

基于网络药理学及体外实验探讨逍遥丸治疗肝硬化的作用机制

王宁^{1,2}, 戈进^{3*}¹天津医科大学朱宪彝纪念医院 天津市内分泌研究所 国家卫健委激素与发育重点实验室;²天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300134; ³南昌大学第二附属医院肝胆外科, 南昌 330008

摘要:运用网络药理学方法探究逍遥丸(Xiaoyao Wan, XYW)治疗肝硬化的潜在作用机制,并进行实验验证。基于ETCM数据库、多种人类疾病数据库查找逍遥丸及肝硬化相关基因靶点,应用String、ToppGene平台及Cytoscape软件等工具分别构建蛋白质互作(PPI)网络、中药-化学成分-作用靶基因网络以及中药-肝硬化相关通路网络。通过网络拓扑结构筛选出逍遥丸治疗肝硬化的核心作用靶基因、关键化学成分,并基于药物作用的通路探讨药效机制。在体外实验中,用逍遥丸关键成分干预肝纤维化细胞系Lx-2后,采用RT-PCR法检测关键基因的表达情况。通过ETCM数据库得到逍遥丸中化学成分505个,作用靶基因848个。通过5个人类疾病相关数据库中检索肝硬化相关基因,合并去冗余后共得到622个肝硬化基因。将848个逍遥丸作用靶基因与164个肝硬化基因取交集后,得到30个重合基因。对互作网络分析后筛选出核心基因节点有9个,为ALB、INS、IL1B、IL6、TNF、PPARG、TLR4、ARG1和GPT。构建中药-化学成分-肝硬化基因网络,并利用Cytoscape软件进行可视化,得到关键化学成分为槲皮素、柴胡皂苷、芹黄素、山柰素等。体外实验证实Lx-2的生长与柴胡皂苷、槲皮素呈剂量依赖性关系,且TNF、TL1B、IL-6、PPARG、TLR4、Collagen、TGFB1、 α -SMA的表达均降低。通过网络药理学分析和实验验证得出逍遥丸通过多作用靶基因、多通路来发挥治疗肝硬化的作用。

关键词:肝硬化;逍遥丸;网络药理学;作用机制;信号通路;靶基因

中图分类号:R575.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)Suppl-0121-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.S.015

Mechanism of Xiaoyao Wan in the treatment of liver cirrhosis based on network pharmacology analysis and *in vitro* experiments

WANG Ning^{1,2}, GE Jin^{3*}

¹NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Chu Hsien-I Memorial Hospital and Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University; ²Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China; ³Department of Hepatological Surgery, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330008, China

Abstract: This study investigates the potential mechanisms of Xiaoyao Wan (XYW) in treating liver cirrhosis using network pharmacology and experimental methods. Gene targets related to XYW and liver cirrhosis were identified from the ETCM database and various human disease databases. Using tools like STRING, ToppGene, and Cytoscape, networks of protein interactions, Chinese herbs-chemical components-target genes, and Chinese herbs-liver cirrhosis pathways were constructed. Key target genes and chemical components were identified. *In vitro* experiments with the Lx-2 liver fibrosis cell line, treated with key XYW components, showed that the expression of crucial genes was affected. The study found 505 chemical components and 848 target genes associated with XYW. After intersecting with 622 liver cirrhosis genes, 30 overlapping genes were identified. Core genes included ALB, INS, IL1B, IL6, TNF, PPARG, TLR4, ARG1, and GPT. Key chemical components identified were quercetin, saikosaponin, apigenin, and kaempferol. *In vitro*, saikosaponin and quercetin showed a dose-dependent effect on Lx-2 cells and reduced expression of TNF, IL1B, IL-6, PPARG, TLR4, collagen, TGFB1, and α -SMA. The

收稿日期:2024-04-03 接受日期:2024-05-15

基金项目:江西省自然科学基金(20212BAB216054);天津医科大学朱宪彝纪念医院科研基金(2019ZXY01);天津市教委科研计划(2021KJ241);天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-032A)

*通信作者 E-mail:hghgejin@126.com

findings suggest that XYW treats liver cirrhosis through multiple targets and pathways.

Key words: liver cirrhosis; Xiaoyao Wan; network pharmacology; mechanism; signaling pathway; target gene

肝硬化(liver cirrhosis, LC)是一种临床上较为常见的慢性进行性肝病,其疾病特征为广泛性肝细胞进行性变性和坏死、结节性再生、纤维结缔组织异常增生伴肝小叶结构破坏和假小叶形成。目前全球每年因慢性肝病死亡人数超百万,其中一半以上为肝硬化患者,由肝硬化带来的疾病负担异常沉重^[1]。肝硬化的发病机制非常复杂,其中由于肝炎病毒的暴露导致的肝细胞受损是主要原因之一。肝炎病毒激发的免疫应答过程中会产生大量的炎症、转化等细胞因子,这将增强肝脏的炎症反应,加速肝纤维化过程。同时,大量细胞因子作用于细胞外基质,造成肝小叶结构被破坏,最终导致肝硬化的出现^[2]。目前尚无治疗肝硬化的特效西药,现阶段临床上只能开展围绕病因的治疗,以及围绕并发症的对症治疗。由于中医能够从更为整体、系统的层面调理患者体质,并改善疾病症状,因此中医在治疗肝硬化上具有独特优势。

在中医学中,肝硬化一般被列为“胁痛”“积聚”“臌胀”范畴,其病机主要是肝脏疏泄职能不利,气行不畅,血运受阻,长此以往则气滞血瘀。同时,肝气横逆致脾运失健,水湿内停,肝脾同病。气滞、血瘀、水湿终致病生。作为治疗肝郁脾虚证的良方,相关文献提示逍遥丸(Xiaoyao Wan, XYW)(同逍遥散)在治疗肝硬化作用上发挥重要作用^[3,4],多项临床研究发现逍遥丸治疗肝硬化具有良好的临床疗效^[5-7]。逍遥丸出自《太平惠民和剂局方》,方剂包括柴胡、白芍、当归、白术、茯苓、薄荷、姜以及甘草共8味中药。方中柴胡具有疏肝解郁功效,白芍可养血敛阴,柔肝缓急,两者配伍是疏肝解郁的常用良方;当归养血和血,以治血亏;白术、茯苓补中健脾,以治脾虚;薄荷疏郁,生姜温胃,甘草益气。多药共奏疏肝解郁,养血补脾虚之功效。早在1960年,已有文献记载逍遥丸可有效治疗肝硬化^[8]。至今,对逍遥丸应用于肝硬化治疗相关的基础及应用研究仍是学者们关注的热点,但逍遥丸治疗肝硬化的机制尚不清晰。现阶段,利用网络药理学方法探究中药方剂的作用机制已成为中药药理学研究的一个重要途径。通过分析药物相关大数据,网络药理学分析能够从系统、整体层面挖掘中药的作用机制。本研究则基于网络药理学方法,探讨逍遥丸治疗肝硬化

