



原创论文

香附醋制入肝改善非酒精性脂肪肝的网络药理学分析

刘月函¹, 卿莹², 廖婉², 高天慧¹

¹齐鲁医药学院, 药学院

²西南特色中药资源国家重点实验室, 药学院/现代中药产业学院, 成都中医药大学

摘要: 为研究香附醋制后可引药入肝达到增效目的, 本研究采用网络药理学方法探析香附醋制入肝改善非酒精性脂肪肝的作用机制。笔者整理近 10 年国内外相关文献, 并基于 TCMS 数据库筛选获得醋香附的有效成分 16 个, 相关作用靶点 471 个; 利用 GeneCards、OMIM 及 DrugBank 数据库获得非酒精性脂肪肝的靶点基因 1,941 个, 其中药物与疾病的共同靶点 104 个; 利用 Cytoscape 3.10.0 软件构建“药物-成分-基因靶点”网络, 得到金银花醇、异鼠李素、山奈酚等为香附醋制入肝作用于非酒精性脂肪肝的主要活性成分; 将潜在作用靶点导入 String 数据库进行蛋白质相互作用分析, 构建 PPI 网络, 分析发现 AKT1、JUN、IL6、IL1B 等为关键靶点基因; 对作用靶点进行 GO 功能富集分析及 KEGG 通路分析, 结果显示醋香附改善非酒精性脂肪肝与多条肝病相关代谢通路相关, 包括肿瘤坏死因子 (TNF signaling pathway)、促分裂素原活化蛋白激酶 (MAPK signaling pathway)、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt signaling pathway) 信号通路。研究结论显示醋香附可通过金银花醇、异鼠李素、山奈酚等活性成分, 作用于 AKT1、JUN、IL6、IL1B 等核心靶点, 调控 TNF、MAPK、PI3K-Akt 等肝病相关信号通路, 经醋制入肝而改善非酒精性脂肪肝。

关键词: 香附; 醋制入肝; 非酒精性脂肪肝; 网络药理学; 作用机制

通讯作者: 廖婉: liaowan@cdutcm.edu.cn

高天慧: gaotianhui@qlmu.edu.cn



Received: 6 November 2024

Revised: 10 March 2025

Accepted: 28 March 2025



前言

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是除酒精及其他明确损伤肝的因素所致的, 病变主体位于肝小叶, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性、脂肪贮积为主要病理特征的临床病理综合征。^[1,2] 近十年来, NAFLD 患病率逐年提升, 到目前为止, 已成为全球最常见的慢性肝病。^[3] 据统计, NAFLD 的患病率为 25.00%, 亚洲地区患病率高达 27.37%。^[4] 根据以往数据对未来 NAFLD 的流行趋势进行数学模型推算后, 预计至 2030 年, 全球脂肪肝人数将较之前

继续增加 30.00%, NAFLD 引起的终末期肝病也将成倍增加。目前针对 NAFLD 的治疗方法主要有: 基础治疗 (饮食结构的调整及纠正生活方式)、减肥、使用胰岛素增敏剂、降血脂药物、针对肝病的药物及肝移植。^[5] 但目前, NAFLD 的确切发病机制尚未完全阐明, 缺乏理想药物,^[6] 且治疗药物的副作用与器官移植的困难性及资源紧缺性, 需要我们寻找新的 NAFLD 治疗的方向。中医认为, NAFLD 本虚标实, 病位在肝, 与脾、肾等脏腑功能失调密切相关, 指出肝郁

导致痰湿内停、瘀血阻络是本病的主要病机。^[7] 中医药调节的整体性、多层次、多靶点的作用特点,以及较好的安全性是改善本病的明显优势,^[6] 故寻找安全有效的中药已成为当前研究的重要方向。

香附为我国的一种传统中药材,来源于莎草科莎草的干燥根茎,味辛、微苦、微甘,性平,归肝、脾、三焦经,是常用的疏肝解郁中药。^[8]《本草蒙筌》中记载香附:“若理气疼,醋炒尤妙”,^[9] 香附醋制后可引药入肝,其疏肝解郁、活血散瘀的功效会增强,因此,在临床上多使用其醋制品。^[10] 根据中医理论,肝郁是 NAFLD 发病及反复发作的主要病机,^[11] 临床中的 NAFLD 多遵肝郁为始、痰瘀致病的发病过程,故治疗时化痰应与疏肝并重。^[12]《本草纲目》言“香附可散时气寒疫,解六郁,消痰饮痞满”;《仁存堂经验方》中记载:香附与半夏、白帆、姜汁配伍后,做成丸剂,可用于治疗停痰宿饮,胸膈不利,能化痰消瘀。而香附能理气解郁,可治气郁不疏,胸胁胀痛,痰饮痞满,^[13] 醋制之后,可引药入肝,增强疏肝解郁之功,消痰化滞之力,使其长于治疗气滞痰瘀、肝郁。^[14] 网络药理学是现代生物信息学研究领域的重要部分,利用公共数据库与文献,集合生物信息技术,进而预测药物防治疾病的有效活性成分、作用靶点及可能参与调控的细胞信号转导通路、潜在药理学机制和方剂配伍规律。^[15] 故本文采用网络药理学,探寻香附醋制后改善 NAFLD 的作用靶点及通路。

方法

1. 醋香附相关成分及靶点筛选

通过 TCSP 数据库并结合文献查阅,收集醋香附的相关成分,以口服生物利用度 (Oral bioavailability, OB) $\geq 30.00\%$, 和类药性 (Drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为条件收集药物成分。并根据已发表的醋香附相关成分文献报道,补充未预测到的活性化合物的已知靶点。

