

DOI:10.16305/j.1007-1334.2023.2101139

网络药理学分析结合细胞实验探讨黄芪汤抗肝纤维化的作用机制

秦 艳¹, 李亚娟¹, 王清兰²

1. 上海中医药大学交叉科学研究院(上海 201203); 2. 上海中医药大学中医学院(上海 201203)

【摘要】 目的 基于网络药理学方法分析黄芪汤抗肝纤维化的关键分子机制,并进一步采用相关肝星状细胞(HSC)实验验证其作用机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库分析平台(TCMSP)获取黄芪汤中黄芪和甘草的全部化学成分,根据生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18的筛选条件筛选出潜在的活性成分,同时通过化源网(Chemsrc)数据库以及检索文献补充数据库中未获得的活性成分。通过TCMSP、化合物靶点预测(Swisstarget prediction)数据库、药物银行(DrugBank)数据库获得化学成分的作用靶点,即药物靶点;再通过全基因(Gencards)数据库、在线人类孟德尔遗传(OMIM)数据库等获取肝纤维化的主要靶点,即疾病靶点;取二者交集获得黄芪汤成分抗肝纤维化的潜在作用靶点。采用富集分析(Metascape)平台进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库信号通路分析,获得黄芪汤成分调控的关键信号通路,并采用Cytoscape 3.8.1软件构建“黄芪汤抗肝纤维化靶点-信号通路”网络图。最后利用体外人肝星状细胞系人肝星状细胞LX-2(简称“LX-2细胞”)验证黄芪汤对LX-2细胞活化及关键信号通路的影响。**结果** 通过网络药理学分析筛选出153个黄芪汤成分抗肝纤维化的潜在作用靶点。KEGG信号通路分析提示,上述靶点可能与白介素-17(IL-17)信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶B(PI3K-Akt)信号通路、5'-单磷酸腺苷依赖的蛋白激酶(AMPK)信号通路等密切相关。PI3K-Akt信号通路在肝纤维化发生发展,尤其是HSC活化中发挥重要作用。体外研究发现,黄芪汤可下调LX-2细胞 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)及I型胶原蛋白(Col-I)基因和蛋白表达,抑制细胞活化;进一步研究发现,黄芪汤对LX-2细胞PI3K基因及蛋白表达有显著抑制作用,并可下调Akt的磷酸化水平,提示对PI3K-Akt信号通路有抑制作用。**结论** 网络药理学分析结合细胞实验提示,黄芪汤抗肝纤维化的部分作用机制与下调PI3K-Akt信号通路、抑制肝星状细胞活化相关。

【关键词】 肝纤维化;黄芪汤;网络药理学;肝星状细胞;作用机制;中药研究

Mechanism of Huangqi Decoction against liver fibrosis by network pharmacological analysis combined with related cell experiment

QIN Yan¹, LI Yajuan¹, WANG Qinglan²

1. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China.

Abstract: Objective To investigate the key molecular mechanism of Huangqi Decoction against liver fibrosis based on network pharmacology and hepatic stellate cells (HSC) experiment validation. **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) was used to obtain all the components from Astragali Radix and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. Then, the potential active components were screened out with the criteria of bioavailability (OB)≥30% and drug-like (DL)≥0.18; Meanwhile, more potential active components were acquired by Chemsrc database and literature. The targets of chemical components, also called drug targets, were obtained through TCMSP database, Swisstarget prediction database and DrugBank. Then the targets of hepatic fibrosis, also called disease targets, were obtained through Gencards, OMIM. The potential targets of anti-hepatic fibrosis of Huangqi Decoction were obtained by the intersection of drug targets and disease targets. The signal pathway of Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome (KEGG) was analyzed by enrichment analysis (Metascape) platform, and the key signal pathways of

Huangqi Decoction were obtained, and the network map of “Huangqi Decoction anti-hepatic fibrosis target-signal pathway” was constructed by Cytoscape 3.8.1 software. Finally, the effects of Huangqi Decoction on the activation and key signal pathways of LX-2 cells were verified by human hepatic stellate cell LX-2 *in vitro*. **Results** A total of 153 potential targets of Huangqi Decoction against liver fibrosis were

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573810)

[作者简介] 秦艳,女,硕士研究生,主要从事中医药防治慢性肝病的药理机制研究工作

[通信作者] 王清兰,副研究员;E-mail:qinglan_wang@126.com。
李亚娟,副研究员;E-mail:liyajuan9@sina.cn

screened by network pharmacological analysis. The analysis of KEGG signal pathway suggests that the above targets may be closely related to interleukin-17 (IL-17) signal pathway, phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B (PI3K-Akt) signal pathway and 5-adenosine monophosphate-dependent protein kinase (AMPK) signal pathway. PI3K-Akt signaling pathway plays an important role in the occurrence and development of liver fibrosis, especially in HSC activation. *In vitro*, Huangqi Decoction could down-regulate the gene and protein expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen (Col-I) in human hepatic stellate cell line LX-2 cells, and inhibit cell activation. Further study showed that Huangqi Decoction could significantly inhibit the expression of PI3K gene and protein in LX-2 cells, and down-regulate the phosphorylation level of Akt, suggesting that it could inhibit the PI3K-Akt signal pathway. **Conclusion** Network pharmacology combined with cell experiment suggests that part of the mechanism of Huangqi Decoction in anti-hepatic fibrosis is related to down-regulating PI3K-Akt signal pathway and inhibiting the activation of hepatic stellate cells.

