

基于网络药理学霍山石斛治疗肝损伤作用机制探讨及体内实验验证

林彩霞^{1,2}, 陈涛^{1,2}, 王成³, 贾婉秋², 廖茂梁^{2,5}, 韩邦兴^{2,4}, 顾欣雨², 袁秀珍², 刘东^{2,4*}, 苏婷^{2,4*}

1. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012
2. 皖西学院 生物与制药工程学院, 安徽 六安 237012
3. 霍山县天下泽雨生物科技发展有限公司, 安徽 六安 237012
4. 安徽省中药生态农业工程研究中心, 安徽 六安 237012
5. 安徽省现代中药产业共性技术研究中心, 安徽 六安 237012

摘要: 目的 基于网络药理学、分子对接及体内实验方法探讨霍山石斛对肝损伤的治疗作用及其机制。方法 运用中国学术期刊全文数据库(CNKI)、PubChem等数据库获取霍山石斛成分,通过GeneCards数据库筛选肝损伤相关基因,将成分靶点与疾病基因交集后构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图,进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,Cytoscape构建“药物-化合物-靶点”网络图,利用AutoDock Tools对关键活性成分和核心靶点进行分子对接。构建乙醇诱导的肝损伤小鼠模型,通过观察肝脏病理学改变,试剂盒法测定血清中天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,通过实时荧光定量逆转录PCR(qRT-PCR)检测酒精性肝损伤小鼠肝脏中相关基因的表达,考察霍山石斛对酒精性肝损伤小鼠的影响。结果 筛选出霍山石斛中33个活性成分,与肝损伤共有靶点224个,包含AKT1、EGFR、SRC等,涉及癌症途径、PI3K/Akt通路等。体内实验结果显示,霍山石斛水提物能够缓解小鼠酒精性肝损伤,并极显著降低AST、ALT和TNF- α 、IL-6水平($P < 0.01$),极显著下调I κ B激酶(IKK)、核因子- κ B(NF- κ B)、蛋白激酶B(Akt) mRNA表达水平($P < 0.01$)。结论 网络药理学分析及动物实验结果,初步证明霍山石斛水提物可以通过下调Akt、IKK、NF- κ B mRNA表达水平,影响NF- κ B信号通路上游,参与酒精性肝损伤通路中炎症反应的调控,提示霍山石斛具有改善酒精性肝病的潜在作用,为揭示霍山石斛治疗肝损伤作用机制提供参考。

关键词: 霍山石斛; 肝损伤; 网络药理学; I κ B激酶(IKK); PI3K/Akt/NF- κ B信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)07-1502-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.009

Mechanism of *Dendrobium huoshanense* in treatment of liver injury: Based on network pharmacology and *in vivo* experimental

LIN Caixia^{1,2}, CHEN Tao^{1,2}, WANG Cheng³, JIA Wanqiu², LIAO Maoliang^{2,5}, HAN Bangxing^{2,4}, GU Xinyu², YUAN Xiuzhen², LIU Dong^{2,4}, SU Ting^{2,4}

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China
3. Huo Shan RainiGrace Biological Technology Development Co., Ltd., Lu'an 237012, China
4. Anhui Engineering Research Center for Eco-agriculture of Traditional Chinese Medicine, Lu'an 237012, China
5. Anhui Modern Chinese Medicine Industry Common Technology Research Center, Lu'an 237012, China

收稿日期: 2024-01-10

基金项目: 国家十四五重点研发计划项目(2023YFC3503804);安徽省科技重大专项(202103b06020004);安徽省大别山中医药研究院开放课题重点科技攻关项目(TCMADM-2023-02, TCMADM-2023-08);安徽省中药生态农业工程研究中心开放课题(WXZR202316);皖西学院高层次人才基金项目(WGKQ2021083, WGKQ2022074);国家级、安徽省大学生创新创业训练项目(202310376037, s202310376123);安徽省中药资源保护与持续利用工程实验室开放课题(TCMRPSU-2022-01)

第一作者: 林彩霞,女,研究方向为中药药剂学。E-mail: lcx1710522623@163.com

***共同通信作者:** 刘东,男,教授,研究方向为中药和天然产物及其纳米药物的制备及质量控制。E-mail: liudong3000@126.com
苏婷,女,高级工程师,研究方向为中药药剂研究及中药药效物质基础。E-mail: suting_1989@126.com

Abstract: Objective To explore the efficacy and mechanism of action of *Dendrobium huoshanense* in treating liver injury using network pharmacology, molecular docking, and *in vivo* experiments. **Methods** China National Knowledge Infrastructure (CNKI), PubChem, and other databases were utilized to identify the components of *D. huoshanense*. Treatment-related genes for liver injury were selected through the GeneCards databases. After intersecting the component targets with disease genes, a protein-protein interaction (PPI) network was constructed. Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed. A "Drug-Compound-Target" network was established using Cytoscape, and key active components and core targets were docked using AutoDock Tools. An ethanol-induced liver injury mouse model was developed. Liver pathology sections were observed, and levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were measured. The expression of related genes in the liver of alcoholic liver injury mice treated with an aqueous extract of *D. huoshanense* was detected through real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) to assess the impact on alcoholic liver injury mice. **Results** A total of 33 active components were identified in *D. huoshanense*, correlating with 224 common targets for liver injury, including Akt, EGFR, SRC, and others, involving pathways like cancer and the PI3K/Akt pathway. *In vivo* experiments showed that the aqueous extract of *D. huoshanense* could alleviate liver injury in alcoholic liver injury mice. It significantly reduced levels of ALT, AST, TNF- α , and IL-6 ($P < 0.01$) and markedly downregulated the expression of I κ B kinase (IKK), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and protein kinase B (Akt) ($P < 0.01$). **Conclusion** Network pharmacology analysis and animal experimental results preliminary demonstrate that the aqueous extract of *D. huoshanense* can modulate the inflammatory response in the alcohol liver disease pathways by downregulating the expression levels of Akt, IKK, and NF- κ B ($P < 0.01$), thus improving ethanol-induced liver injury. It is suggested that *D. huoshanense* has the potential effect of improving alcoholic liver disease and provides a reference for revealing the mechanism of *D. huoshanense* in treating liver injury.