2. NAFLD 的疾病靶点筛选

为保证数据的全面性,以“非酒精性脂肪肝”、“non-alcoholic fatty liver disease”、

“NAFLD”等关键词,搜索 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (online Mendelian inheritance in man)、DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.ca/>) 获得 NAFLD 的核心靶点。使用 UniProt 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org>) 将疾病靶点药物成分的潜在靶点统一规范为 Gene Symbol, 其后将两者进行映射,以获得醋香附潜在干预 NAFLD 的靶点。

3. 核心成分的筛选

将交集靶点导入 Cytoscape 3.7.0, 构建“药物-成分-基因靶点”网络图,分析其核心成分,并根据相关文献检索,对比筛选香附醋制前后成分差异变化,增加香附醋制后含量增加或特有的成分。

4. 核心靶点的筛选

将醋香附成分靶点与疾病靶点取交集靶点,导入 String 数据库,选择物种为“Homo sapiens”获得 PPI 网络关系后,将其导入 Cytoscape 3.10.0, 使用插件 Centiscape 2.2, 根据筛选阈值筛选靶点,删除不合适的靶点;随后将该图导入 Cytoscape 3.7.0 使用插件 network analysis 中的 generate style from statistics 进行分析。并根据这些基因与肝脏或肝脏疾病的相关度,判断是否与香附醋制入肝相关。

5. 醋香附成分-靶点 PPI 网络构建

蛋白质相互作用网络 (protein-protein interaction, PPI) 是指从生物化学,信号转导和遗传网络的角度研究化合物和疾病相关蛋白质分子之间的相关性。为阐明靶点蛋白在系统水平上的作用,将核心靶点上传至 STRING 11.0 数据库,选择物种为“Homo sapiens”,设置靶点关联的置信度为 0.70,以获得 PPI 网络关系。

6. 醋香附成分与非酒精性脂肪肝靶点 GO 功能富集和 KEGG 通路富集

对作用靶点进行生物信息富集分析,包括 GO 分析的生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞成分 (cellular component, CC) 以及 KEGG 通路。对各个

分析结果按照 p 值从小到大排序，且以 $p \leq 0.5$ 为筛选条件，并选取与 NAFLD 更相关的通路

7.“成分-靶点-通路网络图”的构建

将方法中“4.核心靶点的筛选”项下的交集靶点与 KEGG 富集生成生物通路的相互作用信息与方法中“2.NAFLD 的疾病靶点筛选”项下筛选出的药物成分与交集靶点合并，导入至 Cytoscape 3.7.0 中构建出“药物成分-靶点-通路网络图”。使用 CytoScape 3.7.0 内置的 Network Analyzer 分析有效成分与靶点的网络拓扑参数，包括连接度 (Degree)、介度 (Betweenness) 及紧密度 (Closeness) 等，并根据网络拓扑学参数判断核心靶点及干预 NAFLD 的核心成分。

8. 分子对接的验证实验

为验证筛选靶点与成分的准确性，根据 PPI 网络而筛选的核心靶点，从 Pubchem、RCSB PDB

数据库中获取化合物的 3D 结构，并使用 Open babel 转化为 mol2 格式；以及筛选出对应核心靶点的大分子蛋白，导入 Pymol 软件中，去除蛋白质的水分子、多余配体等，再利用 Autodock 加氢、增加原子电荷等，并输出为 pdbqt 格式。随后进行分子对接，将对接结果最好的组合使用 Pymol 进行可视化分析。

结果

1. 醋香附的主要活性成分靶点预测结果

筛选获得符合标准的醋香附活性成分 16 个 (其中将醋香附编号为 XF，醋香附的 16 种活性成分依次编号为 XF1、XF2……XF16)。其有效成分多为黄酮类化合物，包括异鼠李素、山奈酚、槲皮素等成分 (见表 1)。将醋香附蛋白名称利用 VLOOKUP 函数匹配相应的基因名称，去除所有重复靶点后，得到潜在作用靶点 471 个。

表 1 醋香附 16 种有效成分

编号	化合物	CAS 号	分子式
XF1	Chryseriol	491-71-4	$C_{16}H_{12}O_6$
XF2	异鼠李素 (Isorhamnetin)	480-19-3	$C_{16}H_{12}O_7$
XF3	8-异戊二烯基山奈酚 (8-Isopentenyl-kaempferol)	28610-31-3	$C_{20}H_{18}O_6$
XF4	β -谷甾醇 (β -sitosterol)	83-46-5	$C_{29}H_{50}O$
XF5	谷甾醇 (Sitosterol)	83-46-5	$C_{29}H_{50}O$
XF6	异道耳槐 (Isodalbergin)	/	$C_{16}H_{12}O_4$
XF7	Khell	82-02-0	$C_{14}H_{12}O_5$
XF8	Resivit	480-17-1	$C_{15}H_{14}O_7$
XF9	玫瑰壬内酯 (Rosenonolactone)	508-71-4	$C_{20}H_{28}O_3$
XF10	Hyndarin	84-38-8	$C_{21}H_{25}NO_4$
XF11	Stigmasterol glucoside_qt	19716-26-8	$C_{35}H_{58}O_6$
XF12	Sugeonyl acetate	/	$C_{17}H_{24}O_3$
XF13	山奈酚 (Kaempferol)	520-18-3	$C_{15}H_{10}O_6$
XF14	Stigmasterol	83-48-7	$C_{29}H_{48}O$
XF15	木犀草素 (Luteolin)	491-70-3	$C_{15}H_{10}O_6$
XF16	槲皮素 (Quercetin)	73123-10-1	$C_{15}H_{10}O_7$

