

基于网络药理学探讨三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的机制

勾玉萧^{1,*}, 王子涵¹, 陈 铭¹, 王昱茜¹, 董 萌¹, 常建森¹, 郑昭玉¹, 陈文杰¹

(1.山东中医药大学, 山东济南 250355; * wang1805222108@163.com)

摘 要: 目的: 运用网络药理学探讨三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的活性成分、相关潜在靶点和作用机制。方法: 运用 TCMSP 数据库、BATMAN-TCM 数据库等筛选三物黄芩汤的有效成分及相关作用靶点; 检索 GeneCard 数据库、Disgent 数据库、OMIM 数据库获取自身免疫性肝炎靶点; 将三物黄芩汤与自身免疫性肝炎的相关靶点取交集获得共同靶点, 并对交集靶点进行 GO 和 KEGG 分析, 运用 string 数据库构建三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的蛋白互作网络 (PPI), 使用 Cytoscape3.8.2 筛选核心靶点并且构建复方药物-成分-靶点网络-通路相互作用网络。结果: 三物黄芩汤中筛选得到药物靶点 882 个, 肝癌靶点 1824 个, 交集靶点 232 个。KEGG 通路富集分析主要包括 PI3K-Akt 信号通路、HPV 病毒感染、乙型肝炎等。结论: 三物黄芩汤中山姜素、刺槐素、表小檗碱、黄芩素等核心活性成分能够作用于 GAPDH、ESR1、MAPK3、JAK2、SIRT1 等多个关键靶点发挥治疗自身免疫性肝炎的作用。

关键词: 自身免疫性肝炎; 三物黄芩汤; 网络药理学; 作用机制

1 前言

自身免疫性肝炎 (Autoimmune Hepatitis, AIH) 是一种极具进展性的炎症性疾病, 近年来 AIH 患者数量不断增加, 在全球范围内呈现上涨趋势[1]。据统计 AIH 主要患病人群为女性, 占比高达 89%。亚洲地区发病率为 1.31/10 万人, 全球发病率为 1.37/10 万人[2]。AIH 患者如果不及进行治疗, 病情逐渐恶化, 进一步发展为肝衰竭、肝硬化等恶性肝脏疾病, 严重危害患者生命健康。目前西医临床上主要采用激素类药物结合硫唑嘌呤治疗, 但是上述治疗方法会引发一系列并发症, 影响患者正常代谢, 引发骨质疏松、脊柱骨折等症状, 治疗方法具有一定局限性[3]。中医药是中华民族文化遗产, 经过中医临床实践经验表明, 中药在治疗自身免疫性肝炎中有着良好的疗效。三物黄芩汤由黄芩、苦参、干地黄三味中药构成。其中黄芩、苦参清热燥湿、泻火解毒, 干地黄能够清热生津、养阴凉血。全方药性苦寒, 能够清湿热、泻肝火[4]。本文基于网络药理学研究方法, 筛选三物黄芩汤的主要活性成分和作用靶点构建药物活性成分-靶点-通路相互作用网络, 进一步筛选关键靶点, 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 从而寻找中药治疗自身免疫性肝炎新路径。

2 材料与方法

2.1 有效成分的筛选及靶点预测

检索 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/index.php>) [5] 和 BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/index.php>) [6], 得到三物黄芩汤中组方药物黄芩、苦参、干地黄的活性成分。利用 TCMSP 数据库的 ADME 参数[7-8], 将口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 作为标准, 筛选黄芩、苦参中活性较高的化合物。使用 BATMAN-TCM 数据库检索生地黄的活性成分与基因靶点, 其中 Score cutoff 设置为 20, P-value 截止为 0.05 进行检索[9]。借助 Swiss ADME 平台进行三物黄芩汤有效成分筛选, 以胃肠道吸收得分 (GI absorption) 为 “high”, 类药性 (druglike-ness) 至少存在两个 “Yes” 进行筛

选。将三物黄芩汤有效成分的 canonical SMILES 输入 SwissTargetPrediction 数据库预测三物黄芩汤中有效化合物的基因靶点。使用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) [10]对相关靶点进行校对,进而获得药物潜在作用靶点。

2.2 自身免疫性肝炎相关靶点筛选

以“Autoimmune Hepatitis”为关键词在 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) [11]、Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) [12]和 Disgent 数据库 (<https://www.disgent.org/>) 进行检索,将基因靶点获取数据合并并去重,获得自身免疫性肝炎疾病靶点。

2.3 三物黄芩汤与自身免疫性肝炎交集基因获取

将筛选后的药物有效活性成分靶点与自身免疫性肝炎靶点分别输入 Venny2.1 (bioinfogp.cnb.csic.es/tools/) 获得二者交集靶点并绘制韦恩图[13],从而实现交集靶点的可视化分析。

2.4 蛋白互作网络 (PPI) 及关键靶点获取

将在 Venny 中获取的交集靶点导入 String 数据库(<https://cn.string-db.org/>)设置物种为人类(Homo sapiens)得到交集靶点的蛋白互作网络 (PPI) 关系[14]。把下载的 tsv 文件导入 Cytoscape 3.8.2 软件,进行相关可视化分析,运用 centiscape2.2 插件进行网络拓扑学分析,从交集基因靶点中进一步获取知三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的核心靶点。

