

基于网络药理学大黄治疗酒精性肝炎作用机制探讨及实验验证

朱学进¹, 王英豪¹, 刘敏^{2*}, 王伽伯^{1,2*}

1. 福建中医药大学 药学院, 福建 福州 350122

2. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069

摘要: **目的** 采用网络药理学、分子对接及实验验证的方法, 探讨大黄治疗酒精性肝炎的作用机制, 为临床应用提供依据。**方法** 运用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 及查阅国内外相关文献收集大黄活性成分, 通过 GeneCards、OMIM、TTD 数据库收集酒精性肝炎靶点, 将成分-疾病靶点取交集基因, 运用 Cytoscape 软件构建大黄-活性成分-酒精性肝炎-靶基因网络图, 在 STRING 平台制作蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 通过 Metascape 平台对交集靶点进行富集分析, 获得靶点功能及通路。运用 Vina 等软件对大黄的关键活性成分与关键靶点进行分子对接。建立酒精性肝炎小鼠模型, 设置对照组、模型组、氢化可的松 ($20.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和芦荟大黄素低、中、高剂量 (20 、 40 、 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 观察对各组小鼠肝脏指数影响; 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) 水平; 苏木精-伊红 (HE) 染色和油红 O 染色观察小鼠肝组织病理学以及脂质积累情况; Western blotting 检测小鼠肝组织中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)、白细胞介素-18 (IL-18)、IL-1 β 、剪切型半胱天冬酶-3 (cleaved Caspase-3)、半胱天冬酶-3 (Caspase-3) 和半胱天冬酶-1 (Caspase-1) 的蛋白表达。**结果** 大黄 16 个活性成分对应 50 个靶点, 酒精性肝炎对应 6 888 个靶点, 二者取交集获得 45 个靶点。其中 IL-1 β 、CASP3、GSDMD、骨髓细胞瘤癌基因 (MYC)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 以及蛋白激酶 C α (PRKCA) 与核心成分芦荟大黄素分子对接结果良好。基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析发现, 细胞凋亡途径可能是大黄治疗酒精性肝炎的重要途径。体内实验结果显示, 芦荟大黄素能够缓解小鼠酒精性肝炎, 并显著降低肝脏指数 ($P < 0.001$) 和 AST、ALT 水平 ($P < 0.05$)。HE 染色与油红 O 显示, 与模型组相比, 芦荟大黄素低、中、高剂量组恢复了肝组织结构损伤, 降低了炎症细胞浸润, 恢复了肝索排列紊乱状态以及减少了脂滴堆积和脂肪变性。Western blotting 结果显示, 与模型组相比, 氢化可的松组以及芦荟大黄素低、中、高剂量组 NLRP3、IL-18、IL-1 β 、GSDMD、cleaved Caspase-3、Caspase-3 和 Caspase-1 蛋白表达水平均有降低, 其中芦荟大黄素中剂量组 IL-1 β 、GSDMD、Caspase-3 和 Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 大黄治疗酒精性肝炎可通过多成分、多靶点、多通路途径来发挥作用, 其中芦荟大黄素可减轻小鼠酒精性肝炎, 其机制可能与抑制 Caspase-1、Caspase-3 介导的经典细胞焦亡和凋亡通路有关。

关键词: 大黄; 酒精性肝炎; 网络药理学; 芦荟大黄素; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)07-1817-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.012

Mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma* in treating alcoholic hepatitis based on network pharmacology and experimental verification

ZHU Xuejin¹, WANG Yinghao¹, LIU Min², WANG Jiabo^{1,2}

1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma* in the treatment of alcoholic hepatitis by means of network pharmacology, molecular docking and experimental verification, and to provide evidence for the clinical application of *Rhei Radix et Rhizoma* in the treatment of alcoholic hepatitis. **Methods** The active components of *Rhei Radix et Rhizoma* were collected using

收稿日期: 2024-12-03

基金项目: 国家自然科学基金联合基金重点支持项目 (U21A200211); 国家资助博士后研究人员计划资助 (GZC20231759)

作者简介: 朱学进, 硕士研究生。E-mail: xjzhu9904@163.com

*通信作者: 刘敏, 博士, 主要从事肿瘤与肝脏药理研究。E-mail: liumin624@ccmu.edu.cn

王伽伯, 博士, 教授, 主要从事肝脏药理与毒理研究。E-mail: jiabo_wang@ccmu.edu.cn

TCMSP and relevant literature at home and abroad. The targets of alcoholic hepatitis were collected by GeneCards, OMIM and TTD databases, and the intersection genes of constituents and disease targets were selected. The *Rhei Radix et Rhizoma*-active ingredient-alcoholic hepatitis-target gene network map was constructed by Cytoscape software. The protein interaction network was made on the STRING platform. The intersection targets were enriched and analyzed by Metascape platform to obtain the target functions and pathways. The key active components of *Rhei Radix et Rhizoma* were docked with key targets by Vina and other software. A mouse model of alcoholic hepatitis was established, and control group, model group, cortisone ($20.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group and aloe emodin low-dose, medium-dose and high-dose ($20, 40, 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups were set up to observe the effects on liver index of mice in each group. Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were determined by kit method. Liver histopathology and lipid accumulation were observed by HE staining and oil red O staining. Western blotting analysis of NLRP3, IL-18, IL-1 β , cleaved Caspase-3, Caspase-3, and Caspase-1 protein expression in mouse liver tissues. **Results** A total of 16 active components of *Rhei Radix et Rhizoma* correspond to 50 targets, alcohol hepatitis correspond to 6 888 targets, and 45 targets were obtained by intersection of the two. IL-1 β , CASP3, MYC, PTGS2 and PRKCA had good docking results with aloe emodin. GO and KEGG results showed that apoptosis pathway may be an important pathway for *Rhei Radix et Rhizoma* treatment of alcoholic hepatitis. The results of *in vivo* experiment showed that aloe emodin could alleviate alcoholic hepatitis in mice, and significantly reduce liver index ($P < 0.001$) and AST and ALT levels ($P < 0.05$). HE staining and oil red O showed that, compared with the model group, aloe emodin groups restored the damage of dry tissue structure, reduced inflammatory cell infiltration, restored the disorder of hepatic cord arrangement, and reduced lipid droplet accumulation and steatosis. Western blotting results showed that compared with the model group, protein expression levels of NLRP3, IL-18, IL-1 β , GSDMD, cleaved Caspase-3, Caspase-3, and Caspase-1 were decreased in cortisone group and aloe albumin dose groups. The expression levels of IL-1 β , GSDMD, Caspase-3 and Caspase-1 protein in aloe emodin medium dose group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Rhei Radix et Rhizoma* can treat alcoholic hepatitis through multi-component, multi-target and multi-pathway pathways, among which aloe emodin can alleviate alcoholic hepatitis in mice, and its mechanism may be related to the inhibition of classic cell pyrodeath and apoptosis pathways mediated by Caspase-1 and Caspase-3.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma*; alcoholic hepatitis; network pharmacology; aloe emodin; apoptosis

