

## 三七合剂干预肝缺血再灌注损伤机制的网络药理学探讨

韩根利<sup>1</sup>, 刘宏胜<sup>2\*</sup>

1. 天津市第一中心医院 药学部, 天津 300192

2. 天津市第一中心医院 国家卫生健康委员会危重病急救医学重点实验室, 天津 300192

**摘要:** **目的** 通过网络药理学构建三七合剂的活性成分-肝缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI) 靶点-生物通路的网络关系, 探讨三七合剂干预 HIRI 的关键靶点及作用机制。 **方法** 通过国内外文献调研和中药系统药理学分析平台 (TCMSP) 及 Pharm Mapper、Swiss Target Prediction 等服务器, 以口服利用度 (OB) 和类药性 (DL) 作为限定条件筛选并收集三七合剂干预 HIRI 的相关靶点; 利用 OMIM 数据库筛选并整理 HIRI 相关的基因和蛋白靶点。利用 Excel 表合并、整理成分与疾病靶点的交集, 通过 Cytoscape3.7.2 软件的插件 Network Analyzer 分析, 以拓扑参数度 (degree)  $\geq 5$  (平均自由度为 4.5) 为筛选条件找到核心靶点, 并将交集靶点导入 STRING 服务器, 并以置信度得分 (Confidence Score)  $\geq 0.85$  为筛选条件构建核心蛋白互作 (Hub-PPI) 网络; 将交集靶点导入 FunRich 3.0 软件进行生物学过程和生物学通路分析, 利用 Cytoscape3.7.2 构建中药-活性成分-HIRI 靶点-生物学通路网络。 **结果** 三七合剂能降低 HIRI 小鼠天门冬氨酸转氨酶 (AST) 及谷氨酸转氨酶 (ALT) 的表达 ( $P < 0.01$ ); 三七合剂经筛选得到 45 个活性成分, 对应靶点 3 273 个, 主要化合物包括熊果酸、齐墩果酸、马钱子苷、槲皮素、人参皂苷 F<sub>2</sub>、芍药苷等; 整理 HIRI 得到 196 个靶点, 其与成分的交集靶点为 46 个, 主要包括 11- $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 (HSD11B1)、腺苷受体 A3 (ADORA3)、环氧化酶 2 (PTGS2)、腺苷受体 A1 (ADORA1)、蛋白激酶 C- $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) 等; 经 STRING 服务器设定 Confidence Score  $\geq 0.85$  的限定条件, 得到高置信度 PPI 网络并经 cluster 处理将其聚为 3 类; 经 FunRich 软件分析得到蛋白质代谢作用、信号传导、酶活性的负调控、炎症反应、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路共 5 条生物学过程 ( $P < 0.05$ ); 整合素连接激酶信号、TNF 受体信号通路、p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路、TRAIL 信号通路等 16 条生物通路 ( $P < 0.01$ )。 **结论** 初步探讨了三七合剂干预 HIRI 是通过多成分和多靶点的相互作用, 及调控多条生物通路及生物学过程共同完成的, 但关键的核心靶标和具体的调控机制尚待进一步的实验验证。

**关键词:** 三七; 山茱萸; 白芍; 三七合剂; 网络药理学; 生物通路; 数据库; 靶点; 肝缺血再灌注损伤; 熊果酸; 齐墩果酸; 马钱子苷; 槲皮素; 人参皂苷 F<sub>2</sub>; 芍药苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)20-5260-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.019

## Mechanism of Sanqi Mixture for intervention in hepatic ischemia reperfusion injury based on network pharmacology

HAN Gen-li<sup>1</sup>, LIU Hong-sheng<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China

2. NHC Key Laboratory of Critical Care Medicine, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China

**Abstract: Objective** Through network pharmacology, the network relationship between the active component of Sanqi Mixture, the target of hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI), and biological pathway was constructed to explore the key target and mechanism of effect of Sanqi Mixture on HIRI. **Method** Through literature research at home and abroad, Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) platform, Pharm Mapper, Swiss Target Prediction and other servers, oral availability (OB) and drug-likeness (DL) were selected as the limited conditions to collect the relevant targets for Sanqi Mixture for intervention in HIRI. The OMIM database was used to screen and collate HIRI related genes and protein targets. Excel table was used to merge and sort the intersection between disease and targets through Cytoscape3.7.2 software plug-ins Network Analyzer, with topological parameters