2.5 基因本体 (GO) 和 KEGG 分析

将三物黄芩汤与 AIH 交集靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) [15],选择类别为 Gene,选择物种为人类 (Homo sapiens) 进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析,按照 Gene value (%) 进行数据排序,分别取 PB、CC、MF 前十条信息以及 KEGG 前 20 条信息。将上述信息导入微生信在线作图软件 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化气泡图展示。

2.6 构建复方药物-成分-靶点-通路网络图

将复方药物、三物黄芩汤成分、交集靶点、KEGG 筛选的 20 条通路导入 Cytoscape3.8.2 软件,构建三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的复方药物-成分-靶点-通路网络图。

3 结果

3.1 三物黄芩汤活性成分及靶点

检索 TCMSP 数据库、BATMAN-TCM 数据库,共获得三物黄芩汤活性成分 90 个。将 TCMSP 数据库中口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 作为标准,筛选出黄芩活性成分 36 个,苦参活性成分 45 个。通过 Swiss ADME 平台胃肠道吸收得分 (GI absorption) 为 “high”,类药性 (druglike-ness) 至少存在两个 “Yes” 进行筛选,最终获得黄芩有效活性成分 29 个,苦参有效活性成分 39 个。使用 BATMAN-TCM 数据库对生地黄活性成分进行检索,其中 Score cutoff 设置为 20, P-value 截止为 0.05,共获得生地黄化学成分 9 个,去除无对应靶基因成分,最终获得有效活性成分 4 个。筛选后最终获得三物黄芩汤有效活性成分 72 个。将上述有效活性成分输入 SwissTargetPrediction 数据库预测基因靶点,并且通过 UniProt 进行靶点校对和去重

处理，最终获得药物成分作用靶点 772 种。将黄芩、苦参有效活性成分按照 OB 值进行排序。选取排名前 20 见于表 1。选取生地黄筛选后四个有效成分及药物对应基因数见于表 2。

表 1 黄芩、苦参中 OB 排名前 30 位有效活性成分

Mol ID	Molecule Name	OB (%)	DL	Belongs to TCM
MOL002934	NEOBAICALEIN	104.34	0.44	Huang Qin
MOL006596	Glyceollin	97.27	0.76	Ku Shen
MOL000456	Phaseolin	78.2	0.73	Ku Shen
MOL002932	Panicolin	76.26	0.29	Huang Qin
MOL001484	Inermine	75.18	0.54	Ku Shen
MOL012246	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	74.24	0.26	Huang Qin
MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	71.12	0.18	Ku Shen
MOL000392	formononetin	69.67	0.21	Ku Shen
MOL002927	Skullcapflavone II	69.51	0.44	Huang Qin
MOL002911	2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone	69.04	0.22	Huang Qin
MOL006565	AIDS211310	68.68	0.25	Ku Shen
MOL004580	cis-Dihydroquercetin	66.44	0.27	Ku Shen
MOL002937	DIHYDROOROXYLIN	66.06	0.23	Huang Qin
MOL003648	Inermin	65.83	0.54	Ku Shen
MOL006573	13,14-dehydrosophoridine	65.34	0.25	Ku Shen
MOL003627	sophocarpine	64.26	0.25	Ku Shen
MOL005944	matrine	63.77	0.25	Ku Shen
MOL006627	Lehmanine	62.23	0.25	Ku Shen
MOL006562	(+)-7,11-dehydromatrine,(leontalbinine)	62.08	0.25	Ku Shen
MOL006571	anagyrine	62.01	0.24	Ku Shen

表 2 生地黄有效成分、药物对应基因数

Molecule Name	药物对应基因数
Campesterol	6
Gamma-Aminobutyric Acid	204
Catalpol	1
Rehmaglutin C	6

3.2 黄芩汤的靶点与自身免疫性肝炎相关基因交集

通过 GeneCard 数据库收集到 6639 个基因靶点，利用对上述靶点 Score 值取两次中位数的方法最终获得 1661 个基因靶点。通过 Disgent 数据库收集到 190 个基因靶点，OMIM 数据库收集到 149 个基因靶点。将上述三个数据库收集到的基因靶点汇总去除重复值后获得 1824 个自身免疫性肝炎相关靶基因。利用 Venny2.1 作图网站，将 772 个药物有效活性成分作用靶点与 1824 个自身免疫性肝炎相关靶基因取交集，获得 232 个交集靶点，如图 1 所示，即三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的作用靶点。表 2 为三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的交集靶点。

