

· 数字医学 ·

基于网络药理学和生物信息学探讨葛根芩连方治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制

唐高俊¹, 胡杰¹, 张宝芳²

(1. 贵州医科大学临床医学院, 贵州 贵阳 550000; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵州 贵阳 550000)

摘要: **目的** 基于网络药理学及生物信息学探讨葛根芩连方治疗非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的作用机制。 **方法** 首先从GEO数据库中下载NAFLD的GSE89632和GSE63067的微阵列数据集, 通过数据清洗后及以识别健康个体和NASH患者样本之间的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 其次在GeneCards数据库中下载NAFLD蛋白质编码的表型基因。利用TCMSP数据库和相关文献筛选葛根芩连方主要活性成分及靶点, 通过Uniprot蛋白平台匹配靶点对应的靶基因, 然后将数据库数据集及GeneCards差异表达基因与葛根芩连方有效活性成分靶点进行交集, 绘制韦恩图, 上传至STRING平台, 进行蛋白质互作分析 (protein-protein interaction, PPI), 通过Cytoscape不同算法挖掘核心基因, 并通过Cytoscape 3.9.1软件构建核心基因蛋白互作网络及“葛根芩连方—活性成分—交集靶点基因”网络图; 并对交集靶点基因进行免疫浸润、免疫细胞差异分析及核心基因免疫细胞差异性分析。利用R软件对靶点进行基因功能 (gene ontology, GO) 富集与通路 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。并通过TargetScan数据库预测调控核心基因的上游miRNA, 利用AutoDock软件进行小分子药物配体与miRNA受体的分子对接, 利用Pymol进行可视化处理。 **结果** GEO等数据库筛选差异表达基因8467个, 葛根芩连方有效活性成分146个, 药物活性成分靶点基因与数据库差异表达基因交集47个, 核心基因10个, 趋化因子-2 (chemokines-2, CCL2)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、血红素加氧酶1 (heme oxygenase 1, HMOX1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等10个基因被鉴定为NAFLD有前途的诊断生物标志物。GO富集分析涉及对氧化应激、脂质代谢、泛素蛋白连接酶结合、细胞坏死及凋亡、miRNA转录调控等的反应, KEGG富集分析在磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路、非酒精性脂肪性肝病、核因子激活的B细胞的K-轻链增强子通路、肿瘤抑制因子信号通路。药物与疾病靶点交集基因免疫浸润分析得到活化树突状细胞, 自然杀伤T细胞, 自然杀伤细胞, 滤泡辅助性T细胞 (follicular helper T cell, Tfh), 辅助性T细胞2 (T help 2 cell, Th2), 细胞毒性T细胞 (cytotoxic T cell, CD8⁺ T) 是浸润NAFLD的主要免疫细胞, 免疫细胞差异分析及核心基因免疫相关性分析, 得到Tfh细胞、树突状细胞与Th2等与RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、信号转导与转录激活因子等核心基因的相关性较高。通过分子对接方法验证汉黄芩素、山柰酚、槲皮素等8个药物有效成分与调控核心基因的miRNA分子对接结合能力强。 **结论** 研究确定了10个核心基因及miRNA作为诊断NAFLD的潜在生物标志物。通过分子对接验证, 提示药物小分子与miRNA结合能力强, 因此miRNA可能是影响NAFLD发展的潜在调控途径。葛根芩连方药物有效活性成分通过调控miRNA影响核心靶点的转录为治疗NAFLD的分子机制提供新线索。同时免疫细胞Tfh细胞、树突状细胞与Th2等可能与核心基因协同影响NAFLD疾病的进程。

关键词: 生物信息学分析; 网络药理学; 葛根芩连方; 分子对接; 非酒精性脂肪性肝病

中图分类号: R289.5, R575.5 文献标志码: A 文章编号: 2097-5031(2024)01-0026-14

Exploration of the Mechanism of Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤) in Treating Non-alcoholic Fatty Liver Disease Based on Network Pharmacology and Bioinformatics

TANG Gaojun¹, HU Jie¹, ZHANG Baofang²

(1. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou, China;

2. Guizhou Medical University Affiliated Hospital, Guiyang 550000, Guizhou, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤) in treating non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) based on network pharmacology and bioinformatics. **Methods** We downloaded the microarray datasets of GSE89632 and GSE63067 for NAFLD from the GEO database. After data cleaning, we identified differentially expressed genes (DEGs) between healthy individuals and NASH patient samples. Secondly, we downloaded the phenotype genes encoded by NAFLD

作者简介: 唐高俊 (1989-), 男 (苗族), 贵州石阡人, 主治医师, 硕士在读, 研究方向: 内科疾病非酒精性脂肪性肝病。

通讯作者: 张宝芳 (1979-), 女, 贵州瓮安人, 副教授, 博士研究生导师, 博士后, 研究方向: 内科肝脏疾病。E-mail: 312368145@qq.com。

引用格式: 唐高俊, 胡杰, 张宝芳. 基于网络药理学和生物信息学探讨葛根芩连方治疗非酒精性脂肪肝病的作用机制 [J]. 中西医结合慢性病杂志, 2024, 1 (1): 26-38.

proteins from the GeneCards database. Using the TC MSP database and relevant literature to screen the main active ingredients and targets of Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤), matching the target genes corresponding to the targets through the Uniprot protein platform, and then crossing the database dataset and differentially expressed genes on GeneCards with the effective active ingredient targets of Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤), drawing a Venn diagram and uploading it to the STRING platform for protein protein interaction analysis (PPI). Core genes were mined using different algorithms of Cytoscape, and a core gene protein interaction network and a "Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤) active ingredient intersection target gene" network were constructed using Cytoscape 3.9.1 software. And perform immune infiltration, immune cell differential analysis, and core gene immune cell differential analysis on intersecting target genes. Perform gene (GO) functional enrichment and (KEGG) pathway enrichment analysis on the target using R software. And predict upstream miRNAs that regulate core genes through the Targeted Scan database, use AutoDock software for molecular docking of small molecule drug ligands with miRNA receptors, and use Pymol for visualization processing. **Results** 8467 differentially expressed genes were screened from databases such as GEO, 146 active ingredients of Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤) were identified, 47 target genes of drug active ingredients intersected with differentially expressed genes in the database, 10 core genes, and 10 genes including chemokine-2 (CCL2), interleukin-6 (IL-6), heme oxygenase 1 (HMOX1), tumor necrosis factor (TNF) were identified as promising diagnostic biomarkers for NAFLD. GO enrichment analysis involves responses to oxidative stress, lipid metabolism, ubiquitin ligase binding, cell necrosis and apoptosis, miRNA transcriptional regulation, etc. KEGG enrichment analysis is used in the PI3K-AKT signaling pathway, non-alcoholic fatty liver disease, NF- κ B pathway, and P53 signaling pathway. The intersection gene immune infiltration analysis of drugs and disease targets shows that activated dendritic cells, NK-T cells, NK cells, Tfh cells, Th2, CD8⁺ T cells are the main immune cells infiltrating NAFLD. Differential analysis of immune cells and immune correlation analysis of core genes show that Tfh cells, dendritic cells, Th2, and other core genes are highly correlated with AKT1, STAT3, and other core genes. The molecular docking method was used to verify the strong binding ability of eight active ingredients, including baicalein, kaempferol, and quercetin, to miRNA molecules that regulate core genes. **Conclusion** This study identified 10 core genes and miRNAs as potential biomarkers for diagnosing NAFLD. Through molecular docking verification, it is suggested that small drug molecules have strong binding ability with miRNA, indicating that miRNA may be a potential regulatory pathway affecting the development of NAFLD. The effective active ingredients of Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤) provide new clues for the molecular mechanism of treating NAFLD by regulating miRNA and affecting the transcription of core targets. Meanwhile, immune cells such as Tfh, dendritic cells, and Th2 may synergistically affect the progression of NAFLD disease with core genes.

