

## 基于网络药理学与动物实验探讨姜黄素对肝脏缺血再灌注损伤的作用机制

董鑫宇<sup>1</sup>, 曲明海<sup>1#</sup>, 何伟<sup>1</sup>, 潘云健<sup>1</sup>, 王瑞华<sup>1</sup>, 唐艳玲<sup>1</sup>, 黄燕荣<sup>1</sup>, 刘秋邑<sup>1</sup>, 邢雪琨<sup>1,2,3\*</sup>

1. 桂林医科大学 公共卫生学院, 广西 桂林 541199

2. 广西环境暴露组学与全生命周期健康重点实验室, 广西 桂林 541199

3. 广西全生命周期健康保健研究重点实验室, 广西 桂林 541199

**摘要:** **目的** 旨在通过网络药理学探讨姜黄素对肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)的影响。**方法** 采集姜黄素的化学结构, 并利用 SwissTargetPrediction、PharmMapper 等多个数据库确定潜在的靶点。使用 UniProt 数据库进行数据转换。从 GEO 数据库(GSE151648)中提取有关 HIRI 的信息。使用 R 软件包 DESeq2 进行差异基因表达分析寻找潜在的 HIRI 靶点。进行加权基因共表达网络分析(WGCNA)确定交集靶点, 并使用 STRING 平台构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)模型。通过基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 结合机器学习进一步筛选出关键基因, 并利用 AutodockTools 和其他软件完成核心分子的对接模拟。在此基础上对小鼠进行的体内实验验证这些关键基因。**结果** WGCNA 分析确定了 25 个重叠的目标, 机器学习确定了 5 个与 HIRI 相关的关键基因。富集分析结果表明姜黄素和生物学过程如癌症、细胞凋亡和转录核因子  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) 信号通路之间可能存在联系。动物实验验证组织染色切片与血清肝功能指标, 并进一步验证关键基因的表达, 从而验证姜黄素可以减轻 HIRI 损伤。**结论** 姜黄素可以通过下调促炎细胞因子和细胞周期蛋白水平来改善炎症反应与细胞凋亡, 进而改善 HIRI。

**关键词:** 网络药理学; 分子对接; 姜黄素; 肝脏缺血再灌注损伤; 机器学习

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)05-1200-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.012

## Mechanism of curcumin on hepatic ischemia-reperfusion injury based on network pharmacology and animal experiments

DONG Xinyu<sup>1</sup>, QU Minghai<sup>1</sup>, HE Wei<sup>1</sup>, PAN Yunjian<sup>1</sup>, WANG Ruihua<sup>1</sup>, TANG Yanling<sup>1</sup>, HUANG Yanrong<sup>1</sup>, LIU Qiuyi<sup>1</sup>, XING Xuekun<sup>1,2,3</sup>

1. School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541199, China

2. Guangxi Key Laboratory of Environmental Exposomics and Entire Lifecycle Health, Guilin 541199, China

3. Guangxi Key Laboratory of Entire Lifecycle Health and Care, Guilin 541199, China

**Abstract: Objective** To explore the effect of curcumin on liver ischemia-reperfusion injury through network pharmacology. **Methods** The chemical structure of curcumin was collected, and the potential targets were identified by using SwissTargetPrediction, PharmMapper and other databases. UniProt database was used for data conversion. Information about hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI) was extracted from GEO database (GSE151648). Differential gene expression analysis was carried out by using R software package DESeq2 to find potential HIRI targets. WGCNA analysis was carried out to determine the intersection targets, and the protein interaction network model was constructed using the STRING platform. Through the enrichment analysis of gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), combined with machine learning, the key genes were further screened out, and the docking simulation of core molecules was completed by using AutodockTools and other software. On this basis, these key genes were verified by *in vivo* experiments on mice. **Results** WGCNA analysis identified 25 overlapping targets, and machine learning identified five key genes related to HIRI. The results of enrichment analysis showed that there may be a relationship between curcumin

收稿日期: 2024-08-09

基金项目: 国家自然科学基金(82260802); 桂林市科技计划项目(20220139-6-2)

作者简介: 董鑫宇, 硕士研究生, 肝脏疾病治疗的分子机制的研究方向。E-mail: 1220298141@qq.com

#共同第一作者: 曲明海, 硕士研究生, 肝脏疾病治疗的分子机制的研究方向。E-mail: quminghaixiao@163.com

\*通信作者: 邢雪琨, 博士, 副教授, 肝脏疾病治疗的分子机制的研究方向。E-mail: xuekun222@126.com

and biological processes such as cancer, apoptosis and NF- $\kappa$ B signaling pathway. Animal experiments verify tissue staining sections and serum liver function indexes, and further verify the expression of key genes, thus verifying that curcumin can alleviate the injury of HIRI. **Conclusion** Curcumin can improve inflammatory reaction and apoptosis by down-regulating the levels of pro-inflammatory cytokines and isopycycline, and then improve HIRI.

**Key words:** network pharmacology; molecular docking; curcumin; liver ischemia-reperfusion injury; machine learning

肝脏缺血再灌注损伤 (HIRI) 普遍发生在肝叶切除、肝移植等手术中, 严重影响患者的预后<sup>[1]</sup>。在缺血阶段, 肝脏组织和细胞通常由于肝门阻断血流骤然减少导致缺氧, 而缺乏氧气和营养物质使腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 水平降低, 细胞能量代谢中断, 最后进入应激状态。再灌注期间, 血流恢复会引发强烈的炎症反应, 促使大量白细胞和炎症介质 (如细胞因子、趋化因子等) 聚集到肝脏。炎症的过度激活也会引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  过载严重和异常的渗透, 直接损害线粒体外膜的结构完整性。同时线粒体通透性转换孔 (mPTP) 开放, 激活钙依赖性蛋白酶, 细胞质中细胞色素 C 被释放, 继而引发细胞凋亡。因此, 探索减少肝损伤的方法对于改善患者预后和降低死亡率至关重要。目前, 暂无治疗 HIRI 的确切有效药物, 只能通过药物预处理例如类固醇类药物、 $\alpha$ -生育酚等抗氧化剂降低炎症与氧化应激反应, 然而药物效果有限并且具有不良反应。

近年, 中药由于其独特的“药食同源”理论以及靶点多、不良反应小等特点被学者研究。姜黄素是姜黄根茎中的主要生物活性化合物, 它独特的结构使其具有较强的抗氧化能力, 可以调节炎症反应, 并且与肿瘤也密切相关, 被认为具有保肝作用以及治疗糖尿病和心血管疾病的潜力<sup>[2-3]</sup>。近年已有研究表明姜黄素对心脏<sup>[4]</sup>、脑<sup>[5]</sup>、肾脏<sup>[6]</sup>等器官的缺血再灌注 (IR) 损伤有保护作用。例如 Kar 等<sup>[7]</sup>的研究显示, 用姜黄素和 LoxBlock-1 预处理降低了 IR 模型中的氧化应激标志物, 表明其在减轻肝脏、胰腺和心脏等器官的 IR 损伤方面具有潜力。Liu 等<sup>[8]</sup>实验也表明姜黄素类似物 AI-44 可以与过氧化氢酶体氧化酶 1 (PRDX1) 结合, 促进其与 Caspase-1 的相互作用, 进而抑制 NOD 样受体家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLRP3) 和 ASC 的结合, 减轻炎症反应。在 IR 阶段, 活性氧和炎症因子等细胞毒性物质会损害血管内皮细胞, 导致血管舒张功能显著受损。然而有学者发现, 姜黄素对血管内皮有明显的保护作用, 其主要是以促进血管内皮细胞的再生与缓解血管内皮细胞损伤的形式发挥作用<sup>[9]</sup>。