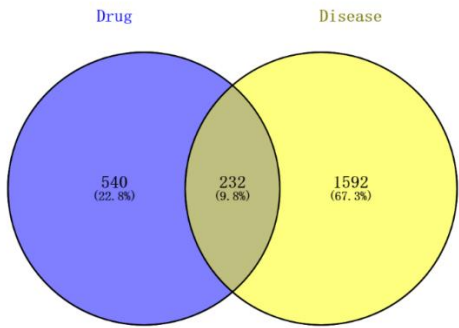


图 1 三物黄芩汤作用靶点与自身免疫性肝炎靶点韦恩图

表 3 三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的交集靶点

交集靶点列表								
CYP19A1	TOP1	MET	PTPN1	HIF1A	MME	CCNA2	TNF	TH
ABCC1	TYR	AKR1C1	FYN	MPI	HPGDS	HNF4A	HDAC9	GHRL
ABCB1	AHR	AKR1A1	MAPK3	GSR	ESRRB	PRKCA	GRIN2A	INS
NOX4	TERT	HSP90AA1	SIRT1	MMP7	EZR	REN	BCL2L1	STAR
XDH	AR	CXCR1	NQO1	CYP2C9	PGF	ADRB2	SCARB1	GPT2
CDK1	IGF1R	HSP90B1	ELANE	PPIA	VEGFA	JAK1	PDGFRA	ASPH
ESR1	EGFR	SHBG	MMP1	IDO1	RAF1	NR3C1	S1PR1	GLUL
FLT3	NOS2	PPARG	MMP14	CYP2D6	BRAF	P2RX7	SREBF2	FOS
ABCG2	CYP1A1	CES1	PDE4A	RAC1	TBK1	CNR1	GPBAR1	ADA
MAOA	CYP1A2	EDNRA	ADAM17	CDC42	COMT	CNR2	RORC	GNMT
SYK	F2	SERPINE1	FLT1	XBP1	CCR4	CCR3	PCNA	SLC25A13
GSK3B	CDK2	RXRA	PDGFRB	PRF1	EP300	SHH	ACE	ABCC2
TTR	GPR35	CXCR4	MAPK14	SCD	SRD5A2	PNP	TYK2	PTEN
KIT	AURKB	JAK3	BCL2	RPS6KB1	CYP2C19	NR1H4	VDR	SLC22A4
LCK	MPO	JAK2	AKT1	NTRK1	CHRNA4	BIRC5	RIPK1	SLC25A15
PTGS2	PIK3R1	CTSB	FGFR1	TGM2	IL2	MAP2K1	CPT2	CTPS1
CFTR	SRC	MTOR	SNCA	ICAM1	RELA	CCR9	NARS2	ASS1
CA2	PTK2	PIK3CD	DNMT1	SELE	F10	HMGCR	GPT	ARG2
MCL1	KDR	PRKDC	STAT1	AGPAT2	CHRNA1	CASP8	EPCAM	EDN1
PLG	MMP13	PIK3CA	F3	ZAP70	CHRND	CASP1	FASLG	CRP
ARG1	MMP3	GAPDH	ALDH2	IRAK4	DRD2	ITK	CYP11A1	CRH
APP	PLK1	CXCR2	IGFBP3	MAPK1	EPHX1	CYP3A4	UROD	PRKCD
PARP1	IKBKB	RET	TLR9	ERBB2	ITGA2B	EIF2AK3	PLAT	ITGB2
MMP9	PIK3CG	CCND1	PRKAA1	MAPK8	ITGB3	DUT	CPT1A	ITGAL
MMP2	TOP2A	CASP3	HDAC1	DPP4	PPARA	AGTR1	SLC22A5	
CD38	INSR	AXL	MIF	STAT3	PON1	MDM2	OTC	

3.3 蛋白互作网络分析及核心靶点筛选

将表 3 中交集基因靶点导入 string 数据库，获得一个 232 个节点，5343 条边的蛋白互作网络（PPI），将 string 数据库中下载的 TSV 文件导入 Cytoscape3.8.2 软件，利用插件 centiscape2.2 进行分析，要求同时满足大于紧密中心性（CC）、度中心性（DC）、中介中心性（BC）这三项平均值的条件，筛选出42个相关核心靶点。利用 Cytoscape3.8.2 软件将 PPI及核心靶点进行可视化分析，见图2。

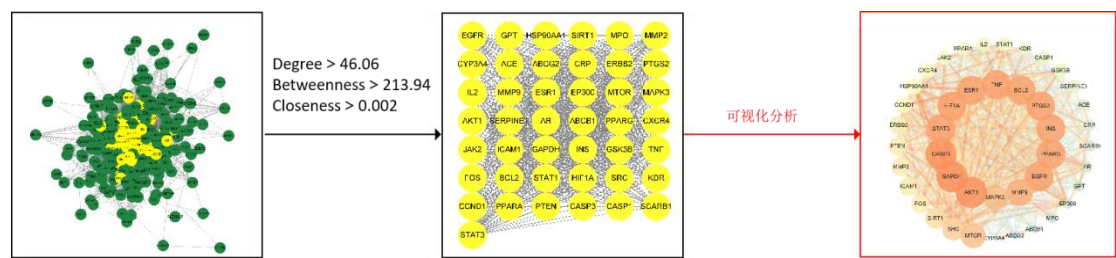


图 2 核心靶点获取过程

3.4 交集靶点的 GO 和 KEGG 富集通路分析

将三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的交集基因导入 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。通过 DAVID 数据库进行 GO 分析获得生物过程（BP）974 条，细胞组分（CC）124条和分子功能（MF）196条，按照 Gene value（%）进行数据排序，分别取 PB、CC、MF 前十条信息使用微生信作图网站进行可视化分析，见图 3。

