

GEO 芯片分析联合网络药理学探讨五味子-枸杞子 保护放射性肝损伤的机制研究

李建华, 刘沛瑶, 王志鹏, 王若琪, 许文黎, 刘晓明, 李建国*

中国辐射防护研究院中核放射毒理与放射性药物临床前评价重点实验室, 太原 036000

摘要: 利用转录组学、网络药理学和分子对接的技术预测五味子-枸杞子保护放射性肝损伤的活性成分、作用靶点及作用机制。通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)筛选出五味子-枸杞子主要活性成分, 从五味子中筛选出 14 个活性成分, 枸杞子中筛选出 25 个活性成分, 核心成分主要为槲皮素、黄豆黄素和去氧紫草素; 通过 GeneCards、在线人类孟德尔遗传数据库获得辐射损伤的靶点基因, 利用 UniProt 对所获得的基因进行校正, 共同关键靶点共 66 个, 利用 Cytoscape 3. 8. 0 软件构建药物-活性成分-关键靶点-放射性肝损伤调控网络, 将活性成分与疾病共同靶点上上传至 String 数据库, 构建药物靶蛋白-放射性肝损伤蛋白相互作用(PPI)网络, 根据度值筛选关键核心靶点为 CASP3、EGFR、ESR1; 对关键靶点进行功能富集分析及通路富集分析, 五味子-枸杞子活性成分主要参与化学致癌-受体激活、脂质与动脉粥样硬化、PI3K-Akt、MAPK、凋亡等信号通路; 分子对接结果提示 3 个活性成分与靶蛋白结合能力较强。本研究初步发现五味子-枸杞子可能通过槲皮素、黄豆黄素和去氧紫草素调节化学致癌-受体激活、脂质与动脉粥样硬化、PI3K-Akt、MAPK、凋亡等多个信号通路发挥保护放射性肝损伤的作用。

关键词: 五味子; 枸杞子; 放射性肝损伤; 转录组学; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)6-1058-11

DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2023. 6. 015

Protective effect of Schisandrae Chinensis Fructus and Lycii Fructus on radiation-induced liver injury based on GEO chip analysis and network pharmacology

LI Jian-hua, LIU Pei-yao, WANG Zhi-peng,
WANG Ruo-qi, XU Wen-li, LIU Xiao-ming, LI Jian-guo*

CNNC Key Laboratory on Radiotoxicology and Radiopharmaceutical Preclinical Evaluation,
China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 036000, China

Abstract: Using transcriptomics, network pharmacology, and molecular docking techniques to predict the active components, targets, and mechanisms of Schisandrae Chinensis Fructus (SCF) and Lycii Fructus (LF) in protecting against radiation-induced liver injury. The main active components of SCF and LF were selected through traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform(TCMSP), 14 active components were selected from SCF, and 25 active components were selected from LF. The core components were mainly quercetin, glycitein and arnebin 7; The target genes for radiation injury were obtained through genecards and online human mendelian genetic database, and the obtained genes were corrected by UniProt, a total of 66 key targets were found. A drug-active component-key target-radiation liver injury control network was constructed using cytascape software, and the targets for active components and diseases were uploaded to the string database, Construct a drug target protein radiation liver injury protein interaction network, and select the key core targets as CASP3, EGFR, and ESR1 based on the degree value; The function enrichment analysis and pathway enrichment analysis of key targets were carried out, The active components of SCF and LF were mainly involved in chemical carcinogenesis receptor

activation, lipid and arterial atherosclerosis, PI3K-Akt, MAPK, apoptosis, etc; Molecular docking results suggest that the three active components have strong binding ability to target proteins. This study preliminarily found that SCF and LF may play a protective role in radiation-induced liver injury by regulating chemical carcinogenesis receptor activation, lipid and arterial atherosclerosis, PI3K-Akt, MAPK, apoptosis and other signaling pathways through quercetin, glycitein and arnebin 7.

Key words: Schisandrae Chinensis Fructus; Lycii Fructus; radiation-induced liver injury; transcriptomics; network pharmacology; molecular docking

放射性肝损伤(radiation-induced liver injury, RILI)是经过放射治疗或核泄漏等方式使肝脏受到一定量的照射后而造成的肝功能下降、肝酶升高等损伤,光镜下早期肝脏组织病理主要表现为肝小叶中央区淤血、肝细胞水肿及炎症反应等,晚期逐渐发展成肝纤维化、肝硬化,这种晚期的病变是不可逆转的。主要发病机制包括微血管及结缔组织损伤、自由基过多、自身免疫反应过大及细胞因子影响等^[1-3]。

五味子(Schisandrae Chinensis Fructus, SCF)本文指的是北五味子,性温,研究发现具有较好保护肝脏的作用,其作用机制主要通过抗氧化、抗炎等方式^[4]。枸杞子(Lycii Fructus, LF),性平,药理作用表明具有滋补肝肾的作用,两者搭配能更有效的保护肝脏损伤^[5]。本文通过利用 GEO 芯片分析、网络药理学及分子对接技术对五味子配伍枸杞子保护 RILI 潜在的活性成分、作用靶点及作用机制进行预测,为进一步的深入研究与临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 五味子-枸杞子活性成分、相应靶点筛选

以口服利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug-likeness, DL)两个因素作为筛选条件,在中药系统药理学分析平台(TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>),检索五味子-枸杞子活性成分、相应靶点,利用 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)将所得靶点转化为基因 Symbol。

