

# 基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 和网络药理学的桔梗治疗非酒精性脂肪肝病的机制研究

王璇<sup>1</sup>, 许伟辰<sup>1</sup>, 罗子宸<sup>1</sup>, 徐泳<sup>1</sup>, 时晨<sup>1</sup>, 谢彤<sup>1</sup>, 廖颖钊<sup>2</sup>, 单进军<sup>1,3</sup>

(1. 南京中医药大学中医儿科学研究所, 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学附属深圳市中医院, 广东 深圳 518033; 3. 江苏省中药高效给药系统工程中心, 江苏 南京 210023)

**摘要:**目的 结合 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术和网络药理学方法预测桔梗治疗非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的作用靶点及潜在的作用机制, 并进行相关实验验证, 为深入揭示桔梗治疗 NAFLD 的药效物质及作用机制奠定基础。方法 通过 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术及中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库筛选桔梗的活性成分; 使用 Swiss Target Prediction 数据库对桔梗的活性成分进行靶点预测; 同时通过 OMIM、Disgenet、TTD 等数据库获取 NAFLD 靶点; 将疾病相关靶点映射到化合物潜在靶点中, 获取公共靶点, 并将信息导入 Cytoscape 软件和 String 在线分析平台分别制作网络图和 PPI 图, 同时进行拓扑学分析; 基于 R 软件使用 Bioconductor 生物信息软件包进行关键靶基因 GO 与 KEGG 功能富集分析。构建 NAFLD 小鼠模型, 通过病理染色切片, qPCR 实验验证网络药理学富集分析结果。结果 结合质谱分析与数据库筛选结果, 共获得桔梗活性成分 13 个, 药物靶点 278 个, 疾病靶点 1 536 个, 共同靶点 83 个, 涉及 PI3K-AKT、胰岛素抵抗、TNF- $\alpha$ 、IL-17、JAK-STAT、T 细胞受体等信号通路。实验验证显示关键靶基因存在差异性表达。结论 该研究初步揭示了桔梗治疗 NAFLD 的活性成分及其作用机制, 为后续的深入研究提供了参考价值。

**关键词:** 桔梗; 非酒精性脂肪肝病; 网络药理学; 分子机制

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2021)04-0554-09

**DOI:** 10.14148/j.issn.1672-0482.2021.0554

**引文格式:** 王璇, 许伟辰, 罗子宸, 等. 基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 和网络药理学的桔梗治疗非酒精性脂肪肝病的机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(4): 554-562.

## UPLC/LTQ-Orbitrap-MS Combined with Network Pharmacology to Explore the Mechanism of *Platycodon Grandiflorum* in the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease

WANG Xuan<sup>1</sup>, XU Wei-chen<sup>1</sup>, LUO Zi-chen<sup>1</sup>, XU Yong<sup>1</sup>, SHI Chen<sup>1</sup>, XIE Tong<sup>1</sup>, LIAO Ying-zhao<sup>2</sup>, SHAN Jin-jun<sup>1,3</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Shenzhen, 518033, China; 3. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing, 210023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** Combining UPLC/LTQ-Orbitrap-MS technology with network pharmacology method to predict the target of *Platycodon grandiflorum* in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the potential mechanism, and carrying out relevant experimental verification, in order to reveal the effective substances and mechanism of *Platycodon grandiflorum* in the treatment of NAFLD. **METHODS** The active components of *Platycodon grandiflorum* were screened by UPLC/LTQ-Orbitrap-MS and TCMSP database. Swiss Target Prediction Database was used to predict the active components of *Platycodon grandiflorum*. Targets of NAFLD were obtained through OMIM, Disgenet, TTD and other databases. The disease-related targets were mapped to the potential targets of compounds to obtain the common targets, and the information was imported into Cytoscape software and String online analysis platform to make network diagram and PPI diagram, respectively, and topological analysis was carried out at the same time. Functional enrichment analysis of key target

**收稿日期:** 2021-04-11

**基金项目:** 江苏省“六大人才高峰”高层次人才选拔培养资助项目(YY-022); 江苏高校优势学科(中医学)建设工程资助项目(PAPD)

**第一作者:** 王璇, 女, 硕士研究生, E-mail: wangxuan15tt@163.com

**通信作者:** 单进军, 男, 教授, 主要从事代谢组学与中医药研究, E-mail: jshan@njucm.edu.cn;

廖颖钊, 男, 副主任医师, 主要从事中医儿科临床研究, E-mail: l.y.z@163.com

genes GO and KEGG was carried out by using Bioconductor bioinformatics software package based on R software. NAFLD mouse model was established, the results of network pharmacology enrichment analysis were verified by pathological staining and qPCR. **RESULTS** Combined with the results of mass spectrometry and database screening, a total of 13 active components, 278 drug targets, 1 536 disease targets and 83 common targets were screened in Platycodon, involving PI3K-AKT, insulin resistance, TNF- $\alpha$ , IL-17, JAK-STAT, T cell receptors and other signaling pathways. Experimental verification showed that the key target genes were differentially expressed. **CONCLUSION** This study reveals the active components of *Platycodon grandiflorum* in the treatment of NAFLD and its mechanism of action, it provides reference value for further research. **KEYWORDS:** *Platycodon grandiflorum*; non-alcoholic fatty liver disease; network pharmacology; molecular mechanism