KEGG 富集分析共获得 182 条相关信号通路，选取富集比较明显的前 20 个通路进行可视化分析，见于图 4。由图可知，三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎涉及多条信号通路，主要包括 PI3K-Akt 信号通路、HPV 病毒感染、乙型肝炎等。

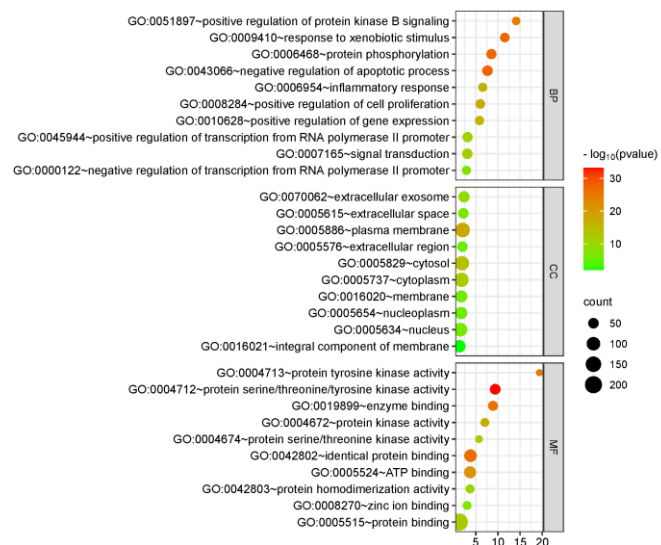


图 3 三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎靶基因 GO 富集

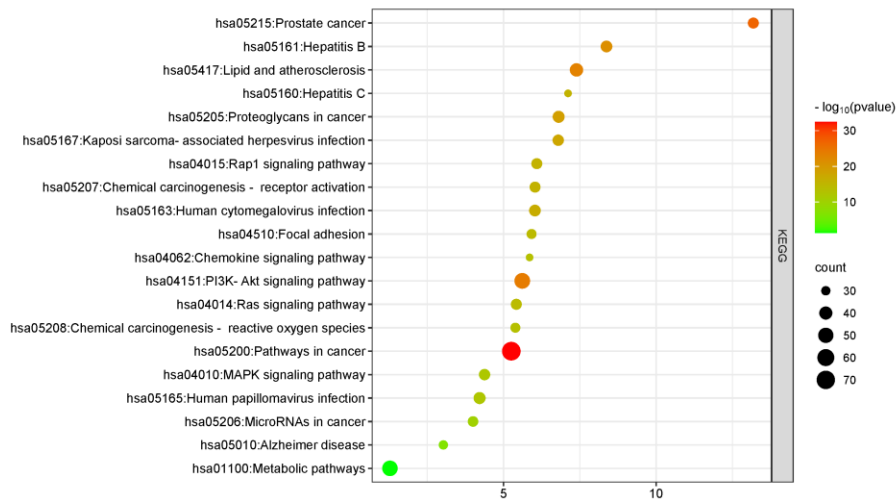


图 4 三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎靶基因的 KEGG 通路分析

3.5 复方药物-成分-靶点-通路网络图

去除复方药物中无对应基因靶点的 2 个成分后, 活性成分按照 Degree 值降序排列见于表 4。将复方药物、成分、交集靶点、KEGG 筛选的 20 条通路导入 Cytoscape3.8.2 软件, 构建三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的复方药物-成分-靶点-通路网络图, 见图 5。该网络共计三物黄芩汤基因靶点 232 个、活性成分 70 个、通路 20 条、药物 3 个、复方 1 个, 共计 326 个节点、2408 条边。三物黄芩汤主要通过 70 个活性成分作用于 232 个靶标基因, 这 232 个靶标基因可能影响自身免疫性肝炎的发生。