1.2 放射性肝损伤相关靶点获取

以“Radiation induced liver injury”为关键词。通过基因名片数据库(GeneCards, <http://www.genecards.org>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org>)挖掘放射性肝损伤的潜在靶点;同时利用 GEO2R 分析来源于 GEO 数据库中的 GSE202586 芯片,分析该芯片中对照组与 12 戈瑞(Gy)照射后 48 h 雌性小鼠肝脏的差异基因。将以上所有筛选结果合并去重后得到 RILI 的相关基因。使用 R 软件中的 VennDiagram 包将“五味子-枸杞子”的靶基因和 RILI 靶基因取交集并可视化,用于

后续研究。

1.3 药物-活性成分-基因靶点-疾病网络的构建

将上述获得的五味子-枸杞子的活性成分以及相关靶点通过 Cytoscape 3.8.0 软件构建“五味子-枸杞子”-活性成分-靶点-放射性肝损伤网络图,初步研究五味子-枸杞子保护 RILI 的药理作用及作用机制。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建

为了研究靶点蛋白的相互作用,确定五味子-枸杞子作用靶点群,将靶点基因上传至在线 String 11.5(<http://string-db.org>),导入基因表达产物,构建 PPI 网络互作图。将蛋白互作结果导入 Cytoscape 3.8.0 软件,根据 Degree 值,筛选关键核心靶点。

1.5 GO 与 KEGG 的富集分析

获得五味子和枸杞子保护 RILI 的共同蛋白靶点后,通过利用 R 软件(包括“DOSE”“ClusterProfiler”“Pathview”三个 Packages)进行 GO 生物过程富集分析和 KEGG 通路富集分析,并对数据进行可视化。

1.6 分子对接

基于“1.3”的分析结果选取核心化合物,通过导入 TCMSP 数据库中得到化合物分子结构,以 mol2 的格式导出,通过 Chem3D 进行转换。根据化合物选取相应高自由度的靶蛋白,通过蛋白结构数据库(PDB)得到 3D 结构。使用 PyMol 2.2 对核心蛋白进行去除水分子、盐离子及其小分子。并使用 PyMol 定义对接盒子的中心,并使对接盒子包裹蛋白活性位点。此外,使用 AutoDock Tools 将所有处理好后的小分子以及受体蛋白转换为 PDBQT 格式。利用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接,对接时的条件是全局搜索的详尽度设为 20,能量为 5。最后使用 PyMol 2.2 软件对结果进行可视化分析。

2 结果

2.1 五味子-枸杞子活性成分及对应靶点的结果

对五味子-枸杞子的活性成分进行检索,五味子设置 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件,并查阅文献共获得 14 个活性成分;枸杞子设置 $OB \geq 40\%$ 和

DL \geq 0.18 为筛选条件,共获得 25 个活性成分(见表 1),经查阅中国药典,枸杞子中含有较多的甜菜碱,但因类药性(DL = 0.01) < 0.18 未将甜菜碱纳入本

研究^[6]。同时利用 TCMSP 数据库获得活性成分所对应的潜在的作用靶点,并在 Uniprot 数据库中对靶点蛋白进行校正和去重后,共筛选出 94 个靶点。

表 1 五味子-枸杞子活性成分信息

Table 1 Active ingredient information of SCF and LF

序号 No.	分子号 MOL ID	活性成分 Active ingredient	OB(%)	DL
1	MOL004624	长管贝壳杉素 A Longikaurin A	47.72	0.53
2	MOL005317	脱氧三尖杉酯碱 Deoxyharringtonine	39.27	0.81
3	MOL008956	当归酰基戈米辛 O Angeloylgomisin O	31.97	0.85
4	MOL008957	五味子酯乙 Schizandrer B	30.71	0.83
5	MOL008968	戈米辛 A Gomisin A	30.69	0.78
6	MOL008974	戈米辛 G Gomisin G	32.68	0.83
7	MOL008978	戈米辛 R Gomisin R	34.84	0.86
8	MOL008992	五味子丙素 Wuweizisu C	46.27	0.84
9	MOL008993	蚕豆酮 Wyerone	79.24	0.13
10	MOL001948	香柏素 Nootkatin	31.82	0.08
11	MOL005604	五味子醇 Schisandrin	7.69	0.66
12	MOL007719	去氧紫草素 Arnebin 7	73.85	0.18
13	MOL004678	利美汀 Limetin	36.63	0.09
14	MOL008951	3 α -巴豆酸氧基苜蓿烷 3 α -Tigloyloxytropane	90.82	0.08
15	MOL001323	α 1-谷甾醇 α 1-Sitosterol	43.28	0.78
16	MOL001494	亚油酸乙酯 Mandenol	42.00	0.19
17	MOL001495	亚麻酸乙酯 Ethyl linolenate	46.10	0.2
18	MOL001979	Lanster	42.12	0.75
19	MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76
20	MOL005406	阿托品 Atropine	45.97	0.19
21	MOL006209	花色素苷 Cyanin	47.42	0.76
22	MOL007449	24-亚甲基苯酚 24-Methylidenelophenol	44.19	0.75
23	MOL008400	黄豆黄素 Glycitein	50.48	0.24
24	MOL009612	(24R)-4 α -甲基-24-乙基胆汁酸-7,25-二烯-3 β -基乙酸酯 (24R)-4 α -Methyl-24-ethylcholesta-7,25-dien-3 β -ylacetate	46.36	0.84
25	MOL009618	24-乙基胆甾-5,22-二烯醇 24-Ethylcholesta-5,22-dienol	43.83	0.76
26	MOL009621	24-亚甲基羊毛甾-8-烯醇 24-Methylenelanost-8-enol	42.37	0.77
27	MOL009622	岩藻甾醇 Fucosterol	43.78	0.76
28	MOL009634	31-去羊毛甾醇 31-Norlanosterol	42.20	0.73
29	MOL009641	4 α ,24-二甲基胆甾-7,24-二烯醇 4 α ,24-Dimethylcholesta-7,24-dienol	42.65	0.75
30	MOL009642	4 α -甲基-24-乙基胆甾-7,24-烯醇 4 α -Methyl-24-ethylcholesta-7,24-dienol	42.30	0.78
31	MOL009644	6-氟吲哚-7-去氢胆固醇 6-Fluoroindole-7-Dehydrocholesterol	43.73	0.72
32	MOL009646	7-O-甲基木犀草素-6-C- β -葡萄糖苷 7-O-Methylfluteolin-6-C- β -glucoside-qt	40.77	0.3
33	MOL009651	隐黄质单环氧化物 Cryptoxanthin monoepoxide	46.95	0.56
34	MOL009656	(E,E)-1-十八碳-3,13-二烯酸乙酯 (E,E)-1-Ethyl octadeca-3,13-dienoate	42.00	0.19
35	MOL009664	藻盐蛋白 A Physalin A	91.71	0.27

