

网络出版时间:2024-02-01 15:50:19 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240201.1113.012

基于网络药理学和体内实验分析黄柏多糖 治疗肝损伤的作用机制

薛娟¹, 杨欣², 莫共柔¹, 刘龙江¹, 陈彪¹, 柴慧芳¹

摘要 **目的** 基于网络药理学分析黄柏治疗肝损伤的作用及分子机制,并通过小鼠体内实验验证相关预测靶点及黄柏提取物-黄柏多糖对免疫性肝损伤的保护作用。**方法** 利用 TCMSP 和 Swiss target prediction 数据库检索并筛选黄柏的有效成分及作用靶点,然后在 GeneCards 和 OMIM 网站获得疾病相关靶点,取化合物与疾病交集靶点做蛋白互作分析、GO 生物功能和 KEGG 信号途径富集分析,接着对化合物及关键靶点蛋白进行分子对接,最后建立刀豆蛋白 A (Con A) 诱导的小鼠肝损伤模型探讨黄柏提取物治疗肝损伤的作用机制。**结果** 黄柏中共筛选出 37 个有效成分,其治疗关键靶点为肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、信号转导与转录激活因子 3 (STAT3)、表皮生长因子受体 (EGFR) 和半胱天蛋白酶 3 (CASP3) 等,富集分析显示黄柏可能通过 MAPK 级联反应的正向调控、氧化应激反应等分子机制及调控 PI3K-Akt 信号通路、脂质和动脉粥样硬化等通路发挥对肝脏的保护作用。动物实验发现黄柏多糖灌胃处理可提高肝组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性,降低血清碱性磷酸酶 (ALP)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 及肝组织丙二醛 (MDA) 水平,调控血清炎症因子白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 的表达,并降低肝组织中 TNF- α mRNA 表达。**结论** 黄柏可通过作用于 TNF- α 、AKT1、STAT3、EGFR 和 CASP3 等靶点,干预脂质和动脉粥样硬化通路来减轻氧化应激反应和炎症反应,达到保肝作用。**关键词** 黄柏;网络药理学;多糖;肝损伤;分子对接
中图分类号 R 285.5
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0267-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.014

肝脏作为人体重要的代谢和解毒器官,会受到各种因素的损害,如长期酗酒、病毒感染、药物毒性、

代谢紊乱、不良情绪和免疫反应等。然而目前肝损伤的临床治疗效果不佳,病死率较高^[1]。因此,探索有效的防治肝损伤的药物具有重要的意义。中医药以其多成分、多靶点的优势在防治肝损伤方面展示了广阔的开发前景。黄柏为芸香科植物黄皮树 (*Phellodendron amurense* Schneid.) 的干燥树皮,味苦、性寒,归肾、膀胱经,具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮之效,收载于《中国药典》^[2],2021 年入选贵州省道地药材目录 (第一批)。现代研究^[3-5]表明黄柏含有生物碱、酚酸、柠檬苦素、多糖等成分,具有抗菌、保肝、抗溃疡、抗氧化、抗痛风等多种药理活性^[6-8]。与其他中药一样,黄柏化学成分复杂、作用靶点多,其保护肝脏作用的机制研究较少,有待深入探讨。该研究利用网络药理学结合小鼠免疫肝损伤实验模型,深入探讨黄柏提取物对肝损伤的保护作用及机制,为充分利用黄柏丰富的天然植物资源提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 黄柏药材购于贵州苗立克中药科技有限公司,批号:171101,生产许可证:黔20160079。刀豆蛋白 A (Con A,货号:824V032) 购于北京索莱宝科技有限公司;过氧化氢酶 (catalase, CAT,货号:20211116)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD,货号:20211213)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA,货号:20211118) 试剂盒购于南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α ,货号:Dec 2021)、白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-1 β 、转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 购于上海茁彩生物科技有限公司 (货号均为 Dec 2021);酶标分析仪购于北京普朗新技术有限公司,分析天平购于上海市卓精电子科技有限公司。

1.1.2 实验动物 60 只雄性 BALB/c 小鼠,5~6 周龄,18~22 g,均购于长沙市天勤生物技术有限公司,许可证号:SCXK(湘):2019-0014。

2023-12-09 接收

基金项目:贵州省科技计划项目 (编号:黔科合基础[2020]1Y389、黔科合基础-ZK[2022]一般 457);贵州省教育厅青年科技人才成长项目 (编号:黔教合 KY 字[2018]205)

作者单位:贵州中医药大学¹药学院基础实验室、²基础医学院药理学实验室,贵阳 550025

作者简介:薛娟,女,讲师;

柴慧芳,女,教授,责任作者, E-mail: 116066988@qq.com

1.2 方法

1.2.1 黄柏活性成分筛选和靶点预测 借助中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmsp.w.com>),以“黄柏”为检索词,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为设定条件,筛选黄柏潜在的活性化学成分。将化学成分输入 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中下载“SDF”格式的分子结构,然后上传至 Swiss target prediction 平台(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)筛选药物作用靶点。

1.2.2 疾病靶点筛选 以“liver injury”为关键词在 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<http://www.omim.org>)数据库检索疾病靶点,将两个数据库靶点信息进行合并去重,获得肝损伤相关靶点。将黄柏活性成分靶点和疾病靶点导入 FunRich 3.1.3 软件取交集,最终获得黄柏治疗肝损伤的潜在作用靶点。

