DOI:10.16016/j.1000-5404.202009246

基于网络药理学探究黄诺玛苷对非酒精性脂肪肝的降脂作用

魏晓丽[1],郭艳丽[1],张永威[1],冉 峥[1],兰 怡[2],王丽凤[3],毛新民[1,4] 830000 乌鲁木齐,新疆医科大学:药学院药理学教研室,中亚高发病成因与防治国家重点实验室和自治区中西医结合高峰学科[1],第四附属医院干部二科[2],基础医学院生理学教研室[3],中医学院[4]

[**摘要**] **目的** 利用网络药理学探索黄诺玛苷抗非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)的作用靶点和信号通路,研究黄诺玛苷治疗 NAFLD 的作用机理。**方法** ①在 Swiss Target Prediction 数据库中检索黄诺玛苷活性靶点,DisGeNET 数据库中搜索疾病靶点,通过化合物靶点与疾病靶点作 Venn 分析得到黄诺玛苷调节 NAFLD 脂代谢的预测靶点。借助 Biso Genet 软件构建蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络图,利用 Metascape 数据库对核心靶点进行 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析,用 Cytoscape 软件绘制"靶点-通路"网络图。②采用 db/db 小鼠模型进行体内实验验证,30 只雄性 db/db 小鼠按随机数字表法分为 3 组:db/m 组(正常)、db/db 模型组、db/db+黄诺玛苷组(50 mg/kg)。给药 12 周后处死,取小鼠肝脏,检测肝脏 TG、GSH、GSSG 含量,HE 和油红 O 染色观察肝脏病理学变化,qRT-PCR 和 Western blot 检测小鼠肝脏脂代谢的关键 mRNA 及蛋白的表达水平。③HepG2 细胞在游离脂肪酸(free fatty acids,FFAs,油酸∶棕榈酸=2∶1)干预成模后,分为正常组、FFAs 处理组(500 μmol/L)、FFAs+黄诺玛苷低中高浓度组(25、50、100 μmol/L),作用 24 h。油红 O 染色检测 HepG2 细胞内 TG 的含量。qRT-PCR 和 Western blot 检测 HepG2 细胞脂代谢的关键 mRNA 及蛋白的表达水平。**结果** ①通过 Venn 分析,得到黄诺玛苷对接 NAFLD 的 29 个核心靶点,主要包括过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARγ)、血管内皮生长因子(VEGF)和丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)等。GO 功能富集了 6 个分子功能、20 个生物过程、5 个细胞组分。KEGG 富集的关键信号通路有 40 条,主要包括 AMPK 脂代谢通路、胰岛素抵抗(IR)通路、细胞凋亡通路等。②动物实验结果表明,黄诺玛苷能降低 db/db 模型组 TG 水平($P<0.05$),提高 GSH/GSSG 比例($P<0.05$)。HE 和油红 O 染色显示黄诺玛苷可逆转肝细胞的肿大,减少肝细胞内的脂滴浸润。qRT-PCR 结果表明黄诺玛苷可以降低脂质合成基因 ACC1、SCD1、FASN mRNA 的表达($P<0.05$),增强 β-氧化基因 ACOX-1、CPT1α mRNA 的表达($P<0.05$)。Western blot 结果显示,与 db/db 模型组相比,db/db+黄诺玛苷组 SREBP、FASN 蛋白水平显著降低($P<0.05$),PPARγ、PPARα 蛋白水平显著升高($P<0.05$)。③体外细胞实验表明,黄诺玛苷可以降低 HepG2 细胞的 TG 含量($P<0.05$),降低脂质合成基因 SREBP、SCD1、ACC1 的表达,提高 CPT1α、ACOX-1 mRNA 水平($P<0.05$)。在蛋白水平,黄诺玛苷可以显著降低 SREBP、FASN 的表达($P<0.05$)。**结论** 黄诺玛苷可能通过调节 PPARγ/SREBP/FASN 信号通路改善氧化应激,增强脂肪酸 β-氧化并减少脂质合成,对 NAFLD 发挥治疗作用。

[**关键词**] 黄诺玛苷;网络药理学;非酒精性脂肪肝病;PPARγ/SREBP/FASN 信号通路;降脂

[**中图法分类号**] R282.71; R285.5; R575.5 [**文献标志码**] A

[**基金项目**] 国家自然科学基金地区项目(81460636);国家自然科学基金联合基金项目(U1303233)

[**通信作者**] 王丽凤,E-mail: wlf4027@126.com

毛新民,E-mail: mxm3277@139.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Lipid-lowering effect of flavanomarein on non-alcoholic fatty liver disease based on network pharmacology

WEI Xiaoli[1], GUO Yanli[1], ZHANG Yongwei[1], RAN Zheng[1], LAN Yi[2], WANG Lifeng[3], MAO Xinmin[1,4]

[1]Department of Pharmacology, School of Pharmacy, State Key Laboratory of Pathogenesis and Prevention of High Incidence in Central Asia and Peak Discipline of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in the Autonomous Region, [2]Second Department of Cadre Ward, the Fourth Affiliated Hospital, [3]Department of Physiology, College of Basic Medicine, [4]College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 830000, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the targets and signaling pathways of flavanomarein in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by network pharmacology, and to investigate the effect and mechanisms in the treatment. **Methods** ① The potential active targets of flavanomarein were retrieved in the Swiss Target Prediction database, and the disease-related targets were searched in the DisGeNET database. The prediction targets of lipid metabolism of NAFLD regulated by flavanomarein was obtained through Venn analysis. The Biso Genet database was used to construct the protein-protein interaction (PPI) network diagram, the Metascape database was used to analyze GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment, and the Cytoscape software was used to draw the "target-pathway" network diagram. ② NAFLD db/db mice was employed for *in vivo* verification. Thirty male db/db mice were randomly divided into db/m group, db/db model group, and db/db+flavanomarein group (50 mg/kg). After the administration of 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution and flavanomarein for 12 weeks, the mice were sacrificed, and the liver contents of TG, GSH and GSSG was detected. HE staining and oil red O staining were used to observe the pathological changes of the liver. qRT-PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein levels of key molecules in the lipid metabolism in the liver. ③HepG2 cells were treated with free fatty acids (FFAs, oleic acid∶palmitic acid = 2∶1) and divided into normal group, FFAs treatment group (500 μmol/L), and FFAs+ low, medium and high concentrations of flavanomarein (25, 50, 100 μmol/L) for 24 h. Oil red O staining was used to detect the TG content in HepG2 cells. qRT-PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein levels of key molecules in the lipid metabolism of HepG2 cells. **Results** ① A total of 29 core targets of flavanomarein docking NAFLD were screened through Venn analysis, including peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARγ), vascular endothelial growth factor (VEGF), and mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14). The GO analysis enriched 6 molecular functions, 20 biological processes and 5 cellular components. KEGG analysis enriched 40 key signaling pathways related to the effect of flavanomarein on NAFLD, which mainly focuses on the AMPK lipid metabolism pathway, insulin resistance (IR) pathway, and apoptosis pathway. ② The results of animal experiments showed that flavanomarein treatment reduced TG level in the NAFLD mice ($P<0.05$) and improved the ratio of GSH/GSSG ($P<0.05$). HE and oil red O staining showed that flavanomarein could reverse hepatocyte enlargement and reduce lipid drop infiltration of hepatocytes. qRT-PCR results showed that the treatment decreased the mRNA levels of ACC1, SCD1, and FASN for lipid synthesis ($P<0.05$), while increased those of ACOX-1 and CPT1α for β-oxidation ($P<0.05$). Western blot assay results indicated that the expression levels of SREBP and FASN were obviously lower ($P<0.05$), and those of PPARγ and PPARα were increased ($P<0.05$) in the flavanomarein group than the model group. ③ *In vitro* cell experiments showed that flavanomarein reduced the TG content of HepG2 cells ($P<0.05$) and the expression of SREBP, SCD1 and ACC1, but increased the levels of CPT1α and ACOX-1 mRNA ($P<0.05$). And, the protein expression of SREBP and FASN was also significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** Flavanomarein may play a therapeutic role in NAFLD by improving oxidative stress, up-regulating fatty acid β-oxidation, reducing lipid synthesis through regulating the PPARγ/SREBP/FASN signaling pathway.

