

# 基于网络药理学和分子对接技术及动物实验探究巴亚格七味散对酒精性肝病的作用机制

赵宏, 孔令洲, 张宇, 高琪, 林仁杰, 汤威威, 沈宇, 王宇亮(佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

**摘要:** **目的** 采用网络药理学和分子对接方法探究巴亚格七味散治疗酒精性肝病可能的作用机制, 并通过实验进行初步验证。**方法** 利用中药系统药理学数据库分析平台(TCMSP)、Swiss ADME、Swiss Target Prediction 和文献获得巴亚格七味散有效成分及其作用靶点; 通过 GeneCards、DisGeNet 和 OMIM 数据库获取酒精性肝病的疾病靶点; 以 STRING 数据库构建靶点相互作用网络; 通过 DAVID 6.8 数据库对关键靶点进行基因本体(GO)富集分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。采用 Cytoscape 3.7.1 软件构建巴亚格七味散治疗酒精性肝病的“药物-有效成分-潜在靶点”网络和“成分-靶点-通路”网络, 并筛选关键靶点进行分子对接。基于网络药理学和分子对接结果, 通过动物实验初步验证预测结果。**结果** 去重后共获得 81 个化学成分及 906 个潜在作用靶点。GO 富集分析共得到 GO 条目 510 条, 其中生物过程 365 条, 细胞组成 47 条, 分子功能 98 条。KEGG 富集共得到 106 条信号通路, 主要涉及神经活性配体-受体相互作用、趋化因子信号通路、Fc RI 信号通路等通路。分子对接结果显示, MAP2K1、MAPK1 和 PIK3CA 等靶点可能为巴亚格七味散治疗酒精性肝病的关键靶点。体内动物实验结果表明, 巴亚格七味散可以有效减少酒精性肝病小鼠干细胞坏死和脂滴堆积的程度, 从而缓解肝组织的病变, 同时可以降低 MAPK1 和 PIK3R1 的表达, 与网络模拟结果基本一致。**结论** 初步揭示巴亚格七味散可能是通过影响 MAPK1 和 PIK3R1 的表达, 减轻炎性细胞浸润和肝细胞坏死程度, 从而起到治疗酒精性肝病的作用, 可为深入阐明巴亚格七味散治疗酒精性肝病分子机制提供理论依据。

**关键词:** 网络药理学; 分子对接; 酒精性肝病; 巴亚格七味散; 炎性细胞浸润; 肝细胞坏死; 作用机制

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)10-1480-10

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.10.010

## Exploring the Mechanism of *Bayage Qiwei* Powder in Treatment of Alcoholic Liver Disease Based on Network Pharmacology, Molecular Docking and Animal Experiment

ZHAO Hong, KONG Lingzhou, ZHANG Yu, GAO Qi, LIN Renjie, TANG Weiwei, SHEN Yu, WANG Yuliang(College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007 Heilongjiang, China)

**Abstract:** **Objective** Network pharmacology and molecular docking were adopted to explore the possible mechanism of *Bayage Qiwei* powder for alcoholic liver disease. To preliminarily verify the predicted results by experiments *in vivo*. **Methods** The active components of *Bayage Qiwei* powder and their potential targets were obtained from the database analysis platform of traditional Chinese medicine system pharmacology, Swiss ADME, Swiss Target Prediction and literature. GeneCards, DisGeNet and OMIM database were used to obtain disease targets of alcoholic liver disease. STRING database was used to build the interaction network of targets. Gene body (GO) enrichment analysis and Kyoto Gene and Genome Encyclopedia(KEGG) pathway enrichment analysis of key targets were conducted through DAVID 6.8 database. Using Cytoscape 3.7.1 software, the “drug-active components-target” and “constituent-target-pathway” networks of *Bayage Qiwei* powder were constructed, and the key targets were selected for molecular docking. Based on the results of network pharmacology and molecular docking, the prediction

收稿日期: 2021-03-22

作者简介: 赵宏, 女, 副教授, 博士, 研究方向: 中药活性成分的结构和活性研究。Email: 0316zh@163.com。

基金项目: 中央支持地方高校改革发展基金项目(2019zyzcd-f-01); 黑龙江省北药与功能食品特色学科建设项目(2018-TSXX-02); 佳木斯大学优秀学科团队项目(JDXKTD-2019005); 黑龙江省博士后专项经费资助项目(LBH-Q20185)。

results were verified by animal experiments. **Results** A total of 81 chemical constituents and 906 potential targets were obtained after deweighting. GO enrichment analysis yielded 510 GO entries ( $P < 0.05$ ), 365 of which were biological processes, 47 were cellular components, and 98 were molecular functions. KEGG enrichment resulted in 106 signaling pathways ( $P < 0.05$ ), mainly involved in neuroactive ligand-receptor interaction, Fc epsilon RI signaling pathway and chemokine signaling pathway. Docking results illustrated that MAP2K1, MAPK1 and PIK3CA may be the key target of *Bayage Qiwei* powder in the treatment of alcoholic liver disease. The results of animal experiments showed that *Bayage Qiwei* powder could effectively reduce the degree of stem cell necrosis and lipid droplet accumulation in mice with alcoholic liver disease, and reduce the expression of MAPK1 and PIK3R1, which was consistent with the simulation results. **Conclusion** This study preliminarily predicted that *Bayage Qiwei* powder may play a role in the treatment of alcoholic liver disease by affecting the expression of MAPK1 and PIK3R1, alleviating inflammatory cell infiltration and hepatocyte necrosis. It provided a theoretical basis for further elucidating the molecular mechanism of *Bayage Qiwei* powder in the treatment of alcoholic liver disease.

**Keywords:** Network pharmacology; molecular docking; alcoholic liver disease; *Bayage Qiwei* powder; inflammatory cell infiltration; hepatocyte necrosis; mechanism

酒精性肝病 (Alcoholic Liver Disease, ALD) 是指因摄入过量酒精而引起的肝脏损伤的系列病变<sup>[1]</sup>。截止 2003 年, 中国已成为全球第 2 大饮酒国, 酒精性肝病患病率从 2007 年的 2.27% 上升到 2015 年的 8.74%, 由酗酒导致的肝癌致病率也逐年上升<sup>[2]</sup>。目前, 常用的保肝药物主要有甘草酸制剂、水飞蓟素等, 中度酒精性肝病可使用糖皮质激素, 重度酒精性肝病则需进行肝移植<sup>[3-4]</sup>。治疗酒精性肝病需要长期服药, 而西药的长期使用具有较大的副作用。因此, 寻找高效低毒, 并可长期应用于临床的新型抗酒精性肝病药物, 是目前酒精性肝病药物研发的首要任务。

中医药在治疗慢性疑难病中, 具有疗效好、毒性低、不易复发等优势。近年从传统中药复方入手, 进行老药新用, 并深入阐明机制, 已成为中医药现代化应用和新药研发的重要手段之一<sup>[5-6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>发现活血化瘀类药物是中医临床治疗酒精性肝病的主要方式之一。巴亚格七味散 (BQP) 出自《内蒙古蒙药制剂规范》<sup>[8]</sup>, 全方由川芎、沙棘、甘草、北沙参、白葡萄干、竹黄、麦冬 7 味药组成, 具有活血化瘀等功效。