1.2.3 蛋白相互作用 将获取的交集靶点导入 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 网站,得到蛋白互作网络(PPI)和 TSV 文件,再用 R 软件对 TSV 文件的靶点数据行统计和绘图分析。

1.2.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 利用 R 软件对潜在作用靶点进行京都基因(geneontology, GO 和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析。GO 分析包括生物学过程(biological process, BP),细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF) 3 个方面。GO 和 KEGG 均选取排名前 10 名结果,绘制气泡图。

1.2.5 分子对接 37 个活性化合物从 PubChem 数据库下载 3D 结构的 sdf 文件并进行能量优化,再从 PDB 网站下载蛋白互作网络(protein protein interaction network, PPI)关联度最高的 5 个蛋白的蛋白质结构,存为 pdb 文件,后将其导入 SYBYL 2.1.1 软件中进行预处理,包括提取配体小分子、去除水分子、加氢等。最后利用 SYBYL 2.1.1 将对应的化合物与蛋白进行分子对接,利用打分函数进行评价。

1.2.6 动物实验

1.2.6.1 分组、给药及模型建立 雄性 BALB/c 小鼠,随机分成 6 组,每组 10 只:空白组、模型组、阳性药物组及黄柏多糖高、中、低剂量组。空白组和模型组以等体积生理盐水进行灌胃,阳性药物组以联苯双酯滴丸 200 mg/kg 的剂量进行灌胃,黄柏多糖高、

中、低剂量组分别以黄柏多糖 686.4、343.2、171.4 mg/kg 进行灌胃(剂量依据《中国药典》中黄柏人用剂量经人/小鼠等效剂量折算后设置),每日灌胃 1 次,连续灌胃 14 d。末次灌胃 1 h 后,空白组尾静脉注射生理盐水 10 ml/kg,其余 5 组静脉注射 Con A 15 mg/kg 造模。禁食禁水 6 h,小鼠眼球取血,室温静置后离心,血清 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存;随后立即脱臼处死小鼠,摘取的肝脏部分于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,部分常温保存,用 4% 多聚甲醛固定。

1.2.6.2 肝组织病理观察 部分肝组织用 4% 多聚甲醛后,石蜡包埋切片,将切片入二甲苯,水化,苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜下进行病理形态检查。

1.2.6.3 小鼠血清中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平检测 小鼠血清按照试剂盒说明书检测 ALP、AST 水平。

1.2.6.4 肝脏中 SOD、CAT、MDA 水平检测 取肝组织适量,生理盐水配成匀浆液,15 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 BCA 法测肝组织蛋白浓度,按照试剂盒说明书测定 MDA、CAT 水平与 SOD 活性。

1.2.6.5 血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TGF- β 1 炎症因子含量的测定 采用 ELISA 法,严格按照试剂盒说明检测小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TGF- β 1 含量。

1.2.6.6 qRT-PCR 检测肝组织 TNF- α mRNA 表达 取肝脏组织提取 RNA,逆转录为 cDNA,以 β -actin 作为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 TNF- α 基因 mRNA 表达水平。TNF- α 上游引物:5'-GAGACAGATGTGGGGTGTGA-3',下游引物 5'-GTCACCTCGGGGTTCGAGAAG-3'。

1.3 统计学处理 数据统计分析采用 SPSS 21.0 软件,组间比较用单因素方差分析, LSD- t 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄柏活性成分靶点及疾病靶基因筛选结果

最终获得 37 个黄柏化学成分,见表 1。37 个成分经 Swiss target prediction 平台预测获得 467 个靶点蛋白。基于 GeneCards、OMIM 数据库检索,整理得到 2 607 个疾病靶点;将上述黄柏靶点蛋白与疾病靶点取交集并绘制 Venn 图,得到核心靶点 346 个,见图 1。