[**Key words**] flavanomarein; network pharmacology; non-alcoholic fatty liver disease; PPARγ/SREBP/FASN signaling pathway; lipid-lowering

Supported by the Regional Program of National Natural Science Foundation of China (81460636) and the Joint Program of National Natural Science Foundation of China (U1303233). Corresponding author: WANG Lifeng, E-mail: wlf4027@126.com; MAO Xinmin, E-mail: mxm3277@139.com

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一种进行性肝脏疾病,与肥胖、胰岛素抵抗、2型糖尿病和高脂血症等代谢紊乱关系密切,是诱发肝纤维化、肝硬化、肝功能衰竭、肝癌和死亡的主要原因[1]。国内外关于NAFLD的临床治疗方法不尽人意,且FDA(Food and Drug Administration)和EMA(European Medicines Agency)尚无批准任何治疗药物。近几年研究发现,从天然产物中分离的单体或其提取物能够改善NAFLD脂代谢紊乱,由于低毒性、多靶点、多功能等优势,引起学者的关注。例如白藜芦醇(RSV)可通过PKA/AMPK/PPARα信号通路改善NAFLD脂质代谢,缓解氧化应激,起到肝脏保护作用[2]。高燕翔等[3]发现白藜芦醇可预防大鼠非酒精性脂肪肝的发生。

两色金鸡菊为菊科属一年生草本植物,具有散风清热、平肝明目、清热解毒的功效[4],主产地在中国新疆,当地维吾尔族人将其作为花茶食用[5];其主要成分有黄酮类、挥发油类、有机酸类、多酚类等[6]。本课题组前期研究表明两色金鸡菊具有降血脂、降血糖、降血压、抗炎抗氧化、减少胰岛素抵抗等活性[7-10],其主要单体化合物黄诺玛苷(flavanomarein)也具有抗糖尿病肾病、抗氧化、降血脂等药理作用[11-12]。然而,目前关于黄诺玛苷对肝脏脂肪代谢的研究鲜有报道,黄诺玛苷对NAFLD作用的具体机制尚不明确。本研究运用网络药理学对黄诺玛苷作用NAFLD可能靶点进行预测,并进一步利用动物、细胞模型进行验证,以期初步阐明黄诺玛苷抗NAFLD的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

黄诺玛苷由本课题组制备[13](纯度>99%);甘油三酯(TG)测试盒(批号:A110-1-1)来自南京建成生物工程研究所;还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、氧化型谷胱甘肽(glutathione, oxidized, GSSG)测试盒购自北京索莱宝科技有限公司,批号分别为BC1175、BC1185;基因引物序列由上海生工生物合成;兔抗FASN抗体(批号:3180)购自美国Cell Signaling Technology公司;兔抗SREBP、PPARγ、PPARα抗体(批号分别为:AF6283、AF6284、AF5301)购自Affinity生物科学公司;胎牛血清FBS购自美国Gibco公司,DMEM培养基购自美国Hyclone公司,噻唑蓝MTT、油红O染液购自德国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 化合物和疾病作用靶点获取 利用Swiss Target Prediction(http://swisstargetprediction.ch)数据库[14]对黄诺玛苷进行靶点分析。黄诺玛苷的SMILES格式可在Pubchem(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)数据库[15]中获取。启动DiS GeNET(http://www.disgenet.org)数据库[16],检索"Non-alcoholic Fatty Liver Disease"关键词,收集并整理NAFLD相关靶点基因。

1.2.2 黄诺玛苷治疗NAFLD的潜在靶点预测及蛋白互作网络(PPI)构建 将黄诺玛苷作用靶点与NAFLD靶点进行Venn分析,得到黄诺玛苷干预NAFLD的预测靶点。利用Uniprot(https://www.uniprot.org/)数据库[17]将黄诺玛苷与NAFLD的靶点基因进行统一转化,再导入Biso Genet 3.0.0(http://apps.cytoscape.org/download/stats/bisogenet/)数据库[18]进行蛋白-蛋白相互作用分析,得到疾病与化合物的蛋白-蛋白互作网络图。

1.2.3 GO功能富集与KEGG通路富集分析 利用Metascape(https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1)数据库[19]的富集功能,得到核心靶点的分子功能(molecular functions,MF)、生物过程(biological processes,BP)、细胞组分(cellular components,CC)及KEGG信号通路,整理后导入Cytoscape3.8.0(https://cytoscape.org/)软件[20],获取黄诺玛苷治疗NAFLD的"核心靶点-通路"网络图。

1.2.4 动物分组及给药 选取5周龄SPF级健康雄性db/db小鼠30只,购自南京大学模式动物研究所,动物许可证号:SCXK(苏)2018-0008。适应性饲养2周后,按随机数字表法分为3组:db/m组(正常)、db/db模型组、db/db+黄诺玛苷组(db/db+F),每组各10只,以基础饲料喂养,每日灌胃。3组均为正常。

1.2.5 小鼠肝脏病理切片观察与生化指标检测 小鼠给药12周后,颈椎脱臼处死小鼠,迅速摘取肝脏新鲜组织,根据TG、GSH、GSSG试剂盒说明书进行操作。一部分肝脏固定于4%多聚甲醛溶液中,制备石蜡切片;另一部分甲醛固定24 h,30%蔗糖脱水,OCT胶包埋,制备冰冻切片供后续病理学观察。

1.2.6 检测小鼠肝脏mRNA和蛋白水平 采用实时荧光定量(qRT-PCR)方法检测肝组织PPARα、PPARγ、PGC-1α、CPT1α、SCD-1、FASN、ACC1、ACOX-1 mRNA的表达,以$2^{-\Delta\Delta Ct}$值表示基因相对表达量。提取小鼠肝脏总蛋白,检测FASN、SREBP、PPARα、PPARγ的蛋白表达,Image Lab软件分析条带的灰度值。

1.2.7 HepG2细胞培养及分组 HepG2细胞接种于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及100 μg/mL链霉素的DMEM完全培养基中,于37 ℃、5%CO_2培养箱中传代培养。采用噻唑蓝MTT法筛选出游离脂肪

酸(free fatty acids,FFAs)、黄诺玛苷的作用浓度及时间,分为正常组、FFAs(500 μmol/L)组、FFAs+黄诺玛苷(25、50、100 μmol/L)组。

1.2.8 HepG2 细胞油红 O 染色及甘油三酯(TG)含量测定 HepG2 细胞接种于 24 孔板,生长至 80%~90%时,分为正常组、FFAs(500 μmol/L)组、FFAs+黄诺玛苷(25、50、100 μmol/L)组。干预 24 h 后,4%多聚甲醛,37 ℃固定 30 min。油红 O 工作液,室温染色 15 min 后于倒置显微镜下观察。吸去蒸馏水,加入异丙醇溶液,37 ℃,30 min,提取 TG。酶标仪于波长 510 nm 处测定光密度值[$D(510)$]。

1.2.9 检测 HepG2 细胞 mRNA 和蛋白水平 采用实时荧光定量(qRT-PCR)方法检测 HepG2 细胞 SREBP、SCD1、ACC1、CPT1α、ACOX-1 mRNA 的表达,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示基因相对表达量。提取细胞总蛋白,检测蛋白指标 SREBP、FASN 的表达情况,Image Lab 软件分析条带的灰度值。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基于网络药理学的黄诺玛苷治疗 NAFLD 的作用靶点预测