的作用机制,力求更全面深入解释逍遥丸的药效基础和治理肝硬化的疗效机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

槲皮素(批号:20220812,纯度100%)、柴胡皂苷(批号:20220825,纯度100%)(北京索莱宝生物有限公司);人肝纤维化细胞系(LX-2)(武汉普诺赛生命科技有限公司);DMEM/F12(批号:8123003, Gibco);胎牛血清(批号:02731059,上海雅酶生物医药科技有限公司);胰蛋白酶(批号:MA0233-MAR-1711,大连美仑生物技术有限公司 meilunbio[?]);胰蛋白酶(批号:20220316,北京索莱宝生物有限公司);CKK8试剂(批号:02711031,上海雅酶生物医药科技有限公司);TRIzol试剂(批号:368709, Life Technologies);染料法荧光定量预混试剂(+Dyell)(批号:Q30720,北京全式金生物科技股份有限公司);TransScript cDNA 第一链合成试剂盒(批号:Q20415,北京全式金生物科技股份有限公司)。

Centrifuge 5424R 低温高速离心机(德国 Eped-dorf);PCR ADVANCE B960 逆转录 PCR 扩增仪(杭州晶格科学仪器有限公司);SYNERGYMX 全波长扫描酶标仪(美国 Biotek);311 二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific);ABI QuantStudio 3 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific)。

1.2 逍遥丸化学成分及作用靶基因的获取

逍遥丸方剂中的各中药化学成分及作用靶基因数据均由传统中药百科全书数据库(ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/>)中获取。该数据库于2018年公布,共收录了402种中草药、3595种药方、7284种化学成分、2266个靶基因以及4323种疾病的详细信息。本研究中,首先以“Xiaoyao Wan”为关键词进行检索,可获取逍遥丸所含八味中草药名称、方剂适应症、方剂相关作用靶基因等。然后,以“柴胡”“当归”“白芍”“茯苓”“生姜”“甘草”“白术”和“薄荷”为关键词,获取每味中药的化学成分以及其作用靶基因。

1.3 肝硬化基因的获取

本研究以“liver cirrhosis”为关键词,由5个人类疾病相关数据库,包括 DisGenet 数据库、GeneCards

数据库、HPO 数据库、MarlaCards 数据库以及 NCBI Gene 数据库中检索肝硬化疾病基因。为了确保肝硬化基因集合的可靠性,本研究只保留至少被两个数据库收录的基因作为肝硬化基因,而仅被单一数据库收录的基因将被剔除。各数据库详细地址详见表 1。

表 1 肝硬化相关数据库
Table 1 Databases related to LC

数据库 Database	网址 Website
DisGenet	https://www.disgenet.org/
GeneCards	https://www.genecards.org/
HPO	https://hpo.jax.org/app/
MalaCards	https://www.malacards.org/pages/info/
NCBI Gene	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene

1.4 逍遥丸作用靶基因与肝硬化基因的重合基因挖掘、功能注释与网络构建

为了探讨逍遥丸对肝硬化的作用机制,本研究首先对逍遥丸直接靶向作用于肝硬化的基因进行挖掘,并对这些基因的功能进行注释。对逍遥丸相关的作用靶基因与肝硬化基因取交集后得到 30 个重合基因。随后,利用 ToppGene 在线工具(<https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>)对重合基因进行基因本体(Gene Ontology, GO)有关的生物过程(biological process, BP)进行富集分析。ToppGene 选择超几何分布检测策略,通过费舍尔确切概率法实现统计学上的显著性检验,并可以选择 Benjamini Hockberg 算法对显著性结果进行多重检验的校正。本研究中,选择 $FDR < 0.05$ 作为显著性阈值。此外,基于 String 数据库平台(<https://string-db.org/>),本研究以置信度大于 0.7 为标准就 30 个重合基因构建互作网络。经过分析该网络的拓扑结构,以节点度(degree)、节点介数(betweenness)为指标,由 30 个重合基因中挖掘出核心靶基因。

1.5 中药-化学成分-重合基因网络构建

为了鉴定出逍遥丸中哪味中药、哪些化学成分对治疗肝硬化发挥着重要作用,本研究将构建中药-化学成分-重合基因网络。基于 Cytoscape 软件,将 30 个重合基因对应的化学成分进行匹配,初步构建“化学成分-重合基因网络”。随后,将化学成分与八味中药进行匹配,将“化学成分-重合基因网络”扩建为“中药-化学成分-重合基因网络”。最后,利用 Cy-

toscape 软件的 Network Analyzer 插件对所构建网络进行度、接近中心性(closeness centrality)等参数相关的网络拓扑分析,以此挖掘出逍遥丸治疗肝硬化的关键中药及化学成分。

1.6 中药-肝硬化相关通路网络构建

作为一种复杂疾病,肝硬化相关基因往往通过多个基因彼此协同作用影响疾病的发生发展。在生物体内,一系列分子通过各种级联反应共同参与完成某一特定的生物学过程,便构成了生物学通路。本研究除了关注于重合基因外,还将由通路层面,探讨逍遥丸治疗肝硬化的机制。

首先,利用 ToppGene 在线工具,对肝硬化相关基因进行通路富集分析。选择伪发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 作为显著性阈值标准,得到与肝硬化有关的显著富集通路。随后,由富集通路所涵括的基因中,挖掘出逍遥丸的作用靶基因,并以此为桥梁构建“中药-肝硬化相关通路”网络。最后利用 Cytoscape 软件及相关插件进行可视化以及网络分析。

