

文章编号 1006-8147(2021)06-0595-08

论 著

## 基于网络药理学、分子对接及实验探讨茵陈蒿汤调节阻塞性黄疸氧化应激的作用机制

陈帅<sup>1</sup>, 刘军舰<sup>2</sup>, 尚海涛<sup>2</sup>, 张井虹<sup>1</sup>, 李忠廉<sup>2</sup>

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市中西医结合医院肝胆胰第二外科, 天津 300100)

**摘要** 目的: 运用网络药理学探讨茵陈蒿汤调节阻塞性黄疸氧化应激的作用机制, 并用分子对接及免疫组化进行验证。方法: 首先利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)和 UniProt 数据库检索并筛选茵陈蒿汤有效成分及作用靶点; 通过 Gene Cards 数据库检索阻塞性黄疸的作用靶点; 利用 R 语言将疾病与药物的有效靶点进行分析, 确定交集靶点; 通过 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建蛋白互作网络; 利用 R 语言进行基因本体论(GO)生物学过程富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析; 利用 Autodock\_vina 软件对内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)和茵陈蒿汤主要化学成分进行分子对接验证; 最后通过免疫组织化学方法(IHC)验证茵陈蒿汤对阻塞性黄疸大鼠肝组织中 eNOS 和 iNOS 的影响。结果: 研究共筛选获得茵陈蒿汤中 29 个有效成分及 177 个作用靶点, 阻塞性黄疸的 2 183 个疾病靶点, 茵陈蒿汤和阻塞性黄疸的交集靶点 123 个; 经 GO 和 KEGG 富集分析得到 133 个 GO 生物过程和 127 个相关信号通路, 主要涉及 Hepatitis B、流体剪应力与动脉粥样硬化、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)-蛋白激酶 B(Akt)、肝细胞癌、低氧诱导因子(HIF)-1 等信号通路; 拓扑属性分析发现槲皮素、山奈酚、异鼠李素等主要成分和 Akt1、TP53、白细胞介素(IL)6、血管内皮生长因子(VEGF)A、eNOS 和 iNOS 等关键靶点。分子对接验证表明, eNOS 和 iNOS 蛋白与槲皮素、山奈酚、异鼠李素有较好的亲和能力; IHC 实验证明与假手术组相比, 模型组肝组织中 eNOS 表达水平降低, 而 iNOS 表达水平升高( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 茵陈蒿汤组肝组织中 eNOS 表达水平升高, iNOS 表达水平降低( $P < 0.01$ )。结论: 茵陈蒿汤对阻塞性黄疸的作用具有多成分、多靶点、多通路的特点, 茵陈蒿汤对阻塞性黄疸氧化应激的调节可能与改变 eNOS、iNOS 蛋白的表达有关。

**关键词** 茵陈蒿汤; 阻塞性黄疸; 网络药理学; 分子对接; eNOS; iNOS

中图分类号 R285

文献标志码 A

## Based on network pharmacology, molecular docking, and experiments to explore the mechanism of Yinchenhao Decoction in regulating oxidative stress of obstructive jaundice

CHEN Shuai<sup>1</sup>, LIU Jun-jian<sup>2</sup>, SHANG Hai-tao<sup>2</sup>, ZHANG Jing-hong<sup>1</sup>, LI Zhong-lian<sup>2</sup>

(1. Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of The Second Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Tianjin Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tianjin 300100, China)

**Abstract Objective:** To explore the mechanism of Yinchenhao Decoction in regulating oxidative stress of obstructive jaundice by network pharmacology, and to verify it by molecular docking and immunohistochemistry. **Methods:** TCMSPP and UniProt database were used to search and screen the effective components and targets of Yinchenhao Decoction. Gene Cards database was used to search the targets of obstructive jaundice. R language was used to analyze the effective targets of diseases and drugs to determine the intersection targets. STRING database and Cytoscape software were used to construct Protein Interaction network. R language was used to analyze the biological process of Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Autodock\_Vina software was used to verify the molecular docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and main chemical components in Yinchenhao Decoction. Finally, the effect of Yinchenhao Decoction on eNOS and iNOS in liver tissue of rats with obstructive jaundice was verified by immunohistochemistry (IHC). **Results:** A total of 29 active components and 177 targets in Yinchenhao Decoction, 2 183 disease targets in obstructive jaundice and 123 intersection targets in Yinchenhao Decoction and obstructive jaundice were screened. Through GO and KEGG enrichment analysis, 133 GO biological processes and 127 related signaling pathways were obtained, mainly involving the signaling pathways of hepatitis B, fluid shear stress and atherosclerosis, MAPK, PI3K-Akt, hepatocellular carcinoma, HIF-1 and so on. The main components of the content of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin and the key targets of Akt1, TP53, IL6, VEGFA, eNOS and iNOS were found by Topological Analysis. Molecular docking showed that eNOS and iNOS proteins had good affinity with Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin. IHC experiment showed that com-

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81273952); 天津市中医药重点领域科技项目(2019003)

作者简介 陈帅(1993-), 男, 医师, 硕士在读, 研究方向: 中西医结合治疗肝胆胰外科疾病; 通信作者: 李忠廉, E-mail: nkyyzl@163.com。

pared with sham operation group, the expression level of eNOS in model group was lower ( $P<0.05$ ); compared with model group, the expression level of eNOS and iNOS in Yinchenhao Decoction group were increased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** The effect of Yinchenhao Decoction on obstructive jaundice has the characteristics of multi-component, multi-target, and multi-pathway. The regulation of Yinchenhao Decoction on oxidative stress of obstructive jaundice may be related to the change of eNOS and iNOS protein expression.

