

基于网络药理学和加权基因共表达网络探析苓苘颗粒治疗代谢相关脂肪性肝病的潜在靶点和作用机制

陆奕宇¹, 张如棉², 赵超群³, 章 亭², 陈 龙³, 周 群³, 蔡 虹^{2*}, 张 华^{3*}

¹上海中医药大学交叉科学研究院, 上海

²厦门市中医院, 福建 厦门

³上海中医药大学曙光医院肝病研究所, 上海

Email: yiyulu@shutcm.edu.cn, *Cguan2004@126.com, *lnutcmzh@126.com

收稿日期: 2021年5月11日; 录用日期: 2021年7月1日; 发布日期: 2021年7月8日

摘 要

目的: 探讨名老中医经验方苓苘颗粒治疗代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)的潜在靶点和作用机制。方法: 通过TCMSP数据库检索出苓苘颗粒所含主要的化学成分; 通过TCMID, TCMSP, TCM-PTD, NSTI, SymMap数据库查出中药各成分作用靶标基因; 检索Gene Cards, OMIM获得MAFLD相关基因靶点。将获得的苓苘颗粒作用靶点与MAFLD疾病靶点共同输入String数据库, 构建药物作用靶点-疾病靶点PPI网络并进行分析。通过核心靶基因筛选及功能富集, 最终构建中药-成分-直接靶点-间接靶点-pathway网络。同时, 运用GEO数据库下载MAFLD患者RNA-seq高通量测序数据, 并进行加权基因共表达网络分析(WGCNA)。结果: 构建中药-成分-直接靶点-间接靶点-pathway整体网络, 并获得36个潜在活性成分, 28个直接靶点。发现TNF信号通路, MAPK信号通路, 代谢相关肝病通路等相关通路的关键靶点基因涉及苓苘颗粒作用机制。结合WGCNA分析, 找到GGT1, E2F1, LMNA, CDKN1A和IGFBP1 5个基因可能与MAFLD的发生发展密切相关。结论: 苓苘颗粒通过TNF信号通路, MAPK信号通路, 以及非酒精性肝病相关等生物过程发挥治疗MAFLD的作用; 而GGT1、E2F1、LMNA、CDKN1A和IGFBP1是苓苘颗粒治疗MAFLD的潜在靶点。

关键词

苓苘颗粒, 代谢相关脂肪性肝病, 网络药理学, 加权基因共表达网络

*通讯作者。

Integrating Network Pharmacology and Weighted Gene Co-Expression Network Analysis to Explore the Potential Targets and Mechanism of Linghe Granules in the Treatment of Metabolism Related Fatty Liver Disease

Yiyu Lu¹, Rumian Zhang², Chaoqun Zhao³, Ting Zhang², Long Chen³, Qun Zhou³, Hong Cai^{2*}, Hua Zhang^{3*}

¹Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

²Xiamen Traditional Chinese Medicine Hospital, Xiamen Fujian

³Institute of Liver Disease, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai
Email: yiyulu@shutcm.edu.cn, *Cguan2004@126.com, *Inutcmzh@126.com

Received: May 11th, 2021; accepted: Jul. 1st, 2021; published: Jul. 8th, 2021

Abstract

Objective: To explore the potential target and mechanism of Linghe granules in the treatment of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD). **Methods:** The main chemical components of Linghe granules were retrieved by TCMSP database. The target genes of each component were identified by TCMID, TCMSP, TCM-PTD, NSTI, and symMap database. The database Genecards and OMIM were used to obtain the MAFLD related target genes. The targets of Linghe granules and MAFLD related targets were input into the String database to construct PPI network. After network analysis, core target genes were selected, of which functional enrichment analysis was performed. Based on the precious results, Linghe granules-component-direct target-indirect target-pathway network was constructed. Meanwhile, the high-throughput RNA-seq sequencing data of MAFLD patients were downloaded from the GEO database and analyzed by weighted correlation network analysis (WGCNA). **Results:** Thirty-six potential active components and 28 direct targets were obtained. The enriched pathways of Linghe granules related target genes include TNF signaling pathway, MAPK signaling pathway, and nonalcoholic liver disease. Integrated with WGCNA analysis, five genes, *GGT1*, *E2F1*, *LMNA*, *CDKN1A* and *IGFBP1*, were found to be closely associated with the occurrence and development of MAFLD. **Conclusion:** TNF signaling pathway, MAPK signaling pathway, and non-alcoholic liver disease biological processes are related to Linghe granules treating MAFLD. *GGT1*, *E2F1*, *LMNA*, *CDKN1A* and *IGFBP1*, are potential targets of Linghe granules in the treatment of MAFLD.

Keywords

Linghe Granules, Metabolic Associated Fatty Liver Disease, Network Pharmacology, Weighted Gene Co-Expression Network

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是临床上常见的与代谢功能障碍相关的肝脏疾病,全球患病率高达 25% [1]。有研究报道,从 2016 年至 2030 年,中国 NAFLD 人口预计将增长 29.1%,达到 3.458 亿;同时,继发于 NAFLD 的失代偿性肝硬化和肝脏相关死亡也将增加一倍以上[2]。此外,因 NAFLD 与代谢紊乱相关,且参与 2 型糖尿病和动脉粥样硬化的发病,是心脑血管疾病及代谢综合征相关恶性肿瘤的危险因素之一,故面对发病率的攀升和疾病危害的增加,于 2020 年将 NAFLD 重新定义并更名为代谢相关脂肪性肝病(metabolic associated fatty liver disease, MAFLD)。

目前,MAFLD 已替代病毒性肝炎,成为全球发病率最高的慢性肝病[3],MAFLD 前期肝脏脂肪积聚虽然可逆,但常因其无临床症状而被忽略。发现时多已进入肝脏炎性病变期,而脂肪性肝炎(NASH)又可进一步发展为脂肪性肝纤维化、肝硬化及肝癌,一旦进展到肝硬化,则为不可逆病变,可出现腹水、上消化道出血、肝性脑病、感染、肝肾综合征等系列并发症,严重危害生命健康。针对肝脏脂肪积聚,现代医学尚无 FDA 批准的有效治疗药物,仅以改变生活方式、减轻体重或控制并发症为主要手段。存在治疗个体差异大、远期疗效差、难以规范实施等问题。中医将 MAFLD 归属“肝癖”、“肥气”、“积聚”等范畴,中医药防治本病具有明显的优势与特色。

苓荷颗粒是已故全国名老中医康良石教授临床治疗 MAFLD 的有效经验方[4],由茯苓、净山楂、荷叶、佛手、决明子、丹参、陈皮、玉米须八味药组成,临床疗效显著[5]。但因缺少作用靶点、效应机制的深入研究,制约了其疗效的发挥和推广应用。基于此,本研究运用网络药理学和加权基因共表达网络算法,对苓荷颗粒的效应机制、药效物质基础和作用靶标进行了初步探索,以期为苓荷颗粒治疗 MAFLD 提供数据支撑与临床指导。

