
CP1	Liquiritigenin	256.27
CP2	Isorhamnetin	316.28
CP3	Sarmentosine	275.29
CP4	δ-Amyrone	424.70
CP5	Kaempferide	300.26
CP6	Sedumoside I	388.50
CP7	Tricin	330.29
<i>Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix</i>		
HZ1	6,8-Dihydroxy-7-methoxyxanthone	258.24
HZ2	Physovenine	262.34
HZ3	Picalinal	366.45
HZ4	Physciondiglucoside	608.60
HZ5	Rhein	284.23
HZ6	Torachryson-8-O-β-D-(6'-oxayl)-glucoside	480.46
HZ7	(+)-Catechin	290.29
HZ8	Resveratrol	228.26
HZ9	Polydatin	390.42
HZ10	Emodin	270.24
Multi-drug		
A1	β-Sitosterol	414.79
A2	Luteolin	286.25
A3	Quercetin	302.25

Continued

2 HGNP治疗NAFLD的潜在靶点的获取

以“nonalcoholic fatty liver disease”为关键词在GeneCards数据库中进行检索,得到疾病靶点1 131个。将疾病靶点与HGNP的药物靶点分别导入Venny 2.1在线软件作图工具平台,绘制韦恩图,得到151个HGNP治疗NAFLD的潜在靶点(图1)。

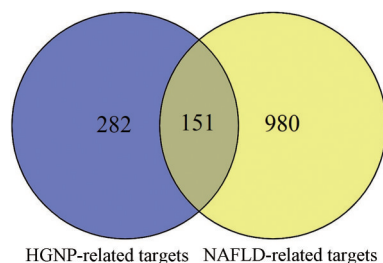


Figure 1 Venn diagram of targets of HGNP and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)

3 潜在靶点的GO富集分析和KEGG通路分析

通过R软件中“cluster profiler v4.2.2”生物信息包对151个潜在靶点进行GO富集分析与KEGG通路分析,得到GO条目共2 526条($P < 0.05$),其中包括生物过程(biological process, BP)条目2 331条、细胞组成(cell composition, CC)条目51条、分子功能(molecular function, MF)条目144个。根据 P 值对条目排序,将各类别前10名富集结果进行可视化分析(图2)。GO富集结果显示,BP方面主要涉及对营养水平的反应

(response to nutrient level)、细胞对化学应激的反应(cellular response to chemical stress)、活性氧代谢过程(response to reactive oxygen species)等生物过程。CC方面主要包括膜筏(membrane raft)、膜微区(membrane microdomain)、囊泡腔(vesicle lumen)等细胞成分。MF方面主要涉及核受体的激动活性(nuclear receptor activity)、配体激活的转录因子的激动活性(ligand-activated transcription factor activity)、DNA结合转录因子的结合(DNA-binding transcription factor binding)等分子功能。

KEGG通路富集分析得到 $P < 0.05$ 的通路共152个,根据 P 值进行排序,排名前20的通路见图3。通路富集结果主要涉及AGE-RAGE在糖尿病并发症中的信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、脂肪和动脉粥样硬化通路(lipid and atherosclerosis)、胰岛素抵抗通路(insulin resistance)、丙型肝炎疾病通路(hepatitis C)、内分泌抵抗通路(endocrine resistance)、NAFLD等。值得注意的是,KEGG通路富集分析结果中,HGNP的24个潜在活性靶点富集于NAFLD疾病通路(表2),表明这些靶点与HGNP治疗NAFLD有较为关键的联系,本研究将这些靶点作为关键靶点,用于进一步的分析验证。

4 “潜在活性成分-关键靶点-通路”网络的构建

根据KEGG通路分析结果,并结合中药潜在活性成分、关键靶点的信息,利用Cytoscape软件构建“潜在

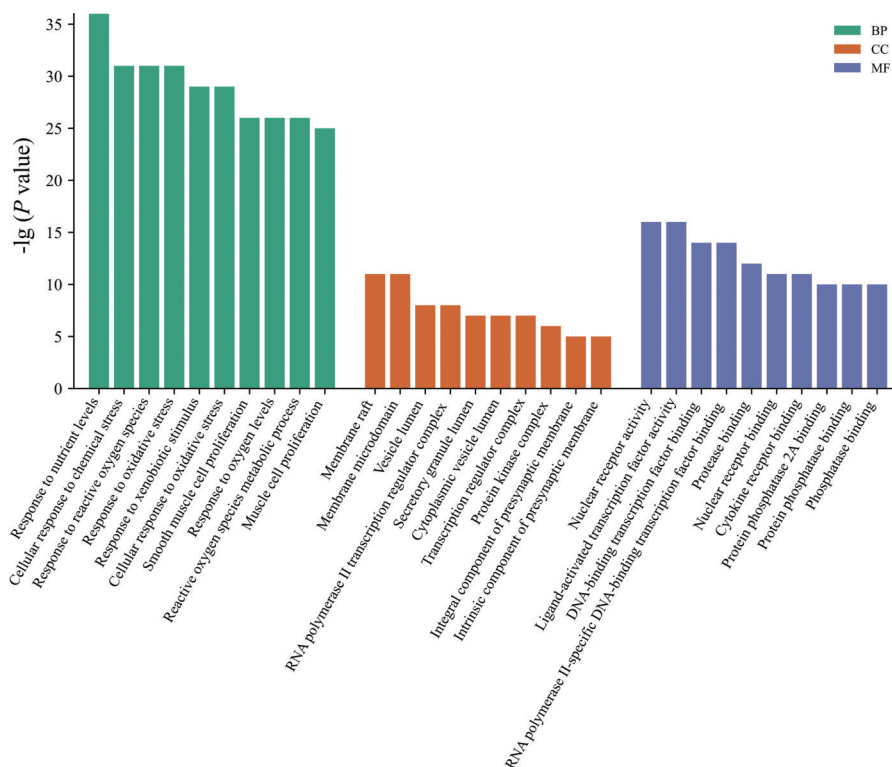


Figure 2 The results of gene ontology (GO) enrichment analysis. BP: Biological process; CC: Cell composition; MF: Molecular function

