

# 基于网络药理学与分子对接探究黄芩有效成分对酒精性肝病的作用机制及效果验证

叶敬榕<sup>1</sup>, 刘瑞<sup>2</sup>, 程成<sup>3</sup>, 张凤英<sup>3</sup>, 杨雪<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>承德医学院中药研究所 河北省中药研究与开发重点实验室, 承德 067000;

<sup>2</sup>云南中医药大学第一附属医院, 昆明 650021; <sup>3</sup>承德医学院基础医学院, 承德 067000

**摘要:**通过网络药理学和分子对接技术探究中药黄芩治疗酒精性肝病的作用机制, 并通过体外细胞实验验证黄芩有效成分对酒精性肝病的治疗效果。在 TCMSp、Swiss ADME 和 Swiss Target Prediction 数据库中检索获得黄芩有效成分及其作用靶点; 在 GeneCards、OMIM、DisGeNET、TTD 和 PharmGKB 数据库中检索获得酒精性肝病相关的疾病靶点; 利用 String 数据库构建靶点相互作用网络; 通过 Metascape 数据库对关键靶点进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析、基因本体 (GO) 富集分析。采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建黄芩治疗酒精性肝病的“有效成分-靶点-通路”互作网络, 并筛选出黄芩有效成分和关键靶点进行分子对接。基于网络药理学和分子对接结果, 采用体外细胞实验初步验证预测结果。将黄芩有效成分进行 ADME 筛选后共获得 27 个, 且这 27 个有效成分可以通过 257 个基因靶点对酒精性肝病起到治疗作用, 其中关键核心靶点有 SRC、AKT1、PIK3R1、STAT3、PIK3CA 等。KEGG 信号通路富集分析结果显示, 黄芩治疗酒精性肝病的主要信号通路包括癌症的途径、PI3K-Akt 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、化学致癌-活性氧物种、前列腺癌等; 分子对接结果提示山姜素或将是黄芩治疗酒精性肝病的关键有效成分之一; 体外细胞实验证实山姜素可显著改善大鼠肝细胞 BRL 3A 的酒精性损伤状态。通过网络药理学、分子对接技术和细胞实验的结果可以分析并推断中药黄芩可通过多成分、多靶点的方式对酒精性肝病起到预防和治疗的作用。其中山姜素作为关键有效成分之一, 可为进一步利用黄芩开发治疗酒精性肝损伤相关药物提供依据及参考。

**关键词:**网络药理学; 分子对接; 细胞实验; 黄芩; 酒精性肝病; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)9-1602-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.9.014

## Mechanism of active ingredients from *Scutellaria Radix* on alcoholic liver disease based on network pharmacology and molecular docking and effect verification

YE Jing-rong<sup>1</sup>, LIU Rui<sup>2</sup>, CHENG Cheng<sup>3</sup>, ZHANG Feng-ying<sup>3</sup>, YANG Xue<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Hebei Province Key Lab. of Research and Development for Chinese Medicine, Chinese Medicine Research

Institute, Chengde Medical University, Chengde 067000, China; <sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Yunnan University of

Traditional Chinese Medicine Kunming, Yunnan 650021, China; <sup>3</sup>Basic Medical Sciences, Chengde Medical University 067000, China

**Abstract:** Network pharmacology and molecular docking technology were adopted to explore the possible mechanism of *Scutellaria Radix* in the treatment of alcoholic liver disease. The therapeutic effect of active ingredient of *Scutellaria Radix* on alcoholic liver disease was verified by cell experiment *in vitro*. The effective components and targets of *Scutellaria Radix* were retrieved from TCMSp, Swiss ADME and Swiss Target Prediction databases; The disease targets related to alcoholic liver disease were retrieved from GeneCards, OMIM, DisGeNET, TTD and PharmGKB databases; Using String database to build target interaction network; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis and gene ontology (GO) enrichment analysis were conducted for key targets through metascape database. The "active ingredient target pathway" interaction network of *Scutellaria Radix* for the treatment of alcoholic liver disease was constructed by using Cytoscape 3.8.0 soft-

收稿日期: 2023-02-06 接受日期: 2023-07-04

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究青年拔尖人才计划 (BJK2023035); 河北省科技厅项目 (2020); 河北省医学科学研究计划 (20220406)

\* 通信作者 E-mail: xyang\_cdmu@163.com

ware, and the active ingredient and key target of *Scutellaria Radix* were screened for molecular docking. Based on the results of network pharmacology and molecular docking, the prediction results were preliminarily verified by cell experiments *in vitro*. A total of 27 active components of *Scutellaria Radix* were obtained after ADME screening, and these 27 active components could play a therapeutic role in alcoholic liver disease through 257 gene targets, among which the key core targets are SRC, AKT1, PIK3R1, STAT3, PIK3CA, etc. The enrichment analysis of KEGG signal pathway showed that the main signal pathways of *Scutellaria Radix* in treating alcoholic liver disease included cancer pathway, PI3K Akt signal pathway, lipid and atherosclerosis, chemical carcinogenic reactive oxygen species, prostate cancer, etc; Molecular docking results suggest that Alpinetin may be one of the key effective ingredients of *Scutellaria Radix* in the treatment of alcoholic liver disease; *In vitro* cell experiments proved that Alpinetin could significantly improve the alcoholic injury of rat liver cells BRL3A. Through the results of network pharmacology, molecular docking technology and cell experiment, it can be analyzed and inferred that *Scutellaria Radix* can play a role in the prevention and treatment of alcoholic liver disease through multi-component and multi target methods. As a key active ingredient, Alpinetin can provide basis and reference for further development of drugs related to the treatment of alcoholic liver injury by using *Scutellaria Radix*.

**Key words:** network pharmacology; molecular docking; cell experiment; *Scutellaria Radix*; alcoholic liver disease; action mechanism

酒精性肝病(alcoholic liver diseases, ALD)拥有着广泛的临床组织学谱系,既包括初期的单纯肝细胞脂肪变性,还包括中、后期的酒精性肝炎、肝纤维化、酒精性肝硬化<sup>[1]</sup>。当前对于 ALD 的最佳防治手段仍是戒酒,临床用药皮质类固醇也只能适当缓解部分症状,提供短期生存获益,目前临床仍无相对应的特效药<sup>[2]</sup>。根据 ALD 的病因、病机及临床表现,中医将 ALD 分为:湿热内蕴的“酒痞”前期,气滞血瘀的“酒癖”中期和正气亏虚的“酒臌”后期<sup>[3]</sup>。处在不同时期其治法也不尽相同,前期主要是疏肝解郁、清热除湿,中期主要是活血化瘀,后期主要是健脾、滋补肝肾<sup>[4]</sup>。

