

基于网络药理学的大黄-桃仁药对治疗肝硬化作用机制初探

于尚玥¹, 李瑞吉¹, 王婷婷¹, 刘金辉¹, 左泽平², 李依林¹, 裴海鸾¹, 田时秋¹, 王志斌^{2*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 北京同仁堂研究院, 北京 100071

摘要: **目的** 通过网络药理学方法探讨大黄-桃仁药对治疗肝硬化的潜在作用机制。**方法** 从中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)中筛选大黄-桃仁药对的活性成分, 通过蛋白质数据库(Uniprot)获得各活性成分的潜在靶点, 利用TTD、GeneCards、PharmGkb、DrugBank及OMIM数据库获得肝硬化作用靶点。采用Cytoscape 3.7.2软件构建大黄-桃仁药对活性成分-肝硬化-靶点网络模型, 利用String平台绘制蛋白相互作用(PPI)网络。通过R studio软件、Bioconductor软件等平台分析筛选出的靶蛋白, 获得基因本体论(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析结果, 取前30条大黄-桃仁药对治疗肝硬化的信号通路。**结果** 得到符合条件的大黄-桃仁药对药对活性成分29个, β -谷甾醇、常春藤皂苷、芦荟大黄素与泽兰黄酮素等为主要有效成分, 作用于肝硬化的22个潜在靶点, 从PPI网络得到TP53、MAPK3、HSP90等9个关键靶点, 富集分析结果发现大黄-桃仁药对治疗肝硬化的相关生物过程主要包括干预调控血管系统的生成发育、上皮细胞增殖、脂质代谢、氧化应激等, 通过影响癌症中的microRNAs(miRNAs)表达、PI3K-Akt信号通路、肝细胞癌以及乙型肝炎进程等发挥治疗肝硬化的作用。**结论** 大黄-桃仁药对通过调控血管系统生成发育、上皮细胞增殖、脂质代谢等对肝硬化起到直接或间接的治疗作用, 其可能作用机制包括癌症中的miRNAs表达、PI3K-Akt信号通路等。

关键词: 大黄-桃仁药对; 活性成分; 肝硬化; 网络药理学; β -谷甾醇

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)07-1312-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.012

Network pharmacology-based study on mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* in treatment of liver cirrhosis

YU Shangyue¹, LI Ruiji¹, WANG Tingting¹, LIU Jinhui¹, ZUO Zeping², LI Yilin¹, PEI Hailuan¹, TIAN Shiqiu¹, WANG Zhibin²

1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Beijing Institution of Tongrentang, Beijing 100071, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* in treatment of liver cirrhosis by network pharmacology. **Methods** With the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), the effective chemical components and target genes of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* were filtrated. Potential targets of active components were obtained through the Protein Database (UNIPROT). According to the TTD、GeneCard、PharmGkb、DrugBank and OMIM Databases, targets of liver cirrhosis were collected. The Cytoscape 3.7.2 software was used to construct the *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* active components-liver cirrhosis-targets network. String platform was used to construct a protein-protein interaction (PPI) network. Gene ontology (GO) enrichment and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) signaling pathways analysed of screened target proteins were employed by R and Bioconductor software, and the top 30 of them were selected. **Results** A total of 29 bioactive components of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* could act on 22 potential targets of liver cirrhosis. Nine key therapeutic targets were collected such as TP53、MAPK3、HSP90 by the constructed PPI network. The enrichment analysis showed that the *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* treatments for liver cirrhosis signal pathways including regulation of vasculature development and angiogenesis, epithelial cell proliferation, lipid metabolic process,

收稿日期: 2021-12-06

第一作者: 于尚玥, 女, 博士研究生在读, 研究方向为药理毒理研究。E-mail: 1343608173@qq.com

*通信作者: 王志斌, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药质量控制标准及药理毒理研究。E-mail: wangzhibin4804@126.com

response to oxygen levels and so on. *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* anti-liver cirrhosis by changing biological related process such as microRNAs (miRNAs) in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, hepatocellular carcinoma, hepatitis B. **Conclusion** *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* had direct or indirect therapeutic effects on liver cirrhosis through regulating vasculature and angiogenesis, epithelial cell proliferation, regulation of lipid metabolic process and so on. The possible potential signal pathways including miRNAs in cancer, PI3K-Akt signaling pathway and so on.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen*; active ingredients; liver cirrhosis; network pharmacology; beta-sitosterol

肝硬化是一种慢性进行性肝病,常由一种或多种病因反复长期作用刺激导致的肝脏组织病理学改变,包括肝细胞坏死、肝细胞结节性再生、肝内外血管增生、结缔组织增生与纤维隔形成等^[1]。肝纤维化作为肝硬化病变的早期过渡阶段,是肝脏对损伤组织部位的修复反应,在肝细胞坏死、再生过程中形成的再生结节和弥漫性纤维结缔组织沉积。临床上西医多对肝硬化进行病因、病程发展及并发症的对症治疗,而中医往往整体考察肝纤维化-肝硬化病机,认为二者均属积聚范畴,临床在肝硬化早期就从脏腑整体层面诊治,采用活血化瘀为主辅以辨证治疗^[2],不对二者加以过度区分。

大黄-桃仁药对配伍使用来源已久,在下瘀血汤、大黄蛰虫丸等中成药方剂及破血消癥、行气理气、活血调经类中药配伍中均可见到^[1],多用于瘀热互结、活血化瘀、消痈解毒。中医理论认为,肝纤维化/肝硬化均属中医积聚范围,核心病机是湿热瘀毒、肝络瘀阻、热结血滞导致的正虚血瘀^[2-3]。大黄泻热祛瘀,桃仁活血通络,大黄-桃仁药对柔中有刚,专入血分,活血泄热之力较一般药物更甚,其方剂大黄蛰虫丸、下瘀血汤、大黄牡丹汤、鳖甲煎丸等对湿热瘀互结所致的肝硬化、肝纤维化均有治疗作用^[4]。然而,目前对于大黄-桃仁药对治疗肝硬化的多靶点作用机制尚不明确,无法很好阐述该药对与疾病的相互作用关系。因此,本研究采用网络药理学方法,旨在探寻大黄-桃仁药对对肝硬化可能的治疗靶点和作用机制,为拓宽其临床应用和实验研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物活性成分收集与靶点预测

应用中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)收集大黄-桃仁药对活性成分,以口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18为条件进行筛选,将活性成分导入Uniprot数据库,获得对应的潜在靶点信息。