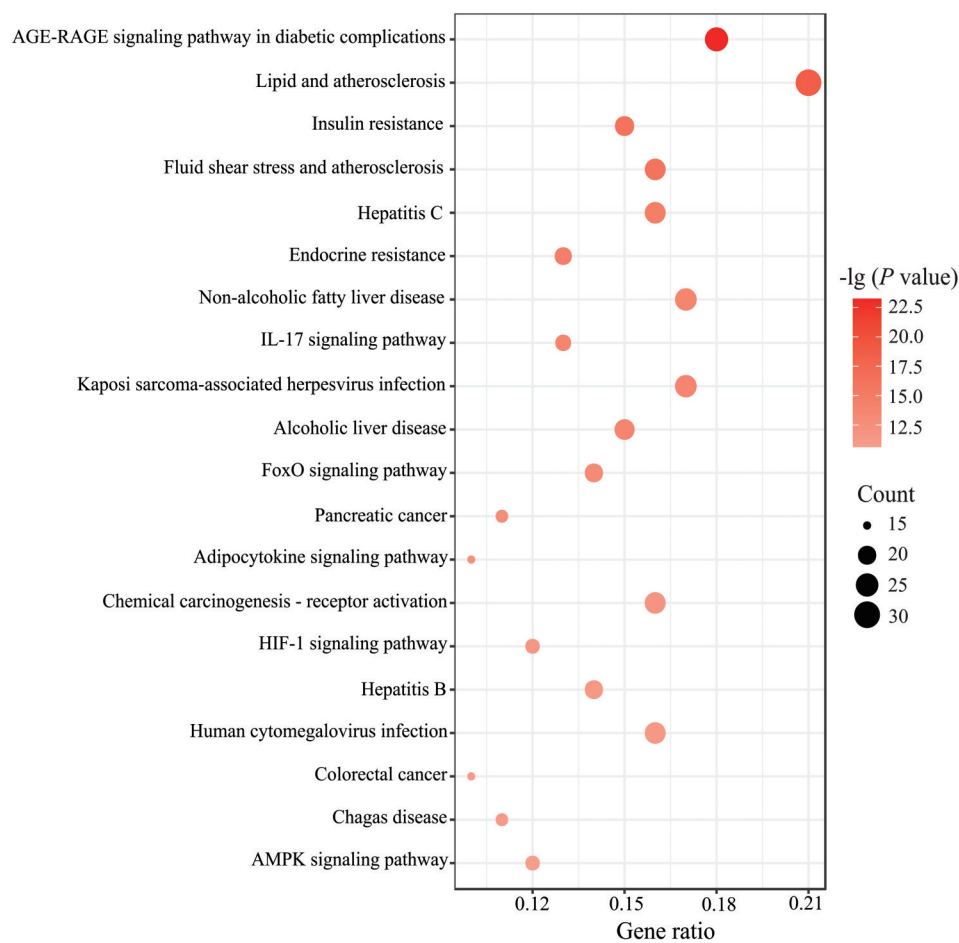


Figure 3 The diagram of Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathways enrichment analysis

Table 2 Key targets of HGNP for the treatment of NAFLD

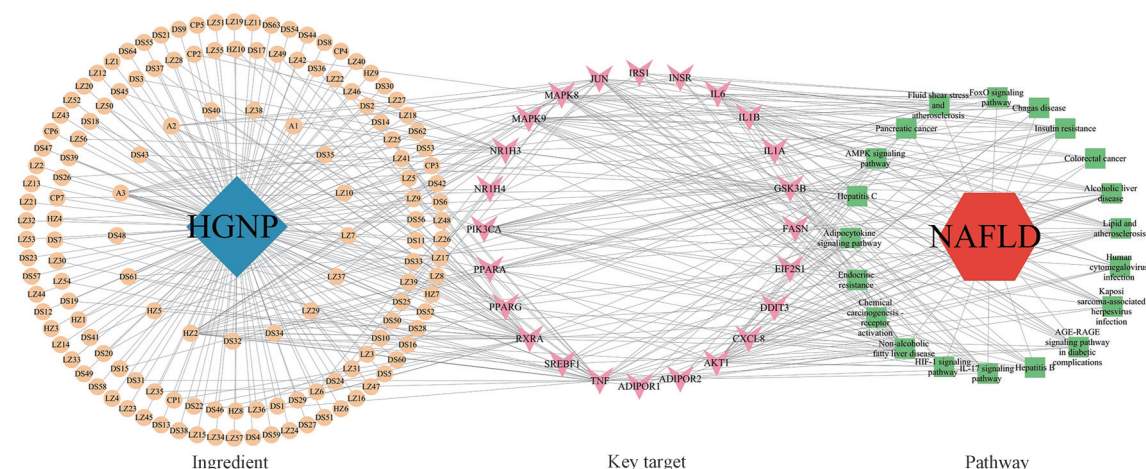
No.	Uniprot	Gene	Target name	Degree
1	P19793	<i>RXRA</i>	Retinoic acid receptor RXR-alpha	32
2	P01375	<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor	31
3	P49841	<i>GSK3B</i>	Glycogen synthase kinase-3 beta	22
4	P31749	<i>AKT1</i>	Serine/threonine-protein kinase 1	22
5	P45983	<i>MAPK8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8	21
6	P05412	<i>JUN</i>	Transcription factor Jun	19
7	P42336	<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform	17
8	Q13133	<i>NR1H3</i>	Oxysterols receptor LXR-alpha	16
9	P45984	<i>MAPK9</i>	Mitogen-activated protein kinase 9	16
10	P05231	<i>IL6</i>	Interleukin-6	15
11	P10145	<i>CXCL8</i>	Interleukin-8	11
12	P01584	<i>IL1B</i>	Interleukin-1 beta	10
13	P37231	<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	8
14	Q07869	<i>PPARA</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	8
15	P06213	<i>INSR</i>	Insulin receptor	7
16	P35568	<i>IRS1</i>	Insulin receptor substrate 1	6
17	P01583	<i>IL1A</i>	Interleukin-1 alpha	5
18	P36956	<i>SREBF1</i>	Sterol regulatory element-binding protein 1	5
19	Q96A54	<i>ADIPOR1</i>	Adiponectin receptor protein 1	5
20	Q86V24	<i>ADIPOR2</i>	Adiponectin receptor protein 2	5
21	P49327	<i>FASN</i>	Fatty acid synthase	4
22	P35638	<i>DDIT3</i>	DNA damage-inducible transcript 3 protein	3
23	P05198	<i>EIF2S1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	2
24	Q96R11	<i>NR1H4</i>	Bile acid receptor	2

活性成分-关键靶点-通路”网络,如图4所示,包括187个节点、453条边。为筛选出关键靶点中作用较大的靶点,利用Analyze Network功能对网络进行拓扑学分析,根据度值进行排序。排名前4的靶点分别为维甲酸受体RXR- α (retinoic acid receptor RXR-alpha, RXRA)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、糖原合酶激酶 (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3B)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1 (serine/threonine-protein kinase 1, AKT1)。