2.2 蛋白相互作用 346 个靶点使用 STRING 进行

表1 黄柏活性成分信息

Mol ID	化合物名称	分子量 (g/mol)	OB(%)	DL
MOL001454	berberine	336.39	36.86	0.78
MOL001458	coptisine	320.34	30.67	0.86
MOL002636	Kihadalactone A	512.70	34.21	0.82
MOL013352	Obacunone	454.56	43.29	0.77
MOL002641	Phellavin_qt	374.42	35.86	0.44
MOL002643	delta 7-stigmastanol	414.79	37.42	0.75
MOL002644	Phellopterin	300.33	40.19	0.28
MOL002651	Dehydrotanshinone II A	292.35	43.76	0.40
MOL002652	delta7-Dehydrosophoramine	242.35	54.45	0.25
MOL002656	dihydroniloticin	458.80	36.43	0.81
MOL002659	kihadinan A	486.56	31.60	0.70
MOL002660	niloticin	456.78	41.41	0.82
MOL002662	rutaecarpine	287.34	40.30	0.60
MOL002663	Skinmianin	259.28	40.14	0.20
MOL002666	Chelerythrine	332.77	34.18	0.78
MOL000449	Stigmasterol	412.77	43.83	0.76
MOL002668	Worenine	334.37	45.83	0.87
MOL002670	Cavidine	353.45	35.64	0.81
MOL002671	Candletoxin A	608.79	31.81	0.69
MOL002672	Hericenone H	580.88	39.00	0.63
MOL002673	Hispidone	472.78	36.18	0.83
MOL000358	beta-sitosterol	414.79	36.91	0.75
MOL000622	Magngrandiolide	266.37	63.71	0.19
MOL000762	Palmidin A	510.52	35.36	0.65
MOL000785	palmatine	352.44	64.60	0.65
MOL000787	Fumarine	353.40	59.26	0.83
MOL000790	Isocorypalmine	341.44	35.77	0.59
MOL000098	quercetin	302.25	46.43	0.28
MOL001131	phellamurin_qt	356.40	56.60	0.39
MOL001455	(S)-Canadine	339.42	53.83	0.77
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	414.79	36.91	0.75
MOL002894	berberrubine	322.36	35.74	0.73
MOL005438	campesterol	400.76	37.58	0.71
MOL006392	dihydroniloticin	458.80	36.43	0.82
MOL006401	melianone	470.76	40.53	0.78
MOL006413	phellochin	488.83	35.41	0.82
MOL006422	thalifendine	322.36	44.41	0.73

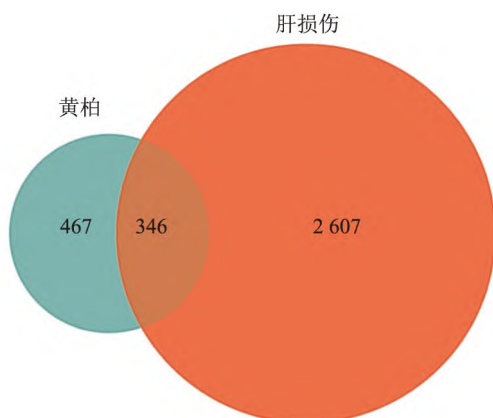


图1 中药黄柏与肝损伤交互靶点信息

PPI 分析,利用 R 语言绘制蛋白质节点的条形图,见图 2。Degree 排名前 5 的节点包括 TNF- α ,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine-protein kinase 1, AKT1),信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3),表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和半胱天蛋白酶 3 (caspase-3, CASP3)。

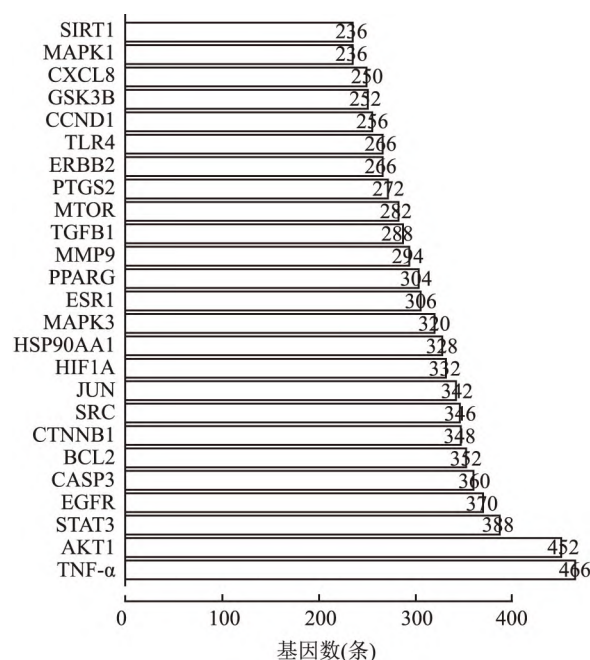


图2 PPI 网络核心基因条形图

2.3 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 使用 R 语言完成 346 个靶点的 GO 富集分析,输出前 10 项,见图 3(A ~ C)。结果显示 346 个靶点参与的生物过程中主要富集于 MAPK 级联反应的正向调控、激酶活性的正向调节、对异种刺激的反应、氧化应激反应等;细胞组分主要涉及膜筏、膜微域、神经元细胞体、焦点粘连等;分子功能主要为蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性和 RNA 聚合酶 II - 特异性 DNA - 结合转录因子结合等。

346 个靶点涉及的信号通路同样基于 R 语言输出前 10 项,见图 3D。主要涉及 PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、癌症中的蛋白多糖 (proteoglycans in cancer)、乙型肝炎 (Hepatitis B) 等。

