

基于网络药理学和分子对接技术探讨四逆散治疗 Graves 病的作用机制

马文欣^{1,2}, 朱晓云², 徐婧^{1,2}, 付守强^{1,2}, 焦烁颖^{1,2}, 杨九天^{1,2}, 郑宇然^{1,2}, 汤阳^{1*}

1. 北京中医药大学, 北京 100029

2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

摘要: **目的** 利用网络药理学方法和分子对接技术探索四逆散治疗毒性弥漫性甲状腺肿 (Graves) 病的潜在活性成分、作用靶点和代谢通路, 为四逆散治疗 Graves 病的临床应用和深入阐明四逆散干预 Graves 病的作用机制提供理论参考。方法运用 TCMSP 平台及查阅文献筛选四逆散的主要活性成分及作用靶点。以 “Graves' disease” 为关键词, 挖掘 GeneCards、CTD、DisGeNET、OMIM、TTD 和 DrugBank 数据库中 Graves 病的相关靶点。利用 Cytoscape 软件构建 “中药 - 成分 - 靶点 - 疾病” 网络, 运用 String 平台构建蛋白互相作用 (PPI) 网络。运用 Metascape 平台对共同靶点通过 GO 数据库和 KEGG 数据库进行注释和富集分析。在 RCSB PDB 和 PubChem 数据库中获得成分和靶点的结构, 利用 pymol 软件和 autodock vina 软件进行分子对接。**结果** 四逆散治疗 Graves 病的主要活性成分可能为槲皮素、山柰酚、芹菜素、异鼠李素、柚皮素、异甘草素、木犀草素、葛根素等, PPI 网络中关键靶点为 AKT1、TNF、INS、IL6、VEGFA、TP53、JUN、CASP3、IL1B、MAPK3 等。GO 与 KEGG 分析主要代谢通路可能有 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、HIF-1 信号通路、p53 信号通路、细胞凋亡、Th17 细胞分化、Toll 样受体信号通路、甲状腺激素信号通路、VEGF 信号通路等。四逆散治疗 Graves 病的作用机制可能有调节免疫失衡、抑制细胞增殖和促进凋亡、抗氧化应激、抑制甲状腺血管新生和减轻外周组织器官损伤等。分子对接结果显示四逆散主要成分与治疗 Graves 病的关键靶点结合活性较高且对接构象较稳定。**结论** 四逆散可能通过多成分、多靶点影响多条代谢通路发挥治疗 Graves 病的作用, 为四逆散治疗 Graves 病的作用机制实验研究提供参考。

关键词: 四逆散; 毒性弥漫性甲状腺肿; 网络药理学; 分子对接; 槲皮素; 山柰酚; 芹菜素; 异鼠李素

中图分类号: R977

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2022)05-0931-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.05.003

To explore the mechanism of Sinisan in treatment of Graves' disease based on network pharmacology and molecular docking technology

MA Wen-xin^{1,2}, ZHU Xiao-yun², XU Jing^{1,2}, FU Shou-qiang^{1,2}, JIAO Shuo-ying^{1,2}, YANG Jiu-tian^{1,2}, ZHENG Yu-ran^{1,2}, TANG Yang¹

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Abstract: **Objective** The potential active components, action targets and metabolic pathways of Sinisan in treatment of Graves' disease were explored by using network pharmacology and molecular docking technology, so as to provide theoretical reference for the clinical application of Sinisan in treatment of Graves' disease and further elucidation of the mechanism of action of Sinisan in the intervention of Graves' disease. **Methods** The main active components and targets of Sinisan were screened by TCMSP platform and literature review. With “Graves' disease” as the key word, the related targets of Graves' disease were extracted from GeneCards, CTD, DisGeNET, OMIM, TTD and DrugBank databases. Cytoscape software was used to construct the network of “TCM - component - target - disease”, and String platform was used to construct PPI network. Metascape platform was used to annotate and enrich common targets through GO database and KEGG database. The structures of components and targets were obtained from RCSB PDB and PubChem databases, and molecular docking was performed using Pymol software and Autodock Vina software. **Results** The main

收稿日期: 2022-02-25

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82004337); 国家自然科学基金面上项目 (81774293); 北京中医药大学新教师启动基金项目 (2020-YJB-XJSJJ-002)

作者简介: 马文欣 (1992—), 女, 在读博士研究生, 从事中医药治疗甲状腺疾病的基础及临床研究。E-mail: 329159631@qq.com

*通信作者: 汤阳 (1991—), 男, 博士, 讲师, 从事伤寒论教学及经方的临床与基础研究。E-mail: tangyang@bucm.edu.cn

active ingredients of Sinisan in treatment of Graves' disease may be quercetin, kaempferol, apigenin, isornetin, naringin, isorritin, luteolin, puerarin, etc. The key targets in PPI network are AKT1, TNF, INS, IL-6, VEGFA, TP53, JUN, CASP3, IL-1B, MAPK3, etc. The main metabolic pathways analyzed by GO and KEGG may include PI3K-Akt signaling pathway, TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, p53 signaling pathway, apoptosis, Th17 cell differentiation, Toll-like receptor signaling pathway, thyroid hormone signaling pathway, VEGF signaling pathway, etc. The mechanism of Sinisan in treating Graves' disease may include regulating immune imbalance, inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis, resisting oxidative stress, inhibiting thyroid angiogenesis and alleviating peripheral tissue and organ injury. The molecular docking results showed that the main active components of Sinisan had high binding activity and stable docking conformation with the key target of Graves' disease. **Conclusion** Sinisan may affect multiple metabolic pathways through multiple components and multiple targets, which can provide reference for experimental study on the mechanism of action of Sinisan in the treatment of Graves' disease.

Key words: Sinisan; Graves' disease; network pharmacology; molecular docking; quercetin; kaempferol; apigenin; isornetin

毒性弥漫性甲状腺肿 (Graves) 病是由于甲状腺刺激性抗体 (TSAb) 刺激促甲状腺素受体 (TSHR), 以弥漫性甲状腺肿大与分泌功能亢进为主要表现的器官特异性自身免疫性疾病, 是在碘含量高的地区中甲状腺功能亢进最普遍的原因, 发病率近年来有上升趋势, 患病率为 1%~1.5%^[1], 多发于女性。抗甲状腺药物是我国当前治疗 Graves 病的主要方式^[2], 但治疗后复发率高, 停药 1 年后复发率可达 50%^[3], 甲状腺肿大程度较高、严重甲状腺功能亢进或持续高滴度 TSHR-Ab 的患者在治疗停止后最有可能复发^[4]。中医药治疗 Graves 病具有多靶点、个体化的独特优势, 可以减少抗甲状腺药物用量从而降低不良反应, 在改善患者症状和降低自身抗体等方面具有较好的疗效, 近年来也取得了较多的研究成果^[5]。四逆散 (柴胡、白芍、枳实、甘草) 是临床常用于 Graves 病治疗的经典名方, 本研究旨在运用网络药理学方法^[6]从整体角度系统地分析四逆散的有效活性成分和作用靶点, 并采用分子对接技术进行验证, 探索四逆散治疗 Graves 病的潜在作用机制, 为实验研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 四逆散有效成分及相关靶点筛选