2. 材料与方法

2.1. 苓荷颗粒化学活性成分检索和筛选

以各单味药的标准中药名称或拉丁文为检索词,通过 TCMSP 和 TCMID 等数据库检索苓荷颗粒组成药物的全部化学成分,构建苓荷颗粒成分数据集。参考口服利用度(Oral bioavailability, OB)和药物相似性(drug-likeness, DL)进行筛选。选取同时满足 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 的成分作为潜在的活性成分,构建苓荷颗粒活性成分数据库。检索数据库:TCMID (<http://www.megabionet.org/tcmid/>); TCMSP (<https://tcmssp.com/tcmssp.php>); TCM-PTD (<http://tcm.zju.edu.cn/ptd/>); NSTI (<http://www.ncmi.cn/>); SymMap (<http://www.symmap.org/>)。

2.2. MAFLD 疾病靶点的预测

通过数据库搜索关键词“Nonalcoholic fatty liverdisease”或“Non-alcoholic fatty liverdisease”,查找与 MAFLD 相关的基因,合并相关数据库,去除重复基因,获得 MAFLD 疾病-靶点。检索数据库:Gene Cards (<https://www.genecards.org/>); OMIM (<http://www.omim.org/>)。

2.3. 构建蛋白相互作用网络并计算网络拓扑参数

将相关基因导入 STRING 在线数据库(<https://string-db.org/>),设定 Organism 为“Homo sapiens”,隐

藏与关键节点网络无连接的节点, 得到蛋白相互作用网络(Protein-Protein Interaction, PPI)。将导出的网络节点关联数据导入 Cytoscape 3.8.2 软件, 计算网络拓扑参数 degree, closeness centrality, clustering coefficient, topological coefficient 和 betweenness centrality, 筛选关键基因。并构建药物-靶点-疾病网络。

2.4. WGCNA 分析 MAFLD 相关潜在靶点基因

GEO 下载 MAFLD 相关数据 GSE135251, 用于加权基因共表达网络分析(Weighted correlation network analysis, WGCNA), 探寻与 MAFLD 发生发展相关的潜在靶点基因。此数据集包括 216 例不同肝纤维化阶段的 MAFLD 患者和 10 例正常人的冷冻肝活检样本的高通量 RNA 测序数据[6]。利用 R 语言的 Deseq2 包筛选差异基因, 利用 WGCNA 包, 构建 MAFLD 加权共表达网络[7]。

为了使构建的网络接近真实生物网络状态的无尺度网络, 首先, 使用 Soft Threshold 选择合适的软阈值参数 β 。然后根据所确定的软阈值, 转变邻接矩阵成为 0~1 之间的连续值, 再以基因间皮尔逊相关系数构建邻接矩阵, 转换为拓扑矩阵, 基于拓扑重叠矩阵的差异性度量识别构建模块。临床指标包括 MAFLD 的疾病与否(Disease/Normal)、严重程度(control = 0, early = 1, moderate = 2)、活动度积分(MAFLD activity score, NAS = 0~8), 以及肝纤维化分期(Fibrosisstage: F0~F4)。以最小尺寸 20 为分割的基因树状图, 建立平均连锁层次聚类, 将上述临床信息与表达模式与其相类似的基因划分为一个模块, 筛选最优模块。

2.5. 核心靶点生物功能注释分析

利用 R 语言 clusterProfiler 包进行靶点基因的功能注释及通路分析。基于 Gene Ontology 数据库(<http://www.geneontology.org>)对基因进行 GO 注释, 基于 KEGG 数据库(<http://www.genome.jp/keg/>)对差异基因进行 pathway 注释。利用 Fisher 精确检验和卡方检验, 以 $P < 0.05$ 及 $FDR < 0.05$, $|\text{fold change}| > 2$ 为标准, 计算每个 GO 的显著性水平和误判率, 筛选出目标基因富集的显著性 GO。并分析目的基因参与的 pathway, 获得目标基因富集的显著性 pathway。

2.6. 统计学分析

进行差异基因表达分析, 方差齐的多样本间进行单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 苓苘颗粒潜在活性成分筛选

苓苘颗粒中 8 味药的成分共有 8137 个, 共筛选到潜在活性成分 134 个。包括茯苓 15 个; 陈皮 5 个; 荷叶 15 个; 玉米须 12 个; 佛手 5 个; 丹参 65 个; 决明子 14 个; 山楂 3 个(表 1)。

Table 1. Active ingredients of 8 herbs in Linghe granules (only 3 active ingredients are listed for each herb)
表 1. 苓苘颗粒中 8 味药活性成分(每味药只列出 3 个活性成分)

	MOL	Name	MW	OB	DL
Fu Ling	MOL000273	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	470.76	30.93	0.81
Fu Ling	MOL000275	trametenolic acid	456.78	38.71	0.8
Fu Ling	MOL000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	526.83	35.11	0.81
Chen Pi	MOL004328	Naringenin	272.27	59.29	0.21

Continued

Chen Pi	MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	302.3	47.74	0.27
Chen Pi	MOL005815	Citromitin	404.45	86.9	0.51
He Ye	MOL000098	Quercetin	302.25	46.43	0.28
He Ye	MOL000354	Isorhamnetin	316.28	49.6	0.31
He Ye	MOL000359	Sitosterol	414.79	36.91	0.75
Yu Mi Xu	MOL013357	(3S,6R,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R,4R)-4-ethyl-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-2,3,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,6-diol	430.79	34.37	0.78
Yu Mi Xu	MOL003044	Chryseriol	300.28	35.85	0.27
Yu Mi Xu	MOL010862	α -tocopheryl quinone	446.79	35.91	0.5
Fo Shou	MOL001323	Sitosterol alpha1	426.8	43.28	0.78
Fo Shou	MOL013253	5,2',5'-Trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	376.34	37.49	0.43
Fo Shou	MOL001506	Supraene	410.8	33.55	0.42
Dan Shen	MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	280.34	38.75	0.36
Dan Shen	MOL001659	Poriferasterol	412.77	43.83	0.76
Dan Shen	MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	414.79	36.91	0.75
Jue Ming Zi	MOL006486	Obtusin	344.34	31.24	0.4
Jue Ming Zi	MOL006472	Aurantio-obtusin	330.31	31.55	0.37
Jue Ming Zi	MOL005043	campest-5-en-3beta-ol	400.76	37.58	0.71
Shan Zha	MOL005384	Suchilactone	368.41	57.52	0.56
Shan Zha	MOL000073	Epicatechin	290.29	48.96	0.24
Shan Zha	MOL001645	linoleyl acetate	308.56	42.1	0.2

3.2. 苓苘颗粒 - 靶点构建

基于 TCMID 数据库中现存所有的中药成分 - 靶点数据信息, 输入前述 134 个苓苘颗粒潜在活性成分, 寻找苓苘颗粒 - 靶点。共获得 258 个潜在靶点基因(图 1)。

3.3. MAFLD 疾病靶点的预测

OMIM 共检索获得 MAFLD 的 238 个靶点基因; Genecards 共检索获得 MAFLD 的 847 个靶点基因; 去除重复的, 共获得 1029 个 MAFLD 的靶点基因。