Keywords: hepatic fibrosis; Huangqi Decoction; network pharmacology; hepatic stellate cells; mechanism of action; traditional Chinese herbal medicine research

肝纤维化是肝脏对多种慢性损伤的一种修复愈合反应,以肝组织内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度增生与异常沉积为特征,是多种慢性肝病的重要病理特点,也是慢性肝病向肝硬化发展的必经过程。肝硬化是肝纤维化的末期,进而可能发展为肝癌。据估计,肝纤维化影响全球人口的1%至2%,并导致全世界每年超过100万人死亡^[1-3]。现代医学除针对某些病因的治疗外,目前尚缺乏理想的生物或化学临床治疗药物。中医药在肝纤维化的治疗上具有明显的优势。

黄芪汤始载于《太平惠民和剂局方》,黄芪与甘草剂量比例为6:1,故又名黄芪六一汤。方中黄芪甘温,大补肺脾之气,固表止汗,托毒生肌,补气以生血,补气以生津液,为君药。炙甘草补脾益气和,助黄芪益气补虚之力,为臣佐药。两药配伍,甘以守中,补中益气之力增,气血津液化生有源,则气弱血虚所致诸症自愈,是经典补气药方之一^[4]。研究发现,黄芪汤对四氯化碳(CCl₄)、胆管结扎(BDL)及二甲基亚硝胺(DMN)^[5]等不同因素诱导的实验性肝纤维化模型均具有良好的预防及治疗作用^[6-7],其作用机制值得进一步研究。

网络药理学可从整体角度研究药物的作用机制,适合于分析中药复方多成分、多靶点的作用特点。本研究首先采用网络药理学方法初步发现黄芪汤抗肝纤维化的作用靶点并对靶点进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路分析,获得黄芪汤成分调控的关键信号通路,并构建“靶点-信号通路”网络图。肝星状细胞活化是肝纤维化的主要细胞学基础,本研究进一步采用人肝星状细胞系人肝星状细胞LX-2(简称“LX-2细胞”),基于网络药理学结果进一步采用细胞实验验证黄芪汤抗肝纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 LX-2细胞株,由上海中医药大学肝病研

究所徐列明教授赠送。

1.1.2 药物与试剂 黄芪汤(黄芪、甘草)由上海中医药大学附属曙光医院国家中医药管理局中药制剂中心(国家中医药管理局三级实验室)制成粗粉末,水煎,浓缩煎出液制成流浸膏后真空干燥,-20℃冷藏保存。生药总质量为8.0 kg,煎煮浓缩后为1.115 kg,真空干燥后质量为1.52 kg,每克含生药5.263 g。

含各种氨基酸和葡萄糖的培养基(DMEM),美国HyClone公司(批号:AE29040273);互补脱氧核糖核酸合成试剂盒(iScript™ cDNA Synthesis Kit)、荧光染料定量PCR试剂(iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix),美国Bio-Rad公司(批号分别为1708891、1725122);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、兔单克隆抗体、蛋白激酶B(Akt)1/2/3兔单克隆抗体,碧云天生物技术有限公司(批号分别为AF0006、AF1186、AF1789);抗Akt磷酸化T308(phospho T308)抗体,美国Abcam公司(批号:ab38449);抗磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抗体、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、I型胶原蛋白(Col-I)抗体,均购自美国Cell Signaling Technology公司(批号分别为4255S、19245S、72026S)。

1.1.3 仪器 脱色摇床,其林贝尔仪器制造有限公司(型号:TS8);制冰机,日本Sanyo株式会社(型号:SIM-F140AY65);恒温微孔板快速振荡器,其林贝尔仪器制造有限公司(型号:QB-9006);恒温磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司(型号:S23-2);电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司(型号:AL204);PCR扩增仪,德国Biometra公司(型号:Thermocycler);低温高速离心机,美国Eppendorf公司(型号:5425);实时荧光定量PCR,美国ABI公司(型号:7500Fast);酶标仪,美国Molecular Devices公司(型号:Spectramax 190);超净台,美国Labconco公司(型号:3612524);蛋白质电泳及转印系统/核酸蛋白测定仪,美国Bio-Rad公司(型号:turbo1704150);化学发光显影仪,上海天能科技有限公司(型号:Tanon5200)。

1.2 黄芪汤抗肝纤维化网络药理学分子分析结合细胞实验验证研究思路 本研究首先通过中药系统药理学数据库分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、化源网(Chemsrsc)数据库(<https://www.chemsrc.com/>)以及检索文献获得所有的黄芪汤的活性成分。通过TCMSP、化合物靶点预测(Swisstarget prediction)数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>)、药物银行(DrugBank)数据库(<https://www.drugbank.ca>)获得化学成分的作用靶点,即药物靶点;再通过全基因

(Gencards)数据库(<https://www.genecards.org>)、在线人类孟德尔遗传(OMIM)数据库(<http://www.omim.org>)等获取肝纤维化的主要靶点,即疾病靶点。取上述交集获得黄芪汤抗肝纤维化的潜在靶点;利用富集分析(Metascape)数据库(<http://metascape.org/gp/index.html>)进行KEGG通路富集分析,获得黄芪汤抗肝纤维化关键信号通路;最后采用LX-2细胞验证黄芪汤对上述关键信号通路的影响,阐述黄芪汤抗肝纤维化的部分作用机制。本研究思路见图1。

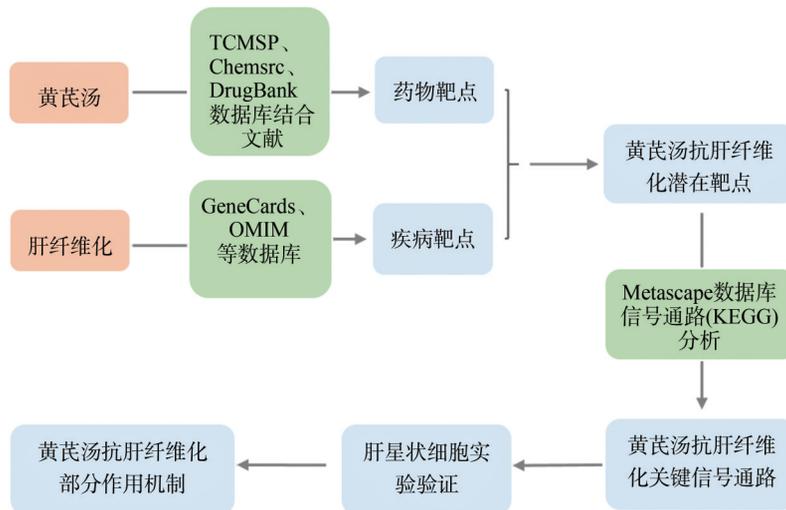


图1 网络药理学结合细胞实验验证探讨黄芪汤抗肝纤维化作用机制研究思路图

1.3 黄芪汤抗肝纤维化网络药理学分子分析

1.3.1 黄芪汤化学成分及有效靶点的筛选 通过TCMSP、Chemsrsc确定黄芪、甘草的化学成分,根据口服利用度(OB) $\geq 30\%$,类药性(DL) ≥ 0.18 两个药代动力学(ADME)属性值进行活性成分初步筛选以获得活性化合物及其作用靶点,再根据Swisstarget prediction、DrugBank数据库和已发表的文献报道补充未预测到的活性化合物的已知靶点。筛选结束后,将蛋白质靶点信息统一在通用蛋白质(Uniprot)数据库(<https://www.uniprot.org>)将化合物作用的蛋白质靶点进行规范。