网络药理学研究策略符合中医对疾病本质的认识, 能够有效研究多成分协同作用体系, 通过探索药物或复方中整体的作用机理, 揭示中药及其复方的作用机制<sup>[9-10]</sup>。分子对接技术<sup>[11]</sup>是根据已知结构的受体或配体, 采取互补原则, 进行分子间相互作用的识别, 并预测分子和蛋白的最佳结合模式, 可为

先导化合物的搜寻和进一步开发提供理论依据<sup>[12]</sup>。本研究采用网络药理学和分子对接技术系统地筛选, 探究巴亚格七味散治疗酒精性肝病的有效成分和潜在作用靶点, 并通过体内动物实验加以验证, 研究结果可为后续巴亚格七味散的分子作用机制研究和临床新用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF 级雄性 KM 小鼠 60 只, 由佳木斯大学动物实验中心提供, 6~8 周龄, 体质量 (20±2)g, 动物质量合格证号: 201900030424, 动物许可证号: SCXK(吉)-2018-007, 饲养于 SPF 级动物室。饲养条件: 室温 20~25℃, 通风性良好。所有动物实验流程均严格遵循中国实验动物管理协会的伦理准则给予人道主义关怀, 由佳木斯大学伦理委员会批准, 批号: JMSU-232。

**1.2 药物与试剂** 巴亚格七味散由川芎、沙棘、甘草、北沙参、白葡萄干、竹黄、麦冬组成, 中药饮片均购自佳木斯市民生药房, 并经佳木斯大学药学院张宇教授鉴定; 联苯双酯滴丸, 万邦德制药集团股份有限公司, 批号: A02j171203; 天冬氨酸转氨酶试剂盒 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT), 南京建成生物工程研究所, 批号分别为: C010-2-1, C009-2-1; MAPK1、PIK3R1 Elisa 试剂盒, 美国 Abnova 公司, 批号分别为: H00005594-P01、H00005295-P01。

**1.3 主要仪器** FA2004 型电子天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; H1650R 医用离心机, 长沙高新

技术产业开发区离心机仪器有限公司; JY92-IIIn 超声细胞粉碎机, 宁波新芝生物; KH-III 全自动研磨仪, 武汉赛维尔生物公司; Epoch 酶标检测仪, 美国 BioTeK 公司; XSP-13C-LP 显微镜, 上海精密仪器仪表有限公司; MDF-382 医用低温箱, 日本 Panasonic 公司。

#### 1.4 巴亚格七味散治疗酒精性肝病的网络药理学研究

**1.4.1 有效成分与作用靶点的收集与筛选** 在 TCMSp (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 数据库及相关文献<sup>[13-17]</sup>中, 以巴亚格七味散中“川芎”“沙棘”“甘草”“北沙参”“白葡萄干”“竹黄”“麦冬”为关键词, 检索获取相关中药化学成分信息, 以类药性(DL)≥0.18、口服生物利用度(OB)≥30%为条件对化学成分进行筛选, 获取有效成分。用 SwissADME<sup>[18]</sup> (<http://www.swissadme.ch/>) 以胃肠道吸收度(GI absorption)为“High”、是否满足类药性五原则(Lipinski)再次进行筛选, 筛选后得到巴亚格七味散主要有效成分, 并为其编号, 以便后续研究。使用 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库获取有效成分的作用靶点。

**1.4.2 疾病靶点及巴亚格七味散治疗酒精性肝病潜在靶点的获取** 以“Alcoholic liver disease”为关键词, 通过 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNet (<https://www.disgenet.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>) 数据库获取酒精性肝病的相关疾病靶点, 将巴亚格七味散有效成分作用靶点及疾病相关靶点进行映射, 获得巴亚格七味散治疗酒精性肝病的潜在靶点。

**1.4.3 “药物-有效成分-潜在靶点”的构建** 将巴亚格七味散中各组分的有效成分与巴亚格七味散治疗酒精性肝病疾病的潜在靶点, 导入至 Cytoscape 3.7.1 (<http://www.cytoscape.org/>), 构建“药物-有效成分-潜在靶点”网络。网络中的节点(Node)表示靶点或化合物, 而边(Edge)则表示药物、有效成分与酒精性肝病之间相互作用。

**1.4.4 靶蛋白相互作用网络(PPI)构建** 将巴亚格七味散治疗酒精性肝病的潜在靶点导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库, 将物种设置为“Homo sapiens(人类)”, 最低相互作用阈值调为“highest confidence(高置信度)”, 其值为 0.900, 隐藏游离点, 其余参数作默认设置。获得靶点的相互作用关系, 导出为 TSV 文件, 将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.7.1 制作出靶点相互作用网络, 并使用其中的

“Network analyzer”插件, 得到靶蛋白相互作用网络拓扑参数和网络图。

**1.4.5 基因本体生物过程(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析** 对 PPI 网络中大于平均度值的关键靶点导入 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析时选择生物学过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)、分子功能(Molecular Function, MF)模块进行功能注释。GO 和 KEGG 富集结果都以  $P < 0.05$  为筛选条件。

**1.4.6 “成分-靶点-通路”网络构建** 选取 KEGG 前 12 条通路, 通过 Cytoscape 3.7.1 构建巴亚格七味散治疗酒精性肝病的“成分-靶点-通路”网络图。

**1.5 分子对接** 分子对接是将药物与靶蛋白通过化学环境和能量等相互识别的过程<sup>[19]</sup>。基于“成分-靶点-通路”网络, 筛选度值前 6 位的靶蛋白, 并在 RCSB (<http://www.rcsb.org/>) 中获取其蛋白结构, 另存为 pdb 格式文件; 获取“2.1.3”项下超过平均度值的 26 个有效成分的三维结构, 另存为 mol2 文件; 一起导入分子对接服务器中进行分析, 预测并评价药物有效成分与靶蛋白之间的结合活性。

#### 1.6 巴亚格七味散对酒精性肝病小鼠的实验研究

**1.6.1 模型<sup>[20]</sup>复制、分组及给药** 选取健康 KM 雄性小鼠 60 只, 随机分为对照组、模型组、阳性药联苯双酯组及巴亚格七味散(BQP)低、中、高(0.2、0.4、0.8 g·kg<sup>-1</sup>)剂量组, 每组 10 只, 适应性喂养 7 d。除对照组外, 各组灌胃给予 56 度红星二锅头 14 mL·kg<sup>-1</sup>, 6 h 后, 联苯双酯组灌胃给予联苯双酯 0.15 g·kg<sup>-1</sup>, 巴亚格七味散低、中、高组根据前期预实验结果分别灌胃给予 0.2、0.4、0.8 g·kg<sup>-1</sup> 巴亚格七味散溶液, 对照组及模型组给予等体积的蒸馏水。每日 1 次, 连续 30 d。当 AST、ALT > 100 IU·L<sup>-1</sup>, 表明酒精性肝病模型复制成功。

**1.6.2 样品处理及指标检测** 给药 30 d 后, 禁食不禁水一夜, 次日水合氯醛麻醉、摘眼球取血。取完血后立即摘取肝脏, 用冷的生理盐水清洗肝脏表面后, 将肝脏分为两部分, 一部分用 10% 多聚甲醛溶液浸泡用于病理检测, 另一部分于 -80 °C 保存, 用于后期实验。