Keywords: bioinformatics analysis; network pharmacology; Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤); molecular docking; non-alcoholic fatty liver disease

非酒精性脂肪性肝病^[1] (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 已成为全球最普遍的慢性肝脏疾患之一, 全球患病率约为 25.24%^[2], 中国患病率约为 29.81%, 其中 2%~3% 会发展为非酒精性脂肪性肝硬化^[3]。NAFLD 患病率较高, 是一种严重的肝脏明显病理改变过程, 它大大降低了患者的健康水平及生活质量^[4-6]。在未来几十年中, NAFLD 可能成为终末期肝病的主要原因^[7]。NAFLD 包括从非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver, NAFL) 到非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic fatty steatohepatitis, NASH)、纤维化和肝硬化等一系列疾病^[8]。NAFLD 的发病机制仍处于探索阶段, 目前占主导地位的仍然是“二次打击”学说, 由 20 世纪末著名科学家 Day 和 James 率先提出, 机体摄入过量脂肪、高糖等因素导致肝细胞内甘油三酯蓄积, 对肝细胞进行第一次打击, 导致机体对内源性损害因子敏感性增加, 活性氧生成增多, 并导致脂质过氧化和炎症产生, 对肝细胞进行第二次打击, 导致肝细胞变性、坏死、炎症反应, 严重者可进展至肝纤维化、肝硬化^[9]。“二次打击”

假说已成为了解这些患者肝损伤发病机制的重要理论框架^[10]。

NAFLD 至今仍无特效的治疗药物, 尚未发现特殊的西医治疗措施和疗效确切的西药, 目前改善的方法仍以改变生活方式和调整饮食习惯为主^[11], 而中医药具有多疗效多靶点优势。因此, 研究可以预防 NAFLD 发生发展的药物或天然产物显得尤为重要。中医经典古籍对于非酒精性脂肪肝的病名没有明确记载, 依据其症状、体征等特点, 将其归属为“胁痛”“积聚”“痞满”“肥气”等范畴。《难经》中所提及的“肝之积, 名曰肥气”是对本病最早的记载。《金匱要略》云:“积者, 脏病也, 终不移; 聚者, 腑病也, 发作有时。”^[12]指出了积和聚的区别。现代大多数医家认为该病是由于素体肝郁脾虚、体内水液代谢障碍, 导致痰浊瘀积于肝脏, 与“痰、食、湿、瘀”关系密切, 从而把本病统一归属为“肝癖”范畴。葛根芩连汤始载于张仲景《伤寒杂病论》, 由葛根、黄芩、黄连、甘草 4 味药物组成, 主治太阳表邪内陷所致热下利证^[13]。葛根解表、生津; 黄芩、黄连清热燥

湿;甘草补脾益气、化痰、调和诸药。从配伍的角度有助于解表清里、清热燥湿、燥湿化痰、生津润燥,正好切中NAFLD燥热伤津、湿热瘀结、痰瘀互结的病机。近年来的临床研究证实葛根芩连汤可用于治疗NAFLD等脂代谢紊乱类病症^[14]。但具体机制仍然不明确,为探究葛根芩连汤治疗NAFLD的具体机制,本研究采用了生物信息学及网络药理学等方法探究它们之间的机制,并通过分子对接对其机制进行验证,系统解析了葛根芩连汤治疗NAFLD的机制,并为临床应用及基础研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 NAFLD靶点的获取

以“NAFLD”为关键词,在GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)搜索与NAFLD的数据集,并通过R 4.3.3对数据集进行数据荟萃分析,在GeneCards数据库^[15](<https://www.GeneCards.org>)中检索NAFLD蛋白质编码的表型基因。

1.2 葛根芩连方化学成分及靶点的获取

运用中药系统药理学数据库与分析平台^[16](TCMSP, <https://www.tcmisp.com/tcmisp.php>),设置口服利用度 $\geq 30\%$ 及类药性 ≥ 0.18 ,筛选葛根芩连方的活性成分及靶点。通过Uniprot(<https://www.uniprot.org>)^[17]匹配靶点所对应的MoLID编号和基因名。

1.3 葛根芩连方有效活性成分靶点基因与NAFLD差异基因及GeneCards NAFLD表型基因的交集

利用软件R(4.2.1)版本,R包:ggplot2(3.3.6),VennDiagram(1.7.3),并对结果进行可视化,得葛根芩连方有效活性成分靶点基因和NAFLD差异基因(differentially expressed genes, DEGs)及GeneCards NAFLD表型基因的交集,并绘制韦恩图。

1.4 利用软件R绘制47个交集靶点基因的热图、火山图、PCA图及基因、通路富集分析

其中基因(gene ontology, GO)富集分析分别从基因的细胞组分、生物过程、分子功能方面进行注释。通路(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析只在富集通路上进行注释,并以基因功能、通路名称为横轴、基因比率为纵轴,颜色代表P值,绘制柱状图及气泡图。

1.5 药物与疾病靶点交集基因免疫浸润及免疫细胞差异分析

为了探索疾病的免疫微环境,基于药物有效成分靶点基因-GEO数据库、GeneCards数据库交集基因,采用CIBERSORT([http://CIBERSORT.stanford.](http://CIBERSORT.stanford.edu/)

[edu/](http://CIBERSORT.stanford.edu/))计算免疫细胞浸润评分,将22个免疫细胞基因作为参考组,设置排列数为1000, $P < 0.05$ 。免疫细胞浸润的结果通过“ggplot2”和“pheatmap”包可视化,最后通过R对免疫细胞进行差异分析。

1.6 通过STRING数据库构建蛋白质PPI互作网络

在STRING 12.0数据库(<https://www.STRING-db.org>)中构建蛋白质-蛋白质相互作用网络,生物种类设定为智人、分数(Score)默认为0.4,并运用R语言得到交集靶点度值大小(Count)文件及核心靶点的网络图。

1.7 通过STRING数据、Cytoscape 3.9.1软件中构建“葛根芩连方活性成分靶点基因与NAFLD交集靶点”网络图

网络拓扑分析葛根芩连方的核心成分,利用cytNCA、Mcode、cytohub 3种不同算法,通过R包:ggplot2(3.3.6),VennDiagram(1.7.3)取交集得到药物靶点与疾病交集的核心基因,并构建核心基因网络图及核心基因-药物有效成分-药物靶点与疾病交集基因的互作网络图。

1.8 核心基因免疫相关性分析

通过Cytoscape 3.9.1预测到的10个核心基因、免疫差异分析得到的主要免疫细胞,利用软件R及tidyverse包、ggplot2包、ggExtra包进行相关性分析,并可视化得到核心基因免疫相关热图。

1.9 通过核心基因预测上游调控的miRNA,通过cytscap软件构建核心基因与miRNA的网络图

浏览器输入www.TargetScan.org,进入主页,填入已知检索基因,选择代表性转录本,结果显示中出现多个依加权评分排序的与目的基因存在保守性或非保守性结合位点的miRNA,依次查看排名靠前miRNA与目的基因的结合信息,综合miRNA的保守性、Context++score值、Context++scorepercentile值、Weightcontext++score值、Conservedbranchlength、PCT值以及已有研究文献确定目的miRNA。

1.10 分子对接

从Pubchem数据库下载小分子化合物的结构,利用mcomposer数据库对miRNA核酸序列构建模型(单链),将核酸指定为受体,将化合物指定为配体采用AutoDockVina 1.2.1软件进行分子对接工作,在对接开始之前,设置对接盒子,使之包裹整个miRNA(单链)结构。此外,使用AFRSuite 1.0将所有处理好后的小分子以及miRNA(单链)蛋白转换为AutoDockVina 1.2.1对接必须的PDBQT格式。对接时,全局搜索的详尽度设为16,其余参数保持默

认设置。输出打分最高的对接构象被认为是结合构象,PyMol 2.5.5对接结果进行可视化分析。一般认为,结合能<0的分子即可自行结合,数值越小结合力越强。当结合能 ≤ -5 cal/mol时,可视为该化学成分可与靶点有效结合。

2 结果

2.1 NAFLD 基因表达

在GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中检索了NAFLD相关的基因表达微阵列。筛选标准如下:(1)生物类型仅限于智人;(2)肝组织仅来自健康人、单纯性肥胖和NASH患者;(3)每个数据集的样本数量超过5个;(4)样本的完整信息可用;(5)每个样本仅分析一次而没有复制。检索GSE63067和GSE89632两个数据集,分别包括2例单纯性肥胖患者、9例NASH患者、20例单纯性肥胖患者、19例NASH和24例健康人。通过数据整理及使用R 4.3.3得出GSE63067和GSE89632两个数据

集的荟萃分析数据,经过筛选条件logFC绝对值>0, $P \leq 0.05$,得到DEGs 7355个。在GeneCards数据库中筛选了NAFLD蛋白质编码的表型基因,筛选条件分值均大于1,得到NAFLD表型基因1112。

2.2 葛根芩连汤的活性成分及靶点

在TCMSP中葛根芩连方筛选出葛根有效活性成分4个,黄连有效活性成分14个,黄芩有效活性成分36个,甘草有效活性成分91个。见表1、表2。在Uniprot数据库中规范葛根芩连方活性成分所对应的靶基因,有11个有效成分未匹配到对应的靶点基因名,134个有效成分成功匹配到靶点基因,剔除重复后得到246个靶点基因。