网络药理学可以整合生物信息学和药理学信息, 通过选取特定信号节点进行多靶点药物与疾病之间的联系分析, 再利用其中药理机制关注各个活性成分与各种不同基因或蛋白之间的相互作用情况<sup>[10-12]</sup>。本研究旨在利用网络药理学和分子对接的方法<sup>[13]</sup>确定姜黄素在 HIRI 中的潜在作用靶点和作用途径, 并结合体内实验验证关键靶点, 以期为后续研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学靶点预测、机器学习与分子对接模型

**1.1.1 姜黄素相关靶点预测** 通过姜黄素的结构 (CC1=C(C(=CC(=C1)C=CC(=O)CC(=O)C=CC2=CC(=C(C(=C2)O)OC)O)) 在 CODD-Pred<sup>[14]</sup>、SwissTargetPrediction<sup>[15]</sup>、TCMBANK<sup>[16]</sup> 和 PharmMapper<sup>[17]</sup>、STITCH<sup>[18]</sup>、SEA<sup>[19]</sup>、BATMAN-TCM<sup>[20]</sup> 综合搜索姜黄素的潜在靶点。使用 UniProt<sup>[21]</sup> 数据库转换校正目标 ID, 去除重复的靶标。

**1.1.2 HIRI 相关靶点预测** 在 GEO 数据库 (<https://www.geneCards.org/>)<sup>[22]</sup> 中搜索 “Hepatic injury due to ischemia-reperfusion” “HIRI” “Reperfusion injury in the liver” 等寻找相关数据集。最终筛选出包含至少 40 个样本的数据集 GSE151648。该数据集包括在再灌注前收集的 40 个由于 IR 导致的肝损伤样本和在 2 h 间隔后再灌注后采集的 40 个样本。使用在线工具 g:profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/convert>)<sup>[23]</sup> 将 geneID 转换为 genesymbol, 除去不可转换的基因。为了鉴定差异表达的基因, 采用了 R 包中的 DESeq2 方法<sup>[24]</sup> 对 GSE151648 进行差异分析, 标准设置为 LgFold change (FC) > 1, 校正 P 值 (padj) < 0.05。利用 DataSetFromMatrix 函数构建输入的基因表达矩阵, 采用 DESeq2 包提供的方差稳定变换 (VST) 方法对原始 Counts 矩阵进行标准化处理 (Normalize)<sup>[25]</sup>。

**1.1.3 加权基因共表达网络分析** 利用 DESeq2 的 R 包中的功能转换矩阵进行加权基因共表达网络分析 (WGCNA)<sup>[26]</sup>。排除了具有最低中位数绝对偏差 (MAD) 的前 75% 个体基因。然后通过 WGCNA

算法为基因构建无标度共表达网络。通过 goodSamplesGenes 函数识别后未发现异常样本及异常基因。将幂为 4 的邻接度转化为拓扑重叠矩阵 (TOM), 用于描述相应的相异度 (1-TOM)。设置最小基因组为 30。灵敏度为 3 构建了平均连锁层次聚类。进一步计算模块特征基因的差异性, 并为模块树状图选择了一条切割线将距离小于 0.25 的模块也一起合并, 最后构建基因模块。

**1.1.4 Venn 图** 将 712 个姜黄素的靶点, 1 322 个 HIRI 的潜在靶点和 237 个通过 WGCNA 筛选出来的关键基因通过 sangerbox3.0<sup>[27]</sup>绘制 Venn 图。

**1.1.5 交叉靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络** 通过 GeneMANIA (<http://www.genemania.org>)<sup>[28]</sup> and STRING (<https://string-db.org/>)<sup>[29]</sup>分析交集靶点的基因相互作用网络和 PPI 分析。

**1.1.6 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG)** GO 分析通常用于基因和表达产物注释, 包括 3 个关键要素: 生物过程 (BP)、细胞成分 (CC) 和分子功能 (MF)<sup>[30]</sup>。KEGG 分析<sup>[31]</sup>用于理解生物学中的复杂功能和系统, 如细胞、有机体和生态系统。利用编程平台中的 clusterProfiler<sup>[32]</sup>工具对 25 个交集进行 GO 和 KEGG 富集分析。使用的筛选标准是  $P < 0.05$  和  $FDR < 0.1$ 。为了尽可能多获取靶点所参与信号通路, 导入 metascape<sup>[33]</sup>数据库进一步富集分析, 判断标准是  $P < 0.01$  和最小数量的富集基因  $\geq 3$ , 选择前 10 个信号通路导入 Cytoscape3.10.0<sup>[34]</sup>中构建成分-靶点-通路网络。

**1.1.7 机器学习** 通过构建包括 Lasso、RF、SVM、DT、GLM、DT、GLM、GBM、XGBoost 9 种不同的机器学习模型, 采用五倍交叉验证, 进行交集靶点数据表达。9 种机器学习模型通过程序软件包 caret<sup>[35]</sup>、DALEX<sup>[36]</sup>、randomForest<sup>[37]</sup>、kernlab<sup>[38]</sup>和 Xgboost<sup>[39]</sup>构建。交集基因作为解释变量, HIRI 临床样本作为反应变量。在从 GSE1561648 获得的 80 个样本中, 56 个样本用于训练, 24 个样本用于验证。使用 ggplot2 和 pROC<sup>[40]</sup>软件包创建了包括逆累积分布图、残差箱线图和 ROC 曲线。研究结果表明, GBM、XGBoost 和 RF 模型具有出色的诊断性能。为了提高预测准确性, 在 GBM 和 XGBoost 模型中实施了 10 重交叉验证, 重复性为 5。并将 Ntree = 1 000 进一步提高 RF 模型预测的准确性, 同时绘制 3 个机器学习模型预测的重要性评分图, 选择 XGBoost、RF 和 GBM 3 个机器学习模型预测出

top10 的重要靶点, 通过 Venn 图获得最终核心靶点。

**1.1.8 单基因 GSEA 分析** 使用单基因 GSEA<sup>[41]</sup>对核心靶基因进行富集分析。根据核心靶点的基因表达谱, 将样本分为低表达组 ( $< 50\%$ ), 高表达组 ( $\geq 50\%$ ), 基于 Molecular Signatures Database 选择 C2.cp.kegg.v7.4.symbols.gmt 用作参考基因组, 最小基因集为 5, 最大基因集为 5 000, 反复抽样次数为 1 000, 以标准化富集得分 (NES) 的绝对值  $> 1.5$ ,  $P < 0.05$ ,  $FDR < 0.25$  作为筛选标准, 用以评估相关信号通路。