**1.6.3 组织病理学观察** 取经 10% 多聚甲醛溶液固定的各组小鼠肝脏样本, 水冲洗, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋、切片, 进行 HE 染色, 光学显微镜下观察肝组织病理变化。

**1.6.4 血清生化指标检测** 小鼠水合氯醛麻醉，摘眼球取血，静置 2 h，以 3 000 r·min<sup>-1</sup> (离心半径为 8 cm) 离心 10 min，取上层血清，-20 ℃ 保存。按照试剂盒说明，测定血清中 AST、ALT 的含量。

**1.6.5 Elisa 法测定肝组织中 MAPK1 和 PIK3R1 水平** 取出肝脏，生理盐水洗 2~3 次，除去血液，剪碎，生理盐水反复洗涤至无血色，再加生理盐水少许，用组织捣碎机或匀浆器制成匀浆。将匀浆装入离心管内，用 2~3 倍量生理盐水和丙酮反复洗涤各 3 次，至上清无血色为止。每次完毕先用 2 000 r·min<sup>-1</sup> (离心半径为 8 cm) 离心沉淀 15 min 后，得肝组织匀浆，-20 ℃ 冰箱保存。按照试剂盒方法测定肝组织中 MAPK1 和 PIK3R1 的含量。

**1.7 统计学处理方法** 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。组间比较采用单因素方差分析方法，两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 巴亚格七味散治疗酒精性肝病的网络药理学研究结果

**2.1.1 有效成分与作用靶点的收集与筛选** 通过文献检索和 TCMSP 中以 OB≥30%，DL≥0.18 进行筛选，得巴亚格七味散有效成分 142 个，其中川芎 7 个、沙棘 33 个、北沙参 8 个、甘草 92 个、竹黄 1 个、麦冬 1 个；通过 SwissADME 二次筛选后，得到巴亚格七味散有效成分 81 个，其中川芎 4 个、沙棘 5 个、北沙参 5 个、甘草 63 个、重复性成分 4 个。槲皮素(A)为药物北沙参、甘草、沙棘的重复成分，亚油酸乙酯(B)为川芎、沙棘的重复成分，异鼠李素(C1)、山柰酚(C2)为甘草、沙棘的重复成分。巴亚格七味散中部分化学成分的基本信息见表 1(由于甘草成分众多，表 1 只列举部分成分)。

通过 SwissTargetPrediction 数据库进行有效成分作用靶点预测，得到作用靶点结果 1 816 个，其中川

表 1 巴亚格七味散部分有效成分基本信息

Table 1 Basic information of some active compounds of Bayage Qiwei powder

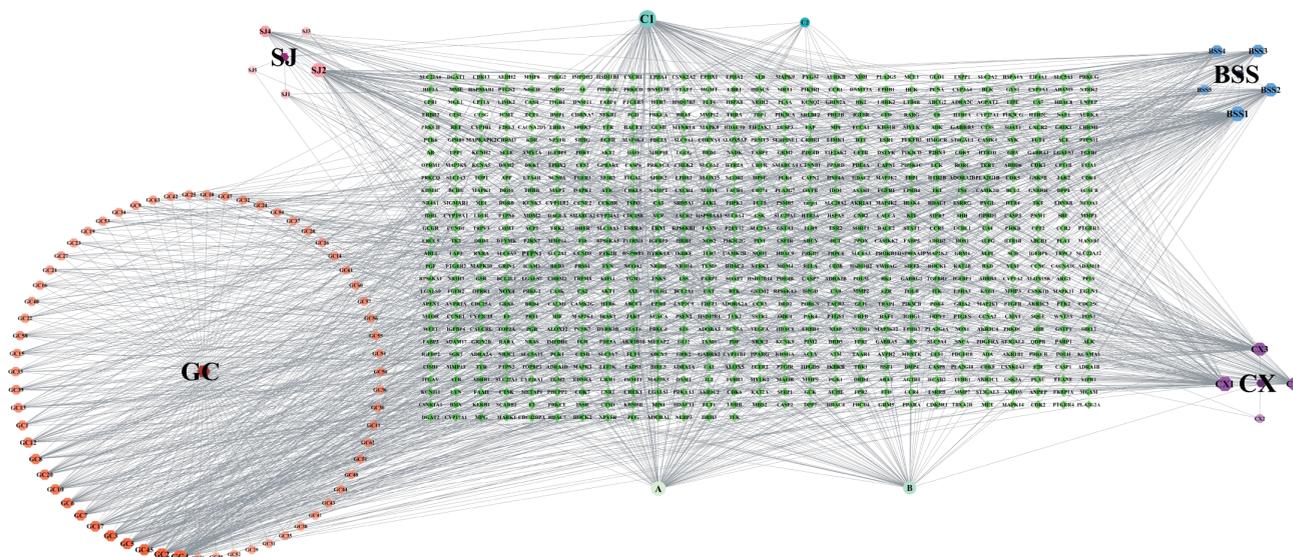
序号	来源	编号	成分代码	有效成分	分子量	口服生物利用度/%	类药性
1	川芎	CX1	MOL002135	Myricanone(杨梅酮)	356.45	40.60	0.51
2	川芎	CX2	MOL002140	Perlolyrine(川芎啉)	264.30	65.95	0.27
3	川芎	CX3	MOL002151	Senkyunone(洋川芎酮)	326.52	47.66	0.24
4	川芎	CX4	MOL002157	Wallichilide(川芎萜呋内酯)	412.57	42.31	0.71
5	沙棘	SJ1	MOL001004	Pelargonidin(氯化花葵素)	271.26	37.99	0.21
6	沙棘	SJ2	MOL002268	Rhein(大黄酸)	284.23	47.07	0.28
7	沙棘	SJ3	MOL000492	(+)-catechin(儿茶素)	290.29	54.83	0.24
8	沙棘	SJ4	MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one(橙皮素)	302.30	47.74	0.27
9	沙棘	SJ5	MOL000073	ent-Epicatechin[(+)-表儿茶素]	290.29	48.96	0.24
10	北沙参	BSS1	MOL001939	Alloisoperatorin(5-羟基-8-(3'-甲基-2'-丁烯基)呋喃香豆素)	270.30	34.80	0.22
11	北沙参	BSS2	MOL001941	Ammidin(欧前胡素)	270.30	34.55	0.22
12	北沙参	BSS3	MOL001942	Isoimperatorin(异欧前胡素)	270.30	45.46	0.23
13	北沙参	BSS4	MOL001951	Bergaptin(佛手柑素)	338.43	41.73	0.42
14	北沙参	BSS5	MOL001956	Cnidilin(8-甲氧基异欧前胡内酯)	300.33	32.69	0.28
15	甘草	GC1	MOL001792	DFV(甘草素)	256.27	32.76	0.18
16	甘草	GC2	MOL002311	Glycyrol(甘草酚)	366.39	90.78	0.67
17	甘草	GC3	MOL000239	Jaranol(华良姜素)	314.31	50.83	0.29
18	甘草	GC4	MOL002565	Medicarpin(美迪紫檀素)	270.30	49.22	0.34
19	甘草	GC5	MOL003656	Lupiwighteone(黄羽扇豆魏特酮)	338.38	51.64	0.37
20	甘草	GC6	MOL003896	7-Methoxy-2-methyl isoflavone(7-甲氧基-2-甲基异黄酮)	266.31	42.56	0.20
21	甘草	GC7	MOL000392	Formononetin(刺芒柄花素)	268.28	69.67	0.21
22	甘草	GC8	MOL000417	Calycosin(毛蕊异黄酮)	284.28	47.75	0.24
23	甘草	GC9	MOL004328	Naringenin(柚皮素)	272.27	59.29	0.21
24	重复成分	A	MOL000098	Quercetin(槲皮素)	302.25	46.43	0.28
25	重复成分	B	MOL001494	Mandenol(亚油酸乙酯)	308.56	42.00	0.19
26	重复成分	C1	MOL000354	Isorhamnetin(异鼠李素)	316.28	49.60	0.31
27	重复成分	C2	MOL000422	Kaempferol(山柰酚)	286.25	41.88	0.24

