

代谢组学联合网络药理学分析香蜂草苷缓解 非酒精性脂肪肝大鼠的作用机制

莫柔¹, 方斌¹, 林兴¹, 黄权芳², 黄仁彬¹

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学第一附属医院药学部, 南宁 530023)

摘要 目的: 利用非靶向代谢组学联合网络药理学研究香蜂草苷改善非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 脂代谢的作用机制。**方法:** 将大鼠随机分为正常组、模型组和香蜂草苷组。模型组与香蜂草苷组给予高脂饮食 (HFD) 8 周诱导 NAFLD 动物模型。灌胃给药, 连续 8 周。采用苏木精-伊红 (HE)、油红染色观察细胞形态和脂质堆积情况。用高分辨液相色谱-质谱 (UPLC-QTOF/MS) 对大鼠肝组织进行代谢组学检测, 并利用 KEGG 数据库分析代谢通路。采用网络药理学对香蜂草苷与 NAFLD 共同作用的靶点进行预测, 并联合代谢组学进一步分析潜在的靶点。**结果:** 香蜂草苷明显减轻大鼠肝损伤、抑制肝脏脂质的过度沉积; 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 分析显示组间的代谢物有显著差异, 火山图显示正常组与模型组存在 404 个差异代谢物 (上调 293 个, 下调 111 个), 模型组与香蜂草苷组存在 147 个差异代谢物 (上调 95 个, 下调 52 个); 代谢通路分析显示差异代谢物主要富集于鞘脂代谢通路; 网络药理学筛选药物与疾病共同靶点共 139 个, 联合代谢组学和网络药理学分析显示, 香蜂草苷可通过调节 *TNF*、*Bcl2*、*Mapk8*、*Pik3ca*、*Akt1*、*mTOR*、*Gsk3β* 来调控鞘脂代谢通路和胰岛素抵抗。**结论:** 香蜂草苷能够通过鞘脂代谢通路和胰岛素抵抗调节脂质代谢紊乱从而发挥治疗 NAFLD 的作用。

关键词 香蜂草苷; 非酒精性脂肪肝; 代谢组学; 网络药理学; 高分辨液相色谱-质谱; 鞘脂代谢通路; 胰岛素抵抗

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2024)06-0870-08

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.06.012

The mechanism of didymin in alleviating non-alcoholic fatty liver disease in rats analyzed by the integrative analysis of untargeted metabolomics and network pharmacology

MO Rou¹, FANG Bin¹, LIN Xing¹, HUANG Quanfang², HUANG Renbin¹. (1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of didymin in alleviating lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) using integrative analysis of untargeted metabolomics and network pharmacology. **Methods:** The rats were randomly divided into normal group, model group and didymin group. The model group and didymin group were fed with a high-fat diet (HFD) for 8 weeks to induce NAFLD animal model, followed by the corresponding administration for further 8 weeks. Hematoxylin-eosin (HE) and Oil Red O staining were used to observe the cell morphology and lipid accumulation. Metabolomics of rat liver tissue was examined with high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS), and metabolism pathway was analyzed using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database. The overlapping target genes between didymin and NAFLD were predicted by network pharmacology analysis, and the potential targets were further analyzed by the integrative analysis of metabolomics and network pharmacology. **Results:** Didymin significantly reduced liver injury and inhibited excessive lipid deposition in rats. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) showed that significant differences in the metabolites between groups. The volcano plots indicated 404 differential metabolites between the normal group and the model group (293 up-regulated and 111

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 82060755)

[通信作者] 黄仁彬, E-mail: huangrenbin518@163.com; 黄权芳, E-mail: g723mb@sina.com

[收稿日期] 2024-04-19

down-regulated), and 147 between the model group and the didymin group (95 up-regulated and 52 down-regulated); metabolic pathway analysis showed that the differential metabolites were mainly enriched in the sphingolipid metabolism pathway. Network pharmacology analysis suggested that there was a total of 139 drug-disease common targets, and further integrative analysis indicated that didymin could regulate the sphingolipid metabolism pathway and insulin resistance by affecting the target genes *TNF*, *Bcl2*, *Mapk8*, *Pik3ca*, *Akt1*, *mTOR*, *Gsk3 β* , respectively. **Conclusion:** Didymin can regulate lipid metabolism disorder through the pathway of sphingolipid metabolism and insulin resistance, ultimately playing a role in the treatment of NAFLD.

Keywords didymin; non-alcoholic fatty liver disease; metabolomics; network pharmacology; high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry; sphingolipid metabolism pathway; insulin resistance

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种多病因引起的以肝细胞内脂质蓄积及肝细胞脂肪变为特征的临床病理综合征,包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎,进一步可发展为肝纤维化,甚至肝癌^[1]。研究表明,NAFLD在普通人群中的全球患病率为25%^[2],其中亚洲的患病率达到29.6%^[3]。NAFLD发病率的持续攀升已成为严重的公共卫生问题,对个人健康和社会经济造成了巨大负担。因此,寻找有效的靶向治疗药物,对遏制NAFLD的发展有着十分重要的科学意义和临床应用价值。