黄芩(*Scutellaria Radix*)为唇形科植物黄芩的干燥根,隶属于清热类中药,具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效,可以较好地应用于 ALD 前、中期的治疗。同时结合相关黄芩保肝研究可发现,黄芩及其有效成分可通过抑制机体氧化应激反应、抑制炎症因子浸润、减少肝细胞凋亡和调节脂质代谢等对肝细胞起到保护作用、降低肝脏病理损伤程度<sup>[5]</sup>。但针对黄芩防治 ALD 的药效物质基础、作用途径及机制尚未明确。本研究采用了网络药理学、分子对接技术和体外细胞实验,初步探究黄芩防治 ALD 的活性成分以及相应的作用途径,以期对黄芩及其有效成分在防治 ALD 方面的深入研究、新药开发和临床应用提供参考<sup>[6]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 药物与试剂

BRL 3A 大鼠肝细胞、BRL 3A 细胞专用培养基、胎牛血清(批号分别为:20220608、SA210518,武

汉普诺赛); MEM 培养基(批号为:8122489, Gibco 有限公司); PBS 缓冲液(pH7.2~7.4, 0.01 mol/L)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)、DMSO 培养基、青链霉素混合液(批号分别为:20220723、20220928、710N0317、20220930, Solarbio 有限公司); 山姜素(CAS 号:36052-37-6, 纯度 $\geq 98\%$ )、药用级无水乙醇(批号分别为:G2226023、B2225811, 上海阿拉丁试剂有限公司); 0.9% 氯化钠溶液(批号为:2105242004, Bebolabs 有限公司); CCK-8 溶液(批号为:K10182833EF5E, APEX BIO 有限公司); 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、谷丙转氨酶(cerealthirdtransaminase, ALT)、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)、蛋白定量(total protein, TP)等试剂盒(批号分别为:20220917、20220930、20220930、20221018、20220825、20221101, 南京建成有限公司)。

### 1.2 黄芩治疗酒精性肝病网络药理学研究

#### 1.2.1 黄芩有效成分检索及化合物靶点筛选

利用中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP),以“黄芩”为关键词检索其含有的主要化学成分。传统中药主要采用口服形式,加以胃肠消化吸收、血液循环代谢而发挥作用。故需要对检索获得的化合物进行吸收、分布、代谢和排泄(absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME)性质筛选。即以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug-likeness, DL) $\geq 0.18$ 为标准,初步筛选出具有较高活性

的化合物。再将获得的化合物分别导入 PubChem 数据库下载化合物 2D Structure 的 SDF 图,并导入 SwissADME 数据库,以胃肠道吸收度(GI absorption)为“High”、满足类药性五原则预测(Lipinski, Ghose, Veber, Egan, Muegge)结果中有 2 个及 2 个以上为“Yes”再次筛选,将最终的结果导出并编号。

药物主要是以所含化合物与相应的靶点结合的形式来发挥药效的,所以需要进一步整理化合物的作用靶点。将筛选得到的化合物 2D Structure SDF 图导入 Swiss Target Prediction 数据库中检索相对应的作用靶点,收集靶点信息并进行整理,构建出药物-化合物-靶点数据库。

### 1.2.2 酒精性肝病相关疾病靶点收集

利用 GeneCards、OMIM、DisGeNET、Therapeutic Target Database (TTD) 和 PharmGKB 人类基因综合数据库,以“alcoholic liver disease”为关键词检索相关疾病基因,收集、整理、去重后即为其所需要的相关 ALD 作用靶点。

### 1.2.3 黄芩药物靶点与酒精性肝病疾病靶点映射

利用在线网站 Venny 2.1.0 平台,输入黄芩有效化合物作用靶点与 ALD 疾病靶点,取二者的交集,即为药物-疾病共同作用的关键靶基因。绘制相应的 Venn 图,导出交集结果。

### 1.2.4 构建靶点蛋白互作网络

利用 String 数据库,在选择 Multiple proteins 后,导入黄芩和 ALD 共有的靶基因,物种选择“Homo sapiens”,构建蛋白-蛋白相互作用网络(PPI),将最低互相作用阈值调为“highest confidence (0.900)”,重新获得蛋白互作信息图,并导出相应的 TSV 文件。利用 Cytoscape 3.8.0 软件和 TSV 文件绘制优化后的 PPI 网络图,并利用 Network Analysis 对网络进行拓扑性质分析,以度值(Degree)进行排序,筛选出关键核心靶点,同时使结果可视化输出。

### 1.2.5 靶点生物学功能分析

采用在线基因功能分析数据库 Metascape 对 PPI 网络中的核心靶点进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析,通过“All in One Zip File”键下载当前所有文件,即可得到所涉及的主要治疗 ALD 信号通路;同时分别对生物学过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)进行基因本位(GO)生物过程富集分析,同样通过“All in One Zip File”键下载当前所有文件,即可得到药物有效成分所对应靶点治疗 ALD 的生物过程,两者均

以  $P < 0.01$  为差异具有统计学意义。并利用在线工具微生信将结果可视化输出。

### 1.2.6 构建“有效成分-靶点-通路”互相作用网络

选取 KEGG 富集获得的前 20 条信号通路,利用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“有效成分-靶点-通路”相互作用网络。网络图中的节点(node)分别代表有效成分、靶点和通路。边(edge)的连接代表有效成分与靶点、靶点与通路或靶点与有效成分之间的相互作用关系。同样采用 Cytoscape 的插件 Network Analysis 对网络进行拓扑性质分析,根据度值(degree)进行排序对网络进行编排,以获得可表征成分、靶点与通路关系的网络图。

## 1.3 靶点蛋白与黄芩有效化学成分分子对接

根据 Yang 所提出的生物大分子三维结构合理选择六项原则<sup>[7]</sup>,利用 RSCB PDB 数据库下载“1.2.6”度值前五所对应的受体蛋白并进行均方根偏差(root-mean-square deviation, RMSD)验证。同时利用 Chem3D 20.0 软件将“1.2.6”筛选得到的高于平均度值的有效成分进行结合能最小化处理。再通过 Discovery Studio 2019 软件将受体蛋白与筛选得到的黄芩活性成分进行分子对接研究,采用 Dock Ligands (Lib Dock) 对接模块进行分子对接分析,当配体分子与受体蛋白的结合自由能小于  $-4.25$  kcal/mol 则表示具有一定活性,小于  $-5.0$  kcal/mol 表示有较好结合活性,而小于  $-7.0$  kcal/mol 则可推测其具有强烈结合活性<sup>[8]</sup>。当结合自由能为正数时,表明键合不能自发形成<sup>[9]</sup>,将最终对接结果可视化输出。