5 分子对接验证

为了验证本网络药理学研究的准确性及筛选出

HGNP潜在活性成分中治疗NAFLD的关键成分,采用软件Discovery Studio 2020对4个关键靶点RXRA、TNF、GSK3B、AKT1分别建立分子对接模型,把共晶配体提取出后重新对接到蛋白的活性位点中,计算对接后的配体与共晶配体的均方根偏差 (root-mean-square-deviation, RMSD) 值。结果显示, RXRA、TNF、GSK3B、AKT1分子对接模型的RMSD值分别为0.573 3、1.417 7、1.326 5、0.930 6 Å,均小于2 Å,表示4个分子对接模型具有较高的可靠性。将HGNP的141个潜在活性成分与上述4个对接模型进行分子对接研究,对接结果以-CDOCKER ENERGY值进行排序,

**Figure 4** The “ingredient-key target-pathway” network of HGNP

-CDOCKER ENERGY值越大,说明成分与靶点的相互作用越强,尤其是当成分与靶点分子对接的-CDOCKER ENERGY值大于共晶配体时,可认为成分与靶点具有很强的结合作用。分子对接-CDOCKER ENERGY值排名前5的化合物如表3所示,异鼠李素、大黄素、白藜芦醇、大黄酸与4个关键靶点分子对接的-CDOCKER ENERGY值均大于共晶配体,而丹酚酸B与靶点TNF、GSK3B、AKT1的分子对接中显示出最大的-CDOCKER ENERGY值。进一步分析潜在活性成分与关键靶点的结合模式,以在分子对接中有较好结合活性的异鼠李素、丹酚酸B为例,其中异鼠李素主要通过氢键、疏水键如 π - π 堆积作用力等与关键靶点结

合(图5),而丹酚酸B主要通过离子键、氢键、疏水键与关键靶点结合(图6)。根据上述分子对接结果,筛选出异鼠李素、丹酚酸B、大黄素、白藜芦醇、大黄酸与关键靶点RXRA、TNF、GSK3B、AKT1有较好的结合活性,推测为护肝宁片治疗NAFLD的关键化合物,进行下一步的实验验证。

6 分子动力学模拟

分子动力学模拟作为研究生物大分子及其相互作用的有力工具,已被广泛用于创新药物研究^[12]。本实验将在分子对接中表现良好的异鼠李素-RXRA,丹酚酸B-GSK3B复合物进行分子动力学模拟。根据模拟结果计算复合物的RMSD和均方根波动(root mean

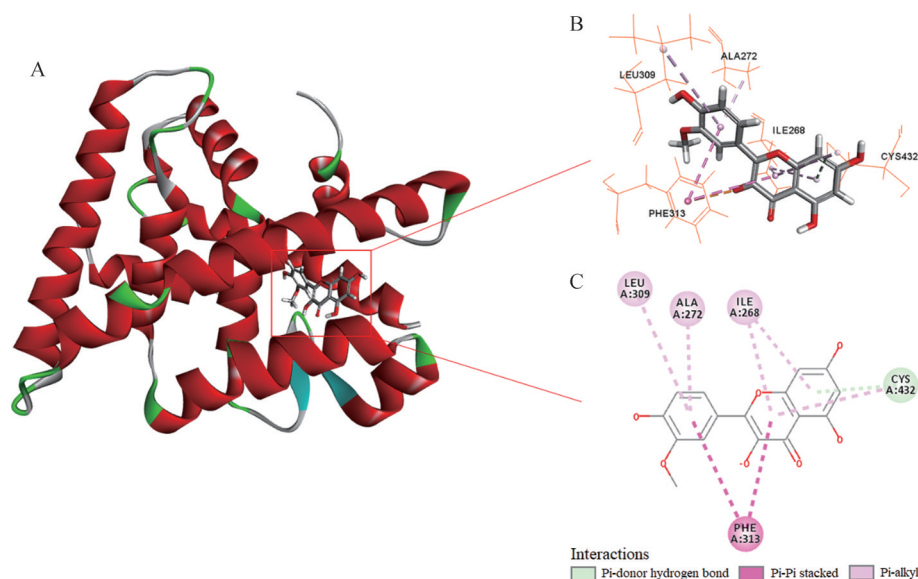


Figure 5 The interactions between isorhamnetin and RXRA (PDB ID: 1MVC). A: Isorhamnetin in the active site of RXRA; B: Three-dimensional interactions between isorhamnetin and RXRA; C: Two-dimensional interactions between isorhamnetin and RXRA

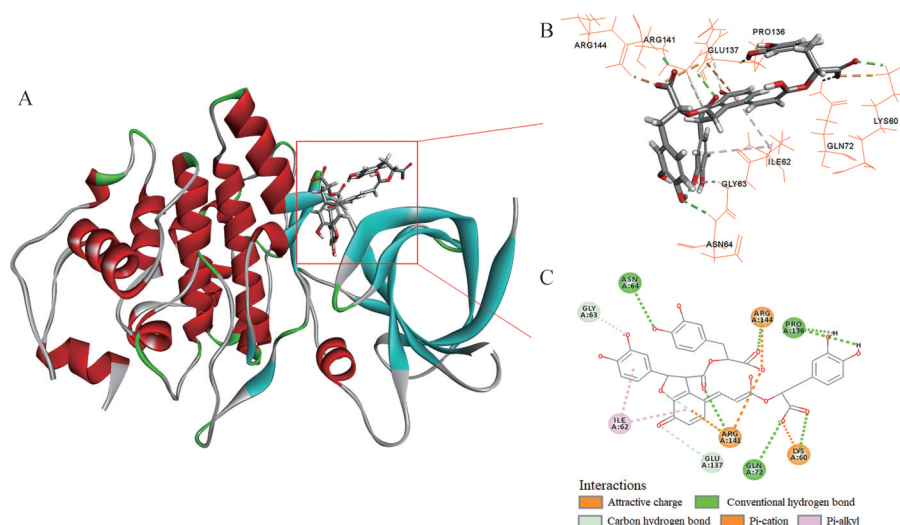


Figure 6 The interactions between salvianolic acid B and GSK3B (PDB ID: 1Q5K). A: Salvianolic acid B in the active site of GSK3B; B: Three-dimensional interactions between salvianolic acid B and GSK3B; C: Two-dimensional interactions between salvianolic acid B and GSK3B

Table 3 Top 5 molecular docking results of RXRA, TNF, GSK3B, and AKT1 with ingredients of HGNP

