

# 基于网络药理学和实验验证探讨石榴皮对非酒精性脂肪性肝炎的作用机制

孙懿<sup>a</sup>, 黄鑫宇<sup>a</sup>, 屈雅琴<sup>a</sup>, 郑国华<sup>a,b</sup>, 田先翔<sup>a\*</sup>, 邱振鹏<sup>a</sup>(湖北中医药大学, a.药学院, b.中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065)

**摘要:** 目的 基于网络药理学和细胞实验验证的方法探讨石榴皮改善非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)作用机制。方法 利用中药系统药理学数据库(TCMSP)进行条件检索, 获取石榴皮的活性成分及其对应的作用靶点。利用人类基因数据库(GeneCards)等 5 个数据库获取 NASH 相关的靶点。将获得的石榴皮和 NASH 靶点进行筛选, 通过韦恩图得到共同靶点。使用蛋白相互作用数据库(String)构建蛋白质-蛋白质相互作用网络, 并用 Cytoscape 3.7.1 建立“石榴皮-成分-靶点-NASH”网络。利用 Metascape 软件进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析。最后借助人肝癌细胞 HepG2 观察石榴皮中主要活性成分对 NASH 的影响。结果 石榴皮活性成分有 7 个, 获得靶点基因 191 个, NASH 靶点 1 818 个, 两者交集靶点 98 个, 拓扑学分析显示, 石榴皮治疗 NASH 的核心成分为槲皮素、山奈酚和木犀草素, 核心靶点为蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt1)、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等。KEGG 通路分析结果显示石榴皮治疗 NASH 主要涉及磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/Akt、核因子  $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)等信号通路。体外细胞试验结果显示, 与对照组相比, 模型组磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated-Akt<sup>Thr308</sup>, p-Akt<sup>Thr308</sup>)、IL-6 等蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 石榴皮活性成分可显著降低 p-Akt<sup>Thr308</sup>、IL-6 等蛋白的表达水平( $P < 0.05$ ), 也能够降低 IL-6、TNF- $\alpha$  基因的 mRNA 表达水平( $P < 0.05$ )。结论 石榴皮可通过多成分、多靶点、多通路发挥抗 NASH 的作用, 其机制可能与石榴皮中活性成分槲皮素、山奈酚和木犀草素影响 Akt1 等核心靶点及调控 PI3K/Akt、NF- $\kappa$ B 等信号通路, 进而抑制相关炎症因子表达有关。

**关键词:** 石榴皮; 网络药理学; 非酒精性脂肪性肝炎; 细胞实验; 分子机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)17-2384-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223506

引用本文: 孙懿, 黄鑫宇, 屈雅琴, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨石榴皮对非酒精性脂肪性肝炎的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(17): 2384-2392.

## Exploring Mechanism of Pomegranate Peel on Non-alcoholic Steatohepatitis Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

SUN Yi<sup>a</sup>, HUANG Xinyu<sup>a</sup>, QU Yaqin<sup>a</sup>, ZHENG Guohua<sup>a,b</sup>, TIAN Xianxiang<sup>a\*</sup>, QIU Zhenpeng<sup>a</sup>(Hubei University of Chinese Medicine, a.School of Pharmacy, b.Key Laboratory of Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Wuhan 430065, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the mechanism of pomegranate peel in improving non-alcoholic steatohepatitis (NASH) based on network pharmacology and cell experiments verification. **METHODS** Using the Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database(TCMSP) to obtain the active components of pomegranate peel and their corresponding targets. NASH-related disease targets were obtained from five disease databases, including the Human Gene Database(GeneCards), etc. To screen the targets of pomegranate peel and NASH and obtain the common targets through Venn diagrams. The protein-protein interaction network of pomegranate peel-NASH was constructed using the protein interaction database(String), and the “pomegranate peel-component-target-NASH” network was established with Cytoscape 3.7.1. Gene ontology(GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway analysis were performed using Metascape software. Finally, the effect of the main active components in pomegranate peel on NASH was observed with human hepatoma cells(HepG2). **RESULTS** There were 7 active ingredients in pomegranate peel, 191 target genes, 1 818

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074077)

作者简介: 孙懿, 女, 硕士 E-mail: 2416927785@qq.com

\*通信作者: 田先翔, 男, 博士, 副教授 E-mail: 284633827@qq.com

NASH targets, and 98 intersection targets. Topological analysis showed that the core components of pomegranate peel in the treatment of NASH were quercetin, kaempferol, and luteolin, and the core targets were protein kinase B(Akt1), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor(TNF). KEGG pathway analysis predicted that pomegranate peel treatment of NASH mainly involved phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K)/Akt, nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B), and other signaling pathways. The results of *in vitro* cell experiments showed that the expression levels of phosphorylated protein kinase B(p-Akt<sup>Thr308</sup>), IL-6 and other proteins were elevated in the model group compared with the control group( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the active ingredients of pomegranate peel could significantly reduce the expression level of p-Akt<sup>Thr308</sup> and IL-6( $P<0.05$ ), as well as the mRNA expression level of IL-6 and TNF- $\alpha$ ( $P<0.05$ ). **CONCLUSION** Pomegranate peel can exert anti-NASH effects through multiple components, multiple targets, and multiple pathways. The mechanism may be related to the active components quercetin, kaempferol, and luteolin in pomegranate peel affecting core targets such as Akt1 and regulating PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B, and other signaling pathways, thereby inhibiting the expression of related inflammatory factors.