1.3.2 肝纤维化相关疾病靶点筛选 以“hepatic fibrosis”“liver fibrosis”为关键词,采用Gencards数据库(<https://www.genecards.org>)、OMIM数据库(<http://www.omim.org>)挖掘影响肝纤维化的潜在靶点。在Gencards数据库中筛选出评分(Score)值相对较高的靶点,其分值越高表示与疾病的联系越密切。根据一般方法经验筛选Score大于两倍中位数的目标靶点为肝纤维化的潜在靶点,在Gencards数据库中所得肝纤维化靶点Score最大值为129.16,最小值为0.12,两倍中位数为8.4,故设定Score > 8.4 的靶点为肝纤维化的潜在靶点。最后合并4个疾病数据库筛选出的靶点作为肝纤维化的疾病靶点。

1.3.3 黄芪汤抗肝纤维化潜在靶点的筛选 利用韦恩

图(<http://www.bioinformatics.com.cn>)获得药物靶点和疾病靶点的交集,即为黄芪汤抗肝纤维化的潜在靶点。

1.3.4 生物学功能与通路的富集分析 Metascape数据库(<http://metascape.org/gp/index.html>)是一个具有较为全面的注释功能和定时更新基因注释的数据库。将黄芪汤抗肝纤维化的潜在靶点输入Metascape数据库平台,选择“人”(Homo sapiens, Human),设置 $P < 0.01$,最小计数为3和富集因子 > 1.5 (富集因子是观察到的计数与偶然预期的计数之间的比率)来进行KEGG富集分析,保存数据结果并采用微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn>)对数据进行可视化,得到黄芪汤抗肝纤维化靶点所富集的信号通路。

1.3.5 黄芪汤抗肝纤维化潜在靶点-信号通路网络图的构建 运用CytoScape 3.8.1软件,根据筛选出来的黄芪汤抑制肝纤维化潜在靶点和KEGG分析结果,构建肝纤维化靶点-信号通路网络图。

1.4 黄芪汤对LX-2细胞活化及关键信号通路的影响

1.4.1 细胞培养 LX-2细胞培养于含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中,置于5% CO₂的37℃细胞培养箱中培养,待细胞长至亚单层后用于实验。

1.4.2 分组与干预 LX-2细胞,设置正常对照组(control)、黄芪汤低剂量组(25 mg/L)、黄芪汤高剂量组(50 mg/L),给药后培养24 h,按检测指标要求收集细

胞,每组设3个复孔,每个实验重复3次。

1.4.3 Western blot 法检测 α -SMA、Col-I 蛋白表达情况 每个培养皿用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗两遍后,加入放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液 150 μ L,按照二喹啉甲酸(BCA)法检测总蛋白含量。取 20 μ g 总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,经硝酸纤维素膜转移,室温封闭(5%脱脂奶粉,1 h)后,分别与特异性一抗孵育,洗涤,再孵育相应二抗(摇床室温 1 h),洗涤后增强型化学发光试剂(ECL)化学发光,胶片曝光,图像分析仪通过光密度测定法定量测量。

1.4.4 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测细胞内基因表达情况 采用 RT-qPCR 法检测 LX-2 细胞纤维化相关 mRNA 的表达,分别为 α 平滑肌肌动蛋白基因(α -SMA), I 型胶原蛋白基因(Col-I), 磷脂酰肌醇-3-激酶基因(PI3K)。用 TRIzol 试剂提取总 RNA,测定其浓度。逆转录为 10 μ L 体系,根据试剂说明书操作,轻柔混匀后按照条件进行逆转录。反应条件:25 $^{\circ}$ C、5 min;46 $^{\circ}$ C、20 min;95 $^{\circ}$ C、1 min;4 $^{\circ}$ C 保存,-20 $^{\circ}$ C 储存备用。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。本实验中所用引物序列见表 1。反应体系为 10 μ L 体系。反应条件:预变性,95 $^{\circ}$ C、30 s,1 个循环;PCR 反应,95 $^{\circ}$ C、15 s,40 个循环,50 $^{\circ}$ C、60 s,40 个循环。以 18s 作为内参,所有反应体系均为 2 个复孔。

1.5 统计学方法 实验数据采用 GraphPad Prism6.02

表 1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
α -SMA	上游:5'-AAAAGACAGCTACGTGGTGA-3'	21
	下游:5'-GCCATGTTCTATCGGGTACTTC-3'	22
Col-I	上游:5'-GAGGGCCAAGACGAAGACATC-3'	21
	下游:5'-CAGATCACGTCATCGCACAAAC-3'	21
PI3K	上游:5'-TATTTGGACTTTGCGACAAGACT-3'	23
	下游:5'-TCGAACGCTACTGGTCTGGATAG-3'	22
18s	上游:5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	20
	下游:5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'	20

注: α -SMA 为 α 平滑肌肌动蛋白基因,Col-I 为 I 型胶原蛋白基因,PI3K 为磷脂酰肌醇-3-激酶基因,18s 为核糖体小亚基基因。

软件进行分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用 one-way ANOVA 进行统计分析,应用 Tukey's multiple comparisons test 进行组间两两比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪汤中化学成分的筛选 黄芪汤由黄芪、甘草组成,在 TCMS 数据库中检索到黄芪成分 87 个,甘草成分 280 个,共 367 个成分。设定筛选参数为 OB \geq 30%、DL \geq 0.18,获取黄芪成分 20 个、甘草成分 92 个,共 112 个有效成分。根据文献以及靶点一一对应,最终筛选出 21 个黄芪有效成分、92 个甘草有效成分,共同成分 3 个。见表 2。