近年来,学者逐步改变传统的学术思维,并从生物系统的整体分析出发,探讨疾病的新靶标。代谢组学专注于生物系统中存在的小分子代谢产物,是一种用于全面评估内源性或外源性干扰后代谢产物动态变化的强大工具,在药物研究中得到了广泛应用^[4]。同样,网络药理学已广泛用于药物设计,包括疾病网络、药物靶向网络和药物疾病网络的构建^[5]。

香蜂草苷具有强大的抗炎、抗氧化等作用。本课题组前期研究发现香蜂草苷可缓解急性和慢性肝损伤^[6-8]。我们的最终目的是把香蜂草苷开发成保肝类药物,但仍未了解香蜂草苷对肝病进展中非酒精性脂肪肝的作用,因此为比较全面地了解香蜂草苷对肝病发生、发展的不同阶段的治疗效果,为香蜂草苷的未来开发提供一定的数据支持。本实验以高脂饲料(high-fat diet, HFD)喂养的NAFLD大鼠为模型,应用非靶向代谢组学技术和网络药理学分析潜在的靶点及关键代谢通路,旨在从多方面揭示香蜂草苷调节脂代谢紊乱的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠18只,体质量(180±40)g,购于广西医科大学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(桂)2020-0003,动物使用许可证号:SYXK(桂)2020-0004。本研究中涉及的所有大鼠实验均经广西医科大学动物伦理委员会批准。

1.2 仪器和主要试剂

三重四极杆飞行时间质谱超高效液相色谱分析(UPLC-Xevo G2-XS QToF, Waters, USA); C18色谱柱(Acquity UPLC®BEH 50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m, Waters Crop.);离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);微滤注射器(0.22 μ m,天津市津腾实验设备有限公司);甲醇、乙腈、甲酸(HPLC级, Fisher公司,美国);香蜂草苷(纯度≥98%,货号:14259-47-3,上海源叶生物科技有限公司);HFD(1145NA,胆固醇1%、猪油10%、蛋黄粉10%、基础料79%,批号:2021021513,北京博爱港生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组和造膜 SD大鼠18只,随机分为3组,分别为正常组、模型组和香蜂草苷治疗组,每组6只,饲养于SPF动物房内。模型组及香蜂草苷组给予HFD诱导NAFLD^[9],正常组给予正常饲料,饲养8周后,香蜂草苷组灌胃3 mg/(kg·d),其余2组灌胃生理盐水8周,末次给药后,3%戊巴比妥麻醉取肝组织,置于-80℃冰箱冻存,用于后续实验。

1.3.2 肝组织病理学观察 取肝组织样本于4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,脱水,切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肝组织病理变化。将肝组织置OTC包埋剂中,冷冻切片后,将切片放入油红染色液中,最后用甘油明胶进行封片,在光学显微镜下观察肝组织脂滴形成情况。

1.4 代谢组学实验方法

1.4.1 非靶向代谢组学样品制备 取50 mg肝组织于5 mL离心管中,分别加入500 μ L溶剂(乙腈:甲醇:水=2:2:1)后匀浆(60 Hz、20 s、研磨用钢珠),

静置 1 h, 每 15 min 涡旋 1 次, 后离心(12 000 r/min、10 min、4 ℃), 取上清液, 用针式过滤器过滤至上样瓶中, 于 4 ℃ 静置观察 1 h, 上机检测。

1.4.2 色谱与质谱条件 流动相 A(MPA) 为 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B(MPB) 为 0.1% 的甲酸的乙腈溶液。流速设定为 0.40 mL/min, 注射体积为 5 μ L。样品的梯度洗脱程序见表 1。

表 1 样品的梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A% (0.1%甲酸—水)	流动相 B% (0.1%甲酸—乙腈)
1	95	5
2	95	5
4	60	40
6	40	60
9	25	75
11	20	80
12	15	85
13	10	90
14	95	5
15	95	5

质谱分析的条件: 正离子模式, 扫描范围 50~1 200 Da。离子源温度 150 ℃, 脱溶剂温度为 350 ℃。毛细管电压为 250 kV, 锥体电压为 40 V。氮气作为鞘气(50 L/h)和脱溶剂气(800 L/h)。在所有分析中使用亮氨酸脑啡肽作为锁定物质, 浓度为 500 ng/mL, 流速为 10 μ L/min。氩气被设定为碰撞气体。氮气同时用作锥形气体和去溶剂化气体。

1.5 数据分析与处理

使用 MassLynx V4.1、Progenesis QIV2.4、和 SIMCA V14.1 软件进行数据分析和鉴定。采用主成分(PCA)分析和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)研究各组间差异, $P < 0.05$ 被认为代谢产物的差异具有统计学意义。使用 R 软件包(version:4.3.2)制作火山图, MetaboAnalyst 网站(<https://www.metaboanalyst.ca/>)对差异代谢物进行聚类富集分析(Enrichment analysis)。采用 IMPaLA(<http://impala.molgen.mpg.de/>)对差异代谢物进行通路富集分析。

1.6 网络药理学分析

利用 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 和 Pharmmpaper (<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/check.html>)、Targetnet (<http://targetnet.scbdd.com/home/index/>) 中进行检索获取香蜂草苷靶点的有效信息, 运用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>) 标准化名称整合数据进行去重。在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 和 MalaCards 数据库 (<https://www.malacards.org/>) 中以“nonalcoholic fatty liver disease”为关键词检索疾病相关基因靶点, 汇总去除重复值后提取疾病基因靶点。利用 venny 网站 (<http://www.liuxiaoyuyuan.cn/>) 取疾病与药物的交集基因, 随后使用 R4.3.2 软件包制作通路气泡图。