运用中药系统药理学数据库与分析平台^[7] (TCMSP, <http://tcmsp.w.com/tcmssp.php>) 检索四逆散 (柴胡、白芍、枳实、甘草) 的化学成分, 以口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (DL) ≥ 0.18 进行药理学吸收、分布、代谢、排泄参数 (ADME) 筛选, 初步获得化学成分及其蛋白质作用靶点, 并查找已发表的文献报道进行有效成分的补充。筛选结束后, 利用 Uniprot 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org>) 将蛋白质靶点的名称进行标准化统一规范。

1.2 Graves 病相关靶点筛选

以 “Graves' disease” 为关键词, 挖掘 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、CTD 数据库^[8] (<http://ctdbase.org/>)、DisGeNET 数据库^[9] (<https://www.disgenet.org/>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org>)、TTD 数据库 (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd>) 中治疗 Graves 病的相关靶点, 并检索 DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.ca>) 中治疗 Graves 病的抗甲状腺药物作用靶点予以补充^[10]。合并疾病数据库靶点后, 删除重复项, 得到 Graves 病相关靶点。筛选结束后, 利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 将蛋白质靶点名称进行标准化统一规范。

1.3 构建 “中药 - 成分 - 靶点 - 疾病” 网络

使用微生信在线工具^[11] (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 对四逆散作用靶点与 Graves 病靶点取交集获得共同靶点, 绘制韦恩图。使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 “中药 - 成分 - 靶点 - 疾病” 网络。以 “节点” (node) 代表属性类型; “边” (edge) 代表交互关系。采用 Cytoscape 3.7.2 软件内置 Network Analyzer 分析网络, 重点关注连接度 (degree), 连接度越大, 涉及的生物功能越多, 重要性也就越高, 从而筛选出四逆散中发挥治疗 Graves 病作用的重要成分。

1.4 构建靶点蛋白互作 (PPI) 网络

将四逆散有效成分和 Graves 病共同靶点提交至 String 11.5 平台^[12]构建 PPI 网络, 生物种类设为 “Homo sapiens”, 最小互作阈值设为 “high confidence” (置信度 > 0.7), 其余为默认设置, 获得 PPI 网络。将数据导出后导入 CytoScape 3.7.2 软件进行网络分析并绘制网络图, 根据 degree 值大小筛选主要作用靶点。

1.5 四逆散 - Graves 病靶点的基因本体 (GO) 与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

运用 Metascape 平台^[13] (<http://metascape.org/gp/index.html>) 对四逆散治疗 Graves 病的靶点通过 GO 数据库[包括细胞组分 (CC)、分子功能 (MF)、生物过程 (BP)]和 KEGG 数据库进行注释和富集分析, 获得其发挥治疗作用主要的生物学过程及代谢通路, 保存数据结果并采用微生信在线工具对数据进行可视化。

1.6 分子对接验证

在 RCSB PDB 数据库^[14] (<https://rcsb.org>) 中下载四逆散 - Graves 病靶点 PPI 网络中 degree 值排名前 5 的靶点的 pdb 格式结构文件, 用 pymol 软件进行加氢、去水、去除溶剂分子、去除不需要的配体、同源二聚体仅保留单链等操作, 然后用 autodocktools 软件导出为 pdbqt 格式文件。在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载四逆散治疗 Graves 病“中药 - 成分 - 靶点 - 疾病”网络中 Degree 值排名前 10 的活性成分的 sdf 格式结构文件, 用 pymol 软件进行加氢后导出为 pdb 格式文件, 然后用 autodocktools 软件定义 Torsion 后导出为 pdbqt 格式文件。在 autodocktools 软件中打开受体蛋白和配体小分子的 pdbqt 格式文件, 生成对接盒子并调整参数, 将 Exhaustiveness 设置为 10, 运行 autodock vina 将 5 个靶点与 10 个四逆散活性成分进行对接, 分析得到的对接结果, 根据结合能和生成的氢键数对结合强度和活性进行评价。

2 结果

2.1 四逆散活性成分及作用靶点的获取

共提取柴胡化学成分 349 种、白芍化学成分 76 种、枳实化学成分 65 种、甘草化学成分 280 种, 经 ADME 筛选、文献补充并删除非人源靶点的化学成分后, 共获得柴胡活性成分 16 种、白芍 10 种、枳实 21 种、甘草 90 种, 共 127 种活性成分。共获得作用靶点柴胡 217 个、白芍 95 个、枳实 157 个、甘草 234 个, 合并后删除重复项、无效项后共得到靶点 299 个。

2.2 Graves 病相关靶点的获取

从 GeneCards 数据库获得 Graves 病靶点 4 802 个, 因靶点数量过多, Relevance score 最高值为 60.91、最低值为 0.07, 根据经验按 Relevance score 值大于四分位数 (6.65) 进行筛选后保留靶点 1 200 个。从 CTD 数据库中获得有直接证据的靶点 26 个;

获得无直接证据的靶点 7 371 个, 因靶点数量过多, Inference Score 最高值为 29.25、最低值为 1.82, 根据经验保留 Inference Score 前 15% (4.71) 的作用靶点共 1 109 个。从 DisgeNet 数据库获得 Graves 病靶点 585 个, 从 OMIM 数据库获得 Graves 病靶点 181 个, 从 TTD 数据库获得 Graves 病靶点 1 个, 从 Drugbank 数据库获得 Graves 病靶点 10 个。将各数据库获得相关靶点合并后删除重复项, 最终获得 2 541 个 Graves 病相关疾病靶点。

2.3 四逆散治疗 Graves 病的“中药 - 成分 - 靶点”网络的构建

将筛选的四逆散活性成分靶点与 Graves 病靶点取交集, 通过用微生信在线工具绘制韦恩图, 得到四逆散成分 - Graves 病共同靶点 193 个, 见图 1。

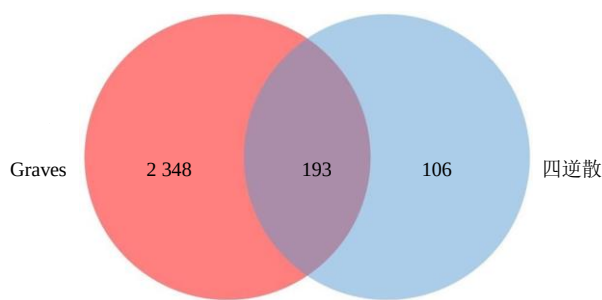


图 1 四逆散活性成分 - Graves 病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of Graves' disease target and Sinisan active ingredient target

使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药 - 成分 - 靶点”网络并进行分析, 得到网络图见图 2。图中共有 324 个节点 (包括 4 种中药、127 种活性成分、193 个靶点) 和 2 130 条边, 矩形代表中药、圆形代表主要活性成分 (靶点下方横向排列成分为多种中药共有成分)、菱形代表共同靶点, degree 值大小以颜色深浅及节点大小表示, degree 值排名前 20 的活性成分见表 1。活性成分 degree 值越高说明该成分与 Graves 病靶点的相互作用越多, 推测四逆散治疗 Graves 病的主要活性成分主要为槲皮素、山柰酚、芹菜素、异鼠李素、柚皮素、异甘草素、木犀草素、葛根素、川陈皮素、刺芒柄花素等。

2.4 四逆散 - Graves 病靶点 PPI 网络

将共同靶点提交至 String 11.5 平台, 得到 PPI 网络图, 见图 3-A。将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 得到四逆散治疗 Graves 病靶点的 PPI 网络, 见图 3-B, degree 值大小以颜色深浅及节点大小表示。degree 值越高代表该靶点与其他靶点相互作用关系