1.2 肝硬化相关靶点的筛选

在数据库 TTD (<https://db.idrblab.org/ttd>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、PharmGkb (<https://www.pharmgkb.org/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>) 和 OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) 基因检索功能中输入与肝硬化相关的关键词“liver cirrhosis”“hepatocirrhosis”进行查询,删除重复基因和假阳性基因,使用 R 软件将其同大黄-桃仁药对作用靶点取交集,输出 Venn 图,得到大黄-桃仁药对活性成分改善肝硬化的潜在作用靶点。

1.3 药物-成分-靶点-疾病网络构建

使用 Cytoscape 3.7.2 软件分析构建大黄-桃仁药对治疗肝硬化的药物-成分-靶点-疾病网络图,各节点 (node) 代表药物、成分、靶点,节点间连线 (edge) 代表两者间作用关系。以度值 (degree) 衡量各节点重要性,度值大小表示此节点在网络中所具有的直接作用关系的多少;以介数中心性 (betweenness centrality) 衡量各节点的重要性,介数中心性反映此节点在网络中所起的桥梁作用的情况。

1.4 蛋白互作 (PPI) 网络构建及分析

使用 String 数据库,搜索大黄-桃仁药对活性成分改善肝硬化潜在作用靶点的相关基因并构建 PPI 网络,设置最高可信度 0.9,删除游离基因。使用 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化及拓扑分析,运用 CytoNCA 找寻 PPI 网络核心。把所有筛选条件均大于中位值的靶点定义为 PPI 网络核心。

1.5 生物过程分析

使用 R 软件并安装 Bioconductor 中“DOSE”“clusterProfiler”“pathview”的安装包。将“1.2”项得到的潜在作用靶点使用 R 语言软件进行生物过程分析,获得基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析结果。选取其中前 30 条作为大黄-桃仁药对治疗肝硬化的相关信号通路进行可视化

分析。

2 结果

2.1 大黄-桃仁药对活性成分

在TCMSP数据库以相关参数 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为条件筛选后最终得到大黄活性成分16个、桃仁活性成分23个,见表1和2。

2.2 大黄-桃仁药对活性成分与潜在靶点

将得到的大黄16个活性成分和桃仁23个活性成分导入Uniprot数据库,获得对应的潜在靶点信息。去除无潜在基因靶点的活性成分,筛选整理后得到大黄10个活性成分拥有相应潜在靶点110个,桃仁19个活性成分拥有潜在靶点138个,见表3和4。

2.3 大黄-桃仁药对活性成分干预肝硬化的潜在作用靶点

通过TTD、GeneCards、PharmGkb、DrugBank和OMIM基因数据库检索肝硬化的相关基因(GeneCards选取relevance score ≥ 10 的基因),共获得1352个肝硬化相关基因。将全部基因名称输入Uniprot数据库的人类组别(human species)进行简称标准化处理(图1)后,同“2.2”项去重后得到的大黄-桃仁药对82个靶点取交集,去重得到大黄-桃仁药对活性成分干预肝硬化的22个潜在作用靶点(图2)。

2.4 药物-成分-靶点-疾病网络

使用Cytoscape 3.7.2软件分析,将大黄-桃仁药对的活性成分(29个)与潜在作用靶点(22个)、疾病关系可视化,构建药物-成分-靶点-疾病网络图。得到的网络图中,与疾病靶点关联具有相关性的成分有19个,绿色代表仅存在于桃仁中的药物成分,共有13个;蓝色代表仅存在于大黄中的药物成分,共有5个;紫色代表在2种药物中重复存在的药物成分,共有1个,节点的大小代表该药物成分治疗疾病时的作用活性强弱;粉色代表药物成分所对应的相关基因,共有26个,见图3。

2.5 PPI网络

运用String数据库对26个潜在作用基因靶点构建PPI网络,Cytoscape 3.7.2软件进行可视化及拓扑分析,结果见图4。将度值和介数中心性均大于中位值的9个靶点确定为大黄-桃仁药对治疗肝硬化的潜在关键靶点,得到与药物干预肝硬化关系密切的蛋白主要有TP53、MAPK3、HSP90(HSP90AA1)等,见表5。

2.6 生物过程分析

使用R软件并安装Bioconductor中“DOSE”“clusterProfiler”“pathview”的安装包。将“2.3”项得到的22个共有作用靶点通过R软件进行生物过程分析,获得GO富集分析和KEGG富集分析结果。

表1 大黄主要活性成分

Table 1 Main active components from *Rhei Radix et Rhizoma*

MOL ID	化合物	OB/%	DL
MOL000554	没食子酸-3-O-(6'-O-没食子糖基)葡萄糖苷[gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside]	30.25	0.67
MOL002260	procyanidin B-5,3'-O-gallate	31.99	0.32
MOL002303	掌叶二萜酮A(palmidin A)	32.45	0.65
MOL002297	胡萝卜苷(daucosterol)	35.89	0.70
MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	36.91	0.75
MOL002259	大黄素甲醚苷(physciondi glucoside)	41.65	0.63
MOL002280	芦荟大黄素-8-葡萄糖苷[torachryson-8-O-beta-D-(6'-oxayl)-glucoside]	43.02	0.74
MOL002288	大黄素-1-O-葡萄糖苷(emodin-1-O-beta-D-glucopyranoside)	44.81	0.80
MOL002281	决明内酯(toralactone)	46.46	0.24
MOL002268	大黄酸(rhein)	47.07	0.28
MOL002251	β 胡萝卜素氧化物(mutatochrome)	48.64	0.61
MOL000096	(-)-儿茶素[(-)-catechin]	49.68	0.24
MOL002276	番泻苷E(sennoside E)	50.69	0.61
MOL002235	泽兰黄醇素(EUPATIN)	50.80	0.41
MOL002293	番泻苷D(sennoside D)	61.06	0.61
MOL000471	芦荟大黄素(aloe-emodin)	83.38	0.24