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	分子号 MOL ID	活性成分 Active ingredient	OB (%)	DL
36	MOL009665	植酸酶-8-O-β-D-龙胆二糖苷 Phycion-8-O-β-D-gentiobioside	43.90	0.62
37	MOL009681	钝叶醇 Obtusifoliol	42.55	0.76
38	MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28

注:1-14 为五味子的活性成分;15-38 为枸杞子的活性成分。

Note:1-14 are the active components of SCF;15-39 is the active ingredient of LF.

2.2 RILI 作用靶点及五味子-枸杞子活性成分关键靶点筛选

GeneCards 数据库得到 1544 个靶点(选取相关性大于 10 的),OMIM 数据库得到 337 个靶点,文献检索 RILI 靶蛋白 52 个,通过 GEO 数据库中的 GSE202586 芯片分析得到 324 个差异基因,其中 196 个上调(图中红色),128 个下调(图中蓝色)(见

图 1)。整合所有靶点去重后共得到相关蛋白靶点 2065 个。将五味子-枸杞子活性成分对应的潜在靶蛋白与 RILI 相关蛋白匹配后取交集,得到 66 个重复靶点,表明这些靶点与五味子-枸杞子保护 RILI 密切相关(见图 2),天蓝色为疾病靶点,橘黄色为药物靶点,重叠部分为药物治疗疾病潜在的靶点。

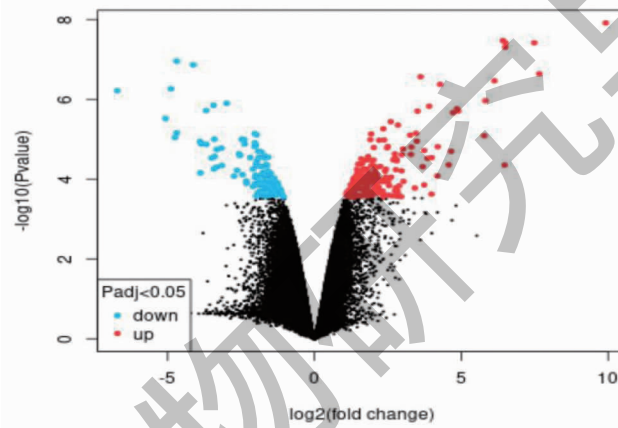


图 1 放射性肝损伤差异基因

Fig. 1 Differential genes of radiation-induced liver injury

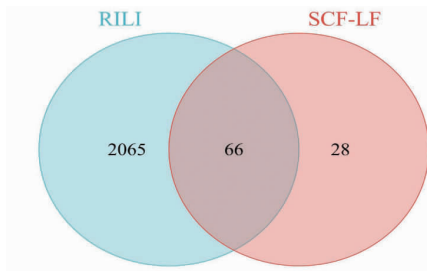


图 2 “五味子-枸杞子”潜在保护放射性肝损伤的靶点

Fig. 2 Potential targets for protection against radiation-induced liver injury of SCF and LF

2.3 药物活性成分-靶点-放射性肝损伤的网络构建

利用 Cytosapes 3.8.0 软件,构建药物活性成分-靶点-放射性肝损伤网络图。结果显示,“五味子-枸杞子”共通过 25 个活性成分作用于 66 个“五味子-枸杞子”RILI 的共同靶点,这 66 个蛋白靶点可

能与五味子配伍枸杞子保护 RILI 有关,该网络由 94 个节点和 129 个条边构成,表明五味子-枸杞子保护 RILI 多成分、多靶点的特征。图中红色菱形代表 RILI,绿色圆形代表药物,天蓝色正方形代表共同靶点(见图 3)。一般而言,一个网络中只有少数的节点具有较大的 Degree 值,Degree 值大的节点在网络