**KEYWORDS:** pomegranate peel; network pharmacology; non-alcoholic steatohepatitis; cell experiments; molecular mechanism

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是临床常见慢性肝脏疾病,流行病学证据表明,NAFLD患者数量占世界成年人总人数 25%<sup>[1]</sup>。非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是 NAFLD 中的炎症亚型<sup>[2]</sup>。近年来 NASH 的患者数逐步攀升,预计未来 10 年 NASH 的发病率将增加 56%,若控制不佳可发展为肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等终末期病变<sup>[3-4]</sup>。目前临床上缺乏有效治疗 NASH 的方法和药物。因此,研发防治 NASH 的药物具有重要意义<sup>[5]</sup>。

石榴皮为石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮<sup>[6]</sup>,是中国药典收录中药材。有研究表明,石榴皮中含有大量的类黄酮和多酚等生物活性物质,其具有多种生物活性,包括抗氧化<sup>[7]</sup>、抗炎<sup>[8]</sup>、抗菌<sup>[9]</sup>和免疫调节等<sup>[10-11]</sup>。由于中药成分的复杂性以及现有研究方法的局限性,目前石榴皮对 NASH 的防治作用鲜有报道。

网络药理学是一门新兴的学科,其通过整合系统生物学和计算机技术,系统、全面地观察药物对疾病的影响,是揭示中医药疾病防治的有力工具<sup>[12-13]</sup>。目前网络药理学已广泛应用于揭示中药在疾病治疗中的潜在活性成分、靶点和机制,阐明了多种疾病的功能机制,如肿瘤、心血管疾病和代谢性疾病等<sup>[13-14]</sup>。本研究基于网络药理学方法对石榴皮防治 NASH 的关键靶点和信号通路进行预测分析,结合预测结果,运用 NASH 相关基因 Akt 过表达的 HepG2 细胞模型验证网络药理学分析结果,以阐明石榴皮改善 NASH 的潜在作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

槲皮素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号: J2127453; 质量分数 $\geq 98\%$ ); 山奈酚(批号:

1208J121; 质量分数 $\geq 98\%$ )、木犀草素(批号: 421G021; 质量分数 $\geq 98\%$ )、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号: 710N0317)均购自北京索莱宝生物科技有限公司; Akt 质粒(pT3-EF1 $\alpha$ -HA-myr-Akt)由美国加州大学陈昕教授实验室构建; Neofect 转染试剂(北京零客创智生物技术有限公司,批号: D202201); DMEM 培养基(批号: AJ30716198)、0.25%胰蛋白酶(批号: J200033)、青霉素和链霉素(批号: J200044)购自美国 Hyclone 公司; PBS 缓冲液(大连美仑生物技术有限公司,批号: MA0015-Jun-10H); 胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号: 21110704); CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所,批号: PF724); BCA 蛋白定量试剂盒(批号: SI251119)、ECL 超敏化学发光液(批号: VC297103)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 蛋白酶抑制剂(批号: 50325)、磷酸酶抑制剂(批号: 07722)均购自康为世纪科技有限公司; TNF- $\alpha$ , IL-6 基因上下游引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,  $\beta$ -actin 基因上下游引物由昆泰锐生物技术有限责任公司合成, 荧光定量 PCR 试剂购于上海星汉生物科技有限公司; 鼠源  $\beta$ -actin 单克隆抗体(批号: HRP-60008)、兔源 Akt 多克隆抗体(批号: 10176-2-AP)均购自 Proteintech 公司; 兔源磷酸化 Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)单克隆抗体(批号: 13038)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号: 7074)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(批号: 7076)均购自美国 CST 公司; NF- $\kappa$ B p65(批号: MO9182169)、I $\kappa$ B- $\alpha$ (批号: MO7281936)、p-I $\kappa$ B- $\alpha$ (批号: MO9182495)均购自沈阳万类生物科技有限公司; TRIZOLTM RNA 提取试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号: 248204); 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶试剂盒(美国 Epi Zyme Scientific 公司,批号: 18D250); 其余试剂为分析纯,水为去离子水。

MCO-15AC CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(日本三洋公司); CKX31 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司); Trans-Blot®Turbo™蛋白转膜系统、TC20™型细胞计数器、Power Pac Basic 型电泳仪、xMark 型全波长酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); Centrifuge 5424R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); G-BOX 型成像分析系统(英国 Syngene 公司); XB 220A 分析天平(瑞士普利赛斯公司)。

人源肝癌 HepG2 细胞株购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

## 1.2 石榴皮有效活性成分的收集和筛选

通过 TCMSP(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>) 数据库, 收集石榴皮的化学成分, 并利用口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug-likeness, DL)进行筛选, 选取同时满足  $OB \geq 30\%$  和  $DL \geq 0.18$  的成分作为潜在的活性成分。接着利用 TCMSP 数据库检索石榴皮活性成分的靶点名称, 借助 UniProt(<http://www.uniprot.org/>)数据库将所有靶点名称进行规范化。

## 1.3 作用靶点的筛选

### 1.3.1 NASH 疾病靶点的预测

分别以“NASH”“non-alcoholic steatohepatitis”为关键词输入到 Genecards(<https://www.genecards.org/>)数据库, 以“non-alcoholic steatohepatitis”为关键词输入在线人类孟德尔遗传数据库 OMIM(<https://www.omim.org/>)、治疗靶标数据库 TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)、DrugBank(<https://go.drugbank.com/>)和疾病相关的基因与突变位点数据库 Disgenet(<https://www.disgenet.org/>), 检索获得已验证的 NASH 相关靶点, 合并 5 个数据库的靶点, 去除重复和假阳性基因。

### 1.3.2 石榴皮的作用靶点与 NASH 相关靶点 Venny 分析

Venny(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)作图软件上分别录入石榴皮和 NASH 的靶点, 绘制 Venn 图, 得到两者的交集即石榴皮治疗 NASH 的潜在作用靶点。

## 1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络拓扑分析及核心靶点的筛选

在 STRING11.5(<https://www.string-db.org/>)数据库中构建共有靶点的 PPI 网络, 设置蛋白种类为“Homosapiens”, 获取蛋白相互作用信息, 分析结果保存为 TSV 文件。然后将文件导入 Cytoscape 中进行拓扑分析, 筛出核心靶点。

## 1.5 石榴皮-成分-靶点-NASH 网络构建

使用 Cytoscape 3.7.1 软件绘制“石榴皮-成分-靶点-NASH”网络图并进行拓扑学分析。在图中, 以石榴皮、活性成分、靶点和 NASH 为 4 类节点, 有相互关系的节点之间用边相连。

## 1.6 GO 分析和 KEGG 通路富集分析

Metascape(<http://metascape.org/gp/index.html>)数据库中, 限定研究物种“Homo sapiens”, 设置  $P < 0.01$ , 对 94 个共有靶点进行 GO 和 KEGG 分析。将获得的数据处理后导入微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn>)在线作图网站绘制条形图和气泡图。