1.7 逍遥丸中有效成分实验验证

Lx-2 细胞按照 $2\ 000$ 个/ cm^2 进行接板,用 DMEM/F12 培养基在 $37\ ^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养。选取不同浓度的药物:柴胡皂苷(0 、 2.5 、 5 、 10 、 $15\ \mu\text{mol/L}$),槲皮素(0 、 25 、 50 、 100 、 $150\ \mu\text{mol/L}$)处理细胞 1 、 2 、 3 、 4 d 后进行 CKK8 实验,绘制生长曲线。Lx-2 细胞分为 a、b 组,a 组分为对照组、实验组,实验组给以柴胡皂苷 $5\ \mu\text{mol/L}$ 处理 48 h,b 组分为对照组、实验组,实验组给以槲皮素 $50\ \mu\text{mol/L}$ 处理 48 h 提取 RNA,然后采用实时荧光定量 PCR 方法检测 TNF、TL1B、IL-6、PPARG、TLR4、Collagen、TGFB1、 α -SMA 的表达水平。

2 结果

2.1 逍遥丸化学成分及作用靶基因

通过对 ETCM 数据库中有关逍遥丸的信息进行检索,经过合并去冗余之后共得到逍遥丸中化学成分 505 个,作用靶基因 848 个(见表 2)。

2.2 肝硬化相关基因

从 5 个人类疾病相关数据库中检索肝硬化相关基因,合并去冗余后共得到 622 个肝硬化基因,其中 164 个基因被 2 个及以上数据库共同收录(见图 1)。本研究将保留这 164 个基因作为肝硬化基因,作为后续研究的数据基础。

表 2 逍遥丸药材及其化学成分、潜在靶基因和归经

Table 2 Information of herbs in XYW and their chemical components, putative target genes and channel tropisms

逍遥丸中药 Chinese herbs contained in XYW	化学成分数量 Number of chemical component	靶基因数量 Number of target gene	归经 Channel tropism
薄荷 Menthae Haplocalycis Herba	28	40	肺经、肝经
白芍 Paeoniae Radix Alba	54	306	胃经、肾经
白术 Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	20	92	脾经、胃经
柴胡 Bupleuri Radix	62	238	肝经、胆经、肺经
当归 Angelicae Sinensis Radix	65	272	心经、肝经、脾经
甘草 Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma	133	208	心经、肺经、脾经、胃经
枸杞子 Lycii Fructus	57	573	肝经、肾经
生姜 Zingiberis Rhizoma Recens	124	105	肺经、脾经、胃经
总数 Total	505	848	胃经、肝经、肺经、脾经、肾经、心经、胆经

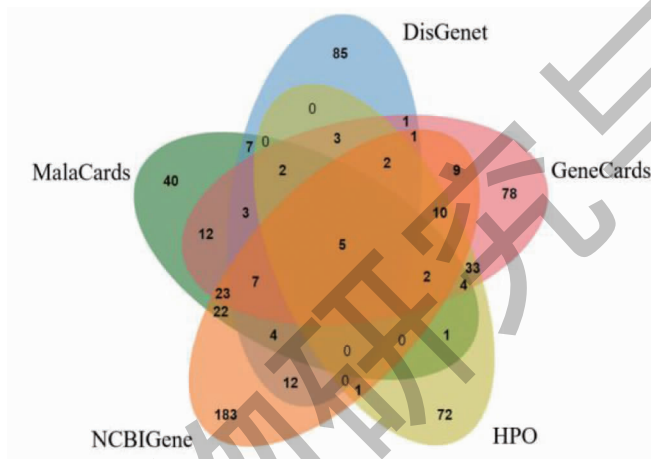


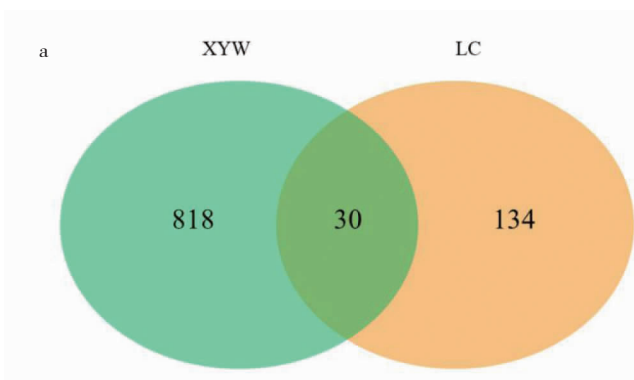
图 1 5 个数据库中检索得到的肝硬化基因信息

Fig. 1 LC genetic information retrieved from five databases

2.3 逍遥丸治疗肝硬化的直接作用靶基因及互作网络构建

将 848 个逍遥丸作用靶基因与 164 个肝硬化基因取交集后,得到 30 个重合基因(见图 2a)。经超几何分布检验得出,肝硬化基因显著富集于逍遥丸作用靶点($P = 5.49 \times 10^{-106}$)。对 30 个重合基因进行生物过程 GO 富集分析发现,这些基因主要参

与调控对某些分子或者化合物的响应,包括激素(response to hormone)、脂质(response to lipid)、胞外刺激(response to extracellular stimulus)、酒精(response to alcohol)等。另外,这些基因在肝脏发育(liver development)、肝胆系统发育(hepaticobiliary system development)过程中也发挥重要作用(见表 3)。



续图 2(Continued Fig.2)

b

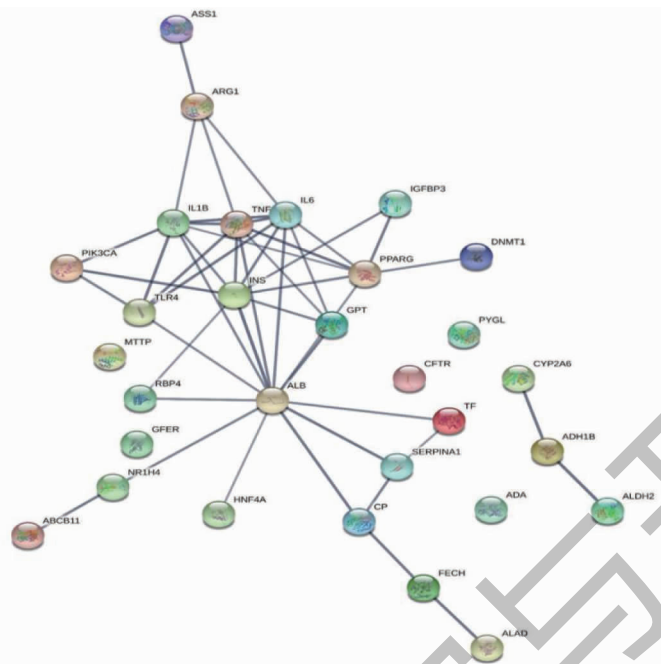


图 2 逍遥丸作用靶基因与肝硬化基因 Venn 图(a) 和 PPI 图(b)