**1.1.9 Friends 分析** Friends 分析是一种基于网络拓扑结构的分析方法。采用 GOSemSim<sup>[30]</sup>程序包对核心靶点进行 Friends 分析, 并获得核心靶点的重要性排列。

**1.1.10 受试者工作特征 ROC 曲线、Calibration 校正曲线以及 DCA 决策曲线** 利用 glm 函数创建二分类 Logistic 模型, 使用 rms 程序包构建 Nomogram 相关模型并进行可视化, 以此评估 HIRI 的预后。使用 pROC 包生成 ROC 曲线并校准分析和可视化。此外, 采用 rmda 包计算对应净收益率情况并进行 DCA 曲线可视化。Nomogram 图评估 ROC 曲线、Calibration 校正曲线和 DCA 决策曲线。

**1.1.11 分子对接** 基于 PDB<sup>[42]</sup>数据库下载核心靶点的蛋白晶体结构, 从 PubChem<sup>[43]</sup>数据库获得姜黄素的 3D 结构, 并在 MMFF94 力场下进行能量最小化。采用 AutoDock Vina 1.1.2<sup>[44]</sup>软件进行分子对接工作, 在对接开始之前, 使用 PyMol 2.5.5 对受体蛋白进行处理。随后设置对接盒子, 使之包裹整个蛋白结构。此外, 使用 ADFRsuite 1.3<sup>[45]</sup>将其转换为 AutoDock Vina 1.1.2 对接必须的 PDBQT 格式。对接时将全局搜索的详尽度设为 32, 其余参数保持默认设置。输出的最高的对接构象使用 PyMol 2.5.5 进行可视化分析。

## 1.2 体内实验

**1.2.1 实验材料** 姜黄素 (北京索莱宝科技有限公司; 货号规格: C7090-5 g; 质量分数  $> 95\%$ ); 二甲基亚砜 (北京索莱宝科技有限公司; 货号规格: D8370-100 mL; 质量分数  $> 99.9\%$ ); 4%组织细胞固定液 (北京索莱宝科技有限公司; 货号规格: P1110-500 mL); Trizol (生工生物工程股份有限公司; 货号规格: B511311-100 mL); ToloScript All-in-one RT EasyMix for qPCR (吐露港生物科技有限公司; 货号规格: 22107-20  $\mu\text{L}/\text{rxn}$ ); 2xQ5 SYBR qPCR Master mix

(吐露港生物科技公司; 货号规格: 22208-1 mL); 天冬氨酸基转移酶 (AST/GOT) 比色法测试盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; E-BC-K236-M-96 T); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT/GPT) 比色法测试盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 货号规格: E-BC-K235-M-96 T)。

1.2.2 动物 SPF C57BL/6J 小鼠, 6~7 周, 体质量约 19~22 g[购自江苏华创信诺医药科技有限公司; 生产许可证编号: SCXK(苏)2020-0009; 伦理编号: GLMC-IACUC-20241067]。

1.2.3 仪器 L-600 离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司); A28140 实时荧光定量 PCR 仪 (赛默飞世尔科技有限公司); THZ-92C 恒温振荡器 (上海博迅实业有限公司); A51119700DPC 全波长扫描式多功能微孔板读数仪 (赛默飞世尔科技有限公司); 3CP-F020-5 快速匀浆破碎仪 (3M 中国有限公司)。

1.2.4 小鼠 HIRI 的模型和实验设计 SPF C57BL/6J 小鼠经过 3 d 的适应性进食后, 随机分配为假手术组、模型 (IR) 组、姜黄素组。IR 组小鼠

用戊巴比妥钠诱导麻醉, 从小鼠腹正中做切口, 用血管夹夹闭肝左、中叶脉管干, 缺血 1 h 后松开血管夹, 进行 6 h 再灌注。假手术组只做切口不行手术。姜黄素组食管给予姜黄素 (50 mg·kg<sup>-1</sup>), 每日 1 次, 共 7 d 后进行 I/R 手术。

1.2.5 苏木精-伊红 (HE) 染色和组织学分析 肝组织样品在 4% 多聚甲醛中固定 48 h 后, 进行石蜡包埋。将包埋的肝组织切成连续的 5 μm 厚的切片, 并用 HE 染色。

1.2.6 血清肝功能指标的检测 参考 AST 与 ALT 比色法测试盒的要求制定标准曲线方程式。收集小鼠血液上清液, 于波长 510 nm 处测吸光度值, 带入公式中, 测定 ALT 及 AST 值。

1.2.7 聚合酶链反应 肝组织研磨后, 加入 Trizol 试剂冰上裂解提取总 RNA, 逆转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增。以 β-actin 为内参, 用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 公式计算 mRNA 表达量。引物序列如下表 1 所示。

1.2.8 统计分析 使用 SPSS 24.0 分析后, 采用方差分析比较各组间差异, 使用 GraphPad Prism 8 可视化。

表 1 基因引物序列  
Table 1 Gene Primer Sequences

| 基因             | 引物序列 (5'→3')                |                               |
|----------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <i>mβactin</i> | F-ACTGCCGCATCCTCTTCTCTC     | R-AACCGCTCGTTGCCAATAGTG       |
| <i>mAdams4</i> | F-GGAACGGTGGCAAGTATTGTGAG   | R-AGGTCGGTTCGGTGGTTGTAG       |
| <i>mCdkn1a</i> | F-CCGTGGACAGTGAGCAGTTG      | R-CCTCCAGCGGCGTCTCC           |
| <i>mEpha2</i>  | F-TCCTACCGCAAGTTCACCTCAG    | R-GCCGTTCCGCATAAGTCATCAC      |
| <i>mCXCL8</i>  | F-GACAGAAGTCATAGCCACTCTCAAG | R-TCAGTTAGCCTTGCCCTTTGTTTCAAG |
| <i>mCCL2</i>   | F-CACTCACCTGCTGCTACTCATTC   | R-GCTTCTTTGGGACACCTGCTG       |

## 2 结果

### 2.1 基因差异分析和加权基因共表达网络分析

以 $|\log_2FC|>1$ 、 $FDR<0.05$  作为筛选标准, 采用 VST 方法基因表达矩阵标准化, 通过火山图展示差异基因, 其中红点代表 1 159 个上调基因, 蓝点代表 163 个下调基因, 黑点代表无明显变化的基因 (图 1)。将经过标准化后的 GSE151648 的基因表达谱用于 WGCNA 分析。结果发现当  $\beta=4$  时, 平均连通性较好, 共得到 18 个非灰色的基因模块 (图 2)。将基因模块与 HIRI 之间的相关性进行分析, 发现蓝色、绿色和深灰色 3 个模块在临床上有意义的模块中具有高连接性, 并且蓝色、绿色和深灰色模块与 HIRI 之间的相关性分别被计算为  $r=0.92$ 、0.91 和 0.71 (图 3), 共获取 237 个基因。