2.1.1 黄诺玛苷与 NAFLD 共有靶点的获取 通过检索 Swiss Target Prediction 和 DiS GeNET 数据库,获得黄诺玛苷作用靶点 104 个,NAFLD 疾病靶点 963 个,利用 OmicShare Tools(http://omicshare.com/tools/)平台对二者的靶点进行 Venn 分析,获得核心作用靶点 29 个,见表 1。

表 1 黄诺玛苷与 NAFLD 共有靶点

序号	靶基因	基因描述	Uniprot ID
1	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	P37231
2	ALOX15	Polyunsaturated fatty acid lipoxygenase ALOX15	P16050
3	ALOX12	Polyunsaturated fatty acid lipoxygenase ALOX12	P18054
4	MET	Hepatocyte growth factor receptor	P08581
5	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	P15692
6	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	Q16665
7	BCL2	Apoptosis regulator Bcl-2	P10415
8	NR1H4	Bile acid receptor	Q96RI1
9	MMP2	72 kDa type Ⅳ collagenase	P08253
10	MMP13	Collagenase 3	P45452
11	PTPN1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	P18031
12	CES2	Cocaine esterase	O00748
13	SHBG	Sex hormone-binding globulin	P04278
14	BCHE	Cholinesterase	P06276
15	AKR1B1	Aldo-keto reductase family 1 member B1	P15121
16	MMP9	Matrix metallo proteinase9	P14780
17	CBR1	Carbonyl reductase1	P16152
18	APP	Amyloid-beta precursor protein	P05067
19	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	P42224
20	CES1	Liver carboxylesterase 1	P23141
21	SLC10A2	Ileal sodium/bile acid cotransporter	Q12908
22	PTGS1	Prostaglandin G/H synthase 1	P23219
23	ESR1	Estrogen receptor	P03372
24	SLC5A2	Sodium/glucose cotransporter 2	P31639
25	SQLE	Squalene monooxygenase	Q14534
26	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	Q16539
27	CYP19A1	Aromatase	P11511
28	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1	P05121
29	TERT	Telomerase reverse transcriptase	O14746

2.1.2　黄诺玛苷与 NAFLD 的蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络图　　用 Biso Genet 软件将黄诺玛苷与 NAFLD 分别作 PPI 分析,然后取交集得到 4 380 个节点(nodes),90 568 条边(edges),计算网络中所有节点 Degree 值的 2 倍中位数,提取 Degree 大于 2 倍中位数的 Hithubs 网络。对 Hithubs 网络中的数据进行 CytoNCA 分析,取度中心性(degree centrality,DC)、接近中心性(closeness centrality,CC)、介度中心性(between centrality,BC)、特征向量中心性(eigenvector centrality,EC)、网络中心性(network centrality,NC)及局部边连通性(local average connectivity,LAC)的中位数进行筛选,得到 53 nodes 和 427 edges(图 1)。

2.1.3　GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析　　对 GO 分析结果进行汇总整理,发现有 6 个分子功能、20 个生物过程、5 个细胞组分(图 2)。将富集到的通路信息与核心靶点绘制出化合物与疾病的“核心靶点-通路”网络图(图 3)。图中共有 69 个节点,每条边代表核心靶点与通路间的相互作用。其中黄色节点代表 29 个核心靶点,绿色节点代表 40 条通路。其形状面积越大,占比越大,表示发挥的作用越大。因此,可以看出 PPARG、HIF1A、VEGFA 是黄诺玛苷作用 NAFLD 的关键靶点。

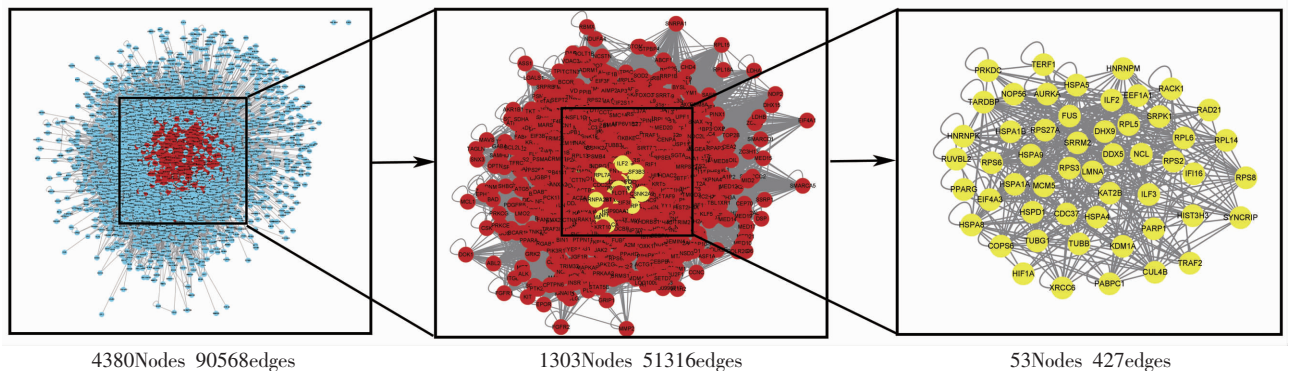


图 1　黄诺玛苷与 NAFLD 的蛋白-蛋白相互作用网络图

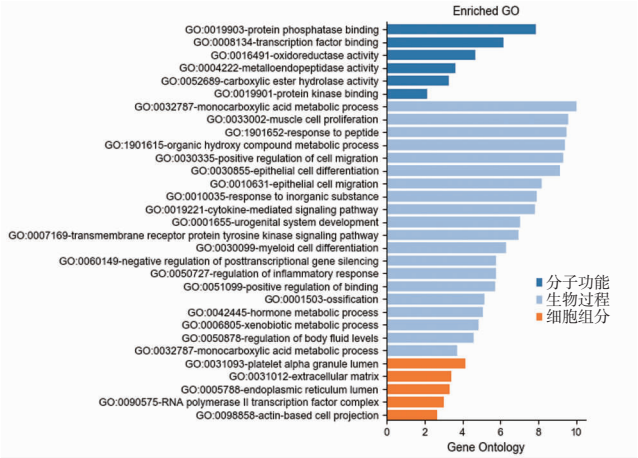


图 2　黄诺玛苷治疗 NAFLD 核心靶点的 GO 富集分析

2.2　黄诺玛苷抗非酒精性脂肪肝病机制研究

2.2.1　小鼠肝脏病理学观察　　新鲜肝脏组织的肉眼观察(图 4)可见:db/m 组小鼠肝脏颜色红润,呈红褐色,外观饱满有光泽,体积适中,组织弹性较好。db/db 模型组小鼠肝脏颜色暗黄,无光泽,组织肿大,相对正常组弹性较差,压迫时出现凹陷,切面有油腻感。db/db+黄诺玛苷组小鼠肝脏与 db/db 模型组相比,肝脏颜色有所好转,表面也比较光滑,触之有弹性。

