

基于网络药理学和分子对接技术的枳椇子防治酒精性肝病分子机制研究

胡晓慧¹, 唐志书¹, 吴群军², 宋忠兴¹, 许洪波¹ [1. 陕西中医药大学陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083; 2. 旬阳太极缘生物科技有限公司, 陕西 安康 725741]

摘要: **目的** 利用网络药理学和分子对接技术探讨枳椇子防治酒精性肝病(Alcoholic liver diseases, ALD)的物质基础和作用机制。**方法** 借助 TCMS 数据库检索枳椇子中所含的主要化学成分及其作用靶点并进行筛选, 从而获得枳椇子防治酒精性肝病的活性成分和靶点; 通过 Cytoscape 软件构建“药物-有效成分-靶点-疾病”网络; 通过 Metascape 在线网站对活性成分靶点进行基因本体 GO 和 KEGG 通路富集分析, 最后用分子对接技术对枳椇子中活性成分的作用靶点进行验证。**结果** 筛选出枳椇子活性成分 40 个, 与酒精性肝病相关的靶点 228 个; GO 分析结果显示主要与细菌反应、无机物响应、脂多糖应答和有毒物质响应等生物学过程相关; KEGG 富集分析表明主要通路为癌症与炎症相关通路; 分子对接结果表明枳椇子中的 13 个活性成分与 MAPK1、MAPK3 和 AKT1 靶点蛋白具有较好的亲和作用。**结论** 本研究较系统地探讨了枳椇子防治酒精性肝病的物质基础与分子机制, 研究结果为临床使用枳椇子防治酒精性肝病提供了科学依据, 同时也为枳椇子的开发利用提供了参考。

关键词: 枳椇子; 酒精性肝病; 肝损伤; 分子对接; 网络药理学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1309-012

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2021.09.011

Study on the Molecular Mechanism of Semen Hoveniae for Prevention and Treatment of Alcoholic Liver Disease Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

HU Xiaohui¹, TANG Zhishu¹, WU Qunjun², SONG Zhongxing¹, XU Hongbo¹ [1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization, State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources(Cultivation), Shaanxi Innovative Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083 Shaanxi, China; 2. Xunyang Taijiyuan Biotechnology Co., Ltd., Ankang 725741 Shaanxi, China]

Abstract: Objective To explore the material basis and mechanism of action of Semen Hoveniae in the prevention and treatment of alcoholic liver disease by using the network pharmacology and molecular docking technology.

Methods The main chemical components in Semen Hoveniae were searched and screened with the help of TCMS 数据库. The active components and targets of Semen Hoveniae in preventing and treating alcoholic liver disease were obtained. The herbs-active ingredients-targets-disease network was constructed using Cytoscape software. The metascape online website was used to perform gene ontology (GO) function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis. Finally, molecular docking technology was used to verify the target points of active ingredients in Semen Hoveniae. **Results** 40 active ingredients of Semen Hoveniae and 228 targets related to ALD were screened out. GO analysis results showed that it is mainly related to biological processes such as response to bacterium, response to inorganic substance, response to lipopolysaccharide, and response to toxic substance. KEGG enrichment

收稿日期: 2021-02-03

作者简介: 胡晓慧, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药效物质研究。Email: 15709101006@163.com。通信作者: 许洪波, 男, 副教授, 研究方向: 中药药效物质研究。Email: xhb2005@sntcm.edu.cn。

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2019JQ-370); 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2016KTSF01-06-01); 陕西省青年科技新星项目(2020KJXX-069)。

analysis showed that the main pathway was cancer-related pathways and inflammation-related pathways. The results of molecular docking showed that the 13 active components in Semen Hoveniae have good affinity with MAPK1, MAPK3 and AKT1 target proteins. **Conclusion** This study systematically explored the material basis and molecular mechanism of Semen Hoveniae in the prevention and treatment of alcoholic liver disease. The results of the study provide a scientific basis for the clinical use of Semen Hoveniae to prevent and treat alcoholic liver disease, and also provide a reference for the development and utilization of Semen Hoveniae.

Keywords: Semen Hoveniae; alcoholic liver disease; liver injury; molecular docking; network pharmacology

酒精性肝病(Alcoholic liver diseases, ALD)是由长期过量饮酒或酗酒所引起的肝损伤,包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化、酒精性肝硬化^[1-2]。酒精性肝病是恶性肝病的主要诱因之一,已成为全球性的公共卫生问题^[3]。2010年,酒精性肝病导致的肝硬化死亡占全球死亡人数的0.9%,占所有肝硬化相关死亡人数的47.9%^[4]。目前,在我国由于酒精所致肝损伤的发病率呈逐年上升趋势,酒精性肝病已成为仅次于病毒性肝炎的肝病,严重危害了人类健康^[5]。截止目前,尚无治疗酒精性肝病的特效药物^[6]。因此,研究和开发治疗酒精性肝病的药物有着重要的经济、社会意义。

中药枳椇子是鼠李科枳椇属植物北枳椇 *Hovenia dulcis* Thunb.、毛果枳椇 *Hovenia trichocarpa* Chun et Tsiang 和枳椇 *Hovenia acerba* Lindl 的成熟种子,具有解酒毒,止呕,止渴除烦,清热利尿等功效^[7]。枳椇子的解酒功效,最早记载于唐代《新修本草》的第十四卷^[8]。《千金翼方》^[9]和《滇南本草》^[10]中对其“解酒毒”也均有记载。现代药理学研究^[11]表明枳椇子具有解酒保肝、抗疲劳、抗氧化、抗肿瘤等作用。尽管此前已有较多研究揭示枳椇子具有显著的解酒保肝作用,但其发挥解酒保肝的药效物质基础尚不明确、作用机制尚不清楚。本研究采用网络药理学和分子对接技术探讨枳椇子治疗酒精性肝病的作用机制和可能的活性成分,以期阐明枳椇子保肝解酒的药效物质提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 枳椇子化学成分收集与筛选 通过中药系统药理学数据库和分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>)检索枳椇子的化学成分,查阅相关文献,建立枳椇子化学成分数据库。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)

和药物相似性(drug likeness, DL)为筛选条件,选择 OB $\geq$ 30%或 DL $\geq$ 0.18 的化学成分^[12-13]。

1.2 枳椇子作用靶点的筛选 在 TCMSP 数据库中收集所得化合物对应的靶点,将所有靶点在 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)中进行搜索,对获得的靶点信息进行规范化校正,得到成分相关的基因靶点。

1.3 酒精性肝病靶点的获取 分别在 OMIM(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)和 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库中以“alcoholic liver disease”和“alcoholic hepatic disease”为关键词搜索与酒精性肝病相关的基因,去重后即得酒精性肝病的相关靶点。

1.4 枳椇子治疗酒精性肝病靶点的筛选 利用在线网站 Venny2.1(<http://www.liuxiaoyu.cn/>)将枳椇子成分作用靶点与酒精性肝病相关的靶点取交集,重合的靶点即为枳椇子可能作用于酒精性肝病的相关靶点。