2.4 分子对接 基于 SYBYL 2.1.1 分子对接验证黄柏 37 个化学成分与 5 个关键靶点的结合情况,对

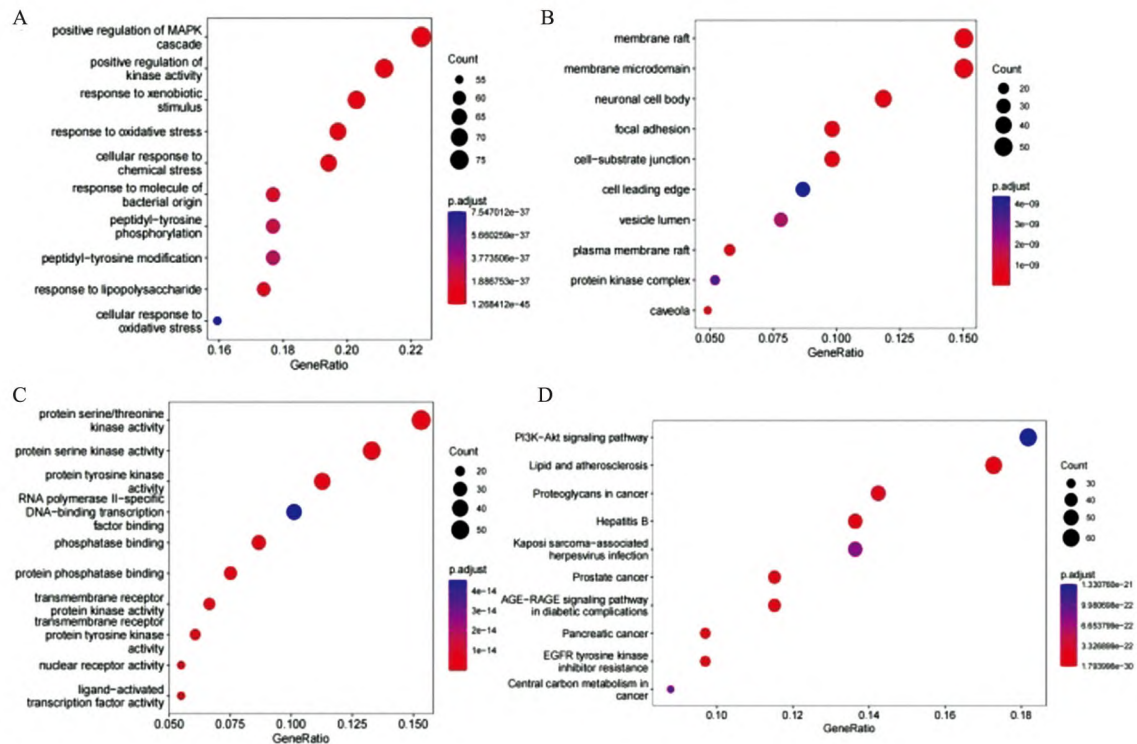


图3 GO功能和KEGG通路富集分析气泡图

A;BP;B;CC;C;MF;D;KEGG

接结果以打分函数 $T_score \geq 5$ 为阈值, $T_score \geq 5$ 表示活性成分与靶标蛋白有较好的结合, 分子对接结果见表2。37个成分中, 22个成分能与AKT1有较好的结合, 21个成分能与CASP3、TNF- α 有较好的结合, 17个成分能与STAT3、EGFR有较好的结合。37个成分中, 9个化学成分能同时与5个靶点(TNF- α 、AKT1、STAT3、EGFR、CASP3)有较好的结合($T_score \geq 5$, 图4), 分别是Hericenone H、delta 7-stigmastanol、campesterol、Candletoxin A、beta-sitosterol、quercetin、phellamurin_qt、poriferast-5-en-3beta-ol、niloticin, 它们可能是黄柏治疗肝损伤的关键成分, 后续将进一步深入研究。

2.5 动物实验结果

2.5.1 小鼠肝组织病理变化 各组小鼠肝组织HE染色结果如图5所示。空白组肝脏组织结构正常, 肝细胞排列整齐、分布均匀, 细胞核完整, 无炎症颗粒细胞浸润。模型组肝脏组织结构明显异常, 肝细胞已经紊乱, 细胞核固缩, 且有炎性颗粒细胞浸润。与模型组相比, 阳性对照组和黄柏多糖高剂量组肝脏组织细胞结构显著改善, 炎性颗粒细胞明显减少, 黄柏多糖中、低剂量组也有一定改善。

2.5.2 小鼠肝功能指标AST、ALP的检测 与空白

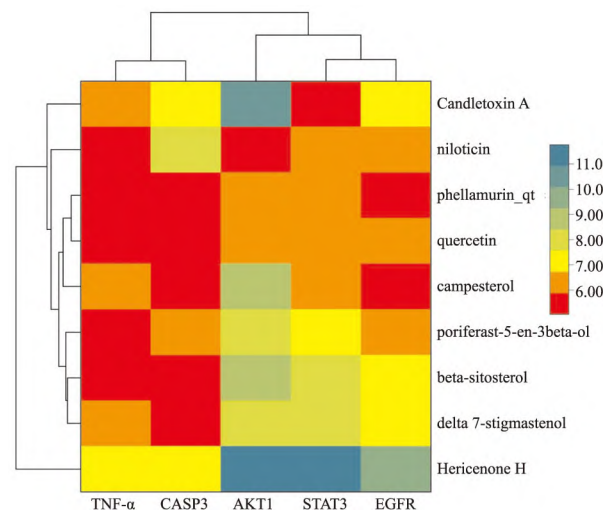


图4 分子对接热图

组相比, 模型组小鼠血清AST、ALP水平显著升高($P < 0.01$), 说明尾静脉注射Con A对小鼠肝组织造成了严重损伤。各给药组小鼠的ALP、AST水平与模型组相比, 均下降, 其中黄柏多糖高剂量组有显著差异($P < 0.01$), 黄柏多糖中剂量组有差异($P < 0.05$), 见表3。