Key words: *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng; liver injury; network pharmacology; I κ B kinase (IKK); PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway

肝损伤是指由大量饮酒、滥用药物和病毒感染等因素引起的肝细胞坏死、凋亡、脂肪变性、炎症反应以及肝功能损害的严重疾病^[1-2]。其中酒精性肝损伤(ALI)是因长期大量饮酒而引起的慢性肝病,该病可进一步发展为酒精性脂肪肝、肝炎、肝硬化甚至是肝癌^[3]。研究表明,ALI的发病机制主要与乙醇代谢、氧化应激、炎症反应、肠道菌群与肠道屏障功能等方面相关^[4]。目前常用且有效治疗ALI的方式仍然是长期戒酒并给予营养支持,常用的治疗药物有糖皮质激素、美他多辛、甘草酸制剂、水飞蓟素类等,但长期使用以上药物治疗,患者容易出现药物依赖和呕吐等不良反应^[5]。因此,迫切需要挖掘治疗ALI的药物及靶点。

霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng 是兰科石斛属多年生草本植物,俗称“米斛”,始载于《本草纲目拾遗》,具有保肝、抗氧化等功效。研究发现霍山石斛可通过参与脂质代谢、抗氧化应激损伤及抑制炎症反应来改善慢性酒精性肝损伤^[6]。霍山石斛多糖主要通过脂肪酸代谢途径、甘油磷脂代谢途径、氨基酸代谢途径、细胞色素 P450 代谢途径改善小鼠亚急性酒精性肝损伤^[7-10]。抑制核因子- κ B(NF- κ B)通路,激活核因子 E2 相关因子 2/Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Nrf-2/

Keap-1)通路,防止 ALI 形成,是中药解酒的作用机制之一^[11]。然而,霍山石斛对 ALI 相关通路的影响尚不清楚,影响 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路相关机制尚未全面揭示。

因此,本研究基于网络药理学和分子对接技术^[12]预测霍山石斛治疗肝损伤的作用机制,并通过体内实验进一步验证霍山石斛治疗肝损伤的分子机制,为临床应用提供新的思路。

1 网络药理学分析

1.1 霍山石斛活性成分及靶点的收集

在中国学术期刊全文数据库(<http://www.cnki.net>)、PubMed(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>)、化源网(<https://www.chemsrc.com>)、Web of Science(<https://www.webofscience.com>)、ChemicalBook(<https://www.chemicalbook.com>)等数据库收集截至2023年7月霍山石斛的成分以及各化学成分信息如名称、分子式、结构式等,自建成成分库,在 Swiss ADME(<http://www.swissadme.ch>)中导入化合物结构,通过药动学规则筛选,即(1) Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge 中 2 种及以上的类药性为“yes”;(2)肠胃吸收结果为“high”,同时满足上述 2 条标准的化合物为霍山石斛中有效的活性成分^[13]。从 Swiss Target Prediction (

swisstargetprediction.ch),以 $\text{Probability} \geq 0.01$ 筛选潜在作用靶点,整合去重后得到霍山石斛活性成分的潜在作用靶点。

1.2 霍山石斛治疗肝损伤潜在作用靶点的预测

从 GeneCards (<https://www.genecards.org>) 数据库中以“肝损伤(Liver injury)”作为关键词检索,以 Relevance score (>3.78) 高于平均值为标准筛选,收集与肝损伤相关的靶点,在 Venny 2.1.0 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 筛选出肝损伤与霍山石斛的活性成分的交集靶点,并构建韦恩图。

1.3 “成分-靶点-疾病”网络构建与分析

将按照“1.1”项方法筛选得到的霍山石斛活性成分和“1.2”项筛选肝损伤靶点取交集得到的共同靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建“成分-靶点-疾病”网络图,优化网络图,计算节点的度值,分析网络拓扑性质。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建与分析

将共同靶点导入 String 网络平台 (<https://string-db.org>),以物种选择“Homo sapiens”,置信度设定为 >0.7 为条件进行筛选,生成交集靶点相互作用关系,将该网络图导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行分析,进行中心度(DC)、中间中心度(BC)和紧密中心度(CC)参数分析,以拓扑分析的度值排序筛选出排名前10的核心节点作为霍山石斛治疗肝损伤的关键靶点。

1.5 基因本体(GO)富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

将按照“1.4”项方法筛选的霍山石斛与肝损伤关键靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析,设定富集分析统计学过滤值 ($P < 0.01$),选择前20条通路进行可视化处理。

1.6 分子对接

从 PubChem 数据库中下载“1.3”项构建的“成分-靶点-疾病”网络中度值排名前3的关键成分的 SDF 文件,作为配体文件。在 Protein Data Bank 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载“1.4”构建的 PPI 网络中度值排名前5的核心靶点的 PDB 结构,作为受体文件。利用 AutoDock Tools 1.5.7 对受体进一步加氢、去水等处理,使用 Autodock Vina 1.5.6 进行15次分子对接并计算结果。

2 霍山石斛水提物对酒精致肝损伤小鼠的影响

2.1 材料

2.1.1 实验动物 SPF 级 ICR 雄性小鼠 32 只,5 周龄,体质量 (20 ± 2) g,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(豫)-2020-0005]。小鼠饲养条件:环境温度为 (24 ± 2) °C,相对湿度为 (50 ± 10) %,昼夜循环照明 (12 h/12 h),自由进食饮水。动物实验经皖西学院实验动物伦理委员会审核批准后实施(伦理审批号:2023120)。

2.1.2 药品与试剂 霍山石斛药材(霍山县天下泽雨生物科技发展有限公司惠赠),经皖西学院韩邦兴教授鉴定为霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng 干燥茎;水飞蓟素胶囊(辉瑞制药有限公司,批号:B2002580,规格:每粒 140 mg);无水乙醇(天津市博华通化工产品销售中心,批号:20230428);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,河南万邦化工科技有限公司,批号:20201007);4% 多聚甲醛(合肥兰杰柯科技有限公司,批号:23108703);0.9% 氯化钠溶液(安徽靓水亭医疗器械有限公司,批号:20220802);总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒(北京聚合美生物科技有限公司,批号:MF036-01、MF166-Plus-01、MF787-01);小鼠丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 检测试剂盒(江西江蓝纯生物试剂有限公司,批号:JLC0524、JLC05241、JLC3601、JLC3924)。

2.1.3 实验仪器 RS232C 电子天平(上海菁海仪器有限公司);HH-S4 恒温数控水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司);RE-2000B 旋转蒸发器(上海越众仪器设备有限公司);FE-1A-80 冷冻干燥机(上海科奎仪器设备有限公司);VORTXE 05 多功能涡旋振荡器(上海达姆实业有限公司);LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪(上海罗氏制药有限公司);1-16R 台式高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司);Synergy H1 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

2.2 方法

2.2.1 霍山石斛水提物制备 取霍山石斛干燥茎适量,粉碎,加入 20 倍水,85 °C 浸泡提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,60 °C 下减压浓缩,冷冻干燥,即得。采用苯酚-硫酸法测得霍山石斛水提物中多糖质量分数为 36.7%,符合《中国药典》标准。