1.5 靶点蛋白互作网络(PPI)构建 利用 String 数据库(<https://string-db.org/>)对上述交集靶点的相互作用进行分析,将靶点信息导入 String 数据库,物种选择为“Homo sapiens”,分析所提交靶点蛋白的相互作用信息,从而构建靶点蛋白的 PPI 网络,利用 R 程序包计算出核心靶点,并将结果可视化输出。

1.6 “药物-有效成分-靶点-疾病”相互作用网络的构建 利用 Cytoscape (3.7.2)软件构建“药物-有效成分-靶点-疾病”相互作用网络。网络图中的节点(node)分别代表疾病、药物、有效成分和靶点。以边(edge)的连接代表有效成分与靶点、靶点与疾病或靶点与药物之间的相互作用关系。采用 Cytoscape 的插件 Network Analysis 对网络进行拓扑性质分析,根据度(Degree)值对网络进行编排,以获得可表征药物、疾病、成分与靶点关系的网络图。

1.7 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析 通过在

线分析网站 Metascape(<https://metascape.org/>)对核心靶点进行 GO(Gene Ontology)富集分析和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)信号通路富集分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,将结果可视化处理。

1.8 靶点蛋白与枳椇子活性成分的分子对接研究 从 PBD 数据库中下载相应的受体蛋白,通过 DISCOVERY STUDIO (DS)软件将其与“1.1”中筛选到的活性成分进行分子对接研究,采用 CDOCKER 对接模块进行分子对接分析。

2 结果

2.1 枳椇子活性成分收集 在 TCMSP 数据库中检索枳椇子,获得 39 个化学成分,通过查阅文献得到 57 个化学成分。将所得到的化学成分去重,并以 $OB\geq 30\%$ 或 $DL\geq 0.18$ 为条件进行筛选,最终得到 40 个成分,其信息如表 1,结构如图 1 所示。

2.2 枳椇子作用靶点的筛选 通过 TCMSP 数据库收集“2.1”项所得的化合物对应的靶点,通过 Uniprot 数据库收集作用靶点的基因名称,删除无效与重复基因,共获得枳椇子活性成分作用靶点 246 个。

2.3 酒精性肝病靶点的收集 以“alcoholic liver disease”和“alcoholic hepatic disease”为关键词分别在 GeneCards 和 OMIM 数据库中收集得到 7 685、5 616、517 和 522 个相关疾病的基因。将所得基因汇总、去重后,共获得 8 292 个有效基因。

2.4 枳椇子治疗酒精性肝病的靶点筛选 将筛选的 246 个枳椇子靶点与 8 292 个酒精性肝病靶点放入在线网站 Venny2.1 中取交集,共收集到 228 个共同靶点(图 2)。

2.5 靶点 PPI 网络的构建与分析 将 228 个交集靶点导入 STRING 在线数据平台,选择种属为 Homo sapiens,并设定置信度为 0.95,绘制 PPI 图(图 3),其中节点代表蛋白,边代表蛋白与蛋白之间的互作关系。采用 R 语言制作柱形图,并分析得到前 30 个 PPI 核心基因(图 4)分别为:STAT3、JUN、MAPK1、AKT1、MAPK3、IL-6、RELA、STAT1、VEGFA、ESR1、CXCL8、EGFR、FOS、CASP8、IL-10、IL-2、RB1、CDKN1A、EGF、IL-1 β 、CCND1、IL-4、MAPK14、NFKBIA、BCL2L1、IL-13、JAK1、MAPK8、MYC、NCOA1。

2.6 “药物-有效成分-靶点-疾病”分析 通过 Cytoscape 软件构建枳椇子的“药物-有效成分-靶点-疾病”网络(图 5)。图中,墨绿色的 V 形节点代表

表 1 枳椇子治疗酒精性肝病(ALD)的主要活性成分信息
Table 1 The main active ingredients of Semen Hoveniae in the treatment of ALD

序号	Mol ID	名称	口服生物利用度(OB)/%	药物相似性(DL)
1	MOL013378	Methyl valerate	51.07	0.01
2	MOL004627	Methyl hexanoate	52.44	0.01
3	MOL007233	Methyl nonylate	54.12	0.03
4	MOL013379	Mono-methyl suberate	31.59	0.04
5	MOL008151	Methylnonadecanoate	16.27	0.19
6	MOL003920	Methyl icosanoate	15.79	0.22
7	MOL008595	Methyl heneicosanoate	15.36	0.26
8	MOL002027	Methyl behenate	14.96	0.29
9	MOL000012	Arachic acid	16.66	0.19
10	MOL000598	Octacosanol	10.70	0.41
11	MOL000114	Vanillic acid	35.47	0.04
12	MOL000513	Gallic acid	31.69	0.04
13	MOL002902	Caffeic acid ethyl ester	103.85	0.07
14	MOL000472	Emodin	24.4	0.24
15	MOL001780	L-tryptophan	75.93	0.08
16	MOL002140	Perolaryne	65.95	0.27
17	MOL000008	Apigenin	23.06	0.21
18	MOL002083	Tricin	27.86	0.34
19	MOL000422	Kaempferol	41.88	0.24
20	MOL000098	Quercetin	46.43	0.28
21	MOL002008	Myricetin	13.75	0.31
22	MOL009278	Laricetrin	35.38	0.34
23	MOL011604	Syringetin	36.82	0.37
24	MOL004328	Naringenin	59.29	0.21
25	MOL002249	Gallocatechin	2.26	0.27
26	MOL004569	(2R,3R)-Dihydrokaempferol	24.15	0.24
27	MOL004576	(2R,3R)-Dihydroquercetin	66.44	0.27
28	MOL013374	Ampelopsin	23.48	0.31
29	MOL005866	(-)-Gallocatechin	18.57	0.27
30	MOL001551	Trochol	15.48	0.78
31	MOL000358	Beta-sitosterol	36.91	0.75
32	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
33	MOL013376	Jujubogenin	29.03	0.62
34	MOL008034	Ceanothic acid	73.52	0.77
35	MOL013375	Hovenine A	17.02	0.69
36	MOL013380	Pentahydroxybufostane	9.50	0.82
37	MOL007227	Myricetin-3-O- β -D-glucopyranoside	1.43	0.79
38	MOL001540	Spinosin	6.31	0.72
39	MOL000357	Sitogluside	20.63	0.62
40	MOL013377	Lutein	22.59	0.55

枳椇子有效成分,红色菱形节点和蓝色的菱形节点分别代表疾病和药物,不同程度的紫色节点代表交集靶点,图中共包含 257 个节点和 745 条边。枳椇子活性成分中,度值排名前 3 位的为槲皮素(133)、



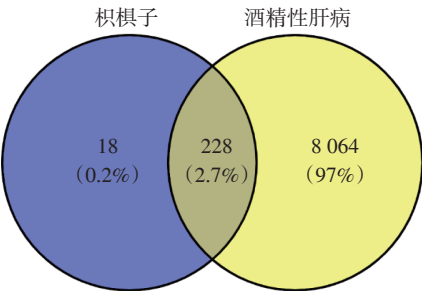


图 2 枳椇子与酒精性肝病(ADL)靶点的韦恩图

Figure 2 The Venn diagram of targets from Semen Hoveniae and ALD



图 3 枳椇子与酒精性肝病(ALD)交集靶点的 PPI 图

Figure 3 PPI diagram of the intersection targets of Semen Hoveniae and ALD

芹菜素(60)和山柰素(50)。排名前 5 位的靶点为 PTGS2、PTGS1、NCOA2、PPARG 和 CASP3，这些靶点主要是与炎症、癌症和细胞凋亡有关。