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)作为一种常见的肝脏疾病,是代谢综合征在肝脏的疾病表现,是肥胖、胰岛素抵抗、2 型糖尿病、高血压和高脂血症等相关疾病的集中反映<sup>[1-2]</sup>。NAFLD 已成为 21 世纪全球重要的公共健康问题之一,亦是我国最常见的肝脏疾病,但尚未引起足够重视<sup>[3]</sup>。NAFLD 因患病率高、低龄化发展趋势、慢性进展性成为隐性肝硬化的重要成因,与肝癌发生有关,是肝功能衰竭的原因之一,因而临床防治价值凸显<sup>[4]</sup>。

中医学对 NAFLD 多从症状、病因病机等方面命名,2017 年发布的《非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见》将其归属于“胁痛”“痞满”“肝胀”“痰证”“痰浊”“湿阻”“瘀证”等范畴<sup>[5]</sup>。

桔梗是药食同源的中药,《本草崇原》记载“桔梗,治少阳之胁痛”<sup>[6]</sup>;《本经》云“桔梗主胸胁痛如刀刺”<sup>[7]</sup>。现代药理研究表明,桔梗中富含的桔梗皂苷和桔梗多糖等成分具有抗氧化和消炎功效,可以通过介导小鼠的脂肪生成,抑制脂质过氧化和抗炎作用对酒精性肝炎和非酒精性脂肪性肝炎起到治疗作用<sup>[8]</sup>。

网络药理学是从系统水平分析药物作用机制,通过构建药物-靶点-疾病网络来分析药物的作用机制<sup>[9]</sup>。本研究采用 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术及网络药理学方法预测桔梗治疗 NAFLD 可能的药效物质基础和作用靶点,并进行了相关实验验证,以期为后续的研究提供参考(图 1)。

## 1 材料

### 1.1 仪器与试剂

LTQ Orbitrap XL 型串联质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);Ulti Mate 3000 型超高效液相色谱(美国 Thermo Fisher 公司);MJ mini 梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);DMIL 倒置显微镜(德国 Leica 公司);高脂饲料(Research Diets D12492);甘油三酯(TG)试剂、总胆固醇(TC)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;甲醇(色谱纯,美国 Supelco

公司),水为超纯水。

### 1.2 数据库及软件

Xcalibur 2.1 SP1 数据处理系统(美国 Thermo Fisher 公司),Mass Frontier 7.0 软件,TCMSP 数据库(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>),Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),OMIM 数据库(<https://omim.org/>),Disgenet 数据库(<https://www.disgenet.org/>),TTD 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>),String 数据库(<https://string-db.org/>),Venny2.1 在线软件作图工具平台(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>),Cytoscape 3.7.2 软件,R3.6.1 软件等。

### 1.3 实验动物

雄性 C57BL/6J 小鼠 18 只,8 周龄,体质量 20~25 g,由北京维通利华有限公司提供,于南京中医药大学动物中心 SPF 级动物饲养房适应性饲养 1 周,温度(22±2)℃,湿度(75±5)%,清洁饮水,昼夜控制各 12 h。所有动物实验设计和方案均获得南京中医药大学动物伦理委员会同意和批准(伦理批号:202005A001)。

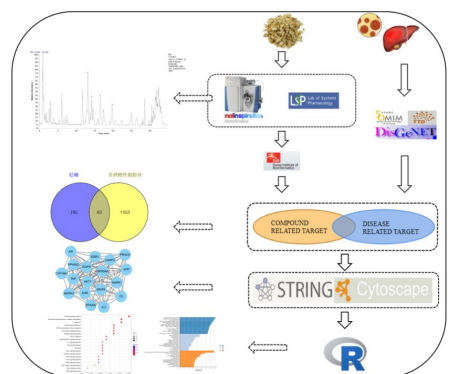


图 1 研究设计流程图

## 2 方法

### 2.1 桔梗水提液制备

桔梗 10 g,加水 200 mL,浸泡 1 h 后煎煮 2 h,取

药液进行减压浓缩(75 ℃),药液体积浓缩至原有的 1/3,加入 95%乙醇,调节药液乙醇浓度为 70%,于 4 ℃冰箱内静置 24 h 后去除沉淀,药液在 45 ℃下减压浓缩回收乙醇后,−80 ℃保存备用。

## 2.2 桔梗水提液化学成分分析

### 2.2.1 色谱条件

色谱柱: Accucore™ C<sub>18</sub> (150 mm×2.1 mm, 2.6 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司),流动相: A(0.1%甲酸水溶液)-B(0.1%甲酸乙腈溶液),梯度洗脱条件: 0~1 min, 21%B; 1~9 min, 21%→23%B; 9~15 min, 23%B; 15~25 min, 23%→23.5%B; 25~28 min, 23.5%→40%B; 28~29.5 min, 40%→90%B; 29.5~31 min, 90%B; 31~32 min, 90%→21%B; 32~35 min, 21%B; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 1 μL。