3.4. 苓苘颗粒作用靶点与 MAFLD 相互作用网络

将获得的 258 个苓苘颗粒作用靶点与 1029 个 MAFLD 疾病靶点共同输入 STRING 数据库, 构建药物作用靶点 - 疾病靶点 PPI 网络。本实验中: degree = 37, closeness = 0.425256, clustering coefficient = 0.403129, topological coefficient = 0.145755 和 betweenness = 0.000416。选取同时满足上述三个阈值的节点作为此网络的关键节点, 共 77 个(表 2)。

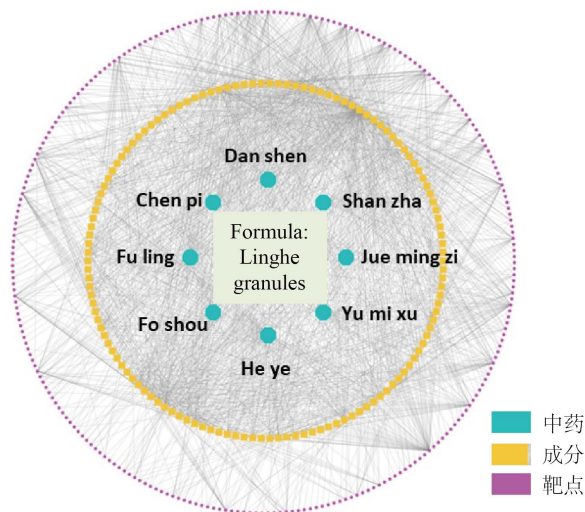


Figure 1. Composition-target network of Linghe granules (134 potential active components and 258 potential target genes)

图 1. 苓荷颗粒成分 - 靶点网络图(134 个潜在活性成分及 258 个潜在靶点基因)

Table 2. 77 key target genes

表 2. 77 个关键靶点基因

Target name	Gene name	Degree	Betweenness Centrality	Closeness Centrality	Clustering Coefficient	Topological Coefficient
E2F1	E2F transcription factor 1	55	4.37E-04	0.448	0.494	0.149
FGF19	fibroblast growth factor 19	53	7.22E-04	0.459	0.430	0.160
GGT1	gamma-glutamyltransferase 1	75	1.70E-03	0.484	0.412	0.152
IL18	interleukin 18	107	7.84E-04	0.472	0.540	0.157
SLC2A1	solute carrier family 2 member 1	72	4.85E-04	0.479	0.512	0.165
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	129	1.05E-03	0.489	0.477	0.151
TGFB1	transforming growth factor beta 1	122	1.04E-03	0.492	0.496	0.152
HGF	hepatocyte growth factor	121	1.35E-03	0.494	0.486	0.150
CD68	CD68 molecule	103	1.29E-03	0.480	0.485	0.147
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	65	4.88E-04	0.463	0.569	0.173
NCF1	neutrophil cytosolic factor 1	69	6.08E-04	0.469	0.490	0.158
NOS2	nitric oxide synthase 2	98	1.67E-03	0.487	0.464	0.151
MMP3	matrix metalloproteinase 3	101	9.66E-04	0.474	0.528	0.164
LCN2	lipocalin 2	73	9.45E-04	0.455	0.415	0.152
VDR	vitamin D	73	6.19E-04	0.471	0.460	0.168
CYP19A1	cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1	66	7.55E-04	0.466	0.449	0.164
SELE	selectin E	83	9.33E-04	0.457	0.622	0.178
F3	coagulation factor III, tissue factor	71	6.98E-04	0.455	0.531	0.171
CTGF	connective tissue growth factor	89	1.07E-03	0.475	0.550	0.166

Continued

CNR1	cannabinoid receptor 1	77	5.51E-04	0.455	0.501	0.154
GPX7	glutathione peroxidase 7	48	6.92E-04	0.451	0.470	0.152
LEPR	leptin receptor	70	6.99E-04	0.455	0.448	0.158
LOX	lysyl oxidase	86	2.28E-03	0.476	0.470	0.159
EGR1	early growth response 1	106	6.39E-04	0.486	0.493	0.159
IRF1	interferon regulatory factor 1	79	6.78E-04	0.465	0.510	0.155
CDH2	cadherin 2	102	1.10E-03	0.484	0.463	0.150
GJA1	gap junction protein alpha 1	66	1.29E-03	0.468	0.450	0.168
TERT	telomerase reverse transcriptase	78	4.64E-04	0.482	0.493	0.157
PGR	progesterone receptor	89	8.33E-04	0.479	0.472	0.157
CASP9	caspase 9	106	7.39E-04	0.496	0.519	0.151
ESR2	estrogen receptor 2	69	5.79E-04	0.473	0.490	0.171
ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	48	8.03E-04	0.464	0.443	0.158
TLR9	toll like receptor 9	104	6.60E-04	0.484	0.534	0.152
BGLAP	bone gamma-carboxyglutamate protein	70	5.81E-04	0.474	0.489	0.160
RUNX2	runt related transcription factor 2	97	1.05E-03	0.487	0.459	0.150
IGF2	insulin like growth factor 2	101	1.28E-03	0.480	0.448	0.147
CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A	111	2.84E-03	0.492	0.474	0.148
ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	55	7.80E-04	0.457	0.457	0.168
VIM	Vimentin	49	6.24E-04	0.460	0.412	0.158
MCL1	BCL2 family apoptosis regulator	97	8.43E-04	0.488	0.503	0.151
LMNA	lamin A/C	64	1.66E-03	0.481	0.430	0.159
ITGB3	integrin subunit beta 3	61	4.86E-04	0.457	0.430	0.160
IRF3	interferon regulatory factor 3	76	9.55E-04	0.468	0.458	0.151
PDGFRB	platelet derived growth factor receptor beta	94	1.11E-03	0.478	0.440	0.151
TGFBR1	transforming growth factor beta receptor 1	64	8.98E-04	0.469	0.436	0.153
CCR2	C-C motif chemokine receptor 2	89	5.35E-04	0.458	0.550	0.158
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	125	9.25E-04	0.477	0.489	0.149
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase	63	1.41E-03	0.465	0.427	0.148
IGFBP1	insulin like growth factor binding protein 1	72	6.02E-04	0.455	0.437	0.152
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein beta	87	2.60E-03	0.476	0.425	0.151
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	104	2.60E-03	0.484	0.433	0.149
SIRT6	sirtuin 6	64	1.27E-03	0.475	0.404	0.148
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3	76	8.08E-04	0.467	0.582	0.170
ADIPOR1	adiponectin receptor 1	43	2.15E-03	0.447	0.563	0.179
PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	69	6.01E-04	0.474	0.518	0.171

