

基于网络药理学研究活血调脂方对糖尿病性脂肪肝脂质代谢的作用

周涛涛¹, 徐定昌¹, 平 菁¹, 张春枚¹, 孙继佳², 王雨稼^{1*}

(1. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学数学与物理教研室, 上海 201203)

摘要: **目的** 基于网络药理学分析活血调脂方对糖尿病性脂肪肝的通路调节机制, 并通过体外实验对关键通路进行验证。**方法** 收集活血调脂方的化学成分并通过 SwissADME 筛选出有效成分, 对有效成分进行靶点预测; 从 DisGeNET、DrugBank、OMIM、TTD 获得与糖尿病性脂肪肝有关的疾病基因; 构建有效成分-靶点-疾病网络图, 对靶点基因进行 GO 功能和 KEGG 富集分析, 并对关键成分和靶点进行分子对接验证。基于靶点基因在通路中的分布, 用活血调脂方干预 HepG2 细胞疾病模型进行体外验证。**结果** KEGG 富集得到的非酒精性脂肪性肝病、胰岛素抵抗、PPAR 信号通路等疾病关系最密切。分子对接显示关键成分和靶点结合稳固。体外实验显示, 与模型组比较, 活血调脂方能增加细胞葡萄糖消耗 ($P<0.05$), 改善胰岛素敏感性 ($P<0.05$), 降低 TG 水平 ($P<0.05$), 减少脂质沉积, 降低 p-IRS-1、SREBP-1C、SOCS-3 蛋白表达 ($P<0.05$), 升高 p-Akt、p-GSK-3 β 、Adiponectin、PPAR γ 蛋白表达 ($P<0.05$)。**结论** 活血调脂方通过 IRS-1/AKT/GSK-3 β 信号通路改善胰岛素信号传导, 并且通过下调 SREBP-1C、SOCS-3 蛋白表达, 上调 Adiponectin、PPAR γ 蛋白表达调节脂质代谢和改善胰岛素抵抗, 进而达到治疗糖尿病性脂肪肝的作用。

关键词: 活血调脂方; 糖尿病性脂肪肝; 网络药理学; 脂质代谢; 胰岛素抵抗; IRS-1/AKT/GSK-3 β 信号通路

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1993-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.049

中国的糖尿病性脂肪肝患者数量预计在未来的几十年将大规模增加^[1], 严重代谢紊乱带来的健康问题将引起巨大的医疗负担^[2-8], 活血调脂方是上海中医药大学附属龙华医院肝病科副主任医师王雨稼副教授的经验方, 针对糖尿病性脂肪肝脾虚湿盛兼夹血瘀的特点配伍而成, 在临床诊疗中发现该方具有很好的降低糖尿病性脂肪肝患者肝脂肪水平的作用。

通过筛选活血调脂方中的有效成分以及糖尿病性脂肪肝的治疗靶点, 以建立药物有效成分-靶点-疾病网络并进行 GO 功能和 KEGG 富集分析, 运用网络药理学方法揭示并体外验证活血调脂方治疗糖尿病性脂肪肝的作用机制。

1 方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 有效成分的收集与筛选 活血调脂方由丹参、西红花、荷叶、绞股蓝、土茯苓、苍术、徐长卿 7 味药配伍而成, 分别通过 TCMSP (<http://tcmssp.com/tcmssp.php>)、TCMID (<http://119.3.41.228:8000/tcmid/search/>) 对药物成分进行收集, 并补充《中药大辞典》^[9] 收录的成分, 再与 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库进行校验校对。利用 SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) 在线数据分析软件, 以 Lipinski、ESOL Class、GI absorption、Bioavailability Score 为

指标, 对活血调脂方中的化学成分进行筛选, Lipinski 取 0; ESOL Class 为化合物溶解性指标, 在筛选时除去评价为“poorly soluble”的成分; Bioavailability Score 为口服利用度得分, 取值 ≥ 0.55 ; “GI absorption”是评价化合物的胃肠道吸收的情况, 保留评价为“high”的成分。

1.1.2 有效成分和疾病的靶点预测和识别 使用 SEA (<http://sea.bkslab.org/>)、HitPick (<http://mips.helmholtzmuellen.de/proj/hitpick>) 和 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>) 数据库对有效成分进行靶点预测。在 DisGeNET (<http://disgenet.org/home/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>)、OMIM (<https://omim.org/>) 和 TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库分别收集 2 型糖尿病和非酒精性脂肪性肝病相关的基因, 使用 Venny 2.1.0 在线分析系统 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将 2 个病从 4 个数据库中收集到的靶点基因取交集得到 2 个病的交集基因, 即得到糖尿病性脂肪肝的相关基因。

1.1.3 构建有效成分-靶点-疾病网络图 将有效成分、药物作用靶点和疾病相关基因输入 Cytoscape 3.8.1 构建了活性成分-靶点-疾病网络图, 可视化有效成分和相关靶点之间的作用关系, 并使用 Network-Analyzer 插件对网络图进行分析。