1.7 代谢组学与网络药理学联合分析

以 $P < 0.05$ 为条件取代谢通路与基因通路交集, 选择其对应的靶基因。随后通过 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 下载 TSC 文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 利用 Cytoscape 中 CytoHubba 插件的 MCC 算法, 最终得到排名靠前的靶点, 根据颜色深浅筛选香蜂草苷治疗 NAFLD 的核心靶点, 颜色越深则代表该靶点可能为治疗 NAFLD 的关键靶点。

2 结果

2.1 香蜂草苷明显减轻肝损伤和脂质沉积

HE 染色结果显示, 正常组大鼠肝组织细胞大小均一, 形态未见异常, 呈放射状排列, 细胞器数量丰富, 形态规整, 胞核定位在细胞中央, 肝小叶结构正常; 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织中肝小叶结构受损明显, 淋巴细胞填充严重, 大多数肝细胞呈弥漫性脂肪变性, 细胞胞体肿胀明显, 呈气球样变性, 肝索结构模糊不明, 局部区域坏死灶点明显; 与模型组相比, 香蜂草苷组大鼠肝组织的气球样变性、脂肪变性以及炎性介质填充均改善。油红染色显示, 模型组大鼠肝脏组织中出现严重的脂质蓄积, 香蜂草苷组治疗后脂质堆积情况明显改善。

2 结果

2.1 香蜂草苷明显减轻肝损伤和脂质沉积

HE 染色结果显示, 正常组大鼠肝组织细胞大小均一, 形态未见异常, 呈放射状排列, 细胞器数量丰富, 形态规整, 胞核定位在细胞中央, 肝小叶结构正常; 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织中肝小叶结构受损明显, 淋巴细胞填充严重, 大多数肝细胞呈弥漫性脂肪变性, 细胞胞体肿胀明显, 呈气球样变性, 肝索结构模糊不明, 局部区域坏死灶点明显; 与模型组相比, 香蜂草苷组大鼠肝组织的气球样变性、脂肪变性以及炎性介质填充均改善。油红染色显示, 模型组大鼠肝脏组织中出现严重的脂质蓄积, 香蜂草苷组治疗后脂质堆积情况明显改善。

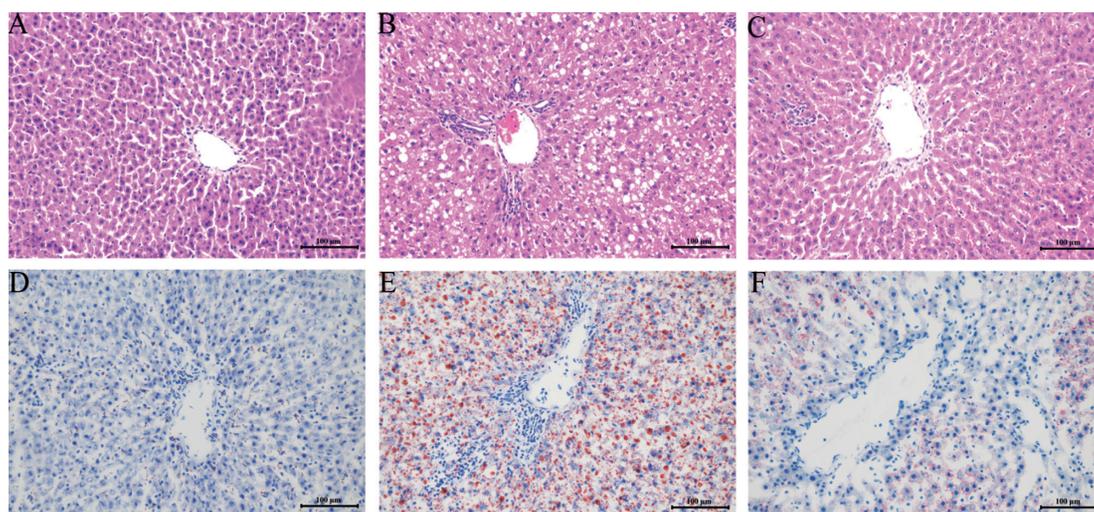
2.2 代谢组学分析

2.2.1 多元统计分析

正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)是一种“有监督”模式的分析方法, 在对数据“降维”的同时, 建立了回归模型, 可以滤除与分类信息无关的噪音, 因而能很好地获取组间差异信息。OPLS-DA 图的横坐标表示组间差异, 纵坐标表示组内样本间的差异。本实验结果表明, 在 OPLS-DA 得分图中, 正常组和模型组(图 2A)的组间离散度明显, 提示给予 HFD 后, 大鼠肝组织中内源性代谢物发生了明显的改变, 以 $n=200$ 对模型进行置换检验, OPLS-DA 置换检验^[10]模型的斜率较大, 并与纵坐标相交于负半轴, 表明模型未出现过拟合, 证实上述分析的结果比较可靠(R^2 和 Q^2 分别