**Key words** Yinchenhao Decoction; obstructive jaundice; network pharmacology; molecular docking; eNOS; iNOS

阻塞性黄疸(obstructive jaundice, OJ)是指由胆道内或胆道邻近部位的良、恶性病变阻碍胆汁经由胆道流入十二指肠引发胆道内压力增高,胆汁由肝细胞和毛细胆管逆流入血窦、窦周,使血中结合胆红素水平升高引起的黄疸<sup>[1]</sup>。阻塞性黄疸可以引起机体发生炎症、内毒素血症、肝脏血流动力学改变、氧自由基增多等,从而造成肝损伤<sup>[2-3]</sup>。目前利用外科手段积极处理病因是西医治疗的首要方法,但中药方剂对保守治疗、术前减黄及解除梗阻后加快黄疸消退、改善肝功能有较大作用<sup>[4]</sup>。茵陈蒿汤由茵陈、大黄、栀子三味药组成,是治疗湿热黄疸的常用方。氧化应激是肝损伤病理过程中的一个重要因素,众多研究证实茵陈蒿汤可以改善 OJ 引起的肝损伤,但对其作用机制缺乏系统的研究。网络药理学能够系统观察药物对疾病网络的干预与影响,这与复方中药多成分、多途径和多靶点协同作用的原理殊途同归<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方法

1.1 茵陈蒿汤的有效成分及靶点的收集与筛选 通过TCMSP 数据库搜索茵陈蒿汤中药物(茵陈、大黄、栀子)的化学成分,并以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) $\geq 0.18$ 为筛选标准,得到茵陈蒿汤的有效化学成分及其对应的靶点蛋白。

1.2 疾病靶点获取 通过 Gene Cards 数据库检索关键词“obstructive jaundice”,得到 OJ 的相关靶点。

1.3 茵陈蒿汤和 OJ 的靶点交集 运用 Excel 中 VLOOKUP 函数以及 UniProt 数据库对茵陈蒿汤中化学成分靶点蛋白的基因名称进一步规范。利用 R4.0.2 软件将茵陈蒿汤的作用靶点与 OJ 的靶点进行交集分析,获得茵陈蒿汤和 OJ 的交集靶点,并绘制 Venny 图。并通过 Cytoscape 软件,对茵陈蒿汤中有效成分和交集靶点进行拓扑属性分析。

1.4 交集靶点蛋白相互作用(protein protein interaction, PPI)网络构建 将交集靶点导入 STRING 数据库,将蛋白种属设置为“Homo sapiens”,去除孤立的靶点蛋白,其余参数均保持默认,获得茵陈蒿汤与 OJ 交集靶点的蛋白相互作用关系网络数据。通过 Cytoscape 软件进行网络可视化及网络拓扑属性分析。

1.5 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 将 Bioconductor 数据库导入 R 软件,利用 R 软件对茵陈蒿汤与 OJ 的交集靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,并将其结果绘制成柱状图与气泡图进行可视化。

1.6 分子对接验证 从 TCMSP 数据库中导出茵陈蒿汤主要成分的分子结构,保存为 mol2 格式,利用 Autodock Tools4.2.6 软件调整电荷、判定配体的 root、选择配体可扭转的键,并保存为 pdbqt 格式。从 PDB 数据库中获得 eNOS 和 iNOS 的蛋白结构,通过 PyMol2.4.1 软件去除水分子及原配体,然后利用 Autodock Tools 给蛋白加氢、计算电荷、添加原子类型,并保存为 pdbqt 格式。再通过 Autodock Tools 获得活性位点中心及盒子大小等对接信息,默认设置为 energy\_range=3, exhaustiveness=100。最后运用 Autodock-vina1.1.2 执行分子对接计算,通过 PyMol 软件实现对接结果可视化,建立分子对接模式图。

## 1.7 免疫组化实验验证

1.7.1 药材、试剂 依据《伤寒论》中茵陈蒿汤剂量组成折合:茵陈 180 g, 栀子 150 g, 大黄 60 g, 共计 390 g 中药购于天津市南开医院中药制剂室,取 2 次煎煮液浓缩至 390 mL,每 mL 含生药量 1 g。

免疫组化试剂:4%多聚甲醛、多聚赖氨酸、抗原修复液、山羊血清封闭液、一抗:NOS3(A-9):sc-376751, NOS2(C-11):sc-7271(购自 SANTA CRUZ 生物公司);二抗:IgG;辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP);DAB 显色试剂盒;苏木素等。

1.7.2 动物模型制备及分组给药 成年 Sprague-Dawley(SD)大鼠 36 只,体重 200~230 g,雄性,SPF 级,购自北京华阜康生物科技股份有限公司(实验动物使用许可证号:SCXK 京 2014-0004;动物伦理委员会通过编号:NKYY-DWLL-2019-081)。应用随机数字表法将大鼠分为假手术组(A 组)、模型组(B 组)、茵陈蒿汤组(C 组),每组 12 只。B 组和 C 组于大鼠胆总管中上 1/3 行双重结扎,手术 3 d 后观察大鼠小便颜色变黄即说明 OJ 模型建立成功。A 组游离上段胆总管后关腹。大鼠自建模后第 3 天起 C 组每日给予茵陈蒿汤剂 3.6 mL/kg(相当于生药 1 g/mL)灌胃, A 组和 B 组每日给予等量生理盐水灌胃。手术

后 10 d 处死大鼠,并留取肝组织进行 IHC 检测。

1.7.3 免疫组化 取 A 组、B 组、C 组大鼠肝组织,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗,取少量组织块;用 4%多聚甲醛进行固定,多级脱水、包埋成石蜡组织块,按 5  $\mu$ m 切片,附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上,60℃过夜;将切片经二甲苯及多级乙醇脱蜡;放入抗原修复液、正常山羊血清封闭液,进行 eNOS 及 iNOS 免疫组化,最后加入 DAB 试剂和苏木素染色,显微镜下观察,进行 400×的显微照相,选择有意义的组织相进一步分析。

