

基于网络药理学及实验验证探究二月兰籽水提物对非酒精性脂肪性肝炎大鼠的治疗作用和机制

苏芮¹, 裴海鸾^{1,3}, 田骄¹, 王晶^{1*}, 王志斌^{2*}

¹北京中医药大学中药学院 中药药理学教研室, 北京 102488; ²北京中研同仁堂医药研发有限公司; ³北京同仁堂股份有限公司科学研究所, 北京 100079

摘要: 探究二月兰籽水提物 (water extract of *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz seeds, OVSWE) 治疗非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 治疗作用及作用机制。采用中国知网 (China National Knowledge Infrastructure, CNKI) 检索并获取 OVSWE 活性成分, 使用疾病数据库以获取 NASH 的相关基因。提取 OVSWE 和 NASH 的交集靶点, 进一步对“药物-潜在活性成分-潜在靶点”网络进行可视化展示。将交集靶点导入 STRING 数据库以构建蛋白-蛋白相互作用网络; 然后进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析并可视化, 再用 Autodock 软件实现分子对接模型的构建。最后通过动物实验对网络药理学预测的靶点及通路进行实验验证。网络药理学分析显示 OVSWE 治疗 NASH 的核心靶点有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (Akt serine/threonine kinase 1, AKT1) 及磷酸肌醇 3 激酶调节亚基 1 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1) 等, 核心成分有诸葛菜碱 A、诸葛菜素 B 及诸葛菜素 C; OVSWE 治疗 NASH 与胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)、脂质代谢等相关信号通路关系密切。分子对接结果显示 OVSWE 中的核心成分与核心靶点 AKT1 对接良好。OVSWE 治疗高脂高糖饮食联合 CCl₄ 诱导 NASH 大鼠动物实验结果中, 通过苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 及天狼猩红染色可观察到 OVSWE 可缓解肝脏脂质堆积和损伤; 生化法检测发现, OVSWE 可显著降低肝组织甘油三酯 (triglycerides, TG) 及低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 大鼠血清葡萄糖 (glucose, GLU)、游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA)、空腹胰岛素含量及 IR 指数亦显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。非靶向脂质组学分析表明经 OVSWE 干预后, NASH 大鼠多种脂质差异物回调, 对其通路富集发现脂质代谢紊乱主要表现在鞘脂代谢及甘油磷脂代谢通路。Western blot 结果显示, OVSWE 可显著增加肝组织胰岛素受体 (insulin receptor, InsR) 和 p-AKT/AKT 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上发现表明, OVSWE 对高脂高糖饮食联合 CCl₄ 诱导的 NASH 大鼠的治疗可能是通过激活 InsR/PI3K/AKT 信号通路, 改善 IR, 调节脂质代谢来实现。

关键词: 非酒精性脂肪性肝炎; 二月兰籽; 网络药理学; 脂质代谢; 胰岛素抵抗

中图分类号: R965

文献标识码: A

Study on the therapeutic effects and mechanism of

***Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz seeds in non-alcoholic steatohepatitis rats based on network pharmacology and experimental verification**

SU Rui¹, PEI Hai-luan^{1,3}, TIAN Jiao¹, WANG Jing^{1*}, WANG Zhi-bin^{2*}

¹Department of Chinese Medicine Pharmacology, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; ²Beijing Zhongyan Tongrentang Pharmaceutical R & D Co., Ltd.; ³Beijing Tongrentang Corporation Scientific Research Institute, Beijing 100079, China

Abstract: To explore the therapeutic effects and mechanism of water extract of *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz seeds (OVSWE) on the treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). The China National Knowledge Infrastructure (CNKI) was used to retrieve and obtain the water-soluble active ingredients of OVSWE. We used diverse disease databases to obtain genes information related to NASH. And we extracted the intersection targets of OVSWE and NASH, further visualized the network of "drugs-potential active ingredients-potential targets". We imported intersection targets into the STRING database to construct a protein-protein interaction network; performed GO function and KEGG pathway enrichment analysis and visualization, and then used Autodock software to construct molecular docking models. Finally, the targets and pathways predicted by network pharmacology were experimentally validated through animal experiments. The analysis of network pharmacology showed that the core targets of OVSWE was Akt serine/threonine kinase 1(AKT1) and phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1(PIK3R1), etc; the core components were schizophyllin A, schizophyllin B and schizophyllin C, the treatment of OVSWE is closely related to insulin resistance (IR) and lipid metabolism signal pathway. Molecular docking results suggest that the core ingredient in OVSWE have strong binding ability to target AKT1. The NASH rat model was induced with high-fat and high-sugar diet combined with CCl₄. Hematoxylin-eosin staining(HE) and Sirius red staining showed that OVSWE could alleviate liver lipid accumulation and damage. Biochemical tests showed that OVSWE could significantly reduce the content of triglycerides (TG) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in liver tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Serum glucose (GLU), free fatty acid (FFA), fasting insulin content and IR index were also significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Not targeting lipid omics analysis showed that OVSWE could regulate a variety of lipid differentials. The enrichment of their pathways showed that the disorders of lipid metabolism mainly focused on the sphingolipid metabolism and glycerol phospholipid metabolism in NASH rats. Western blot showed that OVSWE could significantly increase insulin receptor(InsR) and P-Akt/AKT protein

expression levels in liver tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). These findings suggested that the therapeutic mechanism of the OVSWE on NASH rats induced by the high-fat and high-sugar diet combined with CCl_4 might be related to its activation of the InsR/PI3K/AKT signaling pathway, improvement of IR, regulation of lipid metabolism and reduction of inflammatory response.

Key words: nonalcoholic steatohepatitis; *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz seeds; network pharmacology; Lipid metabolism; insulin resistance

非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 是非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的关键进展型, 用于描述除酒精和其他明确损伤因素外所致的、以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性为主要特征的临床病理综合征^[1], 是导致众多致死性疾病如肝硬化、肝细胞肝癌等的重要因素^[2]。但目前临床对 NAFLD 和 NASH 尚无特效治疗方法, 仍将调整生活方式与药物结合的综合疗法作为主要治疗方式^[3]。面对全球 NASH 及 NAFLD 发病率的日益增加, 研究并开发安全有效的药物以延缓疾病进展已成为一个亟需解决的问题。

中药在 NASH 的治疗中发挥着重要作用。二月兰籽 (*Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz seeds, OVS) 是十字花科芸薹族诸葛菜属越年生草本植物二月兰的种子。二月兰籽水提物 (water extract of *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz seeds, OVSWE) 中主要有生物碱类、香豆素类、萜类和黄酮类等化合物^[4], 本课题组前期研究通过 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 共鉴定出 OVSWE 中含有的 8 种主要化学成分, 包括: 长寿花葡萄糖苷、2-羟基苯甲酸、落叶松树脂醇、诸葛菜碱 A、落叶松树脂醇-9-*O*- β -D-吡喃型葡萄糖苷、诸葛菜碱 B、诸葛菜苷 B 和诸葛菜素 A, 并通过实验表明 OVSWE 能够显著降低棕榈酸-油酸诱导的 L-02 细胞中甘油三酯 (triglycerides, TG) 及细胞中脂滴的含量。有学者研究表明, OVSWE 具有改善肝脏的病理变化、下调谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性, 降低 TG 水平, 减轻氧化应激和抑制肝细胞凋亡等作用^[5], 对改善 NASH 具有较好的药效。但目前关于 OVSWE 对 NASH 的治疗机制鲜有报道。因此, 本实验通过网络药理学及分子对接对 OVSWE 治疗 NASH 的物质基础、作用机制及相关靶点进行预测, 并通过高脂高糖饮食联合 CCl_4 诱导 NASH 大鼠模型进行动物实验, 对肝脂、肝脏功能、肝脏组织病理学对 OVSWE 治疗 NASH 进行药效学研究, 并以肝脏非靶向脂质代谢组学及 Western blot 实验对网络药理学预测结果进一步验证。探究 OVSWE 对 NASH 大鼠模型的治疗作用及作用机制, 以期 OVSWE 治疗 NASH 的下一步研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 软件与数据库

数据库：中国知网 (<https://www.cnki.net/>)、SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)、PharmGkb 数据库 (<https://www.pharmgkb.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 和 Drugbank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>)、PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>)、STRING 在线平台 (<https://cn.string-db.org/>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

软件：Cytoscape 3.7.1、R 语言 4.1.2、PyMol 2.6.0、Autodock 4.2.6、SPSS 20.0、GraphPad Prism 8、Image J 等。

1.2 动物

由北京华阜康生物科技股份有限公司购得的 SPF 级 90~100 g 雄性 SD 大鼠 80 只，许可证号：SCXK(京)2019-0008。本实验已经同仁堂研究院动物实验伦理审核(伦理批号：YJY-2022-041201)。实验大鼠动物饲养于北京同仁堂研究院动物室屏障环境中，动物室温度：22~25 °C，相对湿度：55%~65%。