收稿日期: 2021-11-10

基金项目: 上海中医药大学科学技术处项目 (A1-Z203020105)

作者简介: 周涛涛 (1996—), 男, 硕士生, 从事复方调控糖尿病性脂肪肝研究。Tel: 18879361969, E-mail: zhoutaotao2021@163.com

* 通信作者: 王雨稼 (1970—), 女, 硕士, 副教授, 从事复方调控糖尿病性脂肪肝研究。Tel: 13162032222, E-mail: Yaostyn@sina.com

1.1.4 靶点 GO 功能与 KEGG 富集分析 引用 R 语言数据包对疾病相关基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 并且根据 P 值和基因数目自动生成 GO 功能和 KEGG 富集注释图。选取 $P < 0.01$ 的 3 条核心通路运用 Cytoscape 3.8.1 软件构建靶点-通路网络图。

1.1.5 构建 PPI 网络与模块分析 将有效成分与糖尿病性脂肪肝的交集基因导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库, 设置 Organism 参数为 *Homo Sapiens*, 将 Combine Score 阈值取为 0.4。使用 Cytoscape 3.8.1 的 CytoNCA 插件对 KEGG 富集得到的 3 条核心通路的关键蛋白基因进行分析, 得到关键蛋白基因的 Betweenness、Closeness、Degree、Eigenvector、LAC、Network 评分。

1.1.6 分子对接验证 通过分子对接技术将有效成分-靶点-疾病网络图中 Degree 值大于 19 的有效成分与 KEGG 富集得到的 3 条核心通路的关键蛋白进行分子对接验证。在 Pubchem 下载有效成分的 2D 结构, 再使用 ChemBio3D Ultra 14.0 软件对 2D 结构按照最小自由能进行优化得到小分子配体文件。通过 PDB 数据库 (<http://www1.rcsb.org/>) 得到核心靶点的 pdb 结构文件, 再使用 Pymol 软件 (<https://pymol.org/2/>) 去除核心靶点 pdb 结构文件中的水分子和小分子配体得到蛋白受体文件。将小分子配体文件和蛋白受体文件导入 AutoDockTools 1.5.6 软件计算每对小分子配体和蛋白受体文件最佳结合的区域, 通过 AutoDock Vina 软件 (<http://vina.scripps.edu/>) 进行半柔性分子对接计算得到每对小分子和作用靶点的亲和力值 (affinity)。使用 Discovery Studio 2019 软件绘制有效成分与靶点的结合构像图并标注出结合位点。

1.2 实验材料

1.2.1 细胞 人肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.2.2 试剂与药物 丹参 (批号 200914)、西红花 (批号 202010)、绞股蓝 (批号 201022)、荷叶 (批号 20201015)、土茯苓 (批号 200917)、苍术 (批号 20201013)、徐长卿 (批号 200812) 均购自上海中医药大学附属曙光医院。盐酸二甲双胍 (批号 S30880) 购自上海源叶生物科技有限公司; 阿昔莫司 (批号 32200925) 购自鲁南贝特制药有限公司。GAPDH 抗体 (批号 AF1186) 购自上海碧云天生物技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 WB0123) 购自上海威奥生物技术有限公司; 细胞因子信号转导抑制因子 3 (SOCS-3) 抗体、固醇调节元件结合蛋白-1C (SREBP-1C)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 ab16030、ab28481、ab205718) 购自英国 Abcam 公司; 脂联素 (Adiponectin) 抗体、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、胰岛素受体底物 1 (IRS-1)、磷酸化胰岛素受体底物 1 (Phospho-IRS-1)、糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)、磷酸化糖原合成激酶-3 (Phospho-GSK-3)、Akt、Phospho-Akt (批号 2789T、2435T、3407T、2385T、12456T、5558T、4691T、4058T) 购自美国 Cell Signaling Technology

公司。

1.2.3 活血调脂方制备 参照临床给药剂量, 称取活血调脂方药材丹参 36 g, 荷叶 36 g, 绞股蓝 84 g, 苍术 24 g, 土茯苓 84 g, 徐长卿 84 g, 西红花 2 g, 用蒸馏水充分浸没煎煮 2 h, 汤液过滤除渣, 用旋转蒸发仪 (温度设置 50 $^{\circ}\text{C}$, 转速 40 r/min) 将滤液浓缩至膏状, 将浸膏-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 24 h 后置于冷冻干燥机中冷冻干燥, 得粉率为 8.14%, 收集干燥粉末样品, -20 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存。称取 1 g 活血调脂方冻干粉溶解于 10 mL 去离子水中, 充分震荡摇匀, 配制成 100 mg/mL 的活血调脂方母液, 3 000 r/min 离心 10 min, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用, 临用时用培养基稀释成不同剂量。