酒精性肝炎作为一类因持续性过量饮酒引发的肝脏病理性改变,在我国慢性肝病谱中占据重要地位。长期酒精暴露可诱导复杂的病理生理过程,导致肝细胞发生脂肪变性、炎症浸润及纤维化,严重酗酒状态下,更可引发大面积肝细胞坏死,进而进展为肝功能失代偿与肝衰竭,对患者生命健康构成重大威胁^[1]。酒精性肝炎患者的临床症状具有多样性,主要表现为消化系统功能紊乱,如食欲减退、恶心呕吐等症状;部分患者可见腹水积聚、黄疸体征,伴随肝脏体积增大及触压痛等肝脏形态学与触诊异常改变。病情进展过程中,存在较高的肝衰竭、上消化道出血等严重并发症发生风险。长期病程演变可促使肝脏组织发生病理性重构,逐步进展为肝纤维化、肝硬化,甚至诱导肝细胞癌的发生发展,严重影响患者预后及生存质量^[2]。现有的酒精性肝炎治疗方案主要围绕戒酒、提供营养支持以及使用一些具有保肝抗炎作用的药物展开。然而,这些常规治疗方法在实际应用中往往面临诸多困境,其治疗效果难以达到预期,对于已经形成的肝脏损伤的修复作用较为有限,无法从根本上有效地遏制疾病的恶化进程。临床大多采用激素治疗,但不良反应

尤为明显^[3]。因此,进一步研究和寻找有效的药物进行治疗,延缓甚至阻断酒精性肝炎的发展与预后,具有十分重要的意义。

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf.或药用大黄 *R. officinale* Baill.的干燥根和根茎。大黄药性峻猛,被称为“将军”,取其“善攻善战”“定祸乱而致太平”之意,是传统的内科急症要药之一,其兼具气分与血分的双重作用靶点,既可通过泻火解毒之效清解弥漫性邪热,消除无形之热邪;又能发挥通腑泻下之功,祛除体内有形积滞。此外,其还具备利湿退黄、清心凉营、凉血止血及消痈化瘀等多重药理活性。通过多途径、多靶点的综合作用机制,调节机体的气血津液代谢,纠正病理状态,在多种临床病症的治疗中展现出独特优势^[4]。其中蒽醌类化合物、多糖、鞣质等成分尤为引人注目。现代科学研究已经证实,大黄具有多方面的药理作用,包括强大的泻下功能,能够促进肠道蠕动,加速酒精及其代谢产物的排泄^[5-6];出色的抗氧化能力,可有效清除自由基,保护肝细胞免受氧化损伤;显著的抗炎特性,能抑制炎症因子的释放,缓解肝脏炎症;

以及对肠道菌群的调节作用,有助于维持肠道微生态平衡,进而改善肝脏的整体环境^[7-9]。芦荟大黄素是大黄蒽醌类主要活性成分之一,以其抗氧化、抗炎和调节细胞信号通路的卓越特性而备受瞩目。其抗氧化能力可中和酒精诱导的自由基过量生成,保护肝脏细胞免受氧化损伤^[10];抗炎作用能精准调控炎症相关的信号传导,显著降低炎症因子水平^[11];在细胞层面,芦荟大黄素还可干预与肝纤维化密切相关的细胞活化与增殖过程,展现出全方位的肝脏保护潜力^[12]。这些生物学效应预示着芦荟大黄素有望成为治疗酒精性肝病的新突破点,值得深入探究其作用机制,发掘其临床应用价值。

本研究采用网络药理学结合实验的方法,探讨大黄治疗酒精性肝炎的潜在靶点和分子机制,为大黄的深入研究提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

36 只雄性 C57BL/6J 小鼠,SPF 级,体质量 20~25 g,8~10 周龄,购自维通利华(北京)生物技术有限公司。实验动物生产许可证号 SYXK(京)2022-0049,所有小鼠均饲养于温度 22~25 ℃、相对湿度 40%~70%的环境中,自由进食饮水,适应性饲养 7 d 后进行动物实验。实验获首都医科大学伦理委员会批准(AEEI-2023-102)。

1.2 药物与试剂

芦荟大黄素(质量分数>98%,批号:A17GB1453769)购自于上海源叶生物科技有限公司;氢化可的松(批号:J20IA220015)购自于上海源叶生物科技有限公司;Lieber-DeCarli 酒精液体饲料、对照饲料(批号分别为 293874.00、287891.00)购自博奥派克生生物科技有限公司;二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(批号:240005012)购自北京索莱宝科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(批号分别为 20240429、20240505)购自南京建成生物科技有限公司;增强型化学发光(ECL)发光液(批号:7E0882E4)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;10×Tris-盐酸缓冲盐溶液(TBST)缓冲液(批号:GC2403002)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;Anti-Gasdermin D(GSDMD)抗体 EPR20859、Anti-Caspase-1 抗体、Anti-白细胞介素(IL)-1 β 抗体[RM1009](批号分别为 1059514-8、1047351-5、1000226-30)购自 abcam 公司;Caspase-3 抗体、

cleaved Caspase-3(Asp175)抗体(批号分别为 47、19)购自 Cell Signaling Technology 公司;IL-18 Polyclonal 抗体、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3) Monoclonal 抗体(批号分别为 00132915、10028299)购自 proteintech 公司; β -actin 抗体、HRP 标记的山羊抗兔二抗、HRP 标记的山羊抗鼠二抗(批号分别为 9100026004、9300014001、9300003001)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器

HERAcell vios 160i LK 型二氧化碳培养箱(德国 Thermo 公司);JY300HC 型电泳装置(北京君意东方电泳设备有限公司);FlexStation 3 多功能酶标仪(美谷分子仪器有限公司);Velocity 18R Pro 型高速冷冻离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司);MiniChemi 610 型发光成像分析系统(北京赛智创业科技有限公司)。

2 方法

2.1 大黄治疗酒精性肝炎网络药理学分析及分子对接

2.1.1 大黄活性成分及相关靶点筛选 本研究以中药大黄为研究对象,基于中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3)进行数据挖掘。以“大黄”作为检索关键词,采用口服生物利用度(OB)和类药性(DL)作为筛选参数,设定 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$,系统筛选大黄的潜在活性化学成分及其作用靶蛋白。进一步利用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org>)进行数据校验,将物种限定为“智人(Homo Sapiens)”,并将靶蛋白名称标准化为对应的基因名称,确保后续分析的准确性与一致性。