1.3 药物及试剂

二月兰籽(沐阳润枝绿化工程有限公司，批号：RZ0035)；易善复(赛诺菲(北京)制药有限公司，批号：CBJD256)；高脂饲料(北京科澳协力饲料有限公司，批号：2022032802)；果糖(北京科澳协力饲料有限公司，批号：2022032802)；CCl₄(上海易恩化学技术有限公司，批号：56-23-5)；TG 试剂盒(批号：220841)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒(批号：221661)、低密度脂蛋白胆固醇(light-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒(批号：221712)、葡萄糖(glucose, GLU)试剂盒(批号：220881)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)试剂盒(批号：220181)均购于中生北控生物科技有限公司；InsR 多克隆抗体(批号：23413T)、羊抗兔二抗(批号：20000730)、AKT 兔源抗体(批号：9272S)、p-AKT 兔源抗体(批号：13038T)均购于美国 Cell Signaling Technology 公司；GAPDH 内参抗体(北京博奥森生物技术有限公司，批号：10029187)。

1.4 仪器

BX61 光学显微镜(日本 Olympus)；Epoch2 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)；AU480 全自动生化分析仪(贝克曼库尔特实验系统有限公司)；1.7 μm, 2.1×100 mm ACQUITY UPLC BEH C₁₈

色谱柱（美国 Waters 公司）；Q-Exactive Plus 质谱仪（Thermo Scientific）。

1.5 网络药理学预测 OVSWE 治疗 NASH 的作用机制

1.5.1 筛选活性成分和靶点

通过检索中国知网数据库^[6,7]收集 OVSWE 中水溶性化学成分。依据化合物的 ADME 即药物的吸收、分布、代谢和排泄的药代动力学属性筛选 OVSWE 中的有效活性成分。SwissADME 数据库中以胃肠吸收度为高，类药性指标：Lipinski^[8]、Ghose^[9]、Veber^[10]、Egan^[11]和 Muegge^[12]中满足两种以上为标准筛选 OVSWE 中的活性成分，根据 Swiss Target Prediction 数据库对活性成分进行靶点预测，利用 Cytoscape 3.7.1 软件进行药物-成分-靶点网络图绘制。

1.5.2 构建 NASH 疾病靶点数据库

根据 Genecards、OMIM、PharmGkb、TTD 和 Drugbank 五个数据库，以“nonalcoholic fatty liver disease”和“nonalcoholic steatohepatitis”为关键字搜索疾病靶点。其中 GeneCards 数据库中以 Relevance score 大于等于 1 条件筛选；OMIM 数据库中以 Gene Map 条件筛选；PharmGkb 数据库以 Gene 条件筛选；TTD 数据库中以 Search drugs and targets by disease or ICD identifier 条件筛选；Drugbank 数据库中以 Indications 条件筛选。

1.5.3 筛选核心靶点

对 OVSWE 中水溶性活性成分的靶点和 NASH 疾病靶点取交集，利用 STRING 在线平台，设置最小互作分数为 0.9，分析 OVSWE 中水溶性活性成分与 NASH 疾病靶点蛋白质相互作用关系，导入 Cytoscape 3.7.1 进行可视化，筛选出 OVSWE 中水溶性活性成分治疗 NASH 的核心靶点。

1.5.4 通路富集分析

使用 R 语言 4.1.2 软件、ColorSpace、Stringi、Ggplot2、BiocManager、DOSE、ClusterProfiler、Enrichplot 和 Org.Hs.eg.db 程序包，以 pvalue 和 qvalue 为 0.05，显示数目为 7 运行脚本进行基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析；使用 R 语言 4.1.2 软件、ColorSpace、Stringi、Ggplot2、BiocManager、DOSE、ClusterProfiler、Enrichplot、Org.Hs.eg.db 和 Pathview 程序包，以 pvalue 和 qvalue 为 0.05，显示数目为 30 运行脚本进行京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。

1.6 分子对接

选取核心靶点通过 PDB 数据库下载其分子结构，利用 Pymol 软件除去水分子及残基。其次，从 PubChem 数据库下载核心成分的分子结构，通过 Open Babel 软件转换为“mol2”文件。将处理

好的靶点蛋白受体及核心成分小分子配体通过 Autodock 软件进行分子对接结合能分析。根据结合能结果，选择结合能最低的靶点蛋白-小分子配体复合物作为最优选择，进行分子对接可视化展示。

1.7 动物实验

1.7.1 OVSWE 制备

取 50 kg 的二月兰籽原药材进行粉碎，使用煎药包分装，以饮用水煎煮，一煎：十倍量水煎，2 h；二煎：八倍量水煎，2 h；合并煎液，以 70 °C 温度旋蒸浓缩成适量体积，减压干燥成干膏，将干膏打碎后真空保存。出膏率：12.36%。

1.7.2 动物造模

SD 大鼠 80 只，在适应性喂养 1 周后，随机分成两组，空白对照（control, Con）组 16 只，造模组 64 只。Con 组大鼠给予正常饲料和饮水，造模组大鼠以高脂饮食（88%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇）复合 10%果糖水喂养，第 12 周和第 13 周对照组皮下注射橄榄油溶液，造模组皮下注射 40% 的 CCl₄ 橄榄油溶液（3 mL/kg），每周两次。第 13 周末 Con 组和造模组各取 4 只大鼠进行肝脏组织苏木精-伊红染色（hematoxylin-eosin staining, HE 染色）及评分，结果显示造模组大鼠肝脏组织出现大量大泡性脂肪空泡，炎性细胞浸润增加，胞质内充满细小空泡，肝细胞出现气球样变，NAS 评分大于 4 分。通过综合分析，判定第 13 周末 NASH 模型复制成功。

1.7.3 动物分组

于第 13 周末将 60 只模型复制成功大鼠按照分层随机分组原则分为模型（model, Mod）组、易善复（essentiale, Ess）组、OVSWE 低剂量（OVSWE in low dose, OE-L）组、OVSWE 中剂量（OVSWE in middle dose, OE-M）组和 OVSWE 高剂量组（OVSWE in high dose, OE-H），每组 12 只。加上此前已分出的 12 只 Con 组大鼠，共 72 只、6 组大鼠参与后续给药及实验。

1.7.4 动物给药

第 14 周开始给药，Ess 组、OE-L 组、OE-M 组和 OE-H 组灌胃浓度分别为：0.14、2.5、5、10 g/kg，Con 及 Mod 组纯水灌胃。连续灌胃给药 9 周。给药期间 Mod 组和给药组继续以高脂饲料及高糖水喂养，并皮下注射 40% 的 CCl₄ 溶液，2 mL/kg，每两周一次，共 5 次。

1.7.5 样本采集

给药期间 OE-L 组有 1 只鼠死亡，故给药结束后，对 71 只大鼠进行样本采集。1%戊巴比妥 40 mg/kg 将大鼠麻醉后，采用腹主动脉取血法于离心管中收集适量血液，常温放置 30 min，4 °C，3500 r/min 离心 10 min，取上清分装，于 -80 °C 冰箱保存待检。取完血后，处死动物，将肝大叶完整剪下

放于 4%多聚甲醛固定液中固定。剩余肝脏组织锡纸包好，于-80 °C保存，用于肝脏匀浆。

1.7.6 组织病理染色观察肝脏组织病理损伤

HE 染色：取出固定于 4%多聚甲醛固定液中的肝大叶，进行固定和石蜡包埋，用切片机切成约 4 μm 的薄片后进行展片和烘干，采用苏木素和伊红进行染色，封片后使用全景扫描仪对组织切片进行扫描，使用 Case Viewer 2.3 软件观察肝脏病理形态，放大倍数 800×，采集图像并分析。

天狼猩红染色：与上述 HE 染色相同步骤将肝大叶固定、包埋及切片，后采用苏木素和天狼猩红染料染色，封片后在偏振光显微镜下观察胶原沉积的变化，放大倍数 400×，采集图像并分析。

1.7.7 肝脏生化指标检测

根据生化试剂盒说明测定肝脏内 TG、LDL-C 和 HDL-C 的水平。

1.7.8 血清生化指标检测

大鼠腹主动脉取血，制备血清。全自动生化仪检测大鼠血清谷氨酸和血清游离脂肪酸的含量。按照 ELISA 试剂盒操作说明测定大鼠血清空腹胰岛素水平。使用下列公式（1）计算大鼠胰岛素抵抗指数。

$$I=A \times B / 22.5 \quad (1)$$

式中： I 为胰岛素抵抗指数； A 为空腹血糖值（mmol/L）； B 为空腹胰岛素值（ng/mL）；22.5为校正因子。

1.7.9 非靶向脂质组学分析

1.7.9.1 肝脏样本处理

样本中添加 200 μL 水，MTBE 800 μL，预冷甲醇 240 μL，涡旋混合，低温水浴中超声 20 min，室温放置半小时后 14 000 g 10 °C离心 15 min，取出上层有机相，氮气吹干，加入 200 μL 90%异丙醇/乙腈溶液复溶，复溶液充分涡旋，于 14 000 g 10 °C离心 15 min，取上清上样。

1.7.9.2 色谱、质谱分析

色谱条件： C_{18} 色谱柱柱温 45 °C；流速为 300 μL/min。流动相组成：A（乙腈：水=6：4，+0.1%甲酸+0.1 mmol/L 甲酸铵），B（乙腈：异丙醇=1：9，+0.1% 甲酸+0.1 mmol/L 甲酸铵）。梯度洗脱程序：0~3.5 min，40% B；3.5~13 min，40%→75% B；13~19 min，75%→99% B；19~24 min，40% B。