1.3 实验方法

1.3.1 油酸钠、棕榈酸钠、活血调脂方对 HepG2 细胞存活率的影响 以每孔 1×10^4 个细胞密度接种于 96 孔板中, 用含不同剂量油酸钠、棕榈酸钠、活血调脂方的培养基孵育 24 h, 每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h, 弃去孔内液体后, 加入 150 μL 二甲亚砜, 并通过酶联免疫检测仪检测 570 nm 波长处的光密度 (OD) 值。基于对照组的結果, 将获得的 OD 值进行归一化处理, 并计算各组细胞存活率。

1.3.2 活血调脂方对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的影响 参考文献 [10] 报道配制棕榈酸钠溶液, 对照组不作处理; 模型组用含有指定剂量棕榈酸钠溶液孵育 24 h; 活血调脂方组在棕榈酸钠溶液孵育 24 h 后给予不同剂量活血调脂方继续孵育 24 h, 二甲双胍组则加 2.5 mmol/L 二甲双胍。对照组、模型组、活血调脂方组、二甲双胍组均取半数给予 100 nmol/L 胰岛素刺激, 另一半不作处理, 同时无血清的高糖培养基再孵育 4 h, 比较各组间细胞对胰岛素的敏感性。葡萄糖水平检测参照试剂盒说明书进行操作。

1.3.3 活血调脂方对 HepG2 细胞脂肪肝模型的影响 参考文献 [11] 报道配制油酸钠溶液, 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养。对照组不作处理; 模型组用指定剂量油酸钠溶液孵育 24 h; 活血调脂方组在油酸钠溶液处理 24 h 后给予不同剂量活血调脂方再继续孵育 24 h, 阳性组则加 1 mmol/L 阿昔莫司。甘油三酯检测和油红 O 染色 ($\times 100$) 参照试剂盒说明书进行操作。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达 以每孔 3.5×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板, 设置对照组、模型组、阳性组 (二甲双胍组或阿昔莫司组) 和活血调脂方低、中、高剂量组。对照组正常孵育; 模型组使用指定剂量棕榈酸钠或油酸钠溶液孵育 24 h; 活血调脂方组在棕榈酸钠或油酸钠溶液处理 24 h 后给予不同剂量活血调脂方再继续孵育 24 h, 阳性组则加 2.5 mmol/L 二甲双胍或 1 mmol/L 阿昔莫司。收集各组细胞, 加入含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液, 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白样品经凝胶电泳, 转至 NC 膜, 脱脂

牛奶封闭 2 h, 分别加入 GAPDH (1 : 1 000)、IRS-1 (1 : 1 000)、p-IRS-1 (1 : 1 000)、GSK-3 β (1 : 1 000)、p-GSK-3 β (1 : 1 000)、Akt (1 : 1 000)、p-Akt (1 : 1 000)、SREBP-1C (1 : 1 000)、SOCS-3 (1 : 1 000)、Adiponectin (1 : 1 000) 和 PPAR γ (1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 2 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, ECL 发光试剂盒显影, 使用 ImageJ 1.8.0_172 软件进行半定量分析。

1.4 统计学分析 通过 SPSS 24.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学差异。

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 活血调脂方中的有效成分 从 TCMSP、TCMID、《中药大辞典》中共获得成分 347 个, 其中丹参 53 个, 荷叶 11 个, 绞股蓝 36 个, 西红花 43 个, 苍术 93 个, 土茯苓 61 个, 徐长卿 50 个。利用 SwissADME 对成分进行筛选后得到 198 个有效成分。

2.1.2 活血调脂方治疗疾病的靶点基因 通过 SEA、HitPick、SwissTargetPrediction 得到有效成分的靶点基因 411 个。通过 DisGeNET、DrugBank、OMIM、TTD 4 个数据库得

到糖尿病性脂肪肝相关基因 234 个。通过取交集得到活血调脂方治疗糖尿病性脂肪肝的 54 个作用靶点, 并在 GeneCard 数据库中对所有靶点基因再次核验。

2.1.3 构建有效成分-靶点-疾病网络图 建立有效成分-靶点-疾病网络图 (图 1) 更加全面地揭示活血调脂方治疗糖尿病性脂肪肝的有效成分和作用靶点之间的作用关系。其中, 蓝色是有效成分, 红色是有效成分作用于糖尿病性脂肪肝的靶点基因。该网络显示了 1 107 个节点和 404 条边, 具有更大的度值和更多边缘的节点发挥更加重要的作用, 用 Cytoscape 3.8.1 软件中的 Network Analyzer 插件进行分析选取 Degree 值大于 19 为核心成分, 具体见表 1。