表2 桃仁主要活性成分

Table 2 Main active components from *Persicae Semen*

MOL ID	化合物	OB/%	DL
MOL001323	柠檬二烯醇(sitosterol alpha1)	43.28	0.78
MOL001328	2,3-didehydro GA70	63.29	0.50
MOL001329	2,3-didehydro GA77	88.08	0.53
MOL001339	GA119	76.36	0.49
MOL001340	GA120	84.85	0.45
MOL001342	GA121-isolactone	72.70	0.54
MOL001343	GA122	64.79	0.50
MOL001344	GA122-isolactone	88.11	0.54
MOL001348	gibberellin 17	94.64	0.49
MOL001349	4a-formyl-7alpha-hydroxy-1-methyl-8-methylidene-4aalpha,4bbeta-gibbane-1alpha,10beta-dicarboxylic acid	88.60	0.46
MOL001350	GA30	61.72	0.54
MOL001351	gibberellin A44	101.61	0.54
MOL001352	GA54	64.21	0.53
MOL001353	GA60	93.17	0.53
MOL001355	GA63	65.54	0.54
MOL001358	gibberellin 7	73.80	0.50
MOL001360	GA77	87.89	0.53
MOL001361	GA87	68.85	0.57
MOL001368	3-O-对香豆酰基奎宁(3-O-p-coumaroylquinic acid)	37.63	0.29
MOL001371	populoside_qt	108.89	0.20
MOL000296	常春藤皂苷(hederagenin)	36.91	0.75
MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	36.91	0.75
MOL000493	菜油甾醇(campesterol)	37.58	0.71

表3 大黄活性成分及对应潜在靶点

Table 3 Active components from *Rhei Radix et Rhizoma* and corresponding potential targets

MOL ID	化合物	靶点	数量
MOL002235	泽兰黄醇素	NOS2、ANPK、F2RL3 Xa、PTGS2、F2RL3 VII、TOPBP1、ESR2、DPP IV、HSP90、TRY1、NCOA2、CAMK2B、PTI、SCN5A、VEGFR-2、PPARA	16
MOL002259	大黄素甲醚苷	TOPBP1	1
MOL002268	大黄酸	PTGS1、PTGS2、HSP90、INPP5K、NCOA2、ADGRF1、AP-1	7
MOL002280	芦荟大黄素-8-葡萄糖苷	TOPBP1	1
MOL002281	决明内酯	NOS2、PTGS1、GSDME、PTGS2、ESR2、HSP90、INPP5K、CHEK1、mRNA of PKA Catalytic Subunit C-alpha	9
MOL002288	大黄素-1-O-葡萄糖苷	TOPBP1	1
MOL002297	胡萝卜苷	PAQR、NCOA2	2
MOL000358	β -谷甾醇	PAQR、NCOA2、PTGS1、PTGS2、HSP90、INPP5K、KCNH2、DRD1、CHRM3、CHRM1、SCN5A、GARA2、CHRM4、PDE3A、HT-2A、GARA3、GARA-5、ADRA1A、CHRM2、ADRA1B、ADRB2、BAX、CHRNA2、SLC6A4、BCL2、CASP9、AP-1、MOR1、GABRA1、CHRNA7、CYP450、CASP3、CASP8、PRKCA、TGF、PON1、MAPK3、mRNA of PKA Catalytic Subunit C-alpha	38
MOL000471	芦荟大黄素	PTGS1、PTGS2、HSP90、INPP5K、NCOA2、PRKAR1B、ADGRF1、IGHG1、CDKN1B、EIF6、BAX、TNF、CASP3、TP53、OLAH、PRKCA、ROCK、CDC2、PCNA、MYCN、JL1B、PRKCD、CCNB1、mRNA of PKA Catalytic Subunit C-alpha	24
MOL000096	(-)-儿茶素	PTGS1、GSDME、PTGS2、HSP 90、DPEP1、NCOA2、CAMK2B、xOLAH、FAM120B、KLF7、mRNA of PKA Catalytic Subunit C-alpha	11

表4 桃仁活性成分及对应潜在靶点

Table 4 Active components from *Persicae Semen* and corresponding potential targets

MOL ID	化合物	靶点	数量
MOL001323	柠檬二烯醇	PAQR、PTGS2、GABRA1、ADH1C、CYP450、NR3C2	6
MOL001328	2,3-didehydro GA70	PTGS1、CHRM1、PTGS2、SLC6A2、GABRA1、TRY1、GRM2	7
MOL001329	2,3-didehydro GA77	PTGS2、CAII、GABRA1、NCOA2、GABRG6	5
MOL001339	GA119	CYP450	1
MOL001340	GA120	CHRM3、CHRM1、PTGS2、GAR-3、CHRM2、GABRA1、CHRNA7、GABRG6	8
MOL001342	GA121-isolactone	PAQR	1
MOL001344	GA122-isolactone	PAQR	1
MOL001349	4a-formyl-7alpha-hydroxy-1-methyl-8-methylidene-4aalpha,4bbeta-gibbane-1alpha,10beta-dicarboxylic acid	NR3C2、PAQR	2
MOL001351	gibberellin A44	NR3C2、GABRA1、GABRG6	3
MOL001352	GA54	F2RL3 Xa、PTGS2、HSP90、NCOA2、CAMK2B、mRNA of Protein-tyrosine phosphatase、non-receptor type 1	6
MOL001353	GA60	GARA2、GARA3、CHRM2、GABRA1、GRM2	5
MOL001355	GA63	PTGS2、GABRA1、GRM2、CHRNA7、GABRG6	5
MOL001358	gibberellin 7	CHRM3、CHRM1、PTGS2、PDE3A、SLC6A3、ADRB2、SLC6A4	7
MOL001360	GA77	GARA2、GABRA1、CYP450、GRM2	4
MOL001361	GA87	PTGS2、CAII	2
MOL001368	3-O-对香豆酰基奎宁	PTGS1、PTGS2、HSP 90、INPP5K、NCOA2、CAMK2B、mRNA of PKA Catalytic Subunit C-alpha、mRNA of Protein-tyrosine phosphatase、non-receptor type 1	8
MOL000296	常春藤皂苷	PAQR、NCOA2、CHRM3、CHRM1、GARA2、GARA3、CHRM2、ADRA1B、GRM2、GABRA1、GABRG6、LYZ、GARA-5、IGHG1、ADH1B、ADH1C、NMNAT3、PTGS1、SCN5A、PTGS2、RXRA、PDE3A、SLC6A2、CYP450	24
MOL000358	β-谷甾醇	PAQR、NCOA2、PTGS1、PTGS2、HSP 90、INPP5K、KCNH2、DRD1、CHRM3、CHRM1、SCN5A、GARA2、CHRM4、PDE3A、HT-2A、GARA-5、ADRA1A、GARA3、CHRM2、ADRA1B、BAX、ADRB2、CHRNA2、TGF、SLC6A4、MOR1、GABRA1、CHRNA7、CYP450、BCL2、CASP9、AP-1、CASP3、CASP8、PRKCA、PON1、MAPK3、mRNA of PKA Catalytic Subunit C-alpha	38
MOL000493	菜油甾醇	PAQR、PTGS1、PTGS2、HSP 90、INPP5K	5

