

数据挖掘并验证人参总皂苷改善酒精性肝炎的机制

陈书灵, 刘逸韬, 吴晓, 张朵, 艾金慧, 袁桃花*, 孙见飞*

(贵州医科大学 基础医学国家级实验教学示范中心, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:通过数据分析和实验验证探究人参总皂苷改善酒精性肝炎(AH)的新靶点和中药,为AH的临床治疗提供新方向。方法:该研究前期从GEO数据库筛选GSE28619作为分析对象,选择GSE83148和GSE103580作为验证集。基于limma包和加权基因共表达网络分析方法(WGCNA)识别AH相关差异基因和模块基因;通过“Venny”软件取交集基因。构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,并进行富集分析,再进一步筛选核心基因评估其诊断价值。经过数据集验证后,综合分析出AH新潜在靶点并预测中药。对靶点和中药有效成分进行分子对接,并通过实验验证。将48只SD大鼠随机分出8只为空白组,剩下进行乙醇灌胃造模成功后随机均分为人参总皂苷低($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组、模型组和美他多辛组($117\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),空白组以等量生理盐水灌胃。灌胃3周后取血清测定血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平;取肝组织进行苏木素-伊红(HE)染色、蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肝组织潜在靶点蛋白和基因表达水平。结果:数据分析预测出潜在的原癌基因(FOS)、I型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链基因(COL1A2),实验验证显示给药后肝脏损伤程度均较造模后减轻;血清AST、ALT水平在给药后降低;Western blot和Real-time PCR结果显示给药后FOS蛋白和基因表达水平均明显增高,COL1A2则相反。结论:人参总皂苷能通过FOS和COL1A2改善AH。

[关键词] 生物信息学;酒精性肝炎;关键基因;中药预测;人参总皂苷

[中图分类号] R284;R285;R289;R287;R22;R2-031;R33;R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)21-0095-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20240713 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240412.1606.003>

[网络出版日期] 2024-04-15 16:33:50

Data Mining and Experimental Validation of Total Ginsenosides Ameliorating Alcoholic Hepatitis

CHEN Shuling, LIU Yitao, WU Xiao, ZHANG Duo, AI Jinhui, YUAN Taohua*, SUN Jianfei*

(National Experimental Teaching Demonstration Center of Basic Medicine, Guizhou Medical University,
Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore new targets and herbal medicines of total ginsenosides in ameliorating alcoholic hepatitis (AH) by data mining and experimental validation and to provide new directions for the clinical treatment of AH. **Method:** GSE28619 was selected as the test set from the GEO database and GSE83148 and GSE103580 were selected as the validation sets. The limma package and weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) were employed to identify the AH-related differentially expressed genes and modular genes, and Venny was used to extract the common genes. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed and the enrichment analysis was carried out. The hub genes were further screened and

[收稿日期] 2024-02-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82260829);贵州医科大学大学生创新创业训练项目(S202210660102)

[第一作者] 陈书灵,从事酒精性肝炎的分子机制研究,E-mail:1695326598@qq.com

[通信作者] *袁桃花,硕士,实验师,从事药用植物防病抗病机制的研究,E-mail:1841307634@qq.com;

*孙见飞,硕士,高级实验师,从事药用植物防病抗病机制的研究,E-mail:553164552@qq.com

evaluated for their diagnostic value. After validation with the datasets, new potential targets of AH and traditional Chinese medicine were predicted. Molecular docking between the targets and active ingredients of traditional Chinese medicine was performed, and the results were validated by experiments. Eight out of 48 SD rats were randomly selected into a blank group and received an equal amount of normal saline. The rest rats were subjected to modeling with ethanol by gavage and then randomized into low- ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium- ($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high-dose ($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) total ginsenosides, model, and positive control (metadoxine, $117\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups. After 3 weeks of gavage, serum samples were collected for the measurement of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels, and liver samples were collected for hematoxylin-eosin (HE) staining. Western blot and Real-time PCR were employed to determine the protein and mRNA levels, respectively, of potential targets in the liver tissue. **Result:** Data mining predicted the potential genes: Proto-oncogene FOS and collagen type I alpha 2 (COL1A2). Experimental validation showed that the liver injury was alleviated after drug administration compared with that after modeling. The serum AST and ALT levels were reduced after drug administration. The protein and mRNA levels of FOS were significantly up-regulated, while those of COL1A2 were down-regulated after drug administration. **Conclusion:** Total ginsenosides ameliorate HA via FOS and COL1A2.

[Keywords] bioinformatics; alcoholic hepatitis; hub genes; prediction of traditional Chinese medicine; total ginsenosides

随着社会的发展,饮酒的人数正逐年增长,患有酒精性肝病患者的发病率呈明显上升趋势^[1]。酒精性肝炎(AH)可以由酒精性脂肪性肝炎(ASH)发展而来,表现为患者长期摄入过量乙醇而引起大量肝细胞坏死所导致的急性炎症性肝病^[2-3],其发病率和死亡率较高,临床预后较差^[4]。多见于女性饮酒 $\geq 40\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,男性饮酒 $\geq 50\sim 60\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,饮酒至少超过6个月,黄疸发生前戒酒 $<60\text{ d}$ ^[5]。以血清胆红素超过正常上限3倍, $50\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}<$ 天冬氨酸氨基转移酶(AST) $<400\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和AST/丙氨酸氨基转移酶(ALT) >1.5 为特征^[6]。过量饮酒可能引起肝细胞产生脂肪变性,进而发展为AH,最终导致不可逆的肝硬化和肝癌^[7-8]。AH是酒精性肝病的一种严重综合征,其特征包括快速发作的黄疸、不适、肝肿大触痛及全身炎症反应等临床表现。因此在酒精性肝病发展为最终阶段之前,减轻或逆转肝脏损伤进而阻断其永久性病变显得尤为重要。目前的治疗药物,在治疗AH的同时也带来了许多不良反应^[9]。中药具有多靶点、低不良反应等优势,符合AH期望的药物开发方向。本研究旨在通过生物信息学和机器学习等数据分析方法,寻找治疗AH的新靶点,预测具有潜在治疗价值的中药,并进行实验验证。