1.7.4 统计学处理 实验结果采用 SPSS26.0 软件

进行分析,采用单因素方差分析进行多组间比较,且符合方差齐性就采用 *LSD* 检验方法,实验结果以  $\bar{x}\pm s$  及柱状图表示, $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 茵陈蒿汤有效成分筛选 通过在 TCMSP 数据库中检索,根据  $OB\geq 30\%$ 、 $DL\geq 0.18$  的标准进行筛选,获得 44 个有效成分。茵陈、大黄、栀子分别筛选到 13、16、15 种有效成分(表 1),其中  $\beta$ -谷甾醇(*beta-sitosterol*)为茵陈、大黄、栀子三者的共有成分,槲皮素(*quercetin*)为茵陈和栀子的共有成分。

表 1 茵陈蒿汤主要有效成分及相关参数

Tab 1 Main effective components and related parameters of Yinchenhao Decoction

TCMSP-ID	化合物名称	中药	TCMSP-ID	化合物名称	中药
MOL000358	beta-sitosterol	茵陈、大黄、栀子	MOL009038	GBGB	栀子
MOL004609	Areapillin	茵陈	MOL000098	quercetin	茵陈、栀子
MOL005573	Genkwanin	茵陈	MOL000354	isorhamnetin	茵陈
MOL007274	Skrofullein	茵陈	MOL008043	capillarisin	茵陈
MOL008039	Isoarcapillin	茵陈	MOL008045	4'-Methylcapillarisin	茵陈
MOL008040	Eupalitin	茵陈	MOL008046	Demethoxycapillarisin	茵陈
MOL008041	Eupatolitin	茵陈	MOL008047	Artepillin A	茵陈
MOL002235	EUPATIN	大黄	MOL002281	Toralactone	大黄
MOL002251	Mutatochrome	大黄	MOL002288	Emodin-1-O-beta-D-glucopyranoside	大黄
MOL002259	Physciondiglucoside	大黄	MOL002293	Sennoside D_qt	大黄
MOL002260	Procyanidin B-5,3'-O-gallate	大黄	MOL002297	Daucosterol_qt	大黄
MOL002268	rhein	大黄	MOL002303	palmidin A	大黄
MOL002276	Sennoside E_qt	大黄	MOL000471	aloe-emodin	大黄
MOL002280	Torachryson-8-O-beta-D-(6'-oxayl)-glucoside	大黄	MOL000554	gallicacid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	大黄
MOL001406	crocetin	栀子	MOL000096	(-)-catechin	大黄
MOL001941	Ammidin	栀子	MOL001494	Mandenol	栀子
MOL004561	Sudan III	栀子	MOL001942	isoimperatorin	栀子
MOL000422	kaempferol	栀子	MOL002883	Ethyl oleate(NF)	栀子
MOL000449	Stigmasterol	栀子	MOL001506	Supraene	栀子
MOL001663	(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10R,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid	栀子	MOL007245	3-Methylkempferol	栀子
			MOL003095	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	栀子

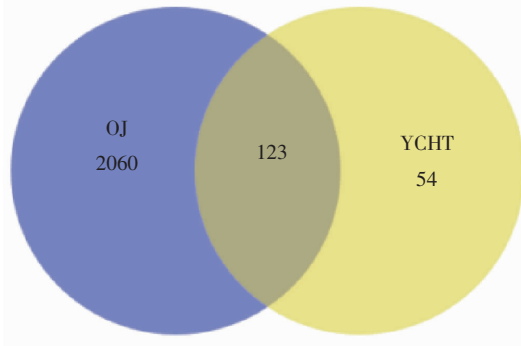
2.2 茵陈蒿汤和 OJ 的靶点交集分析 将茵陈蒿汤中 41 个化学成分及其对应的靶点蛋白,运用 Excel 中 VLOOKUP 函数以及 UniProt 数据库剔除重复项并规范基因名称,得到 29 个化学成分及对应的 177 个靶点。通过在 GeneCards 数据库中检索 OJ 相关靶点,共得到 2 183 个疾病相关靶点。将茵陈蒿汤的作用靶点与 OJ 的靶点进行交集分析,得到 123 个交集

靶点基因,如图 1。将茵陈蒿汤化学成分和交集靶点导入 Cytoscape 软件进行网络拓扑属性分析,筛选出前 5 个主要化合成成分,见表 2。

2.3 交集靶点 PPI 网络构建 将交集靶点导入 STRING 数据库,获取蛋白互作信息(其中有 1 个蛋白未参与互作)。将蛋白互作信息导入到 Cytoscape 软件进行网络拓扑属性分析,得到茵陈蒿汤和 OJ



交集靶点 PPI 网络(图 2)。在 PPI 网络中,一个节点的度(Degree)表示网络中和节点相连的路线条数,该网络由 122 个节点组成,其中节点的大小与 Degree 成正比,Degree 越大颜色越红,表示靶点作用途径更多。根据节点的 Degree 绘制出前 15 个关键靶点的条形图(图 3)。