中具有重要的地位。网络分析结果显示槲皮素、黄豆黄素和去氧紫草素贡献值较大,网络预测分析表

明这三种成分为“五味子-枸杞子”保护 RILI 的重要活性成分。

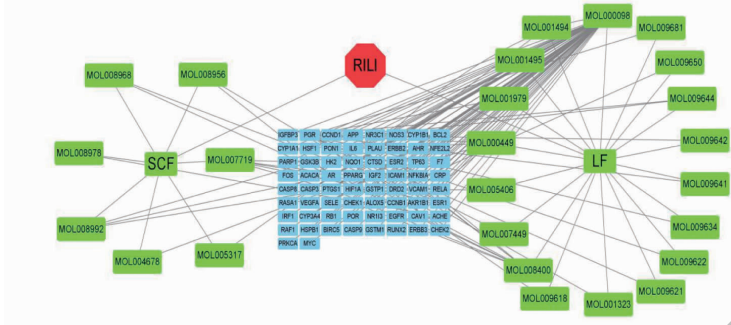


图3 药物活性成分-靶点-放射性肝损伤作用靶点网络

Fig. 3 Drug active ingredient-target-target network of radiation-induced liver injury

2.4 PPI 网络构建

将 66 个与五味子-枸杞子保护 RILI 关键靶点导入 String 数据库中,得到 PPI 网络(见图 4)。将 PPI 网络图导入 Cytoscape 3.8.0 软件中,结果显示 66 个蛋白有相互作用。根据 Degree 值筛选出排名前 20 的核心靶蛋白, Y 轴为基因名, X 为相应基因邻接节点数目(见图 5)。网络分析结果显示,有 66

个节点,1 390 条边。关联性较强的基因有 CASP3、EGFR、ESR1、HIF1A、IL-6、MYC、VEGFA、CCND1、PPARG 和 FOS 等,选取了前 20 个关联性强的基因。在前 20 个关联性较强的基因里选取 Degree 值大于 92 的为核心靶蛋白,包括 CASP3、EGFR、ESR1、HIF1A、IL-6、MYC 和 VEGFA,这些可能是五味子-枸杞子保护 RILI 的关键靶点。

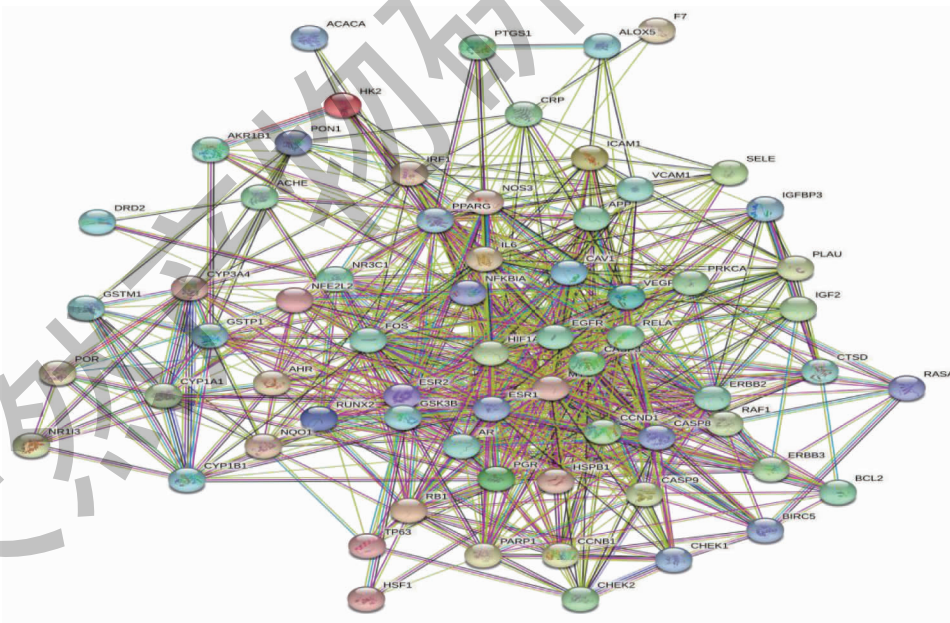


图4 作用靶点的相互作用分析

Fig. 4 Interaction analysis of targets

注:圆形节点表示每个基因对应的蛋白,节点间连接的直线表示两个蛋白相互作用。Note: A circular node represents the corresponding protein of each gene, and a straight line connecting nodes represents the interaction between two proteins.