2.5.3 肝脏中SOD、CAT、MDA的水平检测 与空白组对比, 模型组小鼠肝脏中的SOD、CAT含量显

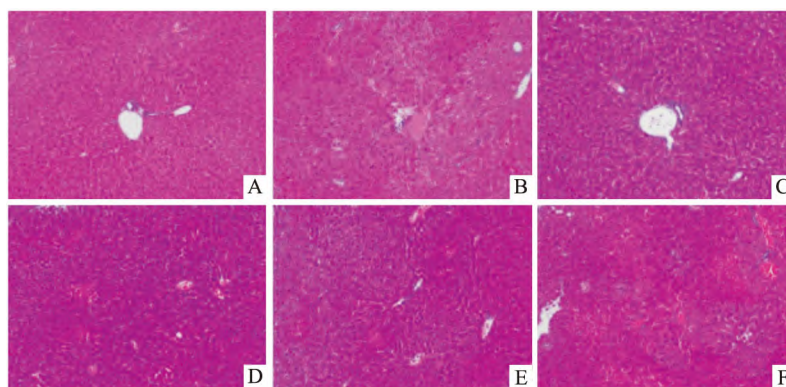


图5 黄柏多糖对 Con A 诱导肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响 HE ×100

A:空白组;B:模型组;C:阳性对照组;D:黄柏多糖高剂量组;E:黄柏多糖中剂量组;F:黄柏多糖低剂量组

表2 分子对接分析

编号	化合物名称	与靶点的对接评分(分)				
		TNF- α	AKT1	STAT3	EGFR	CASP3
1	berberine	5.11	7.20	4.06	3.51	4.38
2	coptisine	4.05	4.41	2.21	2.74	2.28
3	Kihadalactone A	5.99	1.97	1.17	3.06	4.82
4	Obacunone	3.22	3.51	2.97	2.67	5.20
5	Phellavin_qt	4.02	6.67	5.39	4.86	6.32
6	delta 7-stigmastanol	5.94	7.62	7.69	7.21	5.31
7	Phellopterin	5.04	6.03	3.78	5.20	5.17
8	Dehydrotanshinone II A	4.75	5.11	2.61	4.23	3.45
9	delta7-Dehydrosophoramine	2.66	4.41	2.34	2.86	3.04
10	dihydroniloticin	4.78	1.20	2.33	5.64	7.19
11	kihadanin A	3.54	1.84	3.54	4.85	3.41
12	niloticin	5.12	5.69	6.23	6.00	8.12
13	rutaecarpine	2.41	4.21	1.90	2.35	2.58
14	Skimmianin	3.23	4.82	5.01	3.97	4.64
15	Chelerythrine	6.31	6.08	4.80	3.51	3.83
16	Stigmasterol	4.66	6.97	5.81	5.94	5.94
17	Worenine	3.70	4.49	3.66	3.94	1.94
18	Cavidine	3.90	6.23	5.03	3.95	4.56
19	Candletoxin A	6.47	10.19	5.58	7.55	7.05
20	Hericenone H	9.87	11.23	11.75	9.96	6.75
21	Hispidone	5.06	-0.15	5.94	3.11	6.41
22	beta-sitosterol	5.22	9.18	8.05	6.77	5.35
23	Magnograndiolide	4.00	3.49	3.29	3.41	4.61
24	Palmidin A	5.15	1.63	1.59	6.27	5.15
25	palmatine	5.00	6.16	5.73	4.35	5.86
26	Fumarine	3.64	5.53	4.02	3.58	3.74
27	Isocorypalmine	6.16	6.22	5.19	4.55	4.42
28	quercetin	5.11	6.19	6.52	6.05	5.21
29	phellamurin_qt	5.70	6.40	6.06	5.26	5.52
30	(S)-Canadine	3.53	5.38	4.45	4.83	4.67
31	poriferast-5-en-3beta-ol	5.12	7.96	7.33	6.51	6.01
32	berberrubine	5.29	5.14	5.31	4.44	5.43
33	campesterol	6.93	8.41	6.70	5.05	5.41
34	dihydroniloticin	5.10	2.62	4.85	5.59	7.84
35	melianone	5.25	4.11	3.81	5.21	5.84
36	phellochin	5.39	4.64	3.32	7.48	7.28
37	thalifendine	4.34	6.66	4.54	6.29	4.29

表3 黄柏多糖对小鼠血清 AST、ALP 的影响(U/L, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	AST	ALP
空白	14.41 $\pm$ 2.37	156.99 $\pm$ 9.87
模型	155.36 $\pm$ 13.52 ^{##}	273.43 $\pm$ 16.86 ^{##}
阳性	81.60 $\pm$ 4.97 ^{**}	182.05 $\pm$ 8.18 ^{**}
黄柏多糖高剂量	86.90 $\pm$ 10.24 ^{**}	206.96 $\pm$ 7.96 ^{**}
黄柏多糖中剂量	116.77 $\pm$ 13.38 [*]	214.49 $\pm$ 18.39 [*]
黄柏多糖低剂量	132.08 $\pm$ 12.97	248.52 $\pm$ 16.43