表 2 黄芪汤主要化学成分

序号	分子名称	OB/%	DL
A1	槲皮素(quercetin)	46.43	0.28
B1	毛蕊异黄酮(calycosin)	47.75	0.24
C1	山柰酚(kaempferol)	41.88	0.24
HQ1	{(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-丙-2-基-2-基]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊烷[a]菲-3-醇 cyclopenta[a]phenanthren-3-ol}	36.23	0.78
HQ10	联苯双酯(bifendate)	31.10	0.67
HQ11	刺芒柄花素(formononetin)	69.67	0.21
HQ12	黄芪甲苷 IV (astragaloside)	22.50	0.15
HQ13	黄芪甲苷 A (astragaloside)	17.74	0.15
HQ14	氟乙脒(FA)	68.96	0.71
HQ15	黄芪异黄烷苷(isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole)	49.28	0.62
HQ16	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基翼状碳烯(1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene)	39.05	0.48
HQ17	黄芪多糖[2-(chloromethyl)-4-(4-nitrophenyl)-1,3-thiazole]	-	-
HQ18	黄芪总皂苷(astragaloside)	-	-
HQ2	白桦脂酸(mairin)	55.38	0.78
HQ3	华良姜素(jaranol)	50.83	0.29
HQ4	常春藤皂苷元(hederagenin)	36.91	0.75
HQ5	异鼠李素(isorhamnetin)	49.60	0.31
HQ6	3,9-二-O-甲基尼索啉(3,9-di-O-methylnissolin)	53.74	0.48
HQ7	7-O-甲基异琥珀酸醇(7-O-methylisomucronulatol)	74.69	0.30
HQ8	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖苷(9,10-dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside)	36.74	0.92

表 2 (续)

序号	分子名称	OB/%	DL
HQ9	(6 α R,11 α R)-9,10-二甲氧基-6 α ,11 α -二氢-6H-苯并呋喃并[3,2-c]铬-3-醇{(6 α R,11 α R)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol}	64.26	0.42
GC1	α -D-甲基-3-脱氧-3-(苯偶氮)-4,6-O-(苯亚甲基)-(9CI)吡喃葡萄糖(mairin)	55.38	0.78
GC10	甘草酚(glycyrol)	90.78	0.67
GC11	异美迪紫檀素(medicarpin)	49.22	0.34
GC12	黄羽扇豆魏特酮(lupiwighteone)	51.64	0.37
GC13	7-甲氧基-2-甲基异黄酮(7-methoxy-2-methyl)	42.56	0.20
GC14	柚皮素(naringenin)	59.29	0.21
GC15	甘草次酸(α 型)(glycyrrhetic acid)	22.05	0.74
GC16	(2S)-2-[4-羟基-3-(3-甲基丁烯基)苯基]-8,8-二甲基-2,3-二氢吡喃[2,3-f]色酮-4-酮{(2S)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-8,8-dimethyl-2,3-dihydropyrano[2,3-f]chromen-4-one}	31.79	0.72
GC17	欧芹酮(euchrenone)	30.29	0.57
GC18	粗毛甘草素B(glyasperin B)	65.22	0.44
GC19	粗毛甘草素F(glyasperin F)	75.84	0.54
GC2	华良姜素(jaranol)	50.83	0.29
GC20	粗毛甘草素C(glyasperin C)	45.56	0.40
GC21	异三醇(isotrifoliol)	31.94	0.42
GC22	(E)-1-(2,4-二羟基苯基)-3-(2,2-二甲基铬-6-基)丙-2-烯-1-酮{(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one}	39.62	0.35
GC23	甘草黄酮W(kanzonols W)	50.48	0.52
GC24	(2S)-6-(2,4-二羟基苯基)-2-(2-羟基丙-2-基)-4-甲氧基-2,3-二氢呋喃[3,2-g]铬-7-酮{(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one}	60.25	0.63
GC25	半甘草异黄酮B(semilicoisoflavone B)	48.78	0.55
GC26	鳞叶甘草素A(glepidotin A)	44.72	0.35
GC27	鳞叶甘草素B(glepidotin B)	64.46	0.34
GC28	菜豆异黄酮(phaseolinisoflavan)	32.01	0.45
GC29	刺果甘草查尔酮(glypallchalcone)	61.60	0.19
GC3	异鼠李素(isorhamnetin)	49.60	0.31
GC30	8-(6-羟基-2-苯并呋喃基)-2,2-二甲基-5-甲酚{8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol}	58.44	0.38
GC31	甘草查尔酮B(Licochalcone B)	76.76	0.19
GC32	甘草查尔酮G(Licochalcone G)	49.25	0.32
GC33	3-(2,4-二羟基苯基)-8-(1,1-二甲基丙-2-烯基)-7-羟基-5-甲氧基香豆素{3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin}	59.62	0.43
GC34	甘草利酮(licoricone)	63.58	0.47
GC35	甘草宁A(gancaonin A)	51.08	0.40
GC36	甘草宁B(gancaonin B)	48.79	0.45
GC37	3-(3,4-二羟基苯基)-5,7-二羟基-8-(3-甲基丁烯基)色酮{3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone}	66.37	0.41
GC38	5,7-二羟基-3-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基丁烯基)色酮{5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone}	30.49	0.41
GC39	2-(3,4-二羟基苯基)-5,7-二羟基-6-(3-甲基丁烯基)色酮{2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone}	44.15	0.41
GC4	豆甾醇(sitosterol)	36.91	0.75
GC40	甘氨酸(glycyrin)	52.61	0.47
GC41	地衣酮(licocoumarone)	33.21	0.36
GC42	甘草异黄酮(licoisoflavone)	41.61	0.42
GC43	甘草异黄酮B(licoisoflavone B)	38.93	0.55
GC44	甘草异黄酮A(licoisoflavone A)	52.47	0.54
GC45	金翅果芸香碱(shinpterocarpin)	80.30	0.73
GC46	(E)-3-[3,4-二羟基-5-(3-甲基丁烯基)苯基]-1-(2,4-二羟基苯基)丙-2-烯-1-酮{(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one}	46.27	0.31
GC47	新甘草苷(liquiritin)	65.69	0.74
GC48	甘草吡喃香豆素(licopyranocoumarin)	80.36	0.65