### 2.2.2 质谱条件

LTQ Orbitrap XL 型串联质谱仪,采用正/负离子检测模式的 ESI 电离方式, *m/z* 采集范围为 120~1 600,采集时间为 0~35 min。主要质谱参数: 毛细管温度 300 ℃,蒸发器温度 300 ℃,鞘气 275 kPa,辅助器 104 kPa,喷雾电压 3.5 kV,源电流 100 μA,毛细管电压 35 V,管状透镜电压 100 V。

### 2.2.3 供试品溶液的制备

精密移取“2.1”项下桔梗水提液 1 mL,加入 9 mL 甲醇稀释混匀后,超声 10 min,静置过夜,隔天于 18 000 r/min 离心 5 min,取上清,备用。

### 2.2.4 桔梗水提液化学成分的表征

根据 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 分析得到桔梗提取物总离子流图。根据总离子流图所得到的化合物精确分子量、二级碎片信息,和相关文献相对比,获得主要成分信息。

## 2.3 网络药理学分析

### 2.3.1 桔梗活性成分的筛选

在 TCMSP 数据库中设定生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18,对桔梗的活性成分进行筛选,结合“2.2.4”质谱分析得到的结果,确定桔梗的潜在活性成分,录入 Pubchem 数据库获得上述成分的 SDF 结构,导入 Swiss Target Prediction 数据库,取预测得分大于 0 的靶标作为药物靶点,整合去重后即得桔梗活性成分的对靶点。

### 2.3.2 非酒精性脂肪肝病靶点的筛选

以“non-alcoholic fatty liver disease”“non-alcoholic fatty liver disease”为关键词,分别在 OMIM、Disgenet、

TTD 数据库进行检索。

### 2.3.3 绘制网络图和 PPI 图

使用 Cytoscape 3.7.2 软件,构建药物-成分-靶点-疾病网络图,使用 Network Analyzer 功能对桔梗的主要活性成分进行分析。将上述药物-疾病共同靶点输入到 String 数据库中检索,设置蛋白种类为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值为 0.4,构建蛋白相互作用的 PPI 网络。将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.7.2 中,通过 Network Analyzer 工具进行拓扑分析,以 Degree, Betweenness centrality, Average shortest path length 和 Closeness centrality 这 4 个参数为参考标准,筛选出核心靶点。

### 2.3.4 富集分析

为了对靶基因的功能进行描述和注释,以及探究其作用的信号通路。基于 R 软件使用 Bioconductor 生物信息软件包以  $P < 0.05$ ,  $Q < 0.05$  进行关键靶基因 GO 与 KEGG 功能富集分析,并将结果以气泡图形式输出。GO 富集分析包括分子功能(Molecular function, MF)、生物学过程(Biological process, BP)、细胞学组分(Cellular components, CC)3 个部分。进行 KEGG 富集分析,筛选出桔梗治疗 NAFLD 的潜在作用信号通路。

## 2.4 实验验证

### 2.4.1 动物实验

18 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组、模型组和桔梗组,每组 6 只,空白组给予正常饲料,模型组给予高脂饲料,桔梗组给予高脂饲料的同时水饲桔梗水提液(合生药量 4.5 g/kg),连续喂养 12 周后,颈椎脱臼处死。

### 2.4.2 小鼠肝脏病理学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、TC 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号: 20210612, 20210611)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。

### 2.4.3 小鼠肝脏 mRNA 水平

采用 qPCR 检测肝脏组织 TNF、MAPK3、AKT1 mRNA 的表达,以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值表示基因相对表达量。引物信息见表 1,引物由上海生工生物技术有限公司合成。

## 2.5 统计学分析

使用 GraphPad Prism 软件,以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和多因素方差分析进行比较。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

表 1 引物序列

基因名	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
MAPK3	CAGCTCAACCACATTCTAGGTA	TCAAGAGCTTTGGAGTCAGATT
AKT1	TGCACAAACGAGGGGAATATAT	CGTTTCCTTGTAGCCAATAAAGG
TNF	ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA

### 3 结果

#### 3.1 桔梗的化学成分分析及吸收预测

采用 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术对桔梗的化学成分进行定性分析,根据化合物的一级、二级质谱信息,结合 Xcalibur 软件的精确相对分子质量数,对照品的标准图谱以及相关文献<sup>[10-11]</sup>,并结合 Mass Frontier 7.0 软件进行碎裂辅助推断和验证,对桔梗提取物图谱(图 2)中主要表征出的化学成分进行鉴定,将得到的化学成分根据 Lipinski 类药五原则,利用 Molinspiration 网站进行生物利用度预测,结果发现 6 个成分均可能被吸收(表 2)。桔梗的主要成分为三萜皂苷类,这些成分在正、负离子模