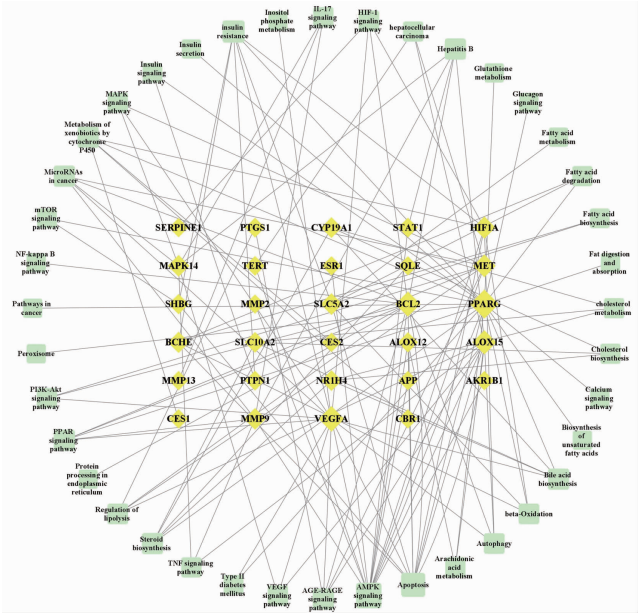


图 3　黄诺玛苷治疗 NAFLD 的“核心靶点-通路”网络图

各组肝脏切片染色后光镜观察见图 4。HE 染色结果显示,db/m 组小鼠肝脏切片光镜下可见细胞形态规则,细胞质均匀,细胞核清晰。db/db 模型组肝细胞排列不规则,细胞膨胀,出现空泡气球样变。与 db/db 模型组相比,db/db+黄诺玛苷组细胞质、核清晰可见,未

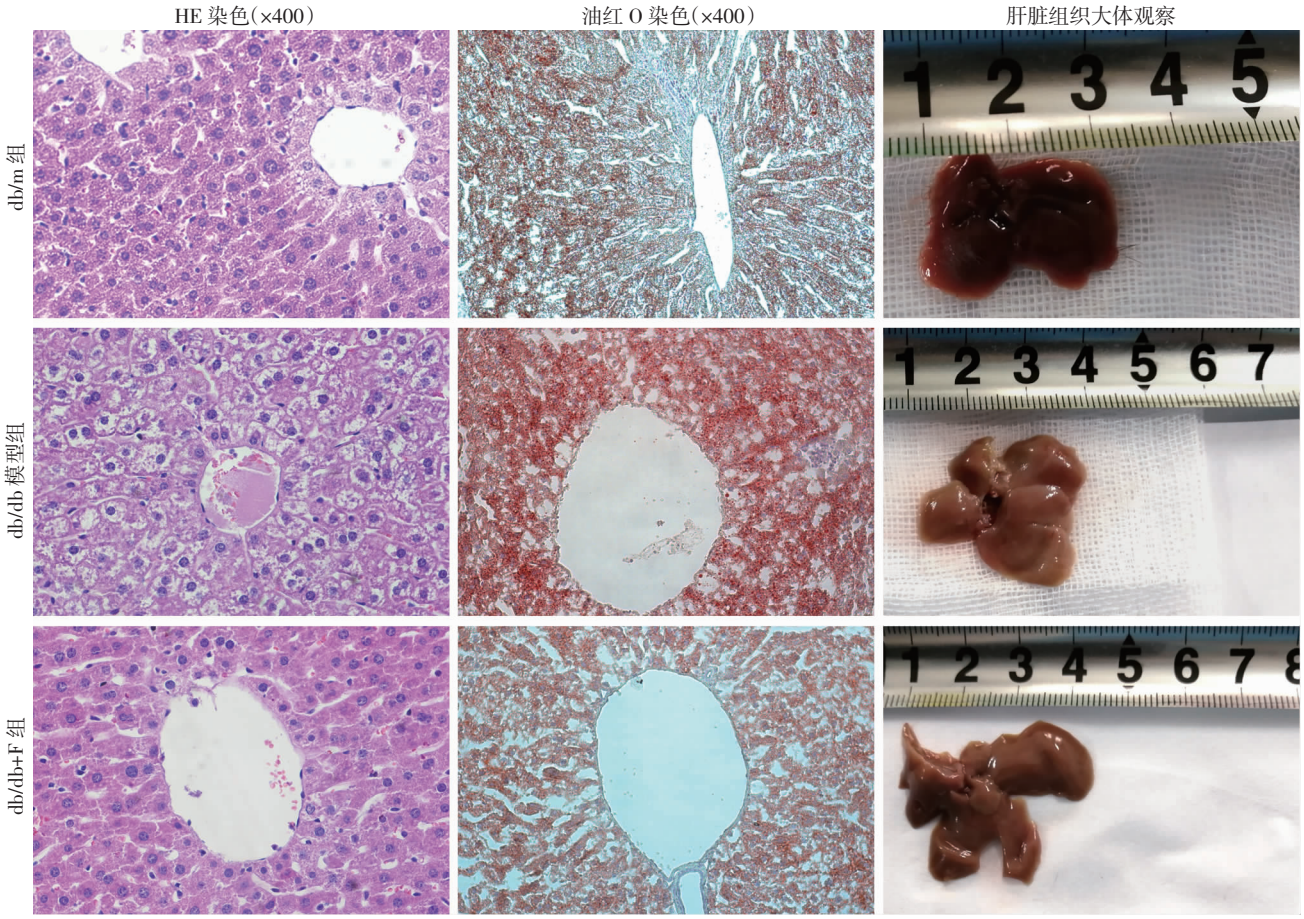
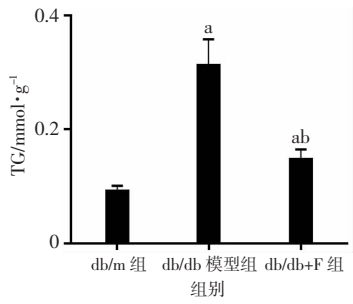


图 4 黄诺玛苷对 db/db 小鼠肝脏病理变化的影响

见空泡样变性、细胞坏死,肝细胞受损情况明显好转。油红 O 染色结果显示,db/m 组与 db/db+黄诺玛苷组小鼠肝脏组织结构完整,排列整齐,肝细胞大小正常,细胞核居中,小部分有轻微脂肪浸润,大部分正常,无脂肪浸润等异常改变;db/db 模型组有重度脂滴出现,肝细胞肿胀,体积增大,细胞核被推向周边。

2.2.2 小鼠肝脏生化指标检测 由试剂盒检测结果得知,db/db 模型组的 TG 水平高于 db/m 组($P<0.05$),db/db+黄诺玛苷组的 TG 水平较 db/db 模型组显著降低($P<0.05$,图 5)。



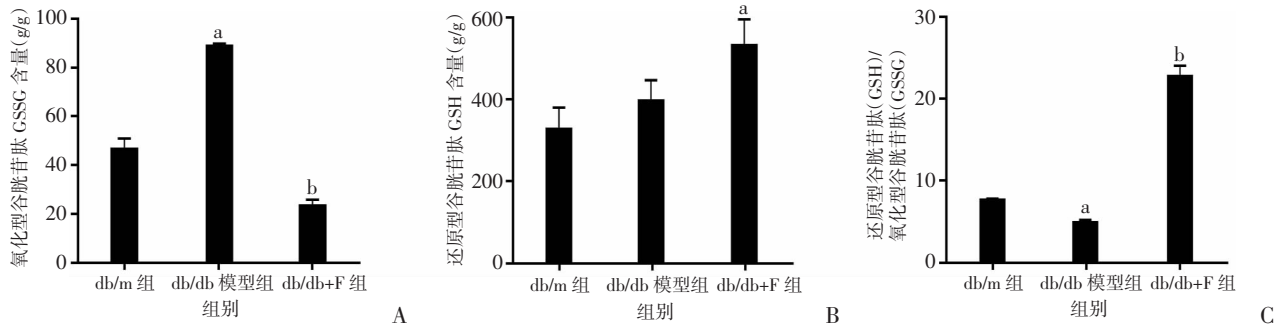
a:$P<0.05$,与 db/m 组比较;b:$P<0.05$,与 db/db 模型组比较