2.1.2 酒精性肝炎疾病相关靶点筛选 利用 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<http://www.omim.org>),以“酒精性肝炎(alcoholic hepatitis)”作为疾病检索关键词,在相关生物医学数据库中进行系统检索,获取酒精性肝炎疾病相关的靶点集合。经数据清洗与去重处理后,采用韦恩图分析方法,将大黄活性成分靶点与酒精性肝炎疾病靶点进行可视化比对,进而筛选出二者的交集靶点,为后续探讨大黄治疗酒精性肝炎的潜在作用机制提供关键数据基础。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析 将“2.1.2”项中获得的交集靶点信息录入 STRING 蛋白质互作数据库(<https://string-db.org/>),将物种限定为智人(Homo sapiens),构建 PPI 网络。以互作评

分(score) > 0.7 作为筛选标准, 对网络进行优化处理。随后, 运用 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行拓扑结构分析, 通过度值(Degree)、介数中心性(BC)、接近中心性(CC)等关键拓扑参数, 识别并筛选出在网络中发挥核心调控作用的靶点, 为深入解析其生物学功能奠定基础。

2.1.4 大黄-活性成分-酒精性肝炎靶点相互作用网络图绘制 基于 Cytoscape 可视化分析平台 (Version 3.8.2, <http://www.cytoscape.org>), 构建“大黄-活性成分-酒精性肝炎靶点”的多维网络关系图谱。通过整合 BisoGenet 和 CytoNCA 插件, 对网络拓扑参数进行量化分析。以度中心性(DC) > 61、BC > 600 作为筛选阈值, 对网络节点进行重要性排序。经系统筛选后, 将具有显著调控作用的核心目标基因以黄色进行可视化标注, 从而实现关键调控靶点的精准定位, 为揭示大黄干预酒精性肝炎的分子机制提供直观的网络药理学依据。

2.1.5 基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 利用 Metascape 数据平台 (<https://metascape.org/>) 对大黄与酒精性肝炎的交集基因进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析, 明确发挥作用路径。

2.1.6 药效成分-靶点分子对接分析 基于 PPI 网络拓扑分析所得的 Degree 值, 对化合物及核心基因进行重要性排序, 并选取排名前列的候选对象开展分子对接研究。研究首先从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取化合物的二维结构信息, 借助 Chem3D 软件将其转换为三维立体结构, 并保存为 lig.mol2 格式文件。同时, 从 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶蛋白的三维结构文件 (pdb 格式), 利用 pymol 软件对其进行预处理, 移除水分子及原有配体, 保存为 rep.pdb 格式。随后, 通过 AutoDock 软件将 rep.pdb 和 lig.mol2 文件分别转换为 rep.pdbqt 和 lig.pdbqt 格式, 并基于靶蛋白结构特征定义活性口袋区域, 输出为 grid.pdqt 格式文件。最终采用 Vina 分子对接程序, 对 lig.pdbqt、rep.pdbqt 和 grid.pdqt 文件进行处理, 完成化合物与靶蛋白的分子对接分析。根据分子对接理论, 配体与受体结合构象的稳定性与结合能呈负相关, 较低的结合能预示着更强的相互作用可能性。本研究以结合能 $\leq -20.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 作为筛选标准, 筛选出具有较强结合活性的化合物-靶蛋白互作关系, 用于后续机制探讨。

2.2 芦荟大黄素对酒精性肝炎小鼠体质量、肝脏功能及相关蛋白表达的影响

2.2.1 酒精性肝炎小鼠模型制备与给药 36 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、氢化可的松 (阳性药) 组 ($20.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、及芦荟大黄素低、中、高剂量 (20 、 40 、 $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组, 共 6 组, 每组 6 只。氢化可的松和芦荟大黄素溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠。造模具体过程为: 第一天给予所有小鼠对照液体饲料 (225 g 干燥混合对照饮食加入 860 mL 自来水充分混匀), 每 2 只小鼠给 50 mL , 自由摄入, 连续 5 d。第 6 天开始, 模型组每天给予含 5% 乙醇的液体饲料 (由 133 g 干燥乙醇饮食、 20.3 g 麦芽糊精和 910 mL 水配制而成), 每 2 只小鼠给 50 mL , 期间各给药组 ig 给药; 对照组仍给予对照液体饲料, 且 24 h 液体饲料给予量始终与模型组相同, 连续饲养 10 d。第 16 天对照组用每 10 mL 含 4.5 g 糊精的溶液 ig, 模型组用浓度 31.5% 乙醇 ig $5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [13]。

2.2.2 小鼠体质量与肝脏指数测定 各组小鼠每日给予液体饲料喂养前称取其体质量并记录, 用于评估各组小鼠在造模期间体质量的变化。在第 16 天取材时, 处死小鼠并迅速分离完整肝脏, 用预冷的 0.9% 氯化钠溶液冲洗后, 称量肝脏湿质量 ($M_{\text{肝}}$), 同时记录处死前小鼠空腹体质量 ($M_{\text{体}}$)。

$$\text{肝脏指数} = M_{\text{肝}} / M_{\text{体}}$$

2.2.3 血清生化指标检测 各组小鼠采用摘眼球取血, 将所获取的全血样本置于预冷的离心管中, 于 4°C 环境下以 $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 15 min , 收集上层血清。采用相应试剂盒, 按照说明书操作流程, 对小鼠血清中的 AST、ALT 水平进行定量检测, 以评估肝脏功能状态。

2.2.4 肝组织病理学观察 肝右叶相同解剖位点采集组织样本。将所获取的肝组织分为 2 部分: 其一迅速浸没于 4% 多聚甲醛缓冲固定液中, 通过常温固定处理后, 进行石蜡包埋、切片制备及苏木精-伊红 (HE) 染色, 以观察肝脏组织病理形态学变化; 其二采用 OCT 包埋剂进行组织包埋, 借助冷冻切片技术制备肝组织切片, 并用油红 O 染色, 用于检测肝细胞内脂质沉积情况, 从而全面评估肝脏病理改变。

2.3.5 Western blotting 法检测核心蛋白的表达 取各组肝组织样本 20 mg , 采用磷酸盐缓冲液 (PBS) 进行 2 次冲洗处理, 随后在冰浴条件下, 利用 RIPA 细胞裂解液进行组织裂解, 完成总蛋白提取。取 $40 \mu\text{g}$ 蛋白样品, 通过上样操作将其置于 SDS-PAGE

凝胶中开展电泳实验。电泳结束后,将 PVDF 膜覆盖于凝胶条带之上,放置于转膜槽内,以 400 mA 恒定电流进行转膜。转膜完成的 PVDF 膜于室温环境下,使用 5%脱脂奶粉封闭处理 1.5 h。封闭后的膜与 NLRP3、Caspase-1、Caspase-3、cleaved Caspase-3、GSDMD、IL-18、IL-1 β 等一抗进行孵育,先于室温短暂孵育,再置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境过夜。采用 TBST 溶液进行 3 次洗涤,每次洗涤时长 10 min。完成一抗孵育及洗涤后,加入二抗于室温条件下孵育 1.5 h,再次以 TBST 溶液洗涤 3 次,每次 10 min。利用 ECL 发光试剂盒对蛋白条带进行曝光显影,运用 Image Lab 软件对所得蛋白条带灰度值进行测定分析,通过计算目标蛋白与内参蛋白灰度值的比值,确定各蛋白的相对表达水平。