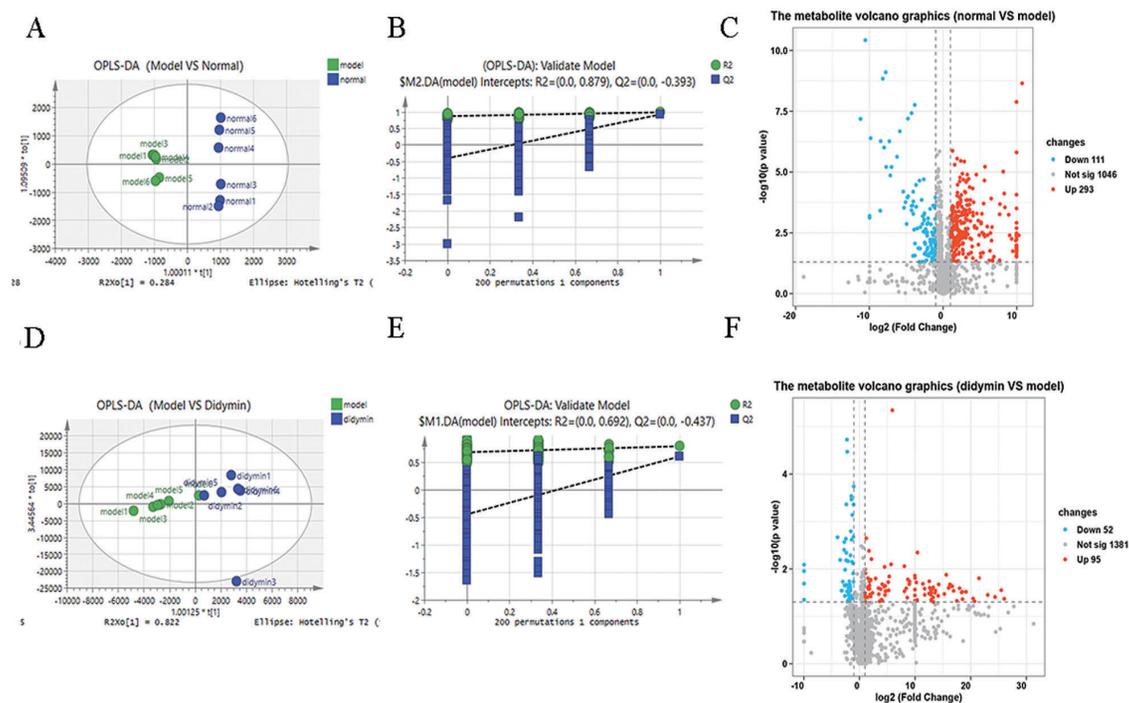
为0.879、-0.393, $R^2 > Q^2$) (图2B)。模型组与香蜂草苷组(图2D)两组之间样本能实现有效分离,说明模型建立良好,可以进行差异代谢物的分析及筛选。将上述模型随机排列200进行置换检验,发现模型的斜率较大,并与纵坐标交于负半轴,表明模型未过拟合,模型可靠。(R^2 和 Q^2 分别为0.692、-0.437,

$R^2 > Q^2$) (图2E)。火山图结果显示(图2C、图2F),以 $|\log_2FC| > 2 (P < 0.05)$ 为筛选条件,正常组与模型组之间存在404个差异代谢物(上调293个,下调111个);模型组和香蜂草苷组间有147个差异代谢物(上调95个,下调52个)。



A: 正常组HE染色图; B: 模型组HE染色图; C: 香蜂草苷组HE染色图; D: 正常组油红染色图; E: 模型组油红染色图; F: 香蜂草苷组油红染色图。

图1 香蜂草苷治疗对非酒精性脂肪肝大鼠肝组织的病理形态学的影响(×200)



A~C: 正常组和模型组的OPLS-DA分析图和火山图; D~F: 模型组和香蜂草苷组的OPLS-DA分析图和火山图。

图2 各组OPLS-DA得分及火山图

2.2.2 差异代谢物的分类富集分析 基于LC-MS的代谢组学分析,筛选得到模型组和香蜂草苷组之间存在147种潜在的差异代谢产物,对其进行分类富集分析,如图3所示,模型组和香蜂草苷组间的代谢产物的分类主要分为15种,其中孕烯醇酮脂类(Prenol lipids)占比15.32%,脂肪酸(Fatty Acyls)占比12.39%。由此推测,香蜂草苷治疗NAFLD与孕烯醇酮脂类和脂肪酸类密不可分。