“/”指没有 CAS 号。

2. 非酒精性脂肪肝相关靶点获取

筛选得到 1,941 个 NAFLD 相关靶点。将醋香附有效成分的 471 个靶点与 1,941 个

NAFLD 疾病靶点取交集，获得 104 个交集靶点（见图 1）。

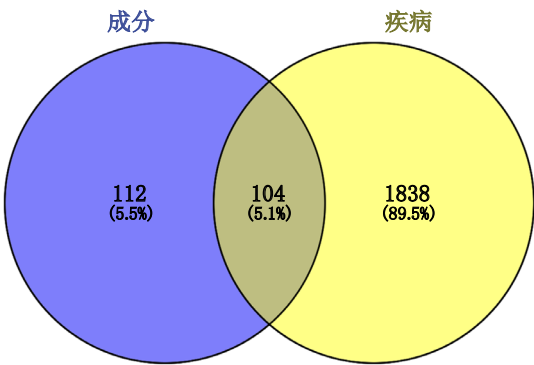


图 1 药物、疾病 VENN 图

3. “药物-成分-基因靶点”网络图的构建

将交集靶点导入 Cytoscape 3.7.0，构建“药物-成分-基因靶点”网络图（见图 2）。红色八边形代表药物-醋香附，橙色方形代表醋香附活性成分，蓝色球形代表 NAFLD 的相关基因。图形越大，表明其相关度越强，通过网络分析发现香附改善 NAFLD 的最主要活性成分是：槲皮素 (quercetin)、β-谷甾醇 (beta-sitosterol)、木犀草素 (luteolin)、山奈酚 (kaempferol)。

根据文献查阅得，香附醋制后，香附烯酮 (cyperotundone, CAS:3466-15-7) 含量增加，但圆柚酮和 α-香附酮 (alpha-cyperone, CAS:473-08-5) 含量降低。α-香附酮的含量虽降低，但《中国药典》将其作为香附的鉴别成分，其重要性不言而喻，且 α-香附酮、香附烯酮是香附疏肝理气功效的表征成分。故可将 α-香附酮、香附烯酮列入核心成分中。[16]

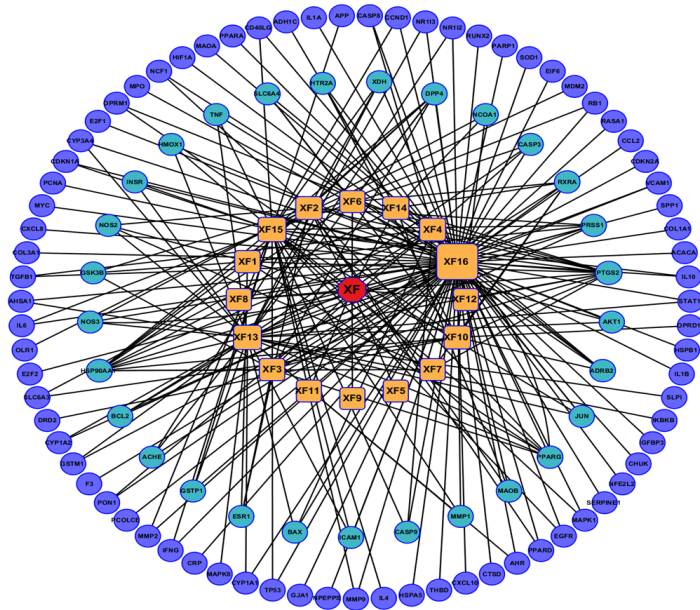


图 2 “药物-成分-基因靶点”网络图

4. 核心基因的筛选

将交集靶点导入 String 数据库，获得 PPI 关系图后，将其导入 Cytoscape 3.7.0 进行分析，

设定值为 betweenness = 67.3592233、closeness = 0.006055478、degree = 38.5631068 进行筛选，得到 30 个核心靶点（见图 3）。

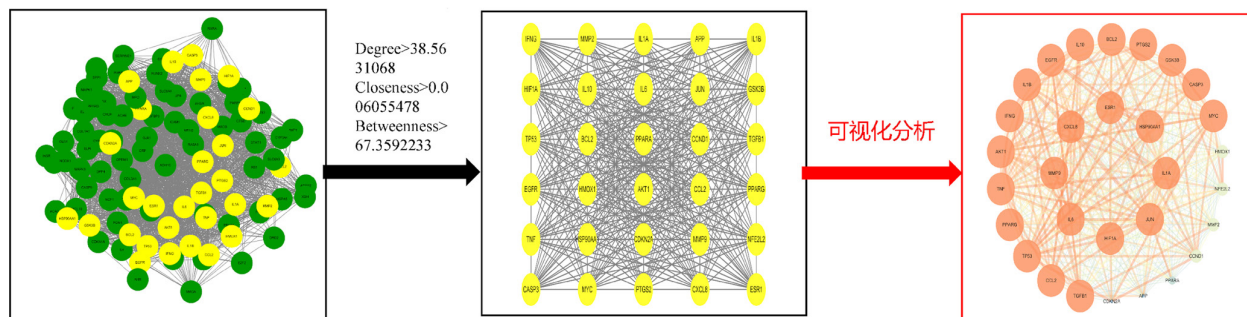


图 3 核心基因的筛选

5. PPI 网络的构建

利用结果中“4. 核心基因的筛选”项下得到的 30 个核心靶点基因构建 PPI 蛋白相互作用网络图 (见图 4)。节点大小表示靶点的度值, 生物功能越重要节点度数越大; 颜色由深到浅表示靶点的度值由大到小; 连接度越大, 靶点越关键。故关键靶点包括: AKT1、JUN、IL6、IL1B、TP53、EGFR 等。AKT1 能通过促进肝细胞血管内皮中生长因子的上调, 可释放出更多的抗压细胞因子于炎症环境下, 从而起到保护肝脏的作用。^[17] JUN 已证实能与 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP-homologous protein, CHOP) 协同上调 serpin 家族成员 1