表 2 (续)

序号	分子名称	OB/%	DL
GC49	葛兰素(glyzaglabrin)	61.07	0.35
GC5	刺芒柄花素(formononetin)	69.67	0.21
GC50	光甘草定(glabridin)	53.25	0.47
GC51	光甘草宁(glabranin)	52.90	0.31
GC52	光甘草素(glabrene)	46.27	0.44
GC53	光甘草酮(glabrone)	52.51	0.50
GC54	1,3-二羟基-9-甲氧基-6-苯并呋喃并[3,2-c]色酮{1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone}	48.14	0.43
GC55	1,3-二羟基-8,9-二甲氧基-6-苯并呋喃[3,2-c]色酮{1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone}	62.90	0.53
GC56	黄甘草异黄酮A(eurycarpin A)	43.28	0.37
GC57	(-)-中果皮碱[(-)-medicocarpin]	40.99	0.95
GC58	乌拉尔宁(sigmoidin-B)	34.88	0.41
GC59	(2R)-7-羟基-2-(4-羟基苯基)色满-4-酮{(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one}	71.12	0.18
GC6	甘草酮a(licochalcone a)	40.79	0.29
GC60	(2S)-7-羟基-2-(4-羟基苯基)-8-(3-甲基丁烯基)色胺-4-酮{(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one}	36.57	0.32
GC61	异甘草醇(isoglycyrol)	44.70	0.84
GC62	异甘草酚(isolicoflavonol)	45.17	0.42
GC63	母乳低聚糖(HMO)	38.37	0.21
GC64	1-甲氧基菜豆素(1-methoxyphaseollidin)	69.98	0.64
GC65	槲皮素二聚体(queretin der.)	46.45	0.33
GC66	3'-羟基-4'-O-甲基苯胺(3'-hydroxy-4'-O-Methylglabridin)	43.71	0.57
GC67	3'-甲氧基光甘草定(3'-methoxyglabridin)	46.16	0.57
GC68	2-[(3R)-8,8-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[6,5-f]铬-3-基]-5-甲氧基苯酚{2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol}	36.21	0.52
GC69	炎性香豆素A(inflacoumarin A)	39.71	0.33
GC7	驴食草酚(vestitol)	74.66	0.21
GC70	顺式-5-二十碳烯酸(icos-5-enoic acid)	30.70	0.20
GC71	甘草黄酮F(kanzonol F)	32.47	0.89
GC72	6-戊烯基癸基(6-prenylated eriodictyol)	39.22	0.41
GC73	7,2',4'-三羟基-5-甲氧基-3-芳基香豆素(7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin)	83.71	0.27
GC74	7-乙酰氧基-2-甲基异黄酮(7-acetoxy-2-methylisoflavone)	38.92	0.26
GC75	8-戊烯基癸基(8-prenylated eriodictyol)	53.79	0.40
GC76	钗酸(gadelaidic acid)	30.70	0.20
GC77	甘草宁G(gancaonin G)	60.44	0.39
GC78	甘草宁H(gancaonin H)	50.10	0.78
GC79	利考果皮素(licoagrocarpin)	58.81	0.58
GC8	高丽槐素(inermine)	75.18	0.54
GC80	粗毛甘草素M(glyasperins M)	72.67	0.59
GC81	甘草黄酮醇A(glycyrrhiza flavonol A)	41.28	0.60
GC82	地衣异黄酮(licoagroisoflavone)	57.28	0.49
GC83	芳香膜菊素(odoratin)	49.95	0.30
GC84	菜豆素(phaseol)	78.77	0.58
GC85	2-(2,2-二甲基-2H-铬-6-基)-8,8-二甲基-2,3-二氢-8H-吡喃[2,3-f]铬-4-酮(xambioona)	54.85	0.87
GC86	脱氢酶C(dehydroglyasperins C)	53.82	0.37
GC9	戊酸二氟米松(DFV)	32.76	0.18

注:A1、B1、C1代表黄芪和甘草共同拥有的3个成分,HQ1-HQ18代表黄芪中的主要成分,GC1-GC86代表甘草中的主要成分。OB为口服生物利用度,DL为药物相似性。

2.2 黄芪汤抗肝纤维化潜在靶点的筛选 首先通过TCMSP数据库预测黄芪汤中化合物的靶点,Swisstarget

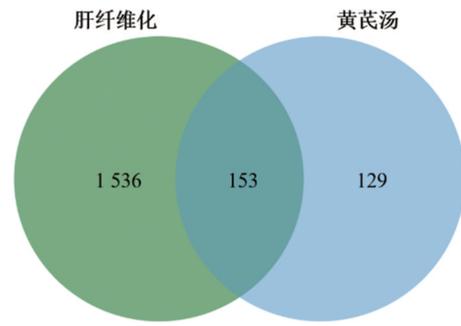
prediction数据库再筛选做补充,最后为了标准化蛋白质靶点信息,统一在Uniprot数据库(<https://www>.

uniprot.org)中将蛋白质靶点进行规范。黄芪成分中筛选出 253 个靶点,甘草成分中筛选出 226 个靶点,合并后删除重复值,共得到 282 个靶点。

通过 Genecards 数据库,根据一般经验筛选获得肝纤维化靶点 1 643 个。结合 OMIM 数据库补充相关靶点,合并后删除重复值,最终得到 1 689 个与肝纤维化相关靶点。

将上述化合物靶点和疾病靶点通过微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn>)取交集,绘制出韦恩(VENN)图^[8],共筛选出 153 个黄芪汤成分抗肝纤维化的潜在作用靶点。见图 2。

2.3 黄芪汤成分-疾病靶点交集信号通路分析 应用 Metascape 数据库对黄芪汤抑制肝纤维化相关靶点进行信号通路分析,借助 Origin Lab 2018 对结果可视化。KEGG 富集分析结果显示,核心靶点与癌症途径、乙型肝炎、晚期糖基化终末产物(AGEs)-糖基化终末产物受