ESI 源工作参数：加热炉温度 300 °C，鞘气流速 45 arb，辅助气流速 15 arb，电喷雾电压 3.0 KV，毛细管加热温度 350 °C。本实验拟收集脂质分子和脂质碎片的质量电荷比。

1.7.10 蛋白质提取和蛋白免疫印迹法

使用 Western blot 法测定肝脏组织 InsR、AKT 和 p-AKT 的蛋白表达水平。通过预加了蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液对肝脏进行裂解。用 BCA 试剂盒测定蛋白含量。上样 32 μg 的蛋白样品，使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质并转移到 PVDF 膜上。以 TBST 为溶剂配置 5% BSA 溶液，封闭 1 h 后，加入一抗 InsR (1:1 000)、AKT (1:1 000)、p-AKT (1:1 000) 及 GADPH (1:5 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。一抗孵育完毕后 TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min，TBST 再次洗膜 3 次，每次 10 min 后，添加 ECL 溶液并进行曝光和显影。利用 Image J 对条带灰度值进行处理分析。以目的条带灰度值/内参条带灰度值之比作为目的蛋白相对表达量。

1.8 统计学方法

所有数据使用 SPSS 20.0 软件处理，数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，当各组数列均为正态分布时，多组数据采用 ANOVA 进行方差分析；一组及以上的数列呈现非正态分布时，采用非参数检验 (Kruskal-Wallis H 秩和检验)。

2 结果

2.1 OVSWE 治疗 NASH 的可能作用靶点及通路网络药理学结果分析

2.1.1 OVSWE 中水溶性活性成分

通过中国知网数据库共检索出 OVSWE 中水溶性成分 55 个，其中包含 6 种前期课题组通过 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 鉴定出的 OVSWE 主要化学成分，包括：2-羟基苯甲酸、落叶松树脂醇、诸葛菜碱 A、诸葛菜碱 B、诸葛菜苷 B 和诸葛菜素 A。SwissADME 数据库以胃肠吸收度和类药性作为标准筛选出 OVSWE 中核心水溶性活性成分 20 个 (见表 1)。

表 1 OVSWE 核心活性成分

Table 1 Core active ingredient of OVSWE

序号 No.	成分 Ingredient	序号 No.	成分 Ingredient	序号 No.	成分 Ingredient
EYLZ1	1, 3-二羟基蒽醌 1, 3-Dihydroxyanthraquinone	EYLZ8	7, 8-二甲基吡嗪 7, 8-Dimethylpyrazine	EYLZ15	芫花素 Genkwanin
EYLZ2	2-羟基苯甲酸 2-Hydroxybenzoic acid	EYLZ9	7-羟基-6-甲氧基香豆素 7-Hydroxy-6-methoxycoumarin	EYLZ16	正十六烷酸 n-Cetanoic acid

EYLZ3	3, 4, 5-三甲氧基苯甲酸 3, 4, 5-Trimethoxybenzoic acid	EYLZ10	白桂木内酯 B Cinnamolactone B	EYLZ17	诸葛菜碱 A Schizophylline A
EYLZ4	4-羟基-3-甲氧基苯甲酸 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	EYLZ11	苯甲酸 Benzoic acid	EYLZ18	诸葛菜素 A Schizophyllin A
EYLZ5	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic acid	EYLZ12	落叶松树脂醇 Larch resinol	EYLZ19	诸葛菜素 B Schizophyllin B
EYLZ6	5, 7, 3', 5'-四羟基二氢黄酮 5,7,3', 5'-Tetrahydroxy dihydroflavone	EYLZ13	染料木素 Genistein	EYLZ20	诸葛菜素 C Schizophyllin C
EYLZ7	5, 7-二羟基色原酮 5, 7-Dihydroxychromogen	EYLZ14	腺苷 Adenosine		

2.1.2 NASH 疾病靶点数据库

GeneCards 共检索到 1 119 个 NASH 疾病相关靶点；OMIM 共检索到 328 个 NASH 疾病相关靶点；PharmGkb 共检索到 135 个 NASH 疾病相关靶点；TTD 共检索到 39 个 NASH 疾病相关靶点及 Drugbank 共检索到 5 个 NASH 疾病相关靶点。对所有靶点进行去掉重复值操作，最终共检索到 NASH 疾病相关靶点 1 262 个。

2.1.3 OVSWE 中水溶性活性成分治疗 NASH 的核心靶点

OVSWE 中水溶性活性成分与 NASH 疾病相关靶点取交集，筛选出 133 个靶点，STRING 对交集靶点进行蛋白互作网络分析（见图 1），Cytoscape 3.7.1 对 PPI 网络做拓扑性质分析（见图 2），显示连接度较高的前 8 项靶点为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1（Akt serine/threonine kinase 1, AKT1）、雌激素受体 1（estrogen receptor 1, ESR1）、信号转导和转录激活因子-3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1（heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1）、磷酸肌醇 3 激酶调节亚基 1（phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1）、表皮生长因子受体（epithelial growth factor receptor, EGFR）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）和磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α （phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA）。

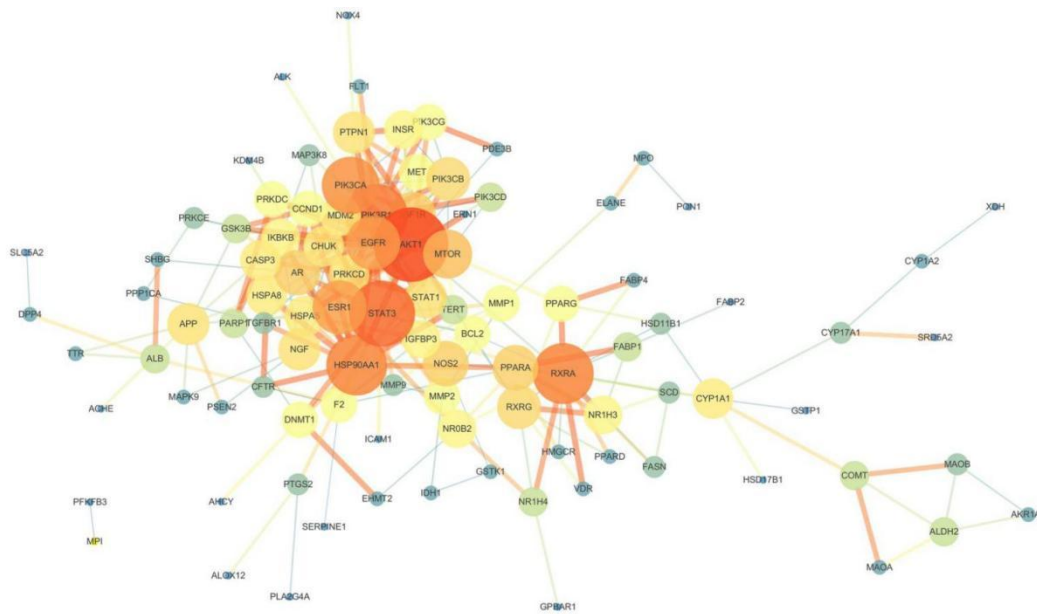


图 1 OVSWE 中水溶性活性成分与 NASH 疾病相关靶点 PPI 网络图

Fig. 1 PPI network of water-soluble active ingredients in OVSWE and targets associated with NASH disease

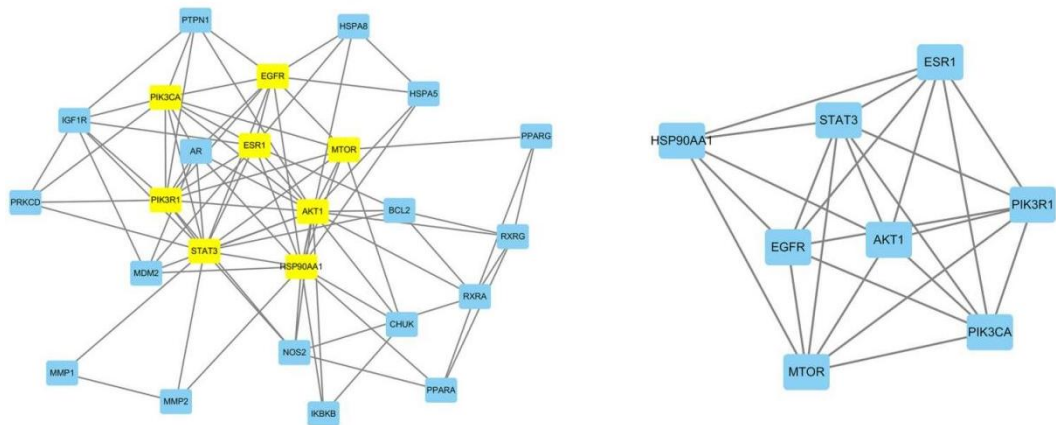


图 2 OVSWE 中水溶性活性成分治疗 NASH 的核心靶点

Fig. 2 Core targets of water-soluble active ingredients in OVSWE for the treatment of NASH