(serpin family a member 1, SERPINA1), 使 SERPINA1 的 Z 等位基因编码突变加重, 从而引起肝脏的功能损伤。^[18] IL6 在肝炎病毒感染的环境下, 会增高自身水平, 促进肝内的炎症水平, 介导肝细胞损伤, 使肝脏炎症持续存在。^[19] 在高胆固醇血症的脂肪变性和肝纤维化中 IL1B 起到重要作用。^[20] TP53 不仅作为抑癌因子,^[21] 并在代谢性肝损伤模型中, 没有 TP53 会导致氧化反应的损害, 加重肝损伤, 体现 TP53 直接的依赖性保护肝细胞。^[22] EGFR 系统在急性与慢性肝病中都有着关键作用, 在应激或急性肝损伤时, EGFR 信号能阻止细胞凋亡和坏死。^[23]

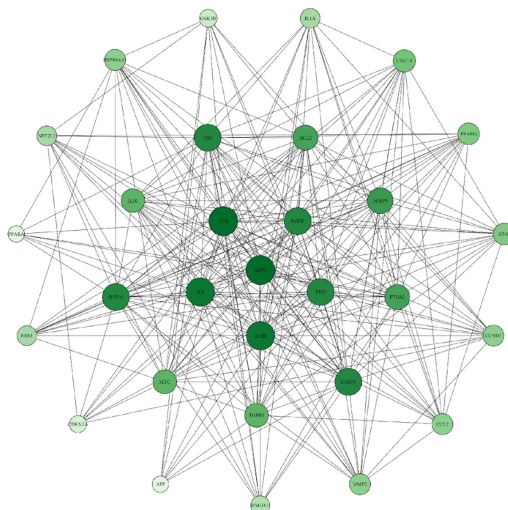


图 4 靶点蛋白的 PPI 网络

6. GO 功能富集和 KEGG 通路富集

GO 功能富集分析表明醋香附干预 NAFLD 主要涉及对基因表达的正向调控 (positive regulation of gene expression)、调节蛋白质复合物反应 (regulation of protein-containing complex)、对酶结合的反应 (response to enzyme binding) 等。KEGG 通路分析显示醋香附改善

NAFLD 与多条肝病相关代谢通路相关, 包括: 肿瘤坏死因子 (TNF signaling pathway)、促分裂素原活化蛋白激酶 (MAPK signaling pathway)、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt signaling pathway)、Toll样受体 (Toll-like receptor signaling pathway) 等信号通路 (见图 5)。

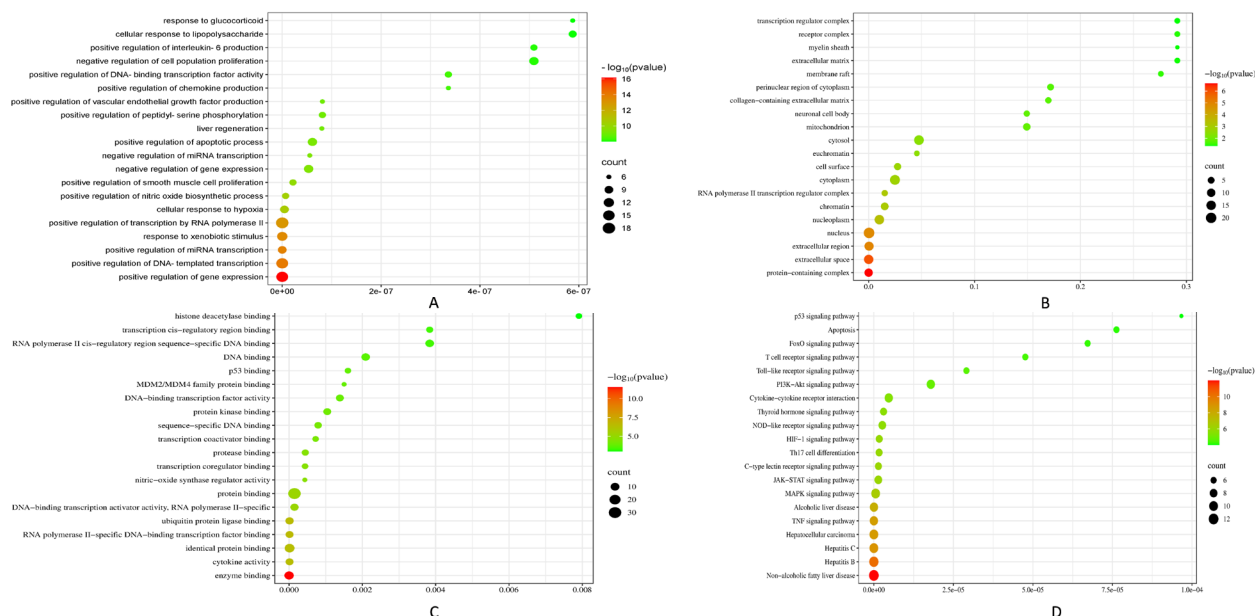


图 5 醋香附主要成分核心靶点的富集分析

(A: GO-BP分析; B: GO-CC分析; C: GO-MF分析; D: KEGG分析)