2.2.2 分组与造模 实验小鼠适应性喂养 3 d 后,

随机分组为对照组、模型组、霍山石斛组、水飞蓟素组,每组 8 只。各组均按 10 mL·kg⁻¹ ig 给药,霍山石斛组给予霍山石斛水提物生药量 1.56 g·kg⁻¹ [14-16] (人用等效剂量),水飞蓟素组给予水飞蓟素 150 mg·kg⁻¹ [17],对照组与模型组给予等体积的 0.05% CMC-Na 溶液,每日 1 次,连续 ig 给药 10 d 后,禁食不禁水 16 h,除对照组外,其余组 ig 50% 乙醇溶液 (15 mL·kg⁻¹) 造模 [18],2 h 后再次 ig 给药,再过 2 h 后进行样本采集。

2.2.3 血液及肝脏标本采集 末次给药 2 h 后,小鼠眼眶采血,室温静置 2 h,4 °C、3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min 收集血清,-80 °C 保存待测。颈椎脱臼法处死小鼠,立即收集肝脏,用冷冻 0.9% 氯化钠溶液冲洗,取肝左叶于 4% 多聚甲醛中固定,其余肝组织于 -80 °C 保存待测。

2.2.4 小鼠肝组织病理学观察 固定肝脏组织,脱水透明,浸蜡包埋,切片与贴片,脱蜡,采用苏木精-伊红 (HE) 染色,脱水透明,封片,观察 [19]。

2.2.5 小鼠血清中 ALT、AST、IL-6、TNF-α 水平检测 根据相应试剂盒的说明书检测小鼠血清中 ALT、AST、IL-6、TNF-α 的水平。

2.2.6 qRT-PCR 检测肝组织中蛋白激酶 B (Akt)、IκB 激酶 (IKK)、核因子-κB (NF-κB) mRNA 表达 剪取小鼠肝右叶,液氮研磨成粉末,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,并测定其浓度,根据反转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA,接着按照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行扩增反应。以 β-actin

作为内参,2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 mRNA 相对表达量 [20-22]。引物基因序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成 (表 1)。

表 1 qRT-PCR 引物序列	
Table 1 Primer sequence of qRT-PCR	
引物	序列 (5'→3')
IKK	正向:GGATATGAGGAAGCGGCATGTAGAG
	反向:CCTGATACTGGCACTTCGGACAAC
NF-κB	正向:AGACCCAGGAGTGTTCACAGACC
	反向:5GTCACCAGGCGAGTTATAGCTTCAG
Akt	正向:TGACCGCCTGTGCTTTGTGATG
	反向:TGCCCGATCCTCCGTGAAGAC
β-actin	正向:ACGGCCAGGTCATCACTATTG
	反向:TGGATGCCACAGGATTCCA

2.2.7 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并由 Graph Pad prism 8.0.1 进行分析并绘图,多组独立数据的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 霍山石斛的活性成分及其靶点筛选 通过自建库收集并筛选去重后共得到 33 个活性成分 (表 2)。通过 Swiss Target Prediction 数据库预测出药物活性成分的潜在作用靶点,删除重复靶点后,共得到 443 个霍山石斛活性成分靶点。

表 2 霍山石斛的活性成分				
Table 2 Active components of D. huoshanense				
编号	化合物名称	CAS 号	编号	化合物名称
1	D-阿拉伯糖[D-(-)-arabinose]	10323-20-3	18	D-木糖[D(+)-xylose]
2	D(+)-无水葡萄糖[D(+)-glucose]	50-99-7	19	柚皮素(naringenin)
3	D-甘露糖(D-mannose)	3458-28-4	20	L-苏氨酸(L-threonine)
4	半乳糖(galactose)	59-23-4	21	缬氨酸(valine)
5	精氨酸(arginine)	74-79-3	22	石斛碱(dendrobine)
6	赖氨酸(lysine)	56-87-1	23	亮氨酸(leucine)
7	组氨酸(histidine)	71-00-1	24	黑麦草内酯(loliolide)
8	5-hydroxymethylfurfural	67-47-0	25	L-异亮氨酸(L-isoleucine)
9	槲皮素(querletin)	117-39-5	26	methyl L-pyroglutamate
10	4-羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid)	99-96-7	27	methyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate
11	天麻素(gastrodin)	62499-27-8	28	异香兰素(isovanillin)
12	苯丙氨酸(phenylalanine)	62056-68-2	29	毛兰素(erianin)
13	尿苷(uridine)	58-96-8	30	二氢阿魏酸(dihydroferulic acid)
14	果糖(β-D-fructopyranose)	7660-25-5	31	3,4-dihydroxy-5-methoxybenzaldehyde
15	异夏佛塔苷(isochaftoside)	52012-29-0	32	3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde
16	夏佛塔苷(schaftoside)	51938-32-0	33	DL-丁香树脂酚(DL-syringaresinol)
17	syringaresinol-4,4'-bis-O-β-D-glucopyranoside	137038-13-2		

3.1.2 霍山石斛治疗肝损伤靶点预测 通过 GeneCards 数据库检索汇总筛选去重后得到肝损伤靶点 2 617 个,进而得到药物成分与疾病的交集靶点共 224 个。

3.1.3 “药物-化合物-靶点”网络构建 该网络图有

259 个节点,704 条边,涉及 33 个活性成分和 224 个靶点(图 1),分析发现 CA2、CDK1、AKR1B1、ADORA3、HSP90AA1 为肝损伤中度值前 5 的靶点(表 3),槲皮素、柚皮素、毛兰素为霍山石斛中度值前 3 的活性成分(表 4)。

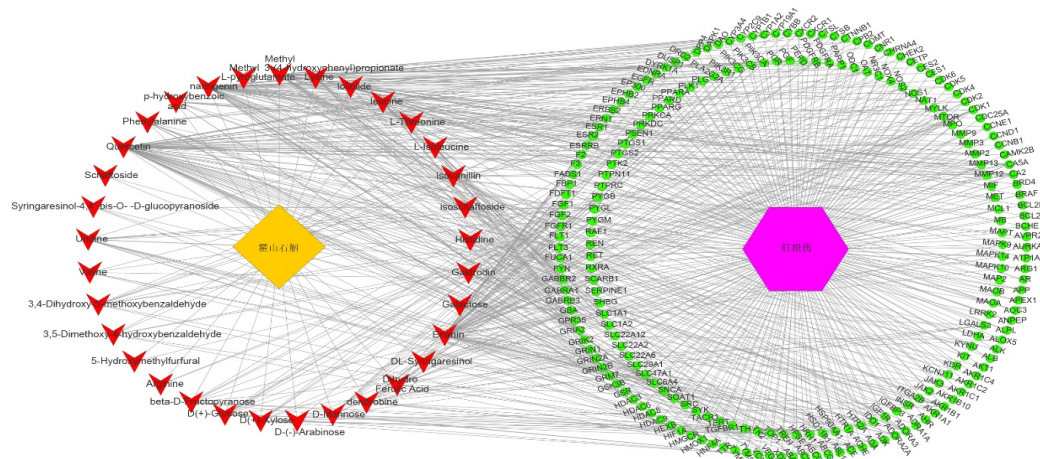


图 1 “药物-化合物-靶点”网络
Fig. 1 “Drug-compound-targets” network

表 3 靶点网络拓扑分析度值前 10 关键靶点
Table 3 Targets network topology analysis of top 10 key targets