2.1.4 GO 和 KEGG 富集分析

对 OVSWE 中水溶性活性成分与 NASH 疾病相关靶点的交集靶点进行 GO 富集分析，共得到 1982 项生物学过程，其中横坐标代表富集的靶点数占比，纵坐标代表富集到的生物学过程、细胞组分和分子功能名称，气泡大小代表靶点的数量，气泡颜色由红至蓝代表 P 值由小至大，P 值越小结果越显著。主要富集的生物学过程包括（见图 3），老化（aging）、肽基-丝氨酸修饰（peptidul-serine modification）、胰岛素受体（insulin receptor）、胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor）等。

对 OVSWE 中水溶性活性成分与 NASH 疾病相关靶点的交集靶点进行 KEGG 富集分析，共得到 151 条信号通路，其中横坐标代表通路的富集靶点数量，纵坐标代表富集的通路名称，条形图颜色由红至蓝代表 P 值由小至大，P 值越小结果越显著。主要富集的信号通路包括（见图 4），胰岛素抵抗（insulin resistance）及脂质和动脉粥样硬化（lipid and atherosclerosis）等。

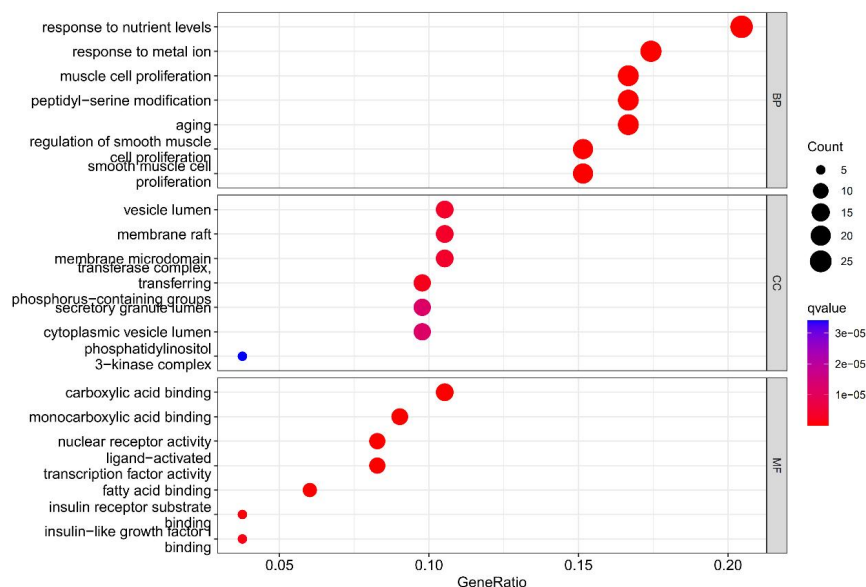


图 3 OVSWE 中水溶性活性成分与 NASH 疾病相关靶点 GO 富集

Fig. 3 Concentration of water-soluble active components in OVSWE and GO targets associated with NASH disease

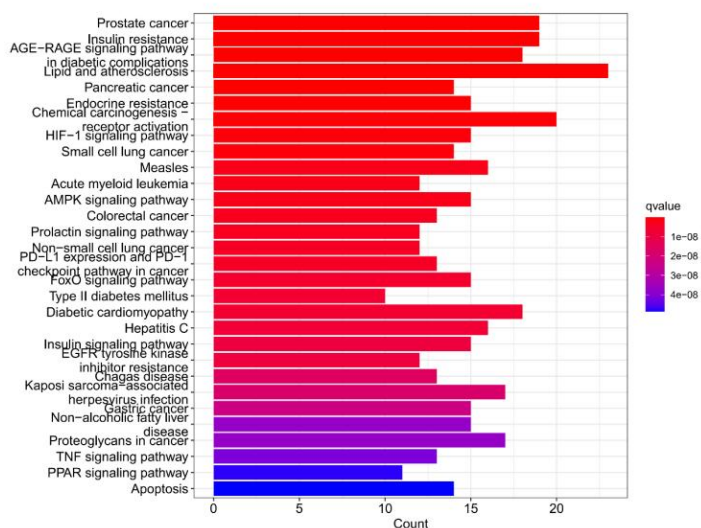


图 4 OVSWE 中水溶性活性成分与 NASH 疾病相关靶点 KEGG 富集

Fig. 4 Concentration of water-soluble active components in OVSWE and the target KEGG associated with NASH disease

2.2 分子对接

通过 Autodock 软件对 OVSWE 提取物治疗 NASH 的关键靶点 AKT1 和 4 个活性成分进行对接，探究其相互作用。图 5 为分子对接可视化，其详细信息列于表 2 中。常认为分子对接结合能小于-5 kcal/mol，则靶点与化合物结合能力较强，结合活性较高，且结合能越小，则其结合越稳定。

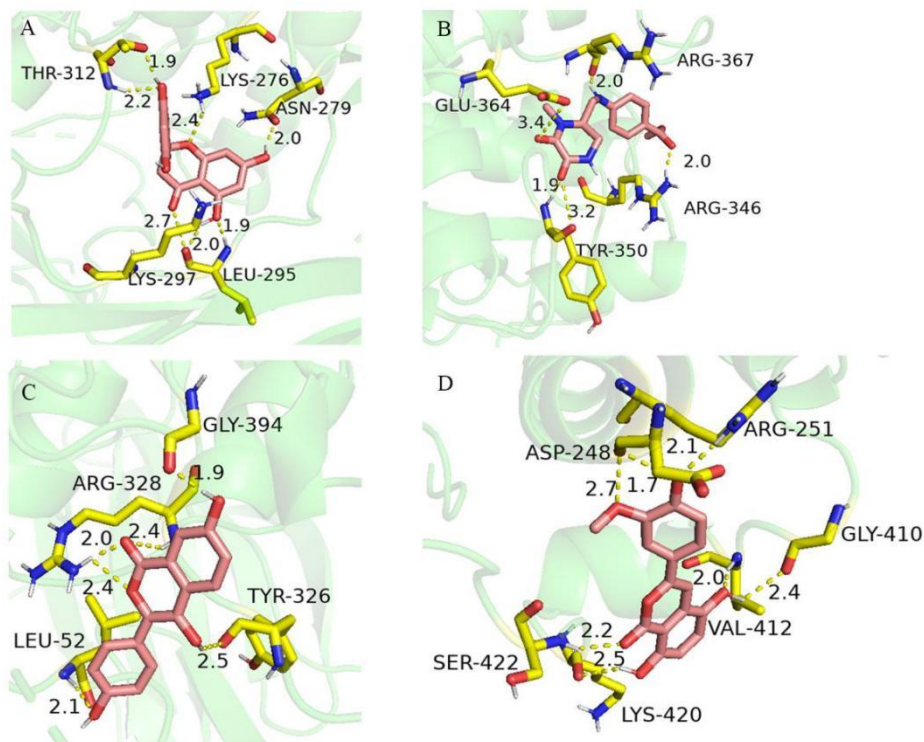


图 5 OVSWE 中关键水溶性活性成分与 AKT1 靶点分子对接

Fig. 5 Molecular docking of AKT1 with key water-soluble active components in OVSWE

注：A：AKT-5, 7, 3', 5'-四羟基二氢黄酮；B：AKT-诸葛菜碱 A；C：AKT-诸葛菜碱 B；D：AKT-诸葛菜素 C。

Note: A:AKT-5,7,3',5'-tetrahydroxy dihydroflavone; B: AKT-Zorostrine A; C: AKT-Schizophyllum B; D:

AKT-Schizophyllum C.

表 2 OVSWE 关键水溶性活性成分与 AKT1 的结合能

Table 2 Binding energy between key water-soluble active components of OVSWE and AKT1

靶点	关键活性成分	结合能
Target	Key active ingredient	Binding energy (kcal/mol)
AKT1	5, 7, 3', 5'-四羟基二氢黄酮	-5.68
	5, 7, 3', 5'-Tetrahydroxy dihydroflavone	

诸葛菜碱 A Schizophylline A	-5.83
诸葛菜素 B Schizophyllin B	-6.66
诸葛菜素 C Schizophyllin C	-6.85

2.3 动物实验结果

2.3.1 OVSWE 对 NASH 大鼠肝脏组织病理学改变的影响

HE 染色结果显示, Con 组大鼠肝脏组织排列紧密, 肝小叶结构完整, 偶见微小脂肪空泡, 肝细胞核形态正常。Mod 组大鼠肝脏组织排列松散, 视野内可见大量大泡性脂肪空泡, 肝细胞明显肿胀, 肝细胞核被挤向一侧, 胞质颜色较浅, 炎性细胞浸润明显。各给药组有不同程度改善, 表现为肝脏组织排列较为紧实, 大泡性脂肪空泡减少, 炎性细胞浸润减少 (见图 6)。