2.5 GO 功能富集分析

利用 R 软件对五味子-枸杞子保护 RILI 的 66

个核心蛋白靶点进行在线 GO 富集分析,设定筛选标准 $P < 0.01$ 。GO 功能富集分析结果显示,66 个

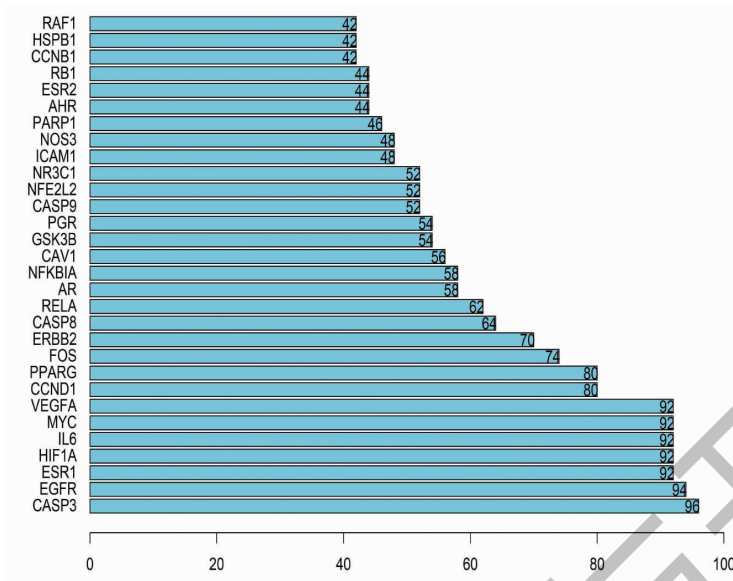


图5 药物潜在作用靶点相互关联结果

Fig. 5 Correlation results of potential drug targets

核心蛋白富集主要涉及 DNA 结合和转录因子结合 (17 个靶点)、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合和转录因子结合 (14 个靶点)、DNA 结合转录激活活性、RNA 聚合酶 II 特异性 (13 个靶点)、DNA 结合转录激活活性 (13 个靶点)、泛素样蛋白连接酶结合 (11 个靶点)、转录辅调节子结合 (10 个靶点)、泛素蛋白连接酶结合 (10 个靶点)、核受体活性 (8 个靶点)、

配体激活的转录因子活性 (8 个靶点)、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性 (8 个靶点) 等多个靶点 (见表 2)。五味子-枸杞子保护 RILI 的作用可能通过参与多种机体内多种位点的结合和调控酶的活性等过程, 这些都与辐射引起肝细胞损伤、功能失调、代谢紊乱密切相关。

表2 “五味子-枸杞子”保护 RILI 潜在靶点 GO 条目

Table 2 Go functional enrichment of potential targets of SCF and LF against RILI

GO ID	生物过程 Biological process	基因数量 Number of gene	占比 Proportion	P 值 P value
GO:0140297	DNA 结合转录因子结合 DNA-binding transcription factor binding	17	25.8	1.42E-10
GO:0061629	RNA 聚合酶 II 特异性 RNA polymerase II-specific	14	21.2	1.04E-09
GO:0001228	DNA 结合转录激活剂活性 DNA-binding transcription activator activity	13	19.7	3.18E-07
GO:0001216	DNA 结合转录激活剂活性 DNA-binding transcription activator activity	13	19.7	3.18E-07
GO:0044389	泛素样蛋白连接酶结合 Ubiquitin-like protein ligase binding	11	16.7	4.86E-07
GO:0001221	转录共调节因子结合 Transcription coregulator binding	10	15.2	7.22E-10
GO:0031625	泛素蛋白连接酶结合 Ubiquitin protein ligase binding	10	15.2	2.61E-06
GO:0004879	核受体活性 Nuclear receptor activity	8	12.1	8.33E-10
GO:0098531	配体激活的转录因子活性 Ligand-activated transcription factor activity	8	12.1	8.33E-10

续表 2(Continued Tab. 2)

GO ID	生物过程 Biological process	基因数量 Number of gene	占比 Proportion	P 值 P value
GO:0004712	蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性 Protein serine/threonine/tyrosine kinase activity	8	12.1	0.001 78
GO:0005496	类固醇结合 Steroid binding	7	10.6	1.93E-06
GO:0019207	激酶调节活性 Kinase regulator activity	7	10.6	0.000 31
GO:0046982	蛋白质异二聚体活性 Protein heterodimerization activity	7	10.6	0.001 78
GO:0001223	转录共激活因子结合 Transcription coactivator binding	6	9.1	2.79E-07
GO:0016705	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity	6	9.1	0.000 55
GO:0019887	蛋白激酶调节活性 Protein kinase regulator activity	6	9.1	0.001 07
GO:0004674	蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性 Protein serine/threonine kinase activity	6	9.1	0.018 47
GO:0004175	内肽酶活性 Endopeptidase activity	6	9.1	0.018 47

2.6 KEGG 信号通路富集分析

为了揭示五味子-枸杞子保护 RILI 的相关通路,对 66 个靶点通过 R 软件进行 KEGG 分析,得到与五味子-枸杞子保护 RILI 的 121 条相关通路。根据基因富集数筛选前 20 条通路途径绘制气泡图(见图 6),其通路包括化学致癌-受体激活(21 个靶点)、脂质与动脉粥样硬化(17 个靶点)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(15 个靶点)、PI3K-Akt 信号通路(14 个靶点)、人巨细胞病毒感染(14 个靶点)、前列腺癌(13 个靶点)、流体剪切应力与动脉粥样硬化(13 个靶点)、乙型肝炎(13 个靶点)、化学致癌-活性氧物种(13 个靶点)、MAPK 信号通路(13 个靶点)、微小 RNA 与癌症(13 个靶点)、肝细胞癌(12 个靶点)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(11 个靶点)及凋亡(11 个靶点)等。

(15 个靶点)、癌症中的蛋白多糖(14 个靶点)、人巨细胞病毒感染(14 个靶点)、前列腺癌(13 个靶点)、流体剪切应力与动脉粥样硬化(13 个靶点)、乙型肝炎(13 个靶点)、化学致癌-活性氧物种(13 个靶点)、MAPK 信号通路(13 个靶点)、微小 RNA 与癌症(13 个靶点)、肝细胞癌(12 个靶点)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(11 个靶点)及凋亡(11 个靶点)等。