Ingredient	-CDOCKER ENERGY/kcal·mol ⁻¹			
	RXRA	TNF	GSK3B	AKT1
Co-crystallized ligand	34.474 6	18.688 0	30.333 0	29.126 0
Isorhamnetin	60.862 3	30.908 4	51.046 3	41.329 5
Salvianolic acid B	20.195 8	63.062 1	70.472 6	58.569 4
Emodin	39.100 8	32.491 2	52.176 7	37.718 6
Resveratrol	43.418 5	26.458 1	42.687 5	29.655 7
Rhein	45.940 7	26.458 1	48.422 7	32.405 8

square fluctuation, RMSF) 值, 评估整个复合物结构及各个氨基酸在动力学过程中的稳定程度。RMSD 将初始构象作为参考对象, 通常用来检测分子动力学模拟过程中复合物结构的稳定性^[13]。由图 7A、B 所示, 异鼠李素-RXRA 和丹酚酸 B-GSK3B 复合物分别在模拟 6 和 4 ns 后趋于平衡, RMSD 值稳定在 0.25 和 0.3 nm, 表明两个复合物的骨架在模拟过程偏移程度较小, 复合物结构可以保持较好的稳定性。RMSF 是衡量蛋白质中每个氨基酸残基在动力学模拟时间段内的波动情况的分析方法^[14]。较高的 RMSF 值代表该氨基酸残基具有较大的波动性; 相反地, 较小的 RMSF 值代表该氨基酸残基的波动性小。根据图 7C、D 所示, 异鼠李素-RXRA 复合物模拟过程中大部分氨基酸残基 RMSF 为 0.1~0.3 nm; 而复合物丹酚酸 B-GSK3B 模拟过程中大部分氨基酸残基 RMSF 值为 0.1~0.4 nm。结合 RMSD 与 RMSF 分析, 表明 2 个化合物与相应蛋白质的结合体系具有较好的稳定性。

7 结合自由能的计算

计算化合物与靶点的结合自由能, 通常用来更精确地探究配体小分子与受体之间的结合强度和亲和力^[15]。化合物与靶点结合所需的结合自由能越少, 表示结合所需的能量越低, 越有利于化合物与靶点的结合^[16]。本实验通过 MM/PBSA 法计算异鼠李素-RXRA 和丹酚酸 B-GSK3B 两个复合物中相应的化合物与蛋白质结合时所需的结合自由能, 并对结合自由能进行能量分解, 分析各个氨基酸的结合自由能贡献值。结果显示, 异鼠李素-RXRA 和丹酚酸 B-GSK3B 两个复合物的结合自由能分别为 -164.093、-120.597 kJ·mol⁻¹, 进一步验证了异鼠李素、丹酚酸 B 与关键靶点的结合能力。另外, 根据图 8 所示, 异鼠李素-RXRA 复合物中, 氨基酸残基 PHE313、ILE268、LEU309 对结合自由能有较大的贡献值, 分别为 -12.395、-9.101、-7.016 kJ·mol⁻¹; 而在丹酚酸 B-GSK3B 复合物中, 氨基酸残基 ARG141、ILE62、PRO136 对结合自由能贡献值最大, 分别为 -59.565、-24.248、-22.181 kJ·mol⁻¹。

8 类药性分析与 ADMET 性质预测

研究表明^[17], 口服吸收有效的化合物对于 Lipinski 五规则的符合率达到 90%, 而 Veber 规则可更好地阐释口服生物利用度与化合物结构的关系。因此, 本研究基于 Lipinski 五规则和 Veber 规则 ($MW \leq 500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{Log}P \leq 5$, $\text{HBA} \leq 10$, $\text{HBD} \leq 5$, $\text{PSA} \leq 140 \text{ \AA}$, $\text{rotatable bonds} \leq 10$), 更全面地分析护肝宁片中关键化合物的类药性。结果如表 4 所示, 关键化合物异鼠李素、大黄

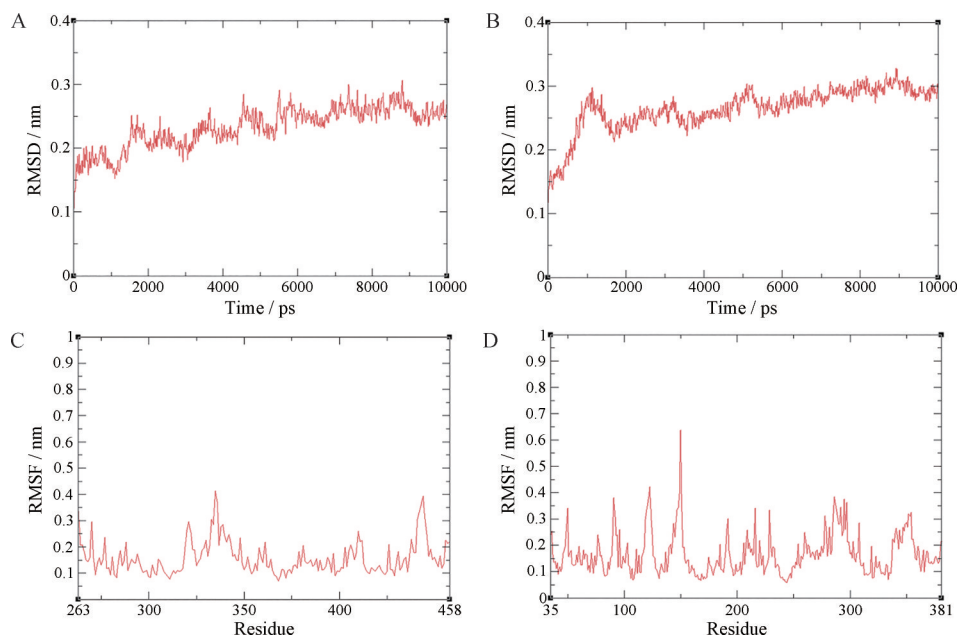


Figure 7 The results of molecular dynamics simulation. A: Root-mean-square-deviation (RMSD) plot of isorhamnetin-RXRA complex; B: RMSD plot of salvianolic acid B-GSK3B complex; C: Root mean square fluctuation (RMSF) plot of isorhamnetin-RXRA complex; D: RMSF plot of salvianolic acid B-GSK3B complex