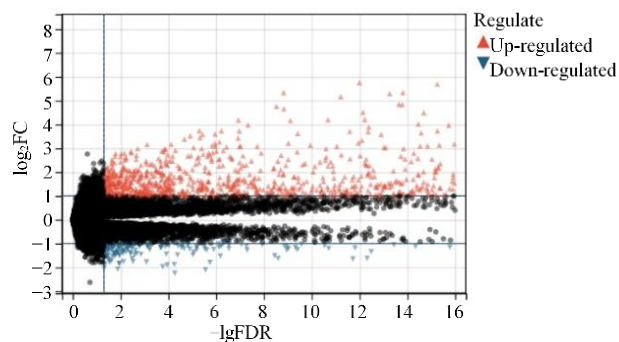


图 1 火山图

Fig. 1 Volcano map

### 2.2 基因 PPI 以及 GO 和 KEGG 信号通路富集分析

一共分析了姜黄素的潜在靶点 712 个、HIRI 的疾病靶点 1 322 个。通过 WGCNA 分析确定了 25 个

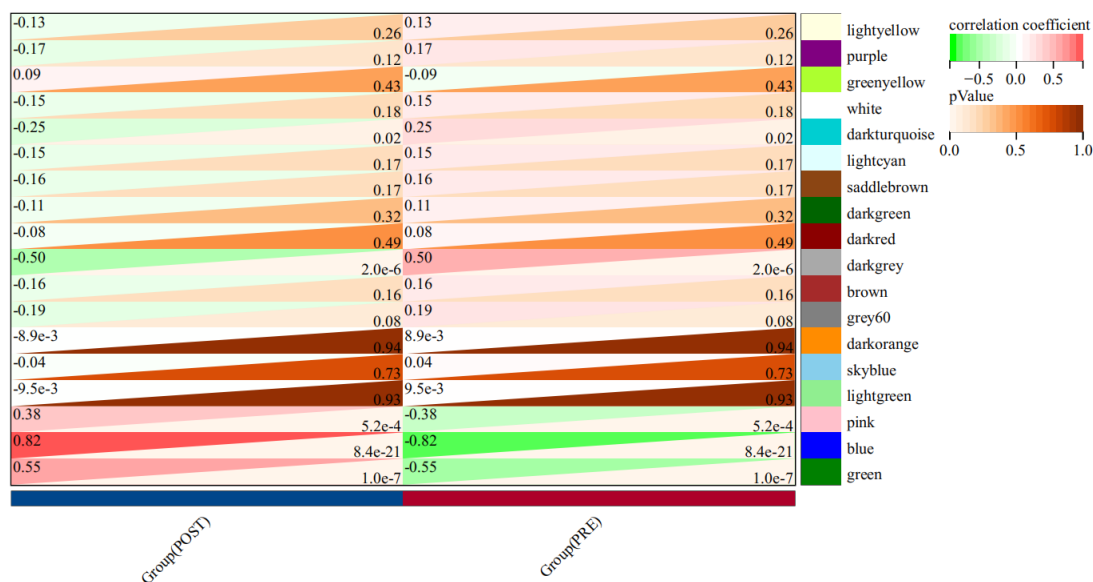


图 2 WGCNA 模块与 HIRI 组的相关性热图

Fig. 2 Correlation heat map between WGCNA module and HIRI group

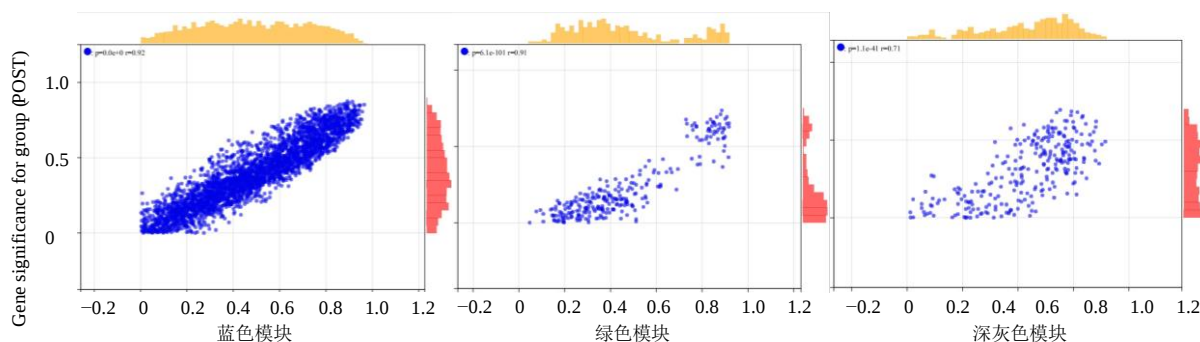


图 3 蓝色模块、绿色模块和黑色模块之间的强相关性

Fig. 3 Strong correlation among blue module, green module and black module

交叉靶点 (图 4)。随后, 使用 STRING 数据库和 Genemania 数据库构建了 25 个交叉目标的 PPI 和基因相互作用网络 (图 5-A)。进而对其进行 GO 和 KEGG 富集分析, 揭示 955 个生物过程 (BP)、9 个细胞成分 (CC) 和 9 个分子功能 (MF) (图 5-B、C)。KEGG 富集分析显示 25 个交叉靶点涉及 41 条信号通路 (图 5-D)。最终生成了药物-疾病-靶点途径图 (图 5-E)。

### 2.3 机器学习预测重要靶点

采用五倍交叉验证构建 RF、SVM、Lasso、DT、NNET、XGBoost、KNN、GLM 和 GBM 共 9 个机器学习模型。通过 ROC 曲线展示 9 种机器学习的诊断效能。结果发现 RF 模型, GBM 模型和 XGBoost 模型的 ROC 曲线下与坐标轴围成的面积值 (AUC) 均为 0.986, 具有最佳的诊断效能 (图 6)。

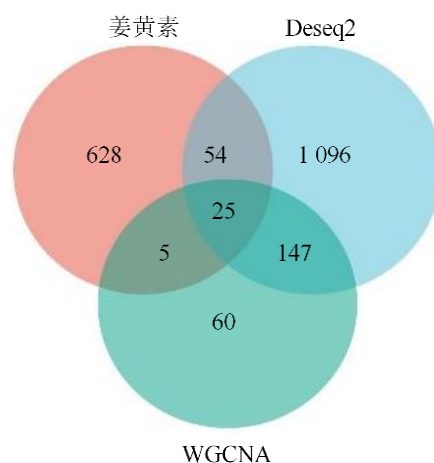
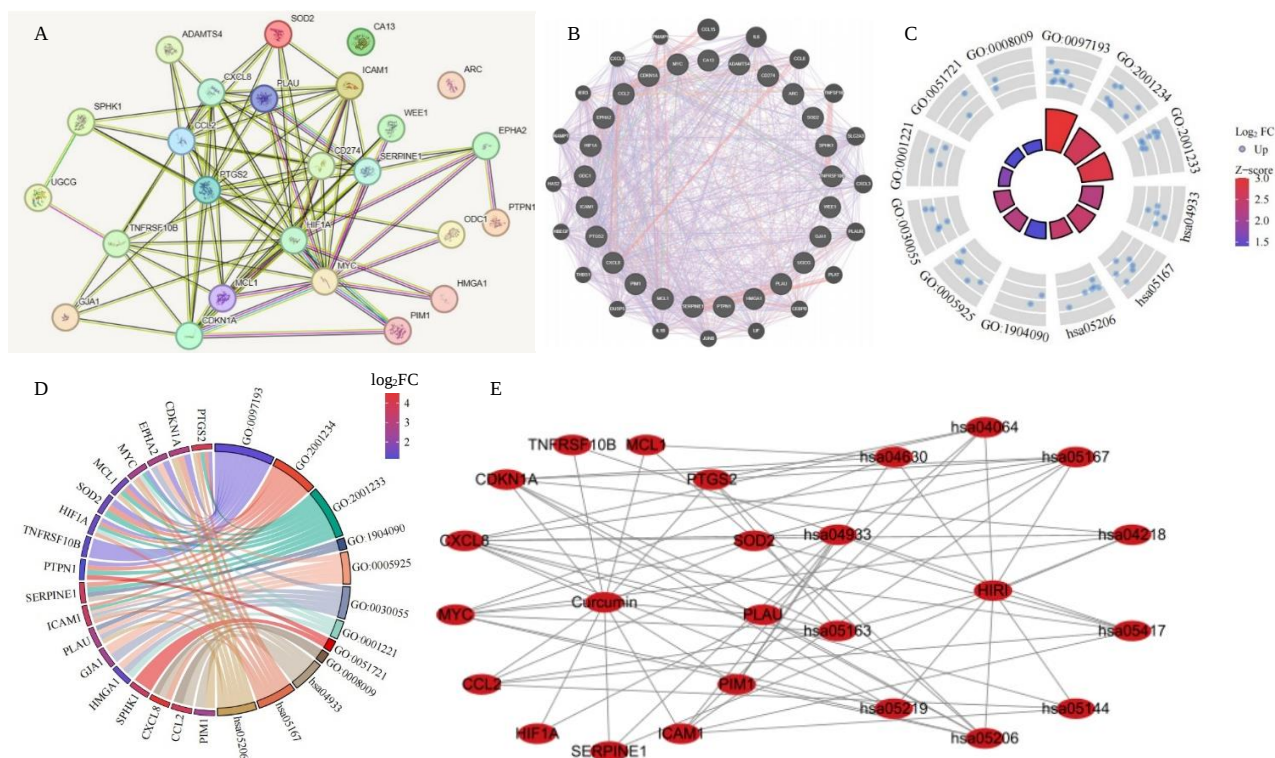