2.3.6 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄-活性成分-靶点的获取

基于 TCMSMP 数据库,对大黄活性成分进行系统检索,并以 $\text{OB} \geq 30\%$ 和 $\text{DL} \geq 0.18$ 作为筛选标准,最终获得 16 个潜在活性成分(表 1)。经靶点映射分析发现,上述 16 种成分中仅 7 种(MOL002235、MOL002268、MOL002281、MOL002297、MOL000358、MOL000471、MOL000096)成功匹配靶点基因。进一步汇总各成分对应靶点信息,通过去重处理后,确定 50 个非重复靶点用于后续研究。

3.2 交集基因的获得

运用韦恩分析策略,对大黄潜在活性化合物对应的靶基因集与酒精性肝炎疾病相关的潜在靶基因集进行交集运算。利用 Genecards 和 OMIM 数据库获得酒精性肝炎疾病 6 888 个,与大黄活性成分靶点取交集;最终确定大黄干预酒精性肝炎的潜在作用靶点共计 45 个,见图 1。

3.3 大黄-活性成分-酒精性肝炎靶点网络的构建

利用 Cytoscape 3.8.2 可视化软件,构建大黄-活性成分-酒精性肝炎靶点的网络关系图。该网络由 64 个节点组成,包括 1 个药物节点、1 个疾病节点、7 个有效活性化合物节点及 45 个靶点节点。经网络拓扑分析显示,芦荟大黄素的 degree 值显著高于其他成分,提示其可能作为大黄治疗酒精性肝炎的核心活性成分。基于此发现,后续将以芦荟大黄素为研究对象开展动物实验验证,见图 2。

表 1 大黄活性成分

Table 1 Active components of <i>Rhei Radix et Rhizoma</i>			
MOLID	化合物	OB/%	OL
MOL002235	泽兰黄醇 (eupatin)	50.80	0.41
MOL002268	大黄酸 (rhein)	47.07	0.28
MOL002281	决明内酯 (toralactone)	46.46	0.24
MOL002297	胡萝卜苷 (daucosterol)	35.89	0.70
MOL000358	β -谷甾醇 (β -sitosterol)	36.91	0.75
MOL000471	芦荟大黄素 (aloe-emodin)	83.38	0.24
MOL000096	(-)-儿茶素[(-)-catechin]	49.68	0.24
MOL002259	大黄素甲醚双葡萄糖苷 (physciondi glucoside)	41.65	0.63
MOL002280	torachrysone-8- <i>O</i> - β -D-(6'-oxayl)-glucoside	43.02	0.74
MOL002288	大黄素-1- <i>O</i> - β -龙胆二糖苷 (emodin-1- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside)	44.81	0.80
MOL002260	procyanidin B-5,3'- <i>O</i> -gallate	31.99	0.32
MOL002276	sennoside E	50.69	0.61
MOL002251	β -胡萝卜素氧化物 (mutatochrome)	48.64	0.61
MOL002293	番泻苷 D (sennoside D)	61.06	0.61
MOL002303	palmidin A	32.45	0.65
MOL000554	gallic acid-3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -galloyl)-glucoside	30.25	0.67

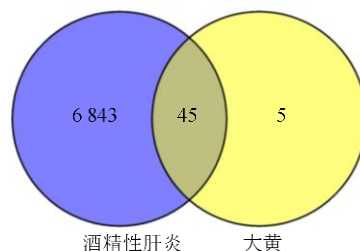


图 1 成分靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of component target-disease target

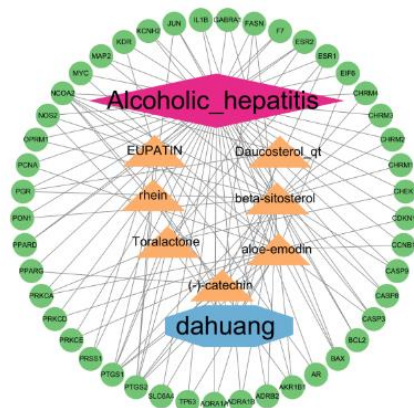


图 2 大黄-活性成分-酒精性肝炎靶点网络

Fig. 2 *Rhei Radix et Rhizoma*-active components-alcoholic hepatitis target network

3.4 PPI 的构建及核心基因筛选

将 45 个药物-疾病交集基因上传至 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 物种选择为人类 (*Homo Sapiens*)。参数设置如下: 置信度阈值设定为中等水平 (0.400), 同时隐藏网络中无相互作用的游离蛋白, 其余参数保持默认设置, 导出 TSV 格式的文本数据。利用 Cytoscape 3.8.2 软件对数据进行可视化处理, 以节点大小映射 degree 值, 构建 PPI 网络。通过拓扑分析筛选出网络中 degree 值排名前 20 的核心节点进行重点展示, 这些关键靶点被推测为大黄干预酒精性肝炎的潜在核心作用位点(图 3、表 2)。

3.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

在 Metascape 平台上实施了功能富集研究, 将显著水平定在 0.01 以下, 从而鉴定到一些在生物过程及信号途径上有重要作用的共表达基因。通过对基因本体 (GO) 的富集分析发现, 这些基因显著聚集于诸如以下功能领域: G 蛋白耦联的受体活性作用、核激素受体的激活、对乙酰胆碱敏感的受体活

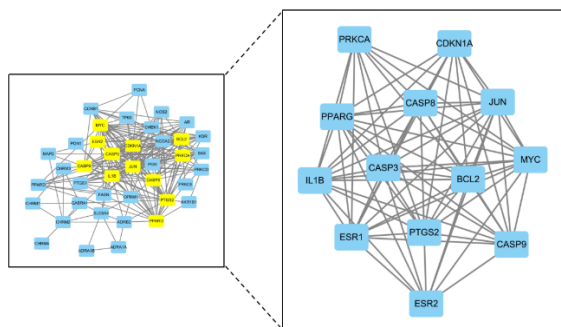


图 3 大黄治疗酒精性肝炎靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of targets of *Rhei Radix et Rhizoma* in treating alcoholic hepatitis