## 1.4 黄芩治疗酒精性肝病的细胞实验

### 1.4.1 BRL 3A 细胞培养及干预

使用 BRL 3A 细胞专用完全培养基,将细胞养于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中,观察细胞密度达到  $80\% \sim 90\%$  左右后,进行传代,并用于后续实验。使用 CCK-8 与乳酸脱氢酶试剂盒检测不同时间下,不同浓度的无水乙醇对 BRL 3A 细胞的损伤程度,再给予不同浓度的山姜素( $20$ 、 $40$ 、 $60\text{ }\mu\text{g/mL}$ )进行干预,同时分别使用生理盐水和多烯磷脂酰胆碱(polyene phosphatidyl choline, PPC)建立空白对照组和阳性对照组。收集干预后的细胞与上清液用于试剂盒测定。

### 1.4.2 相关试剂盒检测山姜素对 BRL 3A 细胞增殖的影响

收集干预后的细胞与上清液后,根据谷草转氨酶(AST/GOT)、谷丙转氨酶(ALT/GPT)、总超氧化物歧化酶(SOD)、细胞丙二醛(MDA)、蛋白定量(TP)等试剂盒的说明书进行操作测定。

## 1.5 数据分析与制图

数据结果采用 SPSS 23.0 软件(IBM 公司, NY, USA)单因素方差分析。图表采用 WPS office(北京金山办公软件股份有限公司)绘制,图中不同的字母表示不同方式处理下的显著性( $P < 0.05, n = 3$ )。

## 2 结果

### 2.1 黄芩治疗酒精性肝病网络药理学研究结果

#### 2.1.1 黄芩有效成分收集、筛选及化合物作用靶点分析

利用 TCMS 收集到黄芩的有效成分化合物共 143 个,以按照  $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$  作为条件筛

选后,得到活性较高的化合物 36 个。将获得的化合物再次导入 SwissADME 数据库筛选,共获得黄芩高活性化合物 27 个,结果见表 1。

将黄芩有效成分 2D Structure 的 SDF 图导入 Swiss Target Prediction 数据库中检索出相对应的作用靶点,将收集到的靶点信息按 Probability 值从大到小排序,选取前 100 个且同时满足  $Probability > 0.1$ 。黄芩化合物作用靶点信息经过整理、去重后,结果共获得 289 个有效靶点信息。其中黄芩有效成分 HQ9 (ent-Epicatechin) 在 Swiss Target Prediction 数据库中无法预测到相应靶点。

表 1 黄芩高活性的 27 种化合物

Table 1 Twenty-seven compounds with high activity from Scutellaria Radix

编号 No.	Mol ID	化合物名称 Compound name	OB(%)	DL
HQ1	MOL002934	黄芩新素 Neobaicalein	104.34	0.439 17
HQ2	MOL002932	降穿心莲黄酮 Panicolin	76.26	0.291 5
HQ3	MOL012246	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮 5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavanone	74.24	0.264 79
HQ4	MOL002927	黄芩黄酮 II Skullecipflavone II	69.51	0.437 9
HQ5	MOL002911	2,6,2',4'-四羟基-6'-甲氧基查尔酮 2,6,2',4'-Tetrahydroxy-6'-methoxychalcone	69.04	0.219 94
HQ6	MOL002937	二氢木蝴蝶素 Dihydrooroxylin	66.06	0.230 57
HQ7	MOL000228	山姜素(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	55.23	0.201 63
HQ8	MOL002915	三裂鼠尾草素 Salvigenin	49.07	0.332 79
HQ9	MOL000073	(+)-表儿茶素 Ent-epicatechin	48.96	0.241 62
HQ10	MOL008206	苏芥宁黄酮 Moslosooflavone	44.09	0.253 31
HQ11	MOL002897	表小檗碱 Epiberberine	43.09	0.776 1
HQ12	MOL002928	千层纸素 A Oroxylin A	41.37	0.232 33
HQ13	MOL002914	圣草酚 Eriodyctiol (flavanone)	41.35	0.243 6
HQ14	MOL002910	红花素 Carthamidin	41.15	0.241 89
HQ15	MOL002913	二氢黄芩素 Dihydrobaicalin_qt	40.04	0.207 22
HQ16	MOL000525	去甲汉黄芩素 Norwogonin	39.40	0.207 23
HQ17	MOL002926	二氢木蝴蝶素 A Dihydrooroxylin A	38.72	0.229 87
HQ18	MOL012266	黄芩黄酮 Rivularin	37.94	0.366 3
HQ19	MOL002908	5,8,2'-三羟基-7-甲氧基黄酮 5,8,2'-Trihydroxy-7-methoxyflavone	37.01	0.265 46
HQ20	MOL012245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮 5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavanone	36.63	0.268 33
HQ21	MOL002933	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮 5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone	36.56	0.266 66
HQ22	MOL001689	金合欢素 Acacetin	34.97	0.240 82
HQ23	MOL002909	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮 5,7,2,5-Tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	33.82	0.447 39
HQ24	MOL002714	黄芩素 Baicalein	33.52	0.208 88
HQ25	MOL000552	5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮 5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	31.71	0.354 62
HQ26	MOL000173	汉黄芩素 Wogonin	30.68	0.229 42
HQ27	MOL001458	黄连碱 Coptisine	30.67	0.856 47

### 2.1.2 酒精性肝病相关疾病靶点收集结果

通过以“alcoholic liver disease”为关键词,在五个人类基因综合数据库中检索相关疾病基因靶点。并将收集到的基因靶点信息进行筛选、去重,其结果为 GeneCards 数据库收集到 8 020 条有效信息、OMIM 数据库收集到 200 条有效信息、DisGeNET 数据库收集到 195 条有效信息、Therapeutic Target Database (TTD) 数据库收集到 7 条有效信息、

PharmGKB 数据库收集到 2 条有效信息。将五个数据库的结果汇总后去重,共获得 8 131 条有效信息。

### 2.1.3 黄芩药物靶点与酒精性肝病疾病靶点映射结果

将黄芩有效化合物作用靶点信息与 ALD 疾病靶点信息输入在线 Venny 2.1.0 平台取交集后,共获得 257 个交集靶点(见图 1)。

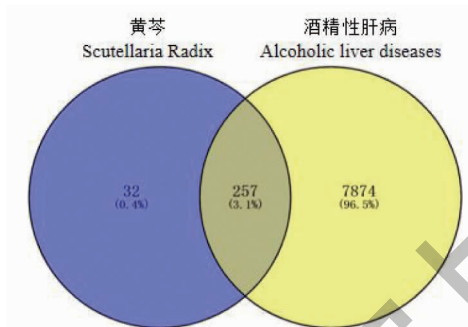


图 1 黄芩有效化合物与酒精性肝病基因映射 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of effective compounds of Scutellaria Radix and ALD