收稿日期: 2020-02-27

基金项目: 天津市第一中心医院春风课题 (2019CF15)

作者简介: 韩根利, 男, 执业药师, 主管中药师。

\*通讯作者 刘宏胜, 女, 硕士, 主任药师。E-mail: lhwmg@sina.com

(degree)  $\geq 5$  (average degrees of freedom 4.5) for the filter to find the core targets; And the intersection targets were imported to the server STRING, and with Confidence Score of 0.85 or higher for the filter conditions to build the core protein interactions (Hub-PPI) network. The intersection target was introduced into FunRich 3.0 software for biological process and biological pathway analysis, and Cytoscape3.7.2 was used to construct the network of “traditional Chinese medicine-active ingredient-HIRI target-biological pathway”.

**Result** Sanqi mixture could reduce the expression of Aspartate aminotransferase (AST) and glutamate transaminase (ALT) in HIRI mice ( $P < 0.01$ ). After screening, 45 active components of Sanqi Mixture were obtained, corresponding to 3 273 targets, and the main compounds included ursolic acid, oleanolic acid, brucine, quercetin, ginsenoside F<sub>2</sub>, paeoniflorin, etc. Among the 196 targets obtained by HIRI, 46 targets were intersected with components, including 11- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD11B1), adenosine receptor A3 (ADORA3), cyclooxygenase 2 (PTGS2), adenosine receptor A1 (ADORA1), protein kinase C- $\epsilon$  (PKC), etc. With the STRING server setting the qualified condition of Confidence Score  $\geq 0.85$ , the PPI network with high Confidence was obtained and clustered into three categories through cluster processing. Five biological processes including protein metabolism, signal transduction, negative regulation of enzyme activity, inflammatory response and transmembrane receptor protein tyrosine kinase signal pathway were analyzed by FunRich software ( $P < 0.05$ ). 16 biological pathways including integrin-linked kinase signal, TNF receptor signaling pathway, P38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway, and TRAIL signaling pathway ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** It is preliminarily discussed that Sanqi Mixture intervenes HIRI through the interaction of multiple components and multiple targets, as well as the regulation of multiple biological pathways and biological processes. However, the key core targets and the specific regulation mechanism still need further experimental verification.

**Key words:** *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; *Paeonia lactiflora* Pall.; Sanqi Mixture; network pharmacology; biological pathways; database; target; hepatic ischemia reperfusion injury; ursolic acid; oleanolic acid; brucine; quercetin; ginsenoside F<sub>2</sub>; paeoniflorin

肝缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI) 是指肝脏在短暂失去血液供应后血液再灌注时出现的一系列损伤, 其能促使肝功能受损加重, 是诱发肝功能不全和肝衰竭的关键因素<sup>[1]</sup>。HIRI 主要发生在复杂肝外科手术及肝移植手术过程中, 常常导致患者发生严重的术后并发症<sup>[2]</sup>, 直接影响到疾病的预后、手术成功率和患者的存活率<sup>[3]</sup>。目前临床上应对 HIRI 的手段常用钙拮抗剂、自由基清除剂及抗氧化剂等药物, 它们通过预处理促进细胞在缺血期的耐受力, 减少在再灌注期的损伤<sup>[4]</sup>。但是, 这些药物对 HIRI 的干预作用无非是从炎症反应、氧化应激及钙超载等几个不同的方面阐述, 解释了 HIRI 的部分形成原因, 至于对其发生的确切机制迄今尚无明确认识<sup>[5]</sup>。况且, 这些药物的作用靶点较为单一, 多具有肝脏毒性的不良反应, 从而降低了药物对 HIRI 的干预疗效。