表 2 Degree 值前 20 位的作用靶点

靶点基因	degree	BC	CC
<i>IL-1β</i>	27	297.867	0.755
<i>JUN</i>	25	65.154	0.678
<i>CASP3</i>	24	58.164	0.667
<i>MYC</i>	24	78.099	0.667
<i>PTGS2</i>	24	152.399	0.690
<i>PPARG</i>	23	132.357	0.667
<i>ESR1</i>	22	86.462	0.667
<i>BCL2</i>	21	21.910	0.635
<i>CDKN1A</i>	19	46.282	0.615
<i>CASP8</i>	18	13.818	0.606
<i>CASP9</i>	17	74.566	0.606
<i>ESR2</i>	16	27.477	0.588
<i>PRKCA</i>	16	30.160	0.580
<i>AR</i>	15	6.530	0.571
<i>PGR</i>	15	6.438	0.571
<i>CCNB1</i>	14	12.691	0.541
<i>KDR</i>	13	3.678	0.563
<i>BAX</i>	11	6.783	0.541
<i>CHEK1</i>	11	7.060	0.500
<i>NCOA2</i>	10	2.493	0.519

性、依靠钙离子的蛋白激酶 C 类激酶活性以及以半胱氨酸为特异性的蛋白酶类群, 参与细胞凋亡过程的活性等 (图 4)。KEGG 分析表明, 酒精性肝炎主要关联的路径包括: 乙型肝炎相关信号途径、肿瘤生成相关信号途径、P53 信号途径、钙调信号途径、糖尿病综合征中的晚期糖基化终末产物-糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE) 信号途径及与细胞凋亡有关的信号途径 (图 5)。

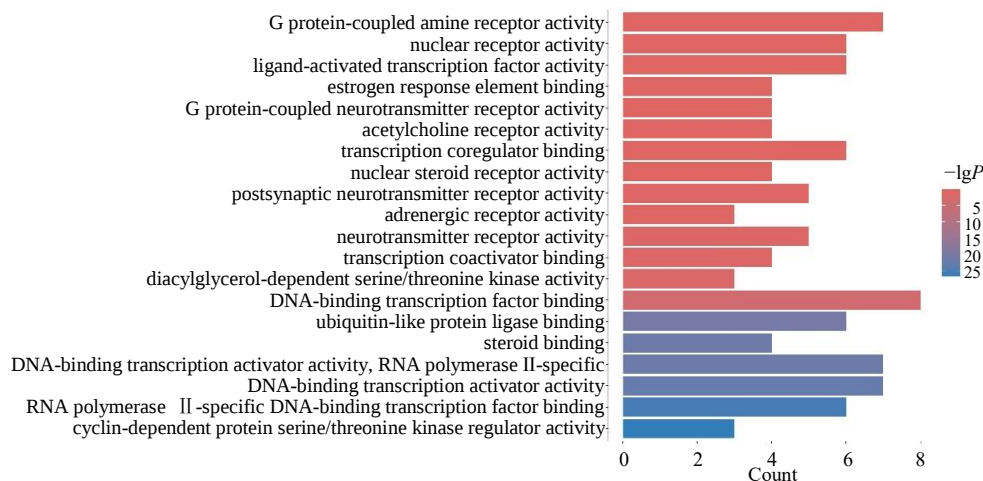


图 4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO functional enrichment analysis

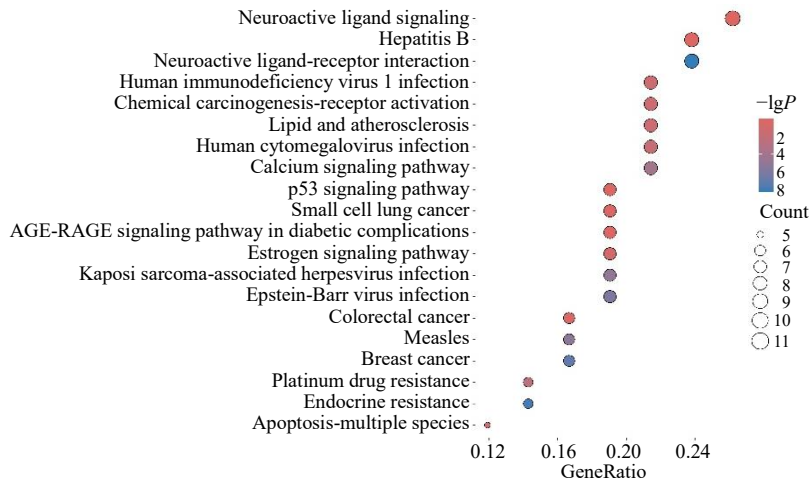


图 5 KEGG 富集分析气泡图
Fig. 5 Bubble diagram of KEGG enrichment analysis

3.6 分子对接

利用 Vina 软件, 将芦荟大黄素与 IL-1 β 、CASP3、骨髓细胞瘤癌基因 (MYC)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 以及蛋白激酶 C α (PRKCA) 进行分子对接。自由结合能量越小, 两者结合的构象越稳定, 故两者之间发生作用的可能性越好, 结果显示, 芦荟大黄素与 IL-1 β 、CASP3、MYC、PTGS2 以及 PRKCA 结合能均 <-20.9 kJ $\cdot$ mol $^{-1}$, 见表 3 和图 6。

表 3 核心成分芦荟大黄素与核心靶点的结合能

Table 3 Binding energy of core component and core target		
核心靶点	PBD ID	结合能/(kJ $\cdot$ mol $^{-1}$)
IL-1 β	7CHZ	-29.33
CASP3	2J62	-21.37
MYC	1NKP	-31.63
PTGS2	5F19	-37.42
PRKCA	2ELI	-128.68

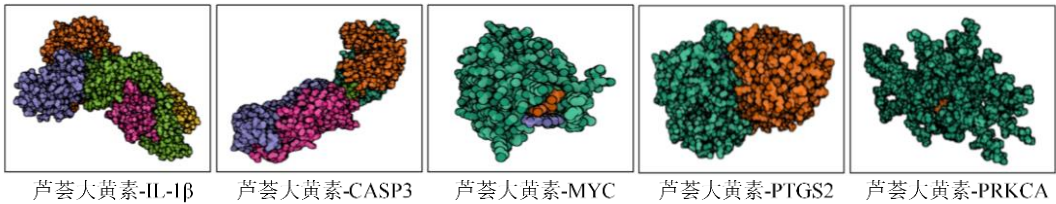


图 6 核心成分与核心靶点的分子对接示意图
Fig. 6 Molecular docking diagram of core components and core targets

3.7 实验验证结果

3.7.1 芦荟大黄素对酒精性肝炎小鼠体质量的影响 15 d 后, 对照组小鼠体质量有所增加, 模型组、氢化可的松组以及芦荟大黄素低、中、高剂量组小鼠体质量略有降低, 差异无显著性。说明乙醇液体饲料可以造成小鼠体质量的下降, 阳性药氢化可的松和芦荟大黄素对肝损伤小鼠的体质量影响不是很明显 (图 7)。