Continued

IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3	93	5.56E-04	0.473	0.454	0.155
TNFSF11	tumor necrosis factor superfamily member 11	110	7.21E-04	0.482	0.474	0.153
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3	72	4.52E-04	0.479	0.500	0.160
VTN	Vitronectin	57	4.90E-04	0.458	0.503	0.162
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	79	3.31E-03	0.478	0.537	0.163
MYD88	myeloid differentiation primary response 88	102	1.22E-03	0.483	0.528	0.147
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	84	5.64E-04	0.482	0.443	0.150
PLAU	plasminogen activator, urokinase	76	7.48E-04	0.475	0.477	0.160
AHR	aryl hydrocarbon receptor	80	9.65E-04	0.476	0.429	0.154
TNFRSF1A	TNF receptor superfamily member 1A	111	1.25E-03	0.488	0.496	0.148
BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	64	2.09E-03	0.458	0.511	0.159
BIRC2	baculoviral IAP repeat containing 2	65	7.52E-04	0.462	0.446	0.147
XBP1	X-box binding protein 1	68	1.42E-03	0.472	0.475	0.158
ERBB3	erb-b2 receptor tyrosine kinase 3	58	4.37E-04	0.466	0.604	0.182
BIRC5	baculoviral IAP repeat containing 5	49	5.75E-04	0.445	0.514	0.154
CTSB	cathepsin B	69	5.43E-04	0.466	0.503	0.166
EPHA2	EPH receptor A2	47	4.29E-04	0.460	0.537	0.173
MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinasekinase 5	70	4.76E-04	0.473	0.492	0.158
ATF6	activating transcription factor 6	51	4.21E-04	0.461	0.511	0.165
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	90	6.02E-04	0.484	0.498	0.159
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	57	1.35E-03	0.446	0.486	0.146
TGFB2	transforming growth factor beta receptor 2	52	4.78E-04	0.466	0.470	0.156

3.5. 中药 - 成分 - 直接靶点 - 间接靶点-pathway 网络构建

将苓苘颗粒 258 个潜在靶点基因与 77 个关键靶点基因进行交集，得到的交集集中的 28 个基因视为直接靶点基因。其余 49 个基因为间接靶点基因(图 2)。

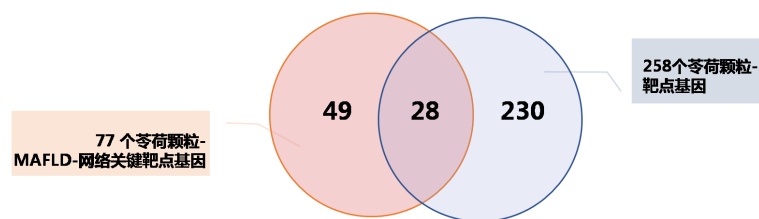


Figure 2. Intersection analysis of 258 potential target genes and 77 key target genes of Linghe granules

图 2. 苓苘颗粒 258 个潜在靶点基因与 77 个关键靶点基因交集分析

进一步将此中药 - 成分 - 靶点网络与 2.4 中苓苘颗粒作用靶点与 MAFLD 相互作用网络整合，获得中药 - 成分 - 直接靶点 - 间接靶点 - pathway 整体网络，包括 36 个潜在活性成分，28 个直接靶点，49

个间接靶点及部分关键基因通路(图 3)。

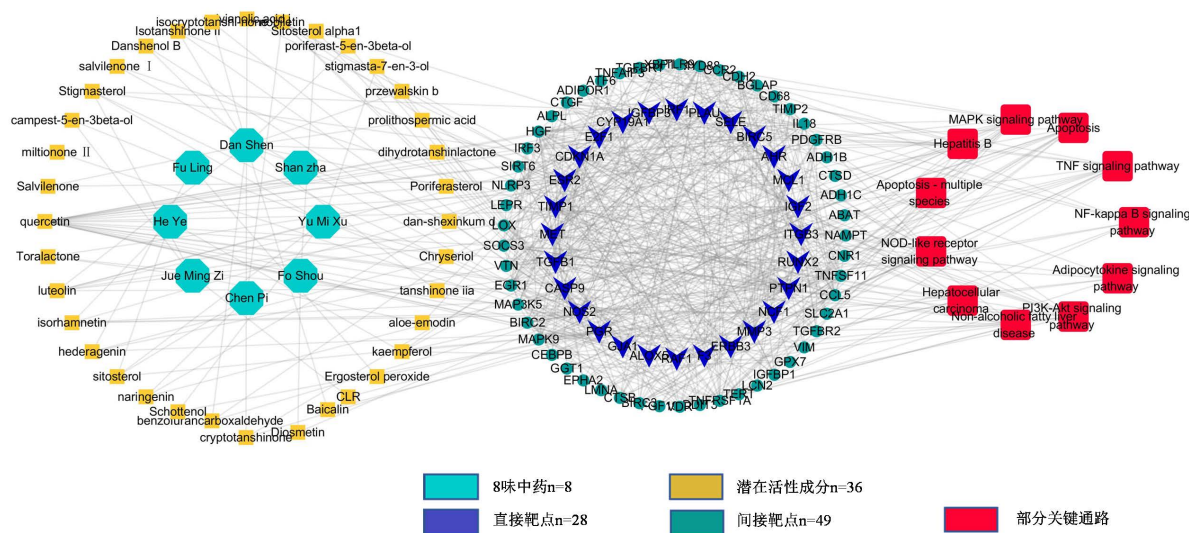


Figure 3. Pathway network-traditional Chinese medicine composition-direct targets-indirect targets

图 3. 中药 - 成分 - 直接靶点 - 间接靶点-pathway 网络

对 77 个关键靶点基因进行生物功能注释, 分析 GO 下的分子功能 BP 和 KEGG pathway。发现 77 个关键靶点基因涉及 TNF 信号通路, MAPK 信号通路, 非酒精性肝病等通路(前 15 个 term) (图 4)。