编号	靶点	度值	接近中心性
1	CA2	11	0.49
2	CDK1	10	0.48
3	AKR1B1	9	0.48
4	ADORA3	8	0.48
5	HSP90AA1	8	0.48
6	VEGFA	8	0.48
7	CA5A	8	0.48
8	GABBR2	8	0.48
9	GBA	7	0.48
10	ACHE	7	0.48

3.1.4 PPI 网络图分析 借助 String 数据库获得霍山石斛活性成分与肝损伤 224 个共有靶点的相互关系(图 2)。将所得结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件,绘制 PPI 网络,此网络包含 212 个节点(靶点蛋白),1 107 条边(图 3)。通过拓扑分析得到度值排名前 10 的关键靶点(表 5)。

3.1.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析 基于“药物-化合物-疾病”网络共筛选到 224 个靶点基因进行富集分析。GO 富集分析得到生物过程(BP)条目 403 条、细胞组分(CC)条目 68 条、分子功

表 4 化合物网络拓扑分析关键成分
Table 4 Compound network topology analysis of key components

编号	化合物	度值	接近中心性
1	槲皮素(quercetin)	66	0.42
2	柚皮素(naringenin)	60	0.42
3	毛兰素(erianin)	59	0.41
4	对羟基苯丙酸甲酯[methyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate]	39	0.39
5	黑麦草内酯(lolilide)	19	0.37
6	石斛碱(dendrobine)	17	0.36
7	尿苷(uridine)	14	0.36
8	苯丙氨酸(phenylalanine)	12	0.36
9	D(+)-无水葡萄糖[D(+)-glucose]	12	0.36
10	D-甘露糖(D-mannose)	12	0.36

能(MF)条目 143 条,根据其基因数目从大到小排列,取前 10 位绘制 GO 分析条形图(图 4)。KEGG 通路富集分析共筛选了 130 条信号通路($P < 0.01$),根据富集基因数目,将前 20 条通路绘制气泡图,分析 KEGG 富集通路(图 5),其中涉及 Pathways in cancer(癌症途径)、Metabolic pathways(代谢途径)、PI3K-Akt signaling pathway、Rap1 signaling pathway 等信号通路。

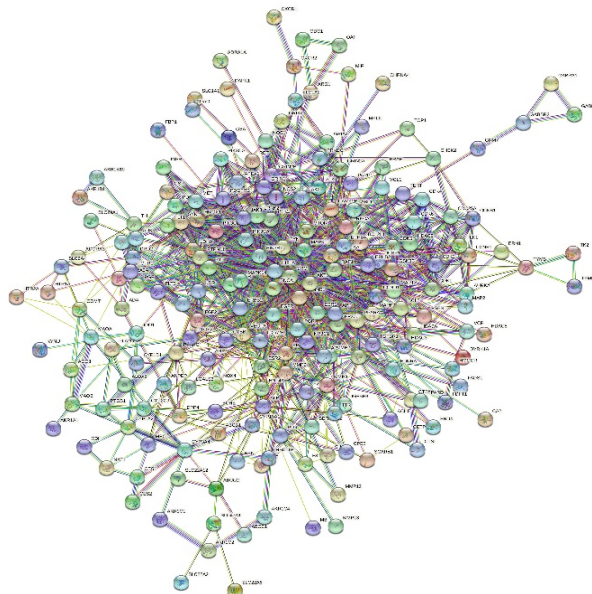


图 2 霍山石斛活性成分与肝损伤交集靶点相互作用关系
Fig. 2 Interaction between active components of *D. huoshanense* active ingredients and liver injury intersection targets

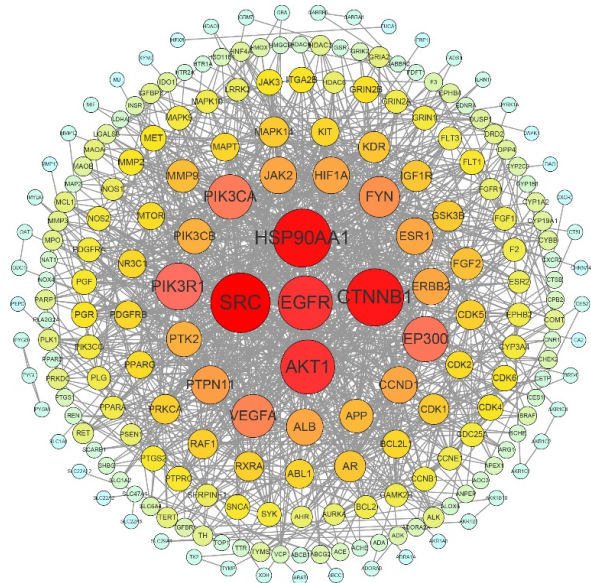


图 3 霍山石斛与肝损伤交集靶点 PPI 网络图
Fig. 3 PPI network of intersection target of *D. huoshanense* active ingredients and liver injury

3.1.6 分子对接 运用分子对接对 5 个核心靶点：AKT1、CTNNB1、EGFR、HSP90AA1、SRC 和“活性成分-疾病-靶点”网络中度值排名前 3 的有效成分：柚皮素、毛兰素、槲皮素进行分析。结果显示，各小分子与蛋白对接的结合能均 $< -20.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，说明各小分子与核心靶点各蛋白均具有较好的结合活性(图 6、7)。

表 5 PPI 网络拓扑分析关键靶点

Table 5 Key targets of PPI network topology analysis

排序	靶点	度值	接近中心性	PDB 数据库编号
1	SRC	58	0.50	1FMK
2	HSP90AA1	56	0.48	5J80
3	CTNNB1	55	0.50	5IVN
4	AKT1	51	0.49	1UNQ
5	EGFR	51	0.49	5UG9
6	PIK3R1	42	0.43	5AUL
7	EP300	40	0.46	5BT3
8	PIK3CA	39	0.43	7L1C
9	VEGFA	37	0.45	4KZN
10	FYN	34	0.44	4U17

3.2 体内实验结果

3.2.1 霍山石斛水提物对 ALI 小鼠肝脏病理形态的影响 对照组小鼠肝小叶结构清晰，肝细胞索以中央静脉为中心呈放射状排列，细胞排列整齐，肝血窦清晰，胞浆完整充盈；模型组小鼠肝小叶结构模糊，肝索排列紊乱，肝血窦结构模糊，可见大量大小不等、形状不一的胞浆空泡和脂肪变性，同时伴随肝细胞变性和坏死；水飞蓟素组肝小叶结构清晰，偶见空泡，少量炎症细胞浸润，肝血窦无扩张，肝细胞无明显变形、坏死等形态学改变；霍山石斛组肝小叶结构模糊程度有所改善，存在少量空泡和脂滴，肝细胞损伤程度较轻(图 8)。