芎 287 个, 沙棘 298 个, 北沙参 367 个, 甘草 854 个, 合并所有成分作用靶点、去重, 得到作用靶点 906 个。

**2.1.2 疾病靶点及巴亚格七味散治疗酒精性肝病潜在靶点的获取** 通过疾病数据库得疾病靶点 8 325 个, 其中 GeneCards 有 7 685 个、DisGeNet 有 84 个、OMIM 有 556 个, 去重后为 8 017 个。与药物作用靶点映射后得到川芎映射靶点 287 个、沙棘 298 个、北沙参 367 个、甘草 854 个, 其中重复成分 A 有 86 个, 重复成分 B 有 62 个, 重复成分 C1 有 60 个, 重复成分 C2 有 9 个。

**2.1.3 巴亚格七味散“药物-有效成分-潜在靶点”构建** 将获得的巴亚格七味散有效成分、巴亚格七

味散治疗酒精性肝病潜在靶点导入 Cytoscape 3.7.1 中, 构建巴亚格七味散的“药物-有效成分-潜在靶点”网络图, 见图 1。由图可知, 此网络共包括 827 个节点, 1 607 个边, 药物有效成分平均度值为 19.84。高于平均度值的有效成分有 26 个, 度值前 6 位分别为异鼠李素(C1), 槲皮素(A), 5-羟基-8-(3'-甲基-2'-丁烯基)呋喃香豆素(BSS1), 杨梅酮(CX1), 大黄素(SJ2), 苜蓿素(GC4)。图中节点度值越大则节点越大、颜色越深。图中巴亚格七味散中多个靶点可对应相同的有效成分, 一个靶点也可与不同的有效成分相对应, 可见巴亚格七味散治疗酒精性肝病具有多成分、多靶点的特点。



注: CX 为药物川芎; BSS 为药物北沙参; C 为药物甘草; SJ 为药物沙棘。A 为药物北沙参、甘草、沙棘重复成分槲皮素; B 为川芎、沙棘重复成分亚油酸乙酯; C1、C2 为甘草、沙棘重复成分异鼠李素、山奈酚。绿色圆形为潜在靶点

图 1 巴亚格七味散治疗酒精性肝病的“药物-有效成分-潜在靶点”网络

Figure 1 The “drug-active components-potential targets” network of *Bayage Qiwei* powder in the treatment of alcoholic liver disease

**2.1.4 PPI 网络分析** 将巴亚格七味散治疗酒精性肝病的潜在靶点导入 STRING, 结果导出为 TSV 文件。将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.7.1 中, 删除度值小于 30 的节点, 得 PPI 网络图, 见图 2。由图 2 可见, 此网络涵括 141 个节点, 2 403 个边, 巴亚格七味散治疗酒精性肝病的 PPI 网络图中度值靠前的靶点有 PIK3CA、PIK3R1、MAPK1 等。

**2.1.5 GO 生物过程和 KEGG 代谢通路富集分析** 通过 NAVID 6.8 数据库, 对 PPI 网络中大于平均度值的 124 个关键靶点进行富集分析, 获取  $P < 0.05$  的 GO 富集结果 510 条; 按照  $P$  值从小到大排序, 共获得生物学过程(BP)结果 365 条, 细胞组成(CC)结果 47 条, 分子功能(MF)结果 98 条, GO 富集分析见

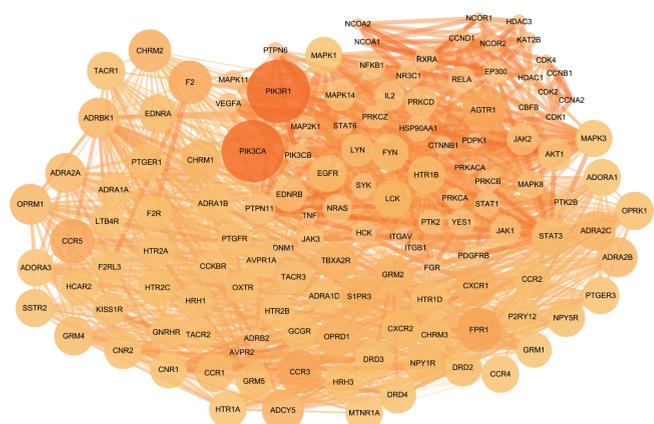


图 2 巴亚格七味散治疗酒精性肝病的 PPI 网络图

Figure 2 PPI network of *Bayage Qiwei* powder in the treatment of alcoholic liver disease

图 3。GO 富集分别在生物学过程有胞质钙离子浓度的正向调节(positive regulation of cytosolic calcium ion concentration)、磷脂酶 C-激活 G 蛋白偶联受体信号通路(phospholipase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway)、G 蛋白偶联受体信号通路(G-protein coupled receptor signaling pathway)等;在细胞组成有质膜(integral component of plasma membrane)、质膜的组成部分(plasma membrane)、质

膜的组成部分(integral component of membrane)等;在分子功能有非膜跨蛋白酪氨酸激酶活性(non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity)、蛋白质酪氨酸激酶活性(protein tyrosine kinase activity)、胰岛素受体底物结合(insulin receptor substrate binding)等。以上结果表明巴亚格七味散治疗酒精性肝病呈现多靶点、多途径的作用特点。