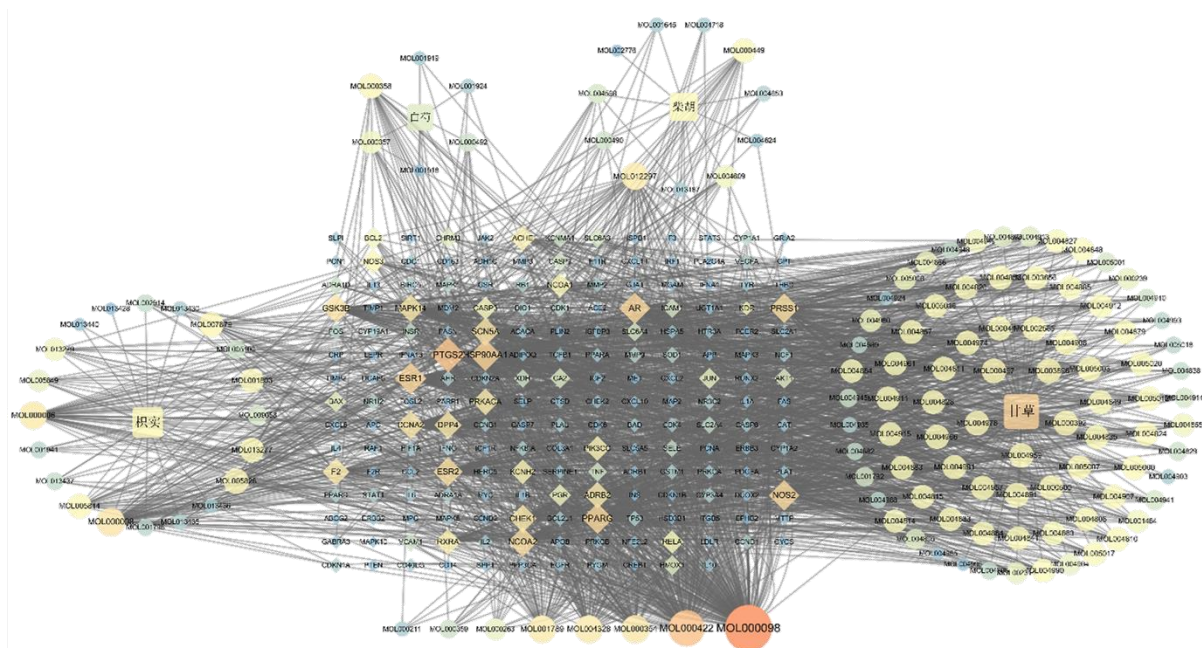


图 2 “四逆散 - 成分 - 靶点”网络图

Fig. 2 Network diagram of “Sinisan - component - target”

表 1 四逆散主要活性成分

Table 1 Main active ingredients of Sinisan

Mol ID	活性成分	OB/%	DL	来源药物
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	柴胡、甘草
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	柴胡、白芍、甘草
MOL000008	apigenin	23.06	0.21	枳实
MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31	柴胡、甘草
MOL004328	naringenin	59.29	0.21	枳实、甘草
MOL001789	isoliquiritigenin	85.32	0.15	柴胡、甘草
MOL000006	luteolin	36.16	0.25	枳实
MOL012297	puerarin	24.03	0.69	柴胡
MOL005828	nobiletin	61.67	0.52	枳实
MOL000392	formononetin	69.67	0.21	甘草
MOL003896	7-methoxy-2-methyl isoflavone	42.56	0.20	甘草
MOL007879	tetramethoxyluteolin	43.68	0.37	枳实
MOL000497	licochalcone a	40.79	0.29	甘草
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	白芍
MOL004978	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	36.21	0.52	甘草
MOL004959	1-methoxyphaseollidin	69.98	0.64	甘草
MOL005814	tangeretin	21.38	0.43	枳实
MOL013277	isosinensetin	51.15	0.44	枳实
MOL004891	shinpterocarpin	80.30	0.73	甘草
MOL000500	vestitol	74.66	0.21	甘草

越强, degree 值排名前 20 的靶点网络节点特征参数见表 2, 预测可能是四逆散治疗 Graves 病的核心作用靶点, 分别为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、胰岛素 (INS)、白细胞介素-6 (IL-6)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、肿瘤蛋白 P53 (TP53)、Jun 原癌基因

(AP-1 转录因子亚基, JUN)、半胱天冬酶 3 (CASP3)、白细胞介素-1 β (IL-1B)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、信号传导与转录激活因子 3 (STAT3)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、雌激素受体 1 (ESR1)、缺氧诱导因子 1 α 亚基 (HIF1A)、MYC 原癌基因 (MYC)、前

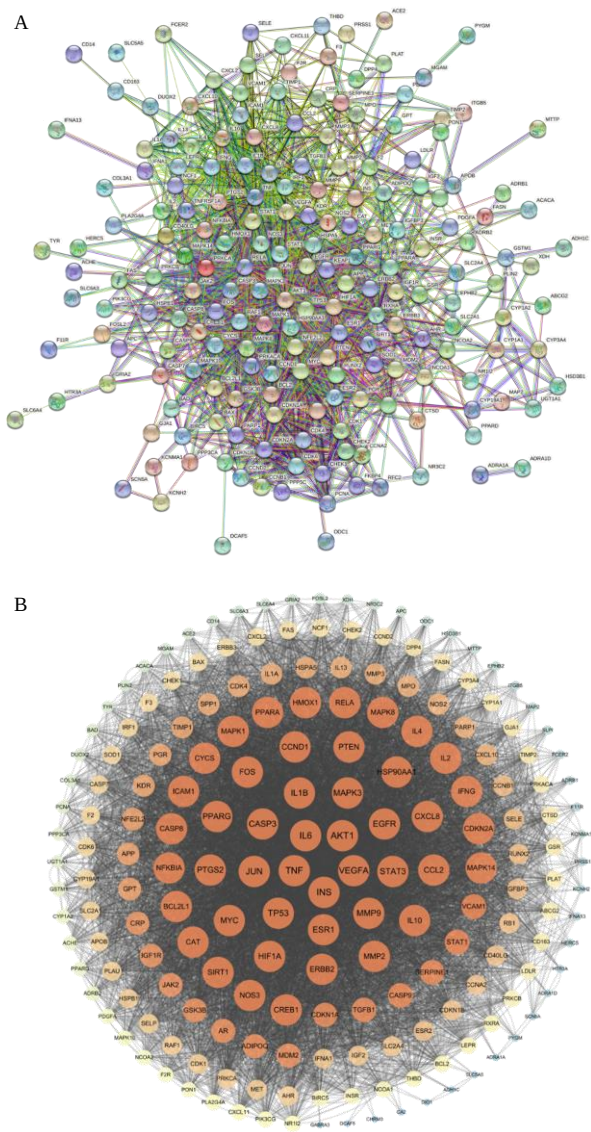


图 3 四逆散 - Graves 病靶点 String (A) 和 Cytoscape (B) 软件 PPI 网络

Fig. 3 Sinisan-Graves' disease target String (A) and Cytoscape (B) software PPI network

列腺素 - 内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、Fos 原癌基因 (AP-1 转录因子亚基, FOS)、细胞周期蛋白 D1 (CCND1)。