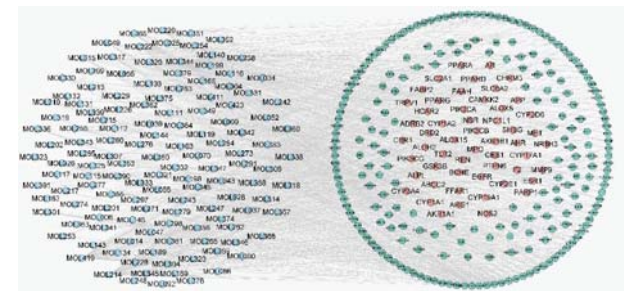


图 1 成分-靶点-疾病网络图

表 1 核心成分表

有效成分	Degree	PubchemID	胃肠道吸收	生物利用度	药物
quercetin	96	5280343	High	0.55	土茯苓、西红花
3beta-hydroxyatractylon	82	71448961	High	0.55	苍术
kaempferol	44	5280863	High	0.55	西红花
alpha-Eudesmol	40	92762	High	0.55	苍术、土茯苓
[(4S)-2-oxo-4-[(E)-1-oxobut-2-en-2-yl]-3,4-dihydropyran-5-yl] acetate	39	5317027	High	0.55	苍术
isorhamnetin	38	5281654	High	0.55	西红花
resveratrol	25	445154	High	0.55	土茯苓
myristic acid	19	11005	High	0.85	土茯苓、西红花、徐长卿

2.1.4 GO 功能分析 使用 R 语言 clusterProfiler 数据包得到活血调脂方作用靶点的 GO 功能分析注释图 (图 2A), 基于 $P < 0.05$ 得到 1 381 个 GO 条目, 其中生物进程 1 262 个, 细胞结构 34 个, 分子功能 85 个。在生物进程中, 交集靶点主要富集在脂肪酸代谢过程、对异源生物刺激的反应、类固醇代谢过程等条目; 在细胞结构中, 交集靶点主要富集在细胞顶端部分、神经细胞体、膜筏等条目; 在分子功能中, 交集靶点主要富集在血红素结合、四吡咯结合、铁离子结合等条目。

2.1.5 KEGG 富集分析 使用 R 语言 clusterProfiler 数据包得到活血调脂方作用靶点的 KEGG 富集分析注释图, 基于 $P < 0.05$ 得到 32 条通路, 图 2B 上显示 $P < 0.01$ 的 15 条通路主要与癌症、免疫、氧化应激、代谢、生物降解、耐药性、信号转导、病毒性疾病等内容相关。在 15 条通路中 PPAR 信号通路、非酒精性脂肪性肝病、胰岛素抵抗这 3 条通路与疾病关系最为密切, 图 2C 显示了靶蛋白在预测通路上的分布, 红色表示靶蛋白, 蓝色为体外实验验证的重要位点,

并使用 Cytoscape 3.8.1 软件构建这 3 条通路的靶点-通路网络图 (图 2D), 在此基础上开展了后续的机制验证。

2.1.6 PPI 核心网络 使用 STRING 构建 PPI 网络图 (图 3), 共有节点 54 个, 220 条边, 每个节点平均有 8.15 条边, 局部聚类系数为 0.394。使用 Cytoscape 3.8.1 的 CytoNCA 插件对 KEGG 富集得到的 3 条核心通路的关键蛋白基因进行评分, 关键蛋白基因的得分情况见表 2。

2.1.7 分子对接 通过分子对接研究发现活血调脂方中的核心有效成分 quercetin (槲皮素)、3beta-hydroxyatractylon、kaempferol (山柰酚)、alpha-eudesmol (α -桉叶醇)、[(4S)-2-oxo-4-[(E)-1-oxobut-2-en-2-yl]-3, 4-dihydropyran-5-yl] acetate、isorhamnetin (异鼠李素)、resveratrol (白藜芦醇)、myristic acid (肉豆蔻酸) 与 7 个关键通路蛋白 GSK3B、INSR、GLUT1、LXRA、PI3K、PPAR γ 、FABP 的亲合力值小于 -5 kcal/mol, 如表 3 所示, 说明这些有效成分与核心靶点结合稳固^[12], 能够改善或治疗糖尿病性脂肪肝。选择亲合力值小于 -7 kcal/mol 的关键蛋白和活性分子绘制对接模式图, 见图 4。