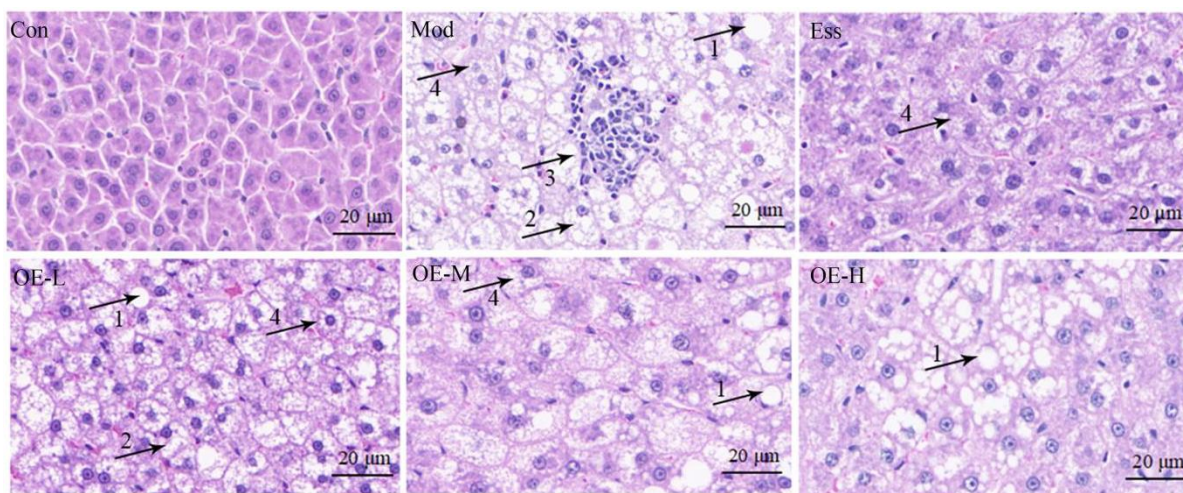


图 6 OVSWE 对 NASH 大鼠肝脏组织病理学的影响 (800×)

Fig. 6 The effect of OVSWE on liver histopathology in NASH rats (800×)

注: “1”代表脂肪空泡; “2”代表肝细胞肿胀; “3”代表炎性细胞浸润; “4”代表细胞质空泡。

Note: "1" represents fat vacuole; "2" represents liver cell swelling; "3" represents inflammatory cell infiltration; "4" stands for cytoplasmic vacuoles.

2.3.2 OVSWE 对 NASH 大鼠肝脏胶原沉积的影响

天狼猩红染色结果显示, Con 组大鼠肝脏有少量胶原沉积, 主要为绿色III型胶原。Mod 组大鼠肝脏胶原沉积明显, 橙红色或亮黄色I型胶原增多, 主要集中分布于汇管区。各给药组的胶原沉积减少, I型胶原减少 (见图 7)。

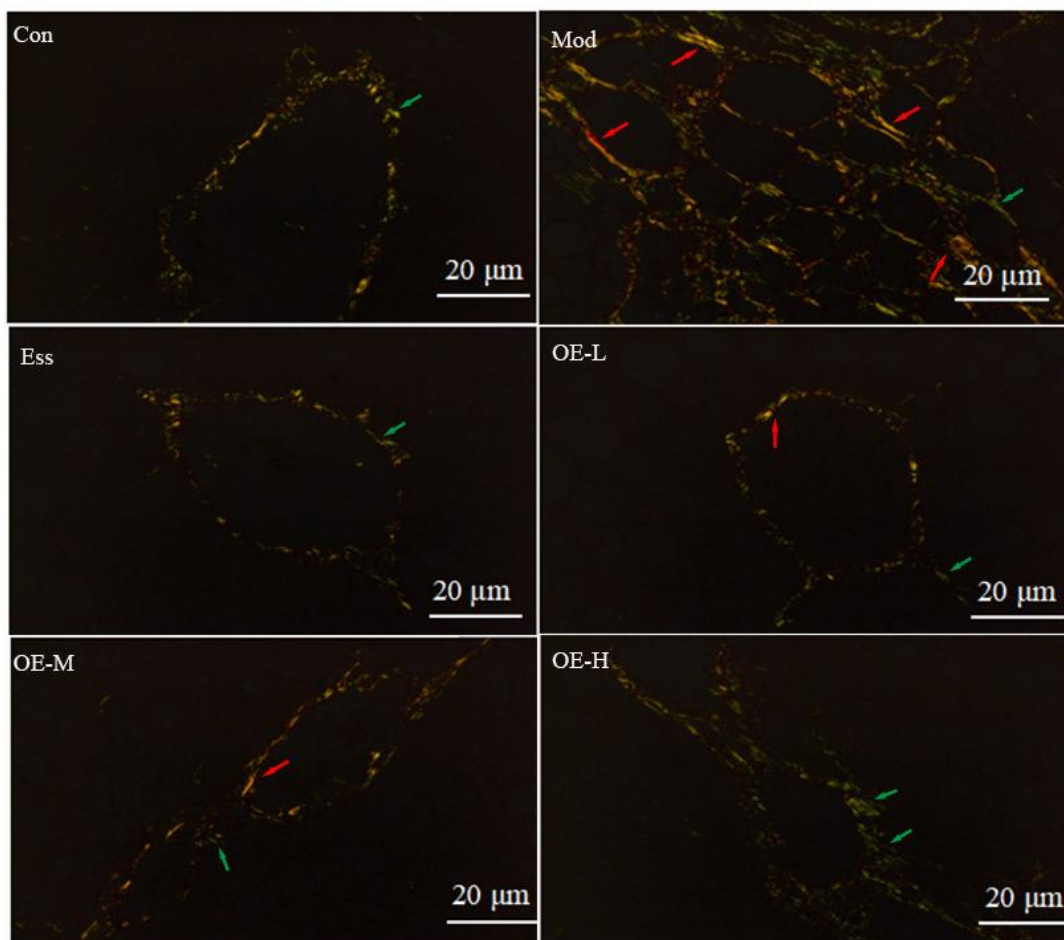


图 7 OVSWE 对 NASH 大鼠肝脏组织胶原沉积的影响 (400×)

Fig. 7 Effect of OVSWE on collagen deposition in liver tissues of NASH rats (400×)

注：红色箭头：I型胶原；绿色箭头：III型胶原。

Note: Red arrows: type I collagen; Green arrows: Type III collagen.

2.3.3 OVSWE 对 NASH 大鼠肝脏 TG、HDL-C 和 LDL-C 含量的影响

与 Con 组比较，Mod 组的 TG 及 LDL-C 水平显著增高 ($P < 0.01$)。与 Mod 组比较，Ess 组、OE-M 组和 OE-H 组 TG 水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；Ess 组、OE-L 组、OE-M 组和 OE-H 组 LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ，见表 3)。

表 3 OVSWE 对 NASH 大鼠肝脏组织 TG、HDL-C 和 LDL-C 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11, 12$) (给药期间 OE-L 组大鼠死亡一只，故该组有 11 只，已在前文样本采集中进行阐述)

Table 3 Effects of OVSWE on the contents of TG, HDL-C and LDL-C in liver tissue of NASH rats ($\bar{x} \pm s, n = 11, 12$)

组别 Group	n	TG (mmol/g)	HDL-C (mmol/g)	LDL-C (mmol/g)
Con	12	0.74 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0.57 ± 0.04
Mod	12	1.56 ± 0.17 ^{##}	0.08 ± 0.01	1.08 ± 0.06 ^{##}
Ess	12	1.22 ± 0.14 [*]	0.18 ± 0.02	0.63 ± 0.06 ^{**}
OE-L	11	1.60 ± 0.17	0.12 ± 0.02	0.77 ± 0.09 ^{**}
OE-M	12	1.02 ± 0.08 ^{**}	0.17 ± 0.02	0.88 ± 0.10 [*]
OE-H	12	1.16 ± 0.07 [*]	0.17 ± 0.02	0.87 ± 0.07 [*]

注：与对照组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ，下同。Note: Compared with the Con, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with the Mod, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, the same below.