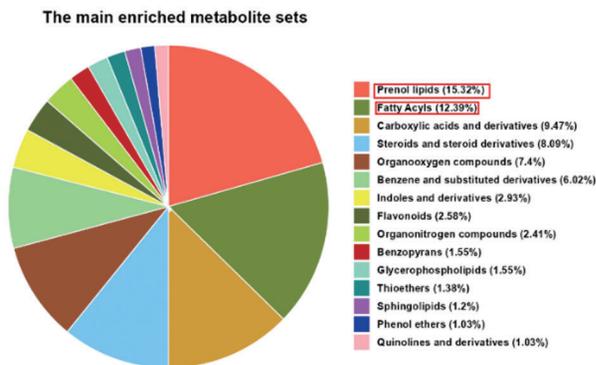


图3 模型组与香蜂草苷组差异脂质代谢物的分类富集分析

2.2.3 差异代谢物的代谢通路富集分析 在获取差异代谢物的匹配信息后,对物种进行整合分子通路水平分析,发现香蜂草苷差异代谢物主要富集在17条代谢通路,其中与脂类代谢相关的有鞘脂信号通路(sphingolipid signaling pathway)、鞘脂代谢(sphingolipid metabolism)、甘油磷脂代谢通路(glycerophospholipid metabolism)、脂肪细胞因子信号通路(adipocytokine signaling pathway)(图4)。提示香蜂草苷改善脂质代谢异常,发挥NAFLD治疗作用的机制可能与调节多条脂质代谢通路有关。

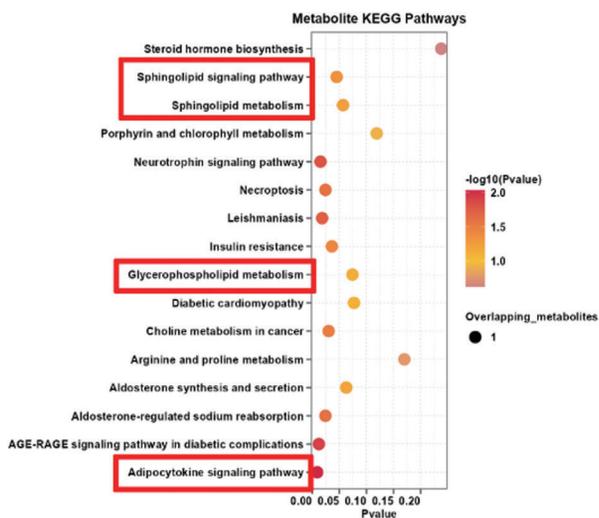


图4 差异代谢物相比较的KEGG通路气泡图

2.3 网络药理学分析结果

利用Swiss Target Prediction数据库和Pharmmpaper查询香蜂草苷对应的基因靶点分别有16个和298个,利用Targetnet网站查询得到香蜂草苷的作用靶点有623个,整合数据取并集,运用Uniprot数据库将蛋白转换成基因名称并去重得到832个作用靶点。在GeneCards数据库、OMIM数据库和MalaCards数据库中以“nonalcoholic fatty liver disease”为关键词检索疾病相关基因靶点分别得到1423、492、97个基因。整合汇总去除重复值,共得到1878个基因靶点。利用venny网站取疾病与药物的交集基因,通过将香蜂草苷的832个靶点与NAFLD病的1878个靶点相映射,筛选出香蜂草苷治疗NAFLD的139个潜在靶点(图5)。将香蜂草苷治疗NAFLD的139个潜在靶基因进行整合分子通路水平分析,发现香蜂草苷主要影响NAFLD共258条通路,前30的通路有脂质和动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、胰岛素抵抗(insulin resistance)、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、鞘脂代谢通路(sphingolipid signaling pathway)等(图6)。

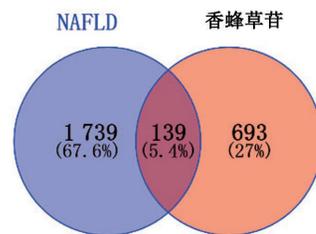


图5 疾病和药物基因交集venny图

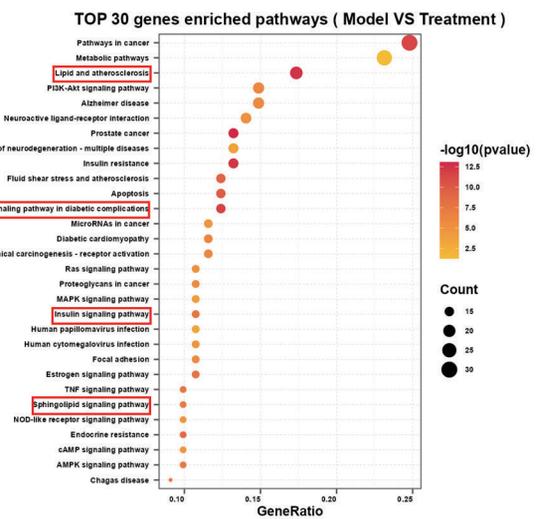


图6 靶基因KEGG通路富集分析

2.4 代谢与网络药理联合分析

代谢物的通路富集分析与潜在靶基因的通路富集分析结果进行交集分析发现有14条共同的通路(图7)。以 $P < 0.05$ 为入选标准,发现香蜂草苷可能通过调控鞘脂信号通路(Sphingolipid signaling pathway)和胰岛素抵抗(Insulin resistance)通路来调节内源性脂质和糖代谢,这两条通路富集的代谢物和基因见表2。为了了解上述代谢通路中的潜在核心靶点,我们利用Cytoscape分析其hub基因,结果发现胰岛素抵抗涉及的关键基因有*mTOR*、*Akt1*、*Gsk3β*、*Pik3ca*、*Mapk8*;鞘脂代谢通路涉及*TNF*、*Bcl2*、*Mapk8*、*Pik3ca*、*Akt1*(图8)。进一步的定量验证实验表明,与模型组比较,香蜂草苷可以降低*mTOR*、*Gsk3β*、*Pik3ca*、*Mapk8*、*Akt1*的表达、升高