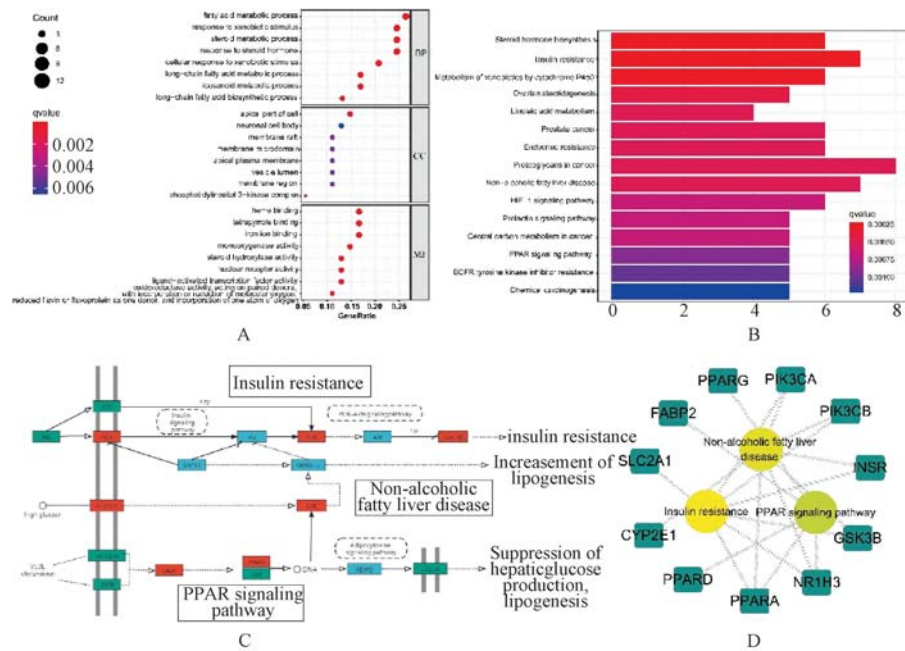


图 2 GO 功能分析和 KEGG 富集分析

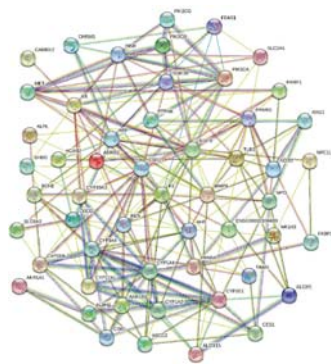


图 3 蛋白互作网络图

2.2 细胞实验

2.2.1 油酸钠、棕榈酸钠、活血调脂方对 HepG2 细胞存活率的影响 如图 5 所示,与对照组比较,0.8 (低剂量)、1.2 (中剂量)、1.6 mg/mL (高剂量)活血调脂方、1 mmol/L 油酸钠和 150 μ mol/L 棕榈酸钠的处理对细胞存活率无明显影响 ($P>0.05$),生存率均大于 90%,表明没有显著的细胞毒性,可以用于建模和给药。

2.2.2 活血调脂方对 HepG2 细胞糖脂代谢的影响 如图 6~7 所示,与未添加胰岛素刺激的对照组比较,胰岛素增加了细胞的葡萄糖消耗 ($P<0.05$),棕榈酸钠处理的模型组对胰岛素的刺激敏感性下降,并且葡萄糖消耗量相比

表 2 靶点蛋白评分表

靶点名称	Betweenness	Closeness	Degree	Eigenvector	LAC	Network	Information	Subgraph
GSK3B	19.3	0.5	7.0	0.1	2.6	3.0	3.8	943.5
INSR	39.1	0.5	9.0	0.1	2.4	3.8	4.2	792.4
SLC2A1	8.9	0.4	5.0	0.1	1.6	2.0	3.3	386.9
PIK3CA	106.8	0.5	14.0	0.2	4.6	8.7	4.9	2 430.4
NR1H3	5.3	0.4	3.0	0.0	0.0	0.0	2.6	58.2
PPARG	232.4	0.6	17.0	0.2	3.5	6.8	5.2	2 988.1
FABP2	7.4	0.4	3.0	0.0	0.0	0.0	2.6	74.9

表 3 Vina 分子对接结果表

Pubchem ID	活性成分	靶点蛋白	PDB ID	亲和力值/($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)
5280343	quercetin	GSK3B	4IQ6	-7.7
		INSR	5EIS	-6.9
71448961	3beta-hydroxyatractylon	GSK3B	4IQ6	-6.9
5280863	kemperor	GLUT1	5EQI	-7.1
92762	alpha-Eudesmol	LXRA	3IPQ	-5.5
5281654	isorhamnetin	LXRA	3IPQ	-5.6
445154	resveratrol	PI3K	4XE0	-7.1
11005	myristic acid	PPAR γ	7EFQ	-5.0
		FABP	2F73	-6.8
5317027	[(4S)-2-oxo-4-[(E)-1-oxobut-2-en-2-yl]-3,4-dihydropyran-5-yl] acetate	PI3K	4XE0	-6.6