表1 葛根芩连方的活性成分数

中药名称	筛选有效活性成分数
葛根	4
黄连	14
黄芩	36
甘草	91

表2 葛根芩连方的有效活性成分

药物	编号	分子编号	活性成分	口服利用度/%	类药性
葛根(GG)	GG1	MOL000392	刺芒柄花素	69.67	0.21
	GG2	MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
	GG3	MOL002959	3'-甲氧基大豆苷元	48.57	0.24
	GG4	MOL003629	大豆苷元-4',7-二葡萄糖苷	47.27	0.67
黄连(HL)	HL1	MOL002907	黄麻苷A	104.95	0.78
	HL2	MOL008647	N-反式-阿魏酰酪胺	86.71	0.26
	HL3	MOL000785	黄藤素	64.60	0.65
	HL4	MOL000622	木兰二内酯	63.71	0.19
	HL5	MOL002903	R-四氢小檗碱	55.37	0.77
	HL6	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
	HL7	MOL002668	甲基黄连碱	45.83	0.87
	HL8	MOL013352	黄柏酮	43.29	0.77
	HL9	MOL002897	表小檗碱	43.09	0.78
	HL10	MOL001454	小檗碱	36.86	0.78
	HL11	MOL002904	氧化小檗碱	36.68	0.82
	HL12	MOL002894	小檗红碱	35.74	0.73
	HL13	MOL000762	掌叶大黄二蒽酮A	35.36	0.65
	HL14	MOL001458	黄连碱	30.67	0.86
黄芩(HQ)	HQ1	MOL002934	黄芩新素	104.34	0.44
	HQ2	MOL002932	黄芩黄酮I	76.26	0.29
	HQ3	MOL012246	5,7,4'-三羟基-8-甲基二氢黄酮	74.24	0.26
	HQ4	MOL002927	黄芩黄酮II	69.51	0.44
	HQ5	MOL002911	2,6,2,4-四羟基-6-甲氧基查耳酮	69.04	0.22
	HQ6	MOL002937	二氢木蝴蝶素	66.06	0.23
	HQ7	MOL000228	(2R)-7-羟基-5-甲氧基-2-苯基色满-4-酮	55.23	0.20
	HQ8	MOL002915	三裂鼠尾草素	49.07	0.33
	HQ9	MOL000073	表儿茶素	48.96	0.24
	HQ10	MOL002917	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮	45.05	0.33
	HQ11	MOL008206	苏莽苳黄酮	44.09	0.25
	HQ12	MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76
	HQ13	MOL001490	双[(2S)-2-乙基己基]苯-1,2-二羧酸酯	43.59	0.35
	HQ14	MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯	43.59	0.39
	HQ15	MOL002897	表小檗碱	43.09	0.78
	HQ16	MOL002928	木蝴蝶素A	41.37	0.23
	HQ17	MOL002914	圣草酚	41.35	0.24
	HQ18	MOL002910	红花素	41.15	0.24
	HQ19	MOL002913	二氢黄芩苷	40.04	0.21
	HQ20	MOL000525	去甲汉黄芩素	39.40	0.21
	HQ21	MOL010415	11,13-二十碳二烯酸甲酯	39.28	0.23

续表2 葛根芩连方的有效活性成分

药物	编号	分子编号	活性成分	口服利用度/%	类药性
甘草 (GC)	HQ22	MOL002926	二氢木蝴蝶素 A	38.72	0.23
	HQ23	MOL012266	河谷林酮	37.94	0.37
	HQ24	MOL002908	5,8,2'-三羟基-7-甲氧基黄酮	37.01	0.27
	HQ25	MOL002925	5,7,2',6'-四羟基黄酮	37.01	0.24
	HQ26	MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
	HQ27	MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75
	HQ28	MOL012245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄烷酮	36.63	0.27
	HQ29	MOL002933	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮	36.56	0.27
	HQ30	MOL001689	刺槐黄素	34.97	0.24
	HQ31	MOL002909	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮	33.82	0.45
	HQ32	MOL001506	角鲨烯	33.55	0.42
	HQ33	MOL002714	黄芩苷	33.52	0.21
	HQ34	MOL000552	5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮	31.71	0.35
	HQ35	MOL000173	汉黄芩素	30.68	0.23
	HQ36	MOL001458	黄连碱	30.67	0.86
	GC1	MOL002311	甘草醇	90.78	0.67
	GC2	MOL004904	甘草吡喃香豆素	80.36	0.65
	GC3	MOL004891	新翼果苷	80.30	0.73
	GC4	MOL005017	菜豆异黄素	78.77	0.58
	GC5	MOL004841	甘草查尔酮B	76.76	0.19
	GC6	MOL004810	粗毛甘草素F	75.84	0.54
	GC7	MOL001484	高丽槐素	75.18	0.54
	GC8	MOL000500	维斯体素	74.66	0.21
	GC9	MOL005007	甘氨酸M	72.67	0.59
	GC10	MOL004903	甘草素	65.69	0.74
	GC11	MOL004808	粗毛甘草素B	65.22	0.44
	GC12	MOL004829	鳞叶甘草素B	64.46	0.34
	GC13	MOL004855	甘草利酮	63.58	0.47
	GC14	MOL004328	柚皮素	59.29	0.21
	GC15	MOL005003	甘草果皮素	58.81	0.58
	GC16	MOL005012	甘草异黄酮	57.28	0.49
	GC17	MOL000211	白桦脂酸	55.38	0.78
	GC18	MOL005018	桑比乌纳	54.85	0.87
	GC19	MOL005020	去氢粗毛甘草素C	53.82	0.37
	GC20	MOL004993	8-异戊二烯酸酯	53.79	0.40
	GC21	MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31
GC22	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	
GC23	MOL004898	(E)-3-[3,4-二羟基-5-(3-甲基丁-2-烯基)苯基]-1-(2,4-二羟基苯基)丙-2-烯-1-酮	46.27	0.31	
GC24	MOL004911	光甘草素	46.27	0.44	
GC25	MOL004974	3''-甲氧基光甘草定	46.16	0.57	
GC26	MOL004811	粗毛甘草素C	45.56	0.40	
GC27	MOL004949	异甘草黄酮醇	45.17	0.42	
GC28	MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	
GC29	MOL004883	甘草异黄酮	41.61	0.42	
GC30	MOL005008	甘草黄酮醇A	41.28	0.60	
GC31	MOL004924	(-)-药果皮素	40.99	0.95	
GC32	MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	

2.3 NAFLD 差异基因及 GeneCards NAFLD 表型基因交集

研究通过利用软件 R 且用 ggplot2 包和 Venn Diagram 包对结果进行可视化得到 DEGS 数据集荟萃分析、GeneCards 表型基因及葛根芩连方靶基因三者的交集基因 47 个。见图 1。

2.4 靶点基因热图、灿图、PCA 图及 GO、KEGG 分析

通过 Match 函数在荟萃分析中 mergeDEGs 匹配 47 个交集基因对应的 p.adj、logFC, 利用软件: R (4.2.1) 版本 R 包: ggplot2 (3.3.6) 对差异分析结果

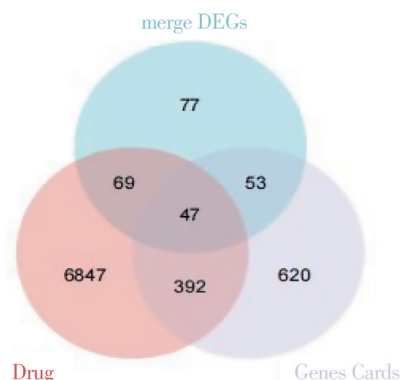
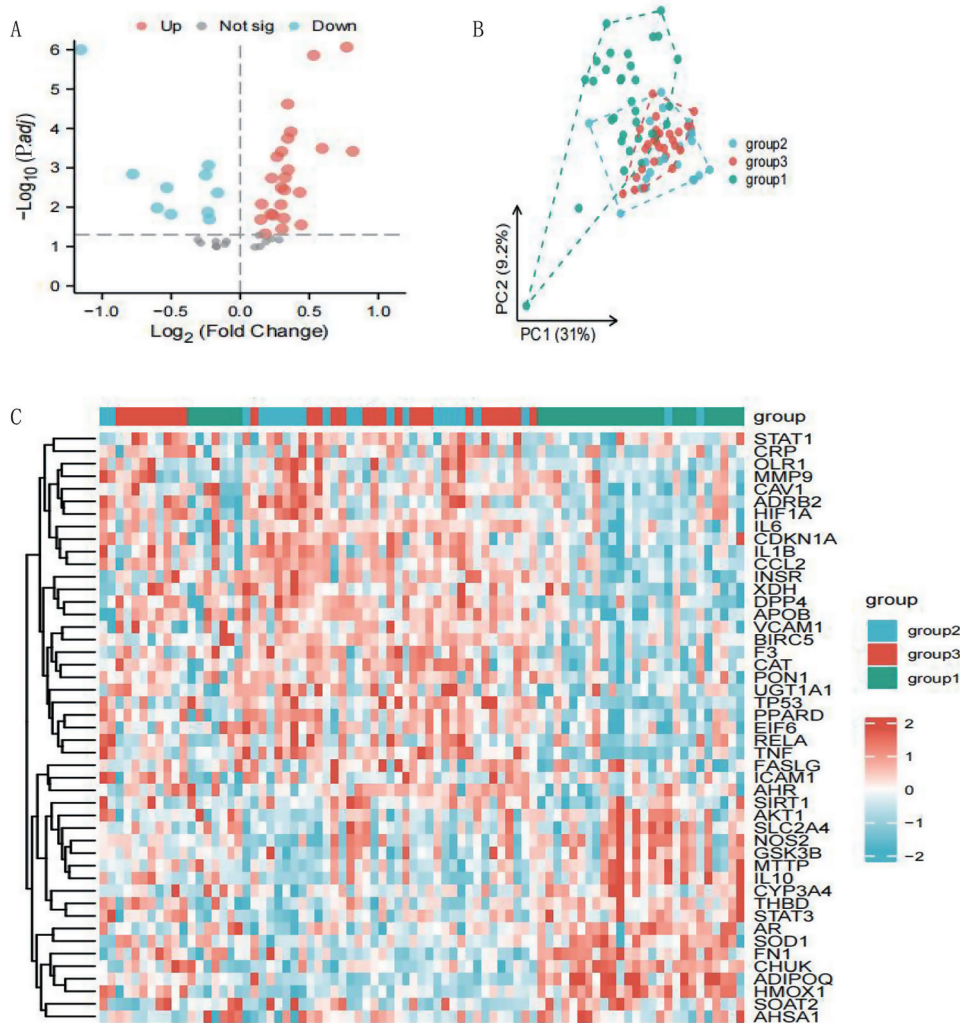