图 5 黄诺玛苷对 db/db 小鼠肝脏 TG 水平的影响

与 db/m 组相比,db/db+黄诺玛苷组的还原型谷胱甘肽 GSH 水平升高($P<0.05$);db/db 模型组氧化型谷胱甘肽 GSSG 水平高于 db/m 组和 db/db+黄诺玛苷组($P<0.05$);db/db+黄诺玛苷组 GSH/GSSG 比值远高于 db/db 模型组($P<0.05$,图 6),提示黄诺玛苷有一定的抗氧化作用。

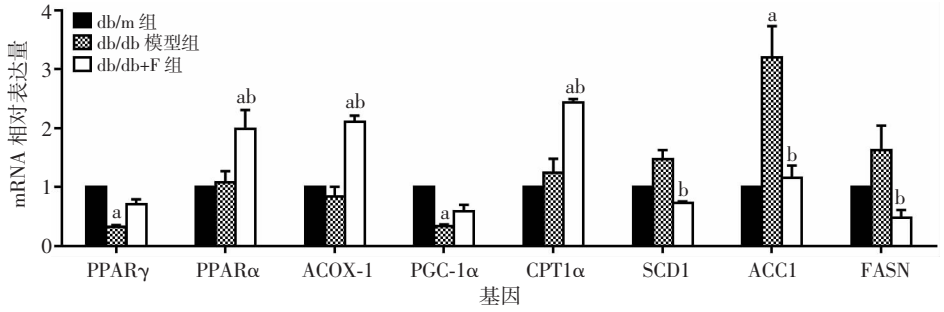
2.2.3 黄诺玛苷对小鼠肝脏脂代谢相关基因表达的影响 结果见图 7。与 db/m 组和 db/db 模型组相比,db/db+黄诺玛苷组小鼠肝脏 PPARα、ACOX-1、CPT1α mRNA 表达显著升高($P<0.05$)。与 db/m 组比较,db/db 模型组小鼠 ACC1 的表达显著升高($P<0.05$);与 db/db 模型组比较,db/db+黄诺玛苷组小鼠 ACC1、SCD1 和 FASN mRNA 水平显著降低($P<0.05$)。

2.2.4 黄诺玛苷对小鼠肝脏蛋白水平的影响 与 db/m 组相比,db/db 模型组小鼠肝脏 SREBP 蛋白表达显著升高($P<0.05$),黄诺玛苷干预后显著降低($P<0.05$);与 db/db 模型组比较,db/db+黄诺玛苷组 FASN 表达下降($P<0.05$),PPARα、PPARγ 表达显著上调($P<0.05$,图 8)。



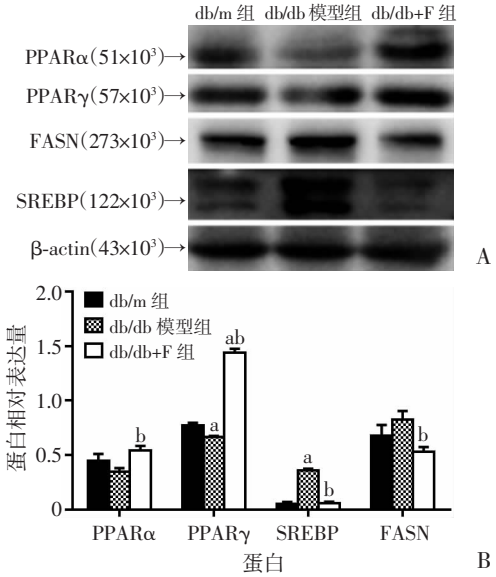
a:$P<0.05$,与 db/m 组比较;b:$P<0.05$,与 db/db 模型组比较

图 6　黄诺玛苷对 db/db 小鼠肝脏 GSSG(A)、GSH(B)、GSH/GSSG(C)水平的影响



a:$P<0.05$,与 db/m 组比较;b:$P<0.05$,与 db/db 模型组比较

图 7　黄诺玛苷对 db/db 小鼠肝脏脂代谢相关基因 mRNA 表达的影响



a:$P<0.05$,与 db/m 组比较;b:$P<0.05$,与 db/db 模型组比较

A:Western blot 检验结果;B:半定量分析结果

图 8　黄诺玛苷对 db/db 小鼠肝脏脂代谢相关蛋白表达的影响

2.3　黄诺玛苷对 FFAs 诱导的 HepG2 细胞脂代谢的机制研究

2.3.1　黄诺玛苷对 FFAs 干预 HepG2 细胞存活率的影响

2.3.1.1　不同浓度及时间 FFAs 对肝癌 HepG2 细胞存活率的影响　　随着 FFAs 浓度增大及作用时间延长,HepG2 细胞的存活率逐渐降低。在 500 μmol/L 时存活率达到峰值,以后 FFAs 的抑制作用开始增加,且有时间依赖性(图 9)。

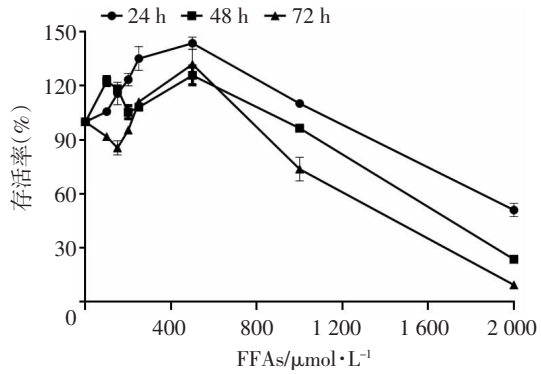


图 9　不同浓度 FFAs 作用不同时间对 HepG2 细胞生长的影响

2.3.1.2　不同浓度及时间黄诺玛苷对肝癌细胞 HepG2 存活率的影响　　细胞的存活率随黄诺玛苷的作用时间增长而下降,浓度在 25、50、100 μmol/L,干预 24 h 时存活率没有受到明显抑制(图 10)。

2.3.1.3　不同浓度及时间黄诺玛苷对 FFAs 诱导的肝癌细胞 HepG2 存活率的影响　　细胞的存活率在

黄诺玛苷给药 25、50、100 μmol/L 时没有受到明显抑制(图 11)。

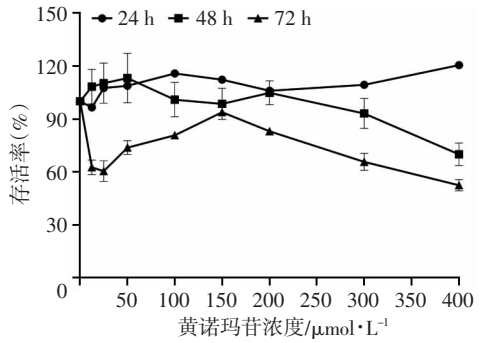


图 10　不同浓度黄诺玛苷作用不同时间对 HepG2 细胞生长影响

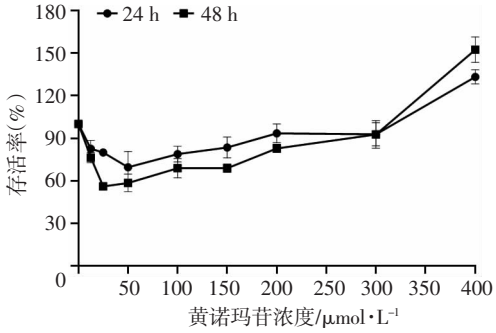
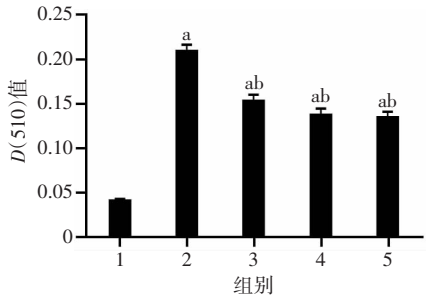