## 1.7 CCK-8 法检测细胞毒性

取对数生长的 HepG2 细胞, 按每孔 5 000 个接种在 96 孔板中。分为对照组和不同浓度的槲皮素给药组, 每组设 6 个复孔。槲皮素给药组分别加入终浓度为 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的含药完全培养基, 对照组加入相同体积的完全培养基, 另设不含细胞只含完全培养基的空白组。分别培养 24 h 和 48 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8, 继续培养 2 h 后, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(A), 计算细胞存活率。山奈酚给药组和木犀草素给药组操作如上。细胞存活率 =  $(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

## 1.8 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 表达

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 接种于 10 cm 培养皿中, 设置对照组、模型组和药物(槲皮素、山奈酚、木犀草素)低、中、高剂量(2.5, 5.0, 10.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组。待细胞生长至 80%时, 进行转染实验。先将 Akt 基因质粒与不含血清的 DMEM 培养基稀释并充分混匀, 在质粒稀释液中加入 Neofect 转染试剂(培养基: 质粒: 转染试剂 = 1 mL : 1  $\mu\text{g}$  : 1  $\mu\text{L}$ ), 轻轻混匀, 室温静置 15~30 min。将复合物加入培养基中, 轻轻混匀, 培养 24 h 后进行药物干预, 对照组使用正常培养基。运用 TRIzol™ RNA 提取试剂抽提 HepG2 细胞 RNA, RNA 逆转录后得到 cDNA, 最后进行扩增。RT-qPCR 扩增条件如下(反应体系为 10  $\mu\text{L}$ ): 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s, 共 40 个循环。以  $\beta$ -actin 作为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 mRNA 的表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

引物名称		引物序列
<i>β-actin</i>	正向	TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG
	反向	GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG
<i>IL-6</i>	正向	AGCCACTCACCTCTTCAGAAC
	反向	ACATGTCCTTTCTCAGGGC
<i>TNF-α</i>	正向	CTGAGGTCAATCTGCCCAAGTAC
	反向	CTTCACAGAGCAATGACTCCAAAG

### 1.9 Western blotting 检测蛋白表达

HepG2 细胞按“1.8”项下方法转染给药后,提取细胞总蛋白,按BCA法测定蛋白浓度。取25 μg蛋白样品经过10% SDS-PAGE电泳分离后,转印至PVDF膜(0.45 μm)上,用5%脱脂牛奶封闭1 h,加入NF-κB、IL-6、β-actin等一抗(稀释按1:1 000)摇床孵育过夜, TBST清洗3次,每次10 min。加入HRP-羊抗兔(鼠)IgG二抗(稀释按1:10 000)室温孵育1 h,用TBST清洗10 min×3次。加入ECL超敏化学发光液后在G:BOX下系统成像,使用Image J 1.8.0 图像软件处理,以目标蛋白与内参(β-actin)条带的灰度值比值作为目标蛋白的表达水平。

### 1.10 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验均重复3次。使用Graphpad Prism 7.0软件作图并统计分析,多组均数间采用One-way ANOVA检验。 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 石榴皮主要活性成分及靶点的筛选

由TCMSP数据库检索得到石榴皮化学成分26个,根据 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 分析,筛选出7个活性成分,通过查阅相关知识,发现安石榴苷、安石榴林和没食子酸虽不满足 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ ,但研究表明具有一定抗炎活性,纳入后续研究,最终得到10个成分见表2。在TCMSP数据库中获取石榴皮活性成分相关靶点,经UniProt数据库转换汇总删除重复的靶点信息后,最终获得石榴皮活性成分靶点蛋白共计191个。

### 2.2 NASH疾病相关靶点筛选

基于OMIM数据库、Disgenet数据库、DrugBank数据库、TTD数据库以及Genecards数据库搜集得到NASH靶点,将Genecards数据库得到的结果根据“Relevance score”值利用二倍中位数法进行筛选,将筛选出的靶点和另外4个网站的靶点合并后删除重复值最终筛选出1 818个相

关疾病靶点。

### 2.3 石榴皮治疗NASH靶点的预测

在Venny 2.1在线作图工具平台上分别录入191个药物靶点蛋白和1 818个疾病靶点蛋白,绘制Venn图,得到两者的交集即为石榴皮治疗NASH的98个潜在作用靶点,见图1。

表 2 石榴皮主要活性成分

Tab. 2 Main chemical constituents of Pomegranate peel

MOL ID	化学成分	中文名称	OB/%	DL
MOL001002	ellagic acid	鞣花酸	43.06	0.43
MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇	36.91	0.75
MOL000422	kaempferol	山奈酚	41.88	0.24
MOL000492	(+)-catechin	(+)-儿茶素	54.83	0.24
MOL000006	luteolin	木犀草素	36.16	0.25
MOL009274	fritillaziebinol	鄂见新醇	55.05	0.34
MOL000098	quercetin	槲皮素	46.43	0.28
MOL009146	punicalagin	安石榴苷	18.17	0.00
MOL009272	punicalin	安石榴林	16.37	0.03
MOL000513	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	没食子酸	31.69	0.04

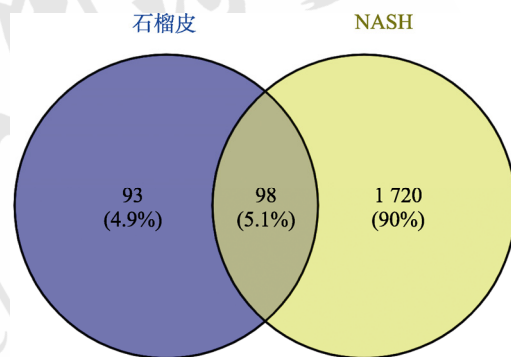


图 1 石榴皮-NASH 共同靶点数

Fig. 1 Number of common targets of Pomegranate peel and NASH

### 2.4 核心靶点的筛选

将石榴皮-NASH的98个交集靶点导入String数据库构建PPI网络图,共获得98个节点,291条边,平均节点度为6.51。应用Cytoscape3.7.1软件对PPI网络进行分析,根据最大集团中心性筛选的核心靶点前10位分别为肿瘤坏死因子(TNF, degree 78)、血管内皮生长因子(VEGFA, degree 69)、白细胞介素-6(IL-6, degree 77)、蛋白激酶B(Akt1, degree 79)、基质金属蛋白酶-9(MMP9, degree 61)、前列腺素内过氧化物合酶(PTGS, degree 65)、白细胞介素-8(CXCL8, degree 58)、白细胞介素-1(IL-1β, degree 71)、转录因子AP-1(JUN, degree 68)、表皮细胞生长因子(EGF, degree 58),见图2。其中IL-6、TNF和IL-1β均为炎症反应相关基因。