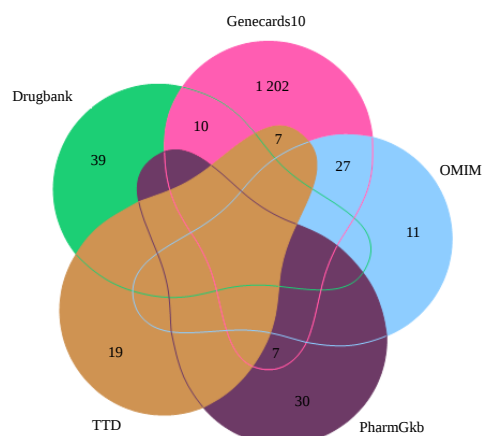


图1 5个基因库检索肝硬化相关基因结果
Fig. 1 Result map of liver cirrhosis related genes from five databases

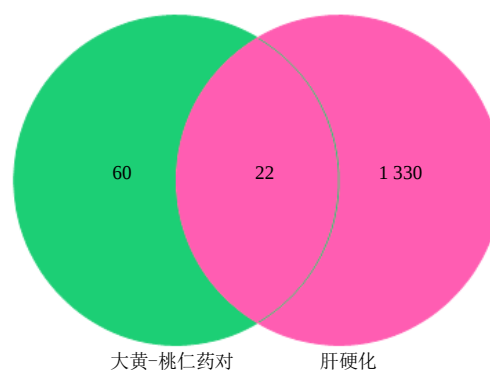


图2 大黄-桃仁药对活性成分干预肝硬化的潜在作用靶点
Fig. 2 Venn of potential targets for *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* active components in treating liver cirrhosis

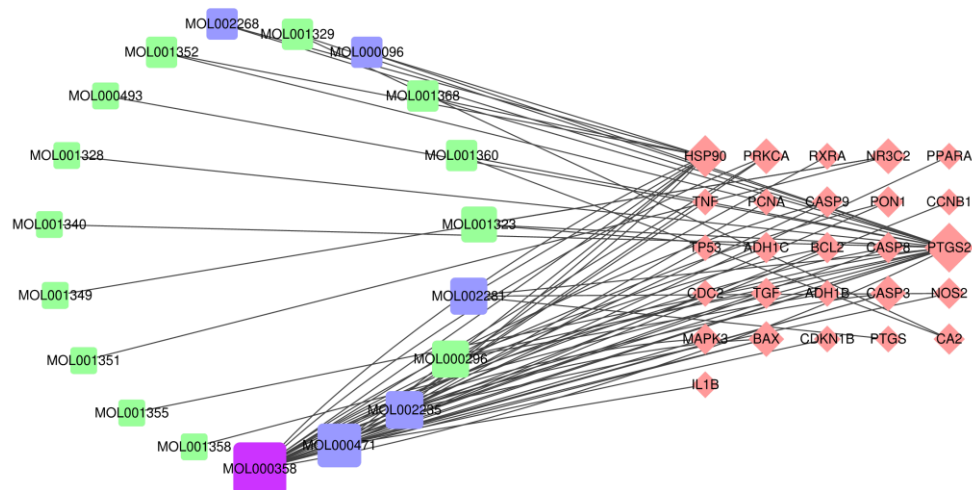


图3 药物-成分-靶点-疾病网络

Fig. 3 Network of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen*-active components-targets-liver cirrhosis

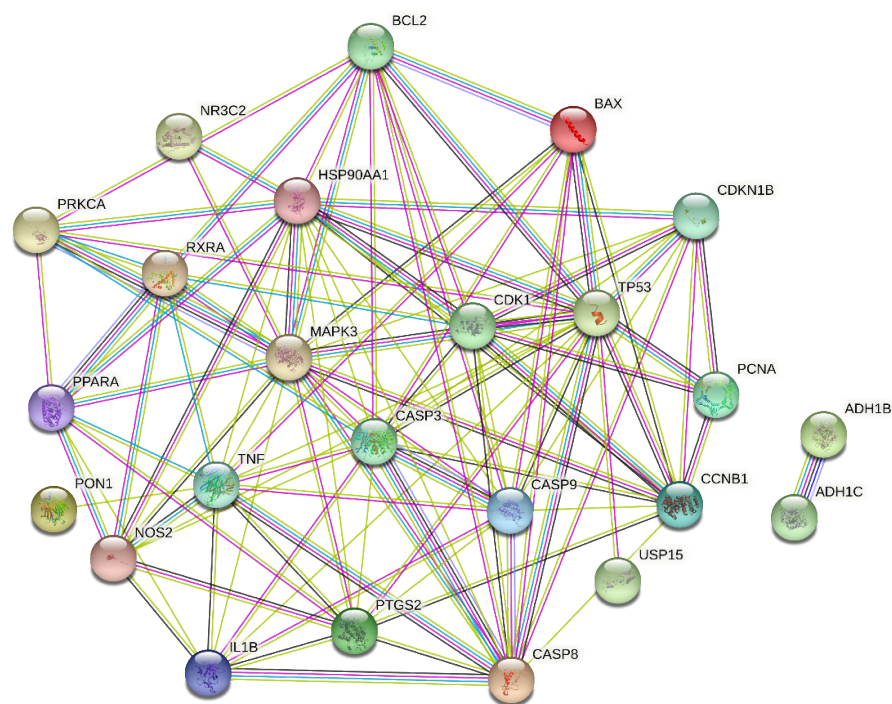


图4 大黄-桃仁药对防治肝硬化的PPI网络

Fig. 4 PPI network of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* in treatment of liver cirrhosis

通过GO富集分析结果得到包括生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)在内的30条GO条目,认为大黄-桃仁药对通过干预调控血管系统的生成发育、上皮细胞增殖、脂质代谢、氧化应激、细胞因子和信号受体活性及结合过程等相关生物学过程对肝硬化起到治疗作用,见图5。