*Bcl2*的表达(图9)。

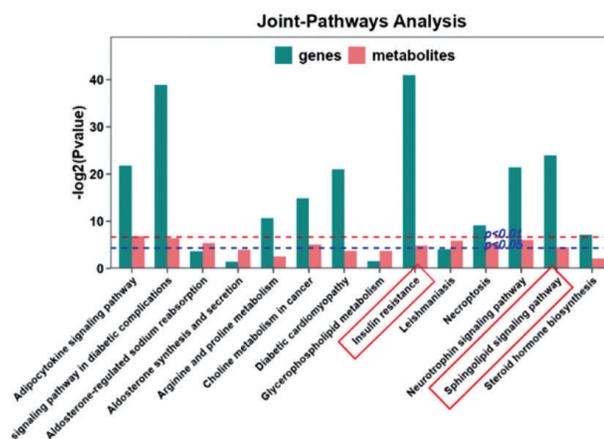
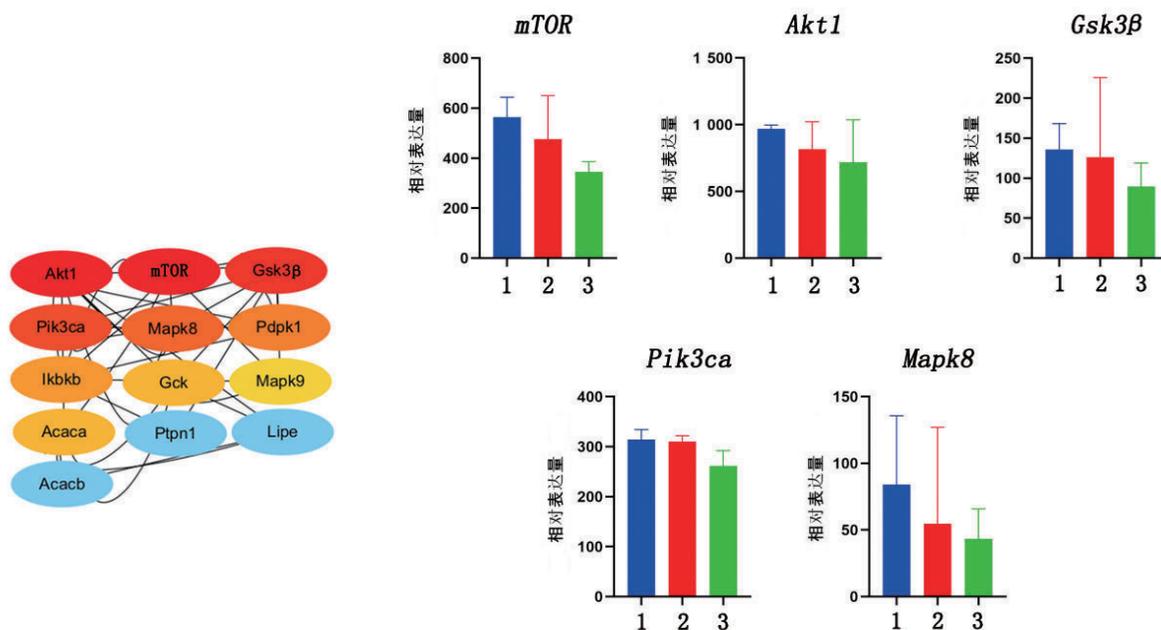