2.5 GO 与 KEGG 富集分析

将四逆散治疗 Graves 病的作用靶点上传至 Metascape 平台进行 GO 与 KEGG 富集分析, KEGG 富集结果中剔除明显不相关疾病代谢通路, 并运用微生物在线工具进行可视化, 见图 4。四逆散主要参与的 BP 包括对无机物、脂多糖、损伤的应答、药物、氧含量、细胞外刺激的应答, 细胞对有机环化合物、对氮化合物的应答, 老化, 对细胞成分运

表 2 四逆散治疗 Graves 病主要作用靶点网络节点特征参数
Table 2 Characteristic parameters of network nodes of main targets of Sinisan therapy for Graves' disease

排名	靶点	连接度	紧密度	中心性
1	AKT1	288	0.793 4	0.052 9
2	TNF	264	0.750 0	0.032 3
3	INS	262	0.752 9	0.039 0
4	IL-6	262	0.752 9	0.039 7
5	VEGFA	256	0.738 5	0.020 5
6	TP53	254	0.735 6	0.023 5
7	JUN	244	0.719 1	0.021 8
8	CASP3	238	0.711 1	0.015 0
9	IL-1B	236	0.713 8	0.020 4
10	MAPK3	234	0.705 9	0.022 0
11	EGFR	226	0.023 2	0.698 2
12	STAT3	226	0.013 4	0.693 1
13	MMP9	222	0.020 8	0.688 2
14	ESR1	222	0.027 7	0.698 2
15	HIF1A	216	0.010 4	0.683 3
16	MYC	214	0.024 4	0.685 7
17	PTGS2	206	0.008 6	0.669 0
18	PPARG	206	0.014 5	0.669 0
19	FOS	192	0.016 0	0.659 8
20	CCND1	190	0.007 1	0.653 1

动、凋亡信号通路、蛋白磷酸化、细胞死亡的正调控, 循环系统过程, 类固醇激素反应, 白细胞分化, 对细胞分化、细胞增殖的负调控等。四逆散作用的主要 CC 为膜筏、膜微域、小窝、质膜筏、质膜外侧边、细胞膜侧边、受体复合体、周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物、囊腔、蛋白激酶复合体、内质网腔、分泌颗粒内腔等。四逆散作用的主要 MF 有 DNA 结合转录因子结合、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、转录因子结合、蛋白结构域特异性结合、激酶链接、细胞因子受体结合、蛋白激酶链接、细胞因子活性、信号受体激活物活性、信号受体调节活性等。四逆散治疗 Graves 病作用的主要代谢通路见图 5。可能有 PI3K-Akt 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、IL-17 信号通路、HIF-1 信号通路、p53 信号通路、foxo 信号通路、细胞凋亡、Th17 细胞分化、Toll 样受体信号通路、甲状腺激素信号通路、催乳素信号通路、MAPK 信号通路、粘着斑、破骨细胞分化、雌激素信号通路、VEGF 信号通路、胰岛素抵抗、细胞因子受体相互作用、T 细胞受体信号通路等。

2.6 分子对接结果

将 PPI 网络中 degree 值排名靠前的靶点与四逆

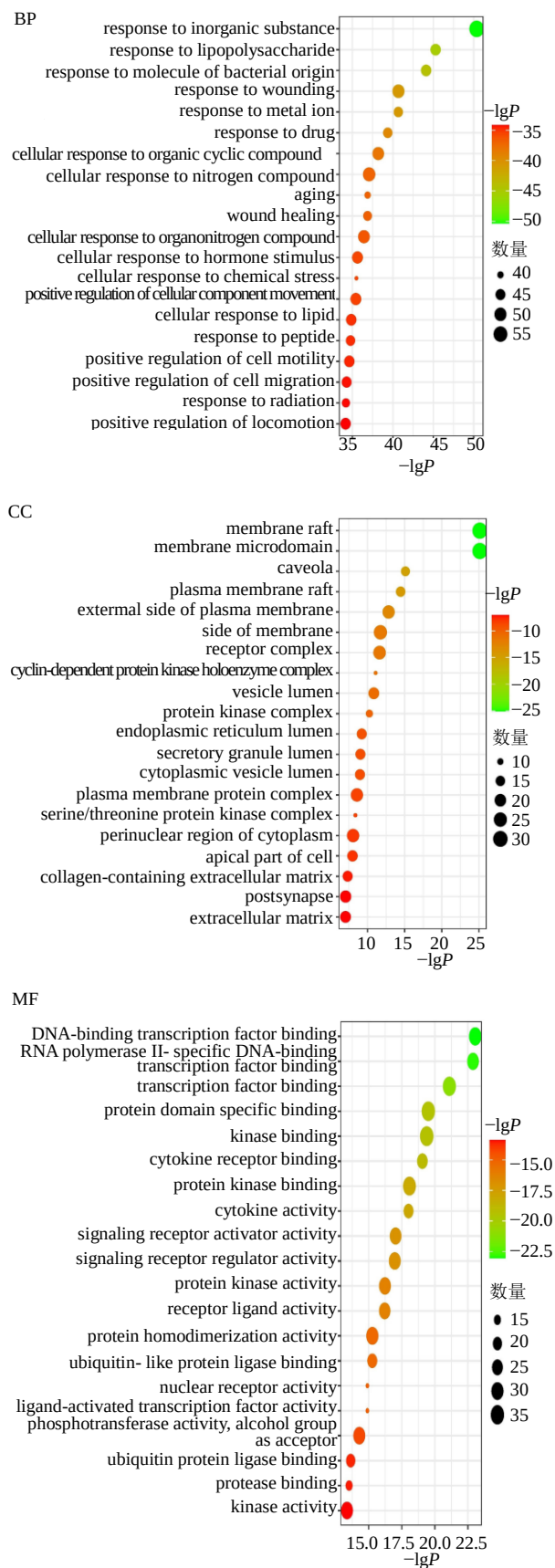


图 4 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

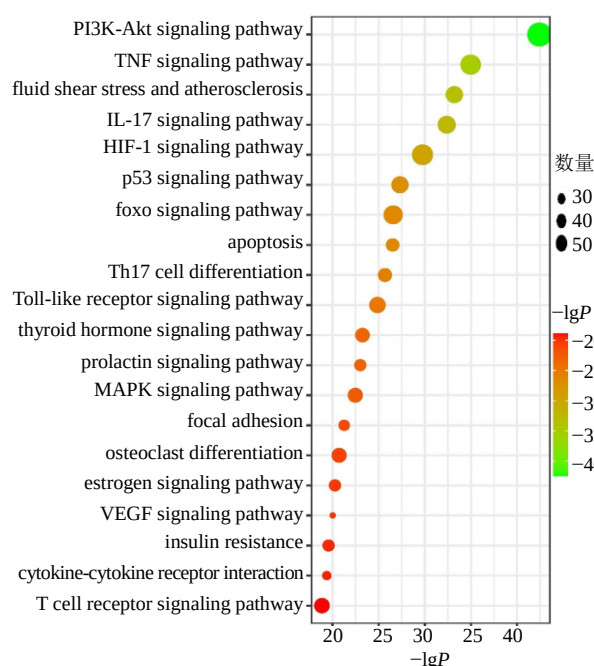


图 5 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis

散活性成分进行分子对接，受体分别为：AKT1 (PDB ID: 3cqu)、TNF (PDB ID: 1tnf)、INS (PDB ID: 1ben)、IL-6 (PDB ID: 1alu)。根据结合能和生成的氢键数对结合强度和活性进行评价，结合能越低、氢键数越多说明受体蛋白和配体小分子的结合构象越稳定、结合活性越高。受体蛋白与配体小分子两两之间最低结合能结果见图 6。图中标注数值为最低结合能，均 < -5 kJ/mol。分子对接结合能最低构象的 RMSD 值为所有构象中最低，表明对接结果具有较好的可靠性。选取氢键数 ≥ 2 的结合构象的相互作用进行可视化展示，见图 7。