通过KEGG富集分析结果发现,癌症中的microRNAs(miRNAs)表达、PI3K-Akt信号通路、肝

细胞癌、乙型肝炎、人巨细胞病毒感染、肿瘤蛋白聚糖表达、疱疹病毒感染等在大黄-桃仁药对治疗肝硬化过程中起到重要作用,见图6。圆点大小代表该信号通路在药物治疗过程中的重要性。

3 讨论

肝硬化是肝脏在慢性损伤中形成不可逆瘢痕的病理性改变,临床表现为肋下疼痛、恶心纳差、腹水等,而肝纤维化指持续慢性刺激后肝脏的细胞外基质(ECM)在肝实质过度沉积导致肝脏结构紊乱的瘢痕过程,通常被认为是肝硬化的前兆。中医将

表5 大黄-桃仁药对干预肝硬化重要靶点
Table 5 Important targets of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* in treatment of liver cirrhosis

靶点蛋白	度值	介数中心性
TP53	17	72.144 444 44
MAPK3	17	44.012 698 41
HSP90AA1	15	32.553 174 60
CASP3	15	14.906 349 21
TNF	13	48.915 079 37
CASP8	13	7.434 920 64
CASP9	13	7.434 920 64
CCNB1	11	7.710 317 46
PTGS2	11	4.636 507 94

两者均归属于“积聚”疾病范畴,认为其实质为血络瘀阻、湿热互结^[5]。吴鞠通在《医医病书》中提出“肝郁久则血瘀”,中医临床上多用活血化瘀法治疗肝硬化疾病。大黄“逐瘀通经”,擅破癥瘕积聚、逐瘀血;桃仁“活血行瘀,润肠通便”,两者刚柔并济,逐瘀通络力卓。在桃仁的多味药对配伍方剂中,桃仁-大黄药对配伍高居首位,足见其应用之广^[6]。作为张仲景经典型化瘀药对之一,大黄-桃仁药对在其8类活血法的22个活血化瘀方中出现6次^[7],且此6个药方(桃核承气汤、抵当丸或汤、鳖甲煎丸、大黄蛰虫丸、大黄牡丹汤、下瘀血汤)在临床均可用于肝硬化的治疗^[8-11]。

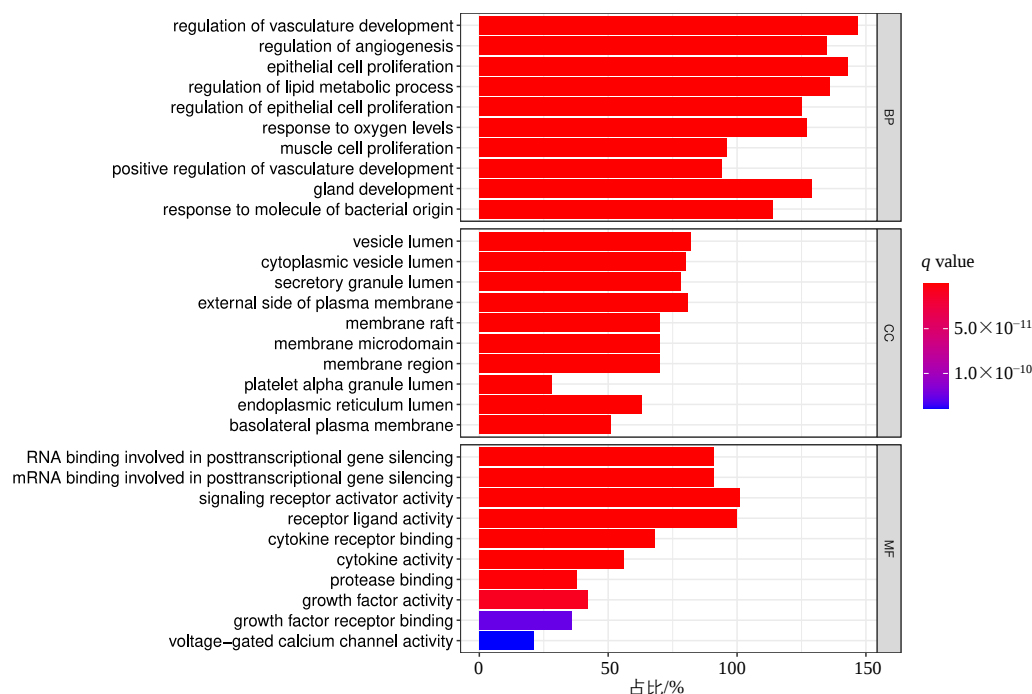


图5 潜在通路靶点的GO富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of potential pathway targets

临床数据及研究已发现,大黄及桃仁单独用药以及包含该药对的多种方药均能有效治疗肝脏疾病,并对肝硬化及相关并发症也起到一定疗效。肝硬化患者临床用药桃仁水提取物3个月后,其血清中的肝组织I型、III型胶原含量显著降低,提示桃仁所含成分能发挥抗肝纤维化作用^[12]。经典名方大黄蛰虫丸中大黄为君,桃仁为臣,它与恩替卡韦联合用药能明显降低慢性乙型肝炎患者的肝纤维化指标^[13];鳖甲煎丸临床上基于活血化瘀、软坚散结理论治疗肝硬化疗效更好^[9],这与二药相须为用,共奏破血逐瘀之效相符合。

本研究对大黄-桃仁药对作用肝硬化疾病进行网络药理学研究发现,两味中药作用于肝硬化的化学成分并不相同,其中活性最强的4个化学成分之一β-谷甾醇(beta-sitosterol)是两者仅有的共同化学成分,其后依次为桃仁成分常春藤皂苷(hederagenin)、大黄成分芦荟大黄素(aloe-emodin)与泽兰黄醇素(eupatin);与肝硬化最相关的3个靶点分别为TP53、MAPK3和HSP90AA1。

β-谷甾醇属于四环三萜类化合物^[14],是一类重要的天然甾醇资源,对多种肝脏疾病具有治疗作用。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化和