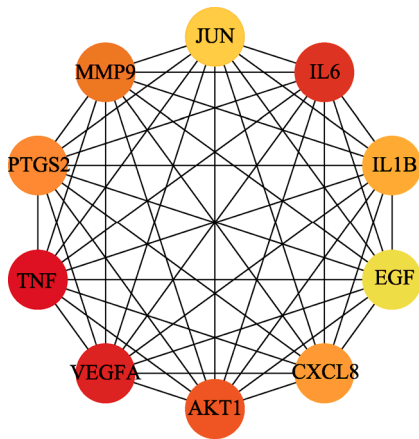


图2 石榴皮-NASH 核心靶点  
圆圈颜色越红, 度值越大。

Fig. 2 Core targets of Pomegranate peel-NASH  
The redder of the circle color, the greater of the degree value.

## 2.5 石榴皮-成分-靶点-疾病网络构建

将石榴皮活性成分及其作用于 NASH 的靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建石榴皮-成分-靶点-NASH 网络见图 3。圆形节点代表石榴皮中主要活性成分, 菱形节点代表交集靶点, 与靶点节点连线越多, 圆圈越大, 代表其可能是发挥药效的成分。其中活性成分槲皮素、山奈酚和木犀草素具有改善 NASH 的潜力, 所以后续选取槲皮素、山奈酚和木犀草素进行体外细胞试验研究。

## 2.6 GO 分析和 KEGG 通路富集分析

将石榴皮有效成分预测出的 98 个作用靶点通过 Metascape 数据库进行 GO 和 KEGG 分析。GO 富集分析结果见图 4, 其中绿色柱代表生物过程 (biological process, BP), 橙色柱代表细胞组分

(cellular component, CC), 紫色柱代表分子功能 (molecular function, MF)。在 BP 层面, 石榴皮活性成分调控细胞对脂质的反应、对细胞因子的反应等; 在 CC 层面, 石榴皮活性成分通过调节转录调节器复合体、膜筏等结构来发挥作用; 在 MF 层面, 石榴皮活性成分对激酶结合、脂质结合和细胞因子受体结合等进行调节。KEGG 通路富集分析结果见图 5, 石榴皮治疗 NASH 主要涉及 NF- $\kappa$ B 信号通路和 PI3K/Akt 信号通路等。

## 2.7 细胞试验结果

2.7.1 槲皮素、山奈酚和木犀草素给药浓度筛选 CCK8 结果显示, 与对照组比较, 不同剂量槲皮素、山奈酚和木犀草素作用 24, 48 h 后, 细胞存活率均降低。当槲皮素、山奈酚和木犀草素给药浓度各为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 作用 24 h 后, 细胞存活率均  $>80\%$ ; 当药物浓度  $>10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 24 h 后细胞的存活率均  $<80\%$ 。因此选择 2.5, 5,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为给药的低、中和高剂量, 并确定 24 h 作为给药时间。结果见表 3。

2.7.2 槲皮素、山奈酚和木犀草素降低 HepG2 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 的表达水平 与对照组比较, Akt 质粒转染的细胞(模型组)中 IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平显著升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 与模型组比较, 5,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的槲皮素、山奈酚和木犀草素给药后能够显著降低 IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结果表明, 槲皮素、山奈酚和木犀草素能够从转录水平下调 Akt 诱导的 HepG2 细胞中炎症因子的表达, 结果见表 4。

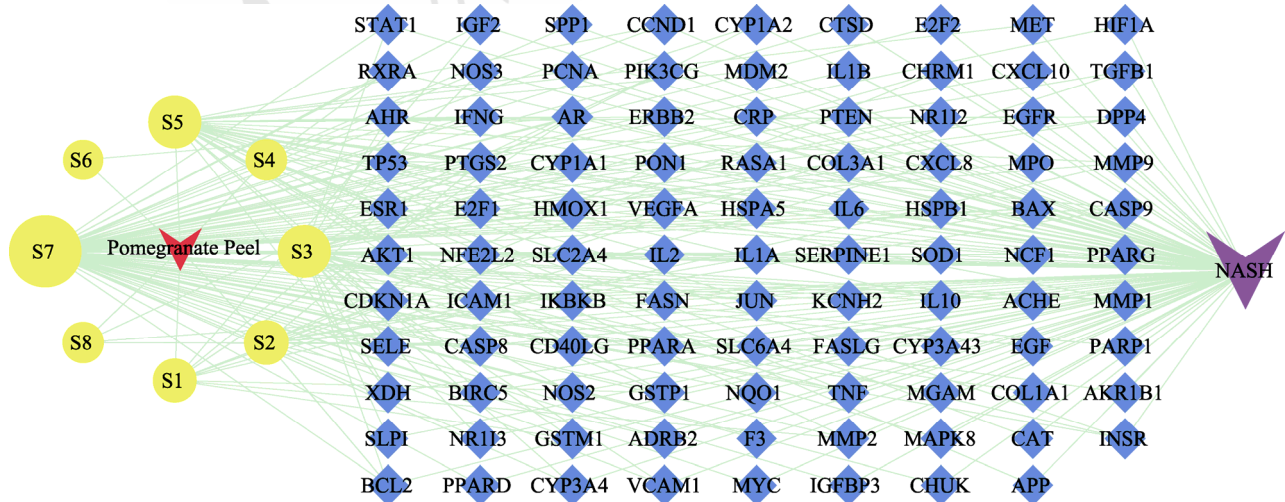


图3 石榴皮-活性成分-靶点-疾病网络图

S1-鞣花酸; S2- $\beta$ -谷甾醇; S3-山奈酚; S4-(+)-儿茶素; S5-木犀草素; S6-鄂见新醇; S7-槲皮素; S8-没食子酸。

Fig. 3 Pomegranate peel-active ingredient-target-disease network diagram

S1-ellagic acid; S2- $\beta$ -sitosterol; S3-kaempferol; S4-(+)-catechins; S5-luteolin; S6-fritillaziebinol; S7-quercetin; S8-gallic acid.