与空白组比较:^{##} $P<0.01$;与模型组比较:^{**} $P<0.01$,^{*} $P<0.05$

著下降($P<0.01$),MDA 含量显著升高($P<0.01$)。黄柏多糖干预后,SOD、CAT 含量均有所升高,MDA 含量有所降低,其中高剂量组变化最显著($P<0.01$),中剂量组次之($P<0.05$),低剂量组最弱,见图6。

2.5.4 血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TGF- β 1 免疫炎症因子含量的测定 各组对 Con A 诱导肝损伤小鼠血清炎症因子的影响结果见图7。与空白组比较,模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TGF- β 1 含量显著升高($P<0.01$)。给予黄柏多糖后,各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TGF- β 1 均有一定程度的降低,其中高剂量组变化最显著($P<0.01$),中剂量组次之($P<0.05$ 或 0.01),低剂量组各因子也有所降低,但差异无统计学意义。

2.5.5 qRT-PCR 检测肝组织 TNF- α mRNA 表达 选取 PPI 网络中最重要的 TNF- α 基因进行实验验证。与空白组比较,模型组小鼠肝组织中 TNF- α mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,黄柏多糖高、中剂量组 TNF- α mRNA 水平显著降低($P<0.01$ 或 0.05),黄柏多糖低剂量组也有所降低,见图8。

3 讨论

中药是中华文明的瑰宝,在防治肝病方面有着

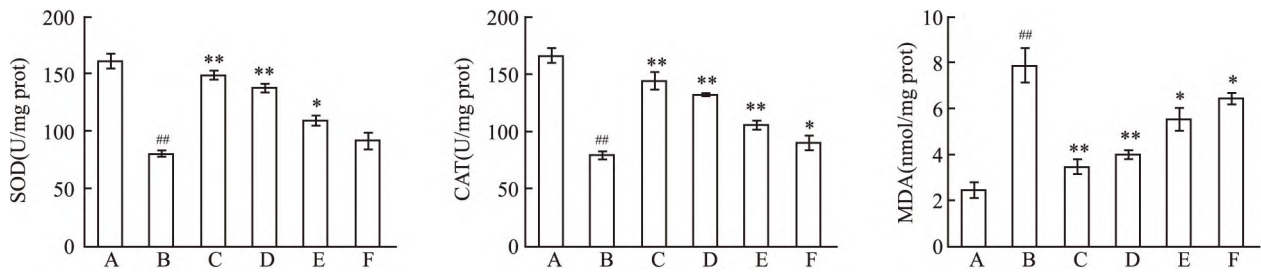


图6 黄柏多糖对肝损伤小鼠血清 SOD、CAT、MDA 的影响

A:空白组;B:模型组;C:阳性对照组;D:黄柏多糖高剂量组;E:黄柏多糖中剂量组;F:黄柏多糖低剂量组;与空白组比较:^{##} $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

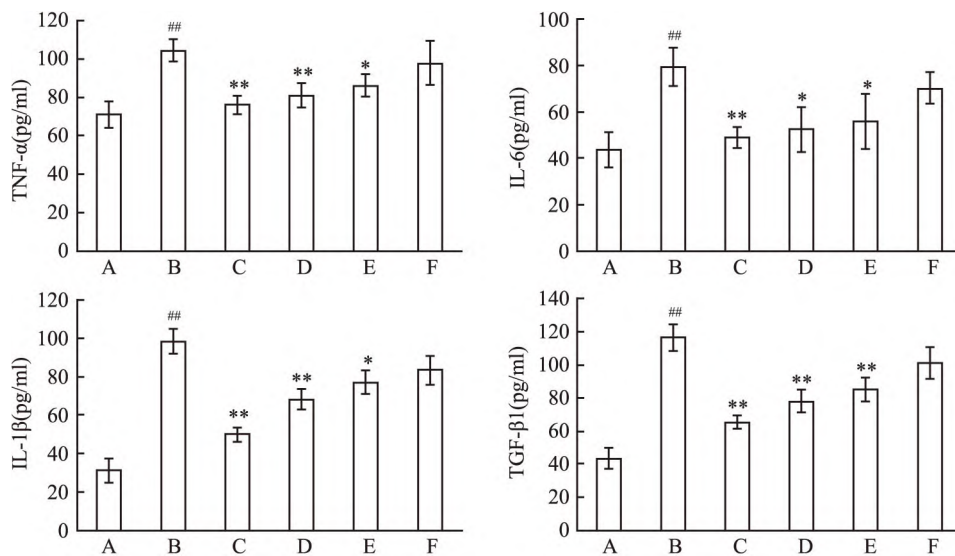


图7 黄柏多糖对肝损伤小鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-1β、TGF-β1 细胞因子的影响

A:空白组;B:模型组;C:阳性对照组;D:黄柏多糖高剂量组;E:黄柏多糖中剂量组;F:黄柏多糖低剂量组;与空白组比较:^{##} $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

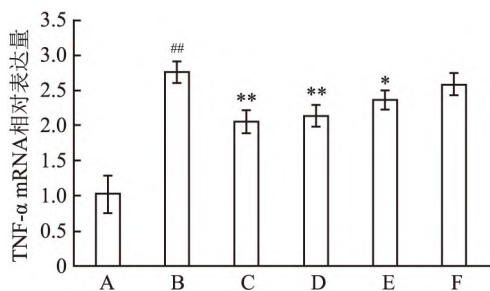


图8 黄柏多糖对肝损伤小鼠肝脏 TNF-α mRNA 表达的影响

A:空白组;B:模型组;C:阳性对照组;D:黄柏多糖高剂量组;E:黄柏多糖中剂量组;F:黄柏多糖低剂量组;与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$