7. “成分-靶点-通路”网络的构建

运用 Cytoscape 3.7.0 构建“成分-靶点-通路”网络图 (见图 6)。由图可知, 红色圆形节点为醋香附, 黄色六边形节点为醋香附干预

NAFLD 的核心靶点, 绿色方形节点为醋香附干预 NAFLD 的核心信号通路, 图中节点面积越大表明其对 NAFLD 的影响越大。

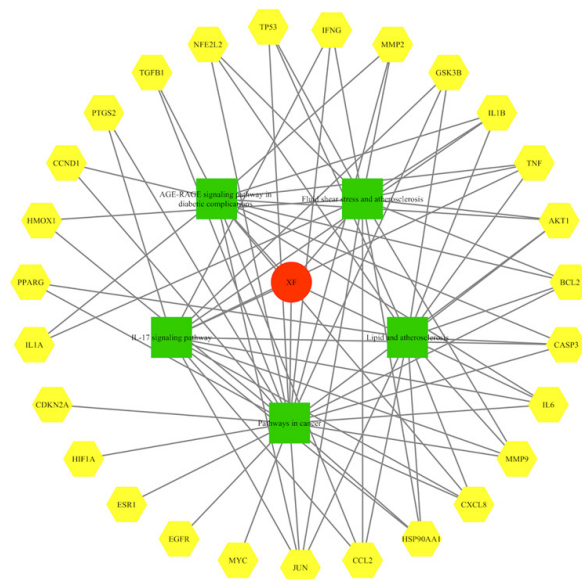


图 6 “成分-靶点-通路”网络图

8. 分子对接的验证实验

将核心成分与核心靶点进行分子对接, 选取化合物槲皮素 (quercetin)、 β -谷甾醇 (beta-sitosterol)、木犀草素 (luteolin)、山奈酚 (kaempferol)、 α -香附酮、香附烯酮及核心靶点

AKT1、JUN、IL6、IL1B、TP53、EGFR 进行分子对接。配体与受体间的结合能越低, 两者间发生作用的可能性越大, 结果显示, 所有成分与靶点的结合能都 < 0 kcal/mol, 表明上述成分与对应的靶点有很强的亲和力, 见表 2, 图 7。

表 2 核心成分与核心靶蛋白分子对接结果

靶点蛋白	成分	结合能
AKT1	α -香附酮	-5.29
JUN	香附烯酮	-4.22
IL6	α -香附酮	-4.99
IL1B	香附烯酮	-5.23
TP53	α -香附酮	-5.43
EGFR	香附烯酮	-5.89

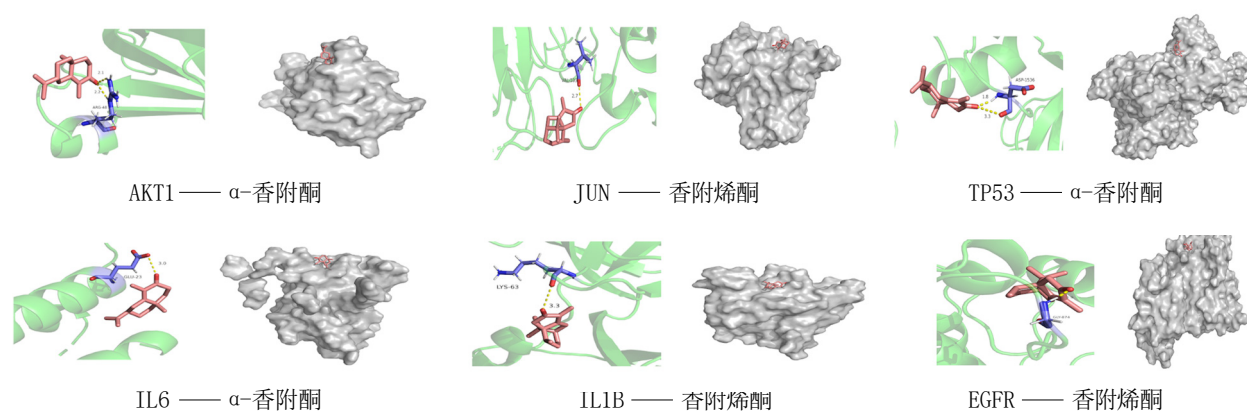


图 7 核心成分与核心靶蛋白分子对接模式图

讨论

本研究筛选得到了醋香附抗 NAFLD 的 6 个核心成分： α -香附酮、香附烯酮、槲皮素 (quercetin)、 β -谷甾醇 (beta-sitosterol)、木犀草素 (luteolin)、山奈酚 (kaempferol)。目前已有大量研究证明这 6 个成分与 NAFLD 的改善息息相关。张超等^[24]发现槲皮素可以调控 NAFLD 相关促炎因子的表达，来抑制炎症反应的发生；Ying HZ 等^[25]发现槲皮素可以通过抑制 NF- κ B p65/i NOS 的表达，减少血浆中 TNF- α 的表达，减轻 NAFLD 大鼠肝脏的炎症反应。Vidyashankar S 等^[26]证实了槲皮素能增强胰岛素信息转导通路中酪氨酸磷酸化，从而促进了胰岛素信号的转导，有利于胰岛素抵抗的改善。槲皮素还可通过调控脂质代谢相关基因的表达，从而减少肝脏脂质蓄积。^[24]周海玥等^[27]利用体外细胞模型，发现 β -谷甾醇可有效降低脂肪肝细胞内甘油三酯的含量，而降低 FFAS 的含量，减少肝脏中脂质的积累。Wang X 等^[28]实验研究证明，木犀草素能改善高脂饮食导致的小鼠体重增加以及肝脏质量的增加，同时木犀草素能

减少肝脏中脂质的异常积累，减轻 NAFLD 的产生；木犀草素能显著抑制由高脂饮食诱导的 SREBP1 和 PPAR- γ 这两种脂质代谢关键转录因子的表达。Yang XJ^[29]证明，山奈酚可下调蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 的磷酸化水平来促进分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞的脂肪分解；也可以下调 TNF 的表达来抑制 3T3L1 成熟脂肪细胞异丙肾上腺素和毛喉素刺激下的脂肪分解；同时也可以促进细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 的磷酸化来下调 3T3L1 成熟脂肪细胞内源 PPAR- γ 的表达。研究证明山奈酚可逆转由棕榈酸盐诱导的脂肪肝细胞中甘油三酯与总脂质的含量升高，明显降低脂肪干细胞的氧化应激标志物的含量，提高超氧化物歧化酶与谷胱甘肽过氧化物酶的活性，抑制肝细胞中的脂肪积累。^[30,31]但现代研究中关于 α -香附酮、香附烯酮抗非酒精性脂肪肝的研究较少。