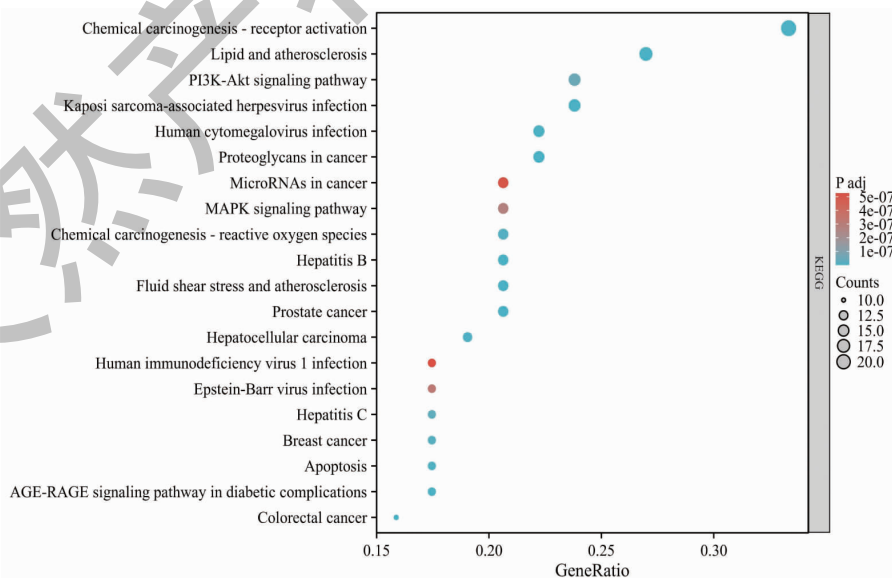


图 6 共同靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis of common targets

2.7 五味子-枸杞子活性成分与 RILI 相关核心蛋白的分子对接

利用分子对接技术对结果进一步分析。根据药物活性成分-基因靶点-放射性肝损伤网络筛选得到 3 个活性成分,分别为槲皮素、黄豆黄素和去氧紫草素。根据 PPI 网络结果,选取排名前 3 个靶点 CASP3、EGFR、ESR1,作为对接靶蛋白(见表 3)。结

果显示,活性成分与靶点蛋白的结合能介于-30.1 kJ/mol 至-37.7 kJ/mol 之间,结合能越低,表明活性成分与放射性肝损伤核心蛋白靶点之间亲和力越高(见表 3、图 7)。对结果进一步分析发现槲皮素、黄豆黄素和去氧紫草素这 3 个活性成分与核心靶蛋白都有很好的结合能力,且与 EGFR 结合能力较强。

表 3 五味子-枸杞子的分子对接结果
Table 3 Molecular docking results of SCF and LF

中药单体 Chinese herbal monomer	结合能 Binding energy (kJ/mol)			结合位点 Binding site		
	CASP3	EGFR	ESR1	CASP3	EGFR	ESR1
槲皮素 Quercetin	-33.1	-36.8	-34.7	TYR-195	LYS-745、ALA-743、 MET-793	ARG-394
黄豆黄素 Glycitein	-33.5	-37.7	-33.9	ARG-164	ARG-836、 LYS-745	HIS-524
去氧紫草素 Arnebin 7	-30.1	-36.0	-33.5	TYR-197、GLU-124、 ARG-164	LEU-861	LEU-346

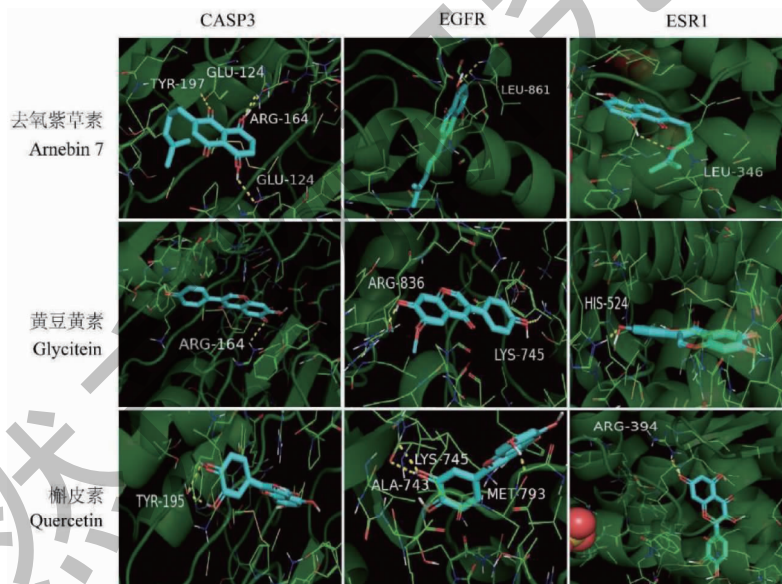


图 7 分子对接结合位点

Fig. 7 Binding site of molecular docking

3 讨论与结论

放射性肝损伤是肿瘤患者接受放射性治疗或者核泄漏等过程中而使肝脏受到一定剂量的照射,早期表现为肝脏内小叶中心肝细胞水肿并发周围炎症反应、影响肝脏功能,后期易发展成肝纤维化或肝硬化。近些年,中药对肝脏的放射性损伤保护研究愈来愈多,中药以其安全、方便口服、吸收迅速、价格低廉等特点,具有很大的潜力^[7-9]。