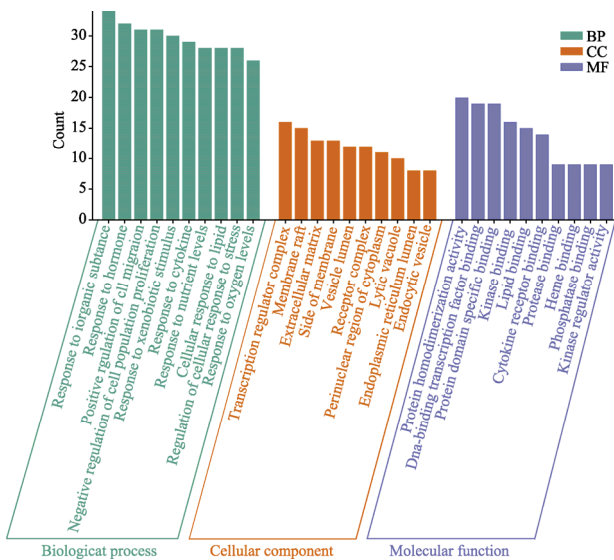


图 4 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

2.7.3 槲皮素、山奈酚和木犀草素抑制瞬时转染 Akt 基因质粒的 HepG2 细胞中炎症相关蛋白的表达 Western blotting 结果见图 6~9, 与对照组相比, 瞬时转染 Akt 基因质粒的 HepG2 细胞(模型组)中 p-Akt<sup>Thr308</sup>、p-p65、p-IκB-α、IL-6、TNF-α 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01$ ), 表明转染 Akt 质粒的 HepG2 细胞中 Akt/NF-κB 信号通路被激活, 并进

表 3 不同浓度槲皮素、山奈酚和木犀草素对 HepG2 细胞的细胞毒性( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 3 Cytotoxicity of different concentrations of quercetin, kaempferol and luteolin on HepG2 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ μmol·L <sup>-1</sup>	槲皮素		山奈酚		木犀草素	
		24 h 细胞存活率/%	48 h 细胞存活率/%	24 h 细胞存活率/%	48 h 细胞存活率/%	24 h 细胞存活率/%	48 h 细胞存活率/%
对照组	-	100±0.69	100±4.37	100±5.13	100±3.42	100±2.27	100±7.53
实验组	1	97.96±1.32	94.13±4.48	97.5±1.77	93.6±8.27	89.88±2.41 <sup>1)</sup>	77.31±4.25
	2	95.61±5.35	92.14±8.67	88.26±2.16	87.46±3.88	88.02±2.96 <sup>1)</sup>	75.92±1.85
	4	93.25±1.74 <sup>1)</sup>	91.33±2.94	86.23±1.41	85.03±3.55 <sup>1)</sup>	86.88±2.23 <sup>1)</sup>	74.15±2.27
	6	90.65±2.17	90.67±1.84	84.08±7.3	82.06±6.63 <sup>1)</sup>	86.18±1.95 <sup>2)</sup>	73.60±2.01
	8	89.67±1.51	87.38±5.58	81.62±1.84 <sup>1)</sup>	80.16±9.61 <sup>1)</sup>	84.48±3.93 <sup>1)</sup>	72.16±5.58 <sup>1)</sup>
	10	88.72±4.12	83.07±2.25 <sup>1)</sup>	80.88±1.34	79.52±9.01 <sup>2)</sup>	83.18±2.35 <sup>2)</sup>	62.46±0.77 <sup>1)</sup>
	20	66.68±6.86 <sup>1)</sup>	63.45±1.08 <sup>2)</sup>	71.03±7.2 <sup>1)</sup>	71.01±0.75 <sup>1)</sup>	60.86±0.58 <sup>2)</sup>	45.99±5.04 <sup>2)</sup>
	40	49.67±4.02 <sup>2)</sup>	27.39±0.98 <sup>2)</sup>	35.18±2.81 <sup>2)</sup>	27.46±0.18 <sup>2)</sup>	23.99±1.38 <sup>2)</sup>	4.36±0.21 <sup>2)</sup>

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ .

表 4 不同浓度槲皮素、山奈酚和木犀草素对 HepG2 细胞中 IL-6、TNF-α mRNA 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 4 Effects of different concentrations of quercetin, kaempferol and luteolin on the expression levels of IL-6 and TNF-α mRNA in HepG2 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ μmol·L <sup>-1</sup>	槲皮素		山奈酚		木犀草素	
		IL-6 相对表达量	TNF-α 相对表达量	IL-6 相对表达量	TNF-α 相对表达量	IL-6 相对表达量	TNF-α 相对表达量
对照组	-	0.85±0.16	0.94±0.09	1.02±0.17	1.06±0.17	1.05±0.19	0.82±0.2
模型组	-	8.87±1.22 <sup>1)</sup>	6.72±0.3 <sup>2)</sup>	12.54±1.35 <sup>1)</sup>	9.18±0.48 <sup>2)</sup>	4.75±0.67 <sup>1)</sup>	8.09±0.59 <sup>2)</sup>
实验组	2.5	2.95±0.77	4.50±0.66 <sup>3)</sup>	9.24±0.39 <sup>3)</sup>	5.04±0.81 <sup>3)</sup>	2.39±0.82	4.26±1.01 <sup>3)</sup>
	5	2.14±0.45 <sup>4)</sup>	1.46±0.18 <sup>4)</sup>	2.77±0.66 <sup>4)</sup>	2.82±0.59 <sup>4)</sup>	1.00±0.14 <sup>3)</sup>	2.38±0.28 <sup>4)</sup>
	10	1.40±0.35 <sup>4)</sup>	0.73±0.01 <sup>4)</sup>	1.73±0.53 <sup>3)</sup>	1.77±0.56 <sup>4)</sup>	0.55±0.11 <sup>3)</sup>	0.73±0.01 <sup>4)</sup>

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; compared with the model group, <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$ .