3.2.2 霍山石斛水提物对 ALI 小鼠血清中 AST、ALT 及 TNF- α 、IL-6 水平的影响 与对照组比较，模型组血清中 AST、ALT 水平极显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，水飞蓟素组小鼠血清中 AST、ALT 水平极显著降低 ($P < 0.01$)，霍山石斛组小鼠血清中 AST、ALT 水平均显著降低 ($P < 0.05$)，结果表明，霍山石斛水提物可显著降低 ALT 和 AST 水平(表 6)。

与对照组相比，模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平极显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，水飞蓟素、霍山石斛组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平极显著下降 ($P < 0.01$)。结果表明，乙醇诱导肝损伤后，肝组织的炎症反应加重，而霍山石斛水提物可以抑制炎症因子水平，改善肝组织炎症，促进肝组织修复，发挥肝保护作用(表 6)。

3.2.3 霍山石斛水提物对 ALI 小鼠肝组织 IKK、NF- κ B、Akt mRNA 表达的影响 基于网络药理学提示的 PI3K/Akt 通路及其下游 NF- κ B 信号通路，考察霍

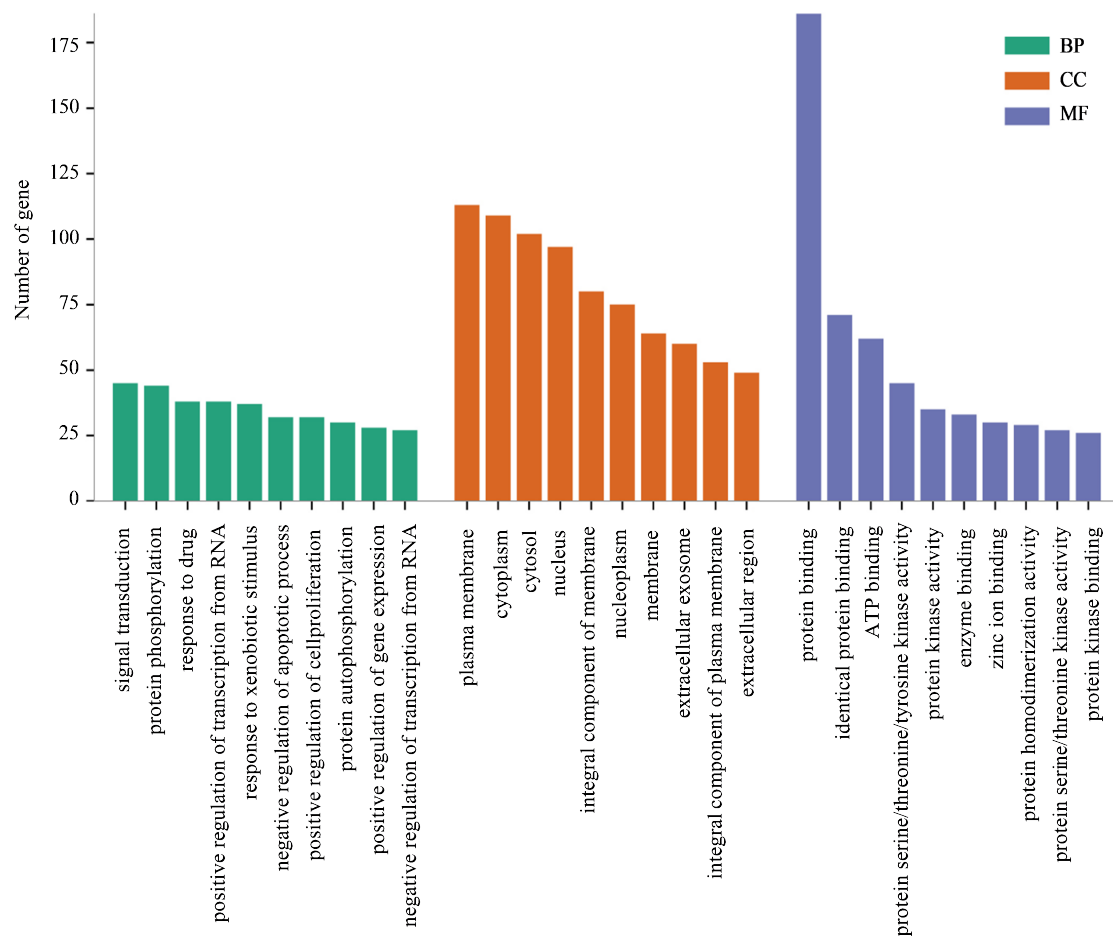


图 4 GO 富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis diagram of GO

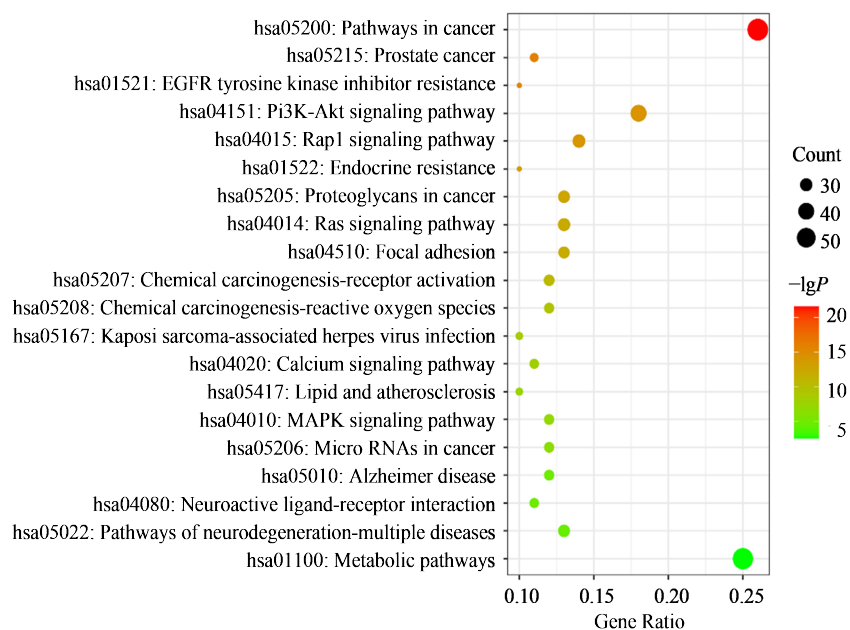


图 5 KEGG 通路分析

Fig. 5 KEGG pathway analysis

AKT1	-26.33	-23.66	-26.79
CTNNB1	-33.69	-29.43	-35.36
EGFR	-35.74	-30.68	-36.95
HSP90AA1	-32.06	-31.56	-33.52
SRC	-35.28	-29.30	-36.20
	柚皮素	毛兰素	槲皮素