### 2.1.4 构建靶点蛋白互作网络结果

将黄芩治疗 ALD 的 257 个交集靶点重新绘制

PPI 网络图,在删除掉八个游离蛋白节点后,其结果见图 2。由图 2 可知,该网络包含了 190 个节点、1

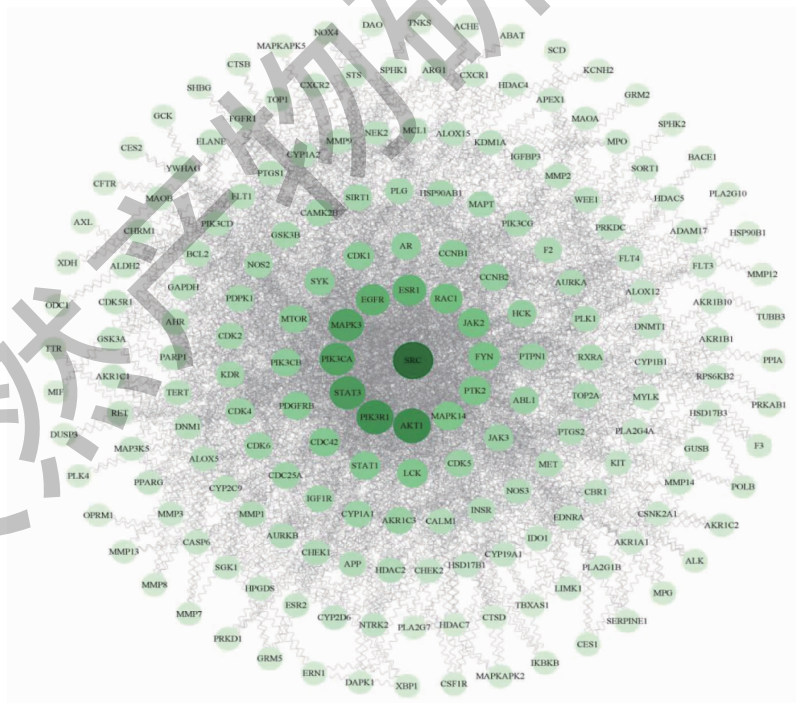


图 2 黄芩治疗酒精性肝病的 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of Scutellaria Radix in treating ALD

注:图中内圈表示度值靠前的蛋白节点,外圈表示度值靠后的蛋白节点,且节点越大说明度值越大。Note: The inner circle in the figure represents the protein node with the highest degree value, while the outer circle represents the protein node with the lowest degree value. The larger the node circle, the greater the degree value.

370 条边。其中黄芩治疗 ALD 的关键核心靶点有 SRC、AKT1、PIK3R1、STAT3、PIK3CA、MAPK3 等。

### 2.1.5 靶点生物学功能分析结果

在进行 KEGG 信号通路富集分析后,共获得 190 条相关通路。将通路按 P 值从小到大排序并选取前 20 条作可视化输出,其结果见图 3。由图可知,黄芩治疗 ALD 的主要信号通路包括癌症的途径 (pathways in cancer)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、脂质与动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、化学致癌-活性氧物种 (chemical

carcinogenesis-reactive oxygen species)、前列腺癌 (prostate cancer)等。ALD 的临床病理变化主要是:由前期的肝损伤、肝炎逐步演化为中后期的肝硬化、肝癌<sup>[10]</sup>。而通过 KEGG 的富集分析可以推断黄芩治疗 ALD 可能主要是通过减轻肝炎症和抑制肝癌变。

在进行基因本位 (GO) 生物过程富集分析后, BP 共获得 1 884 条结果、CC 共获得 117 条结果和 MF 共获得 209 条结果。将各自结果按 P 值从小到大排序并选取前 10 条作可视化输出,其结果见图 4。由图可知,在 BP 中可能主要与蛋白质磷酸化

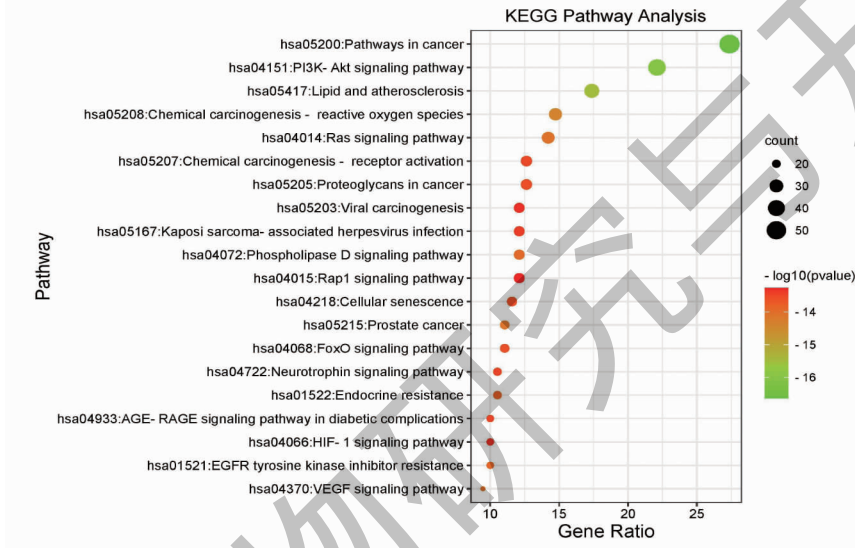


图 3 黄芩治疗酒精性肝病的 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of KEGG signal pathway of Scutellaria Radix in the treatment ofALD

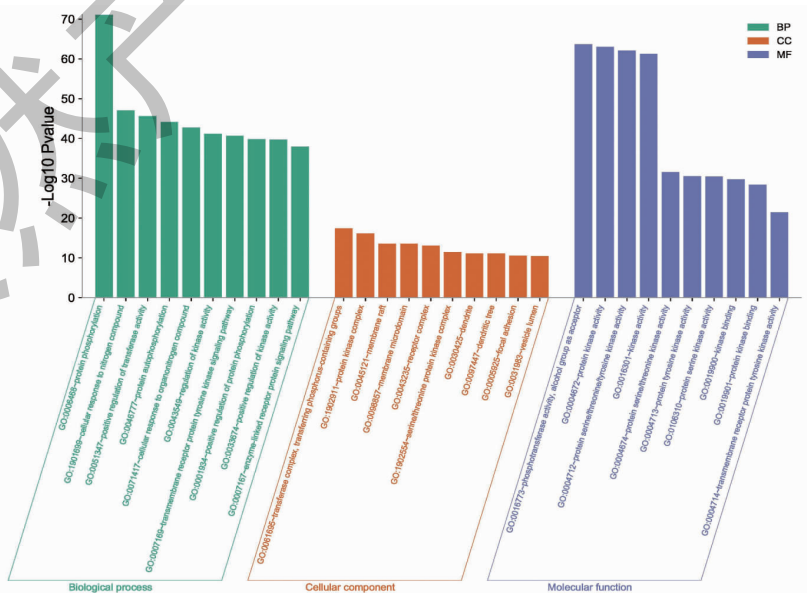


图 4 黄芩治疗酒精性肝病的 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of Scutellaria Radix in the treatment ofALD