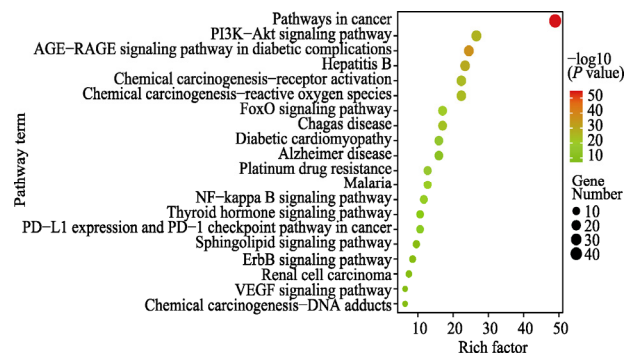


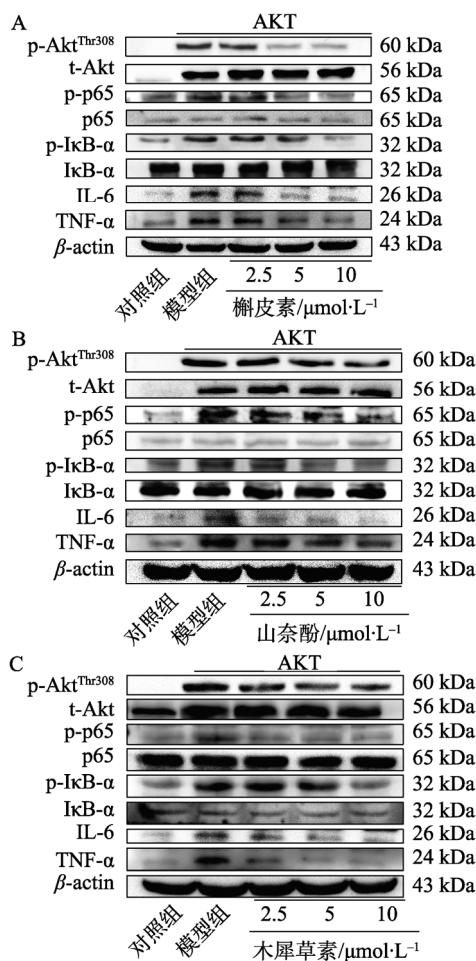
图 5 KEGG 通路富集分析

X 轴为富集倍数; Y 轴为通路的名称; 图中节点的颜色从绿到红表示 Count 值(基因数)从小到大; 节点从小到大大表示基因数由少到多。

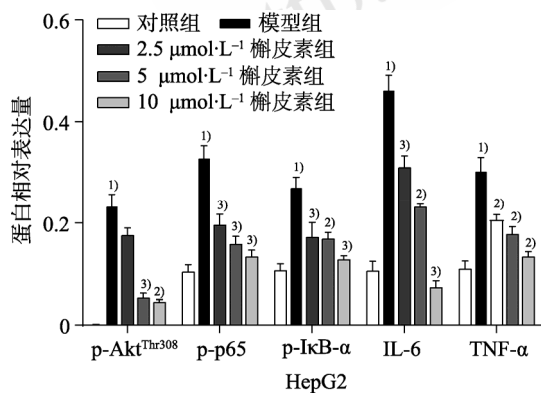
Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

X-axis was the multiple of enrichment; Y-axis was the name of the pathway. In the figure, the color of nodes from green to red indicated the Count value (gene number) from small to large, and the node from small to large indicated the gene number from small to large.

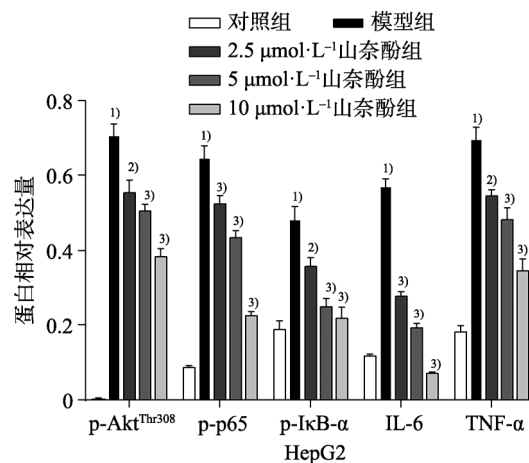
一步促进其下游相关炎症因子的表达。与模型组相比, 5, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的槲皮素、山奈酚和木犀草素给药 24 h 后, p-Akt<sup>Thr308</sup>、p-p65 等表达水平显著降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), t-Akt、p65 和 IκB-α 水平差异无统计学意义。结果表明, 槲皮素、山奈酚和木犀草素抑制了瞬时转染 Akt 质粒的 HepG2 细胞中 Akt/NF-κB 信号通路的表达。



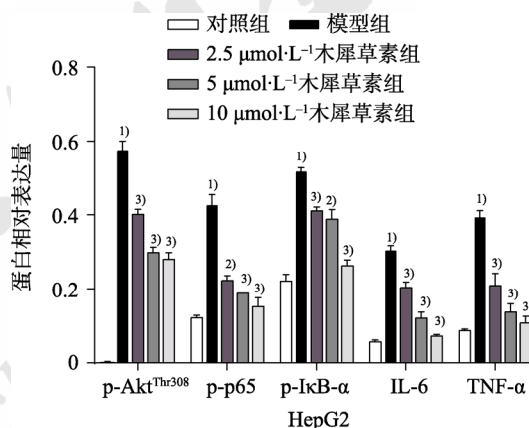
**图 6** HepG2 细胞给药后相关蛋白表达电泳  
A-槲皮素给药后 HepG2 细胞相关蛋白表达电泳；B-山奈酚给药后 HepG2 细胞相关蛋白表达电泳；C-木犀草素给药后 HepG2 细胞中相关蛋白表达电泳。  
**Fig. 6** Related protein expression electrophoresis in HepG2 cells after drug administration  
A-protein expression electrophoresis of HepG2 cells after quercetin administration; B-protein expression electrophoresis of HepG2 cells after kaempferol administration; C-protein expression electrophoresis of HepG2 cells after luteolin administration.



**图 7** 槲皮素对 HepG2 细胞相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。  
**Fig. 7** Effect of quercetin on the expression of HepG2 cell-related proteins ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ .



**图 8** 山奈酚对 HepG2 细胞相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。  
**Fig. 8** Effect of kaempferol on the expression of HepG2 cell-related proteins ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ .



**图 9** 木犀草素对 HepG2 细胞相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。  
**Fig. 9** Effect of luteolin on the expression of HepG2 cell-related proteins ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ .

### 3 讨论

NASH 是 NAFLD 进展过程中伴随炎症应答的病理阶段<sup>[15]</sup>, 是除酒精及明确的肝损伤等因素引起的以肝细胞脂肪变性、炎症反应、不同程度纤维化为特征的临床综合征<sup>[16]</sup>。NASH 的发病机制复杂, 目前被认为涉及多重平行打击过程。第一个打击是肝脏脂肪的积累导致的肝脂肪变性, 随后的多重打击是炎症和纤维化<sup>[17-18]</sup>。中药治疗 NASH 具有多途径、多靶点的特点和优势, 可在中医整体观、辨证论治观的指导下对疾病产生更有效、更全面的治疗效果<sup>[19]</sup>。石榴皮占石榴果实总质量的 11%~21%, 主要含有黄酮、多酚及鞣质类化合

物, 有较大的药用价值<sup>[20-21]</sup>。近年来, 国内外研究发现, 石榴皮中的各类化合物能够抑制肝脏炎症反应<sup>[22-23]</sup>。其中有研究通过 HPLC 和体内动物实验发现槲皮素作为石榴皮提取物中重要活性成分, 具有保肝作用<sup>[24]</sup>。也有研究表明石榴皮中的多酚化合物(如山奈酚、木犀草素等)可以减少促炎细胞因子如 TNF- $\alpha$  的表达<sup>[25-26]</sup>。

本研究通过网络药理学技术对石榴皮治疗 NASH 的靶点进行分析, 结合活性成分关联分析后筛选出槲皮素、山奈酚和木犀草素等潜在有效成分。PPI 网络分析表明, 与石榴皮防治 NASH 有关的关键靶点分别是 Akt1、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF 等。KEGG 通路富集结果显示, 石榴皮治疗 NASH 可能通过调节 PI3K/Akt、NF- $\kappa$ B 相关信号通路发挥作用。Akt 属于 AGC 丝氨酸/苏氨酸激酶家族, 其激活与炎症、胰岛素抵抗、心血管疾病、肿瘤和糖尿病进展密切相关<sup>[27]</sup>。研究发现, Akt 质粒通过高压尾静脉转染技术注入小鼠肝脏使 Akt 基因在肝细胞中稳定表达<sup>[28]</sup>。Akt-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1(mTORC1)可激活脂质代谢的主要转录调节器—甾醇调节元件结合蛋白 1c(SREBP-1c), SREBP-1c 促进了脂肪酸合成酶(FASN)、乙酰辅酶 a 羧化酶(ACC)等脂质合成过程中关键酶的转录和翻译, 进而导致肝细胞中脂质累积, 最终促进 NAFLD/NASH 的发生和发展<sup>[29-31]</sup>。Calvisi 等<sup>[29]</sup>将 Akt 稳定转染到 HCC 细胞中, 发现其可以诱导脂质的生成和脂蛋白的上调。课题组前期研究已发现在 HepG2 细胞内转染 Akt 基因质粒后能升高 TG 的含量<sup>[31]</sup>。Akt 是 PI3K 通路下游的主要调节分子, PI3K/Akt 信号通路参与脂质代谢以及具有抗炎和抗氧化应激等功能<sup>[32]</sup>。近年来大量研究表明 NF- $\kappa$ B 通路可被 PI3K/Akt 信号通路在内的多种因素激活, 在 NASH 的发展进程中发挥重要作用<sup>[33-34]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号通路活化不仅能够诱导多种细胞因子(如 IL-6、TNF- $\alpha$ )的释放激发炎症反应, 还能够上调趋化因子(如 IL-8 等)的表达<sup>[35-36]</sup>, 并诱导参与炎症反应的相关酶(环氧化酶-2 等)的表达<sup>[37]</sup>。因此, 本实验在 HepG2 细胞中运用 Akt 过表达方法激活 NF- $\kappa$ B 信号通路, 确证石榴皮活性成分防治 NASH 的作用机制。体外细胞试验结果表明, 石榴皮活性成分槲皮素、山奈酚和木犀草素显著下调 Akt 转染的 HepG2 中 Akt、NF- $\kappa$ B 和 I $\kappa$ B 磷酸化水平, 并降低炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$  的 mRNA

和蛋白的表达水平。上述研究与网络药理学分析结果一致。

综上所述, 运用网络药理学和体外细胞实验方法, 本研究发现石榴皮具有干预 NASH 进展的潜能, 其作用机制与其活性成分槲皮素、山奈酚和木犀草素调控 Akt/NF- $\kappa$ B 相关信号通路及其下游炎症因子表达有关。本研究为临床运用石榴皮防治 NASH 提供理论依据, 并为进一步通过动物实验研究石榴皮治疗 NASH 作用机制奠定前期基础。但本研究只进行了体外细胞实验, 存在一定的局限性, 后续将在体内进行深入研究。

## REFERENCES

- [1] DRESCHER H K, WEISKIRCHEN S, WEISKIRCHEN R. Current status in testing for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH)[J]. *Cells*, 2019, 8(8): E845.
- [2] HUANG D Q, EL-SERAG H B, LOOMBA R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: Trends, predictions, risk factors and prevention[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(4): 223-238.
- [3] LAN T, HU Y F, HU F J, et al. Hepatocyte glutathione S-transferase mu 2 prevents non-alcoholic steatohepatitis by suppressing ASK1 signaling[J]. *J Hepatol*, 2022, 76(2): 407-419.
- [4] HUBY T, GAUTIER E L. Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(7): 429-443.
- [5] CHEN M, XIE Y, GONG S, et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Pharmacol Res*, 2021(172): 105849.
- [6] FAN G F, XU Z G, DAI R M, et al. Study on the antibacterial mechanism of pomegranate peel based on network pharmacology[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2022, 39(1): 48-54.
- [7] HADRICH F, CHER S, GARGOURI Y T, et al. Antioxidant and lipase inhibitory activities and essential oil composition of pomegranate peel extracts[J]. *J Oleo Sci*, 2014, 63(5): 515-525.
- [8] NEYRINCK A M, VAN HÉE V F, BINDELS L B, et al. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: Potential implication of the gut microbiota[J]. *Br J Nutr*, 2013, 109(5): 802-809.
- [9] VUČIĆ V, GRABEŽ M, TRCHOUNIAN A, et al. Composition and potential health benefits of pomegranate: A review[J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(16): 1817-1827.
- [10] AHMADIPOUR B, PAT S, ABASZADEH S, et al. Pomegranate peel as a phyto-genic in broiler chickens: Influence upon antioxidant, lipogenesis and hypotensive response[J]. *Vet Med Sci*, 2021, 7(5): 1907-1913.
- [11] LU X Y, HAN B, DENG X, et al. Pomegranate peel extract