3.7.2 芦荟大黄素对酒精性肝炎小鼠肝脏指数的影响 与对照组相比, 模型组小鼠肝脏指数显著升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, 芦荟大黄素低、中、高剂量组的小鼠肝脏指数均明显降低 ($P<0.01$),

其中芦荟大黄素中剂量组降低最为明显 ($P<0.001$) (图 8)。

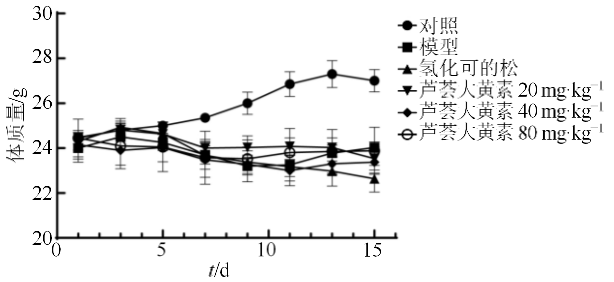
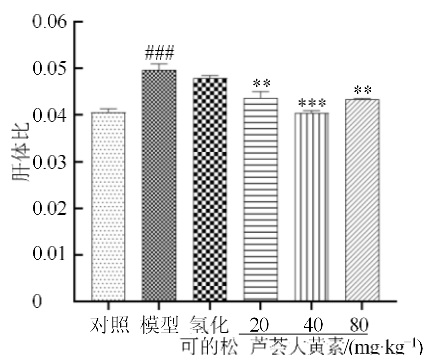


图 7 各组小鼠体质量变化 ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)
Fig. 7 Changes in body weight of mice in each group ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)



与对照组比较: $###P < 0.001$; 与模型组比较: $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ 。
 $###P < 0.001$ vs control group; $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model group.

图 8 各组小鼠肝脏指数 ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)

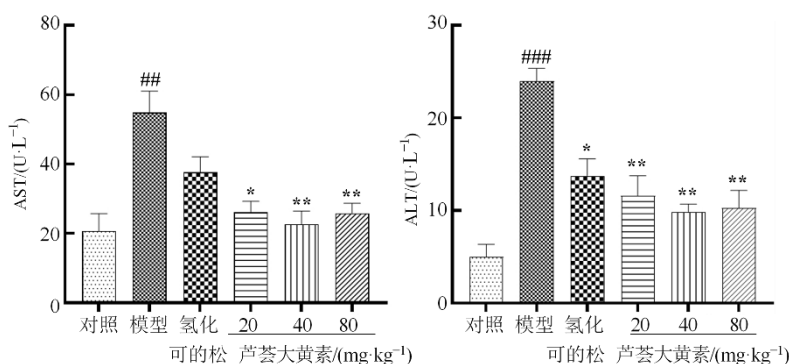
Fig. 8 Liver index of mice in each group ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)

3.7.3 芦荟大黄素对酒精性肝炎小鼠血清 ALT、AST 的影响 与对照组相比, 模型组 ALT、AST 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 氢化可的松组 AST 水平降低, 但不显著, ALT 水平显著降低 ($P < 0.05$), 芦荟大黄素各剂量组均能显著降低

ALT、AST 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 中剂量组尤为显著 (图 9)。

3.7.4 芦荟大黄素对酒精性肝炎小鼠肝脏病理组织学的影响 通过 HE 染色观察肝脏组织病理学变化, 结果显示: 对照组小鼠肝细胞形态均一, 呈规则有序排列, 肝小叶结构清晰可辨, 肝窦形态正常, 仅见少量炎症细胞散在分布; 模型组肝细胞出现显著气球样变性, 肝索排列紊乱无序, 可见大量中性粒细胞浸润及局灶性细胞坏死; 氢化可的松组与芦荟大黄素低、高剂量组肝小叶结构存在不同程度破坏; 相较之下, 芦荟大黄素中剂量组肝组织病理损伤程度明显减轻, 大部分肝小叶结构维持完整状态 (图 10)。

油红 O 染色结果显示, 对照组肝细胞内几乎未见脂滴, 无脂肪变性; 模型组油红 O 染色明显, 大量脂滴聚集且相互融合; 氢化可的松组以及芦荟大黄素低、高剂量组有脂滴聚集, 相较于模型组有减轻; 芦荟大黄素中剂量组脂肪变性明显减轻, 多以小脂滴散在存在 (图 10)。



与对照组比较: $##P < 0.01$ $###P < 0.001$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ 。
 $**P < 0.01$ $###P < 0.001$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs model group.

图 9 各组小鼠血清 ALT、AST 的水平 ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 9 Levels of ALT and AST in serum of mice in each group ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)

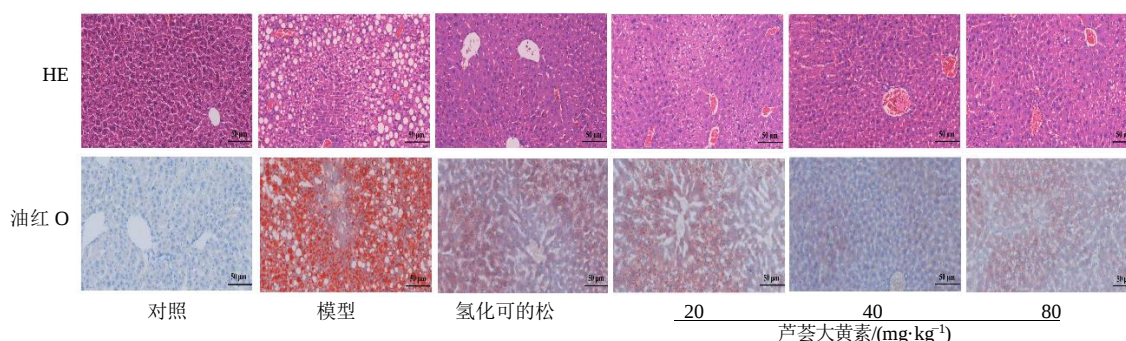
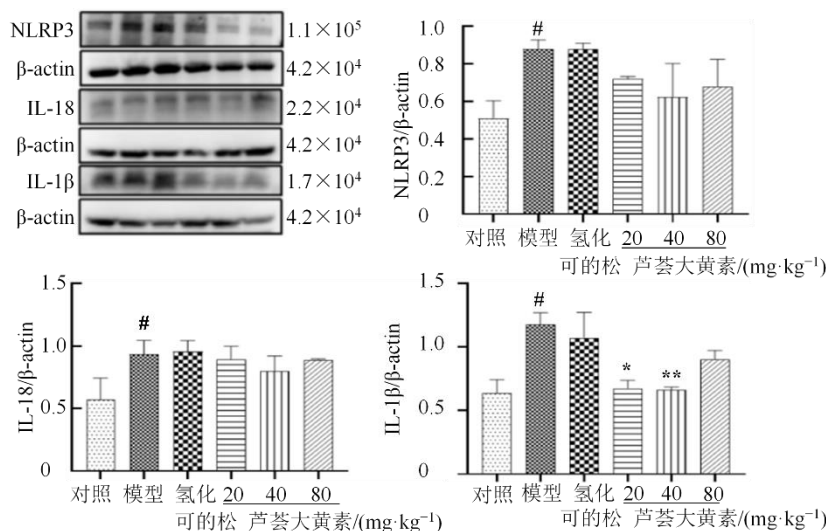