本研究通过通过 KEGG 的通路富集分析，主要涉及有 TNF 信号通路、MAPK 信号通路、To11 样受体信号通路等。大量研究证明，这些

通路广泛参与肝脏多种疾病的发生发展。肝脏对外源物质进行代谢分解时会释放有毒物质,从而引发炎症、氧化应激或细胞凋亡。实验证明,长时间炎症与氧化应激是肝脏疾病发生、发展的重要诱因。氧化应激会促进巨噬细胞的活化及炎症因子的释放,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等,从而导致肝脏受损。^[32] 炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 是 NF- κ B 的激活剂,在这些炎症细胞因子的刺激下,可通过 PI3K-Akt 通路,引起 NF- κ B 激活,^[33] 从而进一步使 TNF- α 、IL-6 增加释放,使最初炎症信号更进一步扩大,造成恶性循环,^[34] 炎症反应不断加深。此外,TLR4 是重要的上游识别受体,可特异性识别病原体,并能通过 MyD88 途径激活 TLR4/NF- κ B 信号通路促进下游的 NF- κ B 转录,最后引起炎症因子。^[35] 此外,MYD88 和 TLR4 还均为“肠-肝轴”上的重要的活性蛋白提示后续研究可从“肠-肝轴”的角度探索醋香附改善 NAFLD 的机理。^[36] 此外,醋制作为中药炮制理论中的精华,醋制后香附成分发生改变,香附烯酮的含量增加,且经过药理实验验证,肝郁气滞模型大鼠给药生、醋香附后,各项指标均有改善,在同等药量下,醋香附组的各项指标优于生香附组。^[37] 本文中筛选的 6 个核心基因均被证实与肝脏疾病息息相关,符合醋制入肝增效的炮制理论。

结论

本研究基于网络药理学方法,挖掘并整合了醋香附 16 种活性成分的 471 个潜在作用靶点,其中与 NAFLD 相关的共同靶点共有 104 个。经生物信息学分析表明,醋香附可以通过调节 AKT1、JUN、IL6、IL1B 等核心靶点,进一步调控 TNF、MAPK、PI3K-Akt、Toll 样受体等多条“肠-肝轴”相关的信号通路,参与细胞损伤、氧化应激、免疫反应及炎症因子的释放,通过多个途径协同发挥改善 NAFLD 的作用,为进一步的药效机制等基础研究提供了生物信息学证据。

References

1. Li JX, Chen Q, Wang YL. Consensus opinion on integrated traditional Chinese and Western medicine diagnosis and treatment of non alcoholic fatty liver disease (2017). Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion. 2017;25(11):805-11. (in Chinese)
2. Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease Study Group of the Chinese Liver Disease Association. Guidelines for diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. Chinese Journal of Hepatology. 2006;14(3):161-3. (in Chinese)
3. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of liver diseases. Hepatology. 2018;67(1):328-57.
4. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander-Sharma B, Mostafa L, Bugianesi E, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2019; 69(6):2672-82.
5. Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease Study Group of the Chinese Liver Disease Association. Guidelines for diagnosis and treatment of non alcoholic fatty liver disease. Journal of Practical Hepatology. 2007;(1):1-3.
6. Chinese Association of Traditional Chinese Medicine Spleen and Stomach Diseases Branch. Guidelines for traditional Chinese medicine diagnosis and treatment of non alcoholic fatty liver disease, grassroots doctor edition. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases. 2019; 29(5):483-6. (in Chinese)
7. Wu DZ, Wang FQ (Editor). Modern famous traditional Chinese medicine treatment techniques for fatty liver. 2nd ed. Scientific

- and Technical Documentation Press; 2011. (in Chinese)
8. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (part 1). 11th ed. Beijing: China Medical Technology Press; 2020. (in Chinese)
9. Xu XM, Wang SQ. Application of Xiangfu in the treatment of coronary heart disease. Shanxi Journal of Traditional Chinese Medicine. 2012;28(10):41-2. (in Chinese)
10. Sheng FY, Zhou LJ, Yan X, Feng WW, Fu CM, Wang SX, et al. The effect of Xiangfu vinegar on liver Qi stagnation model rats before and after processing. Chinese Traditional Patent Medicine. 2016;38(1):156-9. (in Chinese)
11. Yang QH, Ling JS, Ping HH, Weng CY. Traditional Chinese medicine prevention and treatment strategies for nonalcoholic fatty liver. Journal of Traditional Chinese Medicine. 2007;48(8): 746-8. (in Chinese)
12. Mu J, Wang QG, Wang XQ, Cheng FF, Wang ZS, Zhu WX, et al. On the mechanism of liver depression and phlegm production in non-alcoholic fatty liver disease. Global Traditional Chinese Medicine. 2017;10(1):34-6. (in Chinese)
13. Editorial Committee of Chinese Medicine Dictionary. Dictionary of traditional Chinese pharmacy. 2nd ed. Beijing: People's Health Publishing House; 2006. (in Chinese)
14. Ji NP. Basic research on the effective extracts from vinegar cooked *Cyperus rotundus* L. for the efficacy of resolving liver-Qi [dissertation]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 2015. (in Chinese)
15. Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application. Chinese Journal of Natural Medicines. 2013;11(2):110-20.
16. Lu JR, Li WB, Wang SY, Fu CM, Zhou LJ, Yan X, et al. Contents comparison of cyperotundone, nootkatone and α -cyperone in Cyperi Rhizoma before and after vinegar processing. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae. 2014;20(20): 24-7. (in Chinese)
17. Zhou LK, Liu S, Wang Z, Yao JF, Cao WB, Chen SL, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells modified with Akt1 ameliorates acute liver GVHD. Biol Proced Online. 2019;21:24. (in Chinese)
18. Attanasio S, Ferriero R, Gernoux G, De Cegli R, Carissimo A, Nusco E, et al. CHOP and c-JUN up-regulate the mutant Z α 1-antitrypsin, exacerbating its aggregation and liver proteotoxicity. J Biol Chem. 2020;295(38): 13213-23.
19. Chen XR, Zhou YX, Xuan MX. Dynamic study of serum rrNF-d, IL-6 and IL-8 levels in patients with viral hepatitis. Chinese Journal of Infectious Diseases. 1999;17(2):115-7. (in Chinese)
20. Kamari Y, Shaish A, Vax E, Shemesh S, Kandel-Kfir M, Arbel Y, et al. Lack of interleukin-1 α or interleukin-1 β inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. J Hepatol. 2011; 55(5):1086-94.
21. Zhang Z, Guo M, Li Y, Shen M, Kong D, Shao J, et al. RNA-binding protein ZFP36/TTP protects against ferroptosis by regulating autophagy signaling pathway in hepatic stellate cells. Autophagy. 2020;16(8):1482-505.
22. Buitrago-Molina LE, Marhenke S, Becker D, Geffers R, Itzel T, Teufel A, et al. P53-in dependent induction of p21 fails to control regeneration and hepatocarcinogenesis in a murine liver injury model. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2021;11(5): 1387-404.