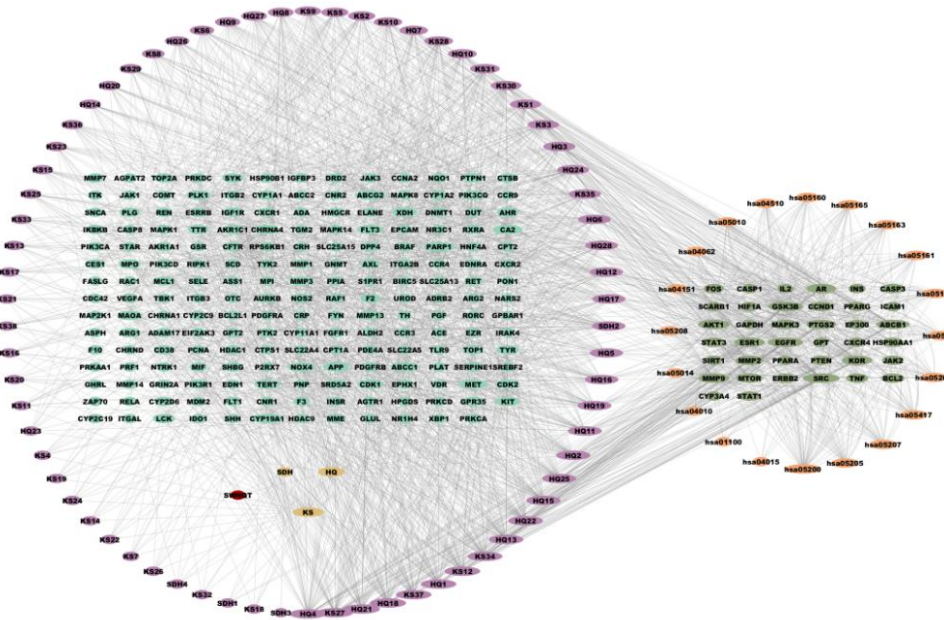


图 3 复方药物-成分-靶点-通路网络图

表 4 活性成分列表

Name	Molecule Name	Degree	Name	Molecule Name	Degree
HQ4	baicalein	52	KS9	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	29
HQ21	Norwogonin	51	HQ27	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	27
KS27	Glyceollin	51	HQ8	2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone	27
HQ18	5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone	50	HQ9	Dihydrobaicalin_qt	26
HQ1	acacetin	49	HQ26	5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	24
KS12	luteolin	49	KS6	Wighteone	24
KS37	quercetin	49	KS8	formononetin	20
KS34	Norartocarpetin	48	KS29	kushenin	19
HQ13	5,7,2',6'-Tetrahydroxyflavone	47	HQ14	dihydrooroxylin A	18
HQ22	5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	47	HQ20	DIHYDROOROXYLIN	18
HQ11	Salvigenin	46	KS36	sophranol	18
HQ15	Skullcapflavone II	46	KS23	1,4-diazaindan-type,alkaloid,flavascensine	17
HQ19	NEOBAICALEIN	46	KS15	(+)-9alpha-hydroxymatrine	16
HQ2	wogonin	46	KS25	5α,9α-dihydroxymatrine	16
HQ25	Moslosooflavone	46	KS13	(+)-14alpha-hydroxymatrine	14
HQ16	oroxylin a	45	KS33	(+)-Lupanine	14
HQ12	5,2',6'-Trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	44	KS17	AIDS211310	13
HQ17	Panicolin	44	KS21	(-)-9alpha-hydroxysophoramine	11
HQ5	5,8,2'-Trihydroxy-7-methoxyflavone	44	KS38	sophoridine	11
SDH2	Gamma-Aminobutyric Acid	44	KS11	matrine	10
HQ28	rivularin	43	KS16	(+)-allomatrine	10
HQ6	5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	43	KS20	(-)-14beta-hydroxymatrine	10
HQ24	epiberberine	41	HQ23	coptisine	9
HQ3	(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	41	KS19	isosophocarpine	8
KS35	Phaseolin	41	KS24	13,14-dehydrosophoridine	8
KS3	8-Isopentenyl-kaempferol	40	KS4	sophocarpine	8
KS1	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	39	KS14	(+)-7,11-dehydromatrine, (leontalbinine)	7
KS30	kushenol J_qt	38	KS22	anagyrene	7
KS31	leachianone,g	36	KS26	7,11-dehydromatrine	7
HQ10	Eriodyctiol (flavanone)	34	KS7	Sophoramine	7
KS28	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-5-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl) chroman-4-one	34	SDH4	Rehmaglutin C	6
HQ7	Carthamidin	33	KS18	(+)-lehmannine	5
KS10	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one	33	KS32	Lehmanine	5
KS2	Inermine	30	SDH1	Campesterol	5
KS5	Inermin	30	SDH3	Catalpol	1

4 讨论

4.1 三物黄芩汤的中医病机分析

三物黄芩汤是《金匱要略》和《备急千金要方》中记载的经典药方，组方药材均为苦寒之药，具有清热解毒，养血滋阴之功效[16]。三物黄芩汤主治四肢烦热、产后受风、头不痛者。其成分为黄芩、苦参、干地黄，其中黄芩味苦，性寒，归脾、肺、胆、大肠、小肠经[17]，为清热泻火之药，能够止血解毒；苦参性味苦寒，归肝、心、胃、大肠、膀胱经，可以杀虫利尿、祛风燥湿[18]；干地黄即为生地黄，《神农本草经》中记载：地黄味甘寒，主折跌绝筋，伤中，逐血痹，填骨髓，长肌肉，作汤，除寒热积聚，除痹，生者尤良[19]。可以

用来滋阴养血、在治疗女性崩漏以及产后血虚方面效果显著，三味药材相互配合发挥功效。在目前，三物黄芩汤常用来临床治疗红斑性肢痛[20]、春夏季烦热以及恶性肿瘤发病患者。对于治疗手足心出汗多，午后及夜加重，并伴有失眠、口渴、盗汗等症状效果明显。自身免疫性肝炎辨证属于肝肾阴虚[21]，契合三物黄芩汤治疗原则。另有临床表明，三物黄芩汤能够改善自身免疫性肝炎出现的发热盗汗等阴虚症状[22]。因此三物黄芩汤在治疗自身免疫性肝炎过程中可能具有重要作用。