图 10 各组小鼠肝组织 HE 染色及油红 O 染色 ($\times 20$)

Fig. 10 HE staining and Oil red staining of liver tissues of mice in each group ($\times 20$)

3.7.5 芦荟大黄素对酒精性肝炎小鼠肝组织中蛋白表达水平的影响 Western blotting 结果显示, 模型组小鼠肝组织中 NLRP3、IL-18、IL-1 β 、GSDMD、cleaved Caspase-3、和 Caspase-1 蛋白表达水平较对照组相比均显著升高 ($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白表达水平有所升高, 但无显著性 (图 11、12)。与模

型组相比, 氢化可的松组以及芦荟大黄素各剂量组 NLRP3、IL-18、IL-1 β 、GSDMD、cleaved Caspase-3、Caspase-3 和 Caspase-1 蛋白表达水平均有降低, 其中芦荟大黄素中剂量组 IL-1 β 、GSDMD、Caspase-3 和 Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01) (图 11、12)。

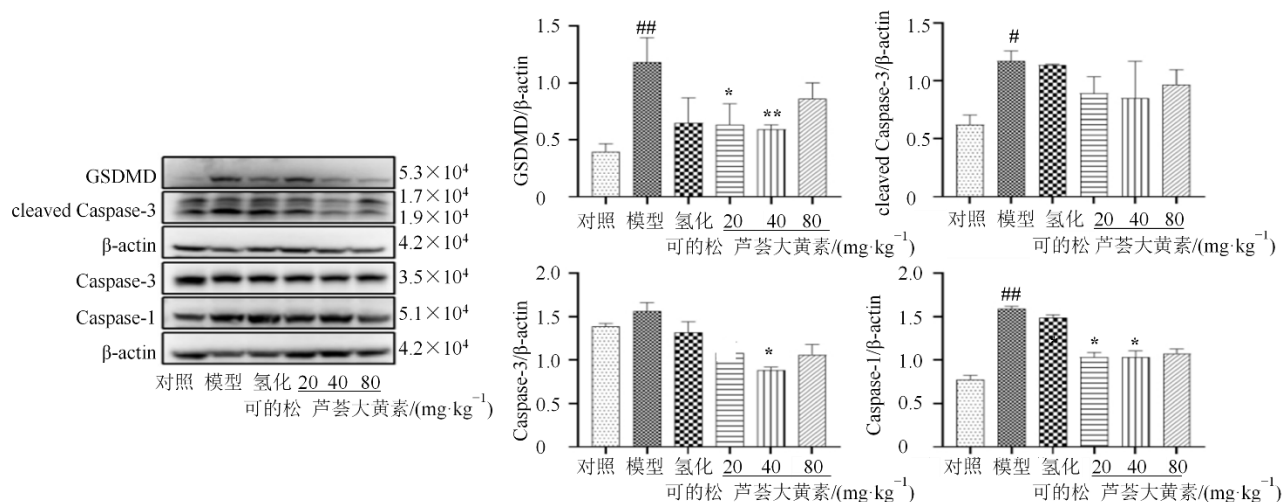


与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ 。

$^{\#}P < 0.05$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group.

图 11 芦荟大黄素对酒精性肝炎小鼠肝脏中 NLRP3、IL-18 和 IL-1 β 蛋白表达的影响 ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 11 Effect of aloe emodin on expression of NLRP3, IL-18 and IL-1 β in liver of alcoholic hepatitis mice ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)



与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ 。

$^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group.

图 12 芦荟大黄素对酒精性肝炎小鼠肝脏中 GSDMD、cleaved Caspase-3、Caspase-3 和 Caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 12 Effect of aloe emodin on expression of GSDMD, cleaved Caspase-3, Caspase-3 and Caspase-1 in liver of alcoholic hepatitis mice ($\bar{X} \pm s$, $n = 6$)

4 讨论

酒精性肝炎是酒精相关性肝病的急性临床表现,全球超过 50%的肝脏疾病负担与过度饮酒有关,严重危害人类健康^[14]。目前西医治疗酒精性肝炎的方法单一,多采用激素治疗,但其治疗效果欠佳,且不良反应较大,而中医药在芦荟大黄素的治疗上突显出经济、低毒、高效的巨大优势。

酒精性肝炎可归属于中医学的“伤酒”“酒癖”“酒疸”“酒胀”等范畴。中医学认为,酒乃湿热有毒之物,长期过饮则湿热酒毒内蕴^[15-16]。其基本治疗大法为“通腑泄热”治法,而大黄作为“通腑泄热”的代表药,既能通腑攻下,除有形之积滞,又能泻火解毒以清无形之邪热。因此,大黄可能通过抗炎、通腑等环节治疗酒精性肝炎。

本研究基于网络药理学构建大黄-活性成分-酒精性肝炎靶点网络,筛选出大黄治疗酒精性肝炎的活性成分 7 个,靶点 50 个,GO 和 KEGG 富集分析发现,潜在靶点参与细胞凋亡等过程,且与癌症通路、凋亡等炎症通路相关。其中,通过 STRING 数据库构建 PPI 网络,筛选出的核心靶点数据,排名第 1 的是 IL-1 β ,是潜在关键核心治疗靶点,而大黄中有效成分只有芦荟大黄素富集在 IL-1 β 的有效药物成分中。因此,本研究以芦荟大黄素作为代表药物。有研究表明,芦荟大黄素具有抗炎、抗菌、抗病毒、保肝和免疫调节等药理特性^[17-18],可以通过调节炎症细胞因子、促进细胞凋亡、调节肠道菌群和结肠紧密连接蛋白的方式治疗炎症爆发性疾病,如关节炎、溃疡性结肠炎和脓毒症等^[10, 19-20],由此提示芦荟大黄素可以通过抑制炎症通路治疗酒精性肝炎。

IL-1 β 是一种促炎细胞因子,通常与炎症反应相关。IL-1 β 的异常释放可以与细胞死亡的类型有关。其中焦亡是一种由炎症小体(inflammasome)激活并由 Caspase-1 切割的细胞死亡形式,它导致 IL-1 β 的成熟和释放。因此,虽然 IL-1 β 本身不是焦亡的直接执行者,但它的成熟和释放是焦亡过程中的一个关键事件^[21]。Caspase-3 通常与凋亡相关,是凋亡过程中的主要执行者。Caspase-3 也可能参与焦亡过程。例如, Caspase-3 可以被炎症小体激活的 Caspase-1 或 Caspase-8 间接激活,从而参与焦亡^[22]。不过, Caspase-3 在焦亡中的作用通常不如 Caspase-1 明显,后者是焦亡过程中切割 IL-1 β 前体和 GSDMD 的关键酶^[23]。