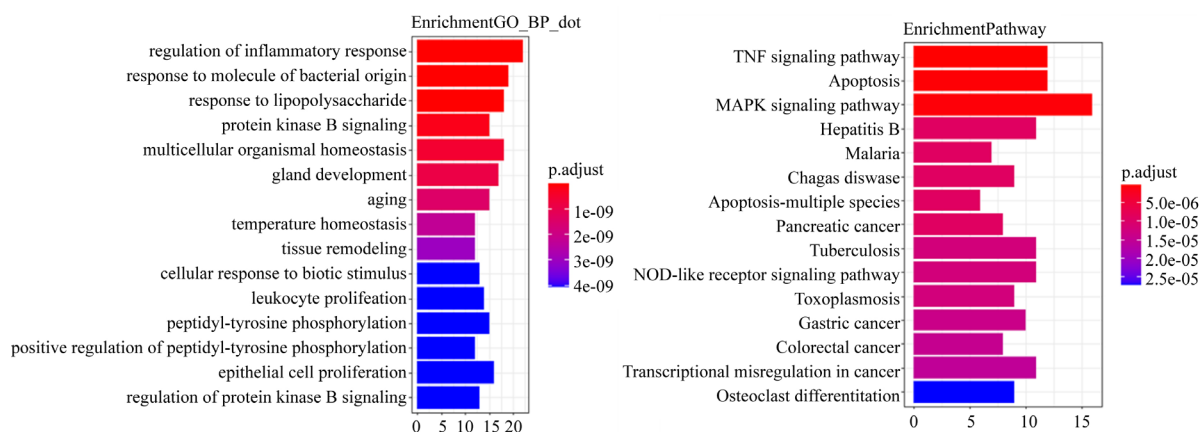


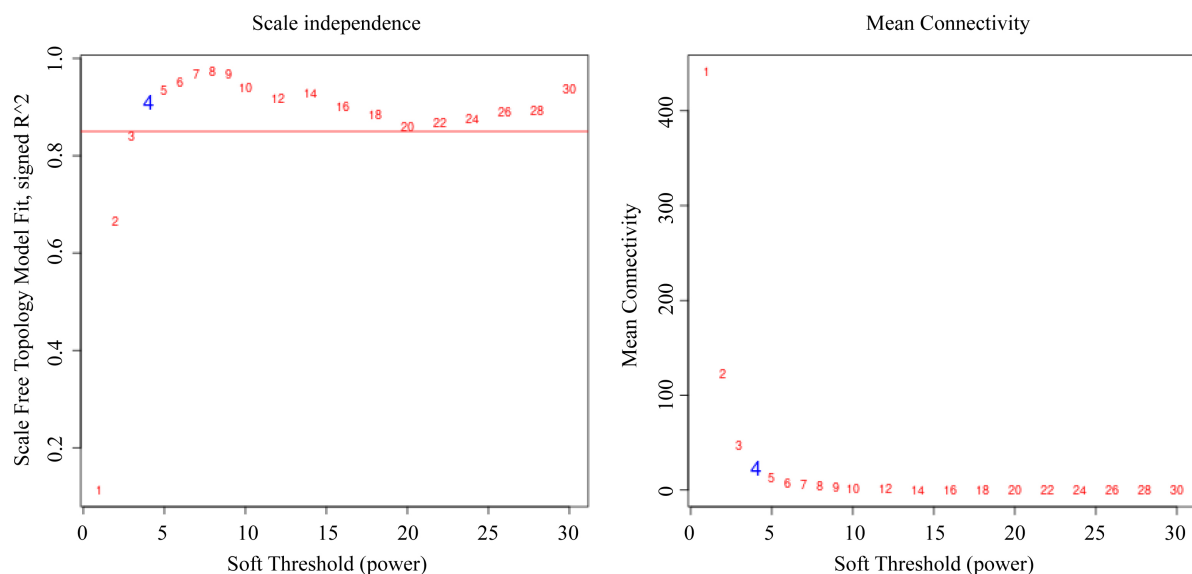
Figure 4. Functional analysis of GO and KEGG pathway of 77 key target genes

图 4. 77 个关键靶点基因的 GO 和 KEGG pathway 功能分析

3.6. WGCNA 分析 MAFLD 相关潜在靶点基因

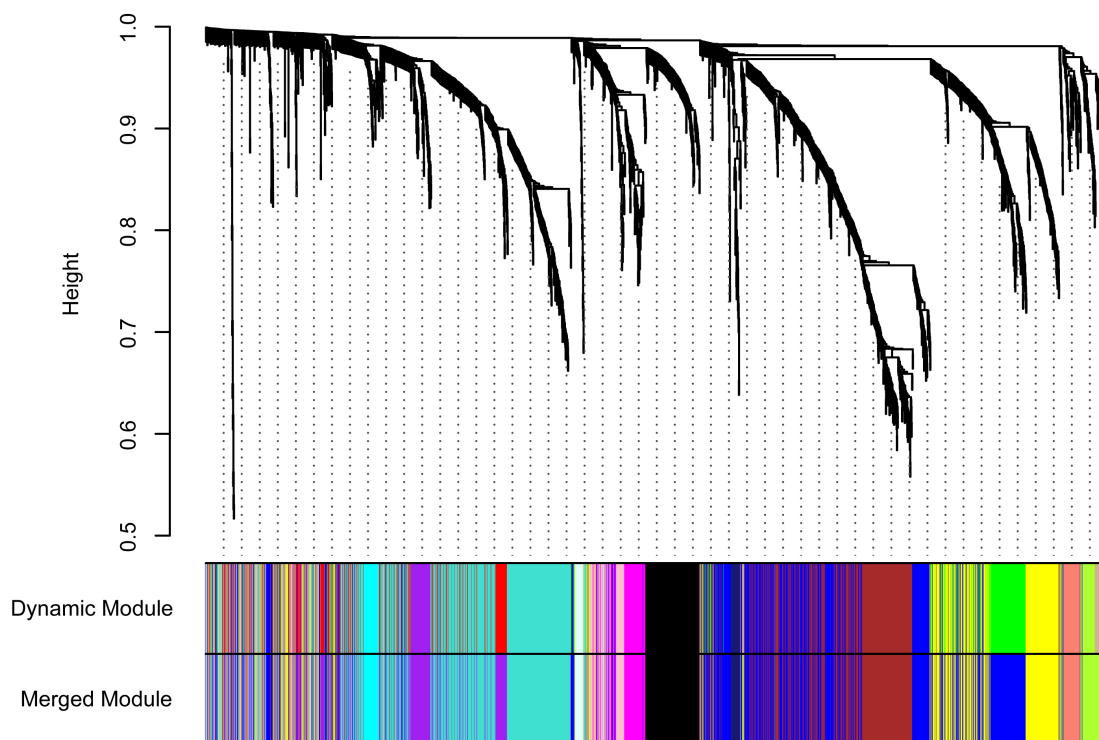
运用 GEO 下载的 MAFLD 数据集进行差异基因分析, 找到差异基因 2796 个。将上述差异基因进行 WGCNA 分析。为使构建的网络更符合无标度网络的特性, 软阈值设置为 4 (图 5(a))。基于加权算法进行层次聚类分析, 根据设定的软阈值和临床指标聚类结果进行分割, 得到不同的基因模块(图 5(b)-(d))。根据软阈值 = 4, 模块内基因数 $n \geq 20$, 模块切割高度 0.25 的标准化, 确定 14 个模块。这 14 个模块与 MAFLD 的疾病与否、严重程度活动度积分及肝纤维化分期相关性见图 5(c)。greenyellow, salmon, blue 和 brown

前四个模块(图 5(c)绿色框)和 MAFLD 的疾病发展显著相关性($P < 0.0001$)。将这四个模块中的 1213 个基因和 77 个关键基因相对比,发现 *GGT1*, *E2F1*, *LMNA*, *CDKN1A* 和 *IGFBP15* 个重复出现的基因。因此,推测这 5 个基因可能参与 MAFLD 的发生发展,并且有可能成为苓苘颗粒治疗 MAFLD 的潜在靶点,从而选择它们进行下一步研究。



(a)

Cluster Dendrogram



(b)