Fig. 2 Venn (a) and PPI (b) of target genes of XYW and LC genes

表 3 显著富集于肝硬化重合基因的生物过程(前 20 个)

Table 3 Biological processes that are significantly enriched in overlapping genes in LC(Top 20)

ID	生物过程全称 Full names of biological process	伪发现率 FDR
GO:0014070	对有机环化合物反应 Response to organic cyclic compound	6.60×10^{-17}
GO:0009725	对激素反应 Response to hormone	6.60×10^{-17}
GO:0033993	对脂质反应 Response to lipid	1.03×10^{-14}
GO:0010243	对有机氮化合物反 Response to organonitrogen compound	2.46×10^{-14}
GO:0001889	肝脏发育 Liver development	4.90×10^{-14}
GO:0061008	肝胆系统发育 Hepaticobiliary system development	5.04×10^{-14}
GO:1901698	对氮化合物的反应 Response to nitrogen compound	5.23×10^{-14}
GO:0046903	分泌 Secretion	1.04×10^{-13}
GO:1901654	酮反应 Response to ketone	1.04×10^{-13}
GO:0010035	对无机物质的反应 Response to inorganic substance	4.01×10^{-12}
GO:0032496	对脂多糖的反应 Response to lipopolysaccharide	4.68×10^{-12}
GO:0031667	对营养水平的反应 Response to nutrient levels	4.68×10^{-12}
GO:0002237	对细菌分子的反应 Response to molecule of bacterial origin	7.91×10^{-12}
GO:0009991	对细胞外刺激的反应 Response to extracellular stimulus	8.45×10^{-12}
GO:1901652	对肽的反应 Response to peptide	9.32×10^{-12}
GO:0009617	对细菌的反应 Response to bacterium	9.70×10^{-12}
GO:0097305	对酒精的反应 Response to alcohol	1.58×10^{-11}
GO:1901701	对含氧化合物的细胞反应 Relular response to oxygen-containing compound	2.21×10^{-11}
GO:0043434	对肽激素的反应 Response to peptide hormone	2.32×10^{-11}
GO:0032940	细胞分泌 Secretion by cell	5.36×10^{-11}

重合基因之间的相互作用关系由 String 数据库获得,如图 2b 所示,30 个基因节点之间存在着 47 个互动边,互动边个数显著高于随机水平($P < 1 \times 10^{-16}$),这提示着重合基因之间存在着紧密的互

相互作用关系。对互作网络分析后得出,该互作网络的平均节点度为 3.33,节点度超过平均值的核心基因节点有 9 个,分别为 ALB、INS、IL1B、IL6、TNF、PPARG、TLR4、ARG1 和 GPT。核心基因的详细信息见表 4。

表 4 相关核心基因的详细信息

Table 4 Detailed information about the relevant core genes

基因简称 Gene symbol	基因名称 Gene name	节点度 Degree
PPARG	过氧化物酶体 增殖激活受体 Peroxisome proliferator activated receptor gamma	7
TLR4	Toll 样受体 4 Toll like receptor 4	5
ARG1	精氨酸酶 1 Arginase 1	4
GPT	谷丙转氨酶 Glutamic-pyruvic transaminase	4
ALB	白蛋白 Albumin	13
INS	胰岛素 Insulin	9
IL1B	白介素 1 β Interleukin 1 beta	8
IL6	白介素 6 Interleukin 6	8
TNF	肿瘤坏死因子 Tumor necrosis factor	8

2.4 逍遥丸治疗肝硬化的关键中药及化学成分筛选

为了筛选出逍遥丸治疗肝硬化的关键中药以及化学成分,本研究首先构建中药-化学成分-肝硬化基因网络,并利用 Cytoscape 软件进行可视化。如图

3 所示,中药-化学成分-肝硬化基因网络由 182 个节点,462 个边构成。其中 182 个节点包括 8 个中药节点、30 个肝硬化基因节点、144 个化学成分节点。利用 Network Analyzer 插件分析拓扑结构后发现,对于肝硬化基因而言,TNF、ALDH2、NR1H4 以及 IL1B

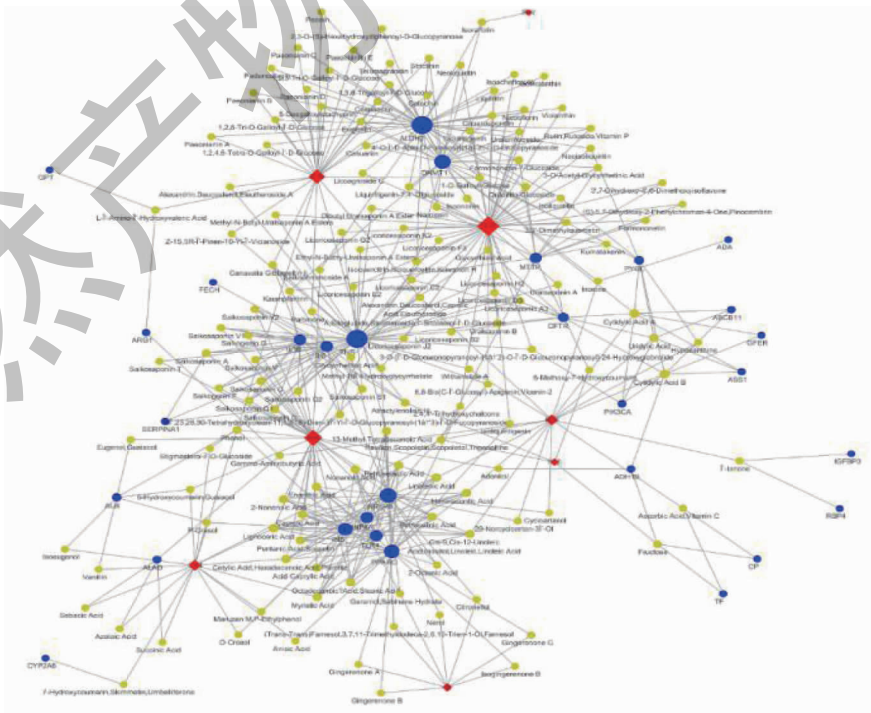


图 3 “中药-化学成分-肝硬化”基因网

Fig. 3 “Chinese herbal medicines-chemical components-liver cirrhosis” genes network