式下均有较好响应;桔梗在正、负离子模式下色谱峰基本上是一致的,因此,本文只选择了在负离子模式下的 TIC 进行分析。

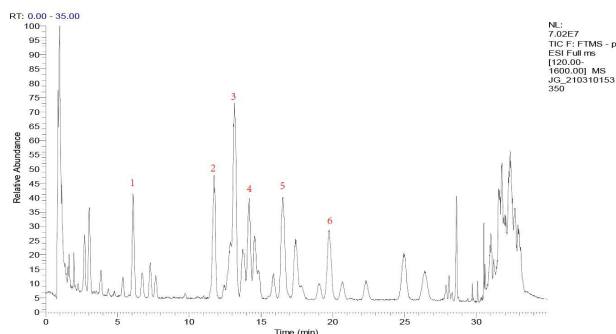


图 2 桔梗水提液在负离子模式下的 TIC

表 2 负离子模式下部分化合物的鉴定

No.	$t_R$ /min	加和离子	$m/z$ 实测值	$m/z$ 理论值	分子式	化合物名称	$\delta$	碎片离子
1	3.04	$[M-H]^-$	1 547.677 98	1 547.674 78	$C_{69}H_{112}O_{38}$	桔梗皂苷 E (Platycoside E)	1.356	1 457.657 48, 1 005.555 79, 987.701 05
2	11.73	$[M-H]^-$	1 091.528 32	1 091.526 88	$C_{52}H_{84}O_{24}$	去芦糖桔梗皂苷 D (Deapio-platycodin D)	0.315	681.558 23, 723.400 57, 663.493 41
3	13.13	$[M-H]^-$	1 223.569 7	1 223.569 14	$C_{57}H_{92}O_{28}$	桔梗皂苷 D (Platycodin D)	0.459	681.647 10, 469.152 44, 1 133.567 88
4	14.18	$[M-H]^-$	1 265.580 04	1 265.579 7	$C_{59}H_{94}O_{29}$	桔梗皂苷 C (Platycodin C)	-0.284	1 223.612 31, 1 205.595 95, 723.381 04
5	16.51	$[M-H]^-$	1 237.548 58	1 237.548 4	$C_{57}H_{90}O_{29}$	桔梗二酸 A (Platycinic acid A)	0.143	1 207.483 64, 1 027.451 42, 485.282 23
6	19.74	$[M-H]^-$	1 265.580 08	1 265.579 7	$C_{59}H_{94}O_{29}$	桔梗皂苷 A (Platycodin A)	-0.569	1 223.518 80, 1 205.570 07, 723.426 82

#### 3.2 网络药理学分析结果

3.2.1 桔梗活性成分 以  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18\%$  作为活性成分筛选条件,得到 7 个活性成分,再与 3.1 中定性分析得到的成分进行综合分析,共获得 13 个活性成分,分别是 Dihydroquercetin、Spinasterol、Dimethyl-2-O-methyl-3-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl platycogenate A、Luteolin、Acacetin、Platycodin A、2-O-Methyl-3-O-beta-D-glucopyranosyl platycogenate A、Platycodin D、Robinin、Platycodin C、Deapio-platycodin D、Platycoside E、Platycoside H/Platycinic acid A。其中 OB 反映药物进入人体循环的药量比例,描述口服药物由胃肠道吸收后经过肝脏到达体循环血液中的药量占口服剂量的百分比,

DL 指化合物与已知药物的相似性。

3.2.2 桔梗活性成分治疗 NAFLD 公共靶点 经过数据库筛选共获得桔梗相关靶点 278 个,NAFLD 相关靶点 1 536 个,在 Venny 2.1 在线软件作图工具平台上输入上述靶点,绘制韦恩图,两者取交集后获得药物-疾病共同靶点 83 个(图 3)。

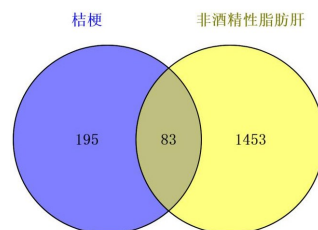


图 3 桔梗治疗 NAFLD 潜在靶点的韦恩分析

3.2.3 PPI 网络的构建及核心靶点筛选 将上述药物-疾病共同靶点输入到 String 数据库中进行检索,设置蛋白种类为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值为 0.4,构建蛋白相互作用(PPI)网络(图 4)。

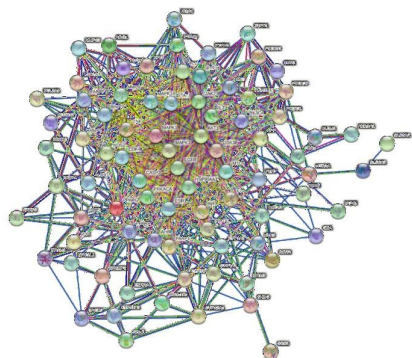


图 4 交集基因 PPI 网络图

将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.7.2 中,通过 Network Analyzer 工具进行拓扑分析,以 Degree, Betweenness centrality, Average shortest path

length 和 Closeness centrality 这 4 个参数为参考标准,通过 Degree 排序,选取分值大于平均分的基因作为核心靶点,将前 30 个靶点使用 R 3.6.1 绘制条形图(图 5)。核心靶点信息见表 3。