图1 DEGs-GeneCards 表型基因-葛根芩连方交集靶点韦恩图

进行可视化,补充说明:(阈值) \log_2FC 绝对值大于0,(阈值) $P < 0.05$;得到47个靶点基因的差异火山图。见图2A。同样利用Match函数匹配在mergeDEGs表达矩阵中的基因名及样本表达量,利用软件R及ComplexHeatmap包(2.13.1)进行热图的可视化,得到差异基因热图及差异基因PCA图。见图2B、图2C。补充说明:数据转换:无;归一化处理:对行归一化;行聚类:欧式距离(euclidean);列聚类:不聚类。通过R及ggplot2包对差异基因进行GO、KEGG富集分析,并对富集分析结果进行可视化,

按照GeneRatio、Counts、p.adj等条件进行作图,并以基因功能、通路名称为横轴、基因比率为纵轴,颜色代表P值,绘制柱状图及气泡图。见图3A~3D。GO分析分别从基因的细胞组分、生物过程、分子功能方面进行注释富集分析。可见差异基因在应激反应、对缺氧反应、脂质代谢、泛素蛋白连接酶结合、细胞坏死及凋亡等功能富集,KEGG富集可见差异基因在AGE-RAGE信号通路、PI3K-AKT信号通路、NAFLD、JAK-STAT信号通路、NF- κ B通路、P53信号通路等富集。



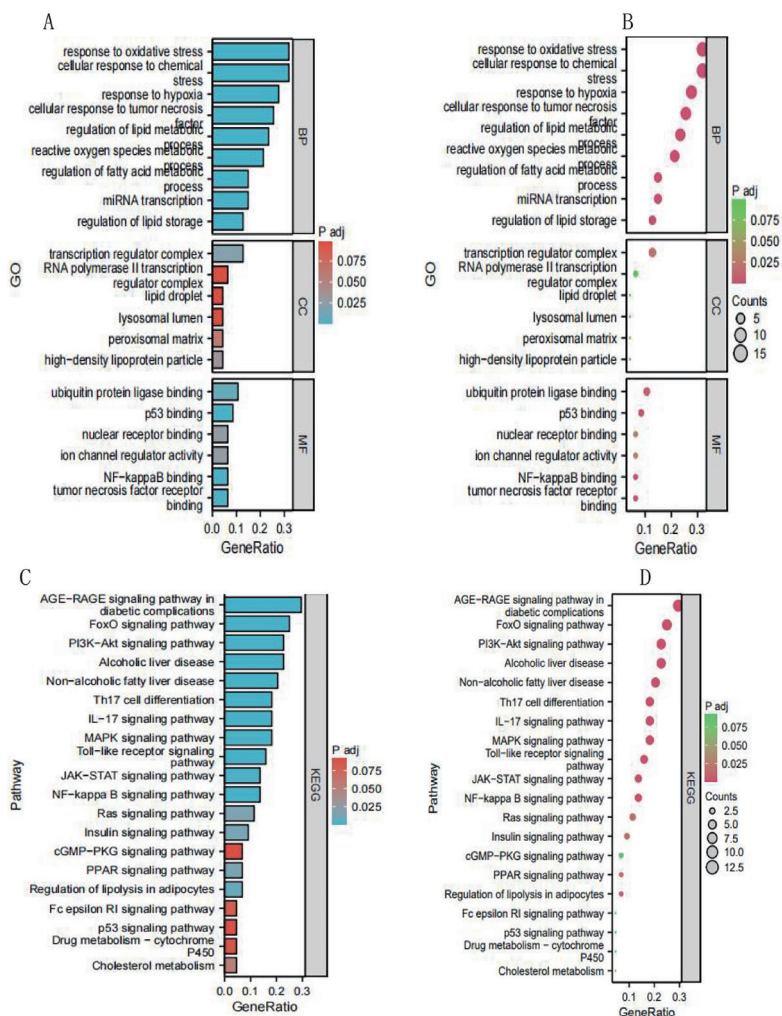
注: A. NAFLD与药物有效成分靶点交集基因的差异表达火山图; B. NAFLD疾病与药物有效成分靶点交集基因的差异表达PCA图; C. NAFLD疾病与药物有效成分靶点交集基因的差异表达热图。

图2 NAFLD疾病与药物有效成分靶点交集基因的差异表达

2.5 药物与疾病靶点交集基因免疫浸润及免疫细胞差异分析

为了研究NAFLD的免疫细胞浸润丰度,对荟萃分析的GSE数据集的表达矩阵(包括2个数据集)进行CIBERSORT以估计混合细胞群中浸润免疫细胞的丰度。结果显示活化树突状细胞、NK-T细胞、NK细胞、Tfh细胞、Th2细胞、CD8⁺T细胞

是浸润NAFLD的主要免疫细胞。见图4A。进一步研究NAFLD交集基因中免疫细胞差异性分析,在NK-T细胞($P=0.366$),NK细胞中($P=0.475$),差异无统计学意义,活化树突状细胞($P < 0.002$),Tfh细胞($P < 0.001$),Th2细胞($P < 0.019$),CD8⁺T细胞($P < 0.001$)表明NAFLD和健康人在免疫细胞浸润方面差异有统计学意义。见图4B。



注: A、B为交集基因GO功能富集图, C、D为交集基因的KEGG通路富集图。

图3 NAFLD差异基因GO功能、KEGG通路富集图

2.6 通过STRING数据库构建蛋白质PPI互作网络

在STRING 12.0数据库(<https://www.STRING-db.org>)中构建蛋白质-蛋白质相互作用网络,生物种类设定为智人、分数(Score)默认为0.4,并运用R语言得到交集靶点度值大小(Count)文件及核心靶点的网络图。见图5。结果显示有47节点,480条边,平均节点水平是20.4, $P < 1.0e-16$ 。

2.7 通过STRING数据、Cytoscape 3.9.1软件中构建“葛根苓连方活性成分与NAFLD交集靶点”网络图

网络拓扑分析葛根苓连方的核心成分,通过cytoNCA计算核心基因,按照Betweenness、Closeness、Degree、Eigenvector、LAC、Network 6个评分标准,经过中位数函数大于中位数分值筛选得到节点数为19,边为298,利用Mcode,设置条件为nodescorecuff: 0.2, K-core: 2,计算得到29个节点,边数为337;利用cytoHubbaMCC算法设置条件为前10个节点进行筛选,通过3种不同算法,利用R及ggplot2包(3.3.6)、VennDiagram(1.7.3)包对结果进行交集绘

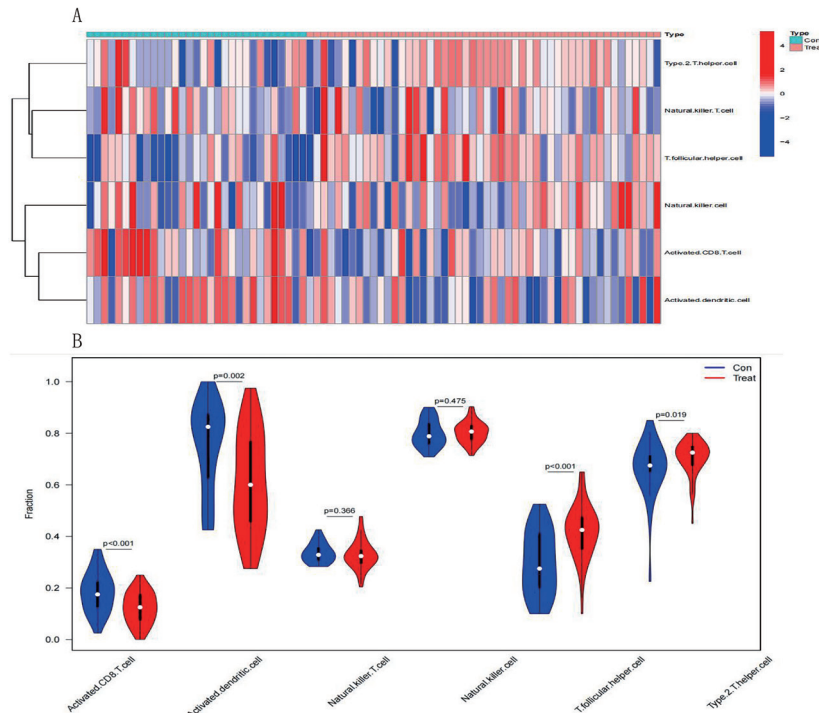
制韦恩图得到CCL2、HMOX1、TNF、AKT1、HIF1A、TP53、IL-6、STAT3、MMP9、IL-1 β 等10个核心基因。见图6A。最后构建一个network文件及type文件,并通过Cytoscape 3.9.1构建核心基因蛋白互作网络及构建核心基因-药物-药物有效活性成分蛋白互作网络图。见图6B、图6C。