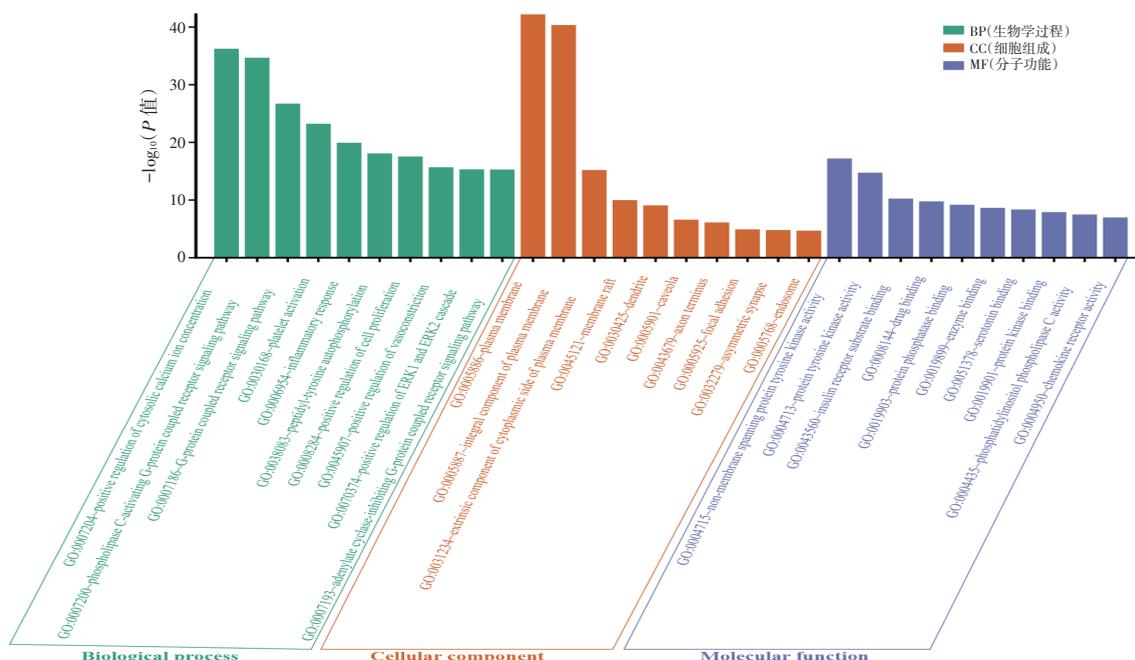


图 3 巴亚格七味散治疗酒精性肝病的 GO 富集分析

Figure 3 GO enrichment analysis of Bayage Qiwei powder in the treatment of alcoholic liver disease

在 KEGG 代谢通路富集中，以  $P < 0.05$  为条件，共得到 106 条相关代谢通路，并按照  $P$  值从小到大排序，得到 KEGG 富集通路图，见图 4。图 4 中显示，巴亚格七味散治疗酒精性肝病的主要代谢通路有神经活性配体-受体相互作用(Neuroactive ligand-receptor interaction)、钙信号通路(Calcium signaling pathway)、趋化因子信号通路(Chemokine signaling pathway)、Fc RI 信号通路(Fc epsilon RI signaling pathway)等。

**2.1.6 “成分-靶点-通路”网络分析** 通过 Cytoscape 3.7.1 构建“成分-靶点-通路”网络图，见图 5。由图 5 可知，有效成分共 46 个节点，平均度值为 5.46，有 19 个成分高于平均度值，其中度值最高的 6 个成分为 BSS1(呋喃香豆素)、C1(异鼠李素)、BSS2(欧前胡素)、CX4(芎藭呋内酯)、CX1(杨梅酮)、B(亚油酸乙酯)。19 个高于度值成分均为“2.1.3”项下高于度值成分，表明巴亚格七味散散作

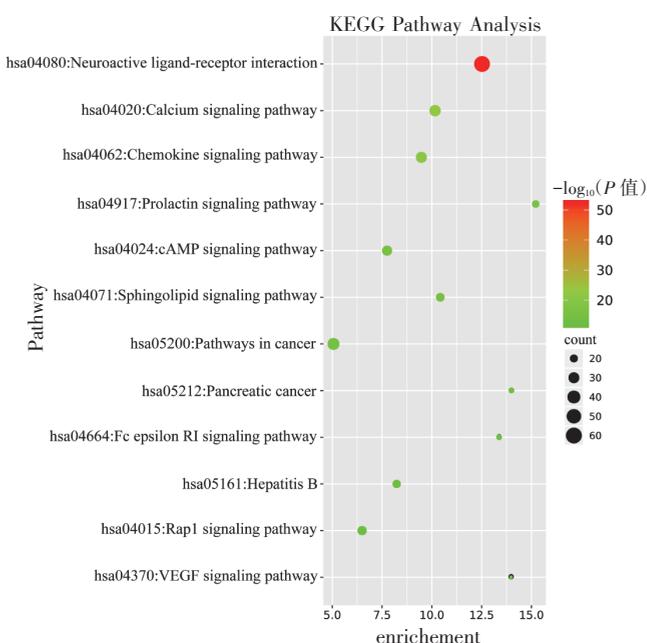


图 4 巴亚格七味散治疗酒精性肝病的 KEGG 代谢通路富集分析  
Figure 4 KEGG pathway enrichment analysis of Bayage Qiwei powder in the treatment of alcoholic liver disease

用于前 20 条通路成分多。作用靶点共 112 个节点，平均度值为 4.57，有 25 个作用靶点高于平均度值，其中度值最高的 6 个为 MAPK1、PIK3CA、AKT1、MAP2K1、PIK3R1、MAPK3。

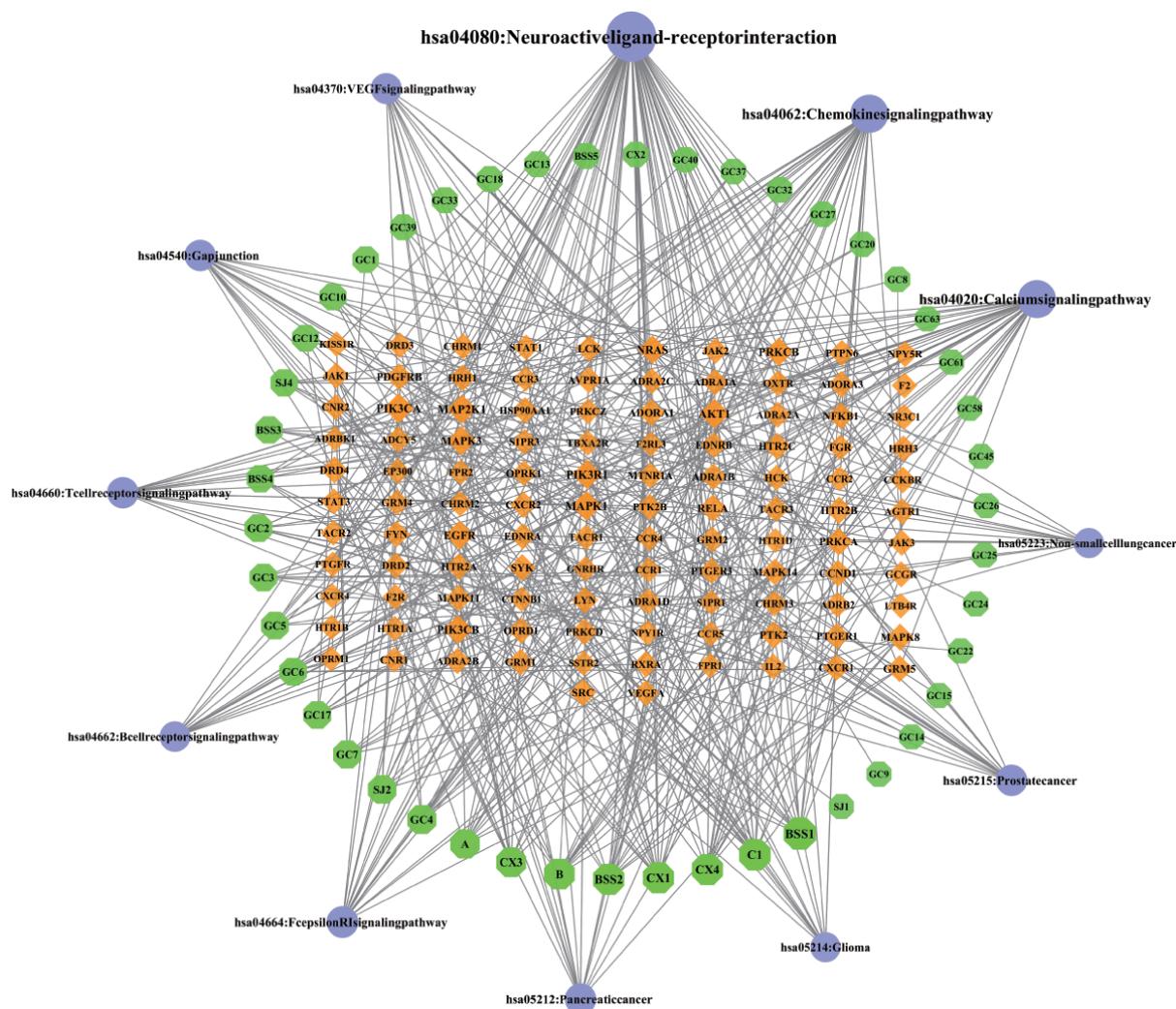
**2.2 分子对接结果** 为更全面地探究巴亚格七味散有效成分对参与前 20 条作用通路的关键靶点的影响，将“2.1.3”项下高于平均度值的 26 个有效成分与“2.1.6”项下度值前 6 位的关键靶点导入 Swiss Dock，进行分子对接。以对接分数为横坐标，有效成分数量为纵坐标绘图。一般认为，对接分数高于 4.5 为有结合可能，对接分数高于 6 为结合力强，其结果见图 6、图 7。由图 6 可见，26 个有效成分与 6 个关键靶点分子对接后，靶点结合能力排序为 MAP2K1、MAPK1、PIK3CA、PIK3R1、AKT1、MAPK3，结合最佳有效成分为亚油酸乙酯。分别对亚油酸乙酯与 MAPK1 和 PIK3R1 进行可视化，由图 7 可知，亚油