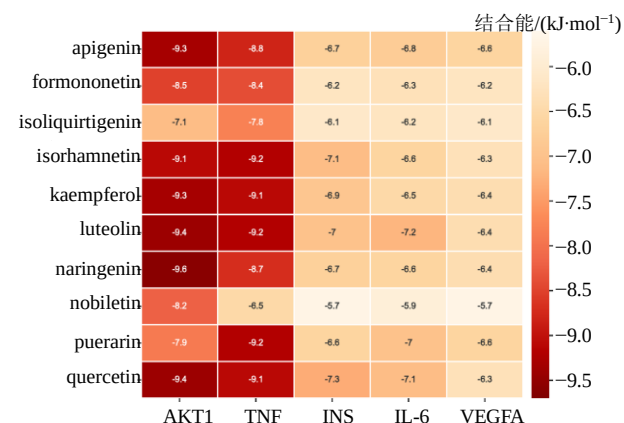


图 6 分子对接结合能热图

Fig. 6 Thermal diagram of molecular docking binding energy

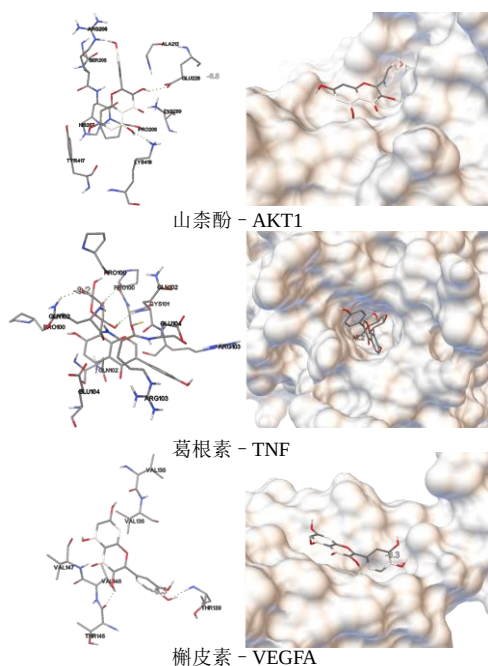


图 7 分子对接结合构象相互作用示意图

Fig. 7 Schematic diagram of molecular docking bound conformational interaction

3 讨论

3.1 四逆散治疗 Graves 病的理论基础

从西医观点来看, Graves 病的发病部位主要为甲状腺, 其在中医理论体系中并无直接对应的脏腑。有学者认为可将甲状腺划为“奇恒之府”范畴, 甲状腺激素的功能涵盖肝之疏泄、心主血脉、肾主生长发育生殖、脾胃化生水谷精微等多个脏腑的生理功能^[15]。Graves 病患者发病多因情志不遂, 肝气郁结, 郁而化火, 腠理开泄, 则见怕热多汗, 日久则耗气伤阴; 气郁痰阻, 结于颈前, 则发生甲状腺肿大; 肝气乘脾, 肝火及胃, 则见多食易饥、腹泻; 火热伤阴, 筋失所养, 阴虚风动, 则见手颤。因此, Graves 病的病位主要在肝脾, 病机主要为气滞痰阻、阴虚火旺, 治疗上应以化痰散结、养阴清火为基本治法。

四逆散组方源自张仲景《伤寒论》少阴病篇, 由柴胡、芍药、枳实和甘草 4 味药组成。方中柴胡与白芍相伍, 一散一收, 气血兼顾, 养肝体而助肝用。枳实破气消积, 化痰散痞, 与柴胡相伍, 共行肝脾之气; 与白芍相伍, 又可理气和血。白芍与甘草相伍, 酸甘化阴, 养血柔肝舒筋。全方药物配伍精当, 临床广泛应用于肝脾不和诸证。四逆散既可理气解郁、化痰散结, 又可养阴柔肝舒筋, 在临床

中常作为治疗 Graves 病的基本方, 常配以清肝火、散痰结、补气阴之品, 具有较好的临床疗效^[16-18]。实验研究表明, 四逆散具有抗抑郁、镇静催眠、保肝、调节免疫等作用^[19], 而 Graves 病发病机制为免疫紊乱, 常伴有肝损害、失眠、焦虑抑郁等表现。因此, 四逆散治疗 Graves 病的作用机理具有较大的研究价值。

3.2 从网络药理学及分子对接结果推测四逆散治疗 Graves 病的潜在作用机制

3.2.1 调节免疫失衡 网络药理学结果中显示, 四逆散治疗 Graves 病的核心靶点可能有 IL-6、IL-1 β 、TNF、STAT3、AKT1 和 HIF1A, 参与的主要生物过程有白细胞分化, 涉及的主要 MF 包括细胞因子受体结合和细胞因子活性, 主要代谢通路可能有 PI3K-Akt 信号通路、IL-17 信号通路、Th17 细胞分化、细胞因子受体相互作用和 T 细胞受体信号通路。KEGG 富集结果中显示, Th17 细胞分化通路上包括 FOS、HIF1A、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-6、JUN、NFKBIA、MAPK3、STAT3、TGFB1 等靶点, 表明这些靶点与 Th17 细胞的分化调控有关。

Graves 病目前公认的发病机制为免疫系统紊乱, 错误识别自身抗原、激活 B 细胞而产生自身抗体, 促进甲状腺细胞增殖与甲状腺激素合成分泌过多, 与 T 细胞亚群中的 Th1/Th2 细胞比例失衡、Th17/Treg 细胞比例失衡等有关^[20], Treg 细胞比例下降而免疫抑制功能失调^[21], 而各种细胞因子在 T 细胞分化和免疫过程中起到重要作用。IL-6 为 Th2 细胞分泌的细胞因子, 可以激活自身反应性 T 细胞以及 B 细胞增殖与分化, 导致甲状腺免疫功能紊乱, 在 Graves 病中高表达, 治疗后 IL-6 水平下降^[21]。IL-6 还可以激活 STAT3 信号通路, 从而诱导 Th17 细胞分化^[22]。TNF- α 和 IL-1 β 在启动适应性免疫反应中起重要作用。IL-1 β 可以改变细胞信号传导、迁移和细胞因子产生, 并在不同条件下对 T 细胞分化产生不同影响, 可以通过促进效应 T 细胞 (Teff) 的增殖来破坏外周免疫耐受, 与自身免疫性疾病有关, 并且可以诱导和维持致病性的 Th17 细胞^[22]。除此之外, 不同的 T 细胞亚群有不同的代谢程序, 同样也调控着 T 细胞的分化。HIF-1 α 是 PI3K/Akt 信号通路上的转录因子哺乳动物雷帕霉素激酶 1 (mTORC1) 的下游信号, 其在缺氧条件下可以诱导糖酵解, 是 Th17 细胞和 Treg 细胞相互分化的关键决定因素。PI3K 和 mTOR 过度表达导致的代谢紊