图 4 姜黄素、WGCNA 和 HIRI 靶点交集 Venn 图

Fig. 4 Venn diagram of curcumin, WGCNA and HIRI intersection target



A-PPI 网络图; B-基因互作网络图; C-GO 富集分析; D-KEGG 富集分析; E-药物-疾病-靶点途径图。

A-PPI network diagram; B-Gene interaction network diagram; C-GO enrichment analysis; D-KEGG enrichment analysis. E-Drug-disease-target pathway diagram.

图 5 GO 和 KEGG 分析靶点图

Fig. 5 Analysis target map of GO and KEGG

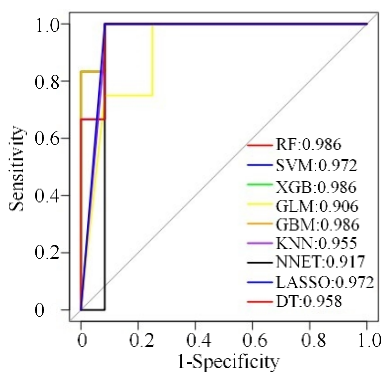


图 6 9 种机器学习的 ROC 曲线分析图

Fig. 6 ROC curve analysis diagram of nine machine learning

## 2.4 核心靶点的筛选与 nomogram 图的验证

通过 GBM、XGBoost 和 RF 模型预测出 top 10 关键基因, 利用 Venn 图取交集确定 5 个关键基因 *ADAMTS4*、*CCL2*、*CDKN1A*、*CXCL8*、*EPHA2* (图 7-A)。通过 ROC 曲线验证 5 个核心靶点的诊断效能, 其中 AUC 值分别为 0.951、0.975、0.972、0.982、0.941 (图 7-B)。随后构建了 5 个核心靶点的

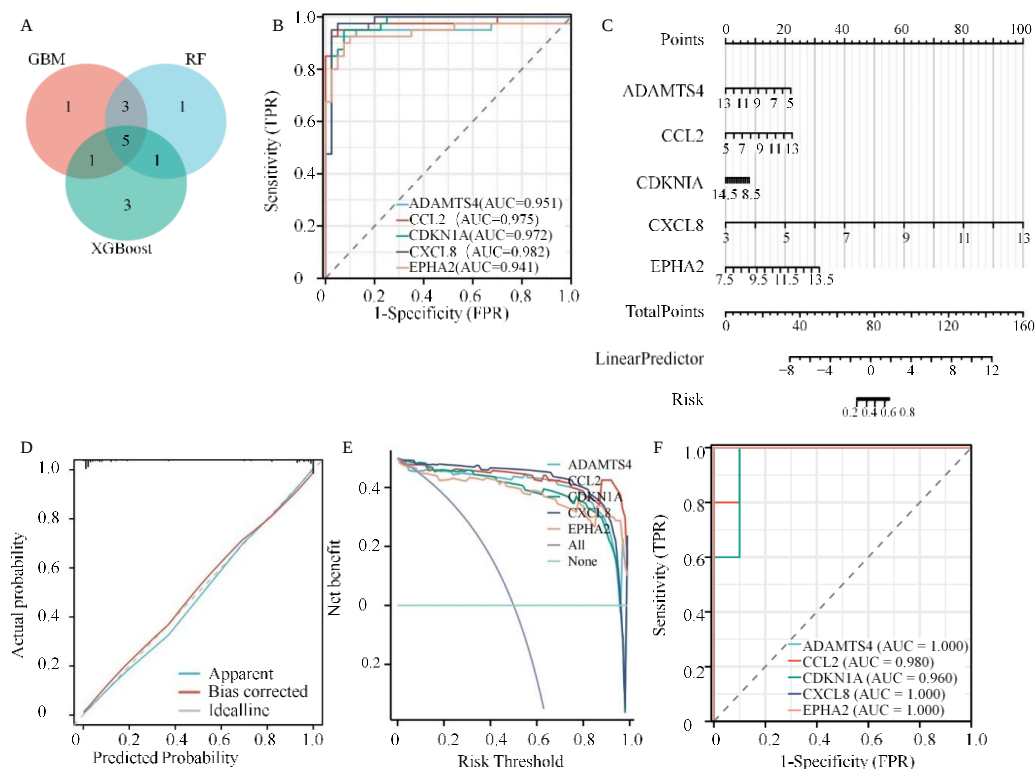
nomogram 图 (图 7-C), calibration 曲线 (图 7-D) 和 DCA 曲线 (图 7-E) 说明其具有良好的预测能力。基于外部数据集 GSE87487 的 ROC 曲线证实了相同 5 个核心靶标的诊断性能 (图 7-F), 产生的 AUC 值分别为 1.0、0.980、0.960、1.0 和 1.0。

## 2.5 分子对接验证

分子对接结果显示如果配体与靶蛋白的结合能  $< 0$ , 则配体和受体蛋白可以自发结合, 如果结合能  $< -20.95 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 表明活性成分与靶蛋白可以稳定结合。发现姜黄素与 *ADAMTS4*、*CCL2*、*CDKN1A*、*CXCL8* 和 *EPHA2* 的结合能分别为  $-33.52$ 、 $-23.46$ 、 $-23.88$ 、 $-24.72$ 、 $-38.13 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 并且姜黄素与每种蛋白质中的特定氨基酸残基都可以相互作用 (图 8)。不难得姜黄素与核心基因之间均具有较强的亲和活性, 可以实现稳定。

## 2.6 血清肝功能指标

通过检测血清中 ALT、AST 水平, 发现与假手术组比较, 模型组的血清中 ALT 和 AST 的水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 说明肝损伤加重, 与模



A-GBM、XGBoost 和 RF 交集 Venn 图；B-5 个核心基因的 ROC 曲线；C-nomogram 图；D-calibration 曲线图；E-DCA 曲线图；F-GSE87487 数据集验证核心基因的 ROC 曲线。

A-Venn diagram of intersection of GBM, XGBoost and RF; B-ROC curves of five core genes; C-nomogram diagram; D-Calibration curve; E-DCA curve; F-GSE87487 dataset verifies ROC curve of core genes.