2.7 枳椇子治疗酒精性肝病关键靶点 GO 生物学过程富集分析 为分析 228 个交集靶点主要富集的细胞组分、分子功能与生物学过程，我们对交集靶点进

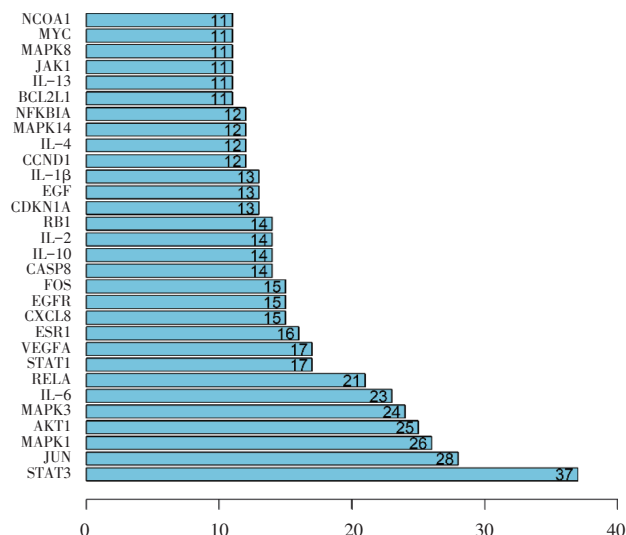


图4 枳椇子治疗酒精性肝病(ALD)的可能核心基因

Figure 4 The possible core genes of Semen Hoveniae in the treatment of ALD

行 GO 分析, 结果显示枳椇子治疗酒精性肝病的关键靶点共在 2 894 个 GO 条目上富集, 包括 2 346 个生物信息学过程(BP)、113 条细胞组成(CC)和 235 条

分子功能(MF)。BP 结果显示可能与细菌反应、无机物响应、脂多糖应答和有毒物质响应等生物学过程相关; CC 结果显示可能与溶酶体、囊泡和蛋白激酶复合物等相关; MF 结果表明与核受体、细胞因子、转录因子及酶活性有关。图 6 展示了 BP、CC 和 MF 前 20 位 GO 分析的结果。

2.8 枳椇子治疗酒精性肝病关键靶点 KEGG 通路

富集分析 枳椇子治疗酒精性肝病关键靶点的 KEGG 分析结果表明, 关键靶点共富集在 185 条通路上, 其中包括前列腺癌、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、小细胞肺癌、癌症中的蛋白多糖和癌症中的小 RNA 等癌症相关通路以及白细胞介素(IL)-17 信号转导通路、乙型肝炎、丙型肝炎、肿瘤坏死因子信号通路、糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路、甲型流感、T 细胞受体信号通路、破骨细胞分化、Th17 细胞分化和细胞凋亡等通路。图 7 为 KEGG 富集分析结果前 30 位的气泡图, 气泡图以基因比进行排序, 排名越靠前的通路基因数越多, 该通路在图中相应的气泡则越大。

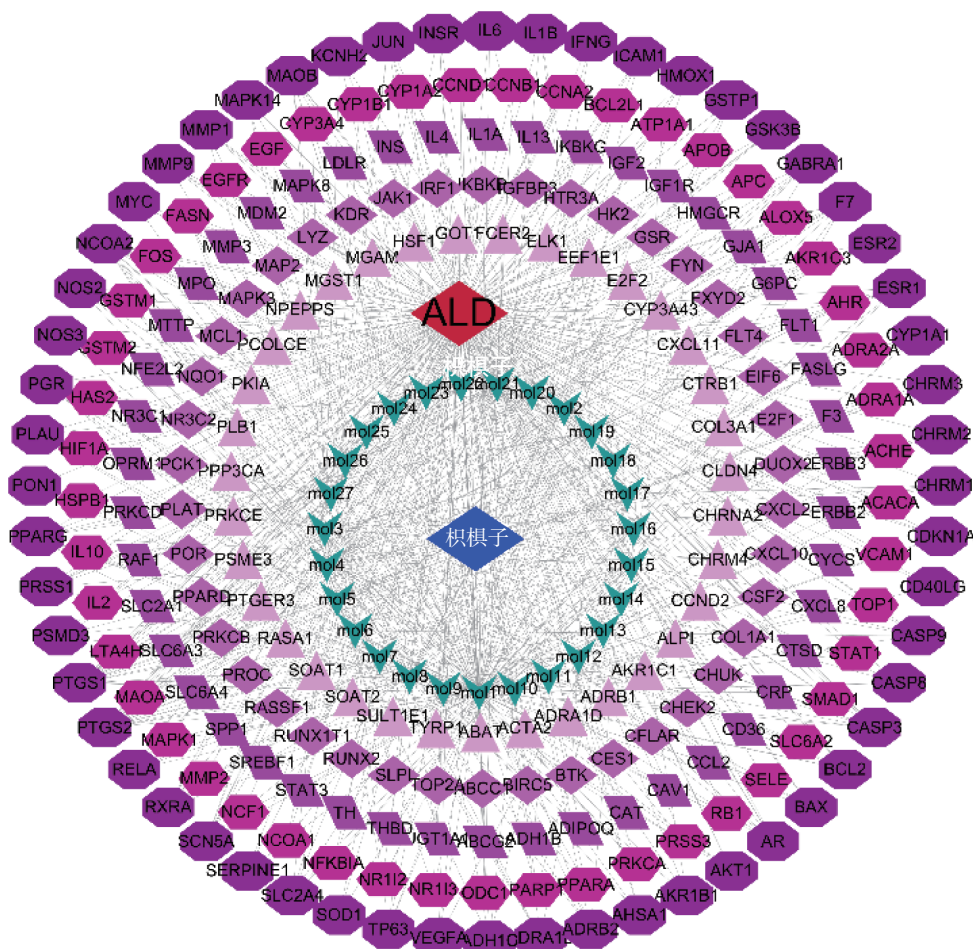


图5 枳椇子治疗酒精性肝病(ALD)“药物-有效成分-靶点-疾病”网络图

Figure 5 Network diagram of “drug-active ingredients-targets-disease” of Semen Hoveniae in the treatment of ALD