- ameliorates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of gut microbiota[J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1857515.
- [12] LIN H X, WANG X T, LIU M Y, et al. Exploring the treatment of COVID-19 with Yinqiao Powder based on network pharmacology[J]. Phytother Res, 2021, 35(5): 2651-2664.
- [13] SUN P Y, WANG A S, ZHANG Z F, et al. Network pharmacology-based strategy to investigate the active ingredients and molecular mechanisms of *Scutellaria barbata* D. Don against radiation pneumonitis[J]. Medicine, 2021, 100(47): e27957.
- [14] HE S, WANG T Q, SHI C W, et al. Network pharmacology-based approach to understand the effect and mechanism of Danshen against anemia[J]. J Ethnopharmacol, 2022(282): 114615.
- [15] WREE A, BRODERICK L, CANBAY A, et al. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(11): 627-636.
- [16] TAKATANI N, KONO Y, BEPPU F, et al. Fucoxanthin inhibits hepatic oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 528(2): 305-310.
- [17] TSOCHATZIS E A, PAPTAEODORIDIS G V, ARCHIMANDRITIS A J. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: From pathogenesis to implications in diagnosis and therapy[J]. Mediators Inflamm, 2009(2009): 831670.
- [18] TAN X Y, SUN Y, CHEN L, et al. Caffeine ameliorates AKT-driven nonalcoholic steatohepatitis by suppressing *De novo* lipogenesis and MyD88 palmitoylation[J]. J Agric Food chem, 2022, 70(20): 6108-6122.
- [19] TIAN G G, XIA E R, ZHANG S Y, et al. Research advances in traditional Chinese medicine in improving nonalcoholic steatohepatitis by regulating the Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling pathway[J]. J Clin Hepatol(临床肝胆病杂志), 2021, 37(12): 2957-2962.
- [20] WANG C X, YUE L L, XU H Y, et al. Simultaneous quantification of 7 components in different parts of *Punica granatum* fruits using ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry(UPLC-QQQMS)[J]. Food Sci(食品科学), 2016, 37(4): 139-143.
- [21] MENG X T, WEI J, XU M Q, et al. Determination of five flavonoids in pomegranate peel of different cultivars by high performance liquid chromatography[J]. Xinjiang Agric Sci(新疆农业科学), 2019, 56(9): 1659-1667.
- [22] OUYANG X, CHENG H Y, HU W Q, et al. Research progress on anti-alcoholic liver injury effects and mechanism of flavonoids[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2020, 36(9): 1200-1205.
- [23] YIN C G, SONG W L, LI M L, et al. Synchronous extraction of total flavonoid from pomegranate peel and yellow pigment from supercritical fluid extraction residue[J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2021, 42(1): 80-87.
- [24] SEHRISH M, ALI K J, BILAL A, et al. Pomegranate peel extract and quercetin possess antioxidant and hepatoprotective activity against concanavalin A-induced liver injury in mice[J]. Pak Vet J, 2021, 41(2): 197-202.
- [25] BAKKIYARAJ D, NANDHINI J R, MALATHY B, et al. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens[J]. Biofouling, 2013, 29(8): 929-937.
- [26] JIMENEZ-LOPEZ C, FRAGA-CORRAL M, CARPENA M, et al. Agriculture waste valorisation as a source of antioxidant phenolic compounds within a circular and sustainable bioeconomy[J]. Food Funct, 2020, 11(6): 4853-4877.
- [27] MANNING B D, TOKER A. AKT/PKB signaling: Navigating the network[J]. Cell, 2017, 169(3): 381-405.
- [28] YU Z Y, HE Y, LUO W, et al. Establishment of *AKT* gene-mediated non-alcoholic fatty liver models in mice[J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong(华中科技大学学报:医学版), 2016, 45(2): 170-175.
- [29] CALVISI D F, WANG C M, HO C, et al. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2011, 140(3): 1071-1083.
- [30] KRYCER J R, SHARPE L J, LUU W, et al. The Akt-SREBP nexus: Cell signaling meets lipid metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21(5): 268-276.
- [31] ZHANG C. Study on the mechanism of ellagic acid ameliorates hepatic steatosis in mice and the preparation of urolithin A liposomes[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2020.
- [32] CHEN Y S. Mechanism of resveratrol regulating PI3K/AKT and SIRT2 signaling pathways to alleviate nonalcoholic fatty liver disease[D]. Shenyang: China Medical University, 2022.
- [33] ZHANG T P, HU J J, WANG X M, et al. microRNA-378 promotes hepatic inflammation and fibrosis via modulation of the NF- $\kappa$ B-TNF $\alpha$  pathway[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 87-96.
- [34] WANG Q Y, OU Y J, HU G M, et al. Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the NLRP3/NF- $\kappa$ B pathway in mice[J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(8): 1806-1821.
- [35] ZHANG Q, YU K, CAO Y Z, et al. miR-125b promotes the NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory response in NAFLD via directly targeting TNFAIP3[J]. Life Sci, 2021(270): 119071.
- [36] MIN H K, MARUYAMA H, JANG B K, et al. Suppression of IGF binding protein-3 by palmitate promotes hepatic inflammatory responses[J]. FASEB J, 2016, 30(12): 4071-4082.
- [37] TANG G Y, XU Y, ZHANG C, et al. Green tea and epigallocatechin gallate (EGCG) for the management of nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD): Insights into the role of oxidative stress and antioxidant mechanism[J]. Antioxidants, 2021, 10(7): 1076.

收稿日期: 2022-10-11  
 (本文责编: 李艳芳)