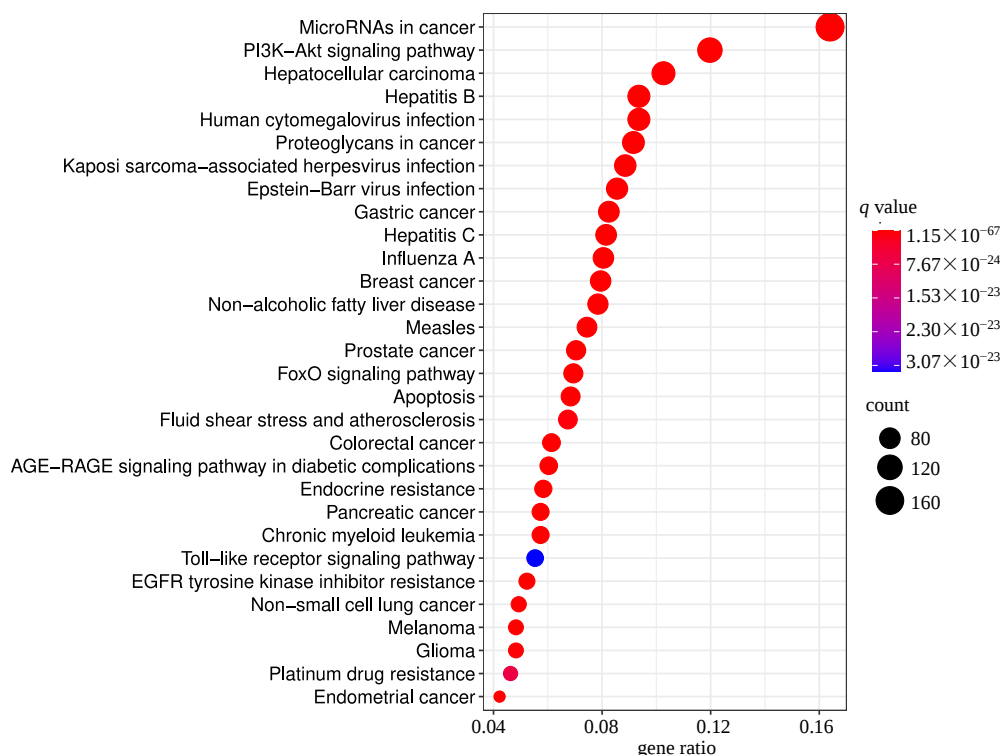


图6 潜在相关通路靶点的KEGG富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of potential pathway targets

ECM沉积是肝硬化发生的细胞学基础,而 β -谷甾醇可预防肝组织胶原的过度沉积、降低HSCs表达重组人胶原蛋白-1等改善肝脏纤维化病变^[15]。通过对 β -谷甾醇的靶点研究^[16],发现它与KDR基因、Rap1信号通路等关系密切,前者编码的血管内皮生长因子干预调控血管系统的生成发育、内皮细胞增殖^[17],后者通过调节不同类型细胞的整合素、黏附分子等对MAPK活性进行调控^[18],表明 β -谷甾醇作为大黄-桃仁药对的共有成分在肝硬化的防治中确能起到极为重要的作用。芦荟大黄素可减轻肝脏脂质代谢紊乱,改善肝功能,防止肝脏疾病向肝硬化病变^[19]。

TP53基因是人类一种重要的抑癌基因,位于17p13染色体区域,其编码的p53蛋白可抑制细胞周期、促进DNA修复,控制细胞的凋亡。常态时p53蛋白活性极低,而机体遭受刺激引起DNA损伤时,活化的p53通过调节下游靶基因的表达诱导细胞凋亡。TP53基因的突变条件易得,单个碱基突变即可导致p53丧失正常功能、发生突变^[20]。在全球有关于TP53基因突变的最大的数据库(<http://www-p53.iarc.fr/>)资料显示,TP53基因在肝脏肿瘤的突变率为31.3%,而肝硬化作为长期慢性进行性疾病,有相当部分会发展成为肝癌。研究发现,在肝硬化发展

成为肝癌阶段,p53可作为临床诊断及鉴别肝硬化恶性发展程度的指标^[21],监测并降低p53蛋白表达、保持TP53基因的功能正常可能是及时阻止肝硬化向肝癌程度发展的手段之一。研究发现,大黄-桃仁药对所在的鳖甲煎丸作为抗纤维化的临床经典用药^[9],可通过影响Wnt/ β -catenin信号通路^[22]、激活TP53基因最终减少肝癌细胞增殖并促进其凋亡,达到抗肝癌、抗肝硬化的目的。

MAPK3作为丝裂原蛋白活化激酶(MAPK)家族成员之一,其主要功能包括调节细胞增殖、分化及死亡,可影响炎性细胞黏附血管内皮增殖进而促进肝硬化^[23-24],这与GO富集分析结果认为大黄-桃仁药对干预血管系统生成发育治疗疾病具有关联性。热休克蛋白(HSP)可维持细胞存活的相关蛋白机构及功能的完整性从而影响细胞生理状态,HSP90通过激活TGF- β 信号通路和氧化应激损伤参与肝硬化过程,使用抑制剂17AAG抑制HSP90表达能抑制糖酵解,诱导肝癌细胞凋亡^[25-26]。研究发现, β -谷甾醇、芦荟大黄素通过干预TGF- β 信号通路对CCL₄诱导的小鼠肝硬化有保护作用^[27-28],常春藤皂苷经抑制MAPK表达起到保护乙醇诱导的大鼠肝损伤作用^[29]。临床证实,含有大黄-桃仁药对的抵当汤能影响血管纤维化,大黄蛰虫丸通过干预炎症

因子释放、抑制HSCs活化达到抗肝硬化作用^[30]。

miRNAs是拥有22~25 nt的内源性非编码小RNA,属于调节基因表达的关键因子之一,多种miRNAs的异常表达均与肝硬化进程密切相关^[31]。在乙型肝炎病毒长期感染导致的肝硬化进程中,与健康人群对照,共有84条miRNAs表达异常,且随病情恶化、肝硬化程度加剧,另有多种miRNAs表达发生变化^[32]。临床研究发现,肝硬化患者血清中的miRNA-21、miRNA-122^[32]表达上调,且miRNA-122相对表达量与病情严重程度呈正相关^[33]。研究证实miRNA-27a的高表达可降低HSCs中固醇调节元件结合蛋白-1c表达,促进肝纤维化发生^[34]。miRNA-200c抑制FOG2蛋白水平进而通过PI3K/Akt通路诱导HSCs增殖,促进肝纤维化^[35]。此外,另有如miRNA-185^[36]、miRNA-29^[37]、miRNA-9^[38]等miRNAs可抑制肝纤维化进展。因此,miRNAs可能是治疗肝硬化的又一潜在靶点。