2.8 核心基因免疫相关性分析

为了确定核心基因与差异免疫细胞之间的相互作用关系,研究发现核心基因与免疫细胞显著正相关,例如;AKT1、STAT3和活化的树突状细胞显著正相关,而HIF1A、IL-1 β 、MMP9、TNF、TP53和活化的树突状细胞呈显著负相关;HMOX1和Tfh细胞与Th2细胞显著负相关。见图7。所有这些结果表明免疫细胞可能与核心基因协同影响NAFLD疾病的进程。

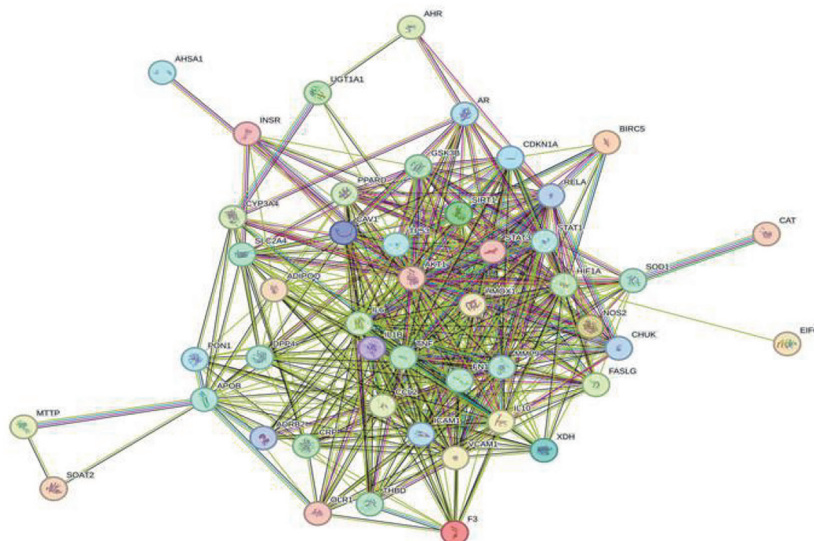
2.9 预测上游调控miRNA并构建核心基因与miRNA网络图

通过核心基因预测上游调控的miRNA, TargetScan



注: A. 疾病与药物活性成分靶点交集基因免疫细胞浸润热图; B. 免疫细胞差异分析热图。

图4 药物与疾病靶点交集基因免疫浸润及免疫细胞差异分析

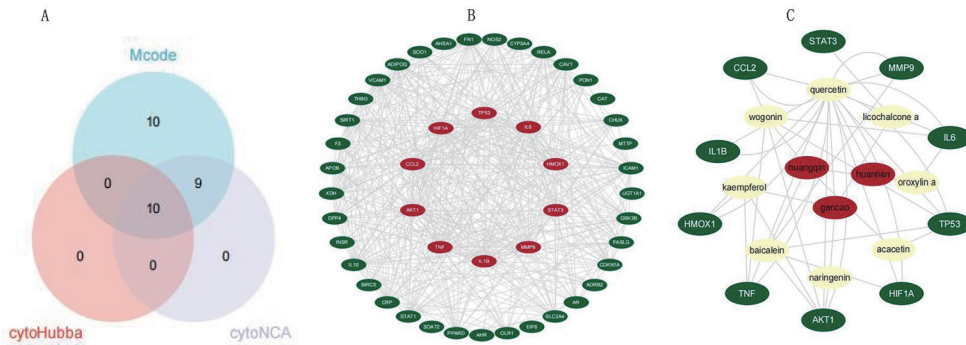


注: 每个节点代表该基因调控的所有蛋白质(彩色-具有一级关系的蛋白质,白色-具有二级关系的蛋白质,实心-有蛋白质的3D结构,空心-没有蛋白质的3D结构),线条之间表示预测出的蛋白之间的功能关联。线条颜色代表互作证据的种类(浅蓝色-辅助数据库证据,紫色-实验证据,灰色-同源蛋白,黄色-文本证据,绿色-基因相似性,黄绿色-文本挖掘,红色-基因融合,黑色-基因共同表达,蓝色-相同基因产生),数据的支撑度越强,置信线越粗。

图5 NAFLD疾病与药物有效活性成分交集基因的STRING数据库蛋白互作网络图

预测目的miRNA浏览器输入www.TargetScan.org, 进入主页, 填入已知检索基因: CCL2、HMOX1、TNF、AKT1、HIF1A、TP53、IL-6、STAT3、MMP9、IL-1β等10个基因, 选择代表性转录本, 结果显示中出现多个依加权评分排序的与目的基因存在保守性或非保守性结合位点的miRNA, 选择miRNA广泛保守区域, 依次查看排名靠前miRNA与目的基因的结合信息, 综合miRNA的保守性、Context++score值、

Context++scorepercentile值、Weightcontext++score值、Conservedbranchlength、PCT值以及已有研究文献确定目的miRNA。得到核心基因排名靠前miRNA, 分别为miR-124-3p.2、miR-217、miR-140-5p、miR-302-3p、miR-18-5p、miR-98-5p、miR-365-3p、miR-106-5p、miR-133a-3p.1、miR-204-5p, 通过cytscape软件构建药物-有效活性成分-miRNA-核心基因蛋白质互作网络图。见图8A、图8B。



注: A.NAFLD与药物有效成分交集基因通过Cytoscape 3.9.1 3种不同算法,最终绘制韦恩图得到差异表达核心基因; B.核心基因靶点蛋白质互作网络图; C.核心基因-药物-药物有效活性成分蛋白质互作网络。

图 6 葛根岑连方活性成分与NAFLD交集靶点网络图

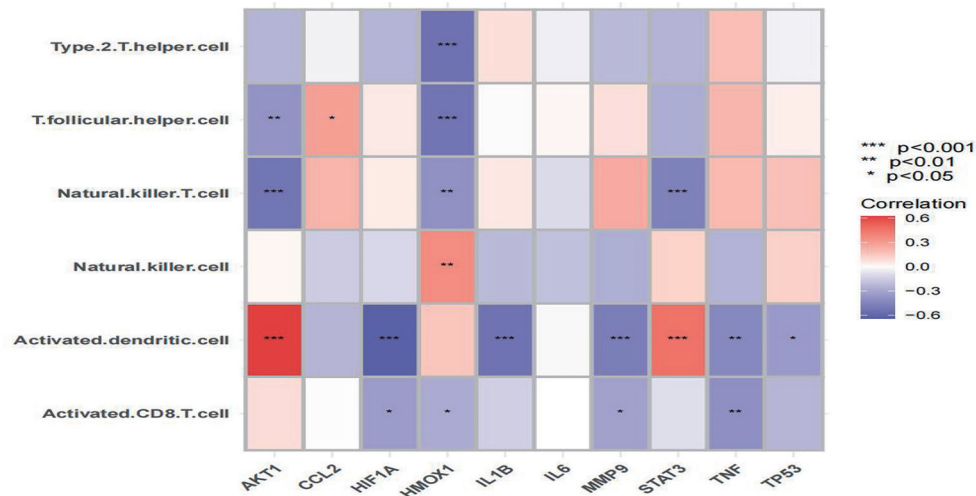
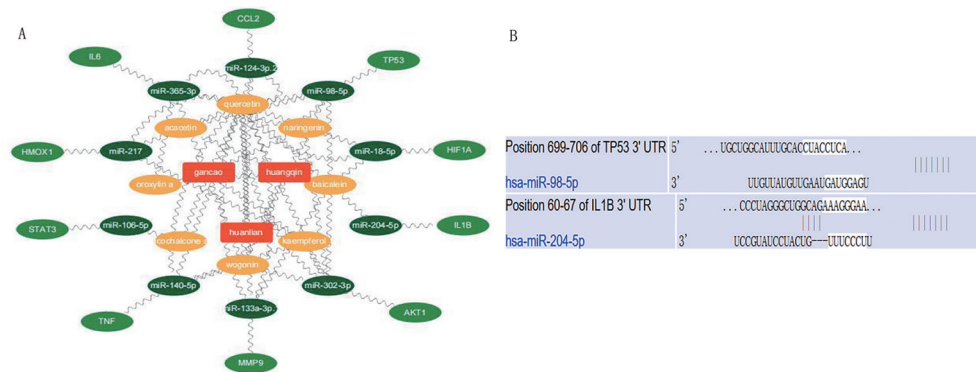