等基因被逍遥散的化学成分靶向作用的频次较高,提示着这些基因在逍遥散治疗肝硬化过程中发挥着重要的作用。对于中药而言,八味中药中甘草中有47个化学成分可作用于肝硬化基因,位列第二三位的分别为柴胡(34个)和白芍(18个)。对于化学成

分而言,槲皮素、芹黄素、胡萝卜甾醇、山柰素及柴胡皂苷等成分在网络中的接近中心性得分较高,提示着这些化学成分距离肝硬化基因节点的距离接近,是治疗肝硬化的重要组分。拓扑分析结果见表5~7。

表5 中药-化学成分-肝硬化基因网络节点拓扑参数(中药)

Table 5 Topological parameters of "Chinese herbal medicines-chemical components-liver cirrhosis genes" network (Chinese herbal medicines)

名称 Name	度 Degree	接近中心性 Closeness centrality
甘草 Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	47	0.36
柴胡 Bupleuri Radix	34	0.38
白芍 Paeoniae Radix Alba	28	0.36
当归 Angelicae Sinensis Radix	17	0.33

表6 中药-化学成分-肝硬化基因网络节点拓扑参数(化学成分)

Table 6 Topological parameters of "Chinese herbal medicines-chemical components-liver cirrhosis genes" network (chemical components)

名称 Name	度 Degree	接近中心性 Closeness centrality
槲皮素 Quercitrin	4	0.37
羟基苷 Hydroxyglycoside	3	0.34
草酸 Glycyrrhetate	3	0.34
芹黄素 Apigeni	3	0.34
胡萝卜素 Daucosterol	3	0.34
芍药二酮 Palbinone	3	0.34
亚麻酸 Linolenic acid	7	0.33
苯酚 Phenol	5	0.33
葡萄糖苷 Glucoside	4	0.32
水仙碱 Narcissin	4	0.32
异芒柄花苷 Isoononin	4	0.32
芒柄花黄素 Formononetin	4	0.32
甘草内酯 Glabrolide	3	0.32
乌拉尔甘草皂苷 B/A Uralsaponin B/A	3	0.32
甘草皂苷 Licorice saponin	3	0.32
甘草酸 Glycyrrhizic acid	3	0.32
山柰素 Kaempferitrin	3	0.32
棕榈酸 Cetylicacid	7	0.32
柴胡皂苷 Saikosaponin	5	0.31
异甘草素 Isoliquiritigenin	2	0.31

表7 中药-化学成分-肝硬化基因网络节点拓扑参数(肝硬化基因)

Table 7 Topological parameters of "Chinese herbal medicines-chemical components-liver cirrhosis genes" network(LC genes)

名称 Name	度 Degree	接近中心性 Closeness centrality
TNF	40	0.37
ALDH2	40	0.33
NR1H4	27	0.35
DNMT1	26	0.33
PPARG	24	0.35
INS	20	0.30
HNF4A	16	0.29
TLR4	16	0.29
IL1B	14	0.27
IL6	14	0.26
MTTP	13	0.31
CFTR	10	0.28
PYGL	7	0.28
ALB	6	0.25
PIK3CA	4	0.28

2.5 逍遥丸治疗肝硬化的关键通路筛选

2.5.1 KEGG 通路富集分析

对 164 个肝硬化基因进行通路富集分析,共有 55 条通路达到统计学显著性水平 ($FDR < 0.05$)。其中细胞因子-细胞因子受体互相作用(cytokine-cytokine receptor interaction)、Toll 样受体信号通路

(Toll-like receptor signaling pathway)、HIF1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、代谢相关通路以及细胞黏着等重要通路的异常与肝硬化的发生发展密切相关,该结果也反映出肝硬化的发病机制非常复杂,涉及多条重要生化通路的失调(见表 8)。

表8 显著富集于肝硬化基因的 KEGG 通路(前 20 个)

Table 8 KEGG pathways enriched in LC genes(Top 20)

编号 ID	KEGG 通路全称 KEGG pathway name	伪发现率 FDR
83051	细胞因子-细胞因子受体反应 Cytokine-cytokine Receptor interaction	1.57×10^{-9}
83076	toll 样受体信号通路 Toll-like receptor signaling pathway	2.06×10^{-9}
695200	HIF-1 信号通路 HIF-1 signaling pathway	1.23×10^{-8}
692234	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway	1.63×10^{-7}
83077	Jak-STAT 信号通路 Jak-STAT signaling pathway	7.14×10^{-6}
989139	AMPK 信号通路 AMPK signaling pathway	2.46×10^{-5}
83032	药物代谢-细胞色素 P450 Drug metabolism-cytochrome P450	2.46×10^{-5}
83031	细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3.48×10^{-5}
1469482	Th17 细胞分化 Th17 cell differentiation	6.40×10^{-5}
1474301	IL-17 信号通路 IL-17 signaling pathway	1.40×10^{-4}
83093	脂肪细胞因子信号通路 Adipocytokine signaling pathway	1.51×10^{-4}
921162	Fox O 信号通路 FoxO signaling pathway	2.45×10^{-4}

续表 8 (Continued Tab. 8)

编号 ID	KEGG 通路全称 KEGG pathway name	伪发现率 FDR
83073	补体和凝血级联反应 Complement and coagulation cascades	3.20×10^{-4}
812256	TNF 信号通路 TNF signaling pathway	3.34×10^{-4}
82943	精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis	5.68×10^{-4}
83067	聚焦粘附 Focal adhesion	8.99×10^{-4}
193146	胆汁分泌 Bile secretion	1.15×10^{-3}
790012	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	1.49×10^{-3}
128760	IgA 产生的肠道免疫网络 Intestinal immune network for IgA production	1.51×10^{-3}
749777	Hippo 信号通路 Hippo signaling pathway	2.80×10^{-3}