2.3.4 OVSWE 对 NASH 大鼠血清 GLU、FFA 和胰岛素含量的影响

与 Con 组相比，Mod 组大鼠血清 GLU、FFA、空腹胰岛素的含量及胰岛素抵抗指数显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与 Mod 组相比，OE-L 组 GLU 含量显著下降 ($P < 0.05$)；Ess 组、OE-M 组和 OE-H 组 FFA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；OE-H 组空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数显著下降 ($P < 0.05$ ，见表 4)。

表 4 OVSWE 对 NASH 大鼠血清 GLU、FFA、空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11, 12$)

Table 4 Effects of OVSWE on serum GLU, FFA, fasting insulin levels and insulin resistance index in NASH rats ($\bar{x} \pm s, n = 11, 12$)

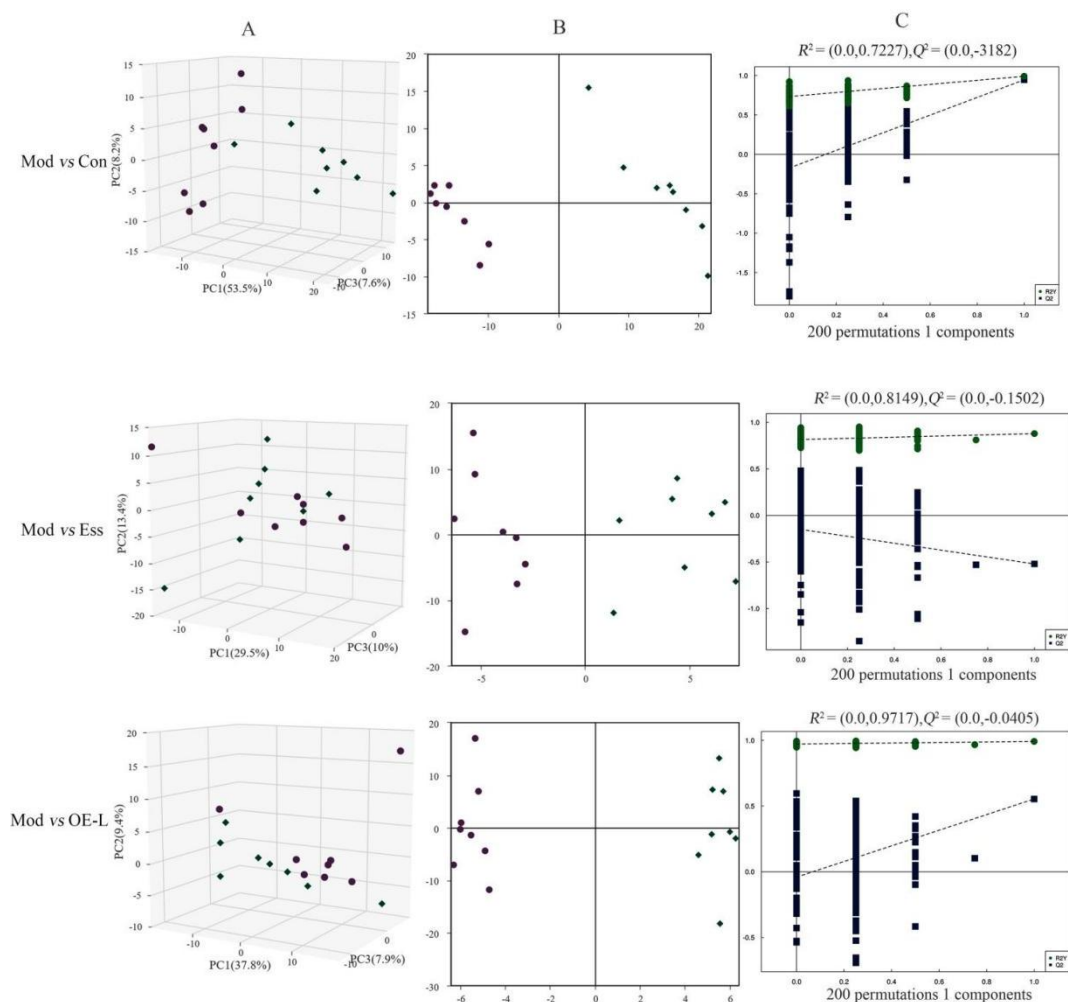
组别 Group	n	GLU (mmol/L)	FFA (mmol/L)	胰岛素含量 Insulin content (pg/mL)	胰岛素抵抗指数 Insulin resistance index
Con	12	9.13 ± 0.46	0.43 ± 0.06	22.02 ± 3.08	9.19 ± 1.52
Mod	12	17.16 ± 0.82 ^{##}	0.58 ± 0.08 [#]	32.90 ± 1.86 ^{##}	22.72 ± 1.25 ^{##}
Ess	12	15.73 ± 1.29	0.41 ± 0.02 [*]	32.71 ± 3.33	23.18 ± 2.27
OE-L	11	12.70 ± 0.79 ^{**}	0.74 ± 0.06	34.76 ± 1.55	20.52 ± 1.71
OE-M	12	17.68 ± 1.15	0.43 ± 0.03 [*]	29.16 ± 2.96	23.74 ± 2.74
OE-H	12	17.04 ± 0.95	0.30 ± 0.01 ^{**}	25.55 ± 2.17 [*]	17.00 ± 1.85 [*]

2.3.5 非靶向脂质组学分析结果

2.3.5.1 脂质代谢物统计分析

主成分分析 (principal component analysis, PCA) 评分图结果 (见图 8A) 显示，Con 组、Mod 组及各给药组的脂质代谢物之间存在差异。正交偏最小二乘法判别 (orthogonal partial least squares

discriminant analysis, OPLS-DA) 结果 (见图 8B) 表明, 各组内样本聚集较好, 组间有所离散, 表明 Mod 组大鼠和 OVSWE 治疗后的大鼠脂质代谢都受到一定的影响, 各组之间的脂质代谢物存在一定程度的差异。200 次置换检验结果及模型评价结果显示 (见图 8C), 模型未发生过度拟合, 结果可靠, 且各组模型 $R^2X > 0.5$, 表明其模型效果较好



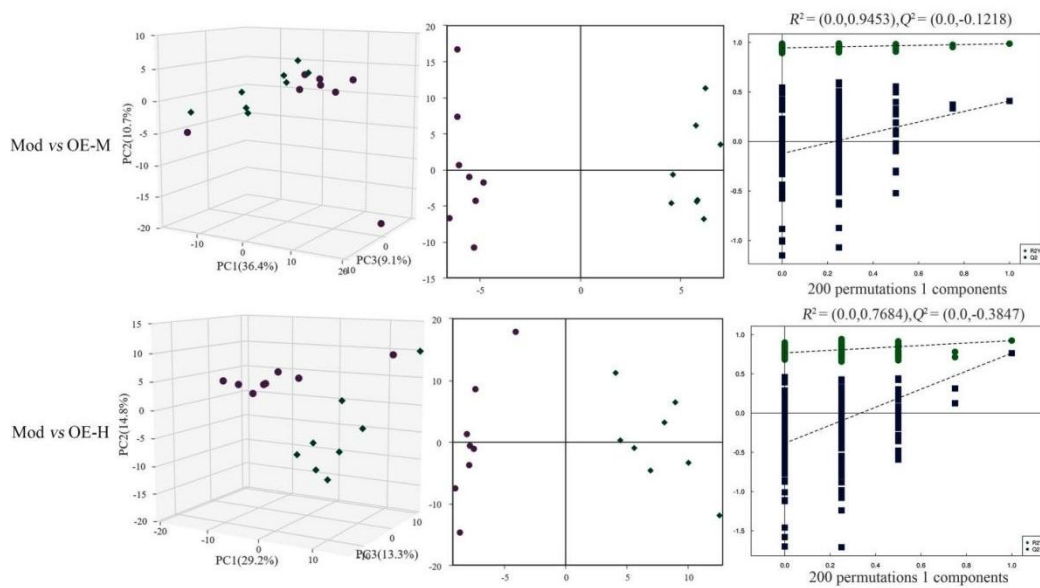


图 8 各组 PCA、OPLS-DA 及 200 次置换检验结果

Fig. 8 Results of PCA, OPLS-DA and permutation tests for each group

注：A：PCA 评分图；B：OPLS-DA 评分图；C：置换检验

Note: A: PCA score chart; B: OPLS-DA score chart; C: Replacement test

2.3.5.2 肝脏脂质差异代谢物

本实验通过 OPLS-DA，以变量投影重要性（variable importance in the projection, VIP）值 > 1 、 $P < 0.05$ 及差异倍数（fold change, FC）值 > 1.5 或 < 0.81 作为脂质分子的显著性差异筛选准则，共筛出脂肪酸类、甘油酯类、甘油磷脂类、鞘脂类等酯类化合物。与 Con 组相比，Mod 组共有 32 个脂质代谢物发生了显著变化。各组共同差异物质结果（见表 5）显示，与 Con 组相比，Mod 组有 21 种脂质物质含量显著上升，如：TG、甘油二酯（diacylglycerol, DG）、鞘磷脂（sphingomyelin, SM）、神经酰胺（ceramide, Cer）等脂质，OVSWE 给药后上述脂质含量显著下降；Mod 组有 11 种脂质物质含量显著下降，如磷脂酰胆碱（phosphatidylcholine, PC）、磷脂酰乙醇胺（phosphatidyl ethanolamine, PE）等，OVSWE 给药后上述脂质含量显著上升。

表 5 肝脏脂质差异物质

Table 5 Lipid difference substances in liver

差异脂质 Differential lipid	Mod vs Con			Mod vs Ess			Mod vs OE-L			Mod vs OE-M			Mod vs OE-H		
	FC	VIP	趋势 Trend	FC	VIP	趋势 Trend	FC	VIP	趋势 Trend	FC	VIP	趋势 Trend	FC	VIP	趋势 Trend
PC(20 : 2e/19 : 0)	2.907	1.789	↓**	1.165	0.300	↑	2.258	3.046	↑**	2.031	2.462	↑*	2.989	2.624	↑**