注:OJ:阻塞性黄疸

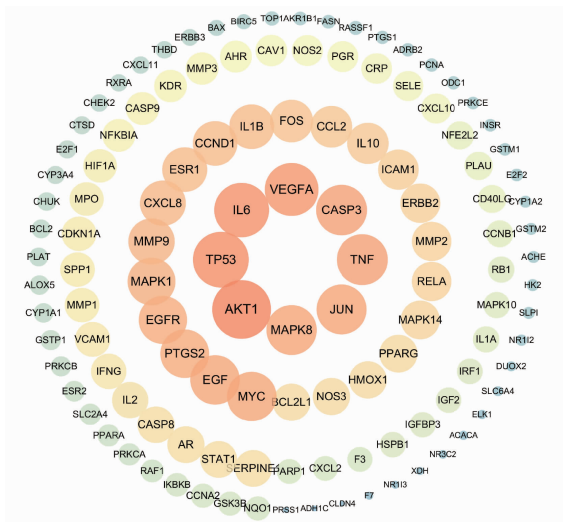
图 1 茵陈蒿汤和 OJ 的交集靶点韦恩图

Fig 1 Venny diagram of intersection target of Yinchenhao Decoction and OJ

表 2 前 5 个与交集靶点对应的主要化合物

Tab 2 The first five main compounds corresponding to the intersection targets

TCMSP-ID	化合物名称	中文名称	对应靶点数(个)
MOL000098	quercetin	槲皮素	106
MOL000422	kaempferol	山奈酚	39
MOL000354	isorhamnetin	异鼠李素	16
MOL000471	aloe-emodin	芦荟大黄素	16
MOL000358	beta-sitosterol	β 谷甾醇	12



注:OJ:阻塞性黄疸;PPI:蛋白相互作用

图 2 茵陈蒿汤和 OJ 交集靶点 PPI 网络

Fig 2 PPI network of Yinchenhao Decoction and OJ intersection

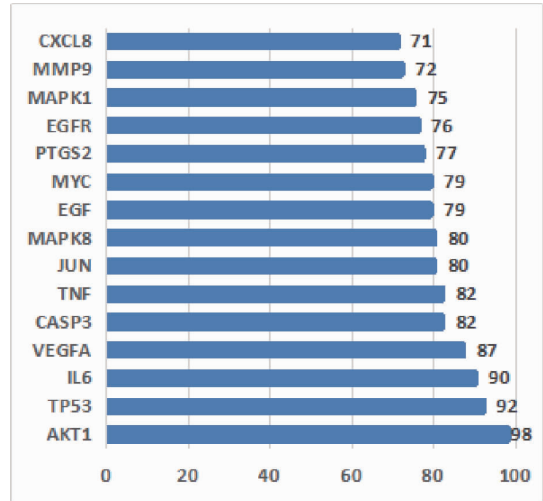


图 3 前 15 个关键靶点的条形图

Fig 3 Bar graph of top 15 key targets

2.4 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 为进一步探讨茵陈蒿汤作用于 OJ 的机制,对交集靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析。根据  $P<0.05$ , 确定了 135 个 GO 条目和 162 个 KEGG 通路,分别将靶点富集个数前 20 的 GO 条目和 KEGG 通路绘制成条形图(图 4)和气泡图(图 5),并利用 Cytoscape 软件绘制主要通路-靶点-化合物的网络图(图 6)。通过对图 6 分析发现靶点蛋白 NOS3 和 NOS2 参与氧化应激过程中的多条通路,并与茵陈蒿汤中多个化合物有关(图 7)。

2.5 分子对接验证 通过 Autodock\_vina 软件将目的蛋白 NOS3(eNOS)和 NOS2(iNOS)分别与槲皮素、山奈酚、异鼠李素进行分子对接。分子对接结果显示 eNOS 和 iNOS 与槲皮素、山奈酚、异鼠李素的最低结合能均  $<-5.0$  kcal/mol(表 3),且分子对接模式图中这些化学成分与 eNOS 和 iNOS 蛋白上多个氨基酸残基相结合(图 8)。

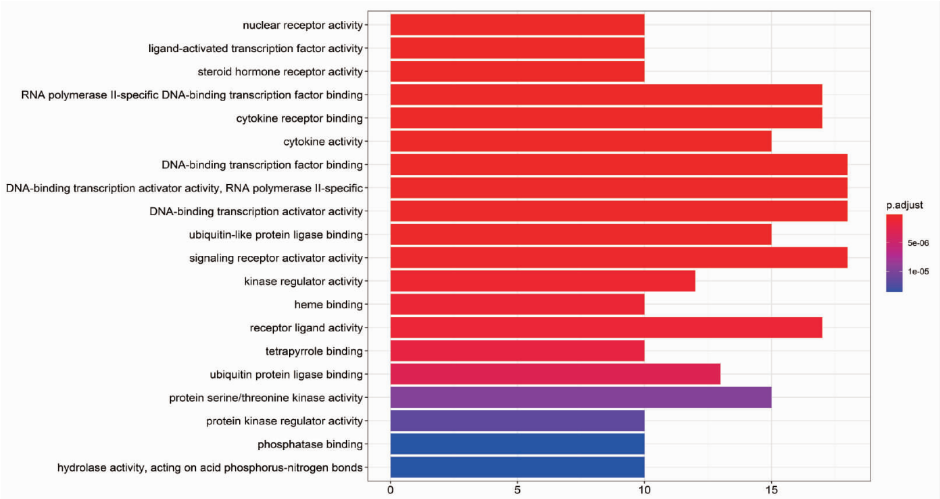
2.6 茵陈蒿汤对大鼠肝组织中 NOS3(eNOS)和 NOS2(iNOS)蛋白表达的影响 IHC 结果显示:与假手术组相比,模型组肝组织中 eNOS 平均光密度值降低,而 iNOS 平均光密度值升高( $P<0.05$ );与模型组相比,茵陈蒿汤组肝组织中 eNOS 平均光密度值升高, iNOS 平均光密度值降低( $P<0.01$ ),见图 9、10。

表 3 eNOS 和 iNOS 与主要化合物的最低结合能(kcal/mol)

Tab 3 The lowest binding energies of eNOS and iNOS with major compounds(kcal/mol)