图 4 中药-肝硬化相关通路网络

Fig. 4 “Chinese herbal medicines-KEGG pathways” network diagram

2.5.2 中药-肝硬化相关通路网络构建与分析

为了探讨各味中药对肝硬化相关通路的作用机制,本研究以通路相关基因与中药作用靶基因的交集为数据基础进行网络构建,并用 Cytoscape 进行可视化。如图 4 所示,“中药-肝硬化相关通路网络”由 57 个节点以及 279 条边构成。这意味着 8 味中药与 49 条肝硬相关通路存在着紧密的作用关系,其中 5 条通路受到 8 味中药的直接作用,包括胰高糖素信号通路(glucagon signaling pathway)、Th17 细胞分化(Th17 cell differentiation)、甾类激素生物合成

(steroid hormone biosynthesis)、糖解与糖代谢合成(glycolysis / gluconeogenesis)以及代谢相关通路(metabolic pathways)。12 条通路被 7 味中药靶向作用,包括 IL-17 信号通路、药物代谢通路等。

鉴于逍遥丸具有多化学成分、多作用靶基因的特点,本研究进一步探讨了逍遥丸中的中药对肝硬化相关通路的作用情况。通过构建中药-肝硬化相关通路网络,研究发现 8 味中药与 49 条肝硬化相关通路之间存在着紧密的调控作用。其中代谢相关通路、Th17 细胞分化、甾类激素生物合成等 5 条通路

被 8 味中药靶向作用, IL-17 信号通路、药物代谢通路等 12 条通路被 7 味中药靶向作用。结果说明逍遥丸治疗肝硬化机制复杂, 涉及多条生化通路的参与。

2.6 有效成分柴胡皂苷、槲皮素与关键靶点的细胞验证

2.6.1 CKK8 法检测 Lx-2 在柴胡皂苷、槲皮素作用下的生长曲线

如图 5 所示, 对于逍遥丸有效成分柴胡皂苷、槲

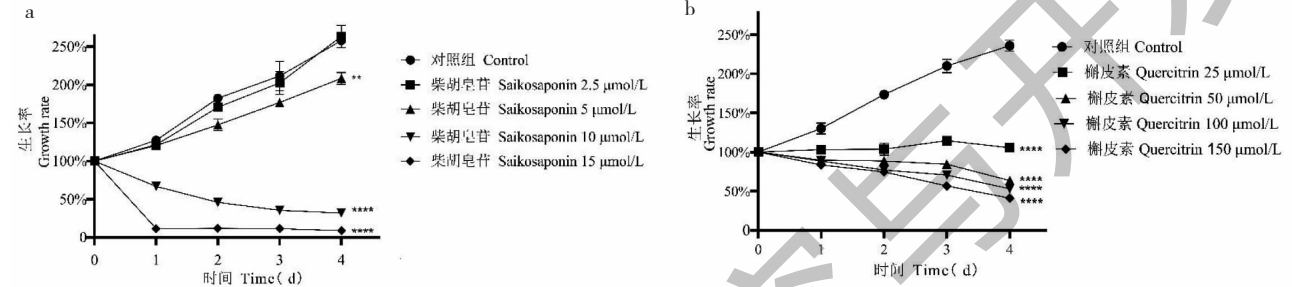


图 5 Lx-2 在柴胡皂苷、槲皮素处理后生长曲线

Fig. 5 Growth curves of Lx-2 after treatment with saikosaponin and quercetin

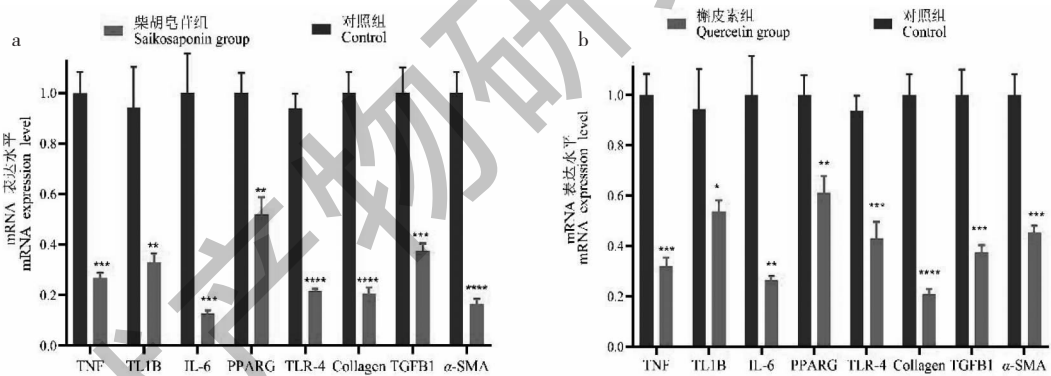


图 6 Lx-2 在柴胡皂苷、槲皮素处理后相关基因表达

Fig. 6 Expression of related genes of Lx-2 treated with active ingredients of saikosaponin and quercetin

3 讨论与结论

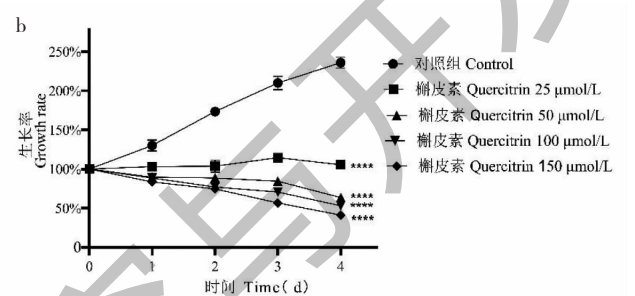
逍遥丸具有多作用靶基因的特点, 本研究挖掘出 30 个直接作用于肝硬化的作用靶基因, 其中编码白蛋白基因 ALB、编码白介素相关基因 IL6 和 IL1B、编码肿瘤坏死因子基因 TNF 等 9 个基因为逍遥丸治疗肝硬化的核心靶基因。

ALB 具有维持胶体渗透压、免疫调节、炎症反应和维持微循环功能完整性的功能。对于肝硬化患者而言, 其白蛋白的合成、转运及释放相应受阻。随着病情加重, 白蛋白表达水平相应降低^[9]。本研究经网络分析发现, 逍遥丸中的当归、柴胡、白芍中的