23. López-Luque J, Caballero-Díaz D, Martínez-Palacián A, Roncero C, Moreno-Càceres J, García-Bravo M, et al. Dissecting the role of epidermal growth factor receptor catalytic activity during liver regeneration and hepatocarcinogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2016;63(2):604-19.
24. Zhang C, Li CP. Current progress in mechanism of quercetin for treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology*. 2015; 26(5):718-21. (in Chinese)
25. Ying HZ, Liu YH, Yu B, Wang ZY, Zang JN, Yu CH. Dietary quercetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet in gerbils. *Food Chem Toxicol*. 2013;52:53-60.
26. Vidyashankar S, Sandeep-Varma R, Patki PS. Quercetin ameliorate insulin resistance and up-regulates cellular antioxidants during oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro*. 2013;27(2):945-53.
27. Zhou HY, Tang W, Jiang J, Song LH. Effect of β -sitosterol and stigmasterol on non-alcoholic fatty liver disease in vitro. *Acta Nutrimenta Sinica*. 2016;38(7):994-7. (in Chinese)
28. Wang X, Zhang L, Cai H, Bao B. Effect of luteolin on the alleviation of high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of Hefei University of Technology (Natural Science)*. 2016;39(7): 994-7. (in Chinese)
29. Yang XJ. Effects of flavonoid from seed of *Hippophae rhamnoides* L. on lipid metabolism and its mechanism [dissertation]. Shanghai: East China Normal University; 2016. (in Chinese)
30. Zhao L, Yang L, Ahmad K. Kaempferol ameliorates palmitate-induced lipid accumulation in HepG2 cells through activation of the Nrf2 signaling pathway. *Hum Exp Toxicol*. 2023; 42:9603271221146780.
31. You YH, Zhou MY, Hu JC, Zhu Z, Xu J. Research progress of kaempferol against liver diseases. *China Medical Herald*. 2024;21(6):58-61. (in Chinese)
32. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26087-124.
33. Venkatesan B, Valente AJ, Prabhu SD, Shanmugam P, Delafontaine P, Chandrasekar B. EMMPRIN activates multiple transcription factors in cardiomyocytes, and induces interleukin-18 expression via Rac1-dependent PI3K/Akt/IKK/NF-kappaB and MKK7/JNK/AP-1 signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49(4):655-63.
34. Han R, Zhang F, Wan C, Liu L, Zhong Q, Ding W. Effect of perfluorooctane sulphonate-induced Kupffer cell activation on hepatocyte proliferation through the NF- κ B/TNF- α /IL-6-dependent pathway. *Chemosphere*. 2018;200:283-97.
35. Yang QY, Ma LL, Zhang C, Lin JZ, Han L, He YN, et al. Exploring the mechanism of indigo naturalis in the treatment of ulcerative colitis based on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway and gut microbiota. *Front Pharmacol*. 2021;12:674416.
36. Sun J. Structural analysis of polysaccharides from *Atractylodes Rhizoma* and its protective mechanism on alcoholic bowel-liver tissue diseases [dissertation]. Changchun: Changchun University of Traditional Chinese Medicine; 2024. (in Chinese)
37. Sheng FY, Zhou LJ, Yan X, Feng WW, Fu CM, Wang SY, et al. Effects of *Cyperus rotundus* before and after vinegar processing on liver-Qi stagnation model rats. *Chinese Traditional Patent Medicine*. 2016;38(1):156-9. (in Chinese)

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวิเคราะห์เภสัชวิทยาเครือข่ายของกลไกการฟื้นฟูโรคไขมันพอกตับชนิดที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์โดยใช้ยาสมุนไพรจีนผ่านการแปรรูปยาโดยใช้น้ำส้มสายชูเพื่อนำยาเข้าสู่ตับ

หลิว เยว่ฮาน¹, ชิง อิ่ง², เลี้ยว หว่าน², เกา เทียนฮุย¹

¹ มหาวิทยาลัยการแพทยศาสตร์ฉีหลู่ วิทยาลัยเภสัชศาสตร์

² ห้องปฏิบัติการแห่งชาติด้านทรัพยากรยาสมุนไพรจีนที่มีเอกลักษณ์ของภูมิภาคตะวันตกเฉียงใต้ วิทยาลัยเภสัชศาสตร์ สถาบันอุตสาหกรรมยาจีนสมัยใหม่ในสังกัด มหาวิทยาลัยการแพทย์แผนจีนเจียงตู