悠久的用药历史,因此,以中药为着眼点,开发其药用价值并探讨作用机制有一定的创新性。网络药理学的应用为预测中药成分靶标和疾病基因提供了新

的手段,它从整体角度探索药物与疾病的关联性^[9]。因此通过网络药理学分析和体内实验验证黄柏抗肝损伤的作用机制、筛选其活性成分靶点有重要意义。

本研究首先于 TCMSP 数据库检索并筛选得到 37 个黄柏潜在的活性成分,主要有小檗碱、黄连碱、黄柏酮等多种化合物。研究^[10]表明,黄柏提取液对 D-氨基半乳糖 (D-Gal N) 诱导的急性肝损伤有较好的预防性保护作用,其作用机制可能与清除氧自由基,降低脂质过氧化等抗氧化作用有关。黄柏乙醇提取物对 α-萘异硫氰酸酯 (ANIT) 诱导的黄疸型肝炎模型小鼠具有一定的预防及治疗作用。同时,对于黄药子导致的肝中毒,黄芩、黄柏及其配伍使用可显著降低大鼠血清转氨酶,其中黄芩配伍黄柏使用效果最佳。这些研究结果均表明黄柏有效成分具有保护肝损伤作用,然而,药效物质基础及作用分子机

制尚不明确。

对黄柏与肝损伤疾病交集靶点进行 PPI 分析,结果显示 TNF- α 、AKT1、STAT3、EGFR 和 CASP3 是 5 个度值最大的靶点。TNF- α 可促白细胞活化、聚集、黏附,也可促血小板活化,加重组织炎症反应,致肝损伤^[9]。AKT1 参与细胞增殖、细胞生长、代谢、氧化应激、炎症等方面相关的信号通路^[11]。STAT3 广泛分布于各个器官,参与各胚层发育、免疫细胞分化发育、肿瘤等各种病理生理过程,是调节细胞增殖、分化、存活,以及自身免疫和炎症的关键因子,EGFR 在控制炎症方面具有关键作用;经过上述分析,5 个核心靶点主要与炎症、细胞凋亡、氧化应激和免疫反应等密切相关。

GO 分析显示,黄柏活性成分治疗肝损伤涉及 MAPK 级联反应的正向调控、激酶活性的正向调节、对异种刺激的反应、氧化应激反应等,KEGG 分析结果表明,黄柏可能通过 PI3K-Akt 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、癌症中的蛋白多糖、乙型肝炎等通路发挥对肝脏的保护作用。其中,脂质和动脉粥样硬化通路可能是肝损伤发生发展的重要环节,KEGG 分析显示 TNF- α 、AKT1、CASP3、STAT3 等多个靶点均富集在该通路上,说明调控该通路可能是黄柏缓解临床症状、保护肝损伤的作用机制。

进一步对黄柏潜在活性成分等与关键靶点蛋白进行分子对接,发现大部分活性成分可与靶点蛋白有较好的结合作用,其中 Hericenone H、delta 7-stigmastenol、campesterol、Candletoxin A、beta-sitosterol、quercetin、phellamurin _ qt、poriferast-5-en-3beta-ol、niloticin 9 个成分均可与 5 个核心靶点 TNF- α 、AKT1、STAT3、EGFR 和 CASP3 结合,由此推测该 9 个成分可能是这些靶点蛋白的潜在抑制剂,而这 5 个靶点亦可能是黄柏治疗肝损伤的关键靶点。

综合考虑网络药理学以及分子对接结果,进一步进行小鼠体内实验研究。研究^[12]表明,黄柏具有广谱抗炎和免疫调节活性。如黄柏水提物可通过抑制 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、IL-1、TNF- α 等细胞因子的产生和分泌,从而抑制小鼠迟发型超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH)。由 Con A 引起的肝损伤是国际公认的免疫性肝损伤实验动物模型,因此本研究选择 Con A 建立小鼠肝损伤模型。动物实验结果显示,经黄柏多糖治疗后,Con A 诱导的肝损伤小鼠转氨酶水平降低,肝脏组织中 SOD、CAT 水平升高,MDA 水平下降,黄柏多糖干预可降低肝损伤小鼠血清中促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、

TGF- β 1 水平,明显逆转了 Con A 诱导的肝损伤小鼠肝脏 TNF- α mRNA 水平的升高。研究表明,测定血清中 ALP 和 AST 活性可反映肝细胞损伤的程度;同时,当肝细胞受到损伤后,MDA 含量升高,其具有较强毒性,可导致细胞裂解和坏死,破坏蛋白和酶的结构和功能^[13-14],同时,作为抗氧化酶的 SOD 和 CAT 发挥抗氧化作用,从而防止肝细胞损伤^[15]。以上结果表明黄柏多糖保护肝损伤作用可能与降低体内氧化应激及调控炎症因子水平有关。