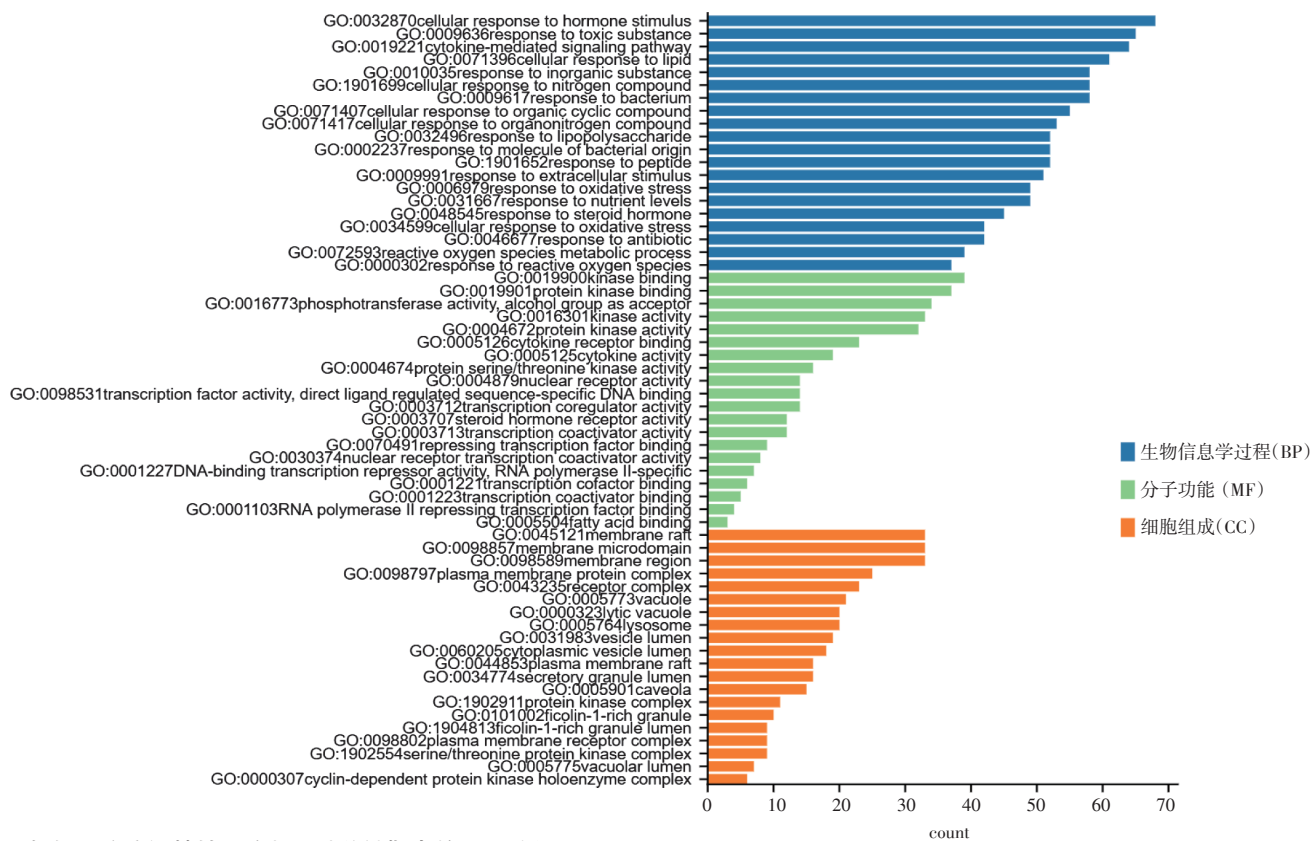


图 6 枳椇子治疗酒精性肝病(ALD)关键靶点的 GO 分析
Figure 6 The GO analysis of the key targets of Semen Hoveniae in the treatment of ALD

KEGG 结果显示枳椇子治疗酒精性肝病的前 2 位通路分别是癌症通路和乙型肝炎通路,此外还涉及到很多和癌症与炎症相关的通路如 IL-17 signaling pathway、apoptosis、TNF signaling pathway、Th17 cell differentiation 和 T cell receptor signaling pathway 等。从肝炎到肝硬化,再到肝癌的多阶段病程发展模式已得到病理学和临床多方面的支持^[14],结合 KEGG 的结果,说明炎症和癌症通路很有可能是枳椇子治疗酒精性肝病的关键通路。

其中,在前 30 位通路中,MAPK1、MAPK3 和 AKT1 涉及 20 个以上的通路(图 8),且在 PPI 网络核心基因中均位列前 5 位,这表明 MAPK1、MAPK3 和 AKT1 可能为枳椇子治疗酒精性肝病的关键靶点。

2.9 活性成分与关键靶点分子对接结果 为深入探讨枳椇子是否可能通过关键靶点 MAPK1、MAPK3 和 AKT1 发挥防治酒精性肝病的作用,我们采用分子对接技术研究枳椇子中主要活性成分与 MAPK1、MAPK3 和 AKT1 蛋白的相互作用。从 PDB 数据库中获得靶点蛋白 MAPK1、MAPK3 和 AKT1 对应的晶体结构 PDB ID: 2OJG、2ZOQ 和 3O96。分别下载其 PDB Formant 格式文件,将其导入到 DS 软件中,采

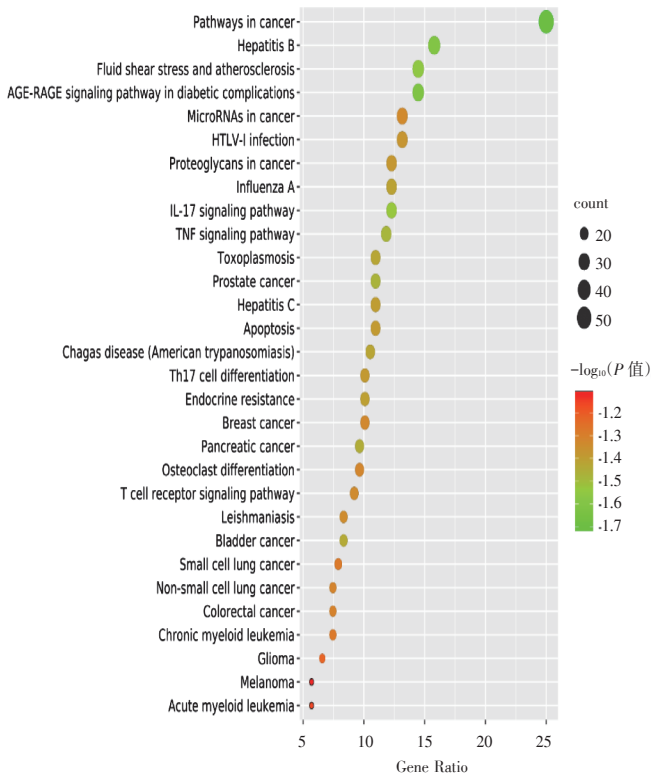


图 7 枳椇子治疗酒精性肝病(ALD)的 KEGG 富集通路分析气泡图
Figure 7 The bubble diagram of KEGG enrichment pathway analysis of Semen Hoveniae in the treatment of ALD

用 cDock 模式进行分子对接研究, 对接参数如表 2 所示。结果以热图的形式呈现(图 9), 其中数值代表分子对接作用的分值, 数值越大表示枳椇子中的活性成分与靶点蛋白的对接亲和作用越强。SUM 为枳椇子主要化学成分与 3 种蛋白对接作用分值的和, 可以直观地看出比原配体(Primary Ligand)SUM 值高的化学成分有 13 个, 表明这些化合物与 3 种蛋白均有较好的对接作用, 提示枳椇子可能通过多成分、多靶点的方式发挥其防治酒精性肝病的作用, 这与上述系统药理学的结果一致。其中, 排名第