乱可导致 Foxp3 基因位点的甲基化增加,从而降低 Treg 细胞的稳定性^[23]。

研究表明槲皮素、山柰酚、异甘草素、葛根素等成分具有调节免疫的作用。槲皮素可以通过调节 T 细胞亚群辅助性 T 细胞 17 (Th17) /调节性 T 细胞 (Treg) 平衡改善类风湿性关节炎 (RA)^[24]和免疫性肝损伤^[25]。山柰酚可以抑制小鼠 T 淋巴细胞的体外活化和增殖,阻止 T 淋巴细胞进入细胞分裂的 DNA 合成期 (S 期) 和 DNA 合成后期 (G₂ 期) /有丝分裂期 (M 期)^[26]。异甘草素能直接与 IKK β 的 Cys46 特异性结合,在体内或体外抑制 T 淋巴细胞活化^[27]。葛根素在食物过敏小鼠模型中诱导视黄酸生成增加,从而增强了 Treg 细胞的产生,因此葛根素有可能治疗 Treg 缺乏的免疫疾病^[28]。分子对接结果显示 IL-6、AKT1 和 TNF 均与四逆散中主要活性成分对接良好,结合能较低,表明结合活性较高。因此,四逆散有可能通过调节 Graves 病的免疫失衡发挥治疗作用。

3.2.2 抑制细胞增殖和促进凋亡 网络药理学结果中显示,四逆散治疗 Graves 病的核心靶点可能有 TP53、JUN、CASP3、EGFR、FOS 和 CCND1,参与的主要生物过程有凋亡信号通路、细胞死亡的正调控和对细胞增殖的负调控,主要代谢通路有细胞凋亡。KEGG 富集结果中显示,细胞凋亡通路上包括 AKT1、FAS、BAD、BAX、BCL2、BCL2L1、CASP3、CASP7、CASP8、CASP9、FOS、JUN、NFKBIA、MAPK3、TNF、TP53 等靶点,表明这些靶点与细胞凋亡的调控有关。

Graves 病甲状腺弥漫性肿大,宏观上表现为甲状腺的体积增大,微观上则表现为甲状腺滤泡上皮细胞异常增多,其增殖与凋亡失衡,细胞增殖大于凋亡,因此恢复其增殖与凋亡的平衡是减轻甲状腺肿大的关键。Fas/FasL 及 BCL-2 蛋白家族 (BAD、BAX、BCL2、BCL2L1 等) 均在细胞凋亡中具有重要作用,其中 Fas/FasL、BCL-2 和 BAD 具有促凋亡作用,而 BAX 具有抗凋亡作用^[29]。表皮生长因子 (EGF) 具有广泛的生长效应,在甲状腺中 EGF 可促进甲状腺细胞生长,但与促甲状腺激素 (TSH) 的不同之处在于抑制而不是刺激甲状腺激素的合成。研究显示,在正常甲状腺中,EGF 和 EGFR 的免疫组化主要定位于细胞质;而在 Graves 病中,EGF 和 EGFR 在细胞质染色强烈,并且在细胞核阳性染色较多^[30]。Caspase-3 为一种半胱氨酸 - 天冬氨

酸蛋白酶,在细胞凋亡的执行阶段起着核心作用,参与负责细胞凋亡执行的半胱天冬酶的激活级联,裂解并激活 caspase-6、caspase-7 和 caspase-9^[31]。研究表明,Graves 病模型小鼠的甲状腺中 Caspase-3 表达显著升高,而经丹栀复方治疗后 Caspase-3 表达显著下降^[32]。

研究表明槲皮素、山柰酚、异甘草素、葛根素、木犀草素、川陈皮素等成分可以抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、诱导细胞周期阻滞,多集中在抗肿瘤作用的研究中^[33-37]。槲皮素可以抑制成纤维细胞增殖和透明质酸产生,可用于 Graves 眼病的治疗^[38]。甲肿消可以通过阻滞细胞由 G₀/G₁ 期向 S 期转换而抑制甲状腺细胞增殖,还可能通过上调 Bax/Bcl-2 的比值诱导小鼠甲状腺细胞 (FRTL 细胞) 凋亡^[39-40],而四逆散与甲肿消含有许多相同的中药活性成分。因此,四逆散有可能通过调节 Graves 病中甲状腺滤泡上皮细胞的增殖与凋亡失衡发挥治疗作用。

3.2.3 抗氧化应激 网络药理学结果中显示,四逆散治疗 Graves 病主要参与的生物过程包括对氧含量的应答。Graves 病的甲状腺毒症是一种代谢亢进状态,其特征是由于细胞内 ATP 和氧气的大量消耗以及线粒体呼吸链功能障碍导致生理抗氧化系统饱和,从而促进外周组织和甲状腺中活性氧 (ROS) 的产生。因此,氧化应激在 Graves 病中可能有两方面的作用,一方面可能损害周围组织,导致甲亢临床表现;另一方面可能会损害甲状腺细胞,使自身抗原暴露于免疫系统,使自身免疫反应恶化^[41]。动物模型研究表明,甲状腺毒症会促进氧化应激以及生理抗氧化机制的反应^[42-43]。在未经治疗的甲亢患者中血清、血浆和红细胞中氧化应激参数水平高于正常组,经抗甲状腺药物治疗后全身氧化应激负荷降低^[44-45]。硒等抗氧化剂已被提议用于改善抗甲状腺药物对患者甲状腺毒症的作用,以及改善 Graves 眼病患者的眼眶组织重塑^[46]。研究表明槲皮素、山柰酚、异甘草素、异鼠李素、木犀草素、葛根素等成分均具有抗氧化应激作用,作用机制包括激活核因子 NF-E2 相关因子 (Nrf2)、血红素氧合酶 1 (HO-1) 等抗氧化酶的表达等^[33-37, 47-48]。因此,四逆散有可能通过抗 Graves 病氧化应激状态发挥治疗作用。

3.2.4 抑制甲状腺血管新生 网络药理学结果中显示,四逆散治疗 Graves 病的主要作用靶点有 VEGFA,主要代谢通路有 VEGFA 信号通路,KEGG 富集结果显示 VEGFA 信号通路上包括 AKT1、

BAD、CASP9、KDR、NOS3、PRKCA、PRKCB、MAPK1、MAPK3、PTGS2、RAF1、VEGFA 等靶点。病理学观察发现 Graves 病患者甲状腺滤泡间质充血,血管密度明显增加^[49],提示 Graves 病甲状腺中存在大量血管新生。VEGF 是最强效的血管生成因子^[50],而 VEGFA 是促血管生成作用最强的亚型,通过与内皮细胞膜上的 VEGF 受体 2 (VEGFR2 即 KDR) 结合,直接促进内皮细胞的增殖,增加血管通透性,同时促进内皮细胞的迁移,从而促进血管形成。研究表明 Graves 病患者甲状腺组织及血清中 VEGF-A 表达显著升高^[51]。在甲状腺中,VEGFA 的合成分泌主要受 PI3K/Akt 通路调控^[49],PI3K、Akt 的磷酸化可促进 VEGF 的合成^[52]。在 PTU 诱导的小鼠甲状腺肿大模型中,特异性阻断 VEGFA 或 VEGFR2 可导致血管内皮细胞发生凋亡,血管密度、血管内皮窗孔和血流灌注减少;同时增生的甲状腺滤泡上皮细胞高度降低,形态恢复,甲状腺重量减轻。另外,抑制 VEGFR2 还可降低 TSH 应答基因 Pax8、TPO 和 NIS 的 mRNA 水平,从而抑制甲状腺细胞增殖和甲状腺激素合成^[49]。