人参是我国传统名贵药材,药用价值极高且作用广泛^[10],味甘、微苦,性微温,有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智等功效^[11],中医常用其治疗体虚欲脱,肢冷脉微,脾虚食少,肺虚喘

咳,津伤口渴,内热消渴,气血亏虚,久病虚羸,惊悸失眠,阳痿宫冷^[12]。而人参皂苷是人参最主要的活性成分^[13],包括人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rc等超过150种单体活性成分^[14],一些研究表明部分人参皂苷有调控糖脂代谢、保护神经系统、抗衰老等功能^[15-16]。已有研究证实人参皂苷能减轻酒精性肝病损伤^[17-18],但具体机制尚不完全明确。

基于AH的现有研究和临床特点,本研究通过生物信息学、机器学习及分子对接等方法预测出潜在靶点和相关中药,选择人参总皂苷并通过体内实验初步探究潜在靶点对AH的调控意义。技术路线见增强出版附加材料。

1 材料

1.1 动物 48只8周龄SPF级SD大鼠,雌雄各半,体质量(200 ± 20)g,贵州医科大学实验动物中心提供,合格证号SYXK(湘)2022-0011。本研究符合动物实验伦理学要求,获得贵州医科大学伦理委员会批准(编号2200391)。

1.2 药品 人参总皂苷(西安汇林公司,货号HL-RSZZG,纯度约为80%),美他多辛(浙江震元制药有限公司,货号200401),红星二锅头(北京红星股份有限公司,货号20211209006)。

1.3 试剂 原癌基因(FOS)抗体、I型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链基因(COL1A2)抗体、AST酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒、ALT ELISA试剂盒(美国Abcam公司,货号分别为ab289723、ab96723、ab263883、

ab234579); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(泰州佰嘉生物科技有限公司,货号IDS0027);山羊抗兔IgG抗体(巴沃德生物科技有限公司,货号BS13278);ChamQ Universal SYBR qPCR MasterMix、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)、RNA isolater Total RNA Extraction Reagent、BCA Protein Quantification Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号分别为Q711-02、R312-01、R401-01、E112-02);Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(gDNA digester plus)[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,货号11141ES10];高效RIPA组织-细胞快速裂解液、蛋白酶抑制剂(PMSF)、Marker、PVDF膜(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为R0010、P0100、PR1910、IPVH00010);异丙醇(上海麦克林生化科技股份有限公司,货号I811925-500 mL);SuperKine™超敏型ECL发光液(飞克级)(亚科因生物技术有限公司,货号BMU102-CN-100)。

1.4 仪器 BG-Power600型电泳仪、BG-verMINI型垂直电泳槽、BG-verBLOT型转印电泳槽(百晶生物);800TS型酶标仪(美国BioTek公司);ABI StepOnePlus™型冷冻离心机、ABI StepOnePlus™型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Thermo Fisher公司);Quantity One凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 生物信息学分析

2.1.1 数据的获取与处理 在GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中以“alcoholic hepatitis”为关键词进行检索,设置“series”“Expression profiling by array”“Homo Sapiens”3个条件,得到GSE28619、GSE83148、GSE1035803个数据集。以GSE28619为测试集,用R软件的“SVA”包对GSE83148、GSE103580数据集进行整合,并取“Human_normal_sample_Healthy”和“Mild_acute_alcoholic_hepatitis_”样本作为验证组。数据库检索时间为2022年4月25日至2023年9月24日。

2.1.2 差异表达基因(DEGs)筛选 使用R软件的“limma”包筛选GSE28619数据集中的差异基因,设置筛选条件为 $|\log_2FC|>1$ 、 $P<0.05$,筛选出差异基因,并绘制火山图、相关性热图。

2.1.3 加权基因共表达网络分析(WGCNA)和关键模块识别 使用R软件的“WGCNA”包对GSE28619数据集进行加权基因共表达网络分析,

以“geneSig Filter=0.5、moduleSig filter=0.8”作为筛选条件,选择相关系数最高、 $P<0.01$ 的模块中的基因,利用Venny软件(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)与“limma”包筛选的差异基因取交集基因纳入后续分析。

2.1.4 核心蛋白的筛选 将交集基因导入STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>)中,构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,深入挖掘交集基因之间的潜在相互作用关系。随后导入Cytoscape 3.10.1软件以置信度0.4为筛选标准,删除游离节点后进行可视化展示。通过CytoHabba插件进行网络拓扑计算,以“degree”为筛选标准选择排名前20的基因作为核心基因进一步分析。

2.1.5 AH相关富集分析 用R软件的“clusterProfiler”“org.Hs.eg.db”包对20个核心基因进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,从细胞组分(CC)、分子功能(MF)、生物过程(BP)等角度分析相关信号通路及通路与靶点间相互作用关系。