皮素来说, 其对 Lx-2 细胞的生长抑制均是呈剂量依赖性的。用高剂量浓度的柴胡皂苷、槲皮素处理 Lx-2 细胞时, 可观察到与剂量相关的死亡细胞。

2.6.2 柴胡皂苷、槲皮素可抑制相关基因的表达

为了初步探究逍遥丸治疗肝硬化的作用机制, 我们采用荧光定量 PCR 技术对 TNF、TL1B、IL-6、PPARG、TLR4、Collagen、TGFB1、α-SMA 的表达进行了检测。如图 6 所示, 可见 TNF、TL1B、IL-6、PPARG、TLR4、Collagen、TGFB1、α-SMA 的表达均降低。



香豆素、香草醛、对甲酚等化学成分可直接作用于 ALB, 其中当归位居榜首。前人已发现, 当归制剂可以增加人脐血单个核细胞表达肝细胞特征产物白蛋白、白蛋白 mRNA, 加快人脐血单个核细胞表达白蛋白的时间, 提示当归可以促进人脐血单个核细胞向肝细胞的分化及缩短其向肝细胞分化的时间, 增强治疗肝损伤的效果^[10]。因此, 逍遥丸通过促进白蛋白基因的表达, 实现护肝助肝、祛湿导泄的功效。

对于白介素相关基因而言, 首先白介素在传递信息, 激活与调节免疫细胞, 介导 T、B 细胞活化、增殖与分化及在炎症反应中起重要作用, 在组织纤维

化的发生发展过程中具有重要的作用。研究表明肝硬化是一种慢性炎症相关性疾病,相比于一般人群,肝硬化患者血浆白介素因子水平有显著升高^[11]。本研究经网络分析发现,柴胡中的有效成分柴胡皂苷是靶向作用于 IL6 和 IL1 β 的最重要化学成分。柴胡皂苷具有广泛的生理药理活性,包括免疫调节、抗肿瘤、抗炎、解热等。实验表明,柴胡皂苷可以作为一种抗炎成分抑制炎症反应,其机制可能是柴胡皂苷通过阻止核因子的激活来抑制一氧化氮的产生,进而减少 IL-6 的释放^[12]。此外,柴胡皂苷对肿瘤坏死因子基因 *TNF* 也存在直接靶向作用。与 IL6 和 IL1 β 类似,*TNF* 也是一种具有炎性的细胞因子,影响多种疾病的发生发展过程。实验证实,柴胡皂苷可显著降低大鼠术后炎症因子 *TNF* 水平^[13]。此外,对于其他核心基因而言,如编码 Toll 样受体相关基因在逍遥丸的抗炎作用中也非常重要。Toll 样受体是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子,在肝硬化的发生发展过程中具有重要作用,其表达水平对肝硬化的诊断和预后具有重要意义^[14]。因此,柴胡皂苷的抗炎功效,是逍遥丸治疗肝硬化的重要机制之一。

逍遥丸具有多化学成分的特点,ETCM 数据库中共收录了 505 个化学成分,其中槲皮素、甘草次酸甲酯、芹黄素、山柰素及柴胡皂苷等化学成分位于中药-化学成分-肝硬化基因网络的关键位置,是逍遥丸治疗肝硬化的重要化学成分。槲皮素是一种黄酮类化合物,具有抗炎、抗病毒、抗氧化、免疫调节、清除自由基等多种生物学作用。槲皮素能够通过抑制炎症反应、氧化应激及脂质代谢等途径改善由于脂肪肝导致的肝损伤^[15]。此外,近期研究发现,槲皮素通过抑制 TLR4/CXCL9/PREX2 通路,减轻肝硬化大鼠炎症反应,缓解肝硬化进程,保护肝功能^[16]。许壮强等人通过分析槲皮素对肝星状细胞胶原蛋白表达的影响,发现槲皮素对肝星状细胞胶原蛋白表达、细胞周期具有显著的调控作用。而肝星状细胞在肝纤维化、肝硬化发生发展过程中起着重要的作用^[17]。类似地,芹黄素也属于黄酮类化合物,同样能够降低肝星状细胞增殖和胶原合成。具体来讲,芹黄素一方面可使前胶原基因表达降低,另一方面可能通过自由基机制减少肝星状细胞的增殖和胶原合成^[18]。山柰素也是一种具有抗炎、抗氧化作用的黄酮类化合物,研究表明山柰素可通过抑制 JNK 磷酸化,降低肝细胞氧化应激,抵抗肝细胞凋亡达到保

护肝细胞的作用^[19]。柴胡皂苷可显著降低细胞炎症反应,下调 IL6、IL1 β 、*TNF* 等致炎因子的表达,达到保护肝细胞的作用。总之,本研究通过网络构建与分析,从 500 多个化合物中筛选出以上关键的化合物成分,研究结果能够与先验知识互相印证,也表明逍遥丸治疗肝硬化是多成分共同作用的结果。

鉴于逍遥丸具有多化学成分、多作用靶基因的特点,本研究结果说明逍遥丸治疗肝硬化机制复杂,涉及多条生化通路的参与。逍遥丸作用于肝硬化的通路中包括多条炎症相关通路,如 *TNF* 信号通路、IL-17 信号通路、Toll 样受体信号通路、T 细胞信号通路等。该结果再一次说明逍遥丸可通过免疫调节、炎症反应等途径作用于肝硬化的治疗。另外,促血管新生相关通路,如 HIF 信号通路、PI3K/Akt 信号通路,也受到逍遥丸中多个中药的靶向作用。研究发现,相比于正常人群,HIF 的表达水平在肝硬化患者中显著升高,其与肝细胞缺氧情况密切相关。同时,HIF 信号通路可促进肝内脂质堆积,激活 Toll 样受体通路,引起肝脏炎症损伤^[20]。PI3K/Akt 信号通路参与多种生物过程,与炎症免疫反应、细胞凋亡、血管生成等过程均有相关性,对多种肝病的发生发展起到重要作用^[21]。此外,逍遥丸相关中药靶向作用于 FoxO 信号通路,FoxO 能够抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡,与肝病的发生发展密切相关。最后,与代谢相关的通路,包括药物代谢、脂代谢等,在逍遥丸治疗肝硬化的过程中具有重要作用。比如,多种物质的代谢依赖于正常的肝,肝硬化一方面影响了肝脏的正常代谢调节功能,无法正常代谢糖脂等物质;另一方面糖脂等物质的代谢紊乱可能会进一步加重肝硬化的病程发展^[22]。逍遥丸中的多种中药可能通过影响这些代谢通路,实现保肝用肝的功效。