五味子具有很好的保肝作用。研究发现五味子中包含 200 多种化学成分,主要包括挥发性的萜类、木脂素类、有机酸类及多糖等,具有抗炎、抗氧化、提高免疫力及调节物质代谢等^[10,11]。Wang^[12]研究发现粗制五味子提高了治疗和预防急性酒精性脂肪肝的作用,可通过降低炎症因子、减少脂肪堆积、CYP2E1 表达降低、Nrf2/ARE 增强等信号通路发挥保护肝损伤的作用。Zhu^[13]体外研究发现五味子多

糖可以有有效的清除羟自由基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、超氧离子;体内试验发现五味子多糖可通过缓解 CCl_4 引起的肝细胞水泡样变性、炎症反应减轻肝损伤。Yang^[14] 研究发现五味子木脂素对乙酰氨基酚引起的肝损伤具有保护作用,主要通过调节 ERBB 信号通路中 EGFR 和 LPCAT1 相关蛋白的表达发挥了抗炎及抗氧化的作用。Chen 等^[15] 研究发现五味子木脂素可降低血清中 AST 和 ALT 的活性,降低炎症因子 IL-6、IL-1 β 等,表现出很强的抗炎作用,从而保护肝脏损伤。Che 等^[16] 研究发现五味子多糖可降低 Bcl-2/Bax 比例、减少 CASP3 的活化,从而降低了肝细胞的凋亡。

枸杞子具有益精明目、滋补肝肾等功效,其富含多糖、挥发油、生物碱、黄酮类等多种成分,现代药理研究具提高免疫、抗氧化、保肝、保护视网膜等^[17]。Tian^[18] 研究发现枸杞多糖能阻止蛋白硫醇的减少和 SOD 的钝化,对 γ 辐射产生的自由基所造成的鼠肝线粒体细胞膜损伤具有很好的抗氧化作用。枸杞子配伍五味子提高了保肝的疗效。Zhang^[19] 研究发现枸杞多糖对放射性造成的小肠损伤具有保护作用,其提供降低氧化反应及提高 Bcl-2/Bax 比例来抑制细胞的凋亡。Gao 等^[20] 研究发现给予肝损伤的大鼠枸杞多酚,可以提高大鼠的氧化功能,其机制可能通过提高 Nrf2 及其下游蛋白的表达发挥减少肝损伤的作用。

通过 PPI 网络分析得到的核心蛋白有 CASP3、EGFR、ESR1。半胱天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspases, CASP)在细胞凋亡的调控中起到至关重要的作用,参与响应促凋亡信号而触发级联反应。CASP3 是 CASP 中的一种主要的执行蛋白,凋亡现象存在于任何细胞,可以通过物理、化学等分子调控细胞生长和死亡的动态平衡^[21]。Cao 等^[22] 研究发现五味子乙素对辐射诱导的 HaCat 细胞凋亡具有抑制作用,其机制通过降低了 CASP3、P53、P21 等凋亡基因的表达发挥保护作用。Duan 等^[23] 研究发现枸杞水提物对照射后的小鼠有抗氧化的作用,通过降低了 CASP3 和 CASP6 的表达发挥了保护作用。CASP3 参与了放射性肝损伤的凋亡过程,通过五味子-枸杞子中的活性成分调控 CASP3 蛋白,从而抑制细胞凋亡,使细胞保持在生长与死亡的动态平衡状态^[24]。上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是表皮生长因子受体家族成员之一,广泛分布于上皮细胞、成纤维细胞、胶质细胞的表面,对细

胞的生长、增殖和分化等过程具有重要的作用。Li 等^[25] 研究发现五味子甲素可在肝脏术后切除手术后通过增加 EGFR 的基因表达、减少凋亡基因 P53、P21 的表达,从而抑制肝细胞的凋亡,促进肝细胞的再生。Zhang^[26] 研究发现枸杞多糖可以调控 EGFR 的表达和磷酸化蛋白表达水平来改善氧化应激引起的内皮功能损伤,其作用机制可能通过 PI3K-Akt 信号通路发挥作用。五味子-枸杞子中的活性成分可能通过作用在 EGFR 来调控细胞凋亡引起的细胞数量失衡,使机体趋于正常的生理水平^[27,28]。雌激素受体 1 (estrogen receptor 1),位于细胞核上,由激素结合、DNA 结合和转录激活重要的结构域组成,Zeng^[29] 研究发现枸杞子水提物可通过调控 PC12 细胞内 mRNA 的表达,不仅上调 ESR1,且下调 CASP3 的表达,为枸杞子作用靶点提供了一定的参考依据。Liu 等^[30] 研究表明在乳腺癌细胞内 ESR1 可通过 NEDD4L/CD71 信号通路抑制电离辐射导致的铁死亡,ESR1 高表达时能够提高乳腺癌患者的生存率,敲除 ESR1 后,增强了电离辐射介导的铁死亡,ESR1 可能是保护 RILI 的潜在靶点。