图7 代谢通路与基因通路交集

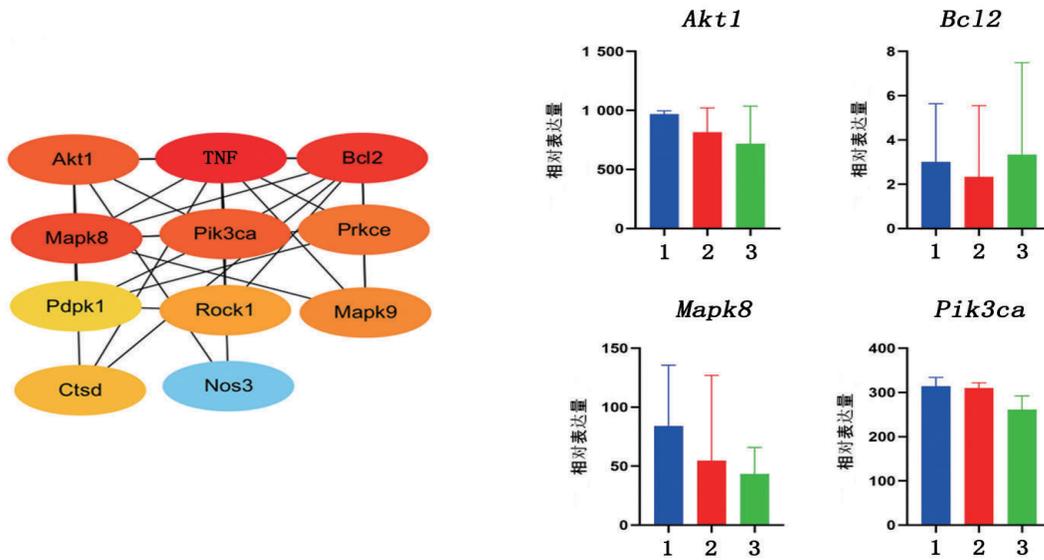
表2 交集通路对应代谢物和靶基因

交集代谢通路	代谢物	基因
胰岛素抵抗 (Insulin resistance)	HMDB0004949	<i>Pik3ca</i> 、 <i>Akt1</i> 、 <i>Acaca</i> 、 <i>mTOR</i> 、 <i>Lipe</i> 、 <i>Mapk8</i> 、 <i>Gck</i> 、 <i>Acacb</i> 、 <i>Ikbkb</i> 、 <i>Gsk3β</i> 、 <i>Ptpn1</i> 、 <i>Mapk9</i> 、 <i>Pdpk1</i>
鞘脂信号通路(Sphingolipid signaling pathway)	HMDB0004949	<i>Nos3</i> 、 <i>TNF</i> 、 <i>Pik3ca</i> 、 <i>Akt1</i> 、 <i>Bcl2</i> 、 <i>Mapk8</i> 、 <i>Ctsd</i> 、 <i>Rock1</i> 、 <i>Mapk9</i> 、 <i>Prkce</i> 、 <i>Pdpk1</i> 、 <i>Oprd1</i>



1:正常组;2:模型组;3:香蜂草苷组。

图8 胰岛素抵抗对应靶基因的hub基因及其基因表达



1: 正常组; 2: 模型组; 3: 香蜂草苷组。
图9 鞘脂代谢通路对应靶基因的 hub 基因及其基因表达

3 讨论

本实验采用 HFD 诱导 SD 大鼠建立 NAFLD 模型, 大鼠肝脏病理学切片结果表明 NAFLD 模型建立成功, 香蜂草苷可以明显减少高脂饮食诱导的大鼠肝脏组织中空泡样脂肪变性、脂质沉积, 表明香蜂草苷能改善高脂饮食所诱导的肝脏病理损伤。

本研究发现, 高脂饮食可以引起 SD 大鼠代谢轮廓的改变; 给予香蜂草苷治疗后, 这种改变得到一定程度的逆转。深入研究发现, 它涉及了 147 种潜在的差异代谢产物, 主要为孕烯醇酮脂类, 脂肪酸等, 其中, 脂肪酸是常见的能量储存和循环形式。脂肪酸合成是肝脏脂质代谢中的关键, 非酯化脂肪酸循环也可能是脂肪肝发病机制的主要决定因素^[11]。本实验结果提示, 发生显著性变化的脂肪酸类代谢产物可能参与了脂肪肝形成的进程, 而香蜂草苷可能通过调节脂肪酸类代谢产物对脂质沉积与糖代谢紊乱发挥作用。

这些差异代谢物在通路富集方面涉及到 17 条代谢通路, 其中有 4 条与脂类代谢相关, 分别是鞘脂信号通路、鞘脂代谢、甘油磷脂代谢通路、脂肪细胞因子信号通路。鞘脂信号通路、鞘脂代谢能够调节 NAFLD 的脂质代谢紊乱^[12], 甘油磷脂异常代谢引起的脂毒性是 NAFLD 的重要诱因^[13], 脂肪细胞因子信号通路可调控肝内脂质蓄积^[14]。本实验结果表明, 香蜂草苷改善脂质代谢异常、发挥 NAFLD 治疗作用的机制可能与这些通路有关。

为了进一步了解香蜂草苷调控这些代谢通路的作用机制, 本研究利用网络药理学对香蜂草苷作用于 NAFLD 的靶基因进行预测, 将靶基因做通路富集分析, 发现可以富集到 258 条通路。接着, 通过靶基因富集的通路与代谢组学富集的通路进行交集分析, 发现其共同指向了胰岛素抵抗和鞘脂信号通路。胰岛素抵抗与 NAFLD 密切相关^[15]。胰岛素可直接抑制脂类分解, 当机体处于 IR 状态时, 胰岛素水解 TG 的能力下降, TG 积累, 极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 合成增加; 同时脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 的活性被削弱, 导致 VLDL 降解减少, 肝细胞内 VLDL 大量蓄积, 形成脂肪肝^[16]。许多研究表明, 体内鞘脂的堆积是诱发肝损伤的另一重要诱因, 鞘脂信号通路可能是治疗 NAFLD 的潜在靶点^[17]。鞘脂来源于脂肪族氨基醇鞘氨醇, 它由前体 1-丝氨酸和棕榈酰辅酶 A 形成, 由丝氨酸棕榈酰转移酶 (SPT) 催化后迅速转化为二氢鞘氨醇 (鞘氨醇) 和二氢神经酰胺。二氢神经酰胺的去饱和和生成神经酰胺, 神经酰胺酶对神经酰胺的分解最终形成鞘氨醇^[18-19]。其中, 神经酰胺的累积会对胰岛素的敏感性和线粒体代谢产生干扰, 进而导致代谢紊乱并增加细胞死亡风险^[20]。神经酰胺可能作为鞘脂介质, 导致肥胖和相应的器官损伤, 提示鞘脂代谢通路中产生的神经酰胺对脂代谢的调控发挥重要作用^[21]。本研究网络药理学和代谢组学分析结果表明, 香蜂草苷改善脂质代谢异常、糖代谢紊乱的作用机制可能与胰岛素抵抗和鞘