บทคัดย่อ: เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยาสมุนไพรจีนผ่านการแปรรูปยาโดยใช้น้ำส้มสายชูเพื่อนำยาเข้าสู่ตับ งานวิจัยนี้ได้นำวิธีการเภสัชวิทยาเครือข่าย (network pharmacology) เพื่อวิเคราะห์กลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรจีนผ่านการแปรรูปยาโดยใช้น้ำส้มสายชูในการปรับปรุงภาวะไขมันพอกตับชนิดที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ (NAFLD) ผู้วิจัยได้รวบรวมวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา และจากฐานข้อมูล TCMSP (traditional Chinese medicine systems pharmacology database) ได้ระบุสารออกฤทธิ์จำนวน 16 ชนิด และเป้าหมายทางชีวภาพ 471 เป้าหมาย จากนั้นใช้ฐานข้อมูล GeneCards, OMIM และ DrugBank คัดกรองยีนที่เป็นเป้าหมายสำหรับโรคไขมันพอกตับชนิดที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์จำนวน 1,941 ยีน ซึ่งในจำนวนนี้พบว่ามียีนเป้าหมายที่เป็นจุดร่วมระหว่างยาและโรคจำนวน 104 ยีน พร้อมทั้งสร้างเครือข่าย “ยา-สารออกฤทธิ์-ยีนเป้าหมาย” และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction หรือ PPI network) โดยใช้ซอฟต์แวร์ Cytoscape รุ่น 3.10.0 การศึกษายังระบุสารออกฤทธิ์หลักของยาสมุนไพรจีนผ่านการแปรรูปยาโดยใช้น้ำส้มสายชู ซึ่งเกี่ยวข้องกับ NAFLD ได้แก่ honeysuckle alcohol, isorhamnetin, kaempferol และสารอื่นๆ เป้าหมายที่ได้จากการวิเคราะห์ถูกนำเข้าฐานข้อมูล String เพื่อวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน พร้อมทั้งสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และระบุเป้าหมายหลัก ได้แก่ AKT1, JUN, IL6 และ IL1B จากผลการวิเคราะห์การเพิ่มคุณสมบัติทางชีวภาพ (GO functional enrichment analysis) และเส้นทางสัญญาณ (KEGG pathway analysis) ของสมุนไพรจีนผ่านการแปรรูปยาโดยใช้น้ำส้มสายชูในการปรับปรุงภาวะไขมันพอกตับชนิดที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ มีความเกี่ยวข้องกับหลายเส้นทางเมแทบอลิซึมในตับ เช่น TNF signaling pathway, MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway และ Toll-like receptor signaling pathway การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสมุนไพรจีนผ่านการแปรรูปยาโดยใช้น้ำส้มสายชูอาจส่งผลต่อยีนเป้าหมายสำคัญ เช่น AKT1, JUN, IL6 และ IL1B ผ่านสารออกฤทธิ์ เช่น honeysuckle alcohol, isorhamnetin และ kaempferol โดยการควบคุมเส้นทางสัญญาณ TNF, MAPK, PI3K-Akt และ Toll-like receptor เพื่อช่วยปรับปรุงภาวะ NAFLD

คำสำคัญ: เชียงฝู; การแปรรูปยาโดยใช้น้ำส้มสายชูเพื่อนำยาเข้าสู่ตับ; โรคไขมันพอกตับชนิดที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์; เภสัชวิทยาเครือข่าย; กลไกการออกฤทธิ์

ผู้รับผิดชอบบทความ: เลี้ยว หว่าน: liaowan@cdutcm.edu.cn

เกา เทียนฮุย: gaotianhui@qlmu.edu.cn



Original Article

Network pharmacology study on the improvement of non-alcoholic fatty liver disease by using *Cyperi Rhizoma* after vinegar processed leading into liver

Liu Yuehan¹, Qing Ying², Liao Wan², Gao Tianhui¹

¹ Department of Medicine, Qilu Medical University, China

² State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy/College of Modern Chinese Medicine Industry, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, China

Abstract: Aim to investigate the effect of vinegar processed *Cyperus rotundus* on enhancing the efficacy of drugs in the liver, this study used network pharmacology methods to explore the mechanism of vinegar processed *Cyperus rotundus* on improving non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The author has compiled relevant literature from both domestic and international sources over the past 10 years, and based on the TCMSP database, identified 16 active ingredients and 471 related targets in vinegar processed *Cyperus rotundus*. Obtain 1,941 target genes for NAFLD using GeneCards, OMIM, and Drug Bank databases, among them, there are 104 common targets for drugs and diseases. Construct a "drug-ingredient-gene target" network and a PPI network using Cytoscape 3.10.0 software. Obtaining honeysuckle alcohol, isorhamnetin, kaempferol, and other active ingredients as the main active ingredients in the production of vinegar processed *Cyperus rotundus* in NAFLD. Importing potential targets into the String database for protein interaction analysis, constructing a protein-protein interaction (PPI) network, and identifying AKT1, JUN, IL6, IL1B, and other key target genes through analysis. Perform GO functional enrichment analysis and KEGG pathway analysis on the target of action, The enrichment results showed that vinegar processed *Cyperus rotundus* improved NAFLD and was associated with multiple liver related metabolic pathways, including TNF signaling pathway, MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, and Toll-like receptor signaling pathway. The study shows that vinegar processed *Cyperus rotundus* may act on core targets such as AKT1, JUN, IL6, and IL1B through active ingredients such as honeysuckle alcohol, isorhamnetin and kaempferol, regulating signaling pathways such as TNF, MAPK, PI3K-Akt signaling to improve NAFLD.

Keywords: *Cyperi Rhizoma*; vinegar-processing Chinese medicine leading into liver; non alcoholic fatty liver disease; network pharmacology; mechanism

Correspongding author: Liao Wan: liaowan@cdutcm.edu.cn

Gao Tianhui: gaotianhui@qlmu.edu.cn