PC(16 : 1/20 : 5)	1.971	1.233	↓**	1.228	0.900	↑	2.035	2.940	↑**	1.427	1.583	↑**	3.629	3.490	↑**
PC(18 : 2/20 : 4)	2.065	1.969	↓**	1.063	0.750	↑	1.151	1.475	↑	1.172	1.376	↑	1.317	1.450	↑*
PC(16 : 0/22 : 6)	2.225	2.538	↓**	0.887	1.006	↓	1.244	2.132	↑*	1.193	1.801	↑	1.270	1.588	↑*
PE(18 : 1/18 : 2)	1.641	1.711	↓**	1.155	1.288	↑	1.330	2.585	↑**	1.413	2.665	↑**	1.631	2.786	↑**
PE(18 : 2/20 : 4)	1.625	1.748	↓**	1.193	1.679	↑	1.287	2.481	↑**	1.405	2.724	↑**	1.594	2.794	↑**
PE(43 : 6)	2.014	1.130	↓**	1.267	0.780	↑	1.241	0.964	↑	1.141	0.687	↑	1.726	1.390	↑**
PG(16 : 0/18 : 2)	2.451	1.152	↓**	1.069	0.735	↑	1.152	0.761	↑	1.322	1.002	↑**	1.068	0.325	↑
PI(17 : 0/20 : 3)	0.174	1.240	↑**	0.964	0.716	↓	0.809	0.962	↓	0.821	0.918	↓	0.609	1.200	↓*
PS(18 : 0/22 : 6)	0.391	3.319	↑**	0.865	1.352	↓	0.838	2.308	↓	0.842	2.177	↓	0.553	4.847	↓**
Hex1Cer(t38 : 0)	0.560	5.293	↑**	0.951	0.905	↓	0.867	4.228	↓	0.844	5.168	↓	0.772	6.161	↓*
LPC(18 : 0)	1.694	7.890	↓**	0.953	2.131	↓	1.091	5.858	↑	1.066	5.369	↑	1.227	6.171	↑*
MG(16 : 2e)	0.178	1.217	↑**	0.839	0.655	↓	0.718	1.201	↓	0.632	1.468	↓*	0.530	1.428	↓**
MG(18 : 3e)	0.115	3.165	↑**	0.922	0.398	↓	0.830	1.835	↓	0.773	2.515	↓	0.685	2.627	↓**
Cer(t18 : 0/25 : 3)	2.672	1.616	↓**	1.069	0.696	↑	1.318	1.382	↑*	1.350	1.348	↑*	1.100	0.502	↑
PI(18 : 0/18 : 1)	0.478	1.260	↑**	1.015	1.283	↑	0.902	0.520	↓	0.935	0.533	↓	0.708	1.665	↓**
PS(18 : 0/18 : 1)	0.525	1.348	↑**	1.117	2.190	↑	0.712	2.173	↓*	0.810	1.629	↓*	0.447	2.675	↓**
PS(27 : 0/11 : 3)	0.410	1.270	↑**	0.806	0.220	↓	0.757	1.305	↓	0.798	1.147	↓	0.610	1.767	↓**
SM(d44 : 0)	0.140	6.669	↑**	0.740	7.057	↓	0.702	7.006	↓	0.673	7.279	↓*	0.622	7.090	↓*
ST(m17 : 1/19 : 1)	1.991	6.542	↓**	1.042	2.240	↑	1.185	5.323	↑	1.205	5.061	↑	1.365	4.923	↑*
TG(18 : 1/18:1/18 : 1)	0.434	7.419	↑**	0.962	4.334	↓	0.942	3.992	↓	0.969	3.229	↓	0.843	5.941	↓*
TG(18 : 1/18 : 2/18 : 2)	0.571	6.131	↑**	1.003	4.821	↑	0.869	4.393	↓	0.841	6.252	↓*	0.917	3.266	↓
TG(18 : 3/18 : 2/18 : 2)	0.650	1.256	↑**	0.681	2.811	↓**	1.309	1.673	↑	0.844	1.404	↓	0.835	1.367	↓
TG(20 : 0e/18 : 2/18 : 3)	0.096	1.522	↑**	0.806	1.097	↓	1.326	1.988	↑	1.558	2.267	↑	3.126	3.579	↑**
TG(18 : 1e/16 : 0/22 : 5)	0.053	1.106	↑**	0.734	1.293	↓	0.645	1.155	↓	0.533	1.407	↓**	0.699	0.960	↓
TG(20 : 4e/18 : 1/18 : 2)	0.136	2.557	↑**	0.888	2.198	↓	1.008	2.689	↑	0.996	2.169	↓	1.887	4.059	↑*
TG(20 : 0e/18 : 2/20 : 5)	0.100	1.027	↑**	0.695	1.251	↓	0.891	0.750	↓	1.038	0.756	↑	2.282	1.785	↑*
DG(32 : 1e)	0.370	1.978	↑**	0.817	1.896	↓	0.754	2.183	↓*	0.819	1.860	↓	0.763	1.870	↓*
DG(32 : 3e)	0.126	1.673	↑**	0.639	2.092	↓	0.587	2.105	↓	0.615	2.016	↓	0.564	1.880	↓*
DG(32 : 4e)	0.206	1.150	↑**	0.619	1.591	↓	0.701	1.281	↓	0.642	1.405	↓	0.564	1.339	↓*
DG(18 : 1/18 : 2)	0.656	3.614	↑**	0.980	3.641	↓	0.877	3.012	↓	0.845	4.226	↓	0.684	6.737	↓**
DG(36 : 3e)	0.470	2.269	↑**	0.979	1.947	↓	0.865	1.451	↓	0.895	1.478	↓	0.666	3.330	↓**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。↑: 含量上升; ↓: 含量下降。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ↑: The content rises; ↓: The content decreases.

2.3.5.3 差异代谢物的富集通路

为明确 OVSWE 干预 NASH 大鼠肝脏脂质代谢潜在差异代谢物所涉及的相关代谢通路, 将 OVSWE 干预后的差异脂质所归属的 11 种脂质分子: 磷脂酰甘油 (phosphatidylglycerols, PG)、PE、PG、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositols, PI)、磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)、Cer、DG、

己糖神经酰胺 (hexosylceramide, Hex1Cer)、溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidyl choline, LPC)、单硬脂酸甘油酯 (monoglyceride, MG)、SM 及 TG, 进行 KEGG 通路富集分析, 如图 9 所示, OVSWE 调控 NASH 大鼠肝脏脂质代谢通路主要集中在鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、嘧啶代谢及嘌呤代谢。

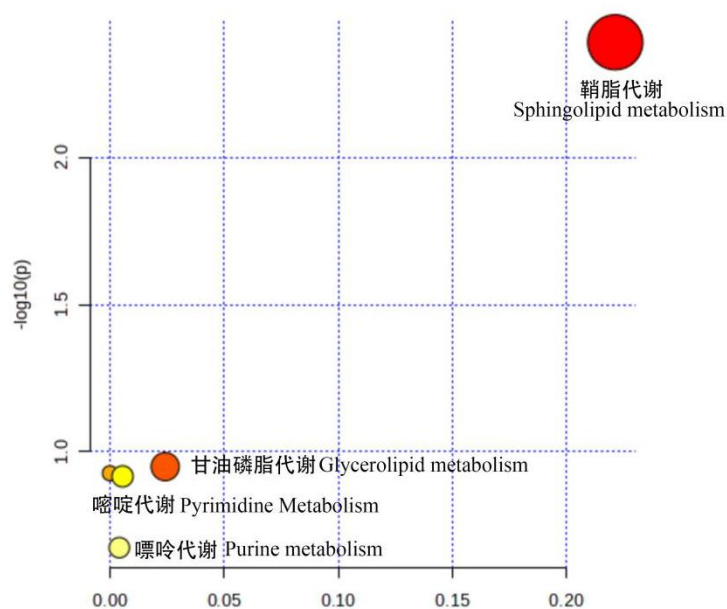


图 9 脂质代谢通路分析结果

Fig. 9 Analysis results of lipid metabolic pathways

2.3.6 OVSWE 对 NASH 大鼠肝脏组织 InsR、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平的影响

与 Con 组相比, Mod 组肝脏组织 InsR 和 p-AKT/AKT 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与 Mod 组相比, OVSWE 各剂量组肝脏组织 InsR 蛋白相对表达量显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); OE-H 组 p-AKT/AKT 蛋白相对表达量显著上升 ($P < 0.05$) (见表 6、图 10)。

表 6 OVSWE 对 NASH 大鼠肝脏组织 InsR 和 p-AKT/AKT 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 6 Effects of OVSWE on InsR and p-AKT/AKT protein relative expression levels in liver tissues of NASH rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Group	InsR/GAPDH	p-AKT/AKT
Con	1.05 ± 0.02	0.54 ± 0.02
Mod	0.65 ± 0.03 [#]	0.43 ± 0.04 [#]
Ess	0.77 ± 0.11	0.47 ± 0.03
OE-L	1.05 ± 0.11 [*]	0.44 ± 0.03
OE-M	1.25 ± 0.24 ^{**}	0.52 ± 0.03
OE-H	1.25 ± 0.06 ^{**}	0.53 ± 0.01 [*]