酸乙酯与 MAPK1 和 PIK3R1 具有较好的结合活性，与 MAPK1 主要结合方式为超共轭效应，与 PIK3R1 结合方式为分子间氢键和超共轭效应。

**2.3 巴亚格七味散对酒精性肝病小鼠的实验研究结果**

**2.3.1 组织病理学观察** 见图 8。光学显微镜下观察，对照组小鼠肝组织结构完整，肝细胞核圆润、清晰，肝小叶轮廓清晰，肝细胞排列整齐；模型组肝细胞排列紊乱，组织空泡增加，肝小叶结构破坏，并出现坏死和炎性细胞浸润；巴亚格七味散中、高(0.4、0.8 g·kg<sup>-1</sup>)剂量组大部分肝细胞结构排列紧密，肝细胞坏死程度减小，肝细胞性状较规则。与模型组比较，联苯双酯组，巴亚格七味散各浓度组均有不同程度减轻。

**2.3.2 血清生化指标检测** 见图 9。通过血清检测可知，与对照组比较，模型组血清中 AST、ALT 水平明显升高(P < 0.01)，且 AST、ALT > 100 IU·L<sup>-1</sup>，



注：绿色圆形为成分，橙色圆形为作用靶点，紫色圆形为信号通路

图 5 巴亚格七味散治疗酒精性肝病的“成分-靶点-通路”图

Figure 5 The “active component–target–pathway” network of Bayage Qiwei powder in the treatment of alcoholic liver disease

说明模型复制成功。与模型组比较，巴亚格七味散各浓度组及联苯双酯组小鼠血清 AST、ALT 水平均明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

**2.3.3 Elisa 法测定肝组织中 MAPK1 和 PIK3R1 水平** 见图 10。与对照组比较，模型组 MAPK1 和 PIK3R1

水平均明显升高( $P < 0.01$ )；与模型组比较，联苯双酯组和巴亚格七味散中、高(0.4、0.8  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )剂量组 MAPK1 和 PIK3R1 水平明显降低( $P < 0.05$ )，巴亚格七味散中剂量组的 MAPK1 和 PIK3R1 较低、高剂量组降低趋势更为明显。

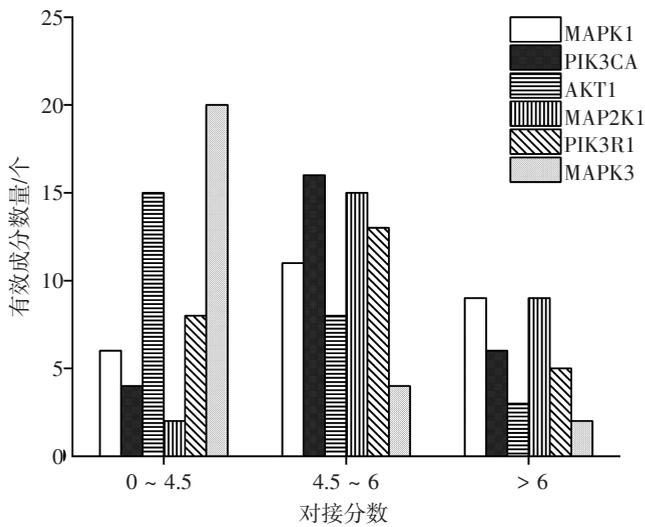
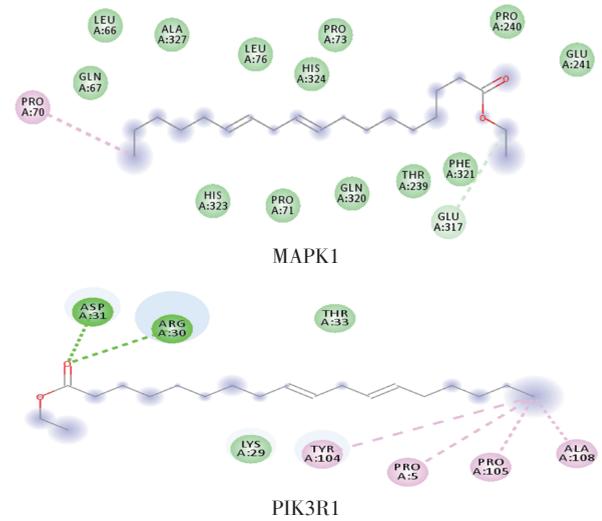


图 6 巴亚格七味散治疗酒精性肝病的分子对接结果

Figure 6 Molecular docking results of *Bayage Qiwei* powder in the treatment of alcoholic liver disease