图 7 核心靶点的诊断效能验证

Fig. 7 Verification of diagnostic efficiency of core target

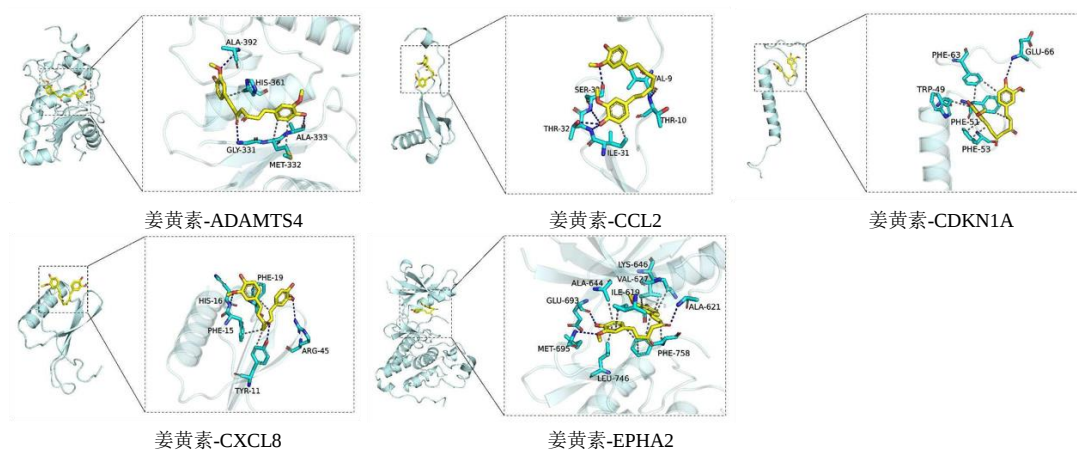


图 8 核心靶基因分子对接图

Fig. 8 Molecular docking map of core target gene

型组比较，姜黄素治疗后的 ALT 和 AST 水平在显著下降（图 9）。

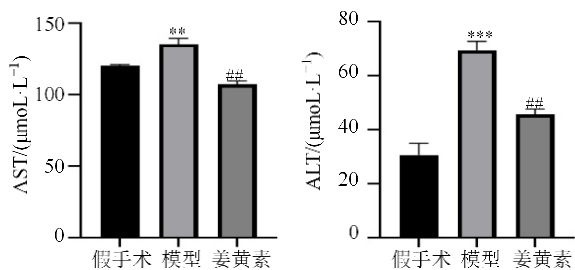
## 2.7 HE 染色和组织学分析

HE 染色显示假手术组肝组织基本正常，而模型组出现细胞水肿、大面积坏死和炎症细胞浸润，

通过姜黄素治疗后的病理变化明显减轻（图 10）。

## 2.8 CDKN1A、ADAMTS4、EPHA2、CCL2 和 CXCL8 的 mRNA 表达

以  $\beta$ -actin 作为内部参照并评估 CDKN1A、ADAMTS4、EPHA2、CCL2 和 CXCL8 的 mRNA 水

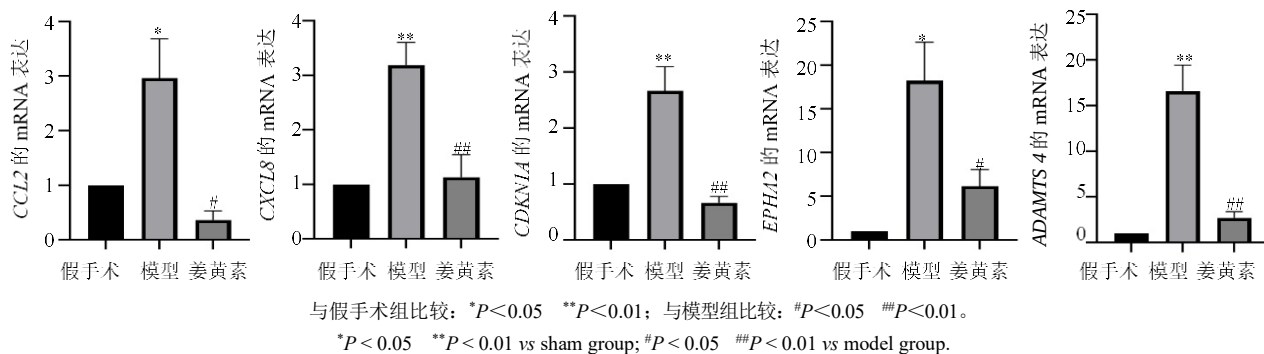


与假手术组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较:  $##P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs sham group;  $##P < 0.01$  vs model group.

图 9 姜黄素对血清 ALT 与 AST 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 9 Effect of curcumin on serum ALT and AST levels ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



与假手术组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $##P < 0.05$   $###P < 0.01$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs sham group;  $##P < 0.05$   $###P < 0.01$  vs model group.

图 11 姜黄素对核心基因的表达式的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 11 Effect of curcumin on the expression of core genes ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

一过程涉及复杂的途径,当缺血时,肝细胞会因缺氧导致 ATP 合成显著减少,影响细胞的离子泵和运输机制而发生代谢紊乱,同时释放多种炎症因子,引起免疫细胞浸润,加剧肝脏的损伤。而再灌注初期,肝脏血流突然的增加,肝窦的直径缩小,血流分布不均,肝小叶内的流体动力学发生变化。氧气和线粒体恢复会伴随过量的活性氧 (ROS) 生成,这些 ROS 会损伤细胞膜、蛋白质和 DNA,导致细胞凋亡的增加,并且这种不可逆的细胞损伤也会导致肝脏组织的结构破坏。因此及时干预可以积极影响患者预后。临床上应用抗氧化剂 (如维生素 E、硫辛酸) 和抗炎药物 (如非甾体抗炎药) 以及一些新型的小分子药物,如 AMPK 激动剂,来减轻氧化应激和炎症反应。然而单一药物的使用可能不足以应对复杂的 HIRI,且药理预处理的临床评估仍然有限,其有效性仍然存在争议。因此有必要探索新的有效策略以及综合多种治疗手段来预防和控制这种情况。

最近传统中药因其安全、效果多样和不良反应

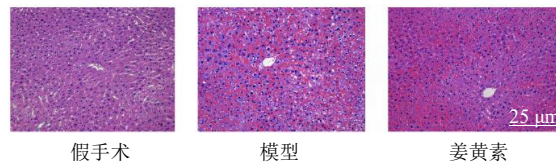


图 10 姜黄素对组织形态的影响 ( $\times 200$ )

Fig. 10 Effect of curcumin on tissue morphology ( $\times 200$ )

平。结果显示,与假手术组相比,模型组的基因表达显著增加 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。与模型组比较,通过姜黄素治疗后 mRNA 表达量有所降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),见图 11。