研究表明,槲皮素能通过抑制 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达及 AKT 的磷酸化抑制人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)的增殖、细胞迁移及管腔形成^[53]。在高葡萄糖条件下,山柰酚可显著抑制人视网膜内皮细胞(HRECs)增殖,通过抑制 Src-Akt1-Erk1/2 信号通路的激活、靶向 VEGF 和 PGF 抑制 HRECs 的血管生成^[54]。另外中药还可以通过下调血管周围组织细胞促血管生成因子的旁分泌作用,从而抑制该组织的血管新生,此类研究以中药抗肿瘤血管新生相关较多,中医认为肿瘤为气、痰、瘀、毒等相互搏结日久而成,与甲状腺肿大的中医病因病机相似,治疗上亦重视化痰散结、理气活血,夏枯草等中药在 Graves 病及肿瘤的治疗中均较为常用,抑制血管新生也是中医药治疗肿瘤作用靶点的研究热点^[55]。分子对接结果显示,VEGFA 与四逆散中主要活性成分对接良好,结合能较低,表明结合活性较高。因此,四逆散可能通过抑制 Graves 病甲状腺血管新生发挥治疗作用。

3.2.5 减轻外周组织器官损伤 网络药理学结果中显示,四逆散治疗 Graves 病参与的生物过程包括对损伤的应答。甲状腺功能亢进常导致肝脏^[56]、心血管^[57]、肾脏^[58]等外周组织器官损伤,最常见的是抗甲状腺药物导致的药物性肝损伤。研究表明,槲

皮素、山柰酚、异甘草素、木犀草素、葛根素等成分具有减轻肝损伤、保护心肌等作用^[33-37,47]。槲皮素是一种有效的肝脏保护剂,主要通过调节 NF- κ B/TLR/NLRP3 信号通路抑制肝脏炎症、降低 PI3K/Nrf2 信号通路介导的氧化应激、激活自噬中的 mTOR、抑制与肝脏疾病发展相关的凋亡因子的表达等途径,通过多靶点和多途径发挥作用^[59]。山柰酚可抑制炎症标志物 TNF- α 、IL-6 表达、抑制 NF- κ B 核易位、激活 Nrf-2,具有抑制炎症反应和氧化应激的作用,可减轻高血糖引起的心脏损伤^[60-61]。异鼠李素可能通过改善糖尿病大鼠肾脏的氧化应激状态、抑制糖尿病大鼠肾组织中 NF- κ B 系统的过度活化、降低炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ICAM-1、TGF- β 1 等)的表达发挥保护糖尿病大鼠肾损伤的作用^[62]。Graves 病治疗的相关研究显示,槲皮素可以通过激活 Nrf2 信号通路从而增强抗氧化酶活性来减轻甲亢引起的肝损伤^[63],还可以通过调节心房钠泵(ANP)/一氧化氮(NO)信号通路减轻甲状腺功能亢进所致的心血管损伤^[64]。因此,四逆散还有可能减轻 Graves 病中的外周组织器官损伤,对抗甲状腺药物治疗起到增效减毒的作用。

4 结语

Graves 病是临床常见的自身免疫性内分泌代谢疾病,可严重影响患者的生活质量。四逆散在临床上治疗 Graves 病具有增效减毒的作用,但其作用机制尚未阐明。本研究通过“中药-成分-靶点-疾病”网络的构建,发现四逆散治疗 Graves 病的主要活性成分可能为槲皮素、山柰酚、芹菜素、异鼠李素、柚皮素、异甘草素、木犀草素、葛根素、川陈皮素、刺芒柄花素等。通过 PPI 网络的构建,发现 AKT1、TNF、INS、IL-6、VEGFA、TP53、JUN、CASP3、IL-1B、MAPK3 等可能是四逆散治疗 Graves 病的核心作用靶点。通过 GO 与 KEGG 分析,发现四逆散治疗 Graves 病作用的主要代谢通路可能有 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、HIF-1 信号通路、p53 信号通路、foxo 信号通路、细胞凋亡、Th17 细胞分化、toll 样受体信号通路、甲状腺激素信号通路、VEGF 信号通路等。分子对接显示,四逆散主要活性成分与治疗 Graves 病的关键靶点结合能较低、对接结构形成氢键,说明结合活性较高且对接构象较稳定。通过整体综合分析,推测四逆散治疗 Graves 病的作用机制可能有调节免疫失衡、抑制细胞增殖和促进凋亡、抗氧化应

激、抑制甲状腺血管新生和减轻外周组织器官损伤等。本研究通过网络药理学方法对四逆散治疗 Graves 病的主要活性成分、关键靶点和作用通路进行了探索, 并采用分子对接技术进行了验证, 以期对四逆散治疗 Graves 病的作用机制研究提供方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kahaly G J, Bartalena L, Hegedüs L, et al. 2018 European Thyroid Association Guideline for the management of Graves' Hyperthyroidism [J]. *Eur Thyroid Journal*, 2018, 7(4): 167-186.
- [2] Wang X, Teng X, Li C, et al. A Chinese survey on clinical practice in hyperthyroidism management: Comparison with recent studies and guidelines [J]. *Endocr Connect*, 2021, 10(9): 1091-1100.
- [3] Hussain Y S, Hookham J C, Allahabadia A, et al. Epidemiology, management and outcomes of Graves' disease-real life data [J]. *Endocrine*, 2017, 56(3): 568-578.
- [4] Masiello E, Veronesi G, Gallo D, et al. Antithyroid drug treatment for Graves' disease: Baseline predictive models of relapse after treatment for a patient-tailored management [J]. *J Endocrinol Invest*, 2018, 41(12): 1425-1432.
- [5] 廖为保, 刘怀珍, 王慧慧, 等. 中医药防治弥漫性毒性甲状腺肿的临床研究进展 [J]. *江西中医药大学学报*, 2020, 32(4): 120-124.
- [6] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [7] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6(1): 13.
- [8] Davis A P, Grondin C J, Johnson R J, et al. Comparative Toxicogenomics Database (CTD): Update 2021 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1138-D1143.
- [9] Piñero J, Ramírez-Anguita J M, Saüch-Pitarch J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D845-D855.
- [10] Wishart D S, Feunang Y D, Guo A C, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
- [11] Bardou P, Mariette J, Escudié F, et al. Jvenn: An interactive Venn diagram viewer [J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(1): 293.
- [12] Szklarczyk D, Gable A L, Nastou K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612.
- [13] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [14] Burley S K, Bhikadiya C, Bi C, et al. RCSB Protein Data Bank: Powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D437-D451.
- [15] 马文欣, 刘金民, 汤阳, 等. 从抑制血管新生探讨中医治疗 Graves 病的调血脉之法 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(14): 1224-1227.
- [16] 张静, 刘美莲. 四逆散病机源流探讨及治疗瘰疬气的体会 [J]. *辽宁中医杂志*, 2008(9): 1324-1325.
- [17] 张秀媛, 徐磊. 四逆散合生脉散加味辨治甲状腺功能亢进早期肝郁气滞证 [J]. *吉林中医药*, 2015, 35(10): 1019-1021.
- [18] 冯贺龙, 王晓雪, 张福利. 基于网络药理学的四逆散保肝作用机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(24): 6258-6268.
- [19] 吴红伟, 李东辉, 张育贵, 等. 四逆散研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(12): 13-20.
- [20] Rydzewska M, Jaromin M, Pasierowska I E, et al. Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases [J]. *Thyroid Res*, 2018, 11: 2.
- [21] 汤阳, 朱晓云, 冯慧, 等. 化痰散结方对 Graves 病小鼠 Th2 细胞因子表达的影响 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(9): 1962-1967.
- [22] Ganesh B B, Bhattacharya P, Gopisetty A, et al. Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31(10): 721-731.
- [23] Saravia J, Chapman N M, Chi H. Helper T cell differentiation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(7): 634-643.
- [24] 蒋海旭, 许杰, 陆清怡. 槲皮素治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(5): 243-250.
- [25] 魏彩冰. 基于 Th17/Treg 细胞平衡探讨槲皮素治疗免疫性肝损伤的作用机制 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- [26] 慕静曾, 曾耀英, 黄秀艳, 等. 山奈酚对小鼠 T 淋巴细胞体外活化、增殖和细胞周期的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(12): 1106-1108.
- [27] Yan F, Yang F, Wang R, et al. Isoliquiritigenin suppresses human T Lymphocyte activation via covalently binding cysteine 46 of IκB kinase [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(21): 34223-34235.
- [28] Yamamoto T, Matsunami E, Komori K, et al. The isoflavone puerarin induces Foxp3⁺ regulatory T cells by augmenting retinoic acid production, thereby inducing mucosal immune tolerance in a murine food allergy model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(3): 626-631.
- [29] 吴军, 郑庆范, 盛基尧, 等. 肝细胞癌中 bcl-2 家族对化疗耐药的研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2021, 25(1): 129-134.
- [30] Marti U, Ruchti C, Kämpf J, et al. Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues [J]. *Thyroid*, 2001, 11(2): 137-145.