化合物名称	槲皮素	山奈酚	异鼠李素
eNOS(3nos*)	-8.9	-9.2	-9.3
iNOS(4nos*)	-9.0	-9.4	-9.4

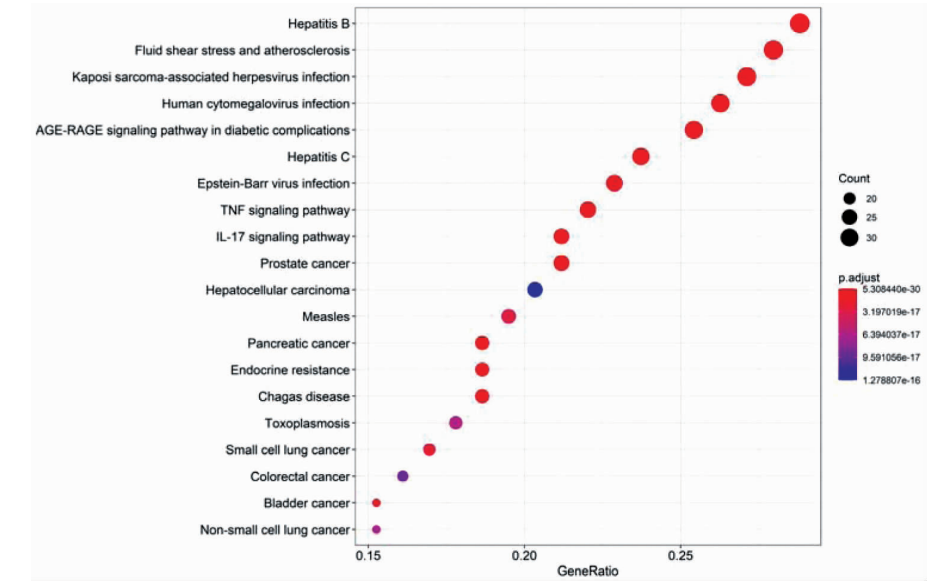
注:\* 为 PDB 数据库中蛋白的 ID;eNOS:内皮型一氧化氮合酶; iNOS:诱导型一氧化氮合酶



注:OJ:阻塞性黄疸

图 4 茵陈蒿汤治疗 OJ 作用靶点的 GO 富集条形图

Fig 4 Bar graph of GO enrichment of targets of Yinchenhao Decoction in the treatment of OJ



注:OJ:阻塞性黄疸

图 5 茵陈蒿汤治疗 OJ 作用靶点的 KEGG 富集气泡图

Fig 5 Bubble chart of KEGG enrichment of targets of Yinchenhao Decoction in the treatment of OJ

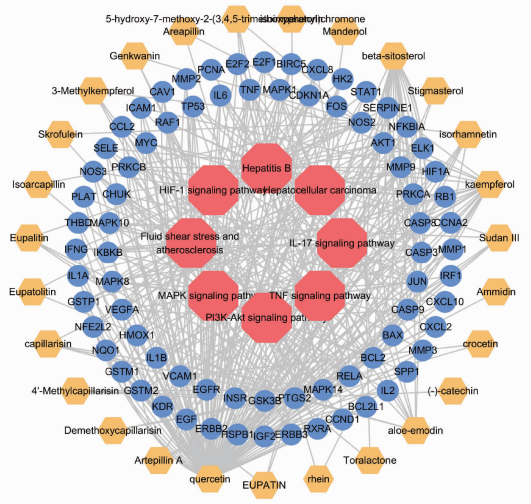
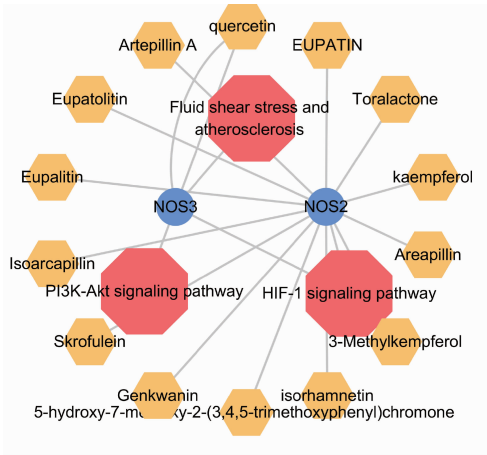


图 6 主要通路-靶点-化合物网络

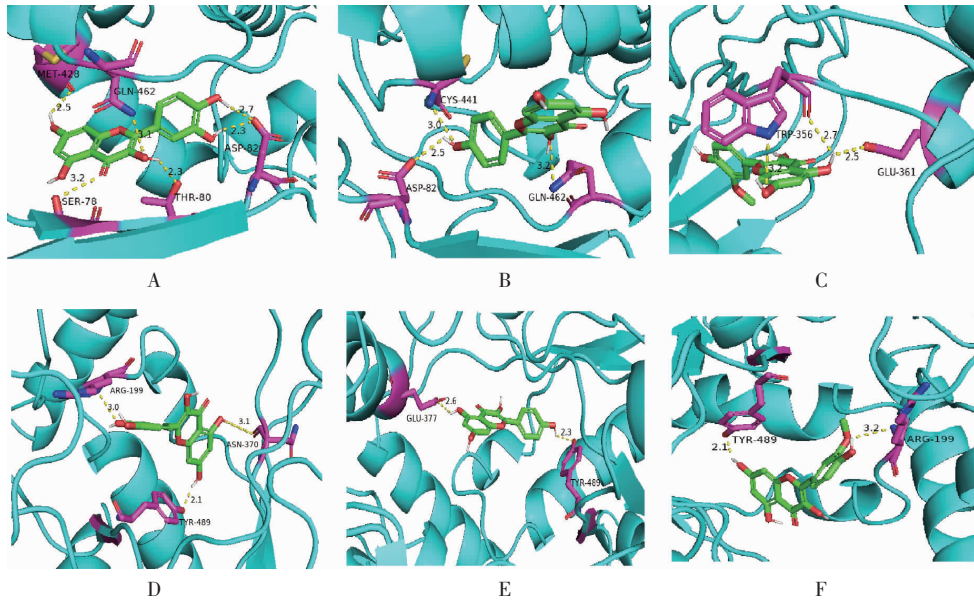
Fig 6 Main pathway-target-compound network