注:交集部分为黄芪汤抗肝纤维化的潜在靶点。

图 2 黄芪汤和肝纤维化靶点韦恩图

体(RAGE)信号通路、癌症中的蛋白多糖白介素-17(IL-17)信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B(PI3K-Akt)信号通路、5'-单磷酸腺苷依赖的蛋白激酶(AMPK)信号通路、分泌型糖蛋白 Wnt 信号通路等密切相关。见图 3。

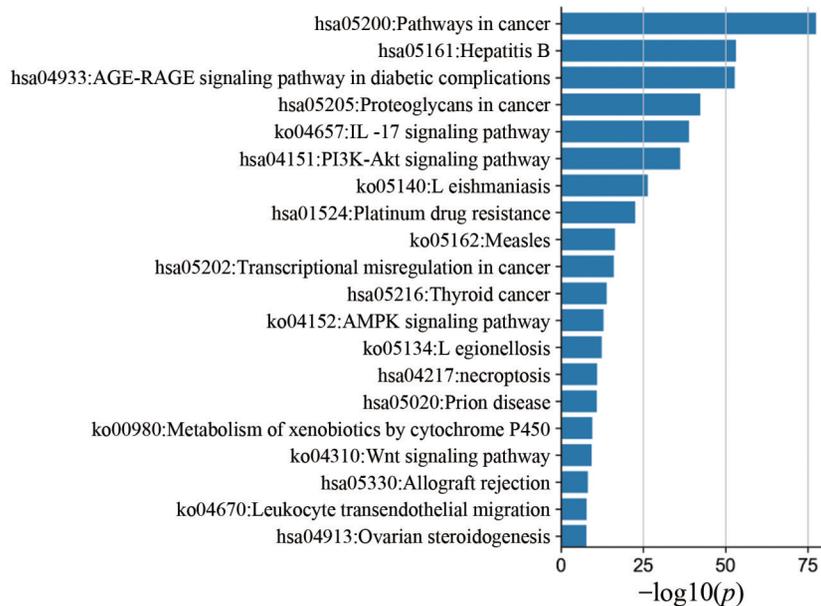


图 3 黄芪汤成分-疾病靶点京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析图

2.4 黄芪汤抗肝纤维化潜在靶点-信号通路网络图的构建 运用 CytoScape 3.8.1 构建黄芪汤抗肝纤维化靶点-通路网络,得到黄芪和甘草成分与肝纤维化交集靶点以及核心通路网络。见图 4。

2.5 黄芪汤对 LX-2 细胞活化的影响 体外研究黄芪汤对 LX-2 细胞活化的影响,结果发现,与正常对照组比较,黄芪汤高、低剂量组均可显著下调 LX-2 细胞 α -SMA、Col-I 蛋白和 mRNA 表达($P<0.05$),提示黄芪汤可体外抑制 HSC 的活化及胶原生成。见图 5。

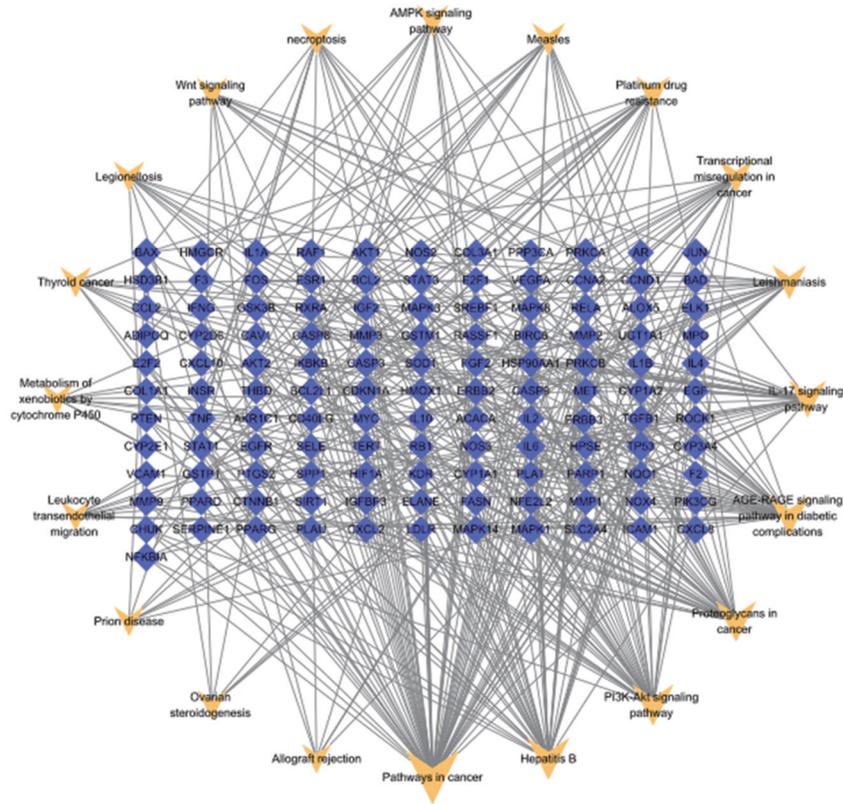
2.6 黄芪汤对 LX-2 细胞 PI3K-Akt 信号通路的影响 体外研究黄芪汤对 LX-2 细胞 PI3K-Akt 信号通路的影响,结果发现,与正常对照组比较,黄芪汤高、低剂量组可显著下调 LX-2 细胞 PI3K 蛋白及 mRNA 表达,黄芪汤