(protein phosphorylation)、细胞对氮化合物的反应 (cellular response to nitrogen compound)、转移酶活性的正调节 (positive regulation of transferase activity) 有关;在 CC 中可能主要与转移酶复合物、转移含磷基团 (transferase complex, transferring phosphorus-containing groups)、蛋白激酶复合物 (protein kinase complex)、膜筏 (membrane raft) 有关;在 MF 中可能主要与磷酸转移酶活性、乙醇组作为受体 (phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor)、蛋白激酶活性 (protein kinase activity)、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性 (protein serine/threonine/tyrosine kinase activity) 有关。

### 2.1.6 “有效成分-靶点-通路”互相作用网络分析

选取 KEGG 所富集获得的前 20 条信号通路,利用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“有效成分-靶点-通路”

相互作用网络,其结果见图 5。由图可知,本网络图中共有 165 个节点、1 117 条边,其中黄芩有效成分 27 个节点、靶点 118 个节点、通路 20 个节点。通过对度值排序后发现,黄芩有效成分的平均度值为 22.81,有 13 个有效成分的度值高于平均度值,其中黄芩治疗 ALD 度值前 5 的有效成分分别为山姜素 (HQ7)、降穿心莲黄酮 (HQ2)、5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮 (HQ23)、黄芩素 (HQ24)、去甲汉黄芩素 (HQ16);靶点的平均度值为 9.47,有 49 个靶点的度值高于平均度值,其中靶点度值前 5 的有 CDK1、EGFR、PIK3R1、CYP1B1、ESR2;通路的平均度值为 25.05,有 5 个通路的度值高于平均度值,度值前 5 的通路即为图 3 中基因占比靠前的五条。该实验结果再次验证了黄芩治疗 ALD 呈现出中药治疗所特有的多成分、多靶点、多途径的特点。

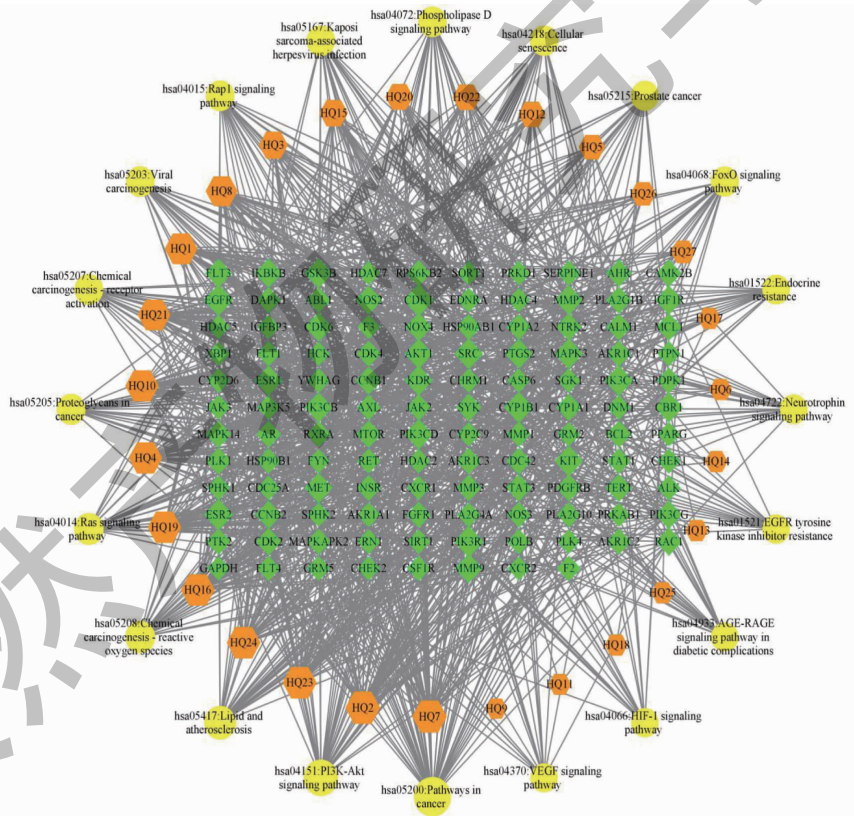


图 5 黄芩治疗酒精性肝病的“有效成分-靶点-通路”互作网络图

Fig. 5 "Effective component-target-pathway" interaction network diagram of *Scutellaria Radix* in the treatment of ALD

注:黄色圆形为通路,橙色正六边形为有效成分,绿色菱形为靶点。Note: The yellow circle is the pathway; The orange regular hexagon is the active ingredient; The green diamond is the target.

## 2.2 靶点蛋白与黄芩有效化学成分分子对接结果

为了更加全面探究黄芩有效成分是如何对 ALD 前 20 条通路关键靶点起到影响的,将筛选过

后的 13 个高于有效成分平均度值的有效成分与度值前 5 的靶点进行分子对接。5 个靶蛋白原始晶体结构的配体构象与对接后的配体构象出现叠合,且

对接后 5 个复合物的最小 RMSD 值分别为:0.050 4、0.090 9、0.078 7、0.129 9、0.028 0 nm,说明对接方法和参数设置合理可行。本次对接中,结合自由能小于-4.25 kcal/mol 有 26 个,小于-5.0 kcal/mol 有 24 个,小于-7.0 kcal/mol 有 21 个,其具体结果见图 6。

通过进一步对比热图结果可以发现,HQ7 与

PIK3R1 对接最强,其结合自由能为-23.769 5 kcal/mol,主要依赖  $\pi$ -烷基作用与  $\pi$ -阳离子作用进行结合;HQ2 与 EGFR 对接次之,其结合自由能为-21.287 4 kcal/mol,主要依赖氢键互相作用与  $\pi$ - $\pi$  共轭作用进行结合;HQ7 与 EGFR 对接排第三,其结合自由能为-21.233 1 kcal/mol,其主要依赖氢键互相作用与  $\pi$ -孤对作用进行结合,各对接结果见图 7。