2.1.6 机器学习和生存分析筛选候选基因 构建LASSO回归模型进行特征选择,绘制交叉验证模型并找到交叉验证误差最小的点,保存该点的LASSO回归候选基因。构建随机森林模型(RF),挑选重要性评分 >2 的基因作为随机森林算法候选基因。将LASSO回归候选基因与随机森林算法候选基因取交集,以获得AH候选基因,并绘制ROC曲线评估AH候选基因的诊断价值。最后在验证集中选取AH候选基因进行生存分析来评估结果。

2.1.7 相关中药的预测 基于Coremine Medical数据库(<https://www.coremine.com/>)预测调控AH候选基因的潜在中药,以 $P<0.05$ 进行结果过滤,将潜在中药导入Cytoscape 3.10.1软件中进行可视化,最后选取治疗潜力最高的中药进行后续实验。

2.1.8 分子对接 将AH候选基因与治疗潜力最高的中药的主要活性成分进行分子对接,结合能 $<-5.0\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($1\text{ cal}\approx 4.186\text{ J}$)时表明对接结果良好,结合能越低说明结合能力越好。通过文献[12]查找潜在中药的主要成分。从PubChem数据库中下载其活性成分的2D结构,以获取其化学结构信息。使用Chembio 3D软件将下载的2D结构转化为3D结构,再用AutoDock Tools 1.5.6软件转化为pdbqt格式存储。在PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)中下载大分子蛋白结构,将其导入PyMOL软件去除蛋白的水和配体分子。利用AutoDock

Tools 1.5.6 软件加氢并转化为 pdbqt 格式文件。用 Vina 和 AutoDock Tools 1.5.6 软件进行分析和导出, 分析结果通过 PyMOL 软件进行可视化处理。

2.2 体内实验验证

2.2.1 建立 AH 模型和分组给药 将 48 只清洁级 SD 大鼠进行 12 h 黑暗光照周期, 适应性喂养 1 周, 随机数法分成实验组 40 只和空白组 8 只。AH 模型的建立参考前人研究^[19-20]并在此基础上进行改进, 实验组给予普通饲料喂养并每日按体质量用 40% 乙醇(10 mL·kg⁻¹)灌胃 6 周, 空白组给予普通饲料喂养并每日按体质量用生理盐水(10 mL·kg⁻¹)灌胃 6 周。实验期间大鼠自由摄取食物和水, 体质量每 3 d 记录 1 次, 期间观察实验组大鼠的是否出现 AH 相关的一系列表现, 如易被激怒、饮食减少、消瘦、精神差等症状, 以判断造模进程, 于 6 周后进行成模检验。成模的标准参考相关文献^[21-23], 多篇文献说明包括 AH 在内的酒精性肝病多为排除性诊断, 临床无特异性诊断标准, 故 AH 大鼠成模无特异性成模指标, 最后本项目组综合各方面因素选择较为简易测量且特异性相对较强的血清学指标 AST、ALT 作为成模的主要标准, 辅以肝脏切片、肝脏系数、症状、行为学改变等方面作为次要标准。本项目组认为, 在造模 6 周后随机挑选大鼠进行尾静脉取血、肝脏病理临时切片和肝脏系数, 同时观察大鼠状态和行为学变化, 若结果显示 AH 造模大鼠血清 AST 和 ALT 增高具有统计学意义, 且 AST 增高幅度较大; 肝切片镜下可见乙醇灌胃后的大鼠肝脏损伤情况与空白组有明显差异, 且肝脏系数增高具有统计学差异; 造模后的大鼠易怒消瘦、毛发枯黄、饮食减少、精神萎靡等症状均提示造模成功。确认造模成功后将实验组大鼠随机分成人参总皂苷低、中、高剂量组、美他多辛组, 并进入给药阶段。

通过查阅资料^[24]得知: 大鼠用药等效剂量为人类的 7 倍, 误差允许达 0.5~1 倍。而实际临床用口服药量为 150~225 mg[以丹东医创的人参茎叶总皂苷片为例, 执行标准 WS-10001-(HD-1221)-2002, 国药准字 H21023720], 按成人 60 kg 体质量换算大鼠等效剂量 17.5~26.25 mg·kg⁻¹, 然后设置预实验, 最终以 10、20、40 mg·kg⁻¹ 效果最佳, 分别确定为人参总皂苷低、中、高剂量组。同法根据美他多辛的临床推荐用量每人每天 1 000 mg 设置美他多辛组剂量 117 mg·kg⁻¹ 并通过预实验验证效果后确认剂量^[25]。

2.2.2 ELISA 检测大鼠血清中 AST、ALT 水平 末次给药后大鼠禁饮食 12 h, 麻醉后普通负压管腹主

动脉取血, 4 ℃, 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 10 cm), 保存在-80 ℃中用于后续分析。AST 和 ALT 按照 ELISA 试剂盒说明书流程进行测定。

2.2.3 HE 切片和肝脏系数 收集肝脏和血清样本。将各组肝脏标本按病理检验标准作业程序(SOP)程序进行脱水、修剪、包埋、切片、染色、封片等处理, 交由成都里来医学实验中心进行镜检。选择要观察的区域采集 400 倍图片, 观察具体病变并采用四级病变分级法对病变进行分级记录, 即正常(-)、轻微(+)、轻度(++)、中度(+++)、重度(++++)。计算肝脏系数(%)=肝脏湿重(g)/体质量(g)×100%。