- [31] Nicholson D W, Ali A, Thornberry N A, *et al.* Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [J]. *Nature*, 1995, 376(6535): 37-43.
- [32] 黄一薇. 丹栀复方对 Graves 病小鼠的甲状腺 Caspase-3, Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [33] 冯亚莉, 李浩, 刘娟, 等. 槲皮素研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5185-5193.
- [34] 魏海霞, 孔伟, 巩萍. 异甘草素的药效学研究进展 [J]. 药物生物技术, 2019, 26(5): 467-470.
- [35] 曹盼, 张樱山, 魏学明, 等. 葛根素药理作用研究新进展 [J]. 中成药, 2021, 43(8): 2130-2134.
- [36] 徐秋红, 杨洁, 李庆, 等. 密蒙花中木犀草素及其糖苷的药理研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(4): 53-57.
- [37] 韦金红, 韦金双, 吴炜邦, 等. 川陈皮素抗肿瘤机制研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(11): 1211-1216.
- [38] Lisi S, Botta R, Lemmi M, *et al.* Quercetin decreases proliferation of orbital fibroblasts and their release of hyaluronic acid [J]. *J Endocrinol Invest*, 2011, 34(7): 521-527.
- [39] 朱晓云, 祁鑫, 王兆礼, 等. 化痰散结中药对甲状腺细胞增殖与凋亡影响的实验研究 [J]. 河南中医学院学报, 2009, 24(1): 31-34.
- [40] 刘喜明, 张奋, 朱晓云, 等. 化痰散结中药对甲状腺细胞凋亡及 Bax Bcl-2 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2008(6): 1129-1131.
- [41] Lanzolla G, Marcocci C, Marinò M. Oxidative Stress in Graves Disease and Graves Orbitopathy [J]. *Eur Thyroid J*, 2020, 9(Suppl 1): 40-50.
- [42] Venditti P, Balestrieri M, Meo S D, *et al.* Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues [J]. *J Endocrinol*, 1997, 155(1): 151-157.
- [43] Candellone A, Gianella P, Ceccarelli L, *et al.* Redox unbalance in the hyperthyroid cat: A comparison with healthy and non-thyroidal diseased cats [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 136.
- [44] Aslan M, Cosar N, Celik H, *et al.* Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism [J]. *Endocrine*, 2011, 40(2): 285-289.
- [45] Larsen C B, Riis K R, Winther K H, *et al.* Treatment of hyperthyroidism reduces systemic oxidative stress, as measured by markers of RNA and DNA damage [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(7): e2512-e2520.
- [46] Lanzolla G, Marinò M, Marcocci C. Selenium in the treatment of Graves' hyperthyroidism and eye disease [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 11: 608428.
- [47] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山奈酚生物功能研究进展 [J]. 生命科学, 2017, 29(4): 400-405.
- [48] 闫姗, 南晓东, 马世杰, 等. 异鼠李素抗动脉粥样硬化作用的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14): 1771-1777.
- [49] Jang J Y, Choi S Y, Park I, *et al.* VEGFR2 but not VEGFR3 governs integrity and remodeling of thyroid angiofollicular unit in normal state and during goitrogenesis [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(6): 750-769.
- [50] Ferrara N. VEGF-A: A critical regulator of blood vessel growth [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2009, 20(4): 158-163.
- [51] Malkomes P, Oppermann E, Bechstein W O, *et al.* Vascular endothelial growth factor--marker for proliferation in thyroid diseases [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2013, 121(1): 6-13.
- [52] 耿军辉, 张丽军, 王亚丽, 等. PI3K/Akt 信号通路与肿瘤血管新生的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(9): 1462-1466.
- [53] 桂志鹏, 周宇宁, 胡月, 等. 槲皮素对血管内皮细胞的作用及其机制研究 [J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2018, 16(5): 385-390.
- [54] 徐晓红. 山奈酚对糖尿病视网膜病变中 VEGF 和 PGF 作用机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
- [55] 许婕, 陈腾. 中药抗肿瘤血管新生的研究进展 [J]. 医学综述, 2016, 22(7): 1274-1277.
- [56] 赵家军. 甲状腺疾病与肝脏 [J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22(3): 165-167.
- [57] Grais I M, Sowers J R. Thyroid and the heart [J]. *Am J Med*, 2014, 127(8): 691-698.
- [58] 靳贝芳, 卢钦镇, 张妍, 等. 氧化应激和炎症反应在甲状腺功能亢进小鼠肾损伤中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(9): 1625-1630.
- [59] Zhao X, Wang J, Deng Y, *et al.* Quercetin as a protective agent for liver diseases: A comprehensive descriptive review of the molecular mechanism [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(9): 4727-4747.
- [60] Chen X, Qian J, Wang L, *et al.* Kaempferol attenuates hyperglycemia-induced cardiac injuries by inhibiting inflammatory responses and oxidative stress [J]. *Endocrine*, 2018, 60(1): 83-94.
- [61] Suchal K, Malik S, Khan S I, *et al.* Molecular pathways involved in the amelioration of myocardial injury in diabetic rats by kaempferol [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 1001.
- [62] 邱书娟. 异鼠李素对糖尿病大鼠的肾脏保护及作用机制研究 [D]. 青岛: 山东大学, 2017.
- [63] Zhao P, Hu Z, Ma W, *et al.* Quercetin alleviates hyperthyroidism-induced liver damage via Nrf2 Signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2020, 46(4): 608-619.
- [64] 庄梅. 槲皮素通过 ANP/NO 信号通路保护甲亢致心血管损伤的作用 [D]. 泰安: 泰山医学院, 2018.