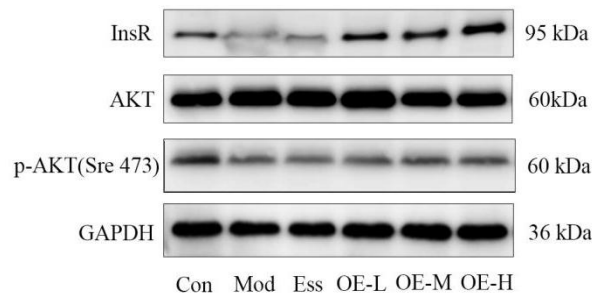


图 10 OVSWE 对 NASH 大鼠肝脏组织 InsR 和 p-AKT/AKT 蛋白相对表达量的影响

Fig. 10 Effects of OVSWE on InsR and p-AKT/AKT protein relative expression levels in liver tissues of NASH rats

3 讨论与结论

NASH 是单纯性脂肪肝 (non-alcoholic simple fatty liver, NAFL) 进化为肝纤维化、肝硬化和肝癌的关键阶段, 是迄今为止临床实践中最常见的慢性肝病。NASH 是多因素共同导致的结果, 中药多靶点和多途径的用药特点是治疗疾病的独特优势。OVSWE 虽对 NASH 具有较好的治疗作用^[5], 但其治疗 NASH 的作用机制尚不明确。

本文通过现代网络药理学, 筛选 OVSWE 治疗 NASH 的核心靶点为 AKT1、ESR1、PIK3R1、PIK3CA 等, 其在肝脏等胰岛素反应组织显著表达^[14]。当胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 发生磷酸化时, 激活的 IRS 与 PI3K 结合转化, 进而激活下游信号因子 AKT^[13], 调节葡萄糖和脂质, 从而缓解 NASH 症状。结合分子对接结果分析可得, AKT1 对治疗 NASH 具有重要意义。进一步综合 GO 富集和 KEGG 富集结果分析, OVSWE 治疗 NASH 相关性最高的是 IR 信号通路, 核心靶点 AKT1 参与的 InsR/PI3K/AKT 通路可调节胰岛素、缓解 IR。因此我们推测调节胰岛素相关指标及其信号路的表达可能是 OVSWE 治疗 NASH 的关键途径, 并通过动物实验对结果进行进一步验证。

当肝脏出现 IR 时, 胰岛素因无法促进肌肉摄取 GLU 并抑制肝脏中的糖异生, 从而导致机体出现不同程度的 GLU、脂质代谢紊乱^[15]及 FFA 增加。肝内 FFA 可与甘油酯化, 以 TG 的形式在肝脏内大量堆积, 诱发 NASH。本实验通过生化试剂盒检测可知, OVSWE 给药可显著降低大鼠肝脏组

组织中的 TG 及 LDL-C 含量, 血清 GLU、FFA 含量、空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数亦明显降低, 表明 OVSWE 可减少脂质在 NASH 大鼠肝组织中的蓄积, 缓解 IR, 降低 NASH 的发病风险。

脂质代谢通路分析结果表明脂质代谢主要表现在鞘脂代谢及甘油磷脂代谢通路紊乱。鞘脂代谢包含 SM、Cer 等多种生物活性脂质, SM 可通过鞘磷脂酶途径水解成 Cer, Cer 过多可导致机体出现 IR^[6]。PC 和 PE 是哺乳动物体内两种主要的甘油磷脂。PE 通过连续甲基化反应转化为 PC 将 TG 等中性脂肪输出肝脏, 当肝脏 PE 及 PC 含量降低时, 将导致更多的 DG 转化为 TG, 增加 NASH 的产生风险^[7]。本实验研究中 OVSWE 给药组大鼠肝脏中 SM 及 Cer 含量下降, PC 及 PE 含量增加, 表明 OVSWE 可能通过调控鞘脂代谢及甘油磷脂代谢缓解机体脂质代谢紊乱及 IR, 减少脂肪在肝脏中的过度堆积。InsR/PI3K/AKT 是调控胰岛素水平的经典通路, 当机体出现营养过剩导致脂肪组织膨胀缺氧超过其储存能力时, 脂肪组织发生 IR, 抑制肝脏 InsR 磷酸化, 从而抑制下游 PI3K 激活, 进而降低 AKT 活性, 脂肪生成增多, 肝脏出现脂肪变性, 最终形成 NASH^[18-20]。本实验研究中, OVSWE 可上调 InsR 及 p-AKT/AKT 蛋白表达水平, 说明 OVSWE 通过 InsR/PI3K/AKT 调节机体胰岛素水平, 缓解 IR, 减少肝脏脂肪堆积, 治疗 NASH。

本实验研究基于网络药理学及动物实验, 发现 OVSWE 对高脂高糖饮食联合 CCl₄ 诱导的 NASH 大鼠肝损伤指标升高、血脂异常、血糖升高、IR 和肝脏脂质含量升高有较好的治疗效果。提示了 OVSWE 对高脂高糖饮食联合 CCl₄ 诱导的 NASH 大鼠的作用机制可能与激活 InsR/PI3K/AKT 信号通路、调节脂质代谢及改善 IR 有关。在未来的研究中我们将进一步探索 OVSWE 对 NASH 模型动物的治疗作用及作用机制。

参考文献

- 1 Li JX, Chen J, Wang YL. Consensus on the diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease with integrated traditional Chinese and Western medicine(2017)[J]. Chin J Int Tradit West Med Dig(中国中西医结合消化杂志), 2017, 25: 805-811.
- 2 Dulai PS, Singh S, Patel J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis[J]. Hepatology, 2017, 65: 1557-1565.
- 3 Pang M, Shan Y, Wang FF, et al. Protective effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds on acetaminophen-induced acute liver injury in mice: roles of activating hepatic AMPK/AKT/GSK-3 β signaling[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2020, 36: 34-41.
- 4 Thomas M, Ahmad M, Cobbold JF, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in adults: current concepts in

- etiology,outcomes,and management[J].Endocr Rev,2020,41:66-117.
- 5 Alves-Bezerra M,Cohen DE.Triglyceride metabolism in the liver[J].Compr Physiol,2017,8(1):1-8.
 - 6 Liu SJ,Zhang GJ,Cui HM,et al.Chemical constituents from the seeds of *Orychophragmus violaceus*[J].Int J Pharm Res(国际药学研究杂志),2018,45:238-243.
 - 7 Zhang TT,Ma GX,Xu FQ,et al.Water-soluble constituents from of seeds *Orychophragmus violaceus*[J].Chin Pharm J(中国药学杂志),2014,49:2165-2167.
 - 8 Lipinski CA,Lombardo F,Dominy BW,et al.Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings[J].Adv Drug Deliv Rev,1997,23:3-25.
 - 9 Ghose AK,Viswanadhan VN,Wendoloski JJ.A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery.1.A qualitative and quantitative characterization of known drug databases[J].J Comb Chem,1999,1:55-68.
 - 10 Veber DF,Johnson SR,Cheng HY,et al.Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates[J].J Med Chem,2002,45:2615-2623.
 - 11 Egan WJ,Merz KM Jr,Baldwin JJ.Prediction of drug absorption using multivariate statistics[J].J Med Chem,2000,43:3867-3877.
 - 12 Muegge I,Heald SL,Brittelli D.Simple selection criteria for drug-like chemical matter[J].J Med Chem,2001,44:1841-1846.
 - 13 Shimomura I,Matsuda M,Hammer RE,et al.Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice[J].Mol Cell,2000,6:77-86.
 - 14 Dummler B,Tschopp O,Hynx D,et al.Life with a single isoform of Akt:mice lacking AKT and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies[J].Mol Cell Biol,2006,26:8042-8051..
 - 15 Chalhoub IG,Boulos RT,Dagher YG,et al.Statins,commonly coprescribed drugs,and concomitant risk factors:A protective,neutral,or harmful association with common cancer types development:A 10-year multicentric retrospective lebanese study[J].Medicine(Baltimore),2023,102:e34562.
 - 16 Eisinger K,Krautbauer S,Hebel T,et al.Lipidomic analysis of the liver from high-fat diet induced obese mice identifies changes in multiple lipid classes[J].Exp Mol Pathol,2014,97:37-43.
 - 17 Feng S,Gan L,Yang CS,et al.Effects of stigmasterol and β -sitosterol on nonalcoholic fatty liver disease in a mouse model:a lipidomic analysis[J].J Agric Food Chem,2018,66:3417-3425.

- 18 Tian S,Wang M,Liu C,et al.Mulberry leaf reduces inflammation and insulin resistance in type 2 diabetic mice by TLRs and insulin signalling pathway[J].BMC Complement Altern Med,2019,19:326-338.
- 19 Yao FY,Zhong Q,Wu YY,et al.Mechanism of modified Wendan decoction against nutritional obesity in young female rats:an exploration based on INSR/PI3K/Akt signaling pathway[J].Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床),2021,37:26-29.
- 20 Pu YZ,Chen HF,Su C.Mechanisms of caffeoylquinic acids from *Erigeron breviscapus* in delaying aging through regulating the PI3K/Akt/FoxO3a pathway[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:737-747.

收稿日期: 2024-03-21

接受日期:

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX09201-011)

*通信作者 Tel: 53912122; E-mail: wangj@bucm.edu.cn, wangzhibin4804@126.com