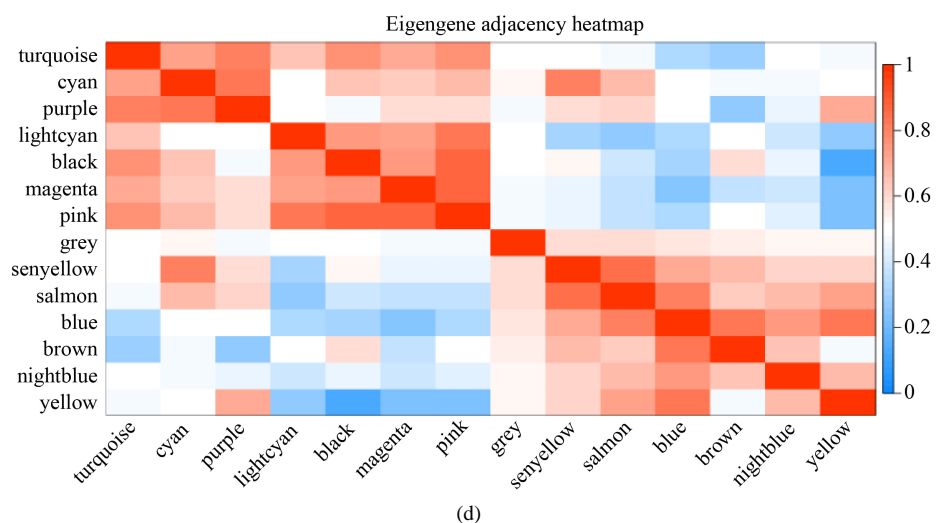
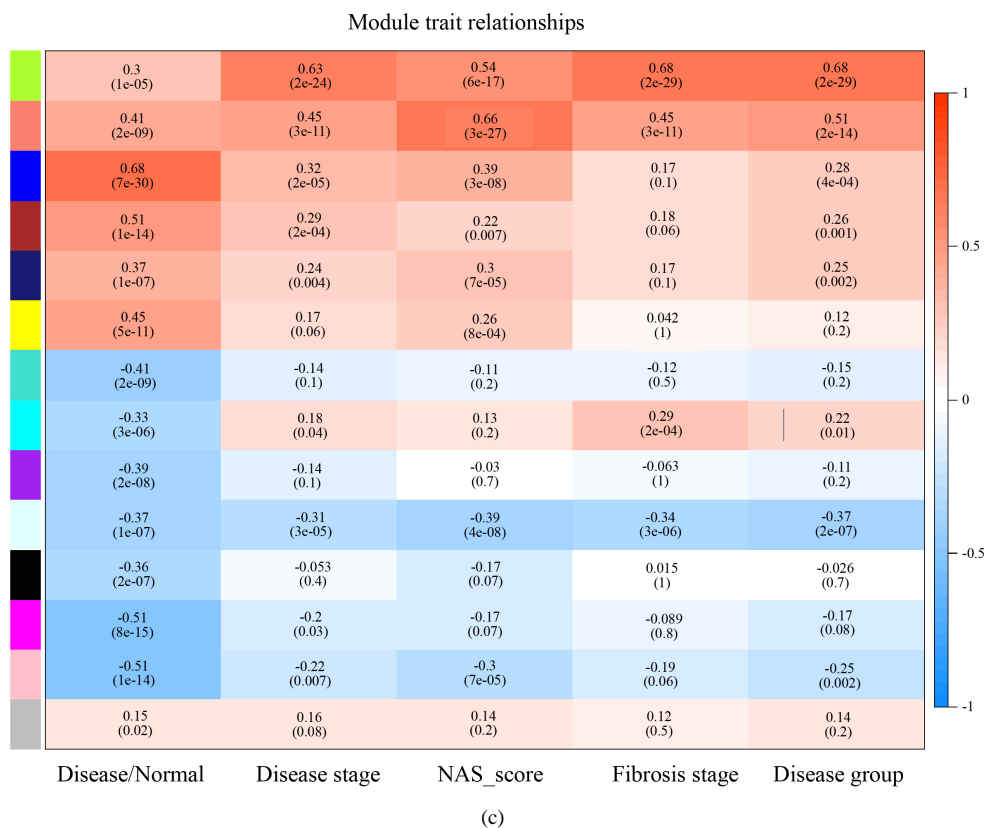


Figure 5. WGCNA analysis. (a) Scale independence and average connectivity analysis in WGCNA analysis; (b) Cluster tree diagram; (c) The correlation between 14 gene modules and clinical characteristic values was analyzed by thermogram; (d) Correlation heat map of different modules

图 5. WGCNA 分析。(a) WGCNA 分析中的尺度独立性和平均连通性分析；(b) 聚类树状图；(c) 14 个基因模块和临床特征值的相关性分析热图；(d) 不同模块间相关性热图

3.7. *GGT1*, *E2F1*, *LMNA*, *CDKN1A* 和 *IGFBP1* 在数据集中的表达

对这 5 个基因在 MAFLD 患者中的表达情况进行分析，随着 MAFLD 的发展，*GGT1*, *E2F1*, *LMNA*，和 *CDKN1A* 的表达显著升高；而 *IGFBP1* 则相反，随着 MAFLD 的发展，其表达显著降低(图 6)。

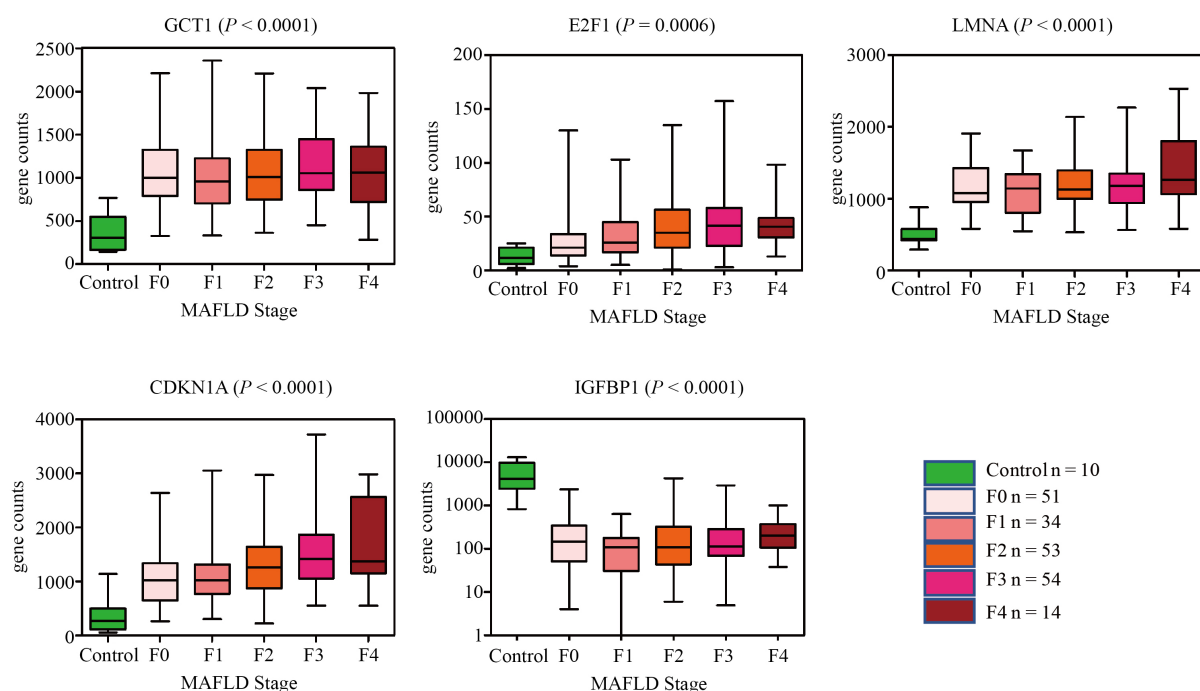


Figure 6. Expression of *GGT1*, *E2F1*, *LMNA*, *CDKN1A* and *IGFBP1* in different stages of MAFLD patients
图 6. *GGT1*, *E2F1*, *LMNA*, *CDKN1A* 和 *IGFBP1* 在 MAFLD 不同阶段患者中的表达情况