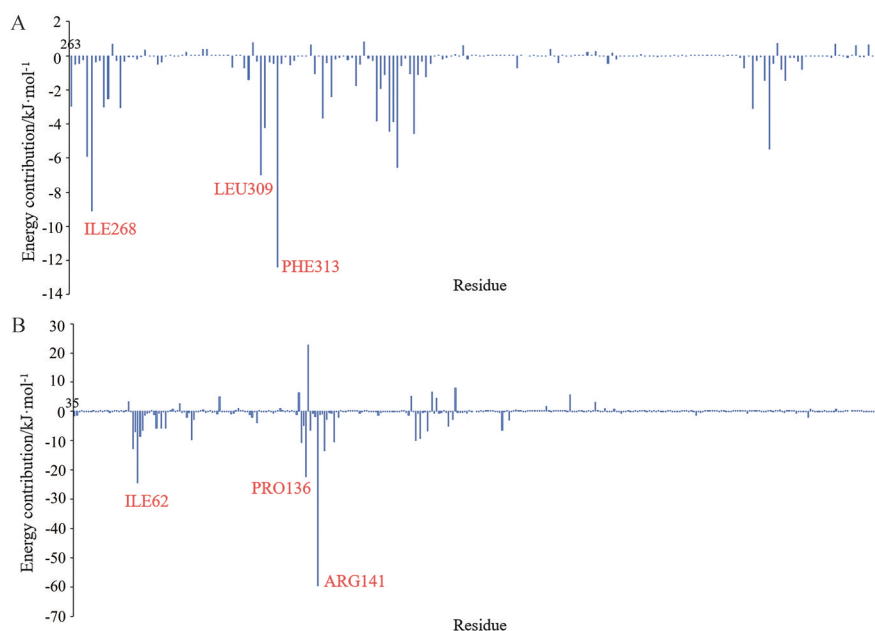


Figure 8 The energy contribution of two complexes in binding free energy calculation. A: The energy contribution of isorhamnetin-RXRA complex in binding free energy calculation; B: The energy contribution of salvianolic acid B-GSK3B complex in binding free energy calculation

素、白藜芦醇、大黄酸的理化性质均符合 Lipinski 五规则和 Veber 规则。而丹酚酸 B 除了 $\text{Log}P$ 满足类药性规则外, 其余性质不符合 Lipinski 五规则和 Veber 规则。

药物的 ADMET 性质, 即药物在体内的吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism)、排泄 (excretion) 及毒性 (toxicity), 是影响药物疗效的关键因素^[18]。ADMET 预测结果显示 (表 4), 大黄素、白藜芦醇显示出较高的体外 Caco-2 细胞膜透过率 ($> 0.9 \log P_{\text{app}}$); 异鼠李素、大黄素、白藜芦醇、大黄酸的肠道吸收率高于低肠道吸收分子的阈值 30%, 其中大黄素、白藜芦醇的肠道吸收率达到 85.629%、90.935%, 显示出较好的肠道吸收; 5 个关键化合物均预测出对 CYP2D6 代谢酶无抑制作用, 且无肝毒性。

9 细胞活力检测

根据 MTT 法检测关键化合物对 HepG2、L02 细胞活力的影响, 并筛选合适的给药浓度。由图 9 所示, 5 个关键化合物在浓度 $\leq 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 HepG2 和 L02 细胞的细胞活力影响较低。随着白藜芦醇、大黄酸的给药浓度大于 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, HepG2、L02 细胞的细胞

活力显著下降; 异鼠李素、丹酚酸 B 浓度 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时仍未降低 L02 细胞的细胞活力, 而对 HepG2 细胞产生明显细胞抑制作用。因此, 为避免细胞活力受到影响, 选定 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为合适的浓度用于后续给药处理。

10 细胞油红 O 染色与 TG 含量检测

肝细胞内 TG 的异常蓄积会引起脂肪变性, 是 NAFLD 发病的重要诱因之一^[19]。采用油红 O 染色与细胞 TG 含量检测实验验证 HGNP 中的关键化合物对肝细胞脂肪变性的改善作用。如图 10、11 所示, 与对照组相比, $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA 诱导 24 h 后的模型组细胞内红色脂滴大量生成, TG 含量显著提升, 表明成功构建细胞脂肪变性模型; 而后分别经过 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异鼠李素、丹酚酸 B、大黄素、白藜芦醇、大黄酸处理 24 h, 5 个给药组细胞内的红色油脂与 TG 含量在不同程度上减少, 细胞脂肪变性情况均有所改善。其中异鼠李素、大黄素对 FFA 诱导的细胞脂肪变性模型的改善作用更为明显。以上实验结果验证了上述 5 个化合物可能为 HGNP 治疗 NAFLD 的重要活性成分, 且进一步证明了本研究网络药理学与计算机辅助药物设计部分的可靠性。

Table 4 Drug-likeness and ADMET properties prediction of key ingredients

Ingredient	MW/ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{Log}P$	HBD	HBA	PSA/Å	Rotatable bond	Water solubility/ $\log \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Caco-2 permea- bility/ $\log P_{\text{app}}$	Intestinal absorption/%	CYP2D6 inhibitor	Hepatotoxicity
Isorhamnetin	316.26	2.291	4	7	128.792	2	-3.000	-0.003	76.014	No	No
Salvianolic acid B	718.62	3.334	9	14	292.421	12	-2.892	-1.570	9.902	No	No
Emodin	270.24	1.887	3	5	113.283	0	-2.892	1.613	85.629	No	No
Resveratrol	228.24	2.973	3	3	98.911	2	-3.178	1.170	90.935	No	No
Rhein	284.22	1.571	3	5	117.445	1	-2.843	-0.241	55.000	No	No