1 位的是枳椇碱 A(Hovenine A), 其次是丁香黄素(Syringetin)、落叶黄素(Laricetrin)、小麦黄素(Tricin)、(+)-没食子儿茶素[(+)-Gallocatechin]、(-)-没食子儿茶素[(-)-Gallocatechin]、杨梅素(Myricetin)、二氢杨梅素(Ampelopsin)、芹菜素(Apigenin)、山柰素(Kaempferol)、花生酸(Arachic acid)、槲皮素(Quercetin)、2R, 3R-二氢槲皮素[(2R, 3R)-Dihydroquercetin]。

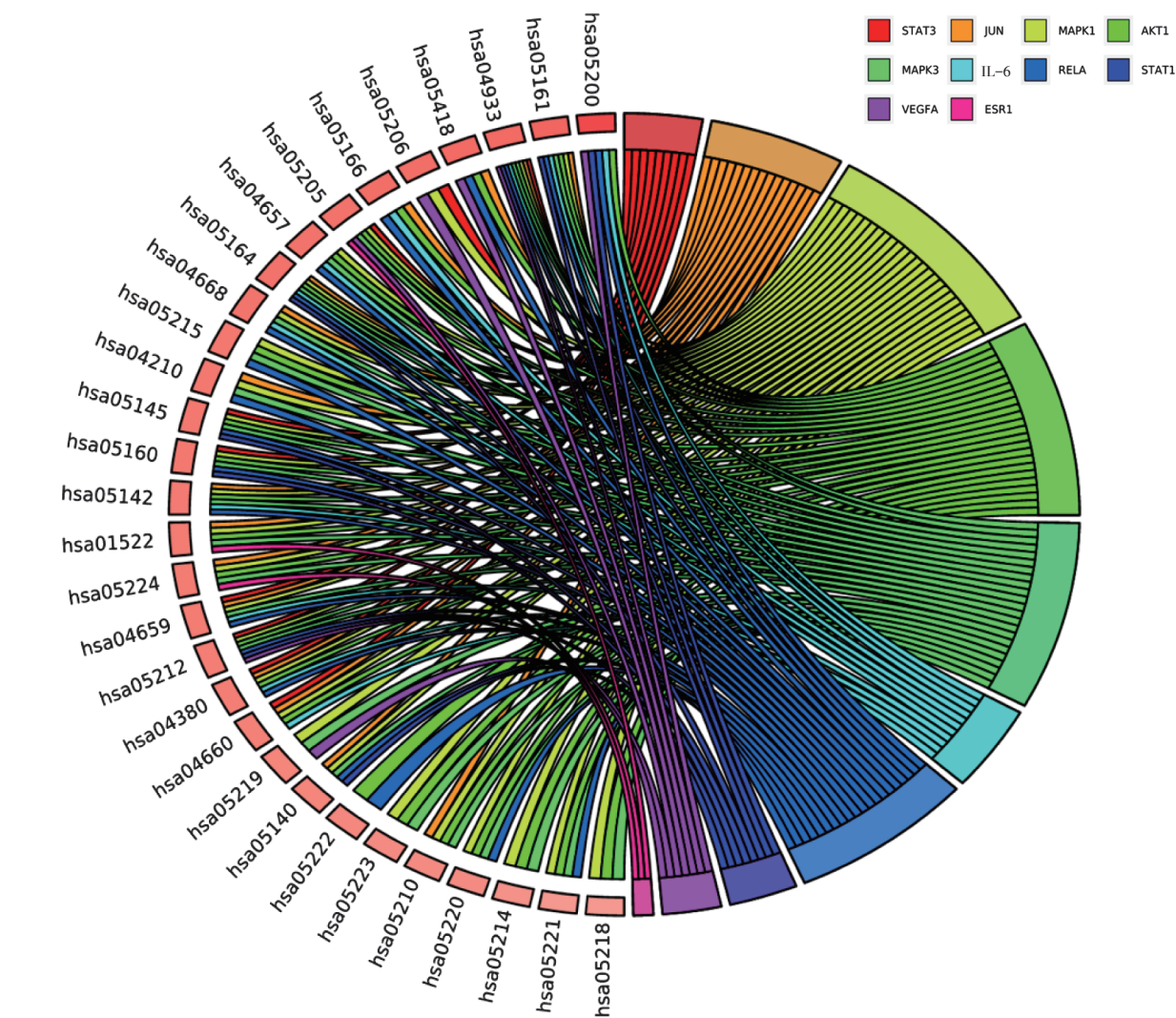


图 8 枳椇子治疗酒精性肝病(ALD)的 KEGG 弦图
Figure 8 KEGG chordal graph of Semen Hoveniae in the treatment of ALD

表 2 枳椇子治疗酒精性肝病(ALD)的分子对接参数表

序号	靶点(Target)	PDB ID	对接位点球的半径(Radius)	位点球坐标(Site Sphere)	对接次数(Top Hits)	构象簇半径(Pose Cluster Radius)
1	MAPK1	2OJG	15.000	-14.396,13.210,41.420	10	0.1
2	MAPK3	2ZOQ	6.421	29.051,7.333,17.810	10	0.1
3	AKT1	3O96	11.282	8.598,-7.101,13.101	10	0.1

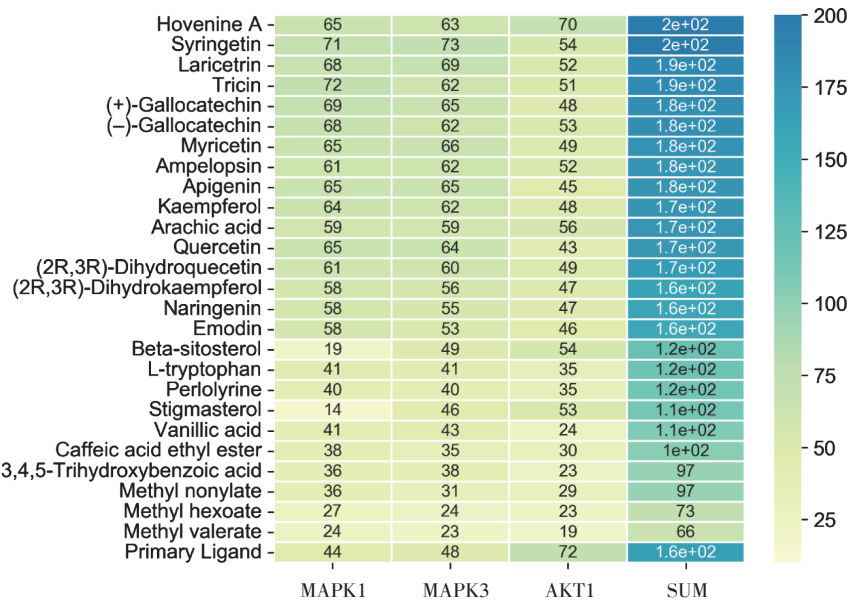


图 9 枳椇子主要化学成分与 MAPK1、MAPK3 和 AKT1 蛋白对接热力图
Figure 9 The heatmap of the docking between the main ingredients of Semen Hoveniae and MAPK1、MAPK3 and AKT1 proteins