2.2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肝组织中的 FOS、COL1A2 蛋白水平 将不同组别的大鼠肝脏进行生理盐水冲洗, 再各取组织 300 mg 剪碎, 加入 RIPA 裂解液和 PMSF 提取细胞总蛋白, 放于-40 ℃保存, 随用随取。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 一抗(FOS 抗体 1:1 000; COL1A2 抗体 1:1 000) 4 ℃孵育过夜, 1×TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 辣根过氧化酶标记的二抗(1:10 000)室温孵育 2 h, 1×TBST 漂洗 3 次后, ECL 显影。最后蛋白条带灰度值使用 Image J 软件进行分析, 以 β-actin 作为内参基因计算各组蛋白的相对表达水平。

2.2.5 Real-time PCR 检测大鼠肝组织中的 FOS、COL1A2 基因表达水平 取处理好的细胞, 按照 TRIzol 提取说明书收集细胞总 RNA, 测定其浓度和纯度后保存于-80 ℃, 随取随用。每组设置 3 个复孔, 设置循环反应条件为 95 ℃预反应 30 s; 95 ℃反应 10 s; 60 ℃退火 30 s, 共 40 个循环。选取甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因。运用 2^{-ΔΔC_t} 的方法进行数据统计。引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 GAAGCTGGTCATCAACGGGA	136
	下游 GGCGGAGATGATGACCCCTTT	
FOS	上游 AAGGGGCAAAGTAGAGCAGC	119
	下游 GCGTATCTGTCTCAGCTCCCTC	
COL1A2	上游 ACTGTCCTTGTCGATGGCTG	124
	下游 TACCACCGATGTCCAGAGGT	

2.2.6 统计学分析 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 25.0 统计软件进行完全随机设计的单因素方差分析(One-way ANOVA), 各样本均数之间的多重

比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验, $P<0.05$ 说明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 差异基因鉴定 用“limma”筛选出GSE28619数据集的差异基因共有1 070个,其中上调基因503个,下调基因567个,见增强出版附加材料。

3.2 AH关键基因的鉴别 基于WGCNA方法,利用“pickSoftThreshold”计算软阈值,在 $R^2=0.93$ 条件下,选择最佳软阈值 β 为4进行无尺度网络的构建。动态树切割可以识别模块,模块中的基因表达值具有相似性。高度相似的模块被合并,一共有21个共表达模块被鉴定,每个模块以1种颜色作为标记,而模块“灰色”保留的为没有共表达的基因。在模块-特征关系图中最大的turquoise模块有1 508个枢纽基因,其相关系数最大($\text{cor}=0.99$)、 $P<0.01$ 。将枢纽基因与差异基因取交集获得570个交集基因。见增强出版附加材料。

3.3 构建AH相关PPI网络图 将交集基因导入STRING数据库中,删除游离节点,构建PPI网络,并在Cytoscape 3.10.1中进行可视化。同时输出排名前20的核心靶点基因纳入后续分析,分别是FOS、COL1A1、COL1A2、基质金属蛋白酶抑制剂1(TIMP1)、膜联蛋白A2(ANXA2)、巨噬细胞源性骨桥蛋白(SPP1)、基膜聚糖(LUM)、ANXA5、COL3A1、沉寂信息调节因子1(SIRT1)、性别决定区Y框蛋白9(SOX-9)、血小板反应蛋白2(THBS2)、COL4A2、硫氧还蛋白(TXN)、半乳糖凝集素3(LGALS3)、柠檬酸合酶(CS)、COL4A1、基质金属蛋白酶(MMP)-7、谷胱甘肽过氧化物酶2(GPX2)、趋化因子(C-X-C基序)配体1(CXCL1)。

3.4 对AH相关基因进行富集分析 将570个交集基因导入R软件中进行GO和KEGG富集分析,共富集到750个GO条目,包含595个生物学过程(BP)、49个细胞组分(CC)和106个生物学功能(MF)。展示每个项目中前10条被显著富集到的GO条目。在BP中,基因被显著富集到对肽类激素的反应(23个基因)、胶原纤维组织(9个基因);在CC中,基因显著富集到含胶原蛋白的细胞外基质(29个基因)、胶原蛋白三聚体复合物(8个基因)、纤维状胶原蛋白三聚体(6个基因)、带状胶原纤维(6个基因);在MF当中,差异基因显著富集到血小板衍生生长因子结合(6个基因)和细胞外基质结构成分(16个基因)。这些富集条目与激素的作用和胶原纤维成分紧密相关,说明AH发展过程受到这

些生物学进程的调控。

KEGG分析结果显示,共46条信号通路被显著富集,将前20个显著富集的通路进行可视化。发现其中有一些通路已有文献报道参与肝脏疾病的调控,包含TNF信号通路、IL-17信号传导途径、色氨酸代谢等。见增强出版附加材料。

3.5 通过机器学习鉴定候选枢纽基因并评估诊断价值 运用LASSO回归分析对核心靶点基因进行交叉验证,确定误差最小的点,对应的6个基因分别为FOS、ANXA2、COL1A2、SIRT1、性别决定区Y框蛋白9(SOX9)、GPX2。通过RF算法挑选重要性评分 >2 的基因,输出结果为FOS、COL1A2。因此FOS和COL1A2即为2种算法共同挑选的候选基因。

对候选基因进行生存分析,绘制受试者工作特征曲线(ROC曲线),曲线下面积(AUC)分别为0.986、0.976。用GSE83148、GSE103580合并后的数据集作为验证集进行验证,AUC分别为0.962、0.769,均 >0.7 ,证明候选基因具有较高诊断价值。见增强出版附加材料。