图4 活血调脂方治疗糖尿病性脂肪肝的重要靶点与活性成分的分子对接

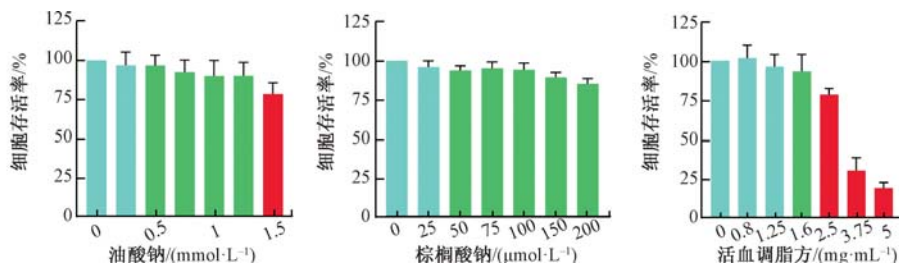
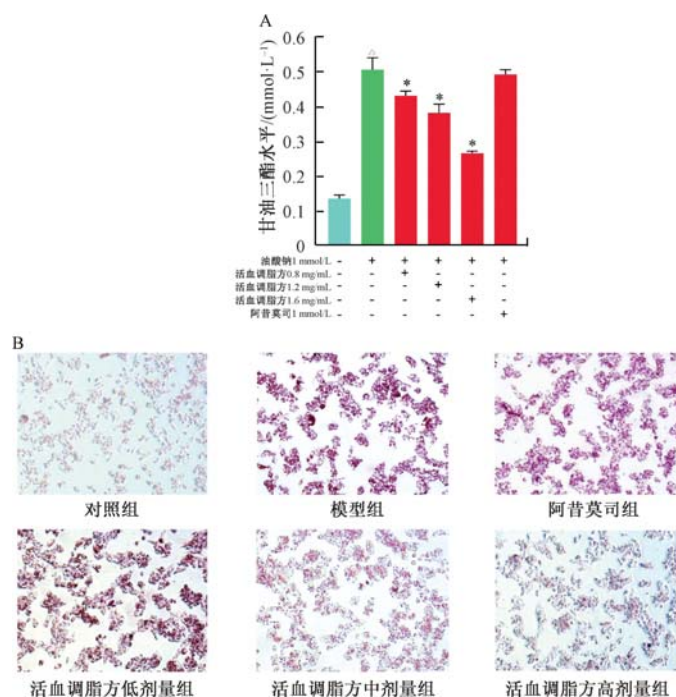


图 5 细胞毒性实验

Group	Glucose Consumption (mmol·L⁻¹)
Control	~6.8
Insulin 100 μmol/L	~9.2*
Insulin 0.8 mg/mL	~5.5*
Insulin 1.2 mg/mL	~5.5*
Insulin 1.6 mg/mL	~6.8*
Insulin 2.0 mg/mL	~6.8*
Insulin 2.4 mg/mL	~8.5*
Insulin 2.8 mg/mL	~8.5*
Insulin 3.2 mg/mL	~8.5*
Insulin 3.6 mg/mL	~8.5*

注:与对照组比较,[△] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与不另加胰岛素刺激组比较,[#] $P<0.05$ 。

图 6 活血调脂方对糖代谢的影响



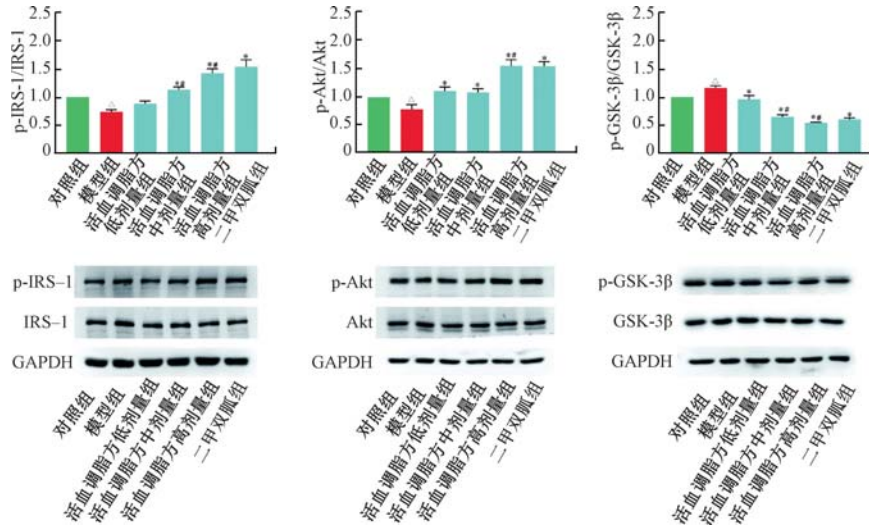
注:与对照组比较, $^{\Delta}P<0.05$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$ 。

图 7 活血调脂方对糖脂代谢的影响

红 O 染色后细胞内脂质积累的差异,如图 7B 所示,与对照组比较,模型组染色更深,表明模型组细胞内脂质积累增加,而中药给药组之间的着色程度随着药物剂量的增加而递减。

2.2.3 活血调脂方对胰岛素信号通路的影响 如图 8 所示,与对照组比较,棕榈酸钠诱导的模型组 p-IRS-1 和 p-Akt 表达降低 ($P<0.05$), p-GSK-3 β 表达升高 ($P<0.05$);