2.10 分子对接模式分析 由分子对接结果可知，枳椇子中 13 个成分与 MAPK1、MAPK3 和 AKT1 蛋白具有较好的对接作用。以小麦黄素(Tricin)、丁香黄素(Syringetin)、枳椇碱 A(Hovenine A)分别与 MAPK1、MAPK3 和 AKT1 蛋白对接为例，分析其与受体之间可能存在的作用模式(图 10)。对于小麦黄素而言，其母核上的酚羟基和羰基能与 MAPK1 蛋白中 MET106 残基形成氢键，同时可提供氧负离子与 LYS52 和 LYS112 形成两个盐桥；丁香黄素可与 MAPK3 蛋白中 LYS131 和 LYS168 形成两个盐桥，同时与 LYS131 残基形成氢键作用；枳椇碱 A 可与 AKT1 蛋白中的 TYR272 残基形成氢键，同时可与 ASP272 形成离子键。总之，枳椇子中关键活性成分与以上 3 个蛋白受体之间主要通过范德华力、氢键、盐桥和疏水作用相结合。

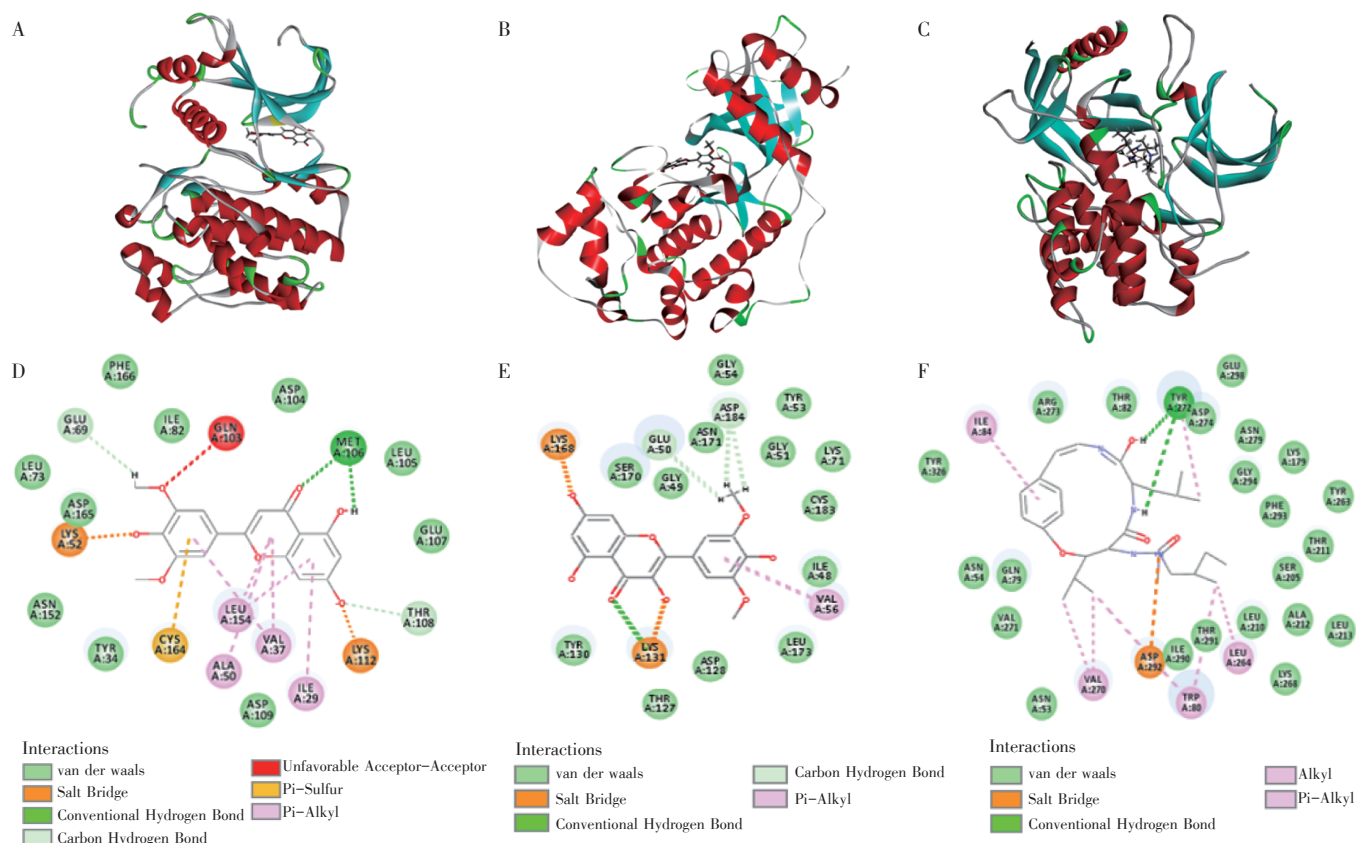
3 讨论

由于酒文化和酒精易成瘾的原因，酒精性肝病已受到全世界的广泛关注。而在酒精性肝病的临床治疗过程中需要避免再次加重肝脏负担及因药物间相互作用而引起的不良反应^[15]。这时，临床应用时间久而毒副作用小的天然药物体现出了巨大的优势与潜力。本研究针对药食同源中药枳椇子解酒保肝的传统功效^[16-21]，采用网络药理学及分子对接技术深入探讨其解酒保肝可能的分子机制，旨在为枳椇子的传统应用提供科学依据和支持，同时也为防治酒精性肝病药物的研发提供参考。

本研究通过相关条件筛选得到 246 个枳椇子中成分的作用靶点，其中有 228 个靶点与酒精性肝病的靶点重合，表明枳椇子确有可能具有防治酒精性肝损伤的作用，这与古代本草中所描述的枳椇子功效一致。通过 KEGG 富集分析进一步探讨了枳椇子治疗酒精性肝病可能的作用机制，结果表明癌症和炎症相关通路很有可能是枳椇子治疗酒精性肝病的关键通路。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)又称细胞外信号调节激酶(ERK)，是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白^[22]。MAPK1(ERK2)和 MAPK3(ERK1)是 MAPK 家族的一员，是与细胞增殖、转化、分化相关的 MAPK^[23]，可促使炎症因子 IL-13 表达，进而加剧炎症反应^[24]。AKT1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，可参与炎症、癌症、糖尿病及心血管疾病等的发生发展^[25]，并且可能在肝脏疾病和肝肿瘤中呈高表达^[26]。以上结果表明，MAPK1、MAPK3 和 AKT1 与酒精性肝病存在密切联系。同时，这 3 个靶点在 KEGG 分析结果的前 30 位通路中均涉及到 20 个以上的通路，且在 PPI 网络核心基因中排名均在前 5 位，故认为这 3 个靶点可能为枳椇子治疗酒精性肝病的关键靶点。

将枳椇子中关键成分与网络药理学筛选所得的关键靶点蛋白 MAPK1、MAPK3 和 AKT1 进行分子对接，其结果表明，枳椇碱 A、丁香黄素、落叶黄素、小麦黄素、(+)-没食子儿茶素、(-)-没食子儿茶素、杨梅素、二氢杨梅素、芹菜素、山柰素、花生



注: A. 小麦黄酮与 MAPK1 蛋白相互作用 3D 图; B. 丁香黄酮与 MAPK3 蛋白相互作用 3D 图; C. 枳椇碱 A 与 AKT1 蛋白相互作用 3D 图; D. 小麦黄酮与 MAPK1 蛋白相互作用 2D 图; E. 丁香黄酮与 MAPK3 蛋白相互作用 2D 图; F. 枳椇碱 A 与 AKT1 蛋白相互作用 2D 图