图6 分子对接结果

Fig. 6 Molecular docking results

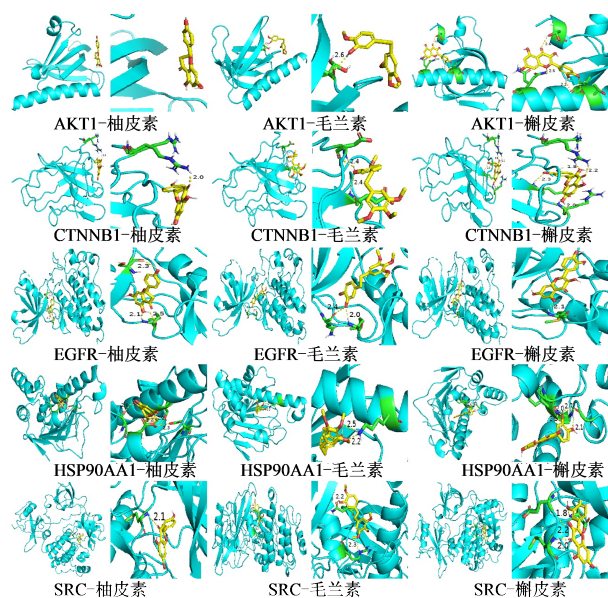


图7 霍山石斛活性成分与核心靶点的分子对接示意图

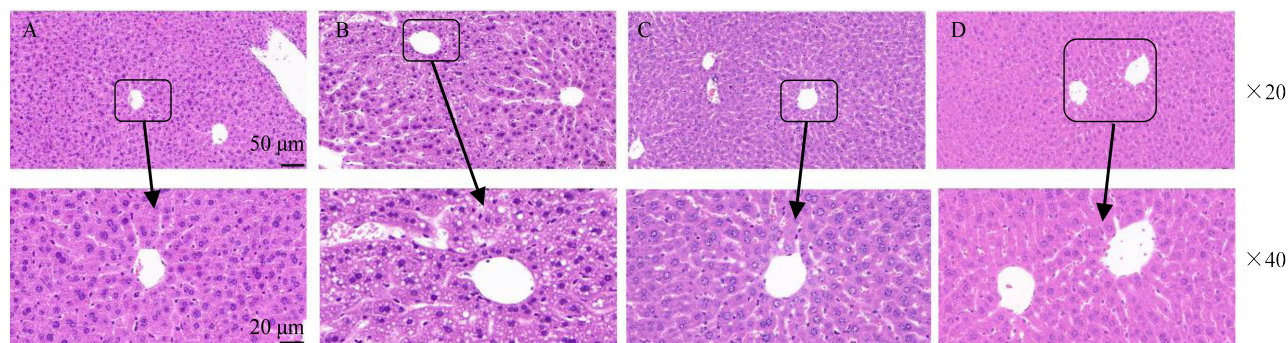
Fig. 7 Molecular docking of active ingredients and key targets of *D. huoshanense*

山石斛水提物对ALI小鼠肝组织中Akt及其上下游密切相关的*IKK*、*NF-κB* mRNA表达的影响。结果表7表明,与对照组相比,模型组小鼠肝组织中*IKK*、*NF-κB*、*Akt* mRNA水平极显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,霍山石斛组肝组织*IKK*、*NF-κB*、*Akt* mRNA水平极显著降低($P<0.01$)。

4 讨论

本研究通过网络药理学分析发现霍山石斛与肝损伤作用的关键靶点有SRC、HSP90AA1、CTNNB1、Akt1、EGFR等。GO/KEGG富集分析预测霍山石斛可能主要通过PI3K/Akt、MAPK等途径改善肝脏炎症损伤,与文献报道相契合,并得到了验证^[23-24]。在此基础上,进一步挖掘KEGG富集分析预测的可能途径,发现PI3K/Akt通路及其下游NF-κB信号通路与KEGG中的Alcohol liver disease通路^[25](KGEE通路编号:map04936)高度重合,与网络药理学提示关键靶点Akt1联系密切。有文献报道,霍山石斛水提物可缓解亚急性酒精性肝损伤,并且通过介导NF-κB/p65和p38MAPK发挥抗氧化、抗炎作用来降低酒精对肝细胞的损伤作用^[23-24, 26]。然而,霍山石斛对于ALI的治疗作用机制尚未阐明。

本研究通过霍山石斛水提物干预乙醇诱导的ALI小鼠模型,发现经霍山石斛水提物治疗后小鼠肝脏结构得以修复、肝细胞损伤程度减轻,小鼠血清中ALT、AST水平显著降低、IL-6、TNF-α水平显著降低,表明霍山石斛水提物可缓解炎症损伤,恢复对乙醇诱导酒精性肝病小鼠的肝脏功能。进一步分析各组小鼠肝组织*IKK*、*NF-κB*、*Akt* mRNA表达的情况,发现经霍山石斛水提物治疗后小鼠肝组织中*IKK*、*NF-κB*、*Akt*水平显著降低,提示霍山石斛



A-对照组;B-模型组;C-水飞蓟素组;D-霍山石斛组。

A-control group; B-model group; C-silymarin group; D-*D. huoshanense* group.

图8 霍山石斛水提物对ALI小鼠肝组织病理学变化的影响(HE染色)

Fig. 8 Effect of *D. huoshanense* water extract on pathological changes of liver tissues in mice with ALI (HE staining)

表6 霍山石斛水提物对ALI小鼠血清中AST、ALT、TNF- α 、IL-6水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)Table 6 Effect of *D. huoshanense* water extract on level of AST, ALT, TNF- α , IL-6 in serum of mice with ALI($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	18.02±4.88	16.36±2.21	47.88±8.65	41.41±10.71
模型	—	41.77±11.80 ^{##}	35.64±6.79 ^{##}	87.14±7.91 ^{##}	67.09±4.68 ^{##}
霍山石斛	1.56	21.30±3.87 ^{**}	20.47±3.16 ^{**}	52.37±13.61 ^{**}	44.80±5.56 ^{**}
水飞蓟素	0.15	22.26±5.48 ^{**}	21.90±6.19 ^{**}	55.18±11.80 ^{**}	48.45±4.41 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.01$ 。^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group.表7 霍山石斛水提物对ALI小鼠肝组织IKK、NF- κ B、Akt mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)Table 7 Effect of *D. huoshanense* water extract on expression level of IKK, NF- κ B, Akt mRNA in liver tissues of ALI mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IKK/ β -actin	NF- κ B/ β -actin	Akt/ β -actin
对照	—	1.01±0.14	1.00±0.12	1.01±0.14
模型	—	2.45±0.25 ^{##}	2.34±0.15 ^{##}	1.38±0.11 ^{##}
霍山石斛	1.56	1.13±0.02 ^{**}	0.81±0.05 ^{**}	0.64±0.01 ^{**}
水飞蓟素	0.15	0.97±0.06 ^{**}	0.95±0.07 ^{**}	0.59±0.04 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组相比: ^{**} $P<0.01$ 。^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group.