3.6 根据候选基因预测中药 将FOS、COL1A2导入Coremine Medical数据库,设置 $P<0.05$ 进行潜在中药预测,最终获得了包括鹿角、人参花、人参芦、人参叶、人参、荔枝草、菟丝子、丹参、补骨脂、三七叶在内的10种中药,其预测结果多为人参及其附属产品,查阅文献得知人参总皂苷是人参的主要活性成分,而由于人参单体提取的复杂性,大多数人参提取物只能得到总皂苷^[26]。已有研究表明多种人参皂苷成分能作用于乙醇相关肝脏疾病和其他肝脏疾病,但研究较少且不深入。鉴于这一背景,本项目组选择人参总皂苷作为初步探究的药物,并进行后续的动物实验研究。

3.7 分子对接结果 根据相关文献[12]的信息,人参总皂苷主要包含7个特征性成分Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁。每个成分对于FOS(PDB ID:1A02)和COL1A2(PDB ID:5CTD)蛋白均对接良好(结合能 $<-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$),结果见增强出版附加材料。对结果进行可视化,分子对接结果显示人参皂苷抗AH作用可能主要与人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁调控胞内FOS和COL1A2蛋白水平有关。

3.8 血清AST、ALT水平 AST、ALT是肝细胞中十分重要的酶,正常情况下仅少量存在于血清中,当肝细胞受损时,细胞膜通透性改变会导致AST和ALT大量释放入血,因此可以灵敏反应肝细胞状

态^[27]。大鼠血清AST、ALT水平见表2所示,与空白组比较,模型组血清AST、ALT水平显著增高($P<0.01$),以AST水平升高为主,提示乙醇对肝脏造成了明显损害;与模型组比较,人参总皂苷各剂量组AST、ALT水平降低,以中、低剂量组效果最为明显($P<0.05$, $P<0.01$),表明人参总皂苷具有改善AH引起的肝损伤的潜力。

3.9 人参总皂苷对AH大鼠肝损伤打分和肝脏系数的影响 在400倍镜下观察到的肝组织病理损伤情况显示,人参总皂苷低剂量组(++)、人参总皂苷中剂量组(+)、人参总皂苷高剂量组(++)、模型组(++)、美他多辛组(-)、空白组(-)。其中模型组肝细胞点状坏死明显,见坏死细胞结构模糊、胞核固缩溶解,坏死区及周围肝窦内少量炎性细胞浸润,以核圆形深染的淋巴细胞为主;其余各组除空白组外可见不同程度肝损伤。总体趋势表明,各药物组

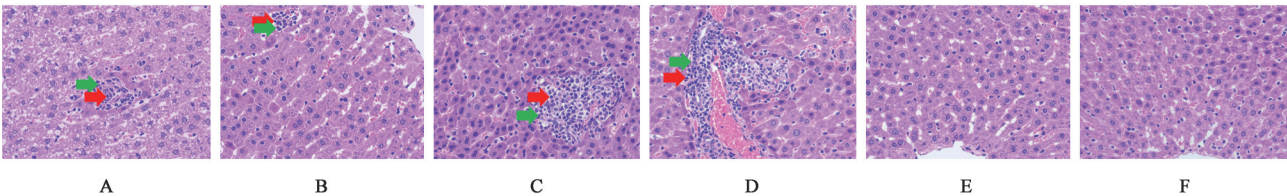
表2 人参总皂苷对AH大鼠血清AST、ALT水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 2 Effect of ginsenoside on serum AST and ALT levels in AH model rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	AST	ALT
空白组		101.84 $\pm$ 6.30	52.60 $\pm$ 6.14
模型组		204.98 $\pm$ 7.39 ¹⁾	103.03 $\pm$ 5.71 ¹⁾
人参总皂苷低剂量组	10	141.38 $\pm$ 7.23 ³⁾	76.25 $\pm$ 4.93 ²⁾
人参总皂苷中剂量组	20	122.01 $\pm$ 6.68 ³⁾	65.89 $\pm$ 8.97 ²⁾
人参总皂苷高剂量组	40	158.98 $\pm$ 8.03 ³⁾	84.03 $\pm$ 5.41
美他多辛组	117	117.99 $\pm$ 6.26 ³⁾	62.80 $\pm$ 5.77 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ (表3、表5同)

的肝细胞坏死和淋巴细胞浸润情况相对于模型组均有所改善。中剂量组和类他多辛组改善最为显著。见图1。



注:A.人参总皂苷低剂量组;B.人参总皂苷中剂量组;C.人参总皂苷高剂量组;D.模型组;E.美他多辛组;F.空白组(图2同)

图1 人参总皂苷对AH大鼠肝损伤的影响(HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of ginsenoside on liver injury in rats (HE, $\times 400$)

肝脏系数由小到大依次排序为空白组、美他多辛组、人参总皂苷中剂量组、人参总皂苷低剂量组、人参总皂苷高剂量组和模型组,且各组与模型组均

差异有统计学意义($P<0.01$),其结果表明AH可能与乙醇导致肝脏的炎症反应和影响脂质代谢有关,而人参总皂苷有可能阻止这一恶化过程。见表3。

表3 人参总皂苷对AH大鼠肝脏系数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 3 Effect of ginsenoside on liver coefficients in AH model rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	大鼠体重/ g	肝重/ g	肝脏系数/%
空白组		374.30 $\pm$ 25.61	9.26 $\pm$ 1.26	2.46 $\pm$ 0.17
模型组		300.63 $\pm$ 21.63 ¹⁾	13.97 $\pm$ 2.01 ¹⁾	4.63 $\pm$ 0.33 ¹⁾
人参总皂苷低剂量组	10	338.80 $\pm$ 21.56 ²⁾	13.09 $\pm$ 1.68	3.85 $\pm$ 0.24 ³⁾
人参总皂苷中剂量组	20	348.80 $\pm$ 21.80 ³⁾	11.20 $\pm$ 1.39 ²⁾	3.20 $\pm$ 0.20 ³⁾
人参总皂苷高剂量组	40	327.60 $\pm$ 16.80	12.81 $\pm$ 1.31	3.90 $\pm$ 0.20 ³⁾
美他多辛组	117	356.95 $\pm$ 28.19 ³⁾	10.59 $\pm$ 1.66 ²⁾	2.95 $\pm$ 0.23 ³⁾