图 10 枳椇子治疗酒精性肝病的分子对接模式分析

Figure 10 Molecular docking mode analysis of Semen Hoveniae in the treatment of ALD

酸、槲皮素、2R, 3R-二氢槲皮素等 13 个成分与这 3 种蛋白对接的-cDockInteraction Energy SUM 值均大于原配体的 SUM 值, 表现出了良好的亲和作用。这与中药多成分协同作用的特点不谋而合, 同时也进一步证实了这 3 个蛋白很有可能是枳椇子发挥防治酒精性肝病作用的关键靶点。

本研究筛选获得的关键成分中, 多个成分在肝病防治方面的相关作用已经明确^[27-53]。其中, 小麦黄酮又名苜蓿素, 是天然黄酮类化合物, 其生物活性主要有抗炎、抗氧化应激、抗过敏、抗肿瘤等^[27]。研究^[28]表明, 小麦黄酮可抑制 HSC(星状肝细胞)增殖, 防治不可逆性肝硬化和肝癌肝纤维化的发生。

杨梅素又称杨梅树皮素, 是从杨梅树皮中提取的多羟基黄酮类化合物^[29], 具有保肝护肝、抗氧化、抗血栓、降血糖等药理作用。研究表明, 杨梅素能明显降低四氯化碳、异硫氰酸萘酯和 D 半乳糖胺致小鼠急性肝损伤, 减轻肝组织的变性和坏死^[30]; 同时也可保护高胆碱饮食引起的小鼠内皮功能障碍和小鼠肝损伤^[31]; 通过减少脂质积累, 氧化应激和炎症来防

止乙醇引起的损伤^[32]; 还可抑制小鼠肝星状细胞(HSC)的活化并改善 CCl₄ 诱导的肝纤维化^[33]。

二氢杨梅素是一种二氢黄酮醇类黄酮化合物, 既往研究证实二氢杨梅素具有抗氧化、解酒、保肝、调血脂、抗肿瘤及抗炎等多方面药理作用^[34], 对多种实验性肝病以及肝病发展进程中的多个环节都具有良好防治效应^[35]。研究表明, 二氢杨梅素能通过调节细胞内 Keap-1/Nrf2 氧化应激调控途径与 p62 蛋白/细胞自噬之间的交互作用, 减轻酒精性肝病病理过程中的脂肪变性和炎症反应^[38]; 还可通过抑制 3 种肝细胞内细胞色素 P450 (CYP) 亚型的表达, 来改善乙醇慢性暴露所致的肝损伤^[36]; 能有效阻止昆明种小鼠体内由酒精导致的肝脏还原型谷胱甘肽耗竭和丙二醛升高, 并降低三酰甘油含量, 减轻肝细胞脂肪变性程度, 具有较好的预防和治疗酒精性肝病功效^[35]。

芹菜素又名芹黄素或洋芹素, 是一种天然类黄酮化合物, 具有改善炎症、心血管疾病、神经退行性疾病、肿瘤和糖尿病等生物活性^[39]。研究^[40-41]表明, 芹菜素对酒精性肝损伤具有保护作用, 且其作用机

制可能是通过促进酒精毒性代谢物乙醇的降解、调节肝脏细胞色素 P450 酶 2E1(CYP2E1)介导的氧化应激或过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)介导的致脂基因表达。

山柰酚又名山柰素,属于黄酮类^[44],具有抗氧化、抗炎症、抗癌等生物活性^[42]。实验研究^[43]表明山柰素可抑制 CYP2E1 的表达及活性,还可抑制线粒体中 CYP2E1 的蛋白表达,而对不同部位 CYP2E1 的表达及活性的抑制作用是其发挥保肝作用的重要机制之一。也有实验研究^[45]表明山柰酚可能通过增加小鼠肠黏膜上丁酸受体、转运蛋白和紧密连接蛋白(TJ 蛋白)而有效地防治小鼠酒精性肝病。

槲皮素是一种多羟基黄酮类化合物,具有抗癌、抗菌、抗炎、抗病毒、降糖降压、心血管保护及免疫调节等作用^[48]。研究表明,槲皮素可通过其降血脂作用和抗氧化作用保护大鼠免受慢性乙醇毒性的侵害^[51],并缓解慢性酒精暴露所致肝脏自噬抑制^[47],对慢性乙醇所诱导的肝毒性具有保护作用^[52],同时能有效拮抗酒精所致的线粒体膜电位下降和细胞凋亡^[49],对酒精性肝线粒体损伤发挥良好的拮抗效应^[50]。

二氢槲皮素又称为花旗松素,是一种二氢黄酮类化合物^[53]。研究^[54]发现,二氢槲皮素通过 AMPK 的活性抑制酒精引起的肝脂肪蓄积,可以防治酒精性脂肪肝,并改善酒精性脂肪肝伴有的炎症。以上研究报道与本研究预测的结果一致,一定程度佐证了本研究结果的可靠性。

综上所述,本研究运用网络药理学方法,结合分子对接技术系统探讨了枳椇子防治酒精性肝病的可能物质基础和分子机制。研究结果表明枳椇子可能对酒精性肝病有防治作用,并预测出其关键靶点可能是 MAPK1, MAPK3 和 AKT1,关键通路可能是与癌症和炎症相关的通路。其中,枳椇子发挥防治酒精性肝病作用的关键成分可能是枳椇碱 A、二氢杨梅素、落叶黄素、小麦黄素、没食子儿茶素、花生酸和丁香黄素等。该研究结果支持了历代本草关于枳椇子保肝解酒作用的记载,对临床应用枳椇子治疗酒精性肝病提供了科学依据,为枳椇子的深入开发利用提供了参考。

参考文献:

- [1] ORMAN E S, ODENA G, BATALLER R. Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28 (Suppl 1): 77-84.
- [2] 孙晓梅, 阎姝, 田书霞. 中药治疗肝损伤的研究进展[J]. *中药材*, 2016, 39(11): 2661-2664.
- [3] 魏玲, 张小莉, 何正, 等. 酒精性肝病治疗研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2015, 9(13): 2593-2597.
- [4] REHM J, SAMOKHVALOV A V, SHIELD K D. Global burden of alcoholic liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 160-168.
- [5] 管文婕, 吕雄文, 杨万枝, 等. 酒精性肝病治疗的研究进展[J]. *安徽医药*, 2011, 15(8): 925-927.
- [6] 罗晨, 杨嘉恩, 梁惠卿. 酒精性肝病中西医结合研究进展[J]. *医学信息*, 2018, 31(15): 16-19.
- [7] 陈晓兰. 自拟枳椇子汤预防性解酒保肝作用的研究[D]. 广东: 汕头大学, 2017.
- [8] 苏敬. 新修本草: 14卷[M]. 上海: 上海古籍出版社, 1985: 143.
- [9] 孙思邈. 千金翼方: 3卷[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997: 68.
- [10] 兰茂. 滇南本草: 1卷[M]. 云南: 云南人民出版社, 1959: 258.
- [11] 王垠芸, 罗绍忠, 陶汝俊, 等. 枳椇子及其复方解酒保肝作用研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2018, 14(3): 77-79.
- [12] XU X, ZHANG W, 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.
- [13] TAO W, 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.
- [14] SAKAMOTO M, HIROHASHI S, SHIMOSATO Y. Early stages of multistep hepatocarcinogenesis: adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 1991, 22(2): 172-178.
- [15] 孙韬华, 刘振胜, 辛永宁. 酒精性肝病治疗研究进展[J]. *实用肝脏病杂志*, 2019, 22(2): 156-159.
- [16] 任发政, 罗云波, 蒋菁莉. 枳椇子影响乙醇代谢机理研究[J]. *食品工业科技*, 2002, 23(12): 36-37.
- [17] 何会, 陈爱丽, 陈伊锴. 葛根、枳椇子对于解酒功效的协同作用功能评价[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6(37): 10-11.
- [18] 邹礼根, 柳爱春, 刘超. 拐枣水提取液解酒作用实验研究[J]. *杭州农业与科技*, 2009(1): 30-32.
- [19] 郑刚, 姜俊. 枳椇属植物及其药用的研究进展[J]. *实用医药杂志*, 2004, 21(8): 755-756.
- [20] 李志满, 邵紫君, 李珊珊, 等. 人参枳椇子提取物对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(14): 302-306.
- [21] 王文香, 田菊霞, 陈春晓, 等. 枳椇子对大鼠酒精性肝损伤的影响[J]. 2012, 47(5): 370-371.
- [22] 刘婷婷, 张淑萍, 覃筱燕, 等. MAPK信号转导通路与神经损伤研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(2): 248-254.
- [23] 刘瑞, 高维娟. 丝裂原活化蛋白激酶信号通路及其在细胞凋亡中的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(18): 4089-4092.
- [24] 尹银华, 杨艳芳, 吴和珍, 等. 基于网络药理学的虎杖抗炎活性成分及作用机制研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(6): 659-664.
- [25] 苗艳菊, 杨敏, 郑娇, 等. Akt1在高血压心肌纤维化中的作用及其机制[J]. *中华高血压杂志*, 2013, 21(3): 265-271.
- [26] YUE Z, ZHENGKAI W, WEIJIAN L, et al. Melatonin protects

- against arsenic trioxide-induced liver injury by the upregulation of Nrf2 expression through the activation of PI3K/AKT pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 3773-3780.
- [27] 刘利艳, 王莹, 刘波, 等. 苜蓿素生物活性研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(6): 764-768.
- [28] SEKI N, TOH U, KAWAGUCHI K, et al. Tricin inhibits proliferation of human hepatic stellate cells in vitro by blocking tyrosine phosphorylation of PDGF receptor and its signaling pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(7): 2346-2355.
- [29] 张莉静, 刘志国, 孟大利, 等. 杨梅树皮提取物及杨梅素抗肿瘤活性[J]. *沈阳药科大学学报*, 2009, 26(4): 307-311.
- [30] 钟正贤, 陈学芬, 周桂芬, 等. 广西藤茶中杨梅树皮素的保肝作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2001, 27(5): 11-13.
- [31] GUO J, MENG Y, ZHAO Y, et al. Myricetin derived from *Hovenia dulcis* Thunb. ameliorates vascular endothelial dysfunction and liver injury in high choline-fed mice[J]. *Food Funct*, 2015, 6(5): 1620-1634.
- [32] GUO C, XUE G, PAN B, et al. Myricetin ameliorates ethanol-induced lipid accumulation in liver cells by reducing fatty acid biosynthesis[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(14): 1801393.
- [33] GENG Y, SUN Q, LI W, et al. The common dietary flavonoid myricetin attenuates liver fibrosis in carbon tetrachloride treated mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(4): 1600392.
- [34] 陈亚丽, 尹跃霏, 李赞, 等. 二氢杨梅素药理作用研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(2): 173-178.
- [35] 李杜, 王晓玲, 杰叶婷, 等. 二氢杨梅素的肝病药理机制研究进展[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2019, 29(2): 190-192.
- [36] LU L, SEN S, HONGBING R, et al. In vitro inhibitory effects of dihydromyricetin on human liver cytochrome P450 enzymes[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1868-1874.
- [37] SILVA J, YU X, MORADIAN R, et al. Dihydromyricetin protects the liver via changes in lipid metabolism and enhanced ethanol metabolism[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2020, 44(5): 1046-1060.
- [38] QIU P, DONG Y, LI B, et al. Dihydromyricetin modulates p62 and autophagy crosstalk with the Keap-1/Nrf2 pathway to alleviate ethanol-induced hepatic injury[J]. *Toxicol Lett*, 2017, 274: 31-41.
- [39] 徐魏, 罗非君. 芹菜素生物学活性及其机理研究进展[J]. *生命科学*, 2019, 31(10): 1077-1087.
- [40] 王峰. 芹菜素对酒精性肝损伤的保护作用及其机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
- [41] WANG F, LIU J C, ZHOU R J, et al. Apigenin protects against alcohol-induced liver injury in mice by regulating hepatic CYP2E1-mediated oxidative stress and PPAR α -mediated lipogenic gene expression[J]. *Chem-Biol Interact*, 2017, 275: 171-177.
- [42] 张燕玲, 薛小平. 山萘酚的作用机理研究[J]. *化学与生物工程*, 2011, 28(12): 1-3.
- [43] 王萌. 山萘酚抗酒精性肝损伤及其机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [44] 童方念, 罗超, 罗丹, 等. 山萘酚对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2014, 35(6): 816-819.
- [45] CHEN J, XUAN Y H, LUO M X, et al. Kaempferol alleviates acute alcoholic liver injury in mice by regulating intestinal tight junction proteins and butyrate receptors and transporters[J]. *Toxicology*, 2019, 429: 152338.
- [46] 刘姝. 急性酒精性肝损伤中槲皮素抗氧化应激及抗炎作用交互影响的机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [47] 李艳艳, 于微, 冯里茹, 等. 槲皮素对慢性酒精暴露小鼠肝脏自噬的调控[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(1): 82-86.
- [48] 孙涓, 余世春. 槲皮素的研究进展[J]. *现代中药研究与实践*, 2011, 25(3): 85-88.
- [49] 揭琴丰. 槲皮素/HO-1/胆红素系统对大鼠原代肝细胞酒精性损伤的保护作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [50] 汪静. 肝线粒体酒精性损伤中frataxin的介导效应与槲皮素保护机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [51] TANG Y, GAO C, XING M, et al. Quercetin prevents ethanol-induced dyslipidemia and mitochondrial oxidative damage[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5): 1194-1200.
- [52] VIDHYA A, INDIRA M. Protective effect of quercetin in the regression of ethanol-induced hepatotoxicity [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2009, 71(5): 527-32.
- [53] 陈雪, 费洪新, 周忠光, 等. 二氢槲皮素药理作用的研究进展[J]. *中医药学报*, 2017, 45(1): 90-92.
- [54] 郑今花. 二氢槲皮素基于NLRP3炎症小体通路调控酒精性脂肪肝与炎症的机制研究[D]. 吉林: 延边大学, 2017.

(编辑: 修春)