本研究基于网络药理学^[39],分析并预测大黄-桃仁药对治疗肝硬化的可能靶标及通路,通过建立药效成分-疾病靶点PPI网络,初步揭示了该药对治疗肝硬化疾病的作用机制,侧面印证该药对作为张仲景“活血化瘀”经典药对的理论依据,富集分析结果可为后续的机制探索研究、指标筛选提供方向与参考。然而,此次研究得到的有效化学成分治疗疾病的相关文献有限,认为此方法存在一定局限性和误差可能。作为治疗肝硬化多种名方中的常见药对之一,大黄-桃仁药对缺少对肝硬化的直接相关报道,仍多集中于药对所在方剂以及2种中药所含的各自化学成分对疾病的防治作用^[40],这提示对大黄-桃仁药对的研究并不充分,需在该药对治疗肝硬化的网络药理学基础上完善及发展相关实验支持,并应探讨作为出现频次颇高的药对组成,大黄-桃仁药对在治疗肝硬化的各类方药中的地位。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐小元,丁惠国,李文刚,等.肝硬化诊治指南[J].实用肝脏病杂志,2019,22(6):770-786.
- Xu X Y, Ding H G, Li W G, et al. Chinese guidelines on the management of liver cirrhosis [J]. J Pract Hepatol, 2019, 22(6): 770-786.
- [2] 程亚伟,胡衡,杨华.中医辨治肝纤维化进展综述[J].山东中医杂志,2017,36(11):986-988.
- Cheng Y W, Hu H, Yang H. Review on the progress of traditional Chinese medicine treatment of liver fibrosis

- [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2017, 36(11): 986-988.
- [3] 徐列明.肝纤维化或肝硬化“正虚血瘀”中医病机的临床观察和研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2016,18(9):1465-1470.
- Xu L M. A study for "zhengxu Xueyu" in the pathogenesis of hepatic fibrosis/cirrhosis in traditional Chinese medicine (TCM) based on clinical observation [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2016, 18(9): 1465-1470.
- [4] 郭玲玲,颜永刚,王红艳,等.桃仁-大黄药对在中药方剂中发挥功效的相关因素分析[J].中国药房,2017,28(23):3188-3191.
- Guo L L, Yan Y G, Wang H Y, et al. Analysis of factors related to efficacy of peach kernel-Rheum palmatum couplet medicines in TCM formula [J]. China Pharm, 2017, 28(23): 3188-3191.
- [5] 李琼,滕龙,李永勤,等.周信有辨治病毒性肝硬化经验[J].中医杂志,2018,59(8):643-645.
- Li Q, Teng L, Li Y Q, et al. ZHOU xinyou's experience in treating viral cirrhosis [J]. J Tradit Chin Med, 2018, 59(8): 643-645.
- [6] 刘景亮,裴丽,王文凯,等.基于数据挖掘的桃仁方剂配伍规律研究[J].江苏中医药,2019,51(4):65-68.
- Liu J L, Pei L, Wang W K, et al. Study on compatibility rule of *Persicae Semen* based on data mining [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2019, 51(4): 65-68.
- [7] 杨文喆.张仲景活血化瘀法用药规律浅探[J].中华中医药杂志,2013,28(11):3165-3168.
- Yang W Z. Analysis on ZHANG Zhong-jing's blood-promoting and stasis-resolving method [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28(11): 3165-3168.
- [8] 艾香英,谢敏.桃核承气汤联合西药治疗肝硬化顽固性腹水疗效观察[J].实用中医内科杂志,2020,34(9):9-11.
- Ai X Y, Xie M. Observation of therapeutic effect of Taohe Chengqi Decoction on intractable ascites due to cirrhosis [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2020, 34(9): 9-11.
- [9] 中华中医药学会肝胆病分会.鳖甲煎丸治疗肝纤维化临床应用专家共识[J].中西医结合肝病杂志,2020,30(6):577-578,584.
- Branch of Hepatobiliary Diseases, China Association of Chinese Medicine. Except consensus on the clinical application of Biejiajian Pills in the treatment of liver fibrosis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2020, 30(6): 577-578, 584.
- [10] 黄露,刘旭东,李品桦,等.大黄蛰虫丸在肝脏疾病中的研究进展[J].中国中西医结合消化杂志,2021,29(5):364-369.