综上所述,黄柏提取物可以改善 Con A 诱导的小鼠免疫性肝损伤,其机制可能通过抑制氧化应激和炎症反应来实现。本研究为黄柏治疗肝损伤奠定了一定的研究基础,但仍需细胞实验进行进一步验证。

参考文献

- [1] Jadaun K S, Mehan S, Sharma A, et al. Neuroprotective effect of chrysophanol as a PI3K/AKT/mTOR signaling inhibitor in an experimental model of autologous blood-induced intracerebral hemorrhage[J]. Curr Med Sci, 2022, 42(2): 249-66.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 153, 318.
- [3] 王 荣. 川黄柏的化学成分及药理活性研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(1): 173-4.
- [4] 史 敏, 任炳楠, 邱志宏, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的黄柏化学成分快速辨识研究[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 21(1): 2225-9.
- [5] Lei X F, Shan G S, Zhang F, et al. Determination and comparison of alkaloids and triterpenes among tissue after oral administration of crude and processed Phellodendri Chinensis Cortex by UPLC-QqQ-MS[J]. Nat Prod Res, 2020, 34(9): 1337-40.
- [6] Xu L Q, Lin G S, Yu Q X, et al. Anti-hyperuricemia and nephro-protective effects of dihydroberberine in potassium oxonate-and hypoxanthine-induced hyperuricemic mice[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 645879.
- [7] Rong Q F, Han B S, Li Y F, et al. Berberine reduces lipid accumulation by promoting fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells of the diabetic kidney[J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 729384.
- [8] Zhu L, Gu P Q, Shen H. Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 68: 242-51.
- [9] 朱耀乾, 王 雨, 王凤杰, 等. 基于网络药理学和分子对接技术分析简鞘蛇菰多糖治疗肝损伤的作用机制及体内实验研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(9): 3466-76.
- [10] 梁华益, 农生斌, 韦家河, 等. 黄柏提取液对 D-氨基半乳糖致小鼠急性肝损伤的预防性保护作用[J]. 广西医学, 2018, 40(3): 303-5, 313.

- [11] 王晓凤, 赵敏. 基于网络药理学研究黄连治疗百草枯中毒致急性肝损伤的分子机制[J/OL]. 中国医科大学学报, 2023, 52(8): 724–30.
- [12] 李春霞, 谢志虹, 徐文艳, 等. 黄柏联合益生菌对妊娠37周后细菌性阴道炎孕妇局部免疫环境的影响[J]. 河北医药, 2019, 41(8): 1148–51, 1156.
- [13] Jelic M D, Mandic A D, Maricic S M, et al. Oxidative stress and its role in cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2021, 17(1): 22–8.
- [14] 胡亚敏, 李跨越, 刘兰, 等. 芦笋及其不同萃取物对CCl₄致急性肝损伤的保护作用的比较[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(1): 11–7.
- [15] Wang M L, Niu J L, Ou L, et al. Zerumbone protects against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury in mice via inhibiting oxidative stress and the inflammatory response: Involving the TLR4/NF- κ B/COX-2 pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24(10):1964.

Analysis of the mechanism of phellodendron amurense polysaccharide in the treatment of liver injury based on network pharmacology and *in vivo* experiments

Xue Juan¹, Yang Xin², Mo Gongrou¹, Liu Longjiang¹, Chen Biao¹, Chai Huifang¹

(College of Pharmacy, School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025)

Abstract Objective To analyze the effect and molecular mechanism of phellodendron amurense in the treatment of liver injury based on network pharmacology, and to verify the relevant prediction targets and the protective effect of phellodendron amurense extract-Phellodendron amurense polysaccharide on immune liver injury through mice.

Methods TC MSP and Swiss target prediction databases were used to retrieve and screen phellodendron amurense active components and action targets, and then obtain disease-related targets on GeneCards and OMIM websites, and take compounds and disease intersection targets for protein interaction. Analysis, GO biological function and KEGG signaling pathway enrichment analysis, followed by molecular docking of compounds and key target proteins, and finally established a mouse liver injury model induced by Daodou protein A (Con A) to explore the mechanism of phellodendron amurense extract in the treatment of liver injury. **Results** 37 active ingredients were screened. The key targets for their treatment were tumor necrosis factor α (TNF- α), serine/threonine protein kinase 1 (AKT1), signal transduction and transcription activation factor 3 (STAT3), epidermal growth factor receptor (EGFR) and integrin. Enzyme 3 (CASP3) and other enrichment analysis showed that phellodendron amurense might play a protective role in protecting the liver through molecular mechanisms such as positive regulation of MAPK cascade reaction, oxidative stress response and regulatory PI3K-Akt signaling pathway, lipid and atherosclerosis. Animal experiments had found that the gastric treatment of phellodendron amurense polysaccharide could improve the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in liver tissue, reduce the levels of serum alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and malonaldehyde (MDA) in liver tissue, and regulate serum inflammatory factor while the expression of interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor α (TNF- α), activated the expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), and reduced TNF- α mRNA expression in liver tissue. **Conclusion** Phellodendron amurense can intervene in lipid and atherosclerosis pathways by acting on targets such as TNF- α , AKT1, STAT3, EGFR and CASP3 to reduce oxidative stress and inflammatory reactions and achieve liver protection.

Key words phellodendron amurense; network pharmacology; polysaccharides; liver injury; molecular docking