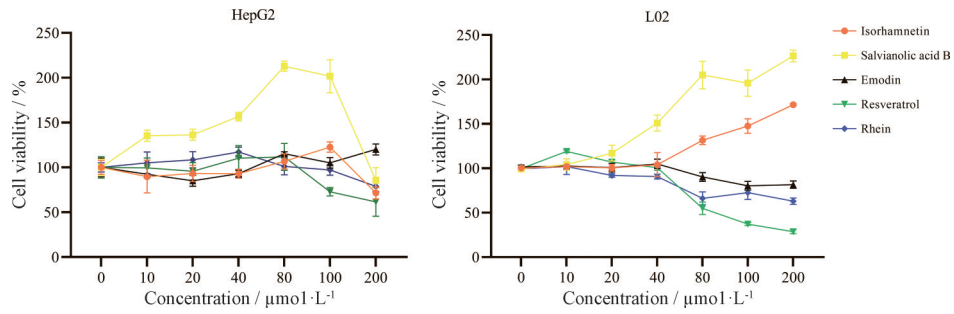


Figure 9 Cell viability of HepG2 and L02 cell treated with key ingredients

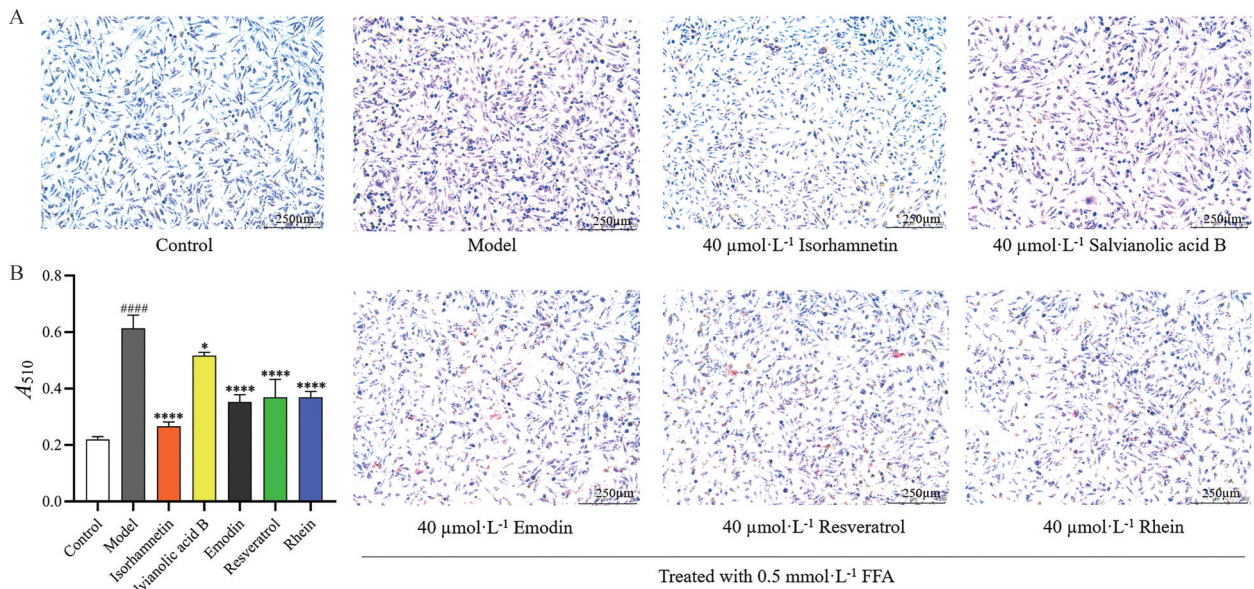


Figure 10 Lipid droplets in the HepG2 cells observed by oil red O staining. A: Graphical representation of oil red O staining of HepG2 cells (light microscope 20 \times , scale bar: 250 μ m); B: For the quantitative determinations of the accumulated lipids, the oil red staining was dissolved in isopropanol that was measured at 510 nm. $n = 3$, mean \pm standard error of mean (SEM). ##### $P < 0.0001$ vs control; * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ vs model

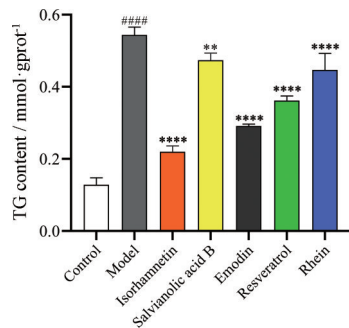


Figure 11 TG content in the HepG2 cells. $n = 3$, mean \pm SEM. ##### $P < 0.0001$ vs control; ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs model

讨论

随着人们饮食习惯与生活节奏的变化, NAFLD 发病率增长迅速且呈低龄化趋势, 对人类生命健康产生严重危害^[20]。NAFLD 的发病机制至今还未明确, 最为大家广泛接受的是“二次打击”假说, 其中“初次打击”

为患者因胰岛素抵抗、肥胖等因素导致肝细胞发生脂肪变性, 肝脏的耐受能力下降。“二次打击”则是在初次打击基础上, 由氧化应激、炎症细胞因子等共同作用导致肝细胞发生炎症、坏死或纤维化^[21,22]。目前临床尚无特异性药物治疗 NAFLD, 多是在改变患者生活方式的基础上 (调整饮食结构、运动), 使用药物如胰岛素增敏剂、降血脂药、抗氧化剂等进行治疗^[23,24]。西药因其成分和靶点较为单一, 对于 NAFLD 这种复杂的代谢性疾病, 往往只能改善部分指标, 且易产生不良反应^[25]。而中药复方具有多成分、多途径、多靶点协同作用的特点, 可从多方面改善 NAFLD^[26-28]。

HGNP 由虎杖、垂盆草、灵芝、丹参 4 味中药组成^[29]。现代医学认为, 方中的虎杖具有抗炎、改善胰岛素抵抗、抗氧化应激、调节脂质代谢、肝保护等作用^[30]; 丹参可发挥调节肝内脂质代谢、降低抗氧自由基、改善肝脏微循环, 减轻肝纤维化等作用^[31,32]; 垂盆草可降低

血清谷丙转氨酶 (ALT) 水平, 保护肝细胞, 减轻肝细胞损伤^[33]; 而灵芝可降低血清 TG、总胆固醇及低密度脂蛋白含量, 对抗氧化应激, 促进肝细胞再生^[34]。近年来研究表明, HGNP 在治疗 NAFLD 方面具有不错的疗效, NAFLD 患者的血脂、肝功能、肝纤维化等指标相较于治疗前明显改善^[7], 但因其作用机制方面并未研究透彻, 阻碍了其在治疗 NAFLD 方面进一步的临床应用。

本研究通过网络药理学方法, 并结合计算机辅助药物分子设计技术与体外实验验证, 研究 HGNP 治疗 NAFLD 的作用机制。在 GO 富集分析、KEGG 通路分析结果中, 通路主要富集于 AGE-RAGE 在糖尿病并发症中的信号通路、脂肪和动脉粥样硬化通路、胰岛素抵抗通路、内分泌抵抗通路、非酒精性脂肪性肝病通路、脂肪细胞因子信号通路、IL-17 信号通路、FoxO 信号通路、AMPK 信号通路等。NF- κ B 是重要的基因转录调节因子, 参与调控多种炎症基因、黏附分子和蛋白酶基因的表达, 在肝脏炎症、氧化应激、纤维化等过程中发挥重要作用, 而 AGE-RAGE 信号通路可通过调控 NF- κ B, 与 NAFLD 在多方面密切联系^[35,36]。FoxO 是一类转录因子, 广泛作用于脂肪细胞、肝细胞、心肌细胞等多种细胞, 参与胰岛素合成及胰岛素对肝细胞糖脂代谢的调节等过程^[37]。Matsumoto 等^[38]发现, 肝脏中的 FoxO 过度表达会引起 TG 合成上升、降低游离脂肪酸的氧化, 从而促进肝脏脂肪变性。AMPK 被称为“细胞能量平衡感受器”, 是体内不可缺少的蛋白激酶, 参与多种代谢过程, 是细胞内调节糖、脂代谢的关键分子^[39]。根据以上推断, HGNP 可能通过作用于缓解胰岛素抵抗、调节脂质和糖代谢、调节炎症反应、调节氧化应激等的相关靶点、通路, 产生治疗 NAFLD 的效果。