注:NOS:一氧化氮合酶

图 7 NOS2、NOS3 相关化合物及通路网络

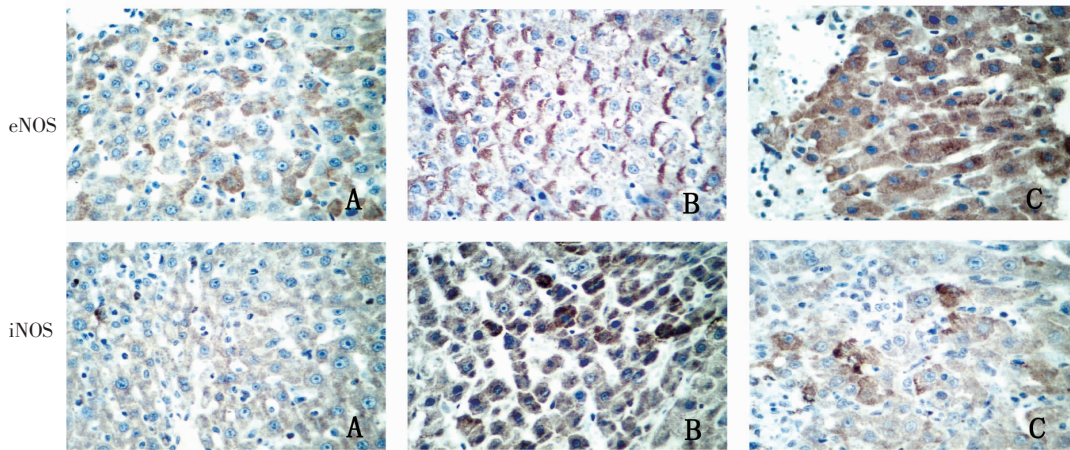
Fig 7 Network of compounds and pathways related to NOS2 and NOS3



注:A、B、C:分别为 eNOS 和槲皮素、山奈酚、异鼠李素的对接模式图;D、E、F:分别为 iNOS 和槲皮素、山奈酚、异鼠李素的对接模式图;  
eNOS:内皮型一氧化氮合酶;iNOS:诱导型一氧化氮合酶

图 8 eNOS 和 iNOS 与主要化合物的分子对接模式图

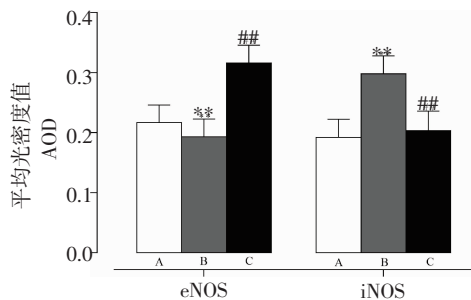
Fig 8 Molecular docking patterns of eNOS and iNOS with major compounds



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为茵陈蒿汤组;eNOS:内皮型一氧化氮合酶;iNOS:诱导型一氧化氮合酶

图 9 各组大鼠肝组织中 eNOS 和 iNOS 表达(免疫组化, 400×)

Fig 9 Expression of eNOS and iNOS in liver tissue of rats in each group(IHC, 400×)



注:A:假手术组;B:模型组;C:茵陈蒿汤组;eNOS:内皮型一氧化氮合酶;iNOS:诱导型一氧化氮合酶;与 A 组相比, \* $P<0.05$ ;与 B 组比较, \*\* $P<0.01$

图 10 各组大鼠肝组织中 eNOS、iNOS 蛋白平均光密度值比较( $\bar{x} \pm s$ )

Fig 10 Comparison of the AOD of eNOS and iNOS proteins in liver tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

中医认为黄疸发病有湿、热、寒、血瘀、脾虚等多种不同的病机,其中以湿邪为主。辨证分型以湿热蕴结为常见,治疗均以化湿邪、利小便为治疗大法,对症选用清热利湿、温中补虚、化瘀等治法<sup>[6]</sup>。茵陈蒿汤由茵陈、大黄、栀子三味药组成,方中重用茵陈为君药,以其善能清热利湿退黄,为治黄疸之主药。臣以栀子清热降火,通利三焦,助茵陈引湿热从小便而去。佐以大黄泻热逐瘀,通利大便,导瘀热由大便而下。三药合用,以利湿与泄热相伍,使二便通利,前后分消,湿热得行,瘀热得下,则黄疸自退。

本研究通过网络药理学方法,获得茵陈蒿汤的



41种有效化学成分,经过筛选规范,共收集到29个有效化学成分及对应的177个靶点,并对这些有效成分及靶点进行分析。槲皮素的作用靶点最多,它也是茵陈、栀子共有的化学成分;其次是山奈酚,以及异鼠李素、芦荟大黄素、 $\beta$ -谷甾醇等。研究表明,槲皮素是一种黄酮类化合物,具有多重生物活性,如抗氧化、抗炎、减轻肝毒性、预防肝纤维化等作用<sup>[7-8]</sup>。山奈酚是一种黄酮类化合物,通过发挥抗炎和抗氧化作用,在各种化学诱导的肝损伤模型中发挥保护作用<sup>[9]</sup>。另外,山奈酚可以降低谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)水平,减轻肝细胞损伤和凋亡<sup>[10]</sup>。 $\beta$ -谷甾醇在抗氧化、抗炎、免疫调节、抗肿瘤等方面表现出良好的药理作用<sup>[11]</sup>。此外,现代药理研究表明,茵陈蒿汤的茵陈色原酮、Artepillin A、芦荟大黄素等成分具有促进胆汁分泌和排泄的作用<sup>[11]</sup>。通过药物与疾病靶点交集得到123个交集靶点。其中蛋白激酶B(Akt)1、TP53、白细胞介素(IL)-6、血管内皮生长因子(VEGF)A、CASP3、肿瘤坏死因子(TNF)、Jun、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)8是关键靶点蛋白。AKT1基因编码的是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,参与PI3K、EGFR等多个通路,在炎症、细胞增殖、迁移和纤维形成的肝损伤过程中起着独特的作用<sup>[13]</sup>。IL-6是一种多功能细胞因子,可以激活多种细胞内信号通路,在肝细胞凋亡、抗炎、氧化应激中起着重要作用<sup>[14-15]</sup>。VEGFA是具有高度内皮细胞特异性的有丝分裂原,在血管发生和形成过程中起着主要的调控作用。VEGF的表达可以促进血管形成,在肝脏再生和肝损伤的修复中起着重要作用<sup>[16]</sup>。