脂信号通路有关,而进一步的Cytoscape分析和基因表达验证验证表明,香蜂草苷调节胰岛素抵抗的靶基因可能是*mTOR*、*Gsk3 β* 、*Pik3ca*、*Mapk8*、*Akt1*,调控鞘脂信号通路的靶基因是*Mapk8*、*Pik3ca*、*Akt1*。

综上所述,香蜂草苷有可能通过调控胰岛素抵抗和鞘脂信号通路、改善糖代谢异常和脂质过度沉积,从而缓解NAFLD的发生与发展。

参考文献:

- [1] WANG X J, MALHI H. Nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Annals of internal medicine* 2018, 169(9): itc65-itc80.
- [2] YOUNOSSI Z M. Non-alcoholic fatty liver disease- A global public health perspective [J]. *Journal of hepatology*, 2019, 70(3): 531-544.
- [3] POWELL E E, WONG V W-S, RINELLA M. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Lancet (London, England)*, 2021, 397(10290): 2212-2224.
- [4] 徐杨,何芷绮,刘晓凤,等.代谢组学在中药复方制剂领域的研究进展及面临的挑战[J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1354-1364.
- [5] 刘可春,王勇澄,臧晓涵,等.网络药理学和斑马鱼模型在中药药效物质及作用机制研究中的应用进展[J]. *山东科学*, 2024, 37(2): 29-35.
- [6] LI Y, LI C, XIONG Y, et al. Didymine ameliorates liver fibrosis by alleviating endoplasmic reticulum stress and glycerophospholipid metabolism: based on transcriptomics and metabolomics [J]. *Drug design, development and therapy*, 2022(16): 1713-1729.
- [7] FENG Z, PANG L, CHEN S, et al. Didymine ameliorates dexamethasone-induced non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting TLR4/NF- κ B and PI3K/Akt pathways in C57BL/6J mice [J]. *International immunopharmacology*, 2020, 88: 107003.
- [8] LIN X, BAI F, NIE J, et al. Didymine alleviates hepatic fibrosis through inhibiting erk and pi3k/akt pathways via regulation of raf kinase inhibitor protein [J]. *Cellular physiology and biochemistry*, 2016, 40(6): 1422-1432.
- [9] GAO Y, ZHANG W, ZENG L-Q, et al. Exercise and dietary intervention ameliorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy [J]. *Redox biology*, 2020, 36: 101635.
- [10] XUE W, ZHANG H, WANG M, et al. Metabolomics-based non-targeted screening analysis of 34 PPCPs in bovine and piscine muscles [J]. *Analytical methods: advancing methods and applications*, 2022, 14(3): 233-240.
- [11] 罗瑞熙,王文佳,王平,等.槲皮素通过调控内质网应激信号通路改善非酒精性脂肪肝大鼠肝脏损伤[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2024, 44(4): 445-454.
- [12] SZTOLSZTENER K, KONSTANTYNOWICZ-NOWICKA K, HARASIM-SYMBOR E, et al. Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and pi3k/akt/mtor signaling pathway in a rat model of NAFLD [J]. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(22): 12478.
- [13] VAN DER VEEN J N, KENNELLY J P, WAN S, et al. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease [J]. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 2017, 1859(9): 1558-1572.
- [14] PAROLA M, MARRA F. Adipokines and redox signaling: impact on fatty liver disease [J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2011, 15(2): 461-483.
- [15] CANFORA E E, MEEX R C R, VENEMA K, et al. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM [J]. *Nature reviews. Endocrinology*, 2019, 15(5): 261-273.
- [16] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention [J]. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 2017, 15(1): 11-20.
- [17] 梁晨,白丽,郑素军.鞘脂代谢在非酒精性脂肪性肝病中的作用及机制研究[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2022, 31(10): 1081-1085.
- [18] GREEN C D, MACEYKA M, COWART L A, et al. Sphingolipids in metabolic disease: The good, the bad, and the unknown [J]. *Cell metabolism*, 2021, 33(7): 1293-1306.
- [19] HANNUN Y A, OBEID L M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease [J]. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2018, 19(3): 175-191.
- [20] BHARATH L P, RUAN T, LI Y, et al. Ceramide-initiated protein phosphatase 2A activation contributes to arterial dysfunction in vivo [J]. *Diabetes*, 2015, 64(11): 3914-3926.
- [21] BOINI K M, ZHANG C, XIA M, et al. Role of sphingolipid mediator ceramide in obesity and renal injury in mice fed a high-fat diet [J]. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2010, 334(3): 839-846.

本文引用格式:

莫柔,方斌,林兴,等.代谢组学联合网络药理学分析香蜂草苷缓解非酒精性脂肪肝大鼠的作用机制[J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(6): 870-877. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.06.012

MO R, FANG B, LIN X, et al. The mechanism of didymine in alleviating non-alcoholic fatty liver disease in rats analyzed by the integrative analysis of untargeted metabolomics and network pharmacology [J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2024, 41(6): 870-877. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.06.012