4. 讨论

MAFLD 系过食油腻肥甘，湿浊内生，脾胃乃伤。食而不运，脂膏留积于肝，致疏泄不利，所引发的一系列病证。如叶天士在《临证指南医案》云：“湿从内生者，必其人膏粮酒醴过度”。康老总结 MAFLD 病因，主要责之湿邪内盛，运化失常。病机为痰湿瘀浊壅滞，三焦气机升降失职，最终导致肝脏脂肪过多难以输出而积聚。故苓荷颗粒组方以茯苓益脾调脏、利水渗湿；荷叶泻肝行气、散瘀利水，合而为君；臣以陈皮理气健脾、宣通五脏；佛手舒肝和胃、消痞除胀；山楂行结气、消食积、开郁化滞；丹参祛瘀生新、理气活血，共助君之用；佐以玉米须利尿泻浊，决明子清肝益肾、利水通便。诸药协同，升降有度，运化有序，则可使湿邪内除，精微传输及时，气机枢纽得利，机体复常[8] [9]。课题组前期初步临床观察证实，苓荷颗粒能显著改善 MAFLD 患者体重、腰围、肝脏脂肪变性定量(CAP 值)等肥胖相关指标和肝脏脂肪变性。

然而，虽已有前期临床数据证实苓荷颗粒治疗 MAFLD 具有较好的疗效，但是对其确切的疗效机制及作用靶点仍知之甚少。传统研究中药作用机制的方法大多从研究单个或少数几个基因、通路或者中药中的单体成分入手，具有一定的盲目性、局部性，无法对疾病的发生发展机制进行全局探索，难以从整体观揭示中药治疗疾病的多成分、多靶点、多通路的特点。以整体性、系统性为特点的网络药理学，与中医药整体观念、辨证论治、方剂配伍等原则不谋而合。由网络药理学参与并主导的“多成分，多靶点”研究策略已获得多次成功[10]。本研究采用 WGCNA 联合网络药理学的方法，构建无尺度网络，将差异基因分为 14 个模块，从中挖掘得到 4 个与 MAFLD 发生发展密切相关的基因群，进一步通过与前述网络药理学靶点分析结果进行比对，发现 *GGT1*, *E2F1*, *LMNA*, *CDKN1A* 和 *IGFBP1* 可能是苓荷颗粒治疗 MAFLD 的潜在靶点。

GGT1 (gamma-glutamyl transpeptidase, γ 谷氨酰基转移酶)，是一种细胞表面酶，裂解细胞外谷胱甘肽(glutathione, GSH)等，在保持细胞内谷胱甘肽水平中起着重要的作用[11]。临床将其作为肝损伤标志之

一。研究发现人类血清中 *GGT1* 水平与肥胖以及代谢综合征[12]相关。澳大利亚的一项队列研究[13]显示, 一组与 *GGT* 关联的 SNP 同时也与心血管疾病及 2 型糖尿病等代谢性疾病强相关。*GGT1* 同时也被发现是泽泻治疗糖尿病大鼠[14]以及黄芪和紫草提取物治疗 MAFLD 肝病小鼠肝脂肪变性的靶点[15]。

在 MAFLD 中, 胆固醇在肝脏中的蓄积是早期事件。已有研究证明 *E2F1* 通过调节蛋白通过原蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9 (*PCSK9*)来维持胆固醇稳态[16]。同时, MAFLD 中的脂质代谢重排有助于疾病发展, 在由 MAFLD 发展成肝癌的过程中, 代谢重排是标志。Gonzalez Romero 等[17]的最新一项研究显示, *E2F1-E2F2-Cpt2* 通路轴线的激活提供了肝癌发生所需的富含脂质的环境, 在接受高脂饮食和二乙基亚硝胺给药的小鼠中, MAFLD 相关肝癌中 *E2F1* 和 *E2F2* 的表达增加。

LMNA 编码的 Lamin A/C 是细胞核纤层的主要组成部分, 直接或间接与染色质相互作用, 在维持染色质结构、DNA 复制、转录和细胞凋亡等方面发挥重要作用[18]。目前已有多个研究发现, *LMNA* 基因的突变或多态性与多种代谢性疾病密切相关[19] [20]。

蛋白 p21 由 *CDKN1A* 编码。研究表明, *CDKN1A* 变异与疾病进展的速度有关, 比如, *CDKN1A* 变体与特发性肺纤维化的快速发展有关[21]。*CDKN1A* 可能在 NAFLD 的疾病进展中起类似作用[21]。Aravinthan 等[22]通过比较无纤维化和有纤维化的 NAFLD 患者, 检验 *CDKN1A* 变异对肝纤维化的影响, 研究发现 *CDKN1A*(p21)的 rs762623 和纤维化密切相关。

胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (*IGFBP-1*)是六个 *IGFBP* 之一, 它们结合并调节胰岛素样生长因子 1 (*IGF-1*)的生物利用度[23] [24]。我们的结果显示 *IGFBP1* 的表达和其他 4 个基因不同, 随着 MAFLD 的发展, 其表达逐步降低(图 6), 本结果和文献报道一致[25]。Stanley 等[26]的研究显示, 具有较高脂肪变性和 NAS 活性评分的个体肝脏中的 *IGF1* mRNA 显著降低。磷酸化的 *IGFBP-1* 可作为 MAFLD 中肝脂肪的非侵入性预测生物标志物[27]。

综上, 本研究发现, 苓苘颗粒作用相关的关键基因涉及 TNF 信号通路, MAPK 信号通路, 非酒精性肝病等通路。进一步结合 WGCNA 分析发现的 *GGT1*, *E2F1*, *LMNA*, *CDKN1A* 和 *IGFBP1* 和 MAFLD 的发生发展密切相关, 为苓苘颗粒治疗 MAFLD 的潜在靶点。本研究结果可为未来进一步研究苓苘颗粒作用于 MAFLD 的实验研究及临床运用提供理论依据和实验依据。

基金项目

上海市“科技创新行动计划”自然科学基金项目(20ZR1453700); 国家自然科学基金青年项目(81503478); 厦门市中医院项目(202101)。

参考文献

- [1] Younossi, Z., Tacke, F., Arrese, M., Chander Sharma, B., Mostafa, I., Bugianesi, E., *et al.* (2019) Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, **69**, 2672-2682. <https://doi.org/10.1002/hep.30251>
- [2] Estes, C., Anstee, Q.M., Arias-Loste, M.T., Bantel, H., Bellentani, S., Caballeria, J., *et al.* (2018) Modeling NAFLD Disease Burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the Period 2016-2030. *Journal of Hepatology*, **69**, 896-904. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.036>
- [3] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(3): 195-203.
- [4] 章亭, 康旻睿, 张如棉, 康素琼, 吴剑华. 康良石教授治疗非酒精性脂肪肝经验[J]. 光明中医, 2013, 28(9): 1806-1807.
- [5] 张如棉, 吴剑华, 康俊杰, 章亭, 于洪涛. 康氏系列方联合拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的疗效初探[J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(5): 309-311.