通过对交集靶点的GO富集结果分析,预测茵陈蒿汤治疗OJ可能涉及DNA结合转录因子结合、信号受体激活剂活性、细胞因子受体结合、泛素样蛋白连接酶结合、氧化还原酶活性等生物过程。通过KEGG通路富集分析,发现茵陈蒿汤中多种成分可以通过Hepatitis B、流体剪应力与动脉粥样硬化、MAPK、PI3K-Akt、肿瘤坏死因子、IL-17、肝细胞癌、低氧诱导因子1(HIF-1)等信号通路作用于OJ。MAPK是生物体内重要的信号转导系统之一,参与介导细胞生长、分裂、分化、死亡以及细胞间的功能同步等多种生理过程。其中c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路是MAPK中重要的通路之一,Wang等<sup>[17]</sup>发现大黄酸诱导的活性氧簇(ROS)激活了JNK/Jun/caspase-3信号通路,进而诱导肝癌细胞凋亡。PI3K/Akt信号通路是细胞内抑制细胞凋亡的关键性信号转导通路。研究证明,PI3K/Akt通路激活可以抑制氧化应激、炎症和细胞凋亡,对肝损伤具有保护作用<sup>[18]</sup>。

HIF-1是低氧浓度或缺氧应答中关键的转录因子,通过激活下游靶基因,参与细胞的增殖、凋亡、血管生成、能量代谢等环节。研究发现蕨麻多酚可能在血管内皮细胞缺氧时通过下调HIF-1 $\alpha$ ,进而抑制内皮素(ET)-1的合成和分泌;上调eNOS,下调iNOS,调控一氧化氮(NO)的合成和分泌;调节NO和ET-1的动态平衡,发挥抗缺氧保护作用<sup>[19]</sup>。上述研究,体现了茵陈蒿汤多成分、多靶点的特点,其可能通过促进胆汁分泌排泄、抗炎、抑制肝纤维化、抗氧化、减轻肝细胞损伤和凋亡等多个生物过程及作用通路,起到治疗OJ的作用。

通过对KEGG富集结果分析发现,靶点蛋白NOS3(eNOS)和NOS2(iNOS)参与流体剪应力与动脉粥样硬化、PI3K-Akt、HIF-1等多条通路,并与茵陈蒿汤中多个化合物有关,因此将eNOS和iNOS作为目的蛋白进行分子对接和免疫组化实验验证。两者均是合成NO的关键酶,NO在OJ肝损害中具有双重作用。在疾病发展早期,机体NO水平相对较低,可扩张血管,抑制血小板聚集,改善肝脏血流;NO还具有抗氧化作用,可以与超氧阴离子等自由基结合,产生低毒性自由基,减轻肝损伤。随着疾病的发展,内毒素等各种刺激因子引起iNOS表达增加,生成大量的NO,过量的NO具有细胞毒性,加重肝损伤<sup>[20]</sup>。上述结果表明茵陈蒿汤中与交集靶点有关的化学成分主要有槲皮素、山奈酚、异鼠李素等,因此将eNOS和iNOS蛋白分别与这些化学成分进行分子对接,发现对接的最低结合能均 $\leq -5.0$  kcal/mol,且通过分子对接模式图可知这些化学成分可能与蛋白上多个氨基酸残基相结合,表示eNOS、iNOS和茵陈蒿汤中的主要化合物槲皮素、山奈酚、异鼠李素有较好的结合能力。通过对大鼠肝组织免疫组织化学研究发现,与假手术组相比,模型组肝组织中iNOS蛋白表达升高,而eNOS蛋白表达降低;与模型组相比,茵陈蒿汤组肝组织中iNOS蛋白表达降低,eNOS蛋白表达升高。这可能是OJ发生时,机体炎症和内毒素等刺激因子引起肝组织中iNOS水平迅速增加,产生大量NO,造成肝损伤;而茵陈蒿汤通过调节eNOS和iNOS,从而降低NO的过量表达,维持一定生理量,使其产生抗氧化、改善肝脏微循环的作用。

本研究通过网络药理学方法研究茵陈蒿汤治疗OJ的有效成分、作用靶点及通路,体现了茵陈蒿汤多成分、多靶点、多途径的作用特点,系统性分析了茵陈蒿汤治疗OJ的可能作用机制,并通过分子对接技术证实茵陈蒿汤中的多种活性成分可作用于eNOS、iNOS蛋白。免疫组化实验证实茵陈蒿汤对OJ氧化应