4.2 三物黄芩汤核心活性成分分析

通过网络药理学研究结果显示三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的核心活性成分主要为黄芩素、汉黄芩素、木犀草素、苦参素、苦参碱、槲皮素等，可能在治疗自身免疫性肝炎过程中发挥重要作用。其中黄芩素与汉黄芩素属于黄酮类成分，研究发现，黄芩素与汉黄芩素具有消炎、抗肿瘤、抗氧化和抑菌的功效[23-26]，并且能够发挥保护肝脏的作用。黄芩素能够促进 Nrf2 的转录与活化，Nrf2 能够与 ARE 相互作用，提高抗氧化蛋白的表达，进而促进机体抗氧化应激反应[27-28]。另有研究发现，黄芩素能够抑制 APAP、Ethanol、CCl₄ 的肝毒性作用，减少肝脏氧化应激损伤，抑制炎症发生。由于 AIH 导致中性粒细胞数量增多，过多的中性粒细胞导致肝损伤加重[29]。汉黄芩素则能够减少 ERK 磷酸化，激活中性粒细胞 caspase3 蛋白，促进中性粒细胞凋亡，减少肝脏损伤[30-31]。研究结果发现汉黄芩素能够诱导肝癌细胞、嗜酸性粒细胞、肝星状细胞凋亡，减少肝癌等疾病的发生风险。研究发现，木犀草素能够促进上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 的表达，抑制间充质标志蛋白 N-cadherin 和 vimentin 的表达，下调 Snai1 因子表达，调控上皮-间充质转化（EMT）[32]，进而抑制肝癌细胞的迁移及黏附，为辅助治疗肝癌提供了新思路。除此之外，木犀草素能够清除肝脏 ABTS 自由基，增强细胞抗氧化能力（CAA）。苦参素能够抑制 TGF- β 1 的表达，从而抑制肝成纤维细胞增殖，起到抗肝纤维化的作用[33]。槲皮素能够激活 Nrf2/ARE 信号通路，增强 HQ-1、NQO1、GCLC 基因的表达，提高 SOD、GSH 的含量，清除 ROS，增强肝脏抗氧化损伤能力[34]。上述研究结果表明，三物黄芩汤的这些活性成分具有抑制肝纤维化、抗肝癌、减少肝脏损伤的作用，在治疗自身免疫性肝炎方面也发挥重要作用。

4.3 三物黄芩汤核心靶点分析

本研究通过 PPI 网络和 centiscape2.2 插件对三物黄芩汤的核心靶点进行了预测，结果显示，蛋白激酶(Akt1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、半胱天冬酶 3(CASP3)、转录激活因子 3(STAT3)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素 2(IL2)、B 淋巴细胞瘤-2(BCL2)等可能是三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎的关键靶点。Akt1 是一种蛋白质编码基因，在调节细胞代谢、存活、增殖、生长和血管生成方面发挥重要作用[35]。ARK 蛋白参与 mTOR 信号通路控制 eIF4E 复合物的合成以及参与 PI3K/AKT 信号通路，进而影响组织生长、癌症发生和细胞失活凋亡[36]。GAPDH 基因与原发遗传病、常染色体隐性遗传、小头症、血吸虫病密切相关，GAPDH 可以通过与 TRAF2 和 TRAF3 相互作用促进 TNF 诱导的 NF-K-B 激活，促进 I 型干扰素的分泌，进而在自身免疫性过程中发挥作用[37]。CASP3 与肝细胞凋亡、坏死、炎症等信号通路密切相关，研究发现，CASP3 可以促进 CGAS、IRF3 和 MAVS 蛋白产生，抑制 I 型干扰素产生，防止细胞因子过量产生，减少炎症反应的发生[38]。TNF 是一种由巨噬细胞分泌的促炎细胞因子，它可以与其 TNFRSF1A/TNFR1 和 TNFRSF1B/TNFR2 受体结合[39]，进而参与细胞增殖、分化、凋亡、凝血等多种细胞过程的调节。该因子参与多种疾病形成，包括自身免疫性疾病、胰岛素抵抗、强直性脊柱炎等，在调节自身免疫反应中起关键作用。研究表明，IL-2 所编码的蛋白质为一种分泌细胞因子，通过影响 T 淋巴细胞与 B 淋巴细胞的增殖来调节免疫过程，IL2 具有双向免疫调节作用，发挥着重要的抗炎作用[40]。BCL2 则可以通过抑制 NLRP1 炎症小体激活来缓解自身免疫性炎症[41]。以上研究结果均表明，知柏地黄丸作用的 Akt1、GAPDH、CASP3、STAT3、TNF、IL2、BCL2 这些靶点是治疗自身免疫性肝炎以及延缓自身免疫性肝炎向癌症转化的关键靶点。