### 3 讨论

HIRI 是影响肝脏手术患者预后的重要因素。这

小被学者挖掘。姜黄素是一种从姜黄中提取的抗氧化剂,其主链结构是不饱和脂族及芳香族基团,属二酮类化合物。由于其在经济可行性和产量特性方面具有优势,通常被用作天然食品着色剂。深入研究姜黄素的药理特性,发现其在抗炎、抗肿瘤和肝脏保护特性等方面具有潜力<sup>[46-49]</sup>。例如姜黄素可以改善脂肪代谢,降低肝脏脂肪沉积,对非酒精性脂肪肝及相关疾病的管理具有积极影响<sup>[50]</sup>。但是姜黄素在 HIRI 治疗中潜在作用机制仍未发掘完全,因而本研究利用网络药理学和分子对接的方法,探讨姜黄素对 HIRI 的影响和作用途径。

本研究对姜黄素、HIRI 预测的靶点与 WGCNA 取交集。通过 MCC 算法,鉴定了 25 个共享靶标,进而通过机器学习,5 个关键基因 (CDKN1A、ADAMTS4、EPHA2、CCL2 和 CXCL8) 被精确定位,用于进一步的单个基因 GSEA 分析和分子对接。周期素依赖性激酶抑制因子 1A (CDKN1A) 是细胞周期中保持遗传完整性的关键调节因子,它阻碍细胞周期蛋白-cdk2 和 CDK4 的复合功能。在 G1 阶段,

这种蛋白质有效地管理细胞周期的进展<sup>[51]</sup>。通过特定刺激触发 CDKN1A 激活 P53 信号通路,导致细胞周期停滞、程序性细胞死亡和潜在的肿瘤形成<sup>[52]</sup>。通过此靶点预测姜黄素可以通过参与细胞周期调控,下调 CDKN1A 来改善 HIRI。血小板反应蛋白解整合素金属肽酶 4 (ADAMTS4) 参与各种细胞活动,包括胶原成熟、基质分解、器官生成和凝血<sup>[52]</sup>。虽然 ADAMTS4 的表达不影响 CRC 细胞的增殖和侵袭,但它显著影响体内肿瘤生长,强调其对细胞外基质 (ECM) 的依赖<sup>[53]</sup>。肝素受体 2A (EPHA2) 是蛋白酪氨酸激酶家族中肝素受体亚群的成员,它与癌细胞中的细胞表面分子相互作用,激活 MAPK、JNK 和 NOD 等信号通路,从而促进肿瘤进展<sup>[54]</sup>。不难发现,这些基因都与细胞凋亡与肿瘤发生发展相关,实验结果分析也表明,姜黄素治疗组的基因表达量对比 HIRI 组有所增加。此外,GO、KEGG 分析显示了与转录核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和凋亡相关的基因的富集,表明姜黄素在炎症反应、癌症受体活化和转录调节中的潜在作用。而这都与实验结果符合,进一步表明姜黄素可以通过调节凋亡与肿瘤途径来减轻 HIRI。

C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) 是一种微小的细胞因子,属于 CC 趋化因子类别。它能够通过激活  $\beta$ 1 整合素和 p38-MAPK 信号通路来控制细胞粘附和趋化。相反,俗称白细胞介素-8 (CXCL8),是一种炎症细胞因子,通过受体结合的趋化性发挥其影响。CXCL8 和 CXCR1/CXCR2 之间的相互作用刺激各种信号通路,如 PI3K/AKT、MAPK、JAK 和 STAT,从而调节各种生物功能的下游基因表达<sup>[55]</sup>。值得注意的是,研究 GSEA 对 CXCL8 的分析强调了 JNK 信号通路的作用。研究表明,TNF 可以通过 NF- $\kappa$ B 转录因子触发 JNK 信号激活,影响下游转录因子,如 c-Jun、Elk1 和 ETS2,这些转录因子影响生长、分化和炎症等过程<sup>[56]</sup>。实验结果表明对比假手术组 HIRI 组 CCL2 和 CXCL8 基因表达量明显降低,而姜黄素处理后有所缓解。Ye 等<sup>[57]</sup>证明了姜黄素类似物 C66 可以通过抑制 JNK 磷酸化来减轻心肌细胞的炎症和凋亡,从而保护心脏免受肥胖诱导的心肌损伤。KEGG 富集的结果强调了姜黄素对 NF- $\kappa$ B 基因的影响,暗示了其调节 NF- $\kappa$ B 介导的途径的潜力。这意味着姜黄素可能对 NF- $\kappa$ B 基因表达有调节作用,影响癌症中受体激活和转录不规则性。对于小鼠进行 HE 染色与组织

学分析,不难发现假手术组肝组织正常,HIRI 组有明显的损伤出现坏死和炎症细胞浸润,而姜黄素处理后病理改变得明显缓解。

综上,本研究通过网络药理学和进行分子对接结果,提出姜黄素可阻断 NF- $\kappa$ B 通路的激活,并通过下调 CCL2、CXCL8 促炎细胞因子和 CDKN1A 等细胞周期蛋白水平来改善炎症反应与细胞凋亡,进而改善 HIRI。在这一基础上,以期本研究可以为更全面地了解姜黄素在治疗和预防 HIRI 中的功效提供证据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Lin J, Huang H F, Yang S K, et al. The effect of Ginsenoside Rg1 in hepatic ischemia reperfusion (I/R) injury ameliorates ischemia-reperfusion-induced liver injury by inhibiting apoptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110398.
- [2] Oliveira S, Monteiro-Alfredo T, Silva S, et al. Curcumin derivatives for type 2 diabetes management and prevention of complications [J]. Arch Pharm Res, 2020, 43(6): 567-581.
- [3] Verma R, Rao L, Nagpal D, et al. Exploring the Prospective of Curcumin-loaded Nanomedicine in Brain Cancer Therapy: An Overview of Recent Updates and Patented Nanoformulations [J]. Recent Pat Nanotechnol, 2024, 18(3): 278-294.
- [4] Liu K, Chen H, You Q S, et al. Curcumin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Oncotarget, 2017, 8(67): 112051-112059.
- [5] Thiagarajan M, Sharma S S. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats [J]. Life Sci, 2004, 74(8): 969-985.
- [6] Bayrak O, Uz E, Bayrak R, et al. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys [J]. World J Urol, 2008, 26(3): 285-291.
- [7] Kar F, Hacıoglu C, Senturk H, et al. Curcumin and LOXblock-1 ameliorate ischemia-reperfusion induced inflammation and acute kidney injury by suppressing the semaphorin-plexin pathway [J]. Life Sci, 2020, 256: 118016.
- [8] Liu W, Guo W, Zhu Y, et al. Targeting peroxiredoxin 1 by a curcumin analogue, AI-44, inhibits NLRP3 inflammasome activation and attenuates lipopolysaccharide-induced sepsis in mice [J]. J Immunol, 2018, 201(8): 2403-2413.
- [9] Monfoulet L E, Mercier S, Bayle D, et al. Curcumin modulates endothelial permeability and monocyte