本研究通过网络药理学对五味子-枸杞子保护 RILI 的机制进行预测,构建药物的活性成分-关键蛋白靶点网络图,结果发现槲皮素、黄豆黄素和去氧紫草素这 3 种活性物质的节点 Degree 值较高,推测这些活性成分在保护 RILI 上发挥了重要的作用。通过对 66 个潜在蛋白靶点进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析,推测五味子-枸杞子活性成分可能通过调控化学致癌-受体激活、脂质与动脉粥样硬、PI3K-Akt、MAPK、凋亡等信号通路,从而起到保护 RILI 的作用。本文通过对数据进行整合预测,受限于样本量较少,随着研究的不断深入,相信预测分析会带来范围更广泛、分析更精准的结果。

利用 GEO 芯片分析、网络药理学和分子对接技术,对五味子-枸杞子进行了多方面、多角度的研究,初步预测了五味子-枸杞子保护放射性肝损伤的作用机理。通过药物活性成分-基因靶点-放射性肝损伤网络预测五味子-枸杞子保护放射性肝损伤的药效物质基础可能是槲皮素、黄豆黄素和去氧紫草素,通过作用在关键靶点 CASP3、EGFR、ESR1 调节化学致癌-受体激活、脂质与动脉粥样硬、PI3K-Akt、MAPK、凋亡等信号通路发挥保护放射性肝损伤的作用,表明五味子-枸杞子是通过“多成分”“多靶点”“多通路”发挥放射性肝损伤的作用,可为后期

的作用机制研究及临床应用提供一定的参考依据。

致谢:感谢中国辐射防护研究院放射医学与环境医学研究所药物安全性评价中心对本研究中网络药理学方法的指导。

参考文献

- Munoz-Schuffenegger P, Ng S, Dawson LA. Radiation-induced liver toxicity[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2017, 27: 350-357.
- Xiao L, Zhang H, Yang X, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in radiation-induced liver injury[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36: 990-997.
- Li T, Cao Y, Li B, et al. The biological effects of radiation-induced liver damage and its natural protective medicine[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2021, 167: 87-95.
- Mu XL, Li B, Zou YC, et al. Research progress on chemical constituents of *Schisandra chinensis* and its effect on nonalcoholic fatty liver disease[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2023, 48: 861-878.
- Song YM, Zhang QL, Cui Z, et al. Research progress of chemical components and pharmacological effects of *Lycium barbarum* and prediction and analysis of quality markers[J]. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2022, 37: 206-213.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典. 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 260.
- Zhang RP, Ning Y, Lliu N, et al. Protective effect of traditional Chinese medicine for supplementing qi and activating blood circulation on radiation-induced liver injury and its influence on liver fibrosis index[J]. *Chin J Clinicians* (中国临床医生杂志), 2017, 45: 112-114.
- He YX. Related Research of Isoglycyrrhizinate magnesium prevent radiation induced liver injury[D]. Yanan: Yanan University (延安大学), 2016.
- Gao SL, Hu ZT, Dong LY, et al. Clinical efficacy and mechanism of total glucosides from white paenoy for radioactive liver damage[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2017, 42: 1390-1394.
- Xing NN, Qu HD, Ren WC, et al. Main chemical constituents and modern pharmacological action of *Schisandrae Chinensis Fructus*; a review[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 210-218.
- Liu YY, Huang SQ, Li YZ, et al. Research progress on lignans and pharmacological activities in plants of *Schisandra* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53: 1903-1918.
- Wang LJ. Studies on the effect and mechanism research of enhanced hepatoprotection of vinegar-processing *Schisandra chinensis* based on Nrf2/ARE signaling pathway [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine (南京中医药大学), 2016.
- Zhu TY. Study on the protective effect of *Schisandra chinensis* polysaccharide on CCl₄-induced acute liver injury in mice [D]. Taian: Shandong Agricultural University (山东农业大学), 2022.
- Yang HJ. The Protective effect and mechanism of schisandrin lignin on drug-induced liver injury [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (天津中医药大学), 2021.
- Chen Q, Zhan Q, Li Y, et al. *Schisandra* lignan extract protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice by inhibiting oxidative stress and regulating the NF- κ B and JNK signaling pathways [J]. *Evid-based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 5140297.
- Che J, Yang S, Qiao Z, et al. *Schisandra chinensis* acidic polysaccharide partially reverses acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 140: 248-254.
- Su BZ. Research progress in pharmacological effects of active components of *Lycium barbarum* [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med* (江苏中医药), 2022, 54: 78-81.
- Tian JQ, Zhu KR, Li XM, et al. Antioxidation effect of two kinds of polysaccharides against membrane damage induced by γ -radiation in rat liver mitochondria [J]. *Food Sci* (食品科学), 2006, 27: 235-239.
- Zhang L. Inhibitory effect on *Lycium barbarum* polysaccharide on apoptosis of intestinal epithelial cells in radiation injured mice and its mechanism [D]. Chongqing: Chongqing Medical University (重庆医科大学), 2020.
- Gao H, Xue Y, Wu L, et al. Protective effect of *Lycium ruthenicum* polyphenols on oxidative stress against acrylamide induced liver injury in rats [J]. *Molecules*, 2022, 27: 4100.
- Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting cleaved caspase-3 in apoptotic cells by flow cytometry [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, 2016: 958-962.
- Cao B, Niu C, Lu T, et al. Protective effect of schisandrin B against oxidative damage of UVB irradiated HaCaT cells and its molecular mechanism [J]. *Chin J Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2014, 30: 523-527.
- Duan YB, Yao XC, Wang C, et al. Protective effects of *Lycium ruthenicum* Murr on X-radiation injured mice [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 148-152.