图 11　不同浓度黄诺玛苷作用不同时间对 FFAs 诱导的 HepG2 细胞生长影响

2.3.2　黄诺玛苷对 FFAs 诱导细胞内的脂质影响　与正常组相比,FFAs 组细胞内脂滴明显增多,黄诺玛苷给药组较模型组脂滴减少,甘油三酯含量有同样变化,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 12、13)。表明黄诺玛苷可降低 HepG2 细胞内脂质含量。

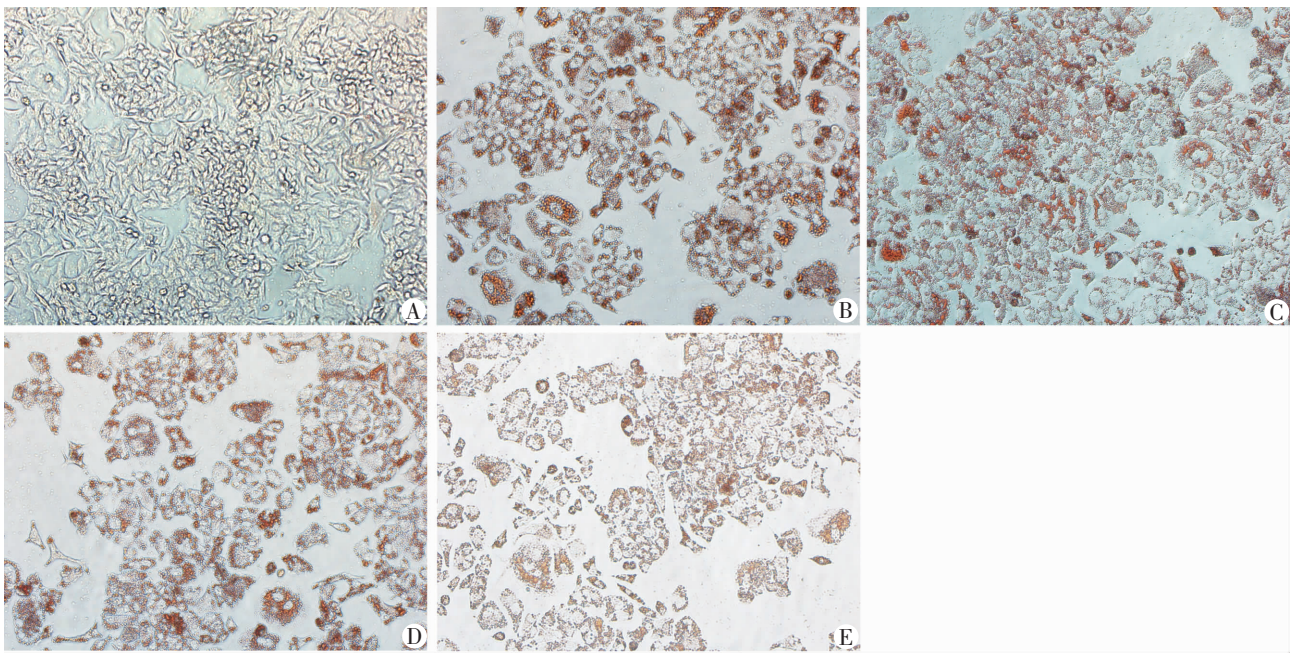


1:正常组;2:FFAs 组;3~5:分别为 FFAs+25、50、100 μmol/L 黄诺玛苷组;a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与 FFAs 组比较

图 12　各组 HepG2 细胞中 TG 水平的变化

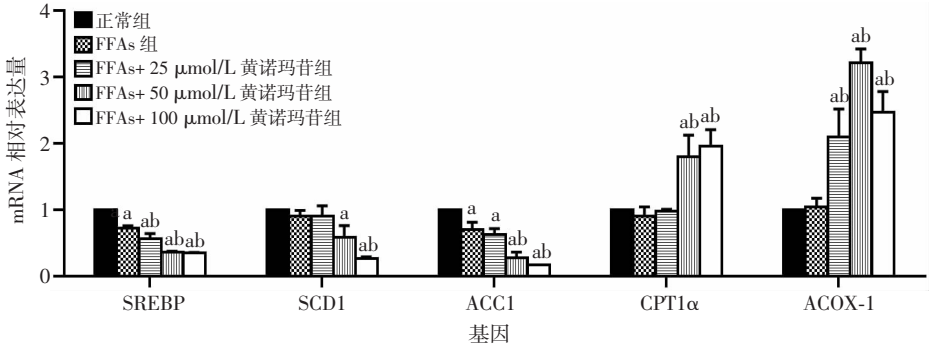
2.3.3　HepG2 细胞内 mRNA 水平　与正常组和 FFAs 组相比,黄诺玛苷给药组脂质合成相关基因 SREBP、SCD1、ACC1 表达显著下降($P<0.05$),而 β-氧化基因 CPT1α、ACOX-1 水平显著升高($P<0.05$,图 14)。

2.3.4　HepG2 细胞蛋白水平　与正常组相比,FFAs 组 FASN、SREBP 蛋白表达升高($P<0.05$),黄诺玛苷干预后均显著降低($P<0.05$,图 15)。



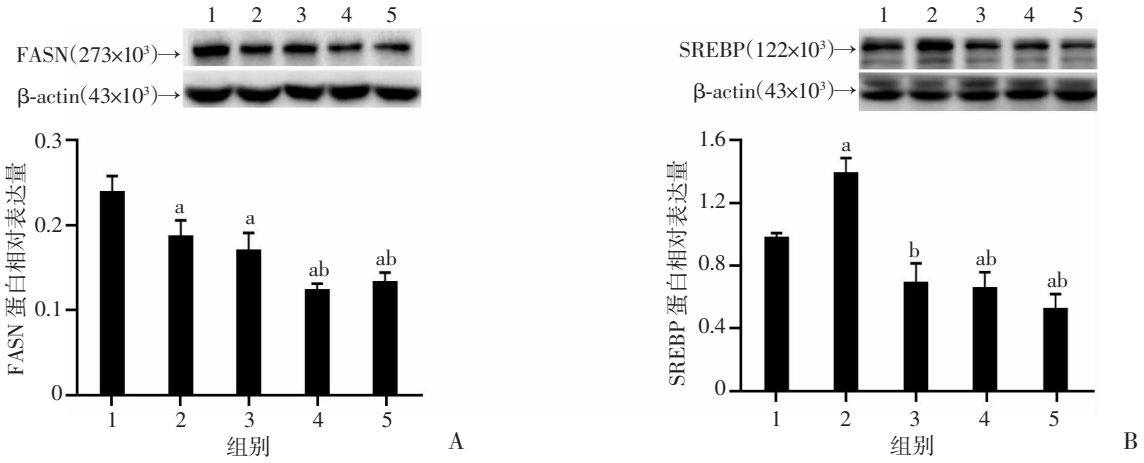
A:正常组;B:FFAs 组;C~E:分别为 FFAs+25、50、100 μmol/L 黄诺玛苷组

图 13　油红 O 染色观察各组 HepG2 细胞中脂滴变化　(×100)



a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与 FFAs 组比较

图 14 不同浓度黄诺玛苷对各组 HepG2 细胞脂代谢相关基因 mRNA 表达的影响



1:正常组;2:FFAs 组;3~5:分别为 FFAs+ 25、50、100 μmol/L 黄诺玛苷组;a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与 FFAs 组比较