- transendothelial migration by affecting endothelial cell dynamics [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 112: 109-120.
- [10] Wang Z, Liu J, Yu Y, et al. Modular pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2012, 7(8):667.
- [11] Yuan Z, Pan Y, Leng T, et al. Progress and prospects of research ideas and methods in the network pharmacology of traditional Chinese medicine [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2022, 25: 218-226.
- [12] Ma X, Pan B, Wang L, et al. Network pharmacology and molecular docking elucidate potential mechanisms of *Eucommia ulmoides* in hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 20716.
- [13] 崔晓燕, 郑晓明, 郭树垚, 等. 基于网络药理学、分子对接与实验验证探究钩藤治疗热性惊厥的作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(15): 5154-5165.  
Cui X Y, Zheng X M, Guo S Y, et al. Mechanism of *Uncaria rhynchophylla* in treatment of febrile seizures based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification [J]. *Chin Tradit Drug Herb*, 2024, 55(15): 5154-5165.
- [14] Yin X, Wang X, Li Y, et al. CODD-Pred: A web server for efficient target identification and bioactivity prediction of small molecules [J]. *J Chem Inf Model*, 2023, 63(20): 6169-6176.
- [15] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [16] Lv Q, Chen G, He H, et al. TCMBank-the largest TCM database provides deep learning-based Chinese-western medicine exclusion prediction [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 127.
- [17] Chen Y, Jia Y, Li Y, et al. Investigation on the antitumor effects of paeonol against renal cell carcinoma based on network pharmacology and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 285: 114857.
- [18] Szklarczyk D, Santos A, von Mering C, et al. STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D380-D384.
- [19] Keiser M J, Roth B L, Armbruster B N, et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(2): 197-206.
- [20] Liu T, Lin Y, Wen X, et al. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Database issue): D198-D201.
- [21] Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, et al. UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to use the Entry View [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1374:23-54.
- [22] Barrett T, Wilhite S E, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 39(Database issue): 1005-1010.
- [23] Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W191-W198.
- [24] Boris M, Teleńczuk Maria, Vincent C, et al. PyDESeq2: A python package for bulk RNA-seq differential expression analysis [J]. *Bioinformatics*, 2023(9): 9.
- [25] Durbin B P, Hardin J S, Hawkins D M, et al. A variance-stabilizing transformation for gene-expression microarray data [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18 Suppl 1(Suppl. 1): S105-S110.
- [26] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 559.
- [27] Shen W, Song Z, Zhong X, et al. Sangerbox: A comprehensive, interaction-friendly clinical bioinformatics analysis platform [J]. *Imeta*, 2022, 1(3): e36.
- [28] Max F, Harold R, Christian L, et al. GeneMANIA update 2018 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018(W1): W60-W64.
- [29] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [30] Yu G, Li F, Qin Y, et al. GOSemSim: An R package for measuring semantic similarity among GO terms and gene products [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(7): 976-978.
- [31] Kanehisa M, Goto S. KEGG kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [32] Yu G, Wang L, Han Y, et al. cluster Profiler: An R Package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *Omics-a J Integr Bio*, 2012, 16(5): 284-287.
- [33] 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.
- [34] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [35] Kuhn M. Building Predictive Models in R Using the caret Package [J]. *J Stat Software*, 2008, 28(5): 1-26.

- [36] Biecek P. DALEX: explainers for complex predictive models [J]. *J Mach Learn Res*, 2018, 19: 1-5.
- [37] Sewpaul R, Awe O O, Dogbey D M, et al. Classification of obesity among south african female adolescents: comparative analysis of logistic regression and random forest algorithms [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2024, 21(1): 15.
- [38] Karatzoglou A, Smola A, Hornik K, et al. kernlab-An S4 Package for Kernel Methods in R [J]. *J Statistical Software*, 2004, 11(9): 1-20.
- [39] Khan I U, Aslam N, AlShedayed R, et al. A proactive attack detection for heating, ventilation, and air conditioning (HVAC) system using explainable extreme gradient boosting model (XGBoost) [J]. *Sensors (Basel)*, 2022, 22(23): 9235.
- [40] Cole K, Paek I. SAS PROC IRT and the R mirt Package: A comparison of model parameter estimation for multidimensional IRT models [J]. *Psych*, 2023, 5(2): 416-426.
- [41] Subramanian A, Tamayo P, Mootha V K, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [42] Sussman J L, Lin D, Jiang J, et al. Protein Data Bank (PDB): Database of three-dimensional structural information of biological macromolecules [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1998, 54(Pt 6 Pt 1): 1078-1084.
- [43] Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1102-D1109.
- [44] Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack A F, et al. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings [J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(8): 3891-3898.
- [45] Ravindranath P A, Forli S, Goodsell D S, et al. AutoDockFR: Advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility [J]. *PLoS Comput Biol*, 2015, 11(12): e1004586.
- [46] Wu R, Wang L, Yin R, et al. Epigenetics/epigenomics and prevention by curcumin of early stages of inflammatory-driven colon cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(2): 227-236.
- [47] Tan B L, Norhaizan M E. Curcumin combination chemotherapy: The implication and efficacy in cancer [J]. *Molecules*, 2019, 24(14): 2527.
- [48] 钟敏, 范妮, 陈雅彤, 等. 姜黄素调控非编码 RNA 抗肿瘤的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(2): 467-473.  
Zhong M, Fan N, Chen Y T, et al. Advances on curcumin regulating non-coding RNA against tumor [J]. *Drugs Clin*, 2023, 38(2): 467-473.
- [49] Kriplani P, Guarve K, Baghel U S, et al. Formulation optimization and characterization of transdermal film of curcumin by response surface methodology [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(2), 274-285.
- [50] Molani-Gol R, Dehghani A, Rafrat M. Effects of curcumin/turmeric supplementation on the liver enzymes, lipid profiles, glycemic index, and anthropometric indices in non-alcoholic fatty liver patients: An umbrella Meta-analysis [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(2): 539-555.
- [51] Judson R L, Greve T S, Parchem R J, et al. MicroRNA-based discovery of barriers to dedifferentiation of fibroblasts to pluripotent stem cells [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(10): 1227-1235.
- [52] Wang X Z, Tang W Z, Su Q Y, et al. Single - nucleotide polymorphisms in the coding region of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 and hepatocellular carcinoma: A retrospective case-control study [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(18): 7869-7880.
- [53] Chen J, Luo Y, Zhou Y, et al. Promotion of tumor growth by ADAMTS4 in colorectal cancer: Focused on macrophages [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1693-1703.
- [54] Peng Q, Chen L, Wu W, et al. EPH receptor A2 governs a feedback loop that activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in gastric cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1146.
- [55] Wang H, Li X, Xia B, et al. Amelioration of chronic prostatitis by fractions of Mongolian medicine *Hosta plantaginea* flowers via inhibition of NF- $\kappa$ B, MAPKs, JAK-STAT, and PI3K-Akt signaling pathways in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 307: 116245.
- [56] Yeh T, Chu W, Huang Y. GM1 ganglioside protects against LPS-induced neuroinflammatory and oxidative responses by inhibiting the activation of Akt, TAK1 and NADPH oxidase in MG6 microglial cells [J]. *Glycobiology*, 2024, 34(1): cwad087.
- [57] Ye L, Chen X, Wang M, et al. Curcumin analogue C66 attenuates obesity-induced myocardial injury by inhibiting JNK-mediated inflammation [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 143: 112121.

[责任编辑 齐静雯]