3.10 FOS、COL1A2蛋白表达情况 Western blot结果显示,与空白组比较,模型组肝脏中FOS水平显著降低而COL1A2则显著增高($P<0.01$);与模型组比较,人参总皂苷中、高剂量组的FOS水平显著增高($P<0.01$),而人参总皂苷低、中剂量组COL1A2水平显著降低($P<0.01$)。上述结果提示,人参总皂苷可能通过降低肝细胞中FOS和COL1A2蛋白水

平来改善酒精性肝炎。见表4、图2。

3.11 FOS、COL1A2基因转录水平 Real-time PCR结果显示,与空白组比较,模型组肝脏中FOS、COL1A2基因转录水平的变化差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,人参总皂苷中、高剂量组FOS的转录水平均升高,而中、低剂量组COL1A2基因转录水平均降低。这表明人参总皂苷的护肝机

表4 人参总皂苷对AH大鼠肝脏FOS和COL1A2蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of ginsenoside on relative expression of FOS and COL1A2 proteins in liver of AH model rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	FOS / β -actin	COL1A2 / β -actin
空白组		3.52±0.29	0.83±0.20
模型组		2.24±0.34 ¹⁾	2.49±0.24 ²⁾
人参总皂苷低剂量组	10	2.88±0.31	1.71±0.19 ²⁾
人参总皂苷中剂量组	20	3.50±0.35 ²⁾	1.62±0.21 ²⁾
人参总皂苷高剂量组	40	3.42±0.38 ²⁾	2.33±0.26
美他多辛组	117	2.95±0.33	2.20±0.22

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$

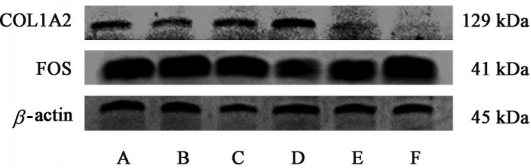


图2 人AH模型大鼠肝脏FOS和COL1A2蛋白表达电泳
Fig. 2 Effect of ginsenoside on expression levels of FOS and COL1A2 proteins in liver of AH model rats

制可能涉及到调控肝内细胞FOS和COL1A2基因转录水平。见表5。

表5 人参总皂苷对AH模型大鼠肝脏FOS和COL1A2 mRNA的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of ginsenoside on electrophoresis expression of ginsenoside on relative of FOS and COL1A2 genes in liver of AH model rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	FOS	COL1A2
空白组		4.61±1.05	0.44±0.08
模型组		1.04±0.34 ¹⁾	1.00±0.07 ¹⁾
人参总皂苷低剂量组	10	2.68±0.99	0.59±0.13 ²⁾
人参总皂苷中剂量组	20	3.60±0.28 ³⁾	0.45±0.11 ³⁾
人参总皂苷高剂量组	40	3.33±0.68 ³⁾	0.78±0.24
美多他辛组	117	2.55±0.54	0.59±0.11

4 讨论

FOS是一种原癌基因,表达后形成核磷酸蛋白,与Jun蛋白都是二聚体激活蛋白-1(AP-1)转录因子复合物的组分^[28]。同时FOS被认为是细胞增殖、分化、转化和细胞死亡的重要调节因子^[29],以往多见于骨肿瘤、动脉粥样硬化、神经系统疾病的研究中^[30-32]。I型胶原纤维是胶原家族的主要组成部分,由COL1A1和COL1A2构成^[33]。COL1A2基因是编码I型胶原 $\alpha 2$ 链的重要基因,有研究表明其与纤维化、癌症等疾病阶段的发展密切相关^[34-35]。

人参为五叶加科植物人参 *Panax ginseng* 的根及根茎^[36],主要活性成分有人参多糖、人参皂苷、人参蛋白等。已有文献验证人参能有效作用于非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化等肝脏疾病^[37-39]。以人参皂苷为主的中成药被广泛用于多系统疾病的辅助治疗。中医认为,饮酒所致机体损害分为初期、中期、后期3个时期,分别对应西医中的酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝硬化3个过程。初期湿热酒毒先伤脾胃,而后累及肝脏;中期邪气日盛,正气渐衰,肝脾同病;后期肝脾肾俱损,正虚邪恋,本虚标实^[40-43]。饮酒所致肝气不畅、肝郁气滞,长此以往,体内湿热内蕴、热病伤津,肝胆不利患者易受侵犯,形成酒精性肝炎加重的恶性循环。而人参的功效主治包含了益气健脾、益气生津、除邪气等方面,益气则本固,生津则热清,脾健则肝病治,邪气除则正气盛,能有效地延缓酒精性肝病的各个发展阶段^[44-45],此辨证论治进一步支持本研究的开展。然而,目前关于人参总皂苷调控AH分子机制的研究较少,故本研究将从分子生物学水平探寻人参总皂苷减轻AH损伤的潜在靶点作为研究的主要目的,为后续研究提供基础信息。