4.4 三物黄芩汤的信号通路分析

KEGG 通路富集分析结果显示,有多条信号通路参与三物黄芩汤治疗自身免疫性肝炎机制,主要包括乙型肝炎通路、代谢相关通路、PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、趋化因子信号通路等。除此之外,与癌症相关信号通路较多,由此可以推测三物黄芩汤对应靶点涉及的通路在防止自身免疫性肝炎发展为肝癌中发挥重要作用。PI3K-Akt 信号通路是参与细胞生存、转移、新陈代谢的重要通路[42]。在炎症因子聚集和血管生成中发挥重要作用,可以有效抑制干细胞的凋亡和自噬,影响自身免疫性肝炎发病过程。有研究发现,槲皮素可以有效降低 TNF 信号通路刺激的肝细胞 cleaved caspase-3 蛋白水平[43],抑制肝星形细胞的增殖,从而缓解由肝炎引起的肺纤维化。分析发现趋化因子信号通路涉及 AKT1、GSK3B、JAK2、MAPK3 等八个基因,在肝脏中主要由分泌细胞分泌,趋化因子对于免疫细胞和炎症细胞的定位非常重要[44],与自身免疫性肝炎的发病机制密不可分。

综上所述,三物黄芩汤中的黄芩素、汉黄芩素、木犀草素、苦参素、苦参碱、槲皮素等核心活性成分,能够作用于 Akt1、GAPDH、CASP3、STAT3、TNF、IL2、BCL2 等多个关键靶点,调节 PI3K/Akt、TNF、NF- κ B、乙型肝炎等信号通路,发挥治疗自身免疫性肝炎的作用。由于网络药理学研究存在一定的局限性与不确定性,本材料旨在为中药治疗自身免疫性肝炎提供新思路。

项目支持

本项目在山东中医药大学创新训练平台上完成,由山东中医药大学大学生研究训练计划项目资助,项目编号 2023083。

参考文献

- [1] 李思博,吴百灵.芍药甘草汤加味治疗肝肾阴虚型自身免疫性肝炎疗效分析[J].山西中医药大学学报,2023,24(10):1146-1150.DOI:10.19763/j.cnki.2096-7403.2023.10.17.
- [2] 吕婷婷,李敏,孔媛媛等.亚洲、欧洲及美洲人群中自身免疫性肝炎发病率和患病率的流行病学特点:系统综述与荟萃分析[J].临床肝胆病杂志,2020,36(02):251.
- [3] 罗龙龙,王丽菲,郑英等.间充质干细胞及其外泌体治疗自身免疫性肝炎的研究进展[J].临床肝胆病杂志,2023,39(12):2920-2925.
- [4] 张兆洲,王炎,李琦.三物黄芩汤研究概述及其应用展望[J].辽宁中医杂志,2019,46(07):1551-1554.DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2019.07.060.
- [5] RU J,LI P,WANG J,et al.TCMSP:a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J].J Cheminform,2014,6(1):13.
- [6] LIU Z Y,GUO F F,WANG Y,et al.BATMAN-TCM:a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J].Scientific Reports,2016,6:21146.DOI:10.1038/srep21146.
- [7] Xu X, Zhang W X, Huang C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [8] Tao W Y, Xu X, Wang X, et al. Network pharmacology- based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal Radix Curcumae formula for application to cardiovascular disease [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(1): 1-10.
- [9] Xiangren K ,Chao L ,Zuzhen Z , et al.BATMAN-TCM 2.0: an enhanced integrative database for known and predicted interactions between traditional Chinese medicine ingredients and target proteins.[J].Nucleic acids research,2023,
- [10] The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D158-D169.
- [11] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue):D789-D798.
- [12] Safran M, Dalah I, Alexander J, et al. GeneCards Version 3: The human gene integrator [J]. Database, 2010, 2010: baq020.