- [6] Govaere, O., Cockell, S., Tiniakos, D., Queen, R., Younes, R., Vacca, M., *et al.* (2020) Transcriptomic Profiling across the Nonalcoholic Fatty Liver Disease Spectrum Reveals Gene Signatures for Steatohepatitis and Fibrosis. *Science Translational Medicine*, **12**, Article No. eaba4448. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aba4448>
- [7] Langfelder, P. and Horvath, S. (2008) WGCNA: An R Package for Weighted Gene Co-Expression Network Analysis. *BMC Bioinformatics*, **9**, Article No. 559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
- [8] 钟杰璋, 陈贻威, 潘家丽, 黄慧学. 中药治疗酒精性肝病的研究进展[J]. 世界中医药, 2018, 13(2): 504-507+512.
- [9] 乐琦琦, 刘晏. 非酒精性脂肪肝的临床和药理研究进展[J]. 中成药. 2014, 36(2): 371-376.
- [10] Zhang, R., Zhu, X., Bai, H. and Ning, K. (2019) Network Pharmacology Databases for Traditional Chinese Medicine: Review and Assessment. *Frontiers in Pharmacology*, **10**, Article No. 123. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00123>
- [11] Wickham, S., West, M.B., Cook, P.F. and Hanigan, M.H. (2011) Gamma-Glutamyl Compounds: Substrate Specificity of Gamma-Glutamyl Transpeptidase Enzymes. *Analytical Biochemistry*, **414**, 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.03.026>
- [12] Liu, C.F., Zhou, W.N. and Fang, N.Y. (2012) Gamma-Glutamyltransferase Levels and Risk of Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *International Journal of Clinical Practice*, **66**, 692-698. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2012.02959.x>
- [13] Middelberg, R.P., Benyamin, B., de Moor, M.H., Warrington, N.M., Gordon, S., Henders, A.K., *et al.* (2012) Loci Affecting Gamma-Glutamyl Transferase in Adults and Adolescents Show Age \times SNP Interaction and Cardiometabolic Disease Associations. *Human Molecular Genetics*, **21**, 446-455. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr478>
- [14] Xu, X., Li, L., Zhang, Y., Lu, X., Lin, W., Wu, S., *et al.* (2020) Hypolipidemic Effect of *Alisma orientale* (Sam.) Juzep on Gut Microecology and Liver Transcriptome in Diabetic Rats. *PLoS ONE*, **15**, e0240616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240616>
- [15] Choi, D.J., Kim, S.C., Park, G.E., Choi, B.-R., Lee, D.Y., Lee, Y.-S., *et al.* (2020) Protective Effect of a Mixture of *Astragalus membranaceus* and *Lithospermum erythrorhizon* Extract against Hepatic Steatosis in High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2020**, Article ID: 8370698. <https://doi.org/10.1155/2020/8370698>
- [16] Lai, Q., Giralt, A., Le May, C., Zhang, L., Cariou, B., Denechaud, P.-D., *et al.* (2017) E2F1 Inhibits Circulating Cholesterol Clearance by Regulating Pcsk9 Expression in the Liver. *JCI Insight*, **2**, e89729. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89729>
- [17] Gonzalez-Romero, F., Mestre, D., Aurrekoetxea, I., O'Rourke, C.J., Andersen, J.B., Woodhoo, A., *et al.* (2021) E2F1 and E2F2-Mediated Repression of CPT2 Establishes a Lipid-Rich Tumor-Promoting Environment. *Cancer Research*, **81**, 2874-2887. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2052>
- [18] Dittmer, T. and Misteli, T. (2011) The Lamin Protein Family. *Genome Biology*, **12**, Article No. 222. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-222>
- [19] Desgrouas, C., Varlet, A.A., Dutour, A., Galant, D., Merono, F., Bonello-Palot, N., *et al.* (2020) Unraveling LMNA Mutations in Metabolic Syndrome: Cellular Phenotype and Clinical Pitfalls. *Cells*, **9**, Article No. 310. <https://doi.org/10.3390/cells9020310>
- [20] 苏本利, 张晓青, 赵蔚, 赵海燕, 张萍, 吕申. 非糖尿病与糖尿病患者群 LMNA1908C/T 基因多态性与血脂代谢紊乱的关系[J]. 中国临床康复, 2004, 8(9): 1690-1692.
- [21] Korthagen, N.M., van Moorsel, C.H., Barlo, N.P., Kazemier, K.M., Ruven, H.J.T. and Grutters, J.C. (2012) Association between Variations in Cell Cycle Genes and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE*, **7**, e30442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030442>
- [22] Aravinthan, A., Mells, G., Allison, M., *et al.* (2014) Gene Polymorphisms of Cellular Senescence Marker p21 and Disease Progression in Non-Alcohol-Related Fatty Liver Disease. *Cell Cycle*, **13**, 1489-1494. <https://doi.org/10.4161/cc.28471>
- [23] Firth, S.M. and Baxter, R.C. (2002) Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocrine Reviews*, **23**, 824-854. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0033>
- [24] Adamek, A. and Kasprzak, A. (2018) Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, Article No. 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms19051308>
- [25] Colak, Y., Senates, E., Ozturk, O., Yilmaz, Y., Zemheri, E., Yilmaz Enc, F., *et al.* (2012) Serum Concentrations of Human Insulin-Like Growth Factor-1 and Levels of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-5 in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Association with Liver Histology. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, **24**, 255-261.
- [26] Stanley, T.L., Fourman, L.T., Zheng, I., McClure, C.M., Feldpausch, M.N., Torriani, M., *et al.* (2021) Relationship of

IGF-1 and IGF-Binding Proteins to Disease Severity and Glycemia in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **106**, e520-e533. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa792>

- [27] Petäjä, E.M., Zhou, Y., Havana, M., Hakkarainen, A., Lundbom, N., Ihalainen, J., *et al.* (2016) Phosphorylated IGFBP-1 as a Non-Invasive Predictor of Liver Fat in NAFLD. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 24740. <https://doi.org/10.1038/srep24740>