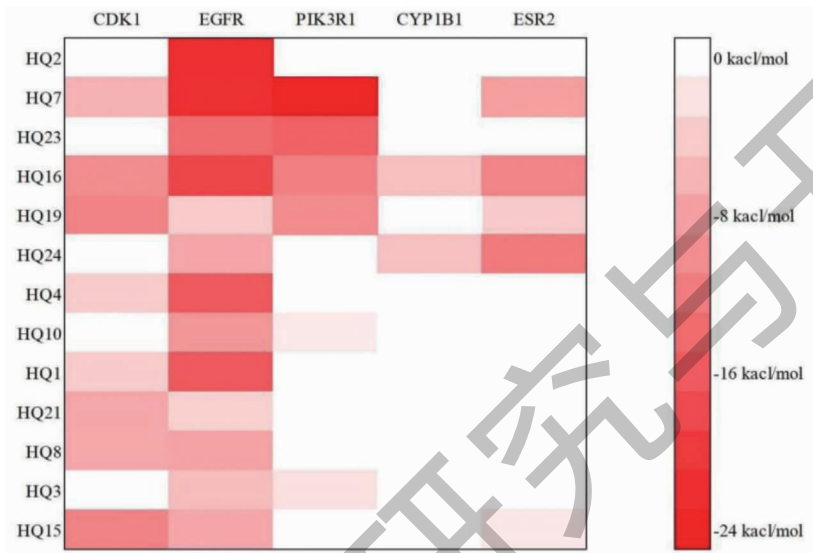


图 6 黄芩治疗酒精性肝病分子对接结合自由能热图

Fig. 6 Molecular docking binding free energy thermogram of Scutellaria Radix in the treatment of ALD

注:图中水平方向代表靶点,垂直方向代表成分编号(具体成分信息见表 1),两者交汇处颜色越深代表结合能越小。Note:The horizontal direction in the figure represents the target point, and the vertical direction represents the composition number (specific ingredient information is shown in Table 1). The darker the color of the intersection of the two, the smaller the binding energy.

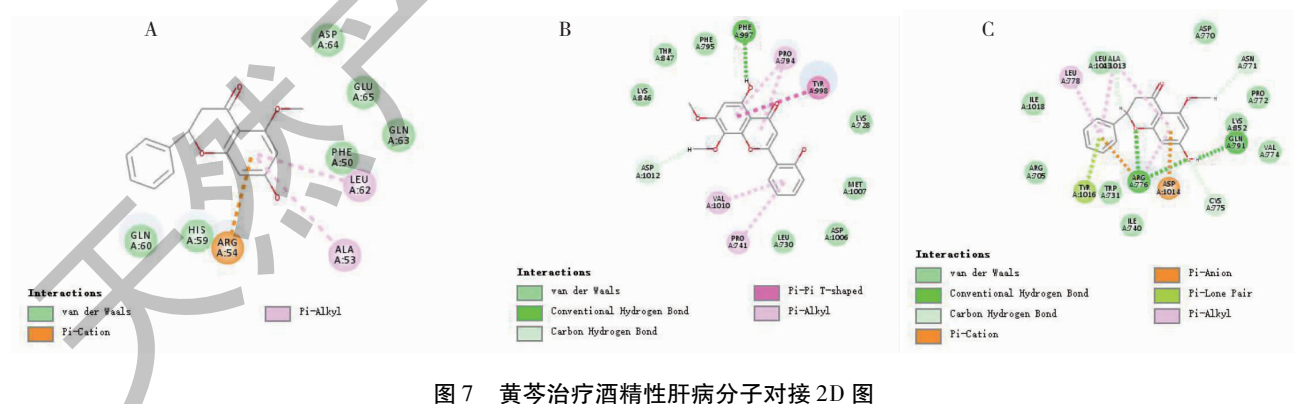


图 7 黄芩治疗酒精性肝病分子对接 2D 图

Fig. 7 2D diagram of molecular docking of Scutellaria Radix in treating ALD

注:A:HQ7-PIK3R1;B:HQ2-EGFR;C:HQ7-EGFR。

### 2.3 山姜素治疗酒精性肝病的细胞实验结果

通过对酒精性肝损伤的大鼠肝细胞给予不同浓度的山姜素治疗后,再利用 CCK-8 溶液与乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒测定其存活率与乳酸脱氢酶释放

量。由图 8A、8B 可知,低、中、高浓度的山姜素均可以对肝损伤细胞起到治疗效果,其细胞存活率较模型组分别提高 15.71%、19.72%、22.59%,同时随着山姜素给药浓度的提高乳酸脱氢酶释放量出现显