与模型组比较,活血调脂方组细胞 p-IRS-1、p-Akt 表达升高 ($P<0.05$), p-GSK-3 β 表达降低 ($P<0.05$);与活血调脂方低剂量组比较,活血调脂方中、高剂量组细胞 p-IRS-1、p-Akt 表达升高 ($P<0.05$), p-GSK-3 β 的表达降低 ($P<0.05$)。结果表明,活血调脂方改善了胰岛素的信号传导,使得糖异生减少,肝糖原合成增加,减少了脂肪酸的合成。

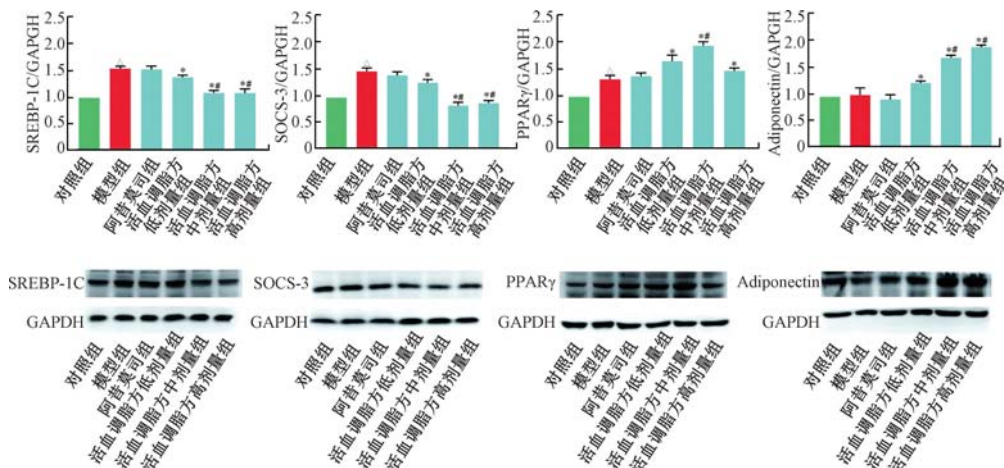


注:与对照组比较,[△] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与活血调脂方低剂量组比较,[#] $P<0.05$ 。

图 8 活血调脂方对胰岛素信号通路的影响

2.2.4 活血调脂方对脂代谢通路的影响 如图 9 所示,与对照组比较,模型组细胞 SREBP-1C、SOCS-3、PPAR γ 表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,活血调脂方各剂量组细胞 Adiponectin、PPAR γ 表达升高 ($P<0.05$), SOCS-3、SREBP-1C 表达降低 ($P<0.05$);与活血调脂方低剂量组比

较,活血调脂方中、高剂量组细胞 SREBP-1C、SOCS-3 表达降低 ($P<0.05$), Adiponectin 表达升高 ($P<0.05$), 活血调脂方中剂量组 PPAR γ 表达升高 ($P<0.05$)。结果表明,活血调脂方减少了脂肪酸的从头合成,增加了脂肪酸的燃烧和能量的消耗,并改善胰岛素抵抗。



注:与对照组比较,[△] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与活血调脂方低剂量组比较,[#] $P<0.05$ 。

图 9 活血调脂方对 HepG2 细胞脂代谢通路的影响

3 讨论

细胞实验表明活血调脂方可以增加葡萄糖的摄入改善胰岛素抵抗同时减少肝细胞内甘油三酯的堆积,网络药理学的分析结果提示活血调脂方可能通过胰岛素抵抗、非酒精性脂肪性肝病、PPAR 信号通路这三条通路调节糖脂代谢,胰岛素信号传导路径 IRS-1/AKT/GSK-3 β 在胰岛素抵

抗的发生中起关键作用^[13]。脂联素是一种抗炎脂肪因子,可以减少肝糖原生成并增加脂肪酸氧化,有助于治疗和预防糖尿病性脂肪肝,PPAR γ 的激活可以显著抑制脂多糖引起的炎症反应,同时增加脂联素的表达^[14]。SOCS-3 的过表达可以导致胰岛素抵抗和肝脏脂肪酸合成的关键调节因子 SREBP-1C 的增加,对 SOCS-3 表达的抑制作用可以改善胰