高、低剂量组可显著抑制 Akt 蛋白磷酸化($P<0.05$),提示黄芪汤可体外抑制 PI3K/Akt 信号通路。见图 6。

3 讨论

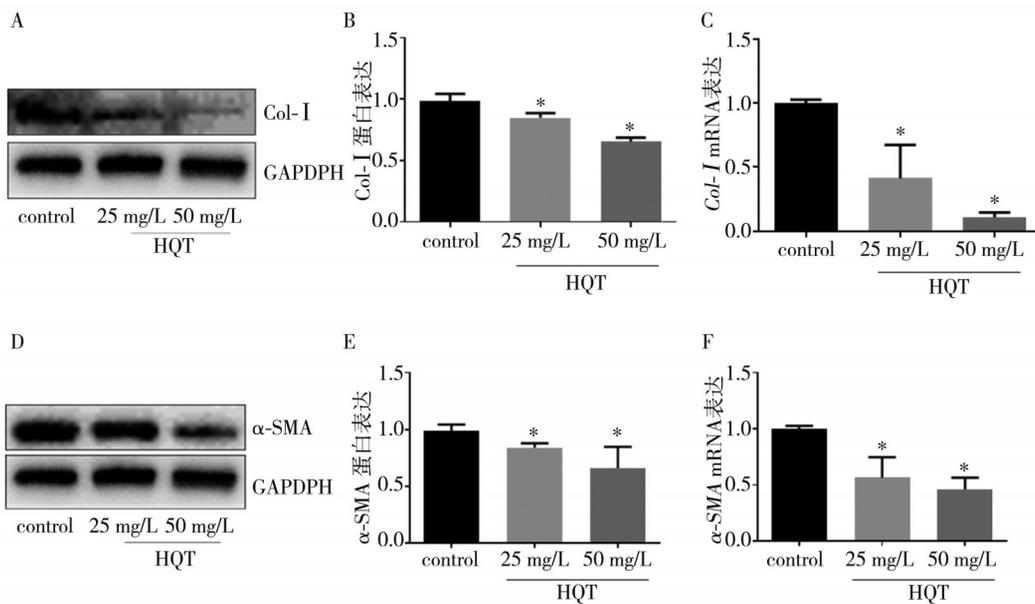
肝纤维化是一种病理性病变,其特征是胞外基质(ECM)在窦周间隙中逐渐积累,是多种慢性肝病的共同病理环节^[9]。如果未得到适当及时的干预,肝纤维化可进一步发展为肝硬化,而肝硬化是全世界最常见的致死性疾病之一^[10]。HSC 的活化在肝纤维化的进展中起着核心作用,减慢肝损伤中活化 HSC 的增殖是解决和治疗肝纤维化的重要策略^[11]。

黄芪汤由黄芪、甘草组成,现代药理研究^[12]发现其主要有效成分为黄芪皂苷、黄芪多糖等,具有调节免疫、促进机体代谢、抗菌等作用。动物实验研究^[13-16]发



注:蓝色菱形为黄芪汤抗肝纤维化核心靶点,橘色箭头为黄芪汤抗肝纤维化核心通路。节点面积代表其度值,面积越大表示该节点越重要。

图4 黄芪汤抗肝纤维化核心靶点-关键通路网络图

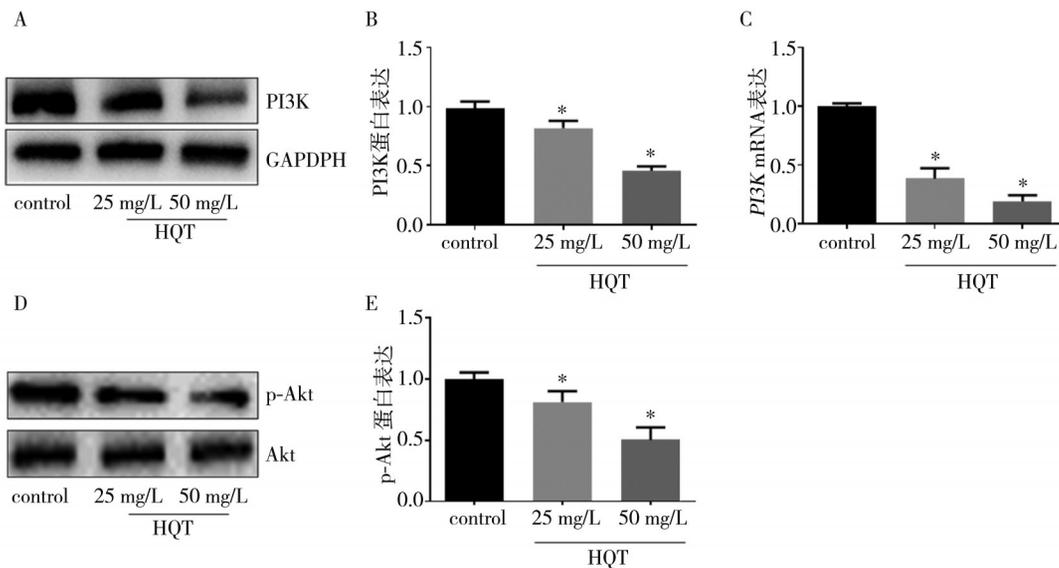


注:图A、D为蛋白表达条带图,图B、E为蛋白表达半定量分析结果,图C、F为基因表达变化。 α -SMA为 α 平滑肌肌动蛋白,Col-I为I型胶原蛋白,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。HQT为黄芪汤,control为正常对照组,25 mg/L为黄芪汤低剂量组,50 mg/L为黄芪汤高剂量组。与control组比较,* $P < 0.05$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图5 黄芪汤对LX-2细胞活化的影响

现其可以改善二甲基亚硝胺(DMN)模型大鼠肝纤维化,改善肝组织病理,降低肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量,提高肝组织SOD活性,进而提高抗氧化应激效应。黄芪和甘草等均可以通过抑制HSC活化、减少胶原形成^[13,17]等起到抗肝纤维化的作用。黄芪汤抗肝纤维化

的作用明确,但其作用机制仍不清楚。网络药理学从整体角度出发,通过药物、靶点、疾病之间的关系分析揭示药物的作用机制,非常适合研究中药复方多成分、多靶点的作用,为中药复方的研究提供了新的思路,因此本研究基于网络药理学结合体外细胞实验进一步探



注:图A、D为蛋白表达条带图,图B、E为蛋白表达半定量分析结果,图C为基因表达变化。PI3K为磷脂酰肌醇-3-激酶,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,p-Akt为磷酸化蛋白激酶B,Akt为蛋白激酶B。HQT为黄芪汤,control为正常对照组,25 mg/L为黄芪汤低剂量组,50 mg/L为黄芪汤高剂量组。与control组比较,* $P < 0.05$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