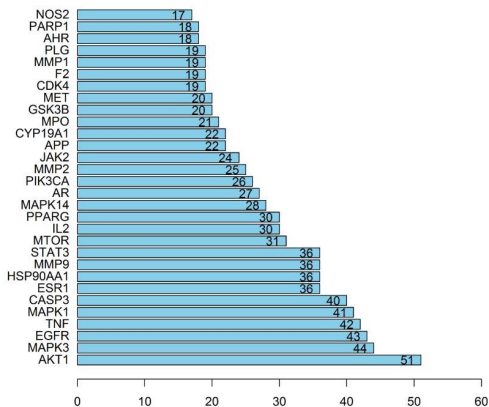


图 5 基于 PPI 拓扑分析的核心靶点排序(排名前 30)

表 3 核心靶点信息

基因名称	蛋白名称	基因 ID
AKT1	RAC-alpha serine/Threonine-protein kinase	P31749
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	P27361
EGFR	Epidermal growth factor receptor	P00533
TNF	Tumor necrosis factor Tumor necrosis factor	P01375
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	P20482
CASP3	Caspase-3	P42574
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	P40763
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	P07900
ESR1	Estrogen receptor	P03372
MMP9	Matrix metalloproteinase-9	P14780
MTOR	Serine/threonine-protein kinase mTOR	P42345
IL-2	Interleukin-2	P60568
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	P37231
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	Q16539
AR	Androgen receptor	P10275
PIK3CA	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform	P42336
MMP2	72 kDa type IV collagenase	P08253
JAK2	Tyrosine-protein kinase JAK2	O60674
CYP19A1	Aromatase	P11511
APP	Amyloid-beta A4 protein N-APP	P12023
MPO	Myeloperoxidase	P05164
GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta	P49841
MET	Hepatocyte growth factor receptor	P08581
MMP1	Interstitial collagenase	P03956
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	P11802
F2	Prothrombin	P00734

(续表)

基因名称	蛋白名称	基因 ID
PLG	Plasminogen	P00747
AHR	Aryl hydrocarbon receptor	P35869
PARP1	Poly[ADP-ribose] polymerase 1	P09874
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Q07869

3.2.4 GO 富集分析 将 83 个共同靶点经 R 语言运行后 GO 分析选取 MF、BP、CC3 部分(图 6A)。GO 结果显示,交集基因集合共富集到 1 642 条 BP 通路,46 条 CC 表达过程,85 个与 MF 相关的过程。

3.2.5 KEGG 富集分析 将 83 个共同靶点经 R 语言运行后共得到 141 条 KEGG 通路,前 20 的结

果形成 KEGG 功能富集的气泡图(图 6B),*P* 值代表富集的显著性,颜色越红则显著性越高。KEGG 结果显示 PI3K-AKT 信号通路、TNF 信号通路、PPAR 信号通路和 MAPK 信号通路等与非酒精性脂肪肝关系密切。见图 7。