注：深绿色为氢键作用；淡绿色为分子间作用力；粉色为超共轭效应

图 7 亚油酸乙酯与 MAPK1、PIK3R1 的分子对接 2D 图

Figure 7 2D molecular docking map of ethyl liuolate with MAPK1 and PIK3R1

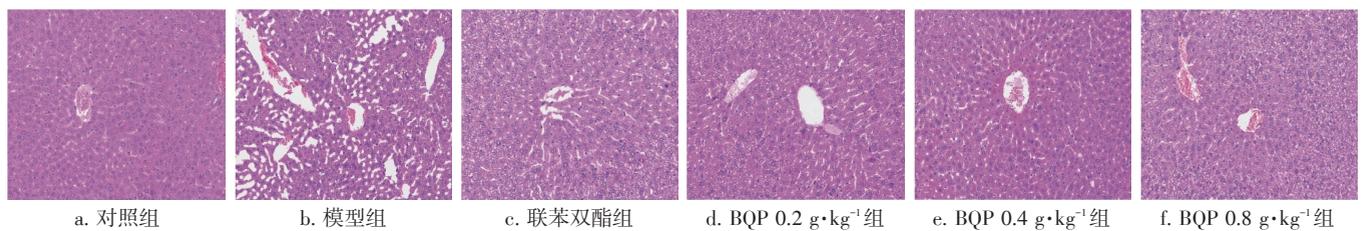
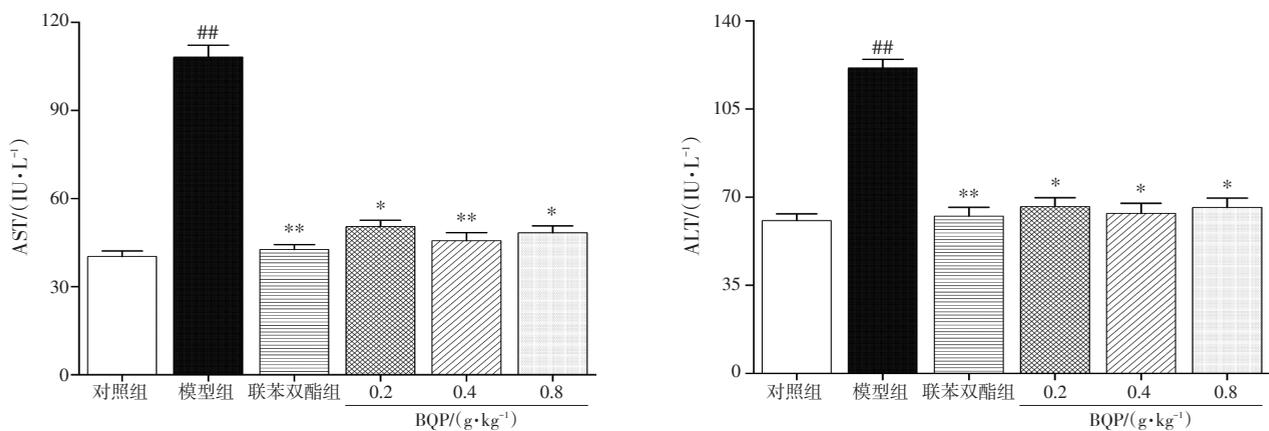


图 8 巴亚格七味散(BQP)对酒精性肝病模型小鼠肝组织病理学观察结果(HE 染色,  $\times 200$ )

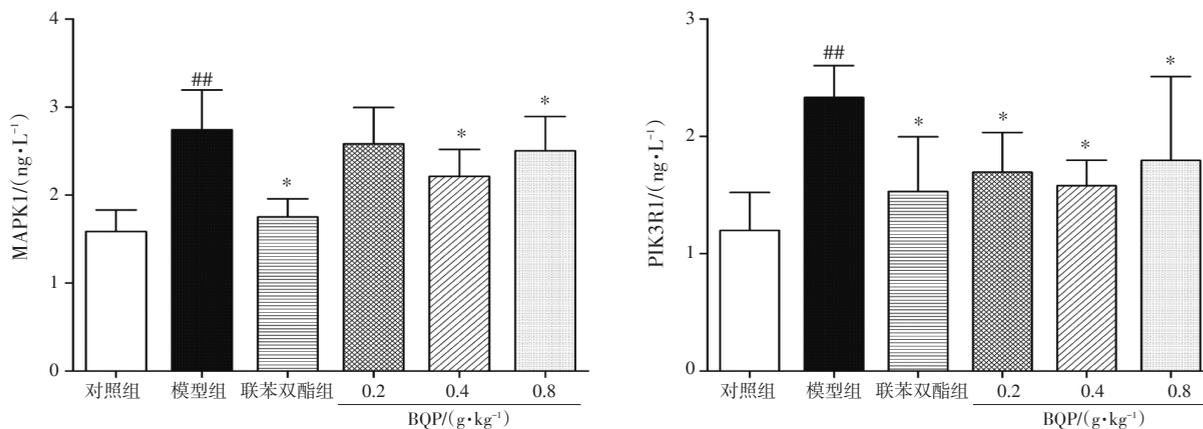
Figure 8 Effect of *Bayage Qiwei* powder on pathological changes of liver in alcoholic liver disease mice(HE,  $\times 200$ )



注：与对照组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

图 9 巴亚格七味散(BQP)对酒精性肝病小鼠血清 AST、ALT 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Figure 9 Effect of *Bayage Qiwei* powder on AST and ALT levels in serums of alcoholic liver disease mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )



注: 与对照组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$

图 10 巴亚格七味散对酒精性肝病小鼠肝组织 MAPK1 和 PIK3R1 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Figure 10 Effect of *Bayage Qiwei* powder on MAPK1 and PIK3R1 levels in liver of alcoholic liver disease mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

### 3 讨论

经统计,酒精性肝病患病率逐年升高,且患病人群呈年轻化趋势。中医学无酒精性肝病之称,通常将酒精性肝病归于伤酒、酒癖、酒鼓、酒疸等范畴。现代中医理论多认为酒毒是酒精性肝病的根本原因,病机为酒毒湿热之邪,导致脾胃受损、脾失健运、痰湿内停等<sup>[21]</sup>,因此在治疗酒精性肝病时多选用活血化瘀药、利水渗湿药和补气药等<sup>[22]</sup>。巴亚格七味散作为传统的活血化瘀药,目前主要治疗肺热、气喘、百日咳等疾病<sup>[23]</sup>,在治疗酒精性肝病方向具有广阔的潜在应用前景。

本研究通过网络药理学和分子对接技术,探究和分析巴亚格七味散对酒精性肝病的分子机制。PPI 网络显示 MAPK1、PIK3CA、AKT1、MAP2K1、PIK3R1、MAPK3 等靶点数值较高,说明以上靶点在酒精性肝病治疗中可能起到重要作用。酒精性肝病疾病过程中常伴随 MAPK 信号通路的改变,MAPK1、MAP2K1、MAPK3 属于 MAPK 家族的主要成员,在细胞的生长、分化,炎症反应等多种病理过程中具有重要作用,通过抑制 MAPK 蛋白水平表达,能有效缓解酒精性肝病模型小鼠炎症因子释放<sup>[24]</sup>。AKT1 具有调控细胞增殖和生长的作用,降低 AKT1 蛋白在机体的表达,能有效抑制肝癌细胞增殖,并促使其凋亡。PIK3R1 和 PIK3CA 的高表达可造成肝癌细胞过度繁殖<sup>[25-26]</sup>。

从 KEGG 富集结果可知,巴亚格七味散治疗酒精性肝病涉及多条信号通路,其中主要与神经活性配体-受体相互作用信号通路(61 个靶点参与)、趋化因子信号通路(31 个靶点参与)、Fc RI 信号通路(16 个