图 15 不同浓度黄诺玛苷对各组 HepG2 细胞 FASN(A)、SREBP(B)蛋白表达的影响

3 讨论

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)代表一系列疾病,从单纯性脂肪变性或非酒精性脂肪肝(NAFL)到非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬化和肝细胞癌[21]。在过去几十年间,NAFLD 的患病率呈上升趋势,患病人群开始向儿童和青少年倾斜,成为全球慢性肝病的最常见原因[22-23]。NAFLD 常伴随动脉粥样硬化、糖尿病和慢性肾脏疾病发生,对全球医疗保健造成极大的经济负担[24]。因此,积极探索防治 NAFLD 的安全有效措施十分迫切。

NAFLD 发病机制十分复杂,目前尚未完全清楚。早期理论采用“两次击打学说”来描述,“初次击打”以肝脏脂肪增加为特征,主要是甘油三酯积累和胰岛素抵抗。随后,出现了“第二击”,以炎症因子、脂肪因子、线粒体功能障碍和氧化应激对肝脏的再次损伤,造成坏死性炎症和纤维化,最终导致肝硬化。然而,随着新技术发展和进一步研究,这种观点似乎过于简单,无法概括人类 NAFLD 的复杂性。现在,被广泛接受的理论是“多次击打模型”,由于遗传和环境因素的相互作用以及不同器官和组织(包括脂肪组织、胰腺、肠、肝)之间的串扰变化,涉及更广泛的代谢功能障碍。但是,由肥胖和胰岛素抵抗引起的肝脂肪蓄积似乎仍然代表着至关重要的“第一击”[25]。肝脏脂质代谢紊乱与脂质蓄积是 NAFLD 关键的发病诱因,在 NAFLD 病程中起着重要作用。黄诺玛苷是两色金鸡菊的主要单体化合物,具有多重药理作用。课题组前期研究发现黄诺玛苷经 Syk /TGF-β1/ Smad 信号通路促进了高糖刺激的人近端肾小管上皮细胞(HK-2)的增殖并抑制了上皮-间质转化,发挥抗糖尿病肾病的肾脏保护作用[11]。MENDEL 等[26]研究发现黄诺玛苷具有胃肠道保护、抗炎、抗溃疡和免疫调节作用。本研究利用网络药理学

工具发现黄诺玛苷可对某分子进行调节,有研究提示这些分子是治疗 NAFLD 的靶点,这些靶点被富集到 NAFLD 发生、发展的信号通路中[27-28]。

本研究筛选得出黄诺玛苷活性靶点 104 个,抗 NAFLD 潜在靶标 29 个;GO 功能和 KEGG 通路富集到 20 个生物过程,40 个信号通路。依据 $\log_{10}P$ 值越小,信号通路相关性越大,挑选出了 AMPK 调控的脂代谢通路,即最有可能阐述黄诺玛苷治疗 NAFLD 的分子机制。根据"核心靶点-通路"网络图,节点形状越大,占比面积越大,发挥作用越大。黄诺玛苷对接 NAFLD 的核心靶点中过氧化物酶体增殖物激活受体家族蛋白(PPARγ)的占比最大,所以本研究以 PPARγ 为主要靶点对黄诺玛苷抗 NAFLD 进行机制研究。黄旦等[29]研究发现 PPARγ 可活化 AMPK/FOXO3a 信号通路,抑制免疫炎症反应,改善动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)患者氧化应激。本研究结果显示:在黄诺玛苷干预后,小鼠肝脏 PPARγ 蛋白、GSH 的含量显著上升,表明黄诺玛苷在肝脏中发挥了一定的抗氧化作用。激活 PPARγ 后还可启动下游 LXRα 基因的转录与翻译[30]。LXRα 是一种细胞核受体,参与甘油三酯和胆固醇的合成与分解过程,促进胆固醇向胆汁酸转化,最终以胆汁形式排出体外,在维持胆固醇稳定过程中起关键作用。LXRα 可通过调控 SREBP 的转录参与下游多种脂肪合成酶的合成。SREBP 是固醇调节元件结合蛋白家族的成员之一,是肝脏调节脂质合成的主要转录因子[31]。其过表达后可异常激活下游参与脂质合成的脂肪酸合成酶(FASN)和乙酶辅酶 A 羟化酶(ACC),进而导致肝脏内脂质的过度沉积,引起脂代谢的紊乱[32]。本研究显示,模型组小鼠肝脏病理学表现为肝细胞膨胀,出现空泡气球样变化和脂滴堆积;且模型组的 TG 水平较正常组显著升高。在黄诺玛苷干预后,HE 和油红 O 染色显示肝细胞大小恢复正常,气球样变减少,仅有小部分轻微脂肪浸润,TG 含量与正常组无明显差异。与模型组相比,黄诺玛苷干预组中脂质合成相关的基因 FASN、SCD1、ACC1 mRNA 水平及蛋白 SREBP、FASN 表达水平显著降低,而 β-氧化相关基因 ACOX-1、CPT1α 表达升高,差异均有统计学意义。表明黄诺玛苷可减少高脂喂养小鼠肝脏中 TG 的异位沉积,降低脂质合成基因的表达,上调 β-氧化相关基因,对小鼠的 NAFLD 脂代谢紊乱有改善作用。以上研究结果表明,黄诺玛苷对 NAFLD 小鼠的防治发挥了重要作用。

为提供更多实验证据,本研究通过构建 HepG2 肝癌细胞脂肪变性模型,模拟 NAFLD 发生时脂质蓄积对其的损伤作用,探究黄诺玛苷对非酒精性脂肪肝体外模型的改善作用。首先,油红 O 染色结果观察到黄诺玛苷可以减少 HepG2 细胞内脂质蓄积,定量结果也发现黄诺玛苷干预后细胞内 TG 含量显著降低。qRT-PCR 检测相关基因显示:黄诺玛苷能降低脂质合成基因 SREBP、SCD1、ACC1 的表达,提高 CPT1α、ACOX-1 mRNA 水平。Western blot 检测蛋白表达显示:黄诺玛苷能降低 FASN 及 SREBP 蛋白表达水平。表明黄诺玛苷可通过抑制 FASN、SREBP 的基因和蛋白表达来调控 TG 的合成,提高 CPT1α、ACOX-1 表达来增加脂肪酸的 β-氧化,与动物体内研究结果相一致。

综上所述,本研究结果表明两色金鸡菊单体化合物黄诺玛苷可能通过调控 PPARγ/SREBP/FASN 改善肝脏氧化应激,增加脂肪酸 β-氧化,减少脂质合成,从而对 NAFLD 发挥治疗作用。本研究为两色金鸡菊治疗 NAFLD 提供了理论依据,然而其具体作用机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 邵幼林,范建高. 非酒精性脂肪性肝病的流行现状与危害[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(1): 10-13. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2019.01.004.
SHAO Y L, FAN J G. Prevalence and harm of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Clin J Hepatol, 2019, 27(1): 10-13. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2019.01.004.

[2] HUANG Y, LANG H, CHEN K, *et al*. Resveratrol protects against nonalcoholic fatty liver disease by improving lipid metabolism and redox homeostasis *via* the PPARα pathway[J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2020, 45(3): 227-239. DOI:10.1139/apnm-2019-0057.

[3] 高燕翔, 张勇, 刘裕, 等. SREBP-1c 在白藜芦醇预防大鼠非酒精性脂肪肝发生中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(17): 1704-1708. DOI:10.16016/j.1000-5404.201412125.
GAO Y X, ZHANG Y, LIU Y, *et al*. SREBP-1c is involved in preventive effect of resveratrol on pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in rats[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(17): 1704-1708. DOI:10.16016/j.1000-5404.201412125.

[4] 瞿璐, 王涛, 董勇喆, 等. 菊花化学成分与药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(1): 98-104. DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2015.01.019.