根据“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络, 发现 HGNP 的潜在活性成分、关键靶点、通路、疾病间存在多种关联, 其中网络中连接度值较高的靶点为 RXRA、TNF、GSK3B、AKT1, 可能是其治疗 NAFLD 较为关键的靶点。RXRA 作为类固醇-甲状腺激素受体超家族的一员, 可与视黄酸受体 (RARs) 形成同二聚体或异二聚体, 从而调节细胞的增殖、分化、脂质代谢等过程^[40]。另外, RXRA 也可与许多核受体如 PPARA、LXR、RARB 等形成二聚体, 参与核受体对靶基因的调控过程^[41]。其中, 异二聚体 RXRA/PPARA 的形成对于 PPARA 调节脂肪酸氧化基因的转录活性发挥关键作用^[42]。TNF 是肿瘤坏死因子, 在炎症反应、细胞免疫、肿瘤免疫等多种生理、病理过程中发挥关键作用^[43]。研究发现, NAFLD 模型小鼠中结肠组织的 TNF 表达水平相比于正常小鼠明显升高, 而 HGNP 可降低 TNF

在 NAFLD 小鼠结肠组织中的表达^[7]。GSK3B 是一种特殊的多功能丝氨酸/苏氨酸激酶, 能磷酸化糖原合成酶并使其失活, 参与新陈代谢、基因表达和器官发育等生理过程^[44]。有研究表明, 抑制靶点 GSK3B 的表达可刺激葡萄糖的吸收, 促进糖原合成, 并缓解胰岛素抵抗^[45]。AKT1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可作为磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K)/AKT 信号通路的关键调节因子, 介导细胞生长、增殖、细胞周期调节等过程^[46,47]。

基于上述网络药理学研究, 对 HGNP 治疗 NAFLD 的潜在活性成分、作用靶点、作用通路进行了初步探讨, 但仍缺乏更深入的分析与验证。分子对接、分子动力学模拟、结合自由能计算等计算机辅助药物设计技术, 可帮助人们从分子水平上对中药的潜在活性成分进行研究, 进一步寻找并阐释中药中的潜在活性成分与机体靶点受体间的相互作用情况, 为中药的现代化挖掘及发现潜在活性成分提供可靠支撑^[48,49]。本研究发现, 异鼠李素、丹酚酸 B、大黄素、白藜芦醇、大黄酸与关键靶点 RXRA、TNF、GSK3B、AKT1 有较好结合能力, 预测为 HGNP 治疗 NAFLD 的关键化合物, 分子动力学模拟分析也验证了异鼠李素、丹酚酸 B 与关键靶点间的结合稳定性。结合自由能由于其更全面地分析化合物与靶点的相互作用力, 通常相较于分子对接可更精确地分析化合物与靶点的结合能力^[50,51]。本文根据结合自由能的计算进一步验证了异鼠李素、丹酚酸 B 与相应关键靶点的结合能力, 并分析化合物与靶点中氨基酸残基的相互作用情况。根据类药性分析, 异鼠李素、大黄素、白藜芦醇、大黄酸的理化性质满足类药性规则, 表明其口服吸收有效, 具有较好的口服生物利用度。ADMET 性质预测结果显示, 大黄素、白藜芦醇拥有较好的细胞膜透过性与肠道吸收。异鼠李素、丹酚酸 B、大黄素、白藜芦醇、大黄酸对 CYP2D6 代谢酶没有抑制作用, 且无肝毒性。

为验证 HGNP 中关键化合物对 NAFLD 的治疗作用, 使用 FFA 在体外诱导构建肝细胞的脂肪变性模型, 发现异鼠李素、丹酚酸 B、大黄素、白藜芦醇、大黄酸可使细胞内的脂滴及 TG 含量在不同程度上减少, 对脂肪变性产生一定的积极作用。其中, 异鼠李素、大黄素改善脂肪变性的效果最为明显。

综上所述, 本研究首先通过网络药理学分析, 对 HGNP 治疗 NAFLD 的潜在靶点进行 GO 与 KEGG 富集分析, 并构建“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络, 初步探讨了 HGNP 可通过多成分、多靶点、多通路治疗 NAFLD 的作用机制。根据计算机辅助药物设计进一步研究 HGNP 治疗 NAFLD 的药效物质基础及分子作用机制, 并推测获得 5 个关键成分异鼠李素、丹酚酸 B、

大黄素、白藜芦醇、大黄酸。体外实验验证了5个关键成分具有改善肝细胞脂肪变性作用。本研究结合网络药理学、计算机辅助药物设计、体外实验,探讨了HGPN治疗NAFLD的作用机制,为护肝宁片的临床应用和机制研究提供参考。

作者贡献: 谭相端和余启明提出整体研究思路,以及负责论文撰写的指导与修改;陈聪负责网络药理学、部分体外活性测试和分子动力学模拟,以及文章撰写;周香辉负责计算机辅助药物设计部分;张兵负责部分体外活性测试;彭彦芬和杨新平负责相关文献的调研与收集。