- Huang L, Liu X D, Li P H, et al. Research progress of Dahuang Zhechong pill in liver diseases [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2021, 29(5): 364-369.
- [11] 加秀凤, 谢纪文, 朱 锐. 下瘀血汤调控ACE2介导的RAS自稳抑制肝纤维化实验研究 [J]. 中西医结合研究, 2021, 13(1): 24-29, 32.
- Jia X F, Xie J W, Zhu R. Experimental study of Xiayuxue Decoction on self-regulation of RAS by targeting ACE2 with hepatic fibrosis [J]. Res Integr Tradit Chin West Med, 2021, 13(1): 24-29, 32.
- [12] 王玉清. 桃仁提取物抗肝纤维化作用及其分子机制研究 [J]. 医学理论与实践, 2014, 27(15): 2015-2016.
- Wang Y Q. Effects and molecular mechanisms of *Persicae* Semen extract against liver fibrosis [J]. J Med Theory Pract, 2014, 27(15): 2015-2016.
- [13] 郭晶晶, 田芝奥, 李亚南. 大黄蛰虫丸联合替诺福韦酯治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床效果观察 [J]. 中国医师进修杂志, 2020, 43(12): 1109-1114.
- Guo J J, Tian Z A, Li Y N. Clinical observation of Dahuang Zhechong pill combined with tenofovir disoproxil fumarate in treating liver fibrosis of chronic hepatitis B [J]. Chin J Postgrad Med, 2020, 43(12): 1109-1114.
- [14] Jovanovi A A, Balan B D, Djordjevi V B, et al. Effect of gentisic acid on the structural-functional properties of liposomes incorporating β -sitosterol [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 183: 110422.
- [15] Kim K S, Yang H J, Lee J Y, et al. Effects of β -sitosterol derived from *Artemisia capillaris* on the activated human hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-induced mouse liver fibrosis [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 363.
- [16] 王旭红, 刘改霞, 李耀辉, 等. 基于网络药理学探寻 β -谷甾醇的作用机制 [J]. 世界中医药, 2022, 17(2): 172-176.
- Wang X H, Liu G X, Li Y H, et al. Mechanism of β -sitosterol based on network pharmacology [J]. World Chin Med, 2022, 17(2): 172-176.
- [17] Melincovici C S, Bosca A B, Susman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. Rom J Morphol Embryol, 2018, 59(2): 455-467.
- [18] Shah S, Brock E J, Ji K, et al. Ras and Rap1: A tale of two GTPases [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 54: 29-39.
- [19] 张莹莹, 周 培, 王炳芳. 芦荟大黄素对小鼠非酒精性脂肪性肝炎的治疗作用 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2016, 26(4): 283-287.
- Zhang Y Y, Zhou P, Wang B F. Effect of *Aloe emodin* on the treatment of non-alcoholic steatohepatitis mice [J]. J Jiangsu Univ Med Ed, 2016, 26(4): 283-287.
- [20] Doffe F, Carbonnier V, Tissier M, et al. Identification and functional characterization of new missense SNPs in the coding region of the TP53 gene [J]. Cell Death Differ, 2021, 28(5): 1477-1492.
- [21] 缙文斌, 田素升, 李长风. P53和Hsp70在肝癌、肝硬化及肝血管瘤的表达及意义 [J]. 肝脏, 2018, 23(5): 410-413.
- Gou W B, Tian S S, Li C F. P53 and Hsp70 expression in liver cancer, liver cirrhosis and hepatic hemangioma and its significance [J]. Chin Hepatol, 2018, 23(5): 410-413.
- [22] 孙海涛, 贺松其, 文 彬, 等. 鳖甲煎丸对HepG2裸鼠移植瘤Wnt信号通路相关分子及靶基因的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 81-85.
- Sun H T, He S Q, Wen B, et al. Effects of Biejiajian wan on Wnt signal pathway molecules and target genes in HepG2 cell xenograft in nude mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(13): 81-85.
- [23] Cao S Y, Zhu C, Feng J, et al. *Helicobacter hepaticus* infection induces chronic hepatitis and fibrosis in male BALB/c mice via the activation of NF- κ B, Stat3, and MAPK signaling pathways [J]. Helicobacter, 2020, 25(2): e12677.
- [24] Li X Y, Lin J Q, Lin Y, et al. Hydrogen sulfide protects against acetaminophen-induced acute liver injury by inhibiting apoptosis via the JNK/MAPK signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 4385-4397.
- [25] Yang Z G, Zhuang L P, Szatmary P, et al. Upregulation of heat shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) in tumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma [J]. Int J Med Sci, 2015, 12(3): 256-263.
- [26] 刘娜斯, 曹明月, 吴友明, 等. HSP90抑制剂抑制糖酵解并促进小鼠肝癌细胞系H22凋亡 [J]. 基础医学与临床, 2020, 40(7): 912-916.
- Liu N S, Cao M Y, Wu Y M, et al. HSP90 inhibitor inhibits glycolysis and promotes apoptosis of mouse hepatocarcinoma cell line H22 [J]. Basic Clin Med, 2020, 40(7): 912-916.
- [27] 万 星, 李相国, 李修贤, 等. Beta-谷甾醇通过抑制TNF- α -NF- κ B和T β R1-Smad2/3信号通路抗小鼠肝纤维化损伤 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(1): 75-80.
- Wan X, Li X G, Li X X, et al. Beta-sitosterol alleviates liver fibrosis in mice by blocking T β R1-Smad2/3 and TNF- α -NF- κ B signaling pathways [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(1): 75-80.
- [28] Zhao X G, Chen G M, Liu Y, et al. Emodin alleviates liver fibrosis of mice by reducing infiltration of Gr1 hi monocytes [J]. Evid Based Complement Alternat Med,

- 2018, 2018: 5738101.
- [29] Kim G J, Song D H, Yoo H S, et al. Hederagenin supplementation alleviates the pro-inflammatory and apoptotic response to alcohol in rats [J]. *Nutrients*, 2017, 9(1): 41.
- [30] 乐音子, 曾莉, 颜帅. 大黄-桃仁药对及其类方现代药理学研究和临床应用 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(24): 6136-6139.
- Yue(Le) Y Z, Zeng L, Yan S. Modern pharmaceutical research and clinical application of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* [J]. *Chin J Gerontol*, 2019, 39(24): 6136-6139.
- [31] Callegari E, Domenicali M, Shankaraiah R C, et al. microRNA-based prophylaxis in a mouse model of cirrhosis and liver cancer [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 239-250.
- [32] 周兴蓓. 血清miRNA在慢性乙肝肝纤维化进展中的诊断价值 [D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
- Zhou X B. Diagnostic value of serum micrornas in the progression of chronic hepatitis B fibrosis [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.
- [33] 吕金明, 李燕, 苏凤君. miRNA-122联合肿瘤标志物在慢性乙肝病毒感染肝硬化及早期肝癌诊断中的价值 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(19): 2922-2926.
- Lyu J M, Li Y, Su F J. Diagnostic value of miRNA-122 combined with tumor markers in cirrhosis and early liver cancer of patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *Chin J Nosocomiol*, 2020, 30(19): 2922-2926.
- [34] Li Z Q, Ji L, Su S Y, et al. Leptin up-regulates microRNA-27a/b-3p level in hepatic stellate cells [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 366(1): 63-70.
- [35] Ma T F, Cai X Q, Wang Z F, et al. miR-200c accelerates hepatic stellate cell-induced liver fibrosis via targeting the FOG2/PI3K pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 2670658.
- [36] Fan H X, Feng Y J, Zhao X P, et al. miR-185-5p suppresses HBV gene expression by targeting *ELK1* in hepatoma carcinoma cells [J]. *Life Sci*, 2018, 213: 9-17.
- [37] Xing T J, Jiang D F, Huang J X, et al. Expression and clinical significance of miR-122 and miR-29 in hepatitis B virus-related liver disease [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 7912-7918.
- [38] Zhang Y, Yao X H, Wu Y, et al. LncRNA NEAT1 regulates pulmonary fibrosis through miR-9-5p and TGF- β signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(16): 8483-8492.
- [39] 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.
- Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [40] 颜永刚, 王红艳, 尹立敏, 等. 基于响应曲面分析法的不同配比桃仁-大黄活血化瘀效应相互作用研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(17): 3560-3567.
- Yan Y G, Wang H Y, Yin L M, et al. Based on response surface analysis study of *Persicae Semen-Rhei Radix et Rhizoma* interaction effects of different compatibility of promoting blood circulation to remove blood stasis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, 48(17): 3560-3567.

[责任编辑 刘东博]