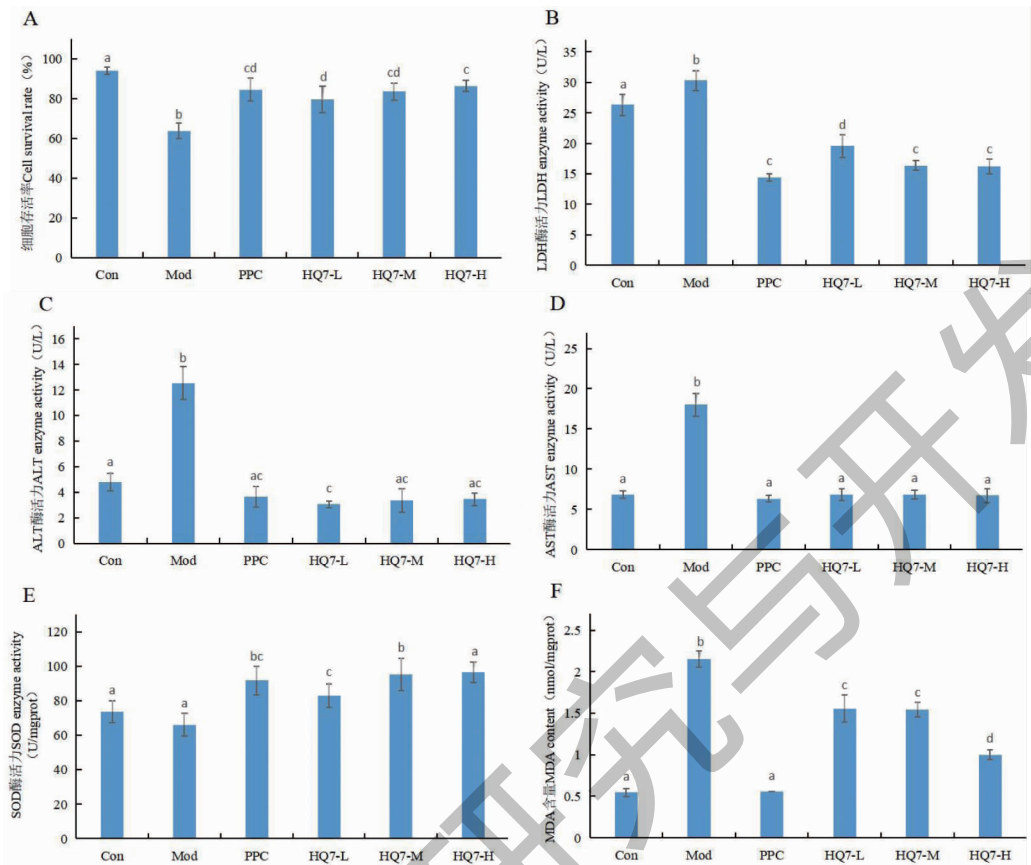


图8 山姜素治疗酒精性肝病的细胞生化指标结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Results of cell biochemical indexes of alpinetin in the treatment of ALD ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: Con:空白对照组; Mod:模型组; PPC:多烯磷脂酰胆碱组(阳性对照); HQ7-L:山姜素低剂量组(20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); HQ7-M:山姜素中剂量组(40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); HQ7-H:山姜素高剂量组(60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。不同的字母表示不同方式处理下的差异有显著性( $P < 0.05$ )。Note: Con: Control group; Mod: Model group; PPC: Polyene phosphatidyl choline group (positive control); HQ7-L: Low dose group of alpinetin (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); HQ7-M: Medium dose group of alpinetin (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); HQ7-H: high dose group of alpinetin (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Different letters indicate significance under different treatment methods ( $P < 0.05$ ).

著降低( $P < 0.05$ )。

由图8C、8D可知,在给予山姜素后,肝损伤细胞的ALT、AST指标均呈现改善趋势,且可以恢复到与正常细胞状态一致( $P > 0.05$ )。山姜素所起到的治疗效果受给药剂量的影响不大,对比低、中、高剂量组其治疗效果显著性不高( $P > 0.05$ ),提示低剂量的山姜素亦可以带来较好的治疗效果。

由图8E、8F可知,山姜素可以有效提高已损伤细胞的SOD酶活力( $P < 0.05$ ),从而积极改善细胞的过氧化状态,抑制肝炎症的发生。对比MDA的结果可以发现,山姜素可以随着给药剂量的增加而逐步降低MDA的含量( $P < 0.05$ )。总体而言,阳性药物对细胞MAD的改善作用优于山姜素。

### 3 讨论与结论

在我国乙型肝炎、丙型肝炎的防治持续取得良

好效果的基础上,再加之经济蒸腾发展以及酒文化的广泛普及,由ALD所导致的肝硬化、肝细胞癌甚至患者死亡的病例占比将持续升高<sup>[11]</sup>。祖国医学体系中并无“酒精性肝病”的术语概念,但根据该病的临床表现、病因病机等进行划分,可与“酒病”“伤酒”“酒癖”“酒疸”等相对应。其治法主要囊括了:健脾益胃法、疏肝利胆法、清热利湿祛浊法等<sup>[12]</sup>。而中药黄芩正是隶属于清热燥湿类药物,目前黄芩主要是被应用在ALD的前、中期<sup>[13]</sup>,但黄芩防治ALD的药效物质基础、作用途径及机制尚未明确,故存在着一定的研究价值。

通过对网络药理学技术的应用,可以得知在蛋白互作网络中关键核心靶点有SRC、AKT1、PIK3R1,这三种蛋白酶在几乎所有类型的癌症中都可能通过上游信号分子的激活或通路组件的突变而

被结构性地激活<sup>[14-16]</sup>。而其中 SRC 作为首个被发现的具有致癌性的基因,参与着众多信号通路下游靶蛋白的磷酸化<sup>[17]</sup>。对细胞生存、粘附、增殖、运动和血管生成均具有不同途径的调节。此外, SRC 的构成性活动也可促进和维持炎症、细胞代谢的重新编程,从而与肿瘤微环境的发展同步,积极维持肿瘤的生长<sup>[18]</sup>。AKT1 作为 PI3K/ AKT 信号通路的中心成员,可被 PIK3R1 编码磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 调节亚基  $\alpha$  (p85-ALPHA) 激活<sup>[19]</sup>, 结合本研究中的蛋白互作 PPI 图可以再次证实两者存在着密切的上、下游关系。

在 KEGG 富集获得的前 20 条信号通路中,多数也归属于“癌变通路”,提示黄芩治疗 ALD 主要是通过预防或抑制肝细胞癌变。EGFR 作为 ErbB 家族的一种典型的酪氨酸激酶受体,在肝脏中高度表达。在摄入酒精后, EGFR 可在血管紧张素 II 与其受体 AT1R 结合的条件下激活,同时 EGFR 可作为 Ras-Raf-1-MAP2K/MEK-MAPK/ERK 细胞信号通路的枢纽,刺激 PIK3R1 蛋白的表达异常,进而影响 PI3K/ AKT 信号通路<sup>[20,21]</sup>。PI3K/ AKT 信号通路与众多炎症疾病密切相关,被认为是肿瘤的关键信号通路之一。已有研究证实,黄芩可以通过上调 IRS1、PI3K、Akt2 和 Glut2 的 mRNA 表达,促进 p-PI3K、p-Akt 和 Glut2 的磷酸化,从而克服 PI3K/Akt 胰岛素信号通路的损伤,积极改善肝炎<sup>[22]</sup>。对比 ALD 的致病因素可以发现,其与心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 同样都包括:炎症、脂肪因子、肠道菌群失调、氧化应激及心理应激等<sup>[23]</sup>。亦有研究表明 ALD 与 CVD 之间存在着直接的联系,提出了肝-心轴相关概念,再结合本研究筛选获得的脂质与动脉粥样硬化信号通路,提示对于 ALD 的治疗除关注肝脏自身病变外,同时还需考虑心血管对其的影响<sup>[24]</sup>。

对比分子对接中的结合能大小可以发现,山姜素可作为黄芩治疗 ALD 的关键有效成分之一。山姜素广泛存在于姜科植物中,相关药理学实验证实其具有抗癌、抗氧化、抗炎、修复血管内皮等作用<sup>[25-27]</sup>。人体主要是依赖微粒体 CYP2E1 进行酒精代谢的,在代谢过程中会大量产生如乙醛、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等中间产物。一方面,乙醛可与蛋白及 DNA 形成加合物,直接发挥致癌毒性。另一方面,由于 ROS 的积聚也会引起 DNA 结构和功能发生改变,导致细胞周期紊乱,影响基因

的转录、翻译等功能,从而启动或促进细胞癌变<sup>[28]</sup>。而研究表明山姜素可以作为信号分子,激活相关通路,在清除 ROS 的同时有效抑制细胞癌变<sup>[29]</sup>。结合体外细胞实验可以发现,在给予不同浓度的山姜素后,可以有效减轻肝细胞的酒精性损伤,相关的生化学指标 ALT、AST 也得到显著改善。再结合 MAD、SOD 的结果,提示山姜素可能可以通过提高 SOD 酶的酶活性来抑制肝脏的氧化应激反应而发挥作用的,但其抗氧化效果或许远不如其抑癌效果,还需要进一步实验研究。