通过 Western blotting 对相关蛋白进行实验验证,结果证明了阳性药(氢化可的松)和大黄有效成分芦荟大黄素均可以有效降低炎症相关蛋白 NLRP3、IL-18、IL-1 β 、GSDMD、cleaved Caspase-3、Caspase-3 和 Caspase-1 表达,而芦荟大黄素中剂量能够抑制炎症相关蛋白 IL-1 β 、GSDMD、Caspase-3 和 Caspase-1 表达水平,同时还能维持小鼠体质量,改善小鼠肝功能、肝细胞脂肪变性及气球样变范围酒精性肝损伤的作用,提示其治疗作用是明显优于阳性药(氢化可的松),且不良反应较小,可能是临床上大黄发挥治疗作用的主要成分。分子对接结果显示,芦荟大黄素与 IL-1 β 、CASP3、MYC、PTGS2 以及 PRKCA 结合力良好。本研究从某种程度上揭示了大黄中蒽醌类成分治疗酒精性肝炎的多靶点、多通路的机制特点。

本研究通过网络药理学探讨大黄对酒精性肝炎的治疗作用及机制,发现大黄可通过多成分-多靶点-多通路的途径治疗酒精性肝炎,并通过构建酒精性肝炎小鼠动物模型,对筛选的主要活性成分芦荟大黄素和核心靶点进行了实验验证。为酒精性肝炎新药的研究提供了新的思路。但通过数据库筛选的有效成分会存在一定的误差,不能完全诠释药物的实际有效成分,同时大黄主要成分蒽醌类的泻下通腑作用在本研究中并未涉及,因此后续结合体内、外实验,完善大黄治疗酒精性肝炎的可能环节和潜在靶点,为临床应用和科学研究提供更合理的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Im G Y, Cameron A M, Lucey M R. Liver transplantation for alcoholic hepatitis [J]. J Hepatol, 2019, 70(2): 328-334.
- [2] Bataller R, Arab J P, Shah V H. Alcohol-associated hepatitis [J]. N Engl J Med, 2022, 387(26): 2436-2448.
- [3] Singal A K, Shah V H. Current trials and novel therapeutic targets for alcoholic hepatitis [J]. J Hepatol, 2019, 70(2): 305-313.
- [4] 张开弦, 姚秋阳, 吴发明, 等. 大黄属药用植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31(6): 555-566.
Zhang K X, Yao Q Y, Wu F M, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of medicinal plants in genus Rheum [J]. Chin J New Drugs, 2022, 31(6): 555-566.
- [5] Neyrinck A M, Etcheberria U, Taminiau B, et al. Rhubarb

- extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(1). DOI: 10.1002/mnfr.201500899.
- [6] 杨天文, 周纪军, 廖玉, 等. 黄防治肝病的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(22): 7536-7544.
- Yang T W, Zhou J J, Liao Y, et al. Research progress on *Rhei Radix* et *Rhizoma* in prevention and treatment of liver diseases [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(22): 7536-7544.
- [7] Wu J W, Wei Z H, Cheng P, et al. Rhein modulates host purine metabolism in intestine through gut microbiota and ameliorates experimental colitis [J]. *Theranostics*, 2020, 10(23): 10665-10679.
- [8] Luo S, He J R, Huang S W, et al. Emodin targeting the colonic metabolism via PPAR γ alleviates UC by inhibiting facultative anaerobe [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154106.
- [9] Jiao J Z, Wu J, Wang M, et al. Rhubarb supplementation promotes intestinal mucosal innate immune homeostasis through modulating intestinal epithelial microbiota in goat kids [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(4): 1047-1057.
- [10] Gao H J, Ren Y, Liu C. Aloe-emodin suppresses oxidative stress and inflammation via a PI3K-dependent mechanism in a murine model of sepsis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 9697887.
- [11] Li X, Yao M H, Li L L, et al. Aloe-emodin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating microglial polarization and pyroptosis through inhibition of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155578.
- [12] Zhang D Q, Zhang L J, Chen G F, et al. Hepatoprotective effect of Xiayuxue decoction ethyl acetate fraction against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice via inducing apoptosis and suppressing activation of hepatic stellate cells [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 1229-1243.
- [13] Bertola A, Mathews S, Ki S H, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(3): 627-637.
- [14] Xu H Q, Xiao P, Zhang F Y, et al. Epidemic characteristics of alcohol-related liver disease in Asia from 2000 to 2020: A systematic review and meta-analysis [J]. *Liver Int*, 2022, 42(9): 1991-1998.
- [15] 周刚, 张扬, 扈晓宇. 中医对酒精性肝炎发病机制的认识 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(10): 1354-1356.
- Zhou G, Zhang Y, Hu X Y. TCM understanding of the pathogenesis of alcoholic hepatitis [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2018, 24(10): 1354-1356.
- [16] Meng Z N, Li M Y, Wang X L, et al. *Inula britannica* ameliorates alcohol-induced liver injury by modulating SIRT1-AMPK/Nrf2/NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 667-678.
- [17] Devi G, Harikrishnan R, Paray B A, et al. Effects of aloe-emodin on innate immunity, antioxidant and immune cytokines mechanisms in the head kidney leucocytes of *Labeo rohita* against *Aphanomyces invadans* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 87: 669-678.
- [18] Ren Q H, Chen J Q, Wesseling S, et al. Physiologically based kinetic modeling-facilitated quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation to predict the effects of aloe-emodin in rats and humans [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(29): 16163-16176.
- [19] Hashiguchi M, Suzuki K, Kaneko K, et al. Effect of aloe-emodin on the proliferation and apoptosis of human synovial MH7A cells; a comparison with methotrexate [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 4398-4404.
- [20] Shi G F, Jiang H, Feng J R, et al. Aloe vera mitigates dextran sulfate sodium-induced rat ulcerative colitis by potentiating colon mucus barrier [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114108.
- [21] Chen M N, Rong R, Xia X B. Spotlight on pyroptosis: Role in pathogenesis and therapeutic potential of ocular diseases [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 183.
- [22] Kang L L, Dai J H, Wang Y F, et al. Blocking Caspase-1/Gsdmd and Caspase-3/-8/Gsdme pyroptotic pathways rescues silicosis in mice [J]. *PLoS Genet*, 2022, 18(12): e1010515.
- [23] Elias E E, Lyons B, Muruve D A. Gasdermins and pyroptosis in the kidney [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(5): 337-350.

[责任编辑 齐静雯]