图 7 差异免疫细胞与核心基因的相关性热图



注: A.药物-有效活性成分-miRNA-核心基因蛋白质互作网络图; B.miRNA 碱基序列。

图 8 核心基因 miRNA 网络图

2.10 分子对接结果

从Pubchem数据库下载小分子化合物Sitosterol的结构,利用rnacomposer数据库对miRNA核酸序列进行建模(单链),将核酸指定为受体,将化合物指定为配体采用AutoDockVina 1.2.1软件1进行分子对接工作,在对接开始之前,设置对接盒子,使之包裹整个RNA结构。此外,使用AFRsuite 1.0将所有处理好后的小分子以及RNA蛋白转换为AutoDockVina 1.2.1对接必须的PDBQT格式。对

接时,全局搜索的详尽度设为16,其余参数保持默认设置。输出的打分最高的对接构象被认为是结合构象,PyMol 2.5.5对接结果进行可视化分析。

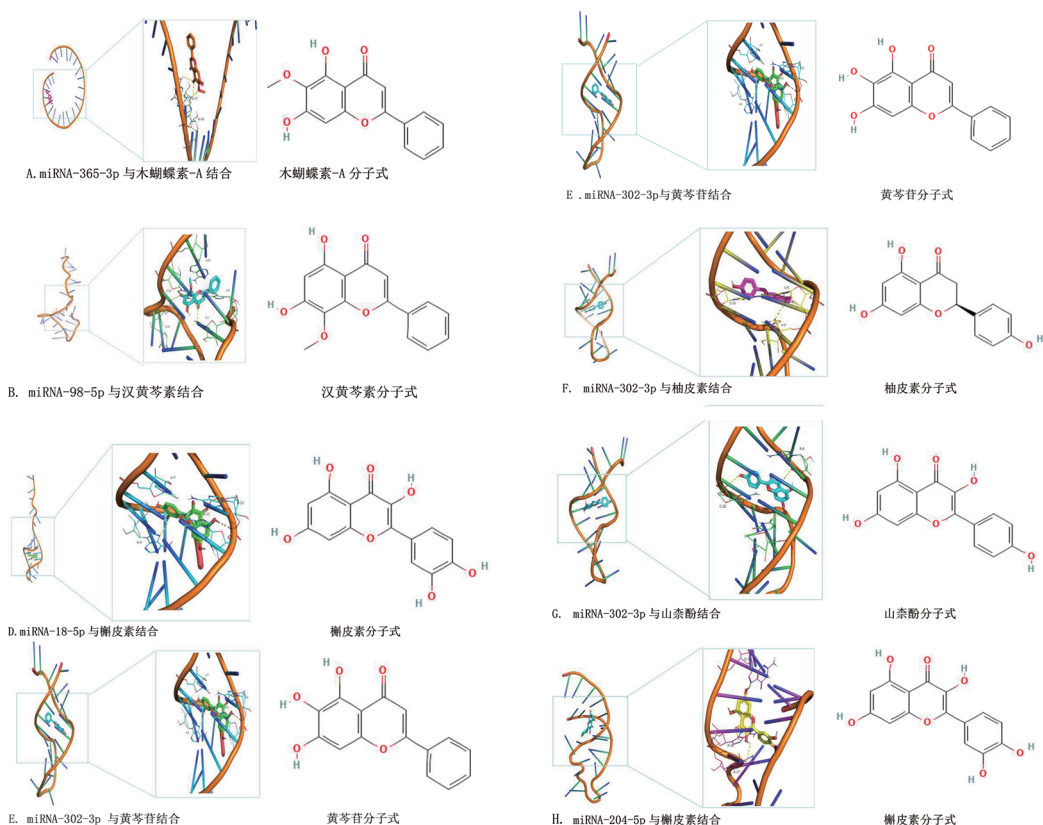
3 结果

对接模拟技术是探究小分子与目标靶点相互作用的便捷有效手段。在此,使用Vina 1.2.3软件对小分子化合物与miRNA进行对接研究,PyMol 2.5.5对接结果进行可视化分析。

表3 核心基因预测 miRNA 与核心基因对应药物活性成分分子对接结果

单位: kcal/mol

药物活性成分	miR-124-3P.2	miR-98-5P	miR-365-3P	miR-106-5P	miR-133a-3p.1	miR-18-5p	miR-302-3p	miR-140-5p	miR-217	miR-204-5p
汉黄芩素	-5	-6.2	-5.3	-	-	-	-7.1	-5	-	-
槲皮素	-5	-7.1	-5.1	-	-7	-8.2	-8.2	-5.2	-5.2	-7.3
山柰酚	-	-	-	-	-	-	-7.8	-5	-5	-
黄芩苷	-	-	-	-	-6.4	-7.4	-7.8	-	-	-
刺槐黄素	-	-6.3	-	-	-	-	-	-	-	-
木蝴蝶素-A	-	-	-5.4	-	-	-	-	-	-	-
甘草查尔酮-A	-	-	-	-6.1	-	-	-	-	-	-
柚皮素	-	-	-	-	-	-	-7.5	-	-	-



注: A-H: 基于对接获得的药物小分子与 miRNA 的结合模式, 左图为整体视图, 右图为局部视图, 图中橘黄色 stick 为药物, 蓝色 cartoon 为 miRNA, 黄色虚线表示氢键作用, 灰色虚线表示疏水作用, 洋红色虚线表示盐桥作用。如图 A-H 所示, 小分子药物与 miRNA 的相互作用图。从图中可以看到小分子药物与 miRNA 形成氢键、盐桥作用。氢键和盐桥的形成使蛋白与小分子之间结合更加紧密。还形成疏水作用为分子提供了强大的范德华力。结合亲和力为负数表示存在结合的可能, 通常数值越小被认为结合可能性越大。在以上复合物中, 对接软件给出小分子与 miRNA 结合亲和力评分为 ≤ -5 kcal/mol, 最小值为 -8.2 意味着小分子药物与对应的 miRNA 结合得比较好。

图9 调控 miRNA 图例

4 讨论

本研究运用网络药理学及生物信息学等方法分析发现, 葛根芩连方中筛选到 145 个有效活性成分, 与 GEO 数据库数据集及 GeneCards 数据库中 NAFLD 共有交集靶点基因有 47 个, 涉及有效药物活性成分包括汉黄芩素、柚皮素、山柰酚、黄芩苷、槲皮素、刺槐黄素、木蝴蝶素-A、甘草查尔酮-A 等 8 个, 还涉及到治疗 NAFLD 的核心靶点, 包括 CCL2、HMOX1、TNF、AKT1、HIF1A、TP53、IL-6、STAT3、MMP9、IL-1 β , 通过 GO 及 KEGG 富集分析, 以上交集靶点在氧化应激、脂质代谢、miRNA 转录调控发

挥作用, 同时还涉及 AGE-RAGE 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、非酒精性脂肪性肝病、JAK-STAT 信号通路、NF- κ B 通路、P53 信号等通路, 根据功能富集分析核心靶点还参与了 miRNA 的转录调控, 表明葛根芩连汤治疗 NAFLD 的作用机制复杂多样, 具有多成分、多靶点、多通路及多转录水平的特征。

NAFLD 病情进展与肝脏炎症关系密切, 炎症的发生伴随炎性细胞因子的参与, 炎性细胞因子包括 TNF、IL、生长因子 (growth factor, GF) 等。TNF- α 、IL-6、IL-1 β 已被证实为炎症反应的标志物^[18], 其中 IL-6 是一种促炎症细胞因子, 其浓度常在炎症反

应过程中增加, IL-6是肝脏中关键的炎症介质^[19], 主要由脂肪组织分泌, 它不仅参与机体的炎症反应, 还参与多种细胞功能, 如细胞存活、凋亡和增殖等^[20]。IL-6作为炎症最为典型的相关因子, 其促炎作用可能是通过抑制胰岛素信号传导并调节急性期反应和慢性炎症, 相关研究表明其可以促进NAFLD的发展^[21]。TNF- α 则可以刺激免疫细胞合成IL-6、IL-1 β 等炎性细胞因子。IL-1 β 是趋化因子家族中IL-1存在的分子形式之一, 其过度表达可诱导下游细胞因子的表达, 如IL-4、IL-6、VEGF等^[22], 他们可直接加重炎症反应; 研究表明长期高脂饮食也会导致促炎介质(如NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、IL-8)和细胞因子的释放增加^[23-25]。IL-1 β 通过刺激原发性肝细胞中的甘油三酸酯和胆固醇蓄积并诱导脂质滴形成来促进肝脂肪变性^[26]。IL-1 β 还可作用于肝窦内皮细胞, 通过上调细胞间黏附分子1的表达并促进肝炎, 从而导致中性粒细胞在肝脏中积聚^[27]。