本研究应用网络药理学方法,对逍遥丸治疗肝硬化的机制做出系统分析。研究发现逍遥丸治疗肝硬化的直接作用核心靶基因包括 ALB、IL-6、IL-1 β 、*TNF* 等基因,这些基因主要参与免疫调节、炎症反应、代谢等生物过程。同时,确定出黄酮类化合物,如槲皮素、芹黄素、山柰素等是逍遥丸治疗肝硬化的重要化学成分,这些化合物通过抗炎、抗氧化、免疫调节、清除自由基等多种生物学途径实现对肝细胞的保护。此外,多条炎症相关通路、促血管新生相关通路以及代谢相关通路受到逍遥丸的靶向影响,在逍遥丸治疗肝硬化过程中发挥重要作用。尽管本研究的结果能够与先验知识互相支持,增强了人们对

逍遥丸治疗肝硬化作用机制的进一步理解,但不可否认的是,本研究还有一定的局限性。比如:本研究所有数据均来源于数据库,鉴于数据库中的数据可能不够完整,因此中药相关的数据信息可能有所遗漏,其次本研究只是选取逍遥丸关键因子槲皮素、柴胡皂苷在肝纤维化细胞系上初步在基因分子层面进行了验证,后续还需对逍遥丸在肝硬化动物模型上进一步实验验证。

参考文献

- Gines P, Krag A, Abraldes JG, et al. Liver cirrhosis[J]. *Lancet*, 2021, 398:1359-1376.
- Manns MP, Maasoumy B. Breakthroughs in hepatitis C research: from discovery to cure [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19:533-550.
- Chai Z, Du S, Fan HJ, et al. Clinical application and modern research progress of treatment of liver diseases by Xiaoyao Powder and its modification[J]. *Chin J Tradit Chin Med*(中华中医药杂志), 2017, 32:3631-3634.
- Liu P, Huang YC, Zhuang KH, et al. Analysis the medication rules of traditional Chinese medicine patent compound based on data mining for cirrhosis ascites[J]. *World J Integr Tradit West Med*(世界中西医结合杂志), 2022, 17:38-47.
- Ren YH. A clinical analysis on treating 38 cases of cirrhosis ascites in the integrative medicine[J]. *Clini J Chin Med*(中医临床研究), 2013, 5:42-43.
- Liu YJ. Efficacy of the Shugan Jianpi Huoxue prescription plus Xiaoyao San on liver function of patients with hepatitis B and cirrhosis[J]. *Clin J Chin Med*(中医临床研究), 2021, 13:83-85.
- Ge BJ, Xiao TG, Zhou Y, et al. Clinical study of Xiaoyao SAN combined with entecavir in the treatment of 30 cases of compensatory stage of liver depression and spleen deficiency type hepatitis B cirrhosis[J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*(江苏中医药), 2020, 52:29-31.
- Li GY, Chen WY. Treatment of liver cirrhosis with Xiaoyao powder[J]. *Fujian J Tradit Chin Med*(福建中医药), 1960, 1:18.
- Lv JL. Correlation between serum total bile acid, albumin and cholinesterase levels and child-pugh grade in patients with hepatitis cirrhosis [J]. *Clin Pract Integr Tradit Chin West Med*(实用中西医结合临床), 2021, 21:113-114.
- Fu JL, Zeng Y, Long ZL, Tang XP. *Angelica sinensis*(oliv.) diels and *lycium chinense* mill preparations induce the differentiation of cord blood mononuclear cells into hepatocytes; Expression of human albumen[J]. *J Clin Rehabil Tiss Eng Res*(中国组织工程研究与临床康复), 2011, 15:8418-8423.
- Labenz C, Toenges G, Huber Y, et al. Raised serum Interleukin-6 identifies patients with liver cirrhosis at high risk for overt hepatic encephalopathy [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019, 50:1112-1119.
- Chen CH, Jin SZ, Han MZ, et al. Research progress of bupleurin in the treatment of cirrhosis[J]. *Chin J Integr Tradit West Med Dig*(中国中西医结合消化杂志), 2016, 24:565-567.
- Yang YJ, Xi ZW. Effects of Saponin A on serum interleukin-6 and tumor necrosis factor- α after anorectal surgery in rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol*(中国临床药理学杂志), 2021, 37:1840-1854.
- Fan XY, Liu FF, Chen LL. Diagnostic value of peripheral blood CD14 + monocyte Toll-like receptor 2 expression in patients with cirrhosis complicated with infection[J]. *Clin J Pract Hosp*(实用医院临床杂志), 2021, 18:104-107.
- Yang H, Yang T, Heng C, et al. Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice [J]. *Phytother Res*, 2019, 33:3140-3152.
- Xu ZQ, Zhang WL, Wu WH, et al. Effects of quercetin on TLR4-CXCL9-PREX-2 pathway and liver function in cirrhotic rats[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2021, 44:1976-1980.
- Jiang W, Deng ZL, Li FC. Effects of quercetin on collagen expression and cell cycle of human hepatic stellate cells[J]. *Chongqing Med J*(重庆医学), 2018, 47:1179-1182.
- Zhao WX, Yang JL, Zhao J, et al. Effects of cainflavin and naringin on proliferation and collagen synthesis of hepatic stellate cells[J]. *Chin Hepatol*(肝脏), 2005, 10:226-227.
- Zhang WX, LAN T, Dong JL, et al. Effect of kaempferol on hepatocyte injury induced by acetaminophen [J]. *World J Tradit Chin Med*(世界中医药), 2019, 14:39-43.
- Nath B, Levin I, Csak T, et al. Hepatocyte-specific hypoxia-inducible factor-1 α is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcohol-induced steatosis in mice [J]. *Hepatology*, 2011, 53:1526-1537.
- Wang M, Zhang J, Gong N. Role of the PI3K/Akt signaling pathway in liver ischemia reperfusion injury; a narrative review[J]. *Ann Palliat Med*, 2022, 11:806-817.
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2012, 56:952-964.