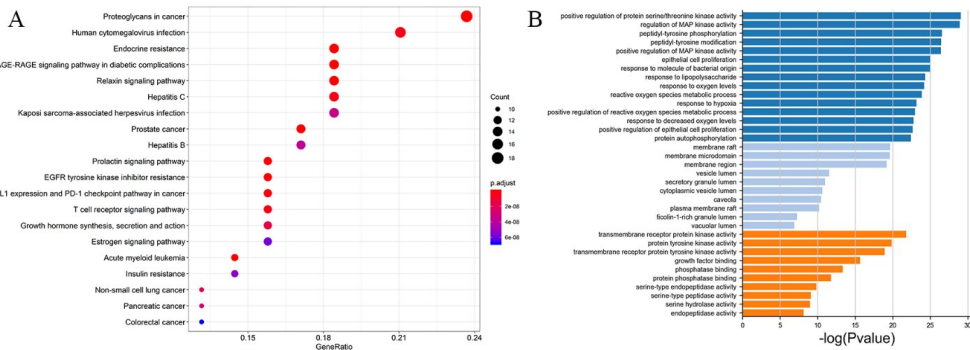


图 6 富集分析结果

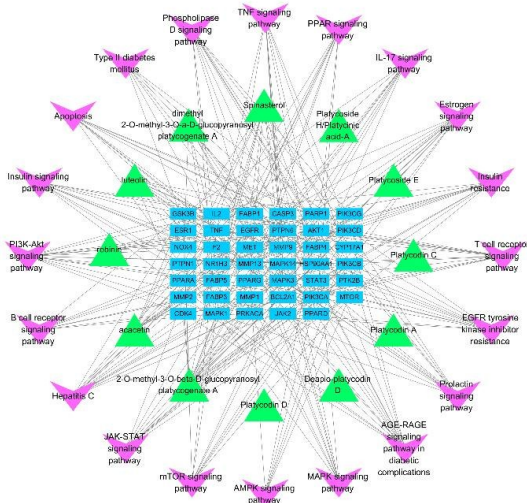


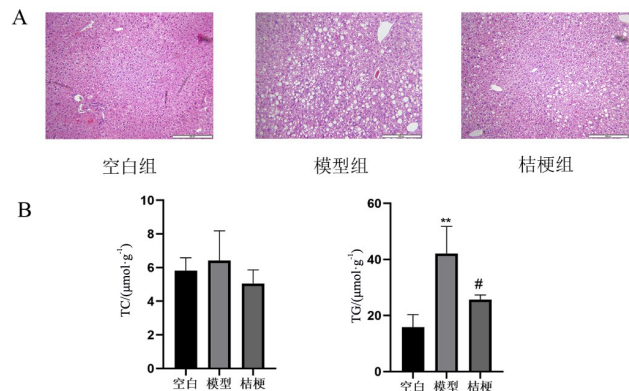
图 7 潜在活性成分-靶点-通路网络图

### 3.3 桔梗对 NAFLD 小鼠模型的影响

3.3.1 小鼠肝脏病理学观察 HE 染色结果显示(图 8A),光镜下可见空白组小鼠肝脏切片细胞形态规则,细胞质均匀,细胞核清晰,无脂肪滴;模型组肝细胞排列紊乱,细胞膨胀,部分细胞核破损,出现空泡气球样变及脂质沉积;与模型组相比,桔梗组细胞质、核清晰可见,未见空泡样变性、细胞坏死,肝细胞

受损情况明显好转。

3.3.2 小鼠肝脏生化指标检测 检测小鼠肝脏中 TC、TG 含量(图 8B),与空白组比较,模型组小鼠肝脏 TG 水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,桔梗组小鼠肝脏 TG 水平显著降低( $P < 0.05$ )。各组小鼠肝脏中 TC 水平变化趋势与 TG 一致,但没有统计学差异( $P > 0.05$ )。



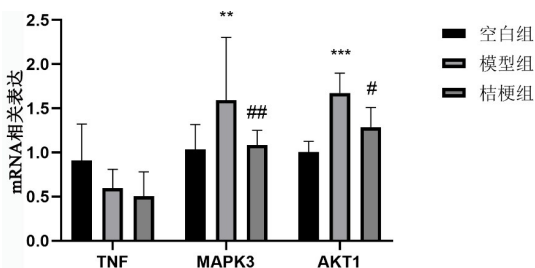
注:与空白组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,

#  $P < 0.05$ 。  $\bar{x} \pm s, n = 3$ 。

图 8 小鼠肝脏 HE 染色及 TC、TG 含量

3.3.3 小鼠肝脏中靶基因表达 通过 qPCR 检测

网络药理学富集分析结果中通路关键靶点基因表达情况,选取排名靠前的 3 个靶基因进行实验。与空白组相比,模型组小鼠肝脏 MAPK3 和 AKT1 mRNA 表达水平显著上升( $P < 0.01$ );与模型组相比,桔梗组小鼠肝脏 MAPK3 和 AKT1 mRNA 表达水平显著下降( $P < 0.05$ )。小鼠肝脏中 TNF mRNA 表达水平变化趋势与 MAPK3 和 AKT1 mRNA 一致,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 9。



注:与空白组比较, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。  $\bar{x} \pm s, n = 3$ 。

图 9 各组小鼠肝脏中关键靶基因表达情况

#### 4 讨论

NAFLD 是肝功能异常和慢性肝病最常见的原因,成人 NAFLD 患病率约为 20%~33%。随着全球肥胖症和代谢综合征人数日益增长,亚洲国家近 20 年来 NAFLD 增长迅速且呈低龄化发病趋势<sup>[12-14]</sup>。研究表明,到 2030 年,中国 NAFLD 患者总数将增至 3.1458 亿,是全球患病率增长最快的国家<sup>[15]</sup>,这必将给我国健康医疗服务带来沉重负担。遗憾的是,现代医学目前对 NAFLD 的治疗尚无特效药物<sup>[16]</sup>。

研究发现药食同源的桔梗对多种药物性肝损伤模型都有治疗作用<sup>[17]</sup>。桔梗水煎液可以抑制四氯化碳导致的肝脏毒性,其机制与清除氧自由基相关<sup>[18]</sup>;水煎液还能减轻四氯化碳诱导的肝纤维化,其机制主要是激活肝星状细胞<sup>[19]</sup>;桔梗根部分离的皂苷可以保护由过氧化叔丁醇造成的肝毒性,与其清除氧自由基和保护细胞免受氧化应激反应有关<sup>[20]</sup>;桔梗水提取物能保护由乙酰氨基酚引起的肝损伤,与阻断肝药酶对乙酰氨基酚的生物激活相关<sup>[21]</sup>。

本文采用 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术对桔梗水提取物的主要成分进行分析,主要表征出 6 个三萜皂苷类化学成分。再结合 TCMS 数据库中活性成分共获得 13 个活性成分进行分析。通过活性成分-靶点-通路关系网络的搭建、拓扑参数的分析及生物通路的信息挖掘对桔梗抗 NAFLD 的化学成