图6 黄芪汤对LX-2细胞中PI3K/Akt通路的影响

讨黄芪汤抗肝纤维化的作用机制。

本研究首先基于网络药理学预测出黄芪汤抗肝纤维化的潜在靶点及机制,并进一步通过KEGG信号通路分析,发现黄芪汤与IL-17信号通路、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、PI3K/Akt信号通路、AMPK信号通路、Wnt信号通路等密切相关;而这些与癌症途径、乙型肝炎、癌症中的蛋白多糖、利什曼病、铂类耐药、麻疹、癌症中的转录失调、甲状腺癌、朊病毒病、细胞色素P450对外源物质的代谢作用等密切相关^[18-23]。其中PI3K/Akt信号通路与肝纤维化的发展密切相关。PI3K是与胞内信号传导相关的第二信使,由p85调节亚基和p110催化亚基构成的异二聚体,具有磷脂酰肌醇激酶和丝/苏氨酸激酶双重活性^[24]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶之一的Akt是PI3K下游的重要靶基酶。肝纤维化中TGF- β 、血小板源性生长因子、胰岛素样生长因子、表皮生长因子及瘦素等可通过自分泌或旁分泌的方式对PI3K/Akt通路产生影响。PI3K诱导的Akt活化可促进HSC增殖活化^[25]。网络药理学分析提示,黄芪汤对PI3K/Akt信号通路具有调节作用,因此本研究进一步采用体外细胞实验验证黄芪汤对PI3K/Akt信号通路的影响。

LX-2细胞是一种体外自活化的肝星状细胞。本研究以黄芪汤干预LX-2细胞,结果发现黄芪汤可抑制HSC活化标志物 α -SMA水平,降低Col-I的表达,提示黄芪汤可抑制LX-2细胞活化。进一步观察黄芪汤对PI3K/Akt信号通路的影响,结果发现黄芪汤可抑制LX-2细胞PI3K表达,下调Akt磷酸化水平。以上结果表明抑制PI3K/Akt信号通路、抑制HSC活化可能是黄芪汤

抗肝纤维化的部分作用机制。

综上所述,本研究通过网络药理学分析,发现黄芪汤抗肝纤维化具有多成分、多靶点、多信号通路特点。其中PI3K/Akt信号通路可通过活化HSC,在肝纤维化发生发展中起重要作用。体外实验验证黄芪汤可通过调控PI3K/Akt信号通路抑制HSC的活化,从而起到抗肝纤维化的作用,这为发掘黄芪汤潜在作用机制提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] GBD 2013 Risk Factors Collaborators, FOROUZANFA M H, ALEXANDER L, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. Lancet, 2015, 386(10010): 2287-2323.
- [2] BARNETT R. Liver cirrhosis[J]. Lancet, 2018, 392(10144): 275.
- [3] ZOUBEK M E, TRAUTWEIN C, STRNAD P. Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2017, 31(2): 129-141.
- [4] 龙爱华,刘平,李风华,等.不同配比黄芪汤干预大鼠胆汁淤积性肝硬化作用观察[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(7): 28-30.
- [5] 白雪,陆璐,刘振权,等.黄芪甲苷抗二甲亚硝胺诱导肝纤维化大鼠效应研究[J].湖南中医药大学学报,2020,40(1): 22-27.
- [6] CHENG L, MINGYU S, LEI W, et al. Effects of Yinchenhao Tang and related decoctions on DMN-induced cirrhosis/fibrosis in rats[J]. Chin Med, 2008, 3: 1.
- [7] 边艳琴,刘平,孙明瑜.基于方证相关理论解析肝硬化湿热内蕴病机[J].世界科学技术-中医药现代化,2016,18(9): 1477-1482.
- [8] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, et al. jvenn: an interactive Venn diagram viewer[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 293.
- [9] SCHUPPAN D, AFDHAL N H. Liver cirrhosis[J]. Lancet, 2008, 371

(9615): 838-851.

[10] LIM Y S, KIM W R. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease[J]. Clin Liver Dis, 2008, 12(4): 733-746.

[11] EZHILARASAN D, SOKAL E, NAJIMI M. Hepatic fibrosis: It is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2018, 17(3): 192-197.

[12] 刘畅,刘平,慕永平,等. 黄芪汤治疗慢性肝病研究进展[J]. 世界中医药, 2015, 10(2): 157-161.

[13] 王骆冰,闫秀川,曾贞,等. 扶正化癥方与黄芪汤合用对实验性肝硬化大鼠的治疗作用[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(13): 1740-1744.

[14] 张贵彪,孙明瑜,宋雅楠,等. 基于基因表达谱分析黄芪汤改善大鼠肝纤维化的分子机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1634-1639.

[15] 张晓岚,王占魁,姜慧卿. 氧化应激与肝纤维化[J]. 临床肝胆病杂志, 2007, 23(3): 226-229.

[16] 王磊,刘平,王春树,等. 不同功效古典方剂对肝硬化大鼠肝组织氧化应激反应的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(5): 435-439.

[17] 董玲,孙剑勇,朱新宇,等. 甘草酸对肝星状细胞增殖、活化和细胞外基质合成的影响[J]. 中国临床医学, 2006, 13(1): 70-71.

[18] ZHOU Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523.

[19] HOCHBERG Y, BENJAMINI Y. More powerful procedures for multiple significance testing[J]. Stat Med, 1990, 9(7): 811-818.

[20] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-2504.

[21] STARK C, BREITKREUTZ B J, REGULY T, et al. BioGRID: a general repository for interaction datasets [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Database issue): D535-D539.

[22] LI T, WERNERSSON R, HANSEN R B, et al. A scored human protein-protein interaction network to catalyze genomic interpretation [J]. Nat Methods, 2017, 14(1): 61-64.

[23] BADER G D, HOGUE C W. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks [J]. BMC Bioinformatics, 2003, 4: 2.

[24] ZHANG Q, XIANG S, LIU Q, et al. PPAR γ antagonizes hypoxia-induced activation of hepatic stellate cell through cross mediating PI3K/AKT and cGMP/PKG signaling [J]. PPAR Res, 2018, 2018: 6970407.

[25] LANG T, IKEJIMA K, YOSHIKAWA M, et al. Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(3): 1091-1095.

编辑:季春来

收稿日期:2021-01-25



河南舞阳 王文浩作

中宣部宣教局 中国文明网