STAT3是一种细胞质信号转录因子, 属于Janus激酶(janus kinase, JAK)信号转导器和转录激活剂(signal transducers and activators of transcription, STAT)途径, 在介导肝损伤的过程中起着至关重要的作用^[28], 可参与JAK-STAT途径, 调节细胞增殖和凋亡, 同时可调控肝损伤过程^[29]。研究表明许多纤维化组织中STAT3被激活, STAT3的持续激活可促进肝纤维化发生发展^[30]。有研究表明血清STAT3表达水平随2型糖尿病合并NAFLD患者肝纤维化程度加重而升高, STAT3是影响2型糖尿病合并NAFLD患者肝纤维化加重的独立危险因素^[31]。HIF1A通过激活多种基因的转录, 包括参与能量代谢、血管生成、细胞凋亡等过程, 以及其他蛋白产物增加氧气输送或促进代谢适应缺氧的基因, 作为细胞和系统对缺氧的稳态反应的主要调节因子。PATRICK S等^[32]观察到胆固醇诱导的NASH小鼠肝脏中HIF1A表达增加, 在缺氧情况下, HIF1的增加通过减少HIF1A的羟基化和降解导致HSC的激活增加。然而, HIF1的最大激活需要激活其他信号通路, 例如NF- κ B通路, NF- κ B在慢性缺氧的最初几个小时内被激活。由于HIF1A基因启动子中存在NF- κ B结合位点, 这导致HIF1A转录增加^[33-35]。因此NF- κ B激活导致HIF1AmRNA表达增加^[36]。HIF1A表达的诱导正向调节炎症信号传导并增加黏附分子的表达。

血红素加氧酶1(haem oxygenase, HMOX1)是一种诱导剂, 可以氧化细胞血红素以释放胆红素、一

氧化碳和游离铁, 是氧化应激的重要指标, 当细胞内的HMOX1水平超过一定的值, HMOX1会发生细胞毒性作用, 导致细胞死亡。YANG Y等^[37]研究发现通过Nrf2/HO-1途径促进下游血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)、GPX4、FTH1表达, 并降低Fe²⁺、ROS、MDA水平, 且有效减少脂滴, 提示HO-1参与了抑制铁死亡的过程, 从而减少脂肪沉积, 减轻NAFLD症状。

人们最初认为P53基因是一种抑癌基因, 但随着近十年研究的深入, P53作为抑癌基因的功能逐渐被揭示出来。马贵萍等^[38]通过药物抑制肝脏组织P53表达, 解除其对SLC7A11的抑制, 进而上调GPX4、FTH1水平, 下调PTGS2、NADPH氧化酶1、COX2水平, 提示可以通过P53途径调节脂质过氧化从而抑制铁死亡, 改善NAFLD脂质沉积。AKT1也被称为蛋白激酶B(PKB)。AKT1由胰岛素和多种生长和存活因子激活, 在调节细胞生长、分裂和细胞凋亡抑制等多种过程中发挥着关键作用。AKT1蛋白在多种组织中广泛存在。有研究显示活化的NF- κ B蛋白可通过激活PIK3/AKT信号通路, 进而促进肝组织的炎症反应, 加速肝细胞凋亡^[39-40]。MMP9属于基质金属蛋白酶(matrix metallo protein, MMP)家族中一员, MMP-9又称明胶酶B主要功能是降解和重塑细胞外基质, 降解明胶、IV、V、VII型胶原及层黏连蛋白、蛋白聚糖及弹性蛋白等能降解完整的基底膜^[41], 是否MMP9参与到NAFLD疾病进展过程中鲜有报道。

GO、KEGG富集分析发现葛根芩连方可通过抑制凋亡、炎症、铁死亡等相关的信号通路来发挥作用, 包括AGE-RAGE信号通路、PI3K-AKT信号通路、JAK-STAT信号通路、NF- κ B通路、P53信号等通路, AGEs是由葡萄糖或其他糖类对包括蛋白质、脂质和核酸在内的大分子进行翻译后非酶修饰而产生的异质分子。AGE是有害分子, 在生理衰老和年龄相关疾病、糖尿病、类风湿关节炎及系统性硬化症等疾病中增加^[42]。RAGE是AGE的细胞结合受体, 两者相互作用可以激活NADPH氧化酶和核因子NF- κ B, 从而导致各种炎症基因的转录激活^[43-44]。有研究AGEs通过自噬诱导和肝星状细胞激活在慢性丙型肝炎患者的纤维化或肝硬化中发挥作用, 阻断AGE-RAGE信号可能是缓解纤维化的一种有前途的方法^[45]。刘露等^[46]推测通过抑制AGE-RAGE信号减轻肝硬化大鼠炎症和纤维化。有研究显示PI3K/AKT/NF- κ B信号通路与NAFLD的发生

有密切联系。谢婷妃^[47]研究发现抑制PI3K/AKT/NF- κ B通路可以降低肝中TC、TG含量,改善肝细胞脂肪变性和炎细胞浸润,从而减轻NAFLD产生的效应^[48-50]。免疫浸润分析发现活化树突状细胞、NK-T细胞、NK细胞、Tfh细胞、Th2、CD8⁺T细胞是浸润NAFLD的主要免疫细胞。经过免疫浸润差异性分析及核心基因免疫相关性分析,免疫细胞Tfh细胞、树突状细胞与Th2等可能与核心基因协同影响NAFLD疾病的进程。

研究发现汉黄芩素能下调IL-1 β 、IL-6、TNF等炎症分子的mRNA水平及上调Nrf2、GPx、HO-1、SOD、CAT的mRNA转录水平,从而降低ROS水平,因此该研究推测汉黄芩素可能通过抑制炎症反应、减轻肝脏细胞的损害,具体对NAFLD的治疗作用有待进一步体内及体外实验验证^[51]。大量研究表明山柰酚具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保护心脏、神经保护和抗糖尿病等作用^[52-54],用斑马鱼验证了山柰酚对体内脂质积累的抑制作用^[55],山柰酚通过抑制脂肪相关基因抑制斑马鱼体内的脂质积累。槲皮素能够减轻氧化应激和肝细胞变性,并降低了炎症细胞因子的表达,抑制凋亡^[56]。柚皮素促进脂肪和肌肉细胞内线粒体生物合成以增加线粒体数量,从而提高细胞内能量的消耗。柚皮素促进Grx1、NQO1、SOD1、SOD2等抗氧化酶蛋白表达水平,从而减轻肝细胞损伤减轻NAFLD^[57]。结合分子对接结果推测,黄芩素、柚皮素、山柰酚、黄芩苷、槲皮素、刺槐黄素、木蝴蝶素-A、甘草查尔酮-A等为治疗非酒精性脂肪性肝病关键有效成分。

miRNA是一类存在于真核生物体内不编码蛋白质的微小RNA,长度约为22个核苷酸内源性单链非编码RNA,其进化为具有高度保守性,它们可以通过与靶向miRNA的3'非翻译区结合,在各时序参与基因修饰与表达,参与编码包括细胞分化、能量代谢和代谢应激的多种细胞过程的调控^[58-59],成熟的miRNA与靶蛋白相结合形成沉默复合体,使靶基因表达上调或下调,通过调控转录后水平的表达从而调节细胞代谢、信号转导、炎症应激等反应^[60]。同时miRNA对于生物体表达的调控是多元性、多位点、多层次的,并非单靶点生物轴的作用机制^[61],这也与中医药治疗整体观念相契合,NAFLD患者体内的miRNA表达多异常(上调或下调),通过与下游靶基因结合参与调控脂代谢的关键酶的合成,导致肝细胞内甘油三酯及脂肪酸堆积或分解^[62]。本研究通过靶点基因预测了miRNA,并利用分子对接对验证了药物有效

活性成分与miRNA的结合能力,提示葛根芩连方药物有效活性成分可能通过调控miRNA,最终调控靶基因的转录发挥作用改善NAFLD的疾病进程。

综上所述,基于网络药理学及生物信息学分析,本研究确定了10个可以预测NAFLD发展的核心靶点(CCL2、HMOX1、TNF、AKT1、HIF1A、Tv、IL6、STAT3、MMP9、IL1B),并探索了NAFLD肝组织损伤的潜在途径。本研究通过预测靶点基因miRNA并验证了药物与miRNA的结合能力,为NAFLD发病机制的分子机制提供了新的见解。需要进一步的研究来证实研究的初步证据,并在临床实践中验证这些核心基因作为NAFLD诊断的生物标志物及调控机制。