分、潜在作用靶点及其分子机制进行富集分析。结果显示 PI3K-AKT、AGE-RAGE、丙型肝炎、催乳素、雌激素、EGFR、细胞凋亡、胰岛素抵抗、TNF- $\alpha$ 、IL-17、JAK-STAT、T 细胞受体等可能为桔梗抗 NAFLD 的潜在作用机制。

本研究基于拓扑参数分析发现桔梗皂苷 D (Platycodin D)、木犀草素 (Luteolin)、金合欢素 (Acacetin)、二氢槲皮素 (Dihydroquercetin) 等可能为桔梗水提取物治疗 NAFLD 的重要活性成分。桔梗皂苷 D 通过激活 SIRT1 和 CaMKK $\beta$ /AMPK 信号通路,抑制 SREBP-1c 的表达来抑制脂肪的生成<sup>[22]</sup>。木犀草素能通过抑制 JNK 磷酸化,降低肝细胞氧化应激,保护线粒体功能,抵抗 DNA 断裂诱发细胞凋亡,从而达到保护过量对乙酰氨基酚导致的肝细胞损伤以及高脂饲料诱导的肝脏脂肪变性<sup>[23-24]</sup>。金合欢素能明显上调肝细胞和肝组织中转录因子 SREBP-2 的蛋白水平,改善肝细胞脂质代谢<sup>[25]</sup>。此外,金合欢素还可以增强大鼠肝组织匀浆和血浆中谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶的活性,可以显著清除 DPPH 自由基,有效减弱体外的脂质过氧化反应,从而达到治疗肝损伤的目的<sup>[26]</sup>。二氢槲皮素可以通过抑制 Caspase-3、Caspase-7 和 Caspase-8 的活化来保护 HepG2 细胞免受 TNF- $\alpha$ /ActD 诱导的细胞凋亡<sup>[27]</sup>;可以通过调节酶活和减少活性氧的积累来改善机体氧化,激活 LKB1 基因的表达,增强 AMPK 磷酸化来调节胆固醇调节元件结合蛋白 SREBP1 和 ACC 的表达<sup>[28]</sup>;还可以上调 SIRT1(负责去乙酰化)的表达,下调 P2X7R(负责促炎因子的合成与释放)和 NLRP3 等转录因子的表达,从而起到抑制脂肪生成和保肝的功效<sup>[29]</sup>。

NAFLD 发病机制非常复杂,其进展可能涉及“平行多次打击”损伤的发生,其特征是氧化应激诱导的线粒体功能障碍,目前认为高脂饮食、胰岛素抵抗、氧化应激、炎症介质和细胞因子是重要诱因<sup>[30-31]</sup>。其中胰岛素是调控机体内部糖与脂类代谢的重要激素,胰岛素抵抗被认为是发生 NAFLD 和代谢综合征的中心环节<sup>[32]</sup>。

富集分析发现 PI3K/AKT 是桔梗抗 NAFLD 最相关的信号通路。确实,PI3K/AKT 作为传递胰岛素信号的关键通路,通过调控胰岛素水平参与体内的糖脂代谢。而各种因素导致的 PI3K/AKT 信号传导障碍,均可引起胰岛素抵抗,从而促进 NAFLD 的发生与发展<sup>[33]</sup>。研究资料表明<sup>[34]</sup>,人体

内的胰岛素主要通过 PI3K-AKT 信号通路来维持糖脂代谢的平衡。胰岛素是在胰岛  $\beta$  细胞刺激下分泌的一种激素,它能调控机体内的糖脂代谢,从而维持平衡。机体内的胰岛素到达作用的组织器官后,首先与胰岛素受体(InsR)的  $\alpha$  亚基结合,诱导  $\beta$  亚基的酪氨酸蛋白激酶(PTK)被激活,随后 PTK 又使 InsR 的底物磷酸化,继而活化它的催化亚基 p110,随后生成 PIP3,与 PDK1 结合并激活 3 种已知的 AKT 异构体,AKT 被激活后从质膜上释放出来,转移到胞核、胞质和线粒体中<sup>[35]</sup>。

综上所述,本研究基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术对桔梗水提取物中化学成分进行鉴定,结合网络药理学方法预测桔梗治疗 NAFLD 的主要化学成分和潜在作用机制,充分体现了桔梗多成分、多靶点、多通路的系统调控特点;同时通过体内实验对网络药理学富集分析得到的排名前 3 的关键靶基因 TNF、MAPK3、AKT1 做了初步验证,为进一步探讨桔梗治疗 NAFLD 的物质基础和作用机制提供一定参考依据。