激的调节可能与改变 eNOS, iNOS 蛋白的表达有关, 这为进一步研究茵陈蒿汤提供了思路和理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 金龙, 邹英华. 梗阻性黄疸经皮肝穿胆道引流及支架植入术专家共识(2018)[J]. 中国介入影像与治疗学, 2019, 16(1): 2
- [2] ATALAY E, OZDEMIR M T, TUR B K, et al. The effect of alpha lipoic acid on oxidative parameters and liver injury in rats with obstructive jaundice[J]. Bratisl Lek Listy, 2019, 120(11): 843
- [3] UNAL Y, TUNCAL S, KOSMAZ K, et al. The effect of calcium dobesilate on liver damage in experimental obstructive jaundice[J]. J Invest Surg, 2019, 32(3): 238
- [4] 陈秋源, 钟小生, 谭志健. 梗阻性黄疸的中西医治疗进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(2): 221
- [5] 张华敏, 刘思鸿, 高宏杰, 等. 复方中药网络药理学方法研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19(10): 1270
- [6] 李鑫, 王向莹, 王诗源. 《伤寒杂病论》与《中医内科学》互参探讨黄疸的分型辨治[J]. 山东中医药大学学报, 2020, 44(1): 19
- [7] DOUSTIMOTLAGH A H, KOKHDAN E P, VAKILPOUR H, et al. Protective effect of Nasturtium officinale R. Br and quercetin against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(7): 5001
- [8] WU L, ZHANG Q, MO W, et al. Quercetin prevents hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and reducing autophagy via the TGF- $\beta$ 1/Smads and PI3K/Akt pathways[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9289
- [9] XU T, HUANG S, HUANG Q, et al. Kaempferol attenuates liver fibrosis by inhibiting activin receptor-like kinase 5[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(9): 6403
- [10] DU Y C, LAI L, ZHANG H, et al. Kaempferol from Penthorum chinense Pursh suppresses HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling and NLRP3 inflammasome activation in acetaminophen-induced hepatotoxicity[J]. Food Funct, 2020, 11(9): 7925
- [11] YIN Y, LIU X, LIU J, et al. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 28(9): 1525
- [12] 华圆, 冯健, 李范珠. 茵陈蒿汤利胆退黄物质基础的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7): 1520
- [13] REYES-GORDILLO K, SHAH R, Arellanes-Robledo J, et al. Akt1 and Akt2 isoforms play distinct roles in regulating the development of inflammation and fibrosis associated with alcoholic liver disease[J]. Cells, 2019, 8(11): 1337
- [14] 曾怡, 潘青波, 沈妍希, 等. 中和白细胞介素-6 减轻小鼠急性肝损伤[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28(6): 509
- [15] TEMEL Y, KUCUKLER S, YILDIRIM S, et al. Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2020, 393(3): 325
- [16] JIN X, AIMAITI Y, CHEN Z, et al. Hepatic stellate cells promote angiogenesis via the TGF- $\beta$ 1-Jagged1/VEGFA axis[J]. Exp Cell Res, 2018, 373(1/2): 34
- [17] WANG A L, JIANG H, LIU Y, et al. Rhein induces liver cancer cells apoptosis via activating ROS-dependent JNK/Jun/caspase-3 signaling pathway[J]. J Cancer, 2020, 11(2): 500
- [18] CHENG M H, REN H Z, WANG J, et al. Targeting PI3K/Akt/Nrf2 pathway by glabridin alleviates acetaminophen-induced hepatic injury in rats[J]. Arab J Chem, 2020, 14(publish): 1
- [19] 陈晔, 刘丹, 李灵芝, 等. 藏麻多酚对糖氧剥夺损伤血管内皮细胞一氧化氮、一氧化氮合酶、内皮素及缺氧诱导因子的影响[J]. 中国药师, 2019, 22(3): 389
- [20] 张西波, 段启龙, 李忠廉. 一氧化氮在阻塞性黄疸肝细胞损伤中的作用研究进展[J]. 山东医药, 2014, 54(40): 102

(2021-02-04 收稿)

(下转第 594 页)

- [9] 何绍南, 何波, 孙学进, 等. 少见单发颅内脑外肿瘤的影像征象分析及鉴别诊断[J]. 临床放射学杂志, 2017, 36(5): 625
- [10] 吕廷勇, 邹伟婕, 王启春, 等. MDCT 血管成像研究黔南少数民族地区颅底 Willis 环解剖变异及分型[J]. 中国临床解剖学杂志, 2017, 35(6): 623
- [11] 朱海生, 严浩林, 阙丽琳, 等. 鼻咽癌侵犯颅底骨 SPECT/CT 与 CT 检测诊断价值对比分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(2): 108
- [12] CAROLUS A, WEIHE S, SCHMIEDER K, et al. One-step CAD/CAM titanium cranioplasty after drilling template-assisted resection of intraosseous skull base meningioma: technical note. [J]. Acta Neurochirurgica, 2017, 159(3): 1
- [13] FÖRÄNDER P, BARTEK J, FAGERLUND M, et al. Multidisciplinary management of clival chordomas; long-term clinical outcome in a single-institution consecutive series[J]. Acta Neurochirurgica, 2017, 159(10): 1
- [14] 郑婉静, 曹代荣, 邢振, 等. 对比分析颅底软组织肉瘤与脊索瘤 CT 和 MRI 征象[J]. 中国医学影像技术, 2018, 34(11): 104
- [15] 包发秀. 囊性脑膜瘤的 MRI 诊断及分型[J]. 放射学实践, 2019, 18(3): 277
- [16] 高倩倩, 鲁珊珊, 洪汛宁, 等. MRI 在脊索样脑膜瘤诊断及与其他脑膜瘤鉴别诊断中的价值[J]. 实用放射学杂志, 2017, 33(2): 181
- [17] ABEL T J, BARRASH J, TRANEL D. Letter to the Editor. Neuropsychological impairment and quality of life after skull base meningioma resection: size and location matter[J]. J Neurosurg, 2017, 127(6): 1
- [18] 叶爱华, 苗焕民, 马新星, 等. MRI 在颅内血管周细胞瘤与血管瘤型脑膜瘤鉴别诊断中的价值[J]. 临床放射学杂志, 2019, 18(2): 206

(2021-03-26 收稿)