参考文献

- [1] STEFAN N, HRING H U, CUSI K. Non-alcoholic fatty liver disease : causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies [J]. Elsevier, 2019, 7 (4): 313-324.
- [2] YOUNOSSEI Z M, KOENIG A B, 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.
- [3] CHRYSAVGIS L, GIANNAKODIMOS I, DIAMANTOPOULOU P, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and hepato cell ular carcinoma : Clinical challenges of an intriguing link [J]. World Journal of Gastroenterology, 2022, 28 (3): 310-331.
- [4] YOUNOSSEI Z M, COREY K E, LIM J K. AGAC clinical practice update on life style modification using diet and exercise to achieve weight loss in the management of nonalcoholic fatty liver disease : expert review [J]. Gastroenterology, 2021, 160 (3): 912-918.
- [5] GOLABI P, PAIK J M, ALQAHTANI S, et al. Burden of non-alcoholic fatty liver disease in asia, the middle east and north africa : data from global burden of disease 2009-2019 [J]. J Hepatol, 2021, 75 (4): 795-809.
- [6] LAZARUS J V, MARK H E, ANSTEE Q M, et al. Advancing the global public health agenda for NAFLD : a consensus statement [J]. Nature reviews Gastroenterology and Hepatology, 2022 (1): 19.
- [7] THANAPIROM K, TSOCHATZIS E A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the quest for effective treatments [J]. Hepatobiliary Surgery and Nutrition, 2019 (1): 3.
- [8] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, MARY R, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. Nature Medicine, 2018, 24 (7): 908-922.
- [9] SAFARI Z, PHILIPPE Y, GÉRARD W. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (naflD) [J]. Cellular And Molecular Life Sciences, 2019, 76 (8): 1541-1558.
- [10] CHRISTOPHER P D, OLIVER F W J. Steatohepatitis : a tale of two "hits"? [J]. Gastroenterology, 1998, 114 (4): 842-845.
- [11] ATHYROS V, POLYZOS S, KOUNTOURAS J, et al. Non-alcoholic fatty liver disease treatment in patients with type 2 diabetes mellitus; new kids on the block [J]. Current Vascular Pharmacology, 2020, 18 (2): 172-181.
- [12] 张玉萍.金匱要略(中医经典名著精选)[M].福州:福建科技出版社,2013.
- [13] 刘莲萱.《伤寒论》葛根芩连汤方证研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2022.
- [14] 夏梦琳.复方葛根芩连汤干预2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝病的临床观察及与FGF21, APN, TNF- α 水平相关性的研究[D].合肥:安徽中医药大学,2017.
- [15] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite : from gene data mining to disease genome sequence analyses

- [J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2016, 54(1): 1–30, 33.
- [16] RU J, LI P, WANG J, et al. Tcmisp : a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminformatics*, 2014, 6(1): 13.
- [17] CONSORTIUM U P. UniProt : a worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D506–D515.
- [18] DEGIRMENCI I, OZBAYER C, KEBAPCI M N, et al. Common variants of genes encoding TLR4 and TLR4 pathway members tirap and irak1 are effective on MCP-1, IL-6, IL-1 β , and TNF- α levels in type 2 diabetes and insulin resistance [J]. *Inflammation Research*, 2019, 68(9): 801–814.
- [19] NASEEM S, HUSSAIN T, MANZOOR S, et al. Interleukin-6 : a promising cytokine to support liver regeneration and adaptive immunity in liver pathologies [J]. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2017, 39(6): 36–45.
- [20] ROSE-JOHN S, JENKINS B, GARBERS C, et al. Targeting IL-6 trans-signalling : past, present and future prospects [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2023, 23(10): 666–681.
- [21] DUAN Y, PAN X, LUO J, et al. Association of inflammatory cytokines with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Front Immunol*, 2022, 13(6): 880298.
- [22] BORSINI A, BENEDETTO M G D, GIACOBBE J, et al. Pro- and anti-inflammatory properties of interleukin in vitro : relevance for major depression and human hippocampal neurogenesis [J]. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2020, 23(11): 738–750.
- [23] NAG S, MANDAL S, MAJUMDAR T, et al. FFA-fetuin-aregulates dpp-ivexpression in pancreatic beta cell sthrough TLR4-NF κ B pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 647(8): 55–61.
- [24] NUZZO D, BALDASSANO S, AMATO A, et al. Glucagon-like peptide-2 reduces the obesity associated inflammation inthebrain [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 121(9): 296–304.
- [25] QIAN G Y, SONG M, WANG S, et al. High-fat diet exacerbated motordys function viane croptosis and neuro in flammation in acrylamide-induce dneuro to xicityin mice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 269(10): 115777.
- [26] KIMBERLY A N, RACHELJ R F, MARINA T D, et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis [J]. *Plos One*, 2017, 9(9): 107265.
- [27] PATRICK A L, RULLO J, BEAUDIN S, et al. Hepatic leukocyte recruitment in response to time-limited expression of TNF-alpha and IL-1beta [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver physiology*, 2007, 293(4): G663–G672.
- [28] GAO B, WANG H, LAFDIL F, et al. STAT proteins-keyregulatorsofant-viralresponses inflammation andtumor-gene sisin the liver [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(2): 430–441.
- [29] ZHOU Y, CHEN J, YAO Z, et al. Gastrodin ameliorates concanavalin a-induced acute hepatitis via the IL6/JAK2/STAT3 pathway [J]. *Immunopharmacol*, 2022, 44(6): 925–934.
- [30] SHEN Y L, JIANG Y P, LI X Q, et al. Er Huang iormula improves renal fibrosis in diabetic nephropathy rats by inhibiting CXCL6/JAK/STAT3 signaling pathway [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1596.
- [31] 陈利灵, 郑宽勇, 王亮, 等. 2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝患者血清CMKLR1, STAT3表达与肝纤维化的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(16): 1929–1933.
- [32] PATRICK, UDEN V, NIALL S, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB [J]. *The Biochemical Journal*, 2008, 412(3): 477–484.
- [33] BELAIBA R S, BONELLO S, CHRISTIAN Z, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor κ B in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Molecular Biology Of The Cell*, 2007, 18(12): 4691–4697.
- [34] RIUS J, GUMA M, SCHACHTRUP C, et al. NF-kappa B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of hif-1alpha [J]. *Nature*, 2008, 453(7196): 807–811.
- [35] CHEN C H, PORE N, BEHROOZ A, et al. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(12): 9519–9525.
- [36] Hayashi M. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells [J]. *Journal of Endocrinology*, 2004, 183(1): 145.
- [37] YANG Y, CHEN J, GAO Q, et al. Study on the attenuated effect of ginkgolide b on ferroptosis in high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Toxicology*, 2020, 445(12): 152599.
- [38] 马贵萍, 于忠杨, 卿立金, 等. 加味二至丸通过抑制铁死亡减轻高脂血症小鼠肝脏脂质沉积[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(2): 259–266.
- [39] YANG B L, GE Y, ZHOU Y, et al. Mir-124a Inhibits the proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via targeting pik3/nf- κ B pathway [J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2019, 37(4): 208–215.
- [40] TANG H, TAN X, ZHU L, et al. Swimming prevents nonalcoholic fatty liver disease by reducing migration inhibitory factor through akt suppression and autophagy activation [J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(7): 4315–4325.
- [41] BREW K, DINAKARPANDIAN D, NAGASE H. Tissue inhibitor of metalloproteinases : evolution structure and function [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477(6): 267–283.
- [42] SHEN C Y, LU C H, WU C H, et al. The development of maillar dreaction, and advanced glycation end product (age)-receptorfor age (rage) signaling inhibit or sasnovel the rapeutic strategies for patients with age-related diseases [J]. *Molecules*, 2020, 25(23): 5591–5621.
- [43] PRASAD K, BHANUMATHY K K. Age-rage axis in the pathophysiology of chronic lower limb ischemia and a novel strategy for its treatment [J]. *International Journal of Angiology*, 2020, 29(3): 156–167.
- [44] BORGIA F, CUSTURONE P, PETERLE L, et al. Involvement of micromas as a response to phototherapy and photodynamic therapy : a literature review [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(8): 1310.
- [45] ABDEL-RAZIK A, MOUSA N, ZAKARIA S, et al. Advanced glycation end products as a predictor of diabetes mellitus in chronic hepatitis c-related cirrhosis [J]. *Frontiers in Medicine*, 2020, 7: 588519.
- [46] 刘露, 刘占奎, 吴雪, 等. 狼毒大戟调节 AGE-RAGE 信号通路对肝硬化大鼠炎症反应和纤维化的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(15): 3800–3804.
- [47] 谢婷妃. 尿酸诱导 HK-2 细胞炎症损伤中 P13K/AKT/NF- κ B 表达的影响 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [48] 农朝雷, 陈威. 调肝祛脂方介导 P13K/AKT-mTOR 通路干预非酒精性脂肪肝的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 2013, 20(2): 119–121, 104.