胰岛素敏感性降低肝脂肪水平和血脂水平^[15]。

中医认为糖尿病性脂肪肝其成因可归为内外因 2 部分，外因多是贪食高粱肥甘之味，生湿酿痰；内因则主要是脾失健运，肝失疏泄。病位主要涉及肝脾，病久则五脏皆受累，多见脾虚湿盛兼夹血瘀，治宜健脾祛湿，活血降脂。活血调脂方由丹参、荷叶、绞股蓝、西红花、苍术、土茯苓、徐长卿 7 味药物组成。丹参是近 20 年来中医药治疗糖尿病性脂肪肝使用频次最高的药物^[16]，尚涛等^[17]发现丹参可在改善胰岛素抵抗基础上进一步改善脂代谢和肝功能。绞股蓝提取液可以通过增强线粒体磷脂的稳定性进而预防脂质蓄积和氧化应激，对糖尿病性脂肪肝患者有益^[18]。荷叶可以增强大鼠的脂质代谢并降低血液中甘油三酯水平^[19]。苍术的挥发油可以实现体外降血糖，是治疗高血糖的潜在药物^[20]。本研究运用网络药理学还发现土茯苓和西红花均含有槲皮素；肉豆蔻酸存在于土茯苓、西红花、徐长卿等药物中；另外西红花中还富含异鼠李素、山柰酚等活性成分。活血调脂方主要组分能够调控 GSK3B、INSR、PI3K、PPAR γ 等 54 个靶点，介导 PPAR 信号通路、非酒精性脂肪性肝病、胰岛素抵抗等 32 条通路，参与脂肪酸代谢过程、对异源生物刺激的反应、类固醇代谢过程等生物进程从而治疗糖尿病性脂肪肝。本研究通过生物信息学结合体外实验，初步验证了活血调脂方治疗糖尿病性脂肪肝的理论基础。

综上所述，活血调脂方是治疗糖尿病性脂肪肝的一种“多成分，多靶点，多路径”的临床复方，其作用机制主要是改善糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗，本研究为中医复方治疗糖脂代谢紊乱相关疾病提供新思路和新方法，为后续研究复方调控糖尿病性脂肪肝提供新的理论依据并指导临床用药。

参考文献:

- [1] Estes C, Anstee Q M, Arias-Loste M T, *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.
- [2] Dai W J, Ling Y, Liu A Z, *et al.* Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(39): e8179.
- [3] Younossi Z M, Golabi P, De A L, *et al.* The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis[J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 793-801.
- [4] Amiri Dash Atan N, Koushki M, Motedayen M, *et al.* Type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2017, 10(Suppl1): S1-S7.
- [5] Ballestri S, Zona S, Targher G, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis [J]. *J Gastroenterol*

- Hepatol*, 2016, 31(5): 936-944.
- [6] Alexander M, Loomis A K, van der Lei J, *et al.* Risks and clinical predictors of cirrhosis and hepatocellular carcinoma diagnoses in adults with diagnosed NAFLD: real-world study of 18 million patients in four European cohorts[J]. *BMC Medicine*, 2019, 17(1): 95.
- [7] Koehler E M, Plompen E P, Schouten J N, *et al.* Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: The Rotterdam study [J]. *Hepatology*, 2016, 63(1): 138-147.
- [8] Mu W, Cheng X F, Liu Y, *et al.* Potential nexus of non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: insulin resistance between hepatic and peripheral tissues [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 9: 1566.
- [9] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 2006: 122-2663.
- [10] Cousin S P, Hugl S R, Wrede C E, *et al.* Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(1): 229-240.
- [11] Gao J, Li J, An Y T, *et al.* Increasing effect of Tangzhiqing formula on IRS-1-dependent PI3K/AKT signaling in muscle[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 198.
- [12] Naqvi A A T, Mohammad T, Hasan G M, *et al.* Advancements in docking and molecular dynamics simulations towards ligand-receptor interactions and structure-function relationships [J]. *Curr Top Med Chem*, 2018, 18(20): 1755-1768.
- [13] Saltiel A R, Kahn C R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism[J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 799-806.
- [14] Ishtiaq S M, Rashid H, Hussain Z, *et al.* Adiponectin and PPAR: a setup for intricate crosstalk between obesity and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, 20(3): 253-261.
- [15] Farrell G C. Signalling links in the liver: knitting SOCS with fat and inflammation[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(1): 193-196.
- [16] 王 悦. 中医药治疗 2 型糖尿病并非酒精性脂肪肝用药规律分析[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.
- [17] 尚 涛, 杜玉茗, 姚庆春, 等. 吡格列酮联合丹参对糖尿病脂肪肝患者糖、脂代谢及肝损伤的影响[J]. *吉林中医药*, 2013, 33(4): 374-375.
- [18] Müller C, Gardemann A, Keilhoff G, *et al.* Prevention of free fatty acid-induced lipid accumulation, oxidative stress, and cell death in primary hepatocyte cultures by a *Gynostemma pentaphyllum* extract [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(5): 395-401.
- [19] Kim H Y, Hong M H, Kim K W, *et al.* Improvement of hypertriglyceridemia by roasted *Nelumbinis folium* in high fat/high cholesterol diet rat model [J]. *Nutrients*, 2020, 12(12): 3859.
- [20] Wang Y, Yan M, Qin R, *et al.* Enzymolysis-microwave-assisted hydrodistillation for extraction of volatile oil from *Atractylodes chinensis* and its hypoglycemic activity *in vitro*[J]. *J AOAC Int*, 2021, 104(4): 1196-1205.