水提物可能通过Akt/NF- κ B/IKK途径参与ALI相关通路,抑制IL-6、TNF- α 炎症因子的异常分泌,减轻炎症反应,从而调节ALI的炎症损伤。提示霍山石斛具有较好的预防急性酒精性肝损伤发展为酒精性肝病的潜在功效,为霍山石斛治疗肝损伤的临床应用提供新的思路。

本研究尚有不足之处,将进一步对霍山石斛水提物进行成分分析,挖掘霍山石斛治疗酒精性肝损伤的物质基础。霍山石斛水提物中含有较为丰富的多糖类物质,霍山石斛水提物中含有较为丰富的多糖类物质,研究报道霍山石斛多糖可治疗酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病、化学性肝损伤以及肝纤维化^[27]。本研究在网络药理学分析发现霍山石斛与肝损伤作用的“药物-化合物-靶点”网络中度值排名前20的有效活性成分仅见无水葡萄糖、甘露糖,提示应进一步提高对霍山石斛多糖组成、构效关系等研究^[28],完善网络药理学数据库信息,提高靶点预测准确性。

运用分子对接技术对霍山石斛活性成分与核心靶点进行分析,发现柚皮素、毛兰素、槲皮素等具有保肝活性^[29-34]的成分与核心靶点具有良好的结合活性,为霍山石斛预防酒精性肝病有效成分富集分离及产品开发提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 肖海军, 卞康坤, 包旭, 等. 红花清肝十三味丸通过激活HNF4 α 改善肝功能的保肝机制研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2024, 45(1): 11-19.
Xiao H J, Bian K K, Bao X, et al. Improving liver function by activating HNF4 α is a mechanism underlying the hepatoprotective effects of Honghua Qinggan 13 flavor pill, a traditional Mongolian medicine [J]. Animal Husbandry Feed Sci, 2024, 45(1): 11-19.
- [2] Qian A, Zhou L, Shi D X, et al. *Portulaca oleracea* alleviates CCl₄-induced acute liver injury by regulating hepatic S100A8 and S100A9 [J]. Chin Herb Med, 2023, 15(1): 110-116.
- [3] Karatayli E, Hall R A, Weber S N, et al. Effect of alcohol on the interleukin 6-mediated inflammatory response in a new mouse model of acute-on-chronic liver injury [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(2): 298-307.
- [4] 梁高爽, 彭金英, 李专. 酒精相关性肝病致病机制与诊疗研究进展 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2023, 20(4): 1-10.
Liang G S, Peng J Y, Li Z. Advances on the study of pathogenesis and treatment of alcohol-associated liver disease [J]. J Hunan Norm Univ Med Sci, 2023, 20(4): 1-10.
- [5] 谢廷良, 陈欣怡, 欧伟杰, 等. 酒精性肝病的药物治疗最新研究进展 [J]. 海峡药学, 2021, 33(10): 89-92.

- Xie T L, Chen X Y, Ou W J, et al. Recent advances in drug treatment for alcoholic liver disease [J]. Strait Pharm J, 2021, 33(10): 89-92.
- [6] 姚静, 刘翠玲, 孙辉, 等. 霍山石斛鲜品对慢性酒精性肝损伤小鼠的保护作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(6): 764-770.
- Yao J, Liu C L, Sun H, et al. Study on the protective effects of fresh *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng on chronic alcoholic liver disease in mice [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2023, 34(6): 764-770.
- [7] 聂春艳, 汪鹤, 潘利华, 等. 霍山石斛水溶性多糖抗亚急性酒精性肝损伤研究 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(17): 100-105.
- Nie C Y, Wang H, Pan L H, et al. Effects of water-soluble polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* against alcohol-induced subacute liver injury [J]. J Anhui Agric Sci, 2017, 45(17): 100-105.
- [8] 钱明雪, 李胜立, 李凡, 等. 6种石斛多糖抗亚急性酒精性肝损伤作用的比较 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(24): 2117-2123.
- Qian M X, Li S L, Li F, et al. Effects of polysaccharides from six different *Dendrobium* species against alcohol-induced subacute liver injury in mice [J]. Chin Pharm J, 2015, 50(24): 2117-2123.
- [9] Wang X Y, Luo J P, Chen R, et al. *Dendrobium huoshanense* polysaccharide prevents ethanol-induced liver injury in mice by metabolomic analysis [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 78: 354-362.
- [10] 王晓玉. 霍山石斛多糖干预小鼠亚急性酒精性肝损伤的蛋白质组学及代谢组学研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2014.
- Wang X Y. Protein Metabonomics and metabonomics study on intervention of polysaccharide from dendrobium huoshanense on subacute alcoholic liver injury in mice [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2014.
- [11] 伏秀, 马佳怡, 朱思婷, 等. 中药解酒机制研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2023, 44(6): 458-461.
- Fu X, Ma J Y, Zhu S T, et al. Research progress on the mechanism of traditional Chinese medicine for relieving alcoholism [J]. J Jilin Med Univ, 2023, 44(6): 458-461.
- [12] 杨赓, 王毛毛, 于淼, 等. 基于网络药理学、分子对接和体外实验探讨防己生物碱类活性成分逆转乳腺癌耐药的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2841-2851.
- Yan Y, Wang M M, Yu M, et al. Mechanism of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on reversing drug resistance in breast cancer based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(9): 2841-2851.
- [13] Daina A, Michielin 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: 42717.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020
- [15] 邓文龙. 动物中人体剂量换算遵循的原则 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(3): 196-197.
- Deng W L. Principles of human dose conversion in animals [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2016, 32(3): 196-197.
- [16] 桂文琪, 方媛, 聊晓玉, 等. 基于网络药理学和体内实验验证霍山石斛治疗胃溃疡的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(7): 151-161.
- Gui W Q, Fang Y, Liao X Y, et al. Mechanism of *Dendrobium huoshanense* in treatment of gastric ulcer: Based on network pharmacology and *in vivo* experiment [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(7): 151-161.
- [17] 高华武, 陈明, 龙子江, 等. 水飞蓟宾对高脂诱导非酒精性脂肪肝大鼠的调脂保肝作用 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(6): 773-777.
- Gao H W, Chen M, Long Z J, et al. Effect of silybin on regulating and protecting the liver of non-alcoholic fatty liver induced by high fat in rats [J]. Drug Eval Res, 2017, 40(6): 773-777.
- [18] 冯彩玲, 杨彬君, 吴岩斌, 等. 牛樟芝提取物调控 Nrf2/HO-1 通路对酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 菌物学报, 2021, 40(9): 2433-2444.
- Feng C L, Yang B J, Wu Y B, et al. Hepatoprotective effects of extracts of *Taiwanofungus camphoratus* on liver with alcohol-induced injury through regulation of Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Mycosystema, 2021, 40(9): 2433-2444.
- [19] 樊鲁倩, 关佳佳, 迟良, 等. 昆明系小鼠酒精性脂肪肝与非酒精性脂肪肝造模比较 [J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2023, 40(4): 270-276.
- Fan L Q, Guan J J, Chi L, et al. Model comparison of alcoholic fatty liver and nonalcoholic fatty liver in Kunming mice [J]. J Qingdao Agric Univ Nat Sci, 2023, 40(4): 270-276.
- [20] 刘政祥. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路研究黄精水提取物对 CCl₄ 诱导的小鼠慢性肝纤维化的保护作用 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2023.
- Liu Z X. Based on TLR4/MyD88/NF- κ B pathway, the protective effect of water extract of *Polygonum aviculare* on CCl₄-induced chronic liver fibrosis in mice was studied [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2023.