靶点参与)联系密切。过量饮酒可导致质膜破坏,造成细胞因子和趋化因子失调<sup>[27]</sup>,进而激活 MAPK 家族中的 ERK、MAPK p38 和 JNKs。激活的 MAPK p38 可向 Fc RI 信号通路转导,使单 PIK3R1 蛋白异常表达,造成肝脂肪堆积和炎症细胞浸润,最终引起酒精性肝病<sup>[28-29]</sup>。

现代研究表明,亚油酸乙酯具有抗菌<sup>[30]</sup>、消炎<sup>[31]</sup>和抑制黑色素形成<sup>[32]</sup>等作用。结合本文分子对接技术结果发现,亚油酸乙酯与 MAPK1 和 PIK3R1 结合力强。表明巴亚格七味散在治疗酒精性肝病的过程中,MAPK1 和 PIK3R1 发挥着重要作用,因此后续将通过体内药理实验对二者进行验证。

通过本文研究的病理组织学结果发现,巴亚格七味散能够减轻酒精性肝病模型小鼠肝脏中炎症因子浸润和肝组织空泡程度,缓解并降低肝组织损伤程度;通过生化指标检测发现,巴亚格七味散能够明显降低酒精性肝病模型小鼠血清中 AST、ALT 含量;Elisa 结果表明,巴亚格七味散能一定程度抑制酒精性肝病模型小鼠肝组织中 MAPK1 和 PIK3R1 水平,说明巴亚格七味散治疗酒精性肝病效果明显,且体内药理结果与网络药理学和分子对接分析结果基本一致。

综上所述,本研究初步预测了巴亚格七味散治疗酒精性肝病的有效成分、靶点、结合形式及相关通路。网络药理学结果呈现了多成分、多靶点、多途径相互作用的关系。动物实验初步验证了巴亚格七味散可通过抑制 MAPK1 和 PIK3R1 表达,来减轻酒精性肝病模型小鼠肝组织损伤。本课题组将以此结果为理论基础,进一步对巴亚格七味散的有效成分

及治疗酒精性肝病的药理机制进行研究。

## 参考文献:

- [1] NOOSHIN H, JULIA S, GYONGYI S. Alcoholic hepatitis: a review [J]. *Alcohol and alcoholism*, 2019, 54(4): 408-416.
- [2] WANG W J, XIAO P, XU H Q, et al. Growing burden of alcoholic liver disease in China: a review[J]. *World journal of gastroenterology*, 2019, 25(12): 1445-1456.
- [3] 聂晶晶, 王骁, 唐艳萍. 酒精性肝病的中西医结合治疗进展[J]. *河南中医*, 2016, 36(4): 187-189.
- [4] LOUVET A, MATHURIN P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment[J]. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 2015, 12(4): 231-242.
- [5] 郭静, 玄振玉, 谢燕. 中药复方新药药学研究中的问题与思考[J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2267-2272.
- [6] 李鸿彬, 丁文侠, 陆文亮. 全球化研发背景下中药新药研发面临的形势和机遇[J]. *中草药*, 2020, 51(15): 4092-4097.
- [7] 严桐, 郑婷婷, 易婷, 等. 基于文献数据挖掘的酒精性脂肪肝中医证候分布特点[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(10): 201-204.
- [8] 内蒙古自治区食品药品监督管理局. 内蒙古蒙药制剂规范[S]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2007.
- [9] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. *中草药*, 2019, 50(10): 6-14.
- [10] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展[J]. *中草药*, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [11] GROSDDIER A, ZOETE V, MICHELIN O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS[J]. *Nucleic acids research*, 2011, 39: W270-W277.
- [12] 李沛波, 谌攀, 吴灏, 等. 基于文献分析和分子对接法探讨化橘红防治新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的前景[J]. *中草药*, 2020, 51(9): 2368-2378.
- [13] 房立真, 刘吉开. 竹黄化学成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22(6): 1021-1023, 1056.
- [14] 卢济台, 田中联. 真菌竹黄的水溶性成份[J]. *中国中药杂志*, 1984, 9(2): 35-36.
- [15] 王翰韬, 吴帆, 倪穗. 不同地域川麦冬几种活性成分比较[J]. *中国野生植物资源*, 2017, 36(1): 26-29.
- [16] 仁义, 马凤霞, 余河水, 等. UPLC-Q-TOF-MS-E结合相对保留时间在线快速鉴定麦冬中甾体皂苷类成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24): 43-50.
- [17] 梁冰倩, 胡正芳, 戚进. 湖北麦冬地下部分化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 37-41.
- [18] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(3): 1-13.
- [19] 林昶, 杨欣, 朱璨, 等. 新疆红花挥发油GC-MS分析及药理作用的分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(23): 104-111.
- [20] 司远青, 颜贵明. 丹皮酚对小鼠酒精性脂肪肝中Adip/CaMKK $\beta$ /AMPK通路的影响[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(1): 80-86.
- [21] 肖达民, 李丹青, 吴艳华. 酒精性肝病的中医临床研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(1): 118-122.
- [22] 苗彦妮, 钟赣生. 酒精性肝病中药复方用药规律探讨[J]. *北京中医药大学学报*, 2009, 32(6): 380-383.
- [23] 梁国栋, 赵粉荣. 蒙药沙棘概况及其现代研究开发现状[J]. *中国民族医药杂志*, 2018, 36(2): 97-102.
- [24] NAKAGAWA H, MAEDA S. Molecular mechanisms of liver injury and hepatocarcinogenesis: focusing on the role of stress-activated MAPK[J]. *Pathology research international*, 2012, 2012: 1-14.
- [25] ZHANG A, LAKSHMANAN J, MOTAMENI A, et al. MicroRNA-203 suppresses proliferation in liver cancer associated with PIK3CA, p38 MAPK, c-Jun, and GSK3 signaling[J]. *Molecular and cellular biochemistry*, 2018, 441(2): 89-98.
- [26] 向雷, 黄智, 张帅, 等. 磷脂酰肌醇3激酶调节亚基1过表达对肝细胞癌进展的影响[J]. *介入放射学杂志*, 2019, 28(10): 52-58.
- [27] CHEN D, ZHANG F, REN H, et al. Role of cytokines and chemokines in alcohol-induced tumor promotion[J]. *OncoTargets and therapy*, 2017, 10: 1665-1671.
- [28] MURALIDHARAN S, LIM A, CATALANO D, et al. Human binge alcohol intake inhibits TLR4-MyD88 and TLR4-TRIF responses but not the TLR3-TRIF pathway: HspA1A and PP1 play selective regulatory roles[J]. *Journal of immunology*, 2018, 200(7): 2291-2303.
- [29] ZHANG A, YAN G, ZHOU X, et al. High resolution metabolomics technology reveals widespread pathway changes of alcoholic liver disease[J]. *Molecular bioSystems*, 2016, 12(1): 262-273.
- [30] KUSUMAH D, WAKUI M, MURAKAMI M, et al. Linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, and monolinolenins as antibacterial substances in the heat-processed soybean fermented with *Rhizopus oligosporus*[J]. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 2020, 84(6): 1285-1290.
- [31] SUN Y P, RAJASEKAR S, KO M J, et al. Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells [J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 19(2): 253-261.
- [32] GYEONG A K, SOMI K C. Ethyl linoleate inhibits  $\alpha$ -MSH-induced melanogenesis through Akt/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signal pathway [J]. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2018, 22(1): 53-61.

(编辑: 修春)