- [13] 董思颖,江泽强,孟翔鹤等.王琦教授新冠肺炎预防方预防新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(04):1063-1075.
- [14] 曾庆涛,吴红彦,王雅乐等.基于网络药理学探讨白芍治疗阿尔茨海默病作用机制[J].西部中医药,2024,37(02):111-115.
- [15] DENNIS G,SHERMAN B T,HOSACK D A,et al.DAVID:database for annotation,visualization,and integrated discovery[J].Genome Biol,2003,4(9):R60.
- [16] 王三虎.三物黄芩汤[J].河南中医,2016,36(02):209.
- [17] 赵晶磊,杨军礼.黄芩汤加减辅助肝动脉化疗栓塞术治疗原发性肝癌临床研究[J].新中医,2023,55(19):145-149.DOI:10.13457/j.cnki.jncm.2023.19.028.
- [18] 郑鑫林,郑晨昭,郝新平等.苦参对肺癌患者围手术期肺部炎症的治疗效果[J].潍坊医学院学报,2023,45(06):442-444.DOI:10.16846/j.issn.1004-3101.2023.06.012.
- [19] 佚名.神农本草经[M].顾观光,重编.北京:人民卫生出版社,1956:28.
- [20] 陈宏,苏忠.三物黄芩汤加味治疗红斑性肢痛[J].浙江中医杂志,2001(07):30.
- [21] 郝君玉,陈虹秀,范文艳等.自身免疫性肝炎中医证型与临床特点的多中心回顾性研究[J].现代中西医结合杂志,2023,32(16):2228-2232+2240.
- [22] 史文丽.三物黄芩汤在自身免疫性肝病中的临床新用[J].中医杂志,2010,51(S2):110-111.DOI:10.13288/j.11-2166/r.2010.s2.007.
- [23] Li X,Hu Y F,Wu J S,et al.Semi-mechanism-based pharmacodynamic model for the anti-inflammatory effect of baicalein in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages[J].Front Pharmacol,2018,9:793.
- [24] Lee Y S,Jung E K,Cha J D.Synergistic effect between baicalein and antibiotics against clinic methicillin and vancomycin-resistant staphylococcus aureus[J].Chemotherapy,2014,4(1):141-152.
- [25] Li HD, Chen X, Yang Y, et al. Wogonin attenuates inflammation by activating PPAR- γ in alcoholic liver disease[J]. Int Immunopharmacol,2017,50:95-106.
- [26] Lee Y S,Jung E K,Cha J D.Synergistic effect between baicalein and antibiotics against clinic methicillin and vancomycin-resistant staphylococcus aureus[J].Chemotherapy,2014,4(1):141-152.
- [27] Yu X,Kensler T.Nrf2 as a target for cancer chemoprevention[J].Mutat Res,2005,591:93-102.
- [28] 李航,段惠军.Nrf2/ARE 信号通路及其调控的抗氧化蛋白[J].中国药理学通报,2011,27(03):300-303.
- [29] Lee HC, Liao CC, Day YJ, et al. IL-17 deficiency attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. Toxicol Lett, 2018, 292: 20-30.
- [30] Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip [J]. Cell, 2009, 138(5): 838-854.
- [31] Liu X, Tian S, Liu M, et al. Wogonin inhibits the proliferation and invasion, and induces the apoptosis of HepG2 and Bel7402 HCC cells through NF- κ B/Bcl-2, EGFR and EGFR downstream ERK/AKT signaling [J]. Int J Mol Med, 2016, 38 (4) : 1250-1256.
- [32] Xu F, Zhang J, Hu G, et al. Hypoxia and TGF- β -induced PLOD2 expression improve the migration and invasion of cervical cancer cells by promoting epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and focal adhesion formation[J].Cancer Cell Int, 2017, 17 (1) :54.
- [33] 钱文杰.苦参素对肝炎后肝硬化患者外周血 T 细胞亚群和肝纤维化指标的影响[J].中国药业,2010,19(03):20-21.
- [34] 魏彩冰,周莲娣,张育珍等.槲皮素通过核因子 E2 相关因子/抗氧化应答元件(Nrf2/ARE)信号通路发挥对免疫性肝损伤的保护作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(03):300-304.DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.008067.
- [35] Cartlidge RA, Knebel A, Pegg M, Alexandrov A, Phizicky EM, Cohen P. The tRNA methylase METTL1 is phosphorylated and inactivated by PKB and RSK in vitro and in cells. EMBO J. 2005 May 4;24(9):1696-705.
- [36] Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. Cell Signal. 2011 Oct;23(10):1515-27.
- [37] Gao X, Wang X, Pham TH, Feuerbacher LA, Lubos ML, Huang M, Olsen R, Mushegian A, Slawson C, Hardwidge PR. NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF- κ B activation. Cell Host Microbe. 2013 Jan 16;13(1):87-99.
- [38] Ning X, Wang Y, Jing M, Sha M, Lv M, Gao P, Zhang R, Huang X, Feng JM, Jiang Z. Apoptotic Caspases Suppress Type I Interferon Production via the Cleavage of cGAS, MAVS, and IRF3. Mol Cell. 2019 Apr 4;74(1):19-31.e7.

- [39] Nie H, Zheng Y, Li R, Guo TB, He D, Fang L, Liu X, Xiao L, Chen X, Wan B, Chin YE, Zhang JZ. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 2013 Mar;19(3):322-8.
- [40] 魏莉,李蕴铷.地塞米松联合小剂量白细胞介素-2 治疗实验性自身免疫性肝炎[J].胃肠病学和肝病学杂志,2011,20(10):933-935.
- [41] Bruey JM, Bruey-Sedano N, Luciano F, Zhai D, Balpai R, Xu C, Kress CL, Bailly-Maitre B, Li X, Osterman A, Matsuzawa S, Terskikh AV, Faustin B, Reed JC. Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell.* 2007 Apr 6;129(1):45-56.
- [42] 张雄,周江,李涛等.ART 调节 PI3K/AKT 通路对肝癌细胞增殖及迁移的影响[J].海南医学,2023,34(15):2129-2134.
- [43] Cai F F, Bian Y Q, Wu R, et al. Yinchenhao decoction suppresses rat liver fibrosis involved in an apoptosis regulation mechanism based on network pharmacology and transcriptomic analysis[J]. *Biomed Pharmacother*,2019, 114:108863.
- [44] Czaja AJ. Review article:Chemokines as orchestrators of autoimmune hepatitis and potential therapeutic targets[J].*Alimentary Pharmacology&Therapeutics*, 2014, 40(3):261-279.