- [21] 姜立娟. 经典名方玉液汤通过PI3K/AKT信号途径改善2型糖尿病胰岛素抵抗的作用及机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2021.
- Jiang L J. Study on the effect and mechanism of classic prescription Yuye Decoction on improving insulin resistance in type 2 diabetes mellitus through PI₃K/AKT signaling pathway [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2021.
- [22] 陈璇. 黄酮类化合物(槲皮素、木犀草素)与类胡萝卜素(番茄红素、叶黄素)协同抗氧化作用及分子机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- Chen X. Synergistic antioxidant effects and mechanisms of flavonoids (quercetin, luteolin) and carotenoids (lycopene, lutein) [D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.
- [23] 王凤华, 韩吉春, 李德芳, 等. 霍山石斛水提取物通过介导NF- κ B/p65和p38 MAPK减轻小鼠酒精性肝损伤[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(4): 569-574.
- Wang F H, Han J C, Li D F, et al. Protective effect of *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng water extract on alcohol-induced acute liver injury by inhibiting NF- κ B/p65 and p38 mapk [J]. Nat Prod Res Dev, 2017, 29(4): 569-574.
- [24] 邓光辉, 叶梦娟, 蔡肖, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨霍山石斛治疗非酒精性脂肪肝的作用机制[J]. 中草药, 2023, 54(16): 5244-5256.
- Deng G H, Ye M J, Cai X, et al. Mechanisms of *Dendrobium huoshanense* against non-alcoholic fatty liver disease by network pharmacology combined with molecular docking and experimental validation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(16): 5244-5256.
- [25] 张金保, 杨宗慧, 其乐木格, 等. 基于网络药理学和动物实验探讨大黄-柴胡药对治疗酒精性肝病的作用及机制[J]. 中国医院药学杂志: 1-11 [2024-06-04].
- Zhang J B, Yang Z H, Qi L M G, et al. Study on the effect and mechanism of *Rhei Radix* et *Rhizoma-Bupleuri Radix* drug pair in the treatment of alcoholic liver disease based on network pharmacology and animal experiments [J]. Chin J Hosp Pharm, 1-11 [2024-06-04].
- [26] 孟海涛, 汪鹤, 查学强, 等. 霍山石斛不同提取物抗小鼠亚急性酒精性肝损伤活性的比较研究[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 229-234.
- Meng H T, Wang H, Zha X Q, et al. Comparison of hepatoprotective effects of different extracts from *Dendrobium huoshanense* against alcohol-induced subacute liver injury in mice [J]. Food Sci, 2015, 36(13): 229-234.
- [27] 邓光辉, 俞年军, 王妍妍, 等. 霍山石斛活性成分对肝脏疾病作用及其机制研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(21): 6959-6967.
- Deng G H, Yu N J, Wang Y Y, et al. Research progress on effect and mechanism of *Dendrobium huoshanense* and its active components against liver diseases [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(21): 6959-6967.
- [28] 王皓南, 范晶, 余坤子, 等. 霍山石斛多糖的结构分析、生物活性研究进展及与不同种间多糖成分差异性分析[J]. 中草药, 2023, 54(15): 5044-5056.
- Wang H N, Fan J, Yu K Z, et al. Structure analysis, bioactivity research progress of *Dendrobium Huoshanense* polysaccharide and the difference of polysaccharide composition between different species [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15): 5044-5056.
- [29] 吴丽霞, 王雨薇, 吴红雁. 柚皮素通过激活凋亡信号抑制肝星状细胞活化[J]. 中国药房, 2023, 34(10): 1187-1192.
- Wu L X, Wang Y W, Wu H Y. Naringenin inhibits the activation of hepatic stellate cells by activating apoptosis signals [J]. J China Pharm, 2023, 34(10): 1187-1192.
- [30] 岳杉杉, 彭安康, 马泽江, 等. 柚皮素通过调控TGF- β 1/smad通路抑制肝纤维化[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(2): 248-254.
- Yue B B, Peng A K, Ma Z J, et al. Naringenin inhibits liver fibrosis by regulating TGF- β 1/smad pathway [J]. Chin Pharmacol Bullet, 2022, 38(2): 248-254.
- [31] Dong H, Wang M, Chang C, et al. Erianin inhibits the oncogenic properties of hepatocellular carcinoma via inducing DNA damage and aberrant mitosis [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 182: 114266.
- [32] 虞璐, 张怡莹, 叶佳琪, 等. 毛兰素对人肝癌细胞系HEPG2增殖、迁移、凋亡和上皮间质转化的影响及其机制[J]. 山东医药, 2023, 63(09): 17-21.
- Yu L, Zhang Y Y, Ye J Q, et al. Effects of erianin on proliferation, migration, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation of human hepatocellular carcinoma cell line HEPG2 and its mechanism [J]. Shandong Med, 2023, 63(09): 17-21.
- [33] Sanjay S, Girish C, Toi P C, et al. Quercetin modulates NRF2 and NF- κ B/TLR-4 pathways to protect against isoniazid-and rifampicin-induced hepatotoxicity *in vivo* [J]. Can J Physiol Pharm, 2021, 99(9): 952-963.
- [34] 张红娜, 周玉法, 刘敬博, 等. 基于NF- κ B和Nrf2信号通路探讨槲皮素的护肝功效及其作用机理[J]. 西北农业学报, 2020, 29(1): 143-149.
- Zhang H N, Zhou Y F, Liu J B, et al. To investigate the protective effect of quercetin on liver and its mechanism based on NF- κ B and Nrf2 signaling pathways [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2020, 29(1): 143-149.