本研究前期从GEO数据库中选择GSE28619、GSE83148和GSE103580数据集进行分析,利用“limma”包和WGCNA方法筛选出差异基因交集,再根据PPI网络的Degree值选取前20个基因纳入后续分析,最后用LASSO回归和随机森林方法获取候选基因。候选基因进行生存曲线分析以评估诊断价值,并用外部数据集进行验证,使预测结果更加可靠。以ROC曲线结果确定最有研究价值的潜在基因,以潜在基因为中心预测中药。即综合生物信息学、机器学习等方法筛选出FOS和COL1A2两个潜在靶点。通过Coremine Medical数据库结合相关文献确定治疗AH的潜在中药人参总皂苷,后期针对2个靶点进行分子对接和实验验证,将人参总皂苷的各代表成分与FOS、COL1A2进行分子对接,对接结果良好的有人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁,提示其可能为人参总皂苷调控AH的主要单体成分。动物实验使用HE染色观察肝脏病理改变情况,肝脏系数和血清AST、ALT值评估肝损伤情况,Western blot和Real-time PCR测定肝细胞内FOS和COL1A2蛋白和基因水平。实验结果验证前期预测结果,人参总皂苷各给药组的大鼠肝损伤水平较模型组显著降低,FOS蛋白表达和基因转录水平上及COL1A2蛋白表达和基因转录水平的下降

具有统计学意义。基于本研究结合已有文献[46-47]推测,FOS参与AH的机制有以下几点:①肝细胞FOS的蛋白缺失会导致LXR/RXR通路抑制,而LXR是维持肝内胆固醇稳态所必需的因子,调控胆固醇的修饰和排出,阻止肝细胞脂肪变及后续恶化进程;②FOS蛋白的缺乏会导致炎症的发生,而炎症反应会进一步降低FOS蛋白水平,形成恶性循环;③FOS通过p38丝裂原活化蛋白激酶途径介导c-Myc诱导的血清剥夺肝癌细胞凋亡信号的介质。Fos可能是c-Myc诱导细胞凋亡的一个新的介导因子,故上调胞内FOS蛋白水平可能延缓AH最终发展为肝癌的过程。COL1A2作用机制可能与IFN- α 抑制COL1A2基因的激活过程相似,从而阻断肝脏纤维化过程,阻止AH进展为肝纤维化和肝硬化^[48]。

综上所述,人参总皂苷延缓AH发展的机制可能是通过TNF信号通路、IL-17信号传导途径、色氨酸代谢等途径,抑制细胞过度增殖、提高干扰素和降低肝纤维化水平。人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁可能在调控FOS和COL1A2基因转录和蛋白表达水平的方面起到关键作用。为了深入研究,后续将分离单体成分并对其余突出靶点和信号通路进行验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] PENNINTI P, ADEKUNLE A D, SINGAL A K. Alcoholic hepatitis: The rising epidemic[J]. Med Clin North Am, 2023, 107(3): 533-554.
- [2] HOSSEINI N, SHOR J, SZABO G. Alcoholic hepatitis: A review[J]. Alcohol Alcohol, 2019, 54(4): 408-416.
- [3] 周相宇,周素芳,李玉茹,等. 基于Nrf2信号通路探究参苓白术散调节铁死亡对酒精性肝损伤大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 104-113.
- [4] ZHENG J, LI Z, XU H. Intestinal microbiotas and alcoholic hepatitis: Pathogenesis and therapeutic value[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14809.
- [5] KAUR B, ROSENBLATT R, SUNDARAM V. Infections in alcoholic hepatitis[J]. J Clin Transl Hepatol, 2022, 10(4): 718-725.
- [6] SEHRAWAT T S, LIU M, SHAH V H. The knowns and unknowns of treatment for alcoholic hepatitis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(5): 494-506.
- [7] DUKIĆ M, RADONJIĆ T, JOVANOVIĆ I, et al. Alcohol, inflammation, and microbiota in alcoholic liver disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3735.
- [8] GUO M, GU L, HUI H, et al. Extracts of *Dracocephalum tanguticum* Maxim ameliorate acute alcoholic liver disease via regulating transcription factors in mice[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 830532.
- [9] KEATING M, LARDO O, HANSELL M. Alcoholic hepatitis: Diagnosis and management[J]. Am Fam Physician, 2022, 105(4): 412-420.
- [10] QU Q, YANG F, ZHAO C, et al. Effects of fermented ginseng on the gut microbiota and immunity of rats with antibiotic-associated diarrhea [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 267: 113594.
- [11] 郭洁,赵贵萍,于大德,等. 人参钾肥的需求规律及肥效评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 192-199.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [13] 卢增辉,郑清烟,张雪,等. 人参调控神经递质代谢的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(21): 7260-7272.
- [14] 范致星,黄逸凡,杨简. 人参皂苷对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究进展[J]. 巴楚医学, 2023, 6(3): 110-114.
- [15] CHEN Y Y, LIU Q P, AN P, et al. Ginsenoside Rd: A promising natural neuroprotective agent [J]. Phytomedicine, 2022, 95: 153883.
- [16] JI Y J, KIM H D, LEE E S, et al. Heat treatment enhances the neuroprotective effects of crude ginseng saponin by increasing minor ginsenosides [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(8): 7223.
- [17] PAN Z, GUO J, TANG K, et al. Ginsenoside Rc Modulates SIRT6-NRF2 interaction to alleviate alcoholic liver disease[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(44): 14220-14234.
- [18] YANG K, RYU T, CHUNG B S. A Meta-analysis of preclinical studies to investigate the effect of *Panax ginseng* on alcohol-associated liver disease [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(4): 841.
- [19] 蒲泽江. 芒果苷钠盐对酒精性肝炎的改善作用和代谢组学的调节机制[D]. 保定:河北大学, 2023.
- [20] 张志刚. 一贯煎加味防治大鼠酒精性肝炎肝肾阴虚证的动物实验研究[D]. 太原:山西中医学院, 2015.
- [21] RACHAKONDA V, BATALLER R, DUARTE-ROJO A. Recent advances in alcoholic hepatitis [J]. F1000Res, 2020, 9: F1000.
- [22] HOSSEINI N, SHOR J, SZABO G. Alcoholic hepatitis: A review[J]. Alcohol Alcohol, 2019, 54(4): 408-416.
- [23] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师学会脂肪性肝病专家委员会. 酒精性肝病防