#### 参考文献:

- [1] BYRNE CD, TARGHER G. NAFLD: A multisystem disease [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(S1): 47-64.
- [2] FRIEDMAN SL, NEUSCHWANDER-TETRI BA, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.
- [3] ZHOU F, ZHOU JH, WANG WX, et al. Unexpected rapid increase in the burden of NAFLD in China from 2008 to 2018: A systematic review and meta-analysis[J]. *Hepatology*, 2019, 70(4): 1119-1133.
- [4] MARENGO A, ROSSO C, BUGIANESI E. Liver cancer: Connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67: 103-117.
- [5] 张声生, 李军祥. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *中医杂志*, 2017, 58(19): 1706-1710.
- [6] 张志聪. 本草崇原[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019: 136.
- [7] 尚志钧. 神农本草经辑注[M]. 尚元胜, 尚元耦, 邱浩, 整理. 北京: 学苑出版社, 2013: 86.
- [8] CHOI JH, JIN SW, CHOI CY, et al. Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* ameliorate high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 86: 205-212.
- [9] 庄延双, 蔡宝昌, 张自力. 网络药理学在中药研究中的应用进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(1): 156-160.
- [10] DENG YL, REN HM, YE XW, et al. Integrated phytochemical analysis based on UPLC-Q-TOF-MS/MS, network pharmacology, and experiment verification to explore the potential mechanism of *Platycodon grandiflorum* for chronic bronchitis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 564131.
- [11] LEE JW, JI SH, KIM GS, et al. Global profiling of various metabolites in *Platycodon grandiflorum* by UPLC-QTOF/MS [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26786-26796.
- [12] SUK KT, KIM DJ. Gut microbiota: Novel therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Exp Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 13(3): 193-204.
- [13] YE Q, ZOU B, YEO YH, et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(8): 739-752.
- [14] YOUNOSSI ZM, KOENIG AB, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [15] ZHOU JH, ZHOU F, WANG WX, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China[J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851-1864.
- [16] ESTES C, ANSTEE QM, ARIAS-LOSTE MT, et al. Modeling nafld disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(4): 896-904.
- [17] 金在久. 桔梗的化学成分及药理和临床研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(2): 506-509.
- [18] KIM TW, LIM JH, SONG IB, et al. Hepatoprotective and anti-hepatitis C viral activity of *Platycodon grandiflorum* extract on carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice[J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2012, 58(3): 187-194.
- [19] LEE KJ, KIM JY, JUNG KS, et al. Suppressing effects of *Platycodon grandiflorum* on the progress of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis[J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(12): 1238-1244.
- [20] LEE KJ, CHOI JH, KIM HG, et al. Protective effect of saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorum* against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(5): 1778-1785.
- [21] LEE KJ, YOU HJ, PARK SJ, et al. Hepatoprotective effects of *Platycodon grandiflorum* on acetaminophen-induced liver damage in mice[J]. *Cancer Lett*, 2001, 174(1): 73-81.
- [22] HWANG YP, CHOI JH, KIM HG, et al. Saponins, especially platycodin D, from *Platycodon grandiflorum* modulate hepatic lipogenesis in high-fat diet-fed rats and high glucose-exposed HepG2 cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 267(2): 174-183.
- [23] LEE WC, JUNG HA, CHOI JS, et al. Protective effects of luteolin against apoptotic liver damage induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide in mice[J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(9): 1916-1921.
- [24] AL-MEGRIN WA, ALKHURIJI AF, YOUSEF AOS, et al. Antagonistic efficacy of luteolin against lead acetate exposure-associated with hepatotoxicity is mediated via antioxidant,



- anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities[J]. *Antioxidants*, 2019, 9(1): 10.
- [25] 席梅, 邢建国, 王丽, 等. 金合欢素的降血脂及抗动脉粥样硬化作用及机制初探[J]. *药学报*, 2019, 54(5): 846-853.
- [26] 马纳, 李亚静, 范吉平. 金合欢素药理研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(10): 1591-1595.
- [27] CHEN JJ, SUN X, XIA TT, et al. Pretreatment with dihydroquercetin, a dietary flavonoid, protected against concanavalin A-induced immunological hepatic injury in mice and TNF- $\alpha$ /ActD-induced apoptosis in HepG2 cells[J]. *Food Funct*, 2018, 9(4): 2341-2352.
- [28] ZHANG Y, JIN Q, LI X, et al. Amelioration of alcoholic liver steatosis by dihydroquercetin through the modulation of AMPK-dependent lipogenesis mediated by P2X7R-NLRP3-inflammasome activation[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(19): 4862-4871.
- [29] 潮蓉, 武小娟, 王羽辉, 等. P2X7R/NLRP3 信号通路在酒精性肝损伤中的作用[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(4): 491-495.
- [30] COBBINA E, AKHLAGHI F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters[J]. *Drug Metab Rev*, 2017, 49(2): 197-211.
- [31] 袁欣, 韩莉花, 张娜, 等. 异芒果苷对高脂饮食诱导大鼠肝脏损伤的改善作用[J]. *南京中医药大学学报*, 2019, 35(4): 453-457.
- [32] KHAN RS, BRIL F, CUSI K, et al. Modulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2019, 70(2): 711-724.
- [33] 许伟辰, 罗子宸, 谢彤, 等. 中药桔梗研究进展及其质量标志物预测初步分析[J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(2): 294-302.
- [34] 迟毓婧, 李晶, 管又飞, 等. PI3K-Akt 信号传导通路对糖代谢的调控作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(10): 879-885.
- [35] ZHANG Z, LIU H, LIU J. Akt activation: A potential strategy to ameliorate insulin resistance[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 156: 107092.

(编辑:董宇)