综上所述,本实验通过网络药理学初步预测出黄芩的 27 个有效成分,表明单味中药亦可以视作一种小型复方。同时黄芩 27 个有效成分可以通过 257 个基因靶点对 ALD 起到治疗作用,其中关键核心靶点有 SRC、AKT1、PIK3R1 等。KEGG 信号通路富集分析结果提示,黄芩可以通过影响癌症的途径、PI3K-Akt 信号通路、脂质与动脉粥样硬化等信号通路对 ALD 起到作用。通过分子对接技术,在验证网络药理学结果的同时,筛选出黄芩治疗 ALD 的最佳有效成分为山姜素。通过体外细胞实验,可以发现山姜素的确能够显著改善大鼠肝细胞 BRL 3A 的酒精性损伤状态。本实验结果可以为黄芩治疗 ALD 提供部分理论基础,但想要进一步挖掘黄芩治疗 ALD 的具体作用原理仍需要进行大量的药理机制实验。

#### 参考文献

- 1 Bajaj JS, Nagy LE. Natural history of alcohol-associated liver disease: understanding the changing landscape of pathophysiology and patient care [J]. *Gastroenterology*, 2022, 163: 840-851.
- 2 Singal AK, Bataller R, Ahn J, et al. ACG clinical guideline: alcoholic liver disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113: 175-194.
- 3 Pan JS, Yu X, Xing LJ. Research progress in the treatment of alcoholic liver disease with traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis* (中西医结合肝病杂志), 2022, 32: 957-960.
- 4 Yang L, Bo YY, Yu BL, et al. Research progress on the prevention and treatment of alcoholic liver disease by traditional Chinese medicine and related mechanisms [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2020, 42: 719-726.
- 5 Bai QY, Tao SM, Tian JH, et al. Progress of research on effect and mechanism of *Scutellariae Radix* on preventing liver diseases [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45: 2808-

- 2816.
- 6 Hu XH, Tang ZS, Wu QJ, et al. Study on the molecular mechanism of semen hoveniae for prevention and treatment of alcoholic liver disease based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2021, 32:1309-1320.
  - 7 Yang XH, Liu HH, Liu JN, et al. Rational selection of the 3D structure of biomacromolecules for molecular docking studies on the mechanism of endocrine disruptor action[J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29:1565-1570.
  - 8 Hsin KY, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. *PLoS One*. 2013, 8:e83922.
  - 9 Miao YL. Study on the binding mechanism of two human protein-ligand based on binding free energy[D]. Shanghai: East China Normal University (华东师范大学), 2022.
  - 10 Tanaka K, Tsuji K, Matsui T, et al. Potential of PALBI - T score as a prognostic model for hepatocellular carcinoma in alcoholic liver disease[J]. *JGH Open*, 2022, 6:36-43.
  - 11 Xu HQ, Gao YH. River international epidemic characteristics of alcoholic liver disease in Asia (2000-2020) [J]. *J Clin Hepatol* (临床肝胆病杂志), 2022, 38:1625.
  - 12 Liang W. Study on TCM syndrome differentiation of alcoholic liver disease[D]. Nanjing: Nanjing University of Traditional Chinese Medicine (南京中医药大学), 2013.
  - 13 Bi ZY, Yang Z, Guo B, et al. Discussion on the traditional Chinese medicine treatment of alcoholic liver disease based on the theory of alcohol injury[J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med* (云南中医中药杂志), 2022, 43:16-19.
  - 14 Wei HM, Wang JC, Xu ZM, et al. Corrigendum; hepatoma cell-derived extracellular vesicles promote liver cancer metastasis by inducing the differentiation of bone marrow stem cells through microRNA-181d-5p and the FAK/Src pathway[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:607001.
  - 15 Tan WB, Zhou S, Kang H, et al. Exploring the mechanism of photoglycyrrhizin in the treatment of castration resistant prostate cancer based on network pharmacology and experimental verification[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35:310-318.
  - 16 He S, Zhang J, Zhang W, et al. FOXA1 inhibits hepatocellular carcinoma progression by suppressing PIK3R1 expression in male patients[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36:175.
  - 17 Liang XX. Study on the mechanism of controlling Src signaling pathway by berberine to inhibit HER-2 positive breast cancer cell SK-BR-3[D]. Jining: Jining Medical College (济宁医学院), 2022.
  - 18 Cirotti C, Contadini C, Barilù D. SRC kinase in glioblastoma news from an old acquaintance[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12:1558.
  - 19 Wang S, Huang Z, Lei Y, et al. Celastrol alleviates autoimmune hepatitis through the PI3K/AKT signaling pathway based on network pharmacology and experiments[J]. *Front Pharmacol*. 2022, 13:816350.
  - 20 Xin J, You T, Jiang X, et al. Caveolin-1 alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity in alcoholic fatty liver disease by regulating the Ang II/EGFR/ERK axis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23:7587.
  - 21 Zhao H, Kong LZ, Zhang Y, et al. Exploring the mechanism of Bayage Qiwei Powder in treatment of alcoholic liver disease based on network pharmacology, molecular docking and animal experiment[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2021, 32:1480-1489.
  - 22 Cui X, Qian DW, Jiang S, et al. Scutellariae Radix and Coptidis Rhizoma improve glucose and lipid metabolism in T2DM rats via regulation of the metabolic profiling and MAPK/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19:3634.
  - 23 Drożdż K, Nabrdalik K, Hajzler W, et al. Metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD), diabetes, and cardiovascular disease: associations with fructose metabolism and gut microbiota[J]. *Nutrients*, 2021, 14:103.
  - 24 Chi ZC. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease[J]. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志), 2020, 28:313-329.
  - 25 Zhao G, Tong Y, Luan F, et al. Alpinetin: a review of its pharmacology and pharmacokinetics[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:814370.
  - 26 Zhu ZH, Hu RY, Li JD, et al. Alpinetin exerts anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-angiogenic effects through activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 pathway in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96:107660.
  - 27 Dai H, Lin JZ, Wang YR. Effect of alpinia on heart function, blood lipid and vascular endothelial function in rats with coronary heart disease[J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2021, 37:2813-2817.
  - 28 Abidan B, Guo JS. Mechanisms of etiology-specific and etiology-unspecific development of hepatocellular carcinoma in chronic liver diseases[J]. *J Southwest Med Univ* (西南医科大学学报), 2021, 44:593-600.
  - 29 Wei LH, Chen WW, Huang LK, et al. Alpinetin ameliorates bone loss in LPS-induced inflammation osteolysis via ROS mediated P38/PI3K signaling pathway[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 184:106400.