- 治指南(2018年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(5):939-946.
- [24] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:科学技术出版社, 2006:38
- [25] 李游, 章燕虹, 沈薇. 美他多辛治疗酒精性肝病的Meta分析[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(2):181-185.
- [26] BAI L, GAO J, WEI F, et al. Therapeutic potential of ginsenosides as an adjuvant treatment for diabetes[J]. Front Pharmacol, 2018, 9:423.
- [27] 王晨, 宋立孝, 程金来, 等. 葛菊护肝片调节NF- κ B和Bcl-2/Bax信号通路改善酒精所致的小鼠肝脏损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(18):17-25.
- [28] MATSUOKA K, BAKIRI L, BILBAN M, et al. Metabolic rewiring controlled by c-Fos governs cartilage integrity in osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82(9):1227-1239.
- [29] CRUZ-MENDOZA F, JAUREGUI-HUERTA F, AGUILAR-DELGADILLO A, et al. Immediate early gene c-Fos in the brain: Focus on glial cells[J]. Brain Sci, 2022, 12(6):687.
- [30] AMARY F, MARKERT E, BERISHA F, et al. FOS expression in osteoid osteoma and osteoblastoma: A valuable ancillary diagnostic tool [J]. Am J Surg Pathol, 2019, 43(12):1661-1667.
- [31] MIAO G, ZHAO X, CHAN S L, et al. Vascular smooth muscle cell c-Fos is critical for foam cell formation and atherosclerosis[J]. Metabolism, 2022, 132:155213.
- [32] YAP E L, PETTIT N L, DAVIS C P, et al. Bidirectional perisomatic inhibitory plasticity of a Fos neuronal network [J]. Nature, 2021, 590 (7844) : 115-121.
- [33] WANG Y, SAKAGUCHI M, SABIT H, et al. COL1A2 inhibition suppresses glioblastoma cell proliferation and invasion[J]. J Neurosurg, 2023, 138(3):639-648.
- [34] CHEN Y, YANG S, TAVORMINA J, et al. Oncogenic collagen I homotrimers from cancer cells bind to $\alpha_3\beta_1$ integrin and impact tumor microbiome and immunity to promote pancreatic cancer[J]. Cancer Cell, 2022, 40(8):818-834.
- [35] ZHANG Q, QU Y, ZHANG Q, et al. Exosomes derived from hepatitis B virus-infected hepatocytes promote liver fibrosis via miR-222/TFRC axis[J]. Cell Biol Toxicol, 2023, 39(2):467-481.
- [36] FAN Z, XIAO S, HU H, et al. Endophytic bacterial and fungal community compositions in different organs of ginseng (*Panax ginseng*) [J]. Arch Microbiol, 2022, 204(4):208.
- [37] CUI L, TAN Y J, XU S Q, et al. Ginsenoside Rd, a natural production for attenuating fibrogenesis and inflammation in hepatic fibrosis by regulating the $ERR\alpha$ -mediated P2X7r pathway [J]. Food Funct, 2023, 14(12):5606-5619.
- [38] YOON S J, KIM S K, LEE N Y, et al. Effect of Korean red ginseng on metabolic syndrome[J]. J Ginseng Res, 2021, 45(3):380-389.
- [39] ZOU J, YANG R, FENG R, et al. Ginsenoside Rk₂, a dehydropotopanaxadiol saponin, alleviates alcoholic liver disease via regulating NLRP3 and NLRP6 inflammasome signaling pathways in mice[J]. J Pharm Anal, 2023, 13(9):999-1012.
- [40] 周彤. 酒精性肝病中医证候分布特点及用药规律的研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2022.
- [41] 张志雄, 刘春芳, 孔庆辉. 酒精性肝病的中西医结合治疗进展[J]. 光明中医, 2020, 35(19):3137-3138.
- [42] 任延明. 酒精性肝病的中医病机浅探[J]. 青海医学院学报, 2004, 25(2):140-141.
- [43] 王晓慧, 吴同玉. 基于“阳化气”理论探讨肝硬化的中医治疗思路[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(4):74-76.
- [44] 杨珊, 赵暖暖, 杨鑫, 等. 人参活性成分及药理作用研究进展[J]. 中医药导报, 2023, 29(1):105-107, 116.
- [45] 李峰. 人参的四性、归肝经及大补元气功效的中药药理学研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2018.
- [46] BAKIRI L, HAMACHER R, GRAÑA O, et al. Liver carcinogenesis by FOS-dependent inflammation and cholesterol dysregulation [J]. J Exp Med, 2017, 214(5):1387-1409.
- [47] KALRA N, KUMAR V. c-Fos is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (24) : 25313-25319.
- [48] INAGAKI Y, NEMOTO T, KUSHIDA M, et al. Interferon alfa down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice [J]. Hepatology, 2003, 38 (4) : 890-899.

[责任编辑 顾雪竹]