利益冲突: 所有作者均声明没有利益冲突。

References

- [1] Zhao HD, Yang F, Zhan L. Research advances in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Acad J Chin PLA Med Sch (解放军医学院报), 2022, 43: 366-370.
- [2] Ekstedt M, Nasr P, Kechagias S. Natural history of NAFLD/NASH [J]. Curr Hepatol Rep, 2017, 16: 391-397.
- [3] Ni R, Li CX, Ju J. Recent advance in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol (胃肠病学和肝病杂志), 2022, 31: 136-140.
- [4] Ke SJ, Yang HY, Liu LX. Research progress of pathogenesis and treatment in non-alcoholic liver disease [J]. Med Recapit (医学综述), 2020, 26: 3146-3150.
- [5] Guo L. Research progress of the mechanism and therapy of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2018, 30: 1166-1172.
- [6] Huang W, Gao SQ, Zhang BH. Clinical application of the efficacy and safety of proheparinum tablet [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China (中国医院用药评价与分析), 2010, 10: 751-753.
- [7] Wang ZJ, Liu XY, Wang XL. Effects of Huganning tablets on liver function, serum lipid parameters and iconography in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Hebei J Tradit Chin Med (河北中医), 2016, 38: 353-355.
- [8] Zhao YT, Shu XB, Yang ZX, et al. Effects of Huganning tablets on intestinal mucosal mechanical barrier in mice with non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Shanghai Univ Tradit Chin Med (上海中医药大学学报), 2021, 35: 58-65.
- [9] Liu ZH, Sun XB. Network pharmacology: new opportunity for the modernization of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药科学报), 2012, 47: 696-703.
- [10] Macalino SJY, Gosu V, Hong S, et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery [J]. Arch Pharm Res, 2015, 38: 1686-1701.
- [11] Luo Y, He XP, Li X, et al. Establishment and comparative analysis of several kinds of cell fatty degeneration model [J]. Chin Arc Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2017, 35: 2074-2077.
- [12] Zhao H, Caflisch A. Molecular dynamics in drug design [J]. Eur J Med Chem, 2015, 91: 4-14.
- [13] Zhang YH, Zhang RS, Hu RJ, et al. Successful molecular dynamics and binding energy calculation of HIV-1 Tat complexed with P-TEFb [J]. J Lanzhou Univ (Nat Sci) (兰州大学学报(自然科学版)), 2011, 47: 114-121.
- [14] Zhang H, Lv JH, Mu JB, et al. Molecular dynamics simulation and antibacterial mechanism of 3MBA derivatives as FtsZ protein inhibitors [J]. Acta Phys Chim Sin (物理化学学报), 2015, 31: 566-575.
- [15] Hu RJ. Molecular Modeling Studies of HIV-1 Reverse Transcription and Some of Its Inhibitors (HIV-1 逆转录酶及其抑制剂的分子模拟研究) [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2009.
- [16] Li CH, Zhang M, Lin J, et al. Analysis of *in vitro* activity and compatibility of Dunhuang Yifang Dabupi Decoction on gastric cancer based on computer-aided drug design [J]. Acta Pharm Sin (药科学报), 2022, 57: 2087-2100.
- [17] Walters WP. Going further than Lipinski's rule in drug design [J]. Expert Opin Drug Discov, 2012, 7: 99-107.
- [18] Hu BC, Tian JX, Zhang YT, et al. Online prediction of compound's druggability [J]. Chin J Med Chem (中国药物化学杂志), 2022, 32: 90-101.
- [19] Zhao LP, Cheng YY, Fan TY, et al. Synthesis and evaluation on triglyceride inhibitory activities of novel indole alkaloids [J]. Acta Pharm Sin (药科学报), 2022, 57: 433-440.
- [20] Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: clinical impact [J]. J Hepatol, 2018, 68: 268-279.
- [21] Dong S, Liu P, Sun MY. Role of "two-hit" in non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Clin Hepatol (临床肝胆病杂志), 2012, 28: 551-555.
- [22] Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease [J]. J Hepatol, 2015, 62: 47-64.
- [23] Dong S, Liu P, Sun MY. The development of treatment for NAFLD [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2013, 40: 599-602.
- [24] Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. Clin Med, 2018, 18: 245-250.
- [25] Qian K, Liu YY, Zhang Y, et al. Research progress on molecular mechanism of traditional Chinese medicine against non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 5083-5092.
- [26] Hu YY. Advantages and prospects of traditional Chinese medicine in treating nonalcoholic fatty liver disease [J]. World Chin Med (世界中医药), 2015, 10: 149-152.
- [27] Xu Y, Tao Y, Gou XJ. Differentiation and analysis on TCM etiology and pathogenesis of non-alcoholic fatty liver [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2016, 34: 2586-2589.
- [28] Wang YL, Zhang HX, Li WL, et al. Analysis and thinking on TCM preventing and treating NAFLD [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2022, 38: 85-89.

- [29] Xu H, Zheng SM, Jiang MD, et al. Therapeutic effects of Huganning pill on patients with drug induced hepatitis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig (中国中西医结合消化杂志), 2009, 17: 34-36.
- [30] Li SD, Chen XJ, Liu JK, et al. Signaling pathways involved in the active components of *Polygonum cuspidatum* in treatment of nonalcoholic fatty liver disease and their interaction [J]. J Clin Hepatol (临床肝胆病杂志), 2022, 38: 902-907.
- [31] Lv J, Jiang Y, Zhang X, et al. Research progress of non-alcoholic fatty liver disease in traditional Chinese medicine [J]. Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志), 2017, 51: 238-241.
- [32] Sun LW, Huang MZ. The effect of Danshen on the non-alcoholic fatty liver rats MDA, SOD, TNF and Leptin [J]. J Zhejiang Chin Med Univ (浙江中医药大学学报), 2007, 31: 696-698.
- [33] Zhang Y, Zhang J, Xin YN, et al. Effectiveness of Huganning tablet in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Acta Acad Med Qingdao Univ (青岛大学医学院学报), 2017, 53: 100-102.
- [34] Chang SS, Zhou D, Meng GL, et al. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on oxidative stress of hyperlipidemic fatty liver in rats [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2012, 37: 3102-3106.
- [35] Wu L, Xie YT. Effect of NF- κ B on the pathogenic course of non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Cent South Univ (中南大学学报), 2017, 42: 463-467.
- [36] Wang L, Li HJ. AGEs-RAGE signaling pathway in diabetic refractory wounds [J]. Chin J Burns Wounds Surf Ulcers (中国烧伤创疡杂志), 2015, 27: 406-409.
- [37] Huang N, Li WJ, An LG, et al. The function of FoxO1 and its relationship with human disease [J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2012, 24: 334-339.
- [38] Matsumoto M, Han S, Kitamura T, et al. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism [J]. J Clin Invest, 2006, 116: 2464-2472.
- [39] Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13: 1016-1023.
- [40] Harish S, Ashok MS, Khanam T. Serine 27, a human retinoid X receptor a residue, phosphorylated by protein kinase A is essential for cyclicAMP-mediated downregulation of RXR α function [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279: 853-857.
- [41] Washburn DG, Hoang TH, Campobasso N, et al. Synthesis and SAR of potent LXR agonists containing an indole pharmacophore [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19: 1097-1100.
- [42] Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, et al. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor α modulates its transcriptional activity [J]. Hepatology, 2002, 35: 937-946.
- [43] Qiu CH, Hou G, Huang DN. Molecular mechanism of TNF- α signal transduction [J]. Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报), 2007, 23: 430-435.
- [44] Liu YB, Hu XF. Molecular mechanism of GSK-3 β in tumor cells [J]. Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报), 2020, 36: 259-266.
- [45] Liu MM, Ye DY. Advance in study of glycogen synthase kinase-3 β and its inhibitors [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2009, 33: 4145-4151.
- [46] Chi YJ, Li J, Guan YF, et al. PI3K/Akt signaling axis in regulation of glucose homeostasis [J]. Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报), 2010, 26: 879-885.
- [47] Balasuriya N, McKenna M, Liu XG, et al. Phosphorylation-dependent inhibition of Akt1 [J]. Genes, 2018, 9: 450.
- [48] Yang J, Chu P, Xiong YH, et al. Computer-aided drug design using in the modernization of traditional Chinese medicine [J]. World Clin Drugs (世界临床医药), 2009, 30: 615-619.
- [49] Qiao LS, Zhang YL. Application of CADD on multi-target drug R&D in natural products [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 1951-1955.
- [50] King E, Aitchison E, Li H, et al. Recent developments in free energy calculations for drug discovery [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 712085.
- [51] Rastelli G, Del Rio A, Degliesposti G, et al. Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA [J]. J Comput Chem, 2010, 31: 797-810.