QU L, WANG T, DONG Y Z, *et al*. Research progress on chemical constituents of Chrysanthemum morifoliuin and their pharmacologic activities[J]. Drug Eval Res, 2015, 38(1): 98-104. DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2015.01.019.

[5] YAO L, LI J, LI L, *et al*. Coreopsis tinctoria Nutt ameliorates high glucose-induced renal fibrosis and inflammation *via* the TGF-β1/SMADS/AMPK/NF-κB pathways[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 14. DOI: 10.1186/s12906-018-2410-7.

[6] 阿力腾布鲁克, 李琳琳, 王丽凤, 等. 两色金鸡菊提取物及其单体化合物体外抗凝血作用的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(3): 368-371,377. DOI:10.3969/j.issn.1009-5551.2019.03.021.
ALITENGBULUKE, LI L L, WANG L F, *et al*. Study on anticoagulant effect of extracts from Coreopsis tinctoria Nutt and its monomers *in vitro*[J]. J Xinjiang Med Univ, 2019, 42(3):368-371,377. DOI:10.3969/j.issn.1009-5551.2019.03.021.

[7] KIM H G, JUNG Y S, OH S M, *et al*. Coreolanceolins A-E, new flavanones from the flowers of coreopsis lanceolate, and their antioxidant and anti-inflammatory effects [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(6):539. DOI: 10.3390/antiox9060539.

[8] 毛新民, 韩雪, 卢伟, 等. 两色金鸡菊对糖尿病小鼠血糖、血脂的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 78-82.
MAO X M, HAN X, LU W, *et al*. Effect of the ethyl acetate extract from Coreopsis tinctoria nutt. on fasting blood levels and blood lipids in diabetic mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2014, 30(2):78-82.

[9] 毛新民, 卢伟, 李琳琳, 等. 两色金鸡菊化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(4): 235-239.
MAO X M, LU W, LI L L, *et al*. The progress of chemical constituents and pharmacological action of Coreopsis tinctoria Nutt[J]. Chin J Drug Appl Monit, 2014, 11(4):235-239.

[10] 张旭华, 王烨, 李琳琳, 等. 两色金鸡菊提取物对胰岛素抵抗小鼠肠道菌群的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(6): 786-791. DOI:10.3969/j.issn.1009-5551.2020.06.023.
ZHANG X H, WANG Y, LI L L, *et al*. Effect of extract from Coreopsis tinctoria Nutt on the intestinal microbiota in insulin resistant mice[J]. J Xinjiang Med Univ, 2020, 43(6):786-791. DOI:10.3969/j.issn.1009-5551.2020.06.023.

[11] ZHANG N N, KANG J S, LIU S S, *et al*. Flavanomarein inhibits high glucose-stimulated epithelial-mesenchymal transition in HK-2 cells *via* targeting spleen tyrosine kinase [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 439. DOI: 10.1038/s41598-019-57360-4.

[12] LE L, FU H, LV Q, *et al*. The protective effects of the native flavanone flavanomarein on neuronal cells damaged by 6-OHDA[J]. Phytomedicine, 2019, 53: 193-204. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.09.005.

[13] 张永威, 李新霞, 王敬伟, 等. 两色金鸡菊中马里苷和黄诺玛苷的制备及其均匀性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(3): 340-343. DOI:10.3969/j.issn.1009-5551.2020.03.024.
ZHANG Y W, LI X X, WANG J W, *et al*. Preparation of certified reference material and the homogeneity of flavanomarein and marein from Coreopsis trinctoria Nutt[J]. J Xinjiang Med Univ, 2020, 43(3):340-343. DOI:10.3969/j.issn.1009-5551.2020.03.024.

[14] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. Swiss-target prediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364. DOI:10.1093/nar/gkz382.

[15] KIM S, CHEN J, CHENG T J, *et al*. PubChem 2019 update: improved access to chemical data[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D1102-D1109. DOI: 10.1093/nar/gky1033.

[16] PIÑERO J, RAMÍREZ-ANGUITA J M, SAÜCH-PITARCH J, *et al*. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1): D845-D855. DOI:10.1093/nar/gkz1021.

[17] CONSORTIUM T U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 47(D1): D506-D515. DOI: 10.1093/nar/gky1049.

[18] MARTIN A, OCHAGAVIA M E, RABASA L C, *et al*. BisoGenet: a new tool for gene network building, visualization and analysis[J]. BMC Bioinform, 2010, 11: 91. DOI:10.1186/1471-2105-11-91.

[19] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, *et al*. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523. DOI:10.1038/s41467-019-09234-6.

[20] OTASEK D, MORRIS J H, BOUÇAS J, *et al*. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis [J]. Genome Biol, 2019, 20(1): 185. DOI: 10.1186/s13059-019-1758-4.

[21] DE A, DUSEJA A. Natural history of simple steatosis or

nonalcoholic fatty liver[J]. J Clin Exp Hepatol, 2020, 10(3): 255-262. DOI:10.1016/j.jceh.2019.09.005.

[22] ARSHAD T, GOLABI P, HENRY L, *et al*. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in North America[J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(10): 993-997. DOI: 10.2174/1381612826666200303114934.

[23] 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. DOI: 10.1136/archdischild-2019-318063.

[24] KUMAR R, PRIYADARSHI R N, ANAND U. Non-alcoholic fatty liver disease: growing burden, adverse outcomes and associations[J]. J Clin Transl Hepatol, 2020, 8(1): 76-86. DOI:10.14218/jcth.2019.00051.

[25] FANG Y L, CHEN H, WANG C L, *et al*. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model"[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(27): 2974-2983. DOI:10.3748/wjg.v24.i27.2974.

[26] MENDEL M, CHŁOPECKA M, LATEK U, *et al*. Evaluation of the effects of Bidens tripartita extracts and their main constituents on intestinal motility : An *ex vivo* study[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 259: 112982. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112982.

[27] CHYAU C C, WANG H F, ZHANG W J, *et al*. Antrodan alleviates high-fat and high-fructose diet-induced fatty liver disease in C57BL/6 mice model *via* AMPK/Sirt1/SREBP-1c/PPARγ pathway[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(1):360. DOI:10.3390/ijms21010360.

[28] LIU E, WANG X, LI X, *et al*. Co-exposure to multi-walled carbon nanotube and lead ions aggravates hepatotoxicity of nonalcoholic fatty liver *via* inhibiting AMPK/PPARγ pathway[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(14): 14189-14204. DOI: 10.18632/aging.103430.

[29] 黄旦, 刘健, 纵瑞凯, 等. 黄芩清热除痹胶囊激活PPARγ介导AMPK/FOXO3a信号通路改善强直性脊柱炎患者氧化应激[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 451-456. DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20190619.501.
HUANG D, LIU J, ZONG R K, *et al*. Huangqin Qingre Chubi Capsules in improving oxidative stress of patients with ankylosing spondylitis *via* activating PPARγmediated AMPK/FOXO3a pathway[J]. China J Chin Mat Med, 2020, 45(2):451-456. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20190619.501.

[30] JIA Q, CAO H, SHEN D, *et al*. Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of PCSK9, CD36, PPARγ, LXRα and ABCA1[J]. Int J Mol Med, 2019, 44(3): 893-902. DOI:10.3892/ijmm.2019.4263.

[31] ZHANG L, QIAO X, CHEN M, *et al*. Ilexgenin A prevents early colonic carcinogenesis and reprogramed lipid metabolism through HIF1α/SREBP-1[J]. Phytomedicine, 2019, 63: 153011. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.153011.

[32] LIN Q, HUANG Z, CAI G, *et al*. Activating AMP-activated protein kinase mediates fibroblast growth factor 1 protection from nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. Hepatology, 2020. DOI: 10.1002/hep.31568.

(**收稿**:2020-09-29;**修回**:2020-11-03)

(编辑 吴培红)