而基于系统生物学理论的网络药理学是通过生物系统的网络分析, 选取特定信号节点进行多靶点药物分子分析的新方法<sup>[6]</sup>。是药物多成分与疾病多靶点之间通过生物学多通路完成的物质基础研究, 是从整体层面研究中药治疗疾病的过程。是药物多成分与疾病多靶点之间通过生物学多通路完成的物质基础研究, 是从整体层面研究中药治疗疾病的过程。本研究前期实验以三七合剂 10 mg/g 对抗

HIRI 小鼠, 结果小鼠血清中的天门冬氨酸转氨酶 (AST)、谷氨酸转氨酶 (ALT) 数值与 HIRI 模型组相比具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 证明三七合剂能干预 HIRI 的发生发展。

三七合剂是由三七、山茱萸、白芍 3 种中药组成。其中三七是一种名贵的中药材, 具有止血化瘀的功效。有关实验证明, 三七能够有效缓解心肌缺血再灌注损伤 (MIRI)、抗脂质氧化, 从而既保护了缺血心肌又调节了血脂<sup>[7]</sup>。其次, 三七还有保护肝脏, 抑制肝细胞间纤维变性坏死, 阻止炎性细胞聚集浸润的特点<sup>[8]</sup>。此外, 三七还具有免疫调节、抗炎、改善血管通透性等功效<sup>[9-11]</sup>; 山茱萸是我国传统的名贵滋补中药材, 具有补益肝肾的功效<sup>[12]</sup>。文献报道<sup>[13-14]</sup>, 山茱萸果核提取物可以通过抗氧化应激反应、清除氧自由基、抑制炎性因子释放及免疫调节等途径保护肝脏。此外, 山茱萸还具有抗肿瘤、降血糖、抗衰老等功效<sup>[15]</sup>; 白芍具有柔肝止痛、平抑肝阳的作用<sup>[16]</sup>。文献报道<sup>[17]</sup>, 白芍保护肝脏可能是通过清除氧自由基、提高超氧化物歧化酶的活性来完成的。此外, 白芍还具有抗炎、止痛、抑制自身免疫反应等药理作用<sup>[17]</sup>。总之, 本研究旨在运用网络药理学方法, 通过构建中药-活性成分-HIRI 靶点-生物通路的网络关系, 探讨三七合剂干预 HIRI 的核心靶标及作用机制, 为后期的深入研究及

新药开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

C57BL 小鼠 21 只, 雄性, SPF 级, 5 周龄, 体质量 (19±3) g, 由中国医学科学院医学实验动物研究所提供, 许可证号: SCXK (京) 2014-0004; 三七合剂 (含马钱苷 837.73 mg/L, 芍药苷 208.66 mg/L), 国家卫生健康委员会危重病急救医学重点实验室提供; AST 及 ALT 检测试剂盒, 批号分别为 20190109、20181219, 南京建成生物工程研究所; 戊巴比妥钠 (20180629)、福尔马林, 烟台市双双化工有限公司。

### 1.2 三七合剂对 HIRI 小鼠血清中 AST、ALT 影响

将 21 只 C57BL 小鼠, 随机分为 3 组, 分别为假手术组、HIRI 模型组和给药组, 每组 7 只。给药组以三七合剂 10 mg/g (生药/小鼠体质量) 的剂量 ig 给药 14 d, 1 次/d; 其他 2 组 ig 给予等量生理盐水。末次给药预处理后 1 h 后, ip 戊巴比妥钠 (40 ng/g) 麻醉, 在上腹正中打开腹腔, 小心暴露肝脏, 然后游离肝周韧带。模型组与三七合剂组夹闭肝左叶和肝中叶入肝血管阻断血流, 1 h 后松开血管夹恢复血流。假手术组仅游离肝门而不阻断血流。再灌注 6 h 后摘眼球取血、分离部分肝脏和脾脏组织于 -80 °C 储存, 剩余部分肝组织储存于福尔马林中。本实验研究中将血清室温静置 60 min, 3 000 r/min 离心 20 min, 分离血清, 然后按照 ALT、AST 检测试剂盒步骤进行操作检测其含量。

### 1.3 三七合剂活性成分收集、筛选及靶点预测

在中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP, (<http://tcmispw.com/tcmisp.php>) 及国内文献查阅收集三七合剂组方中三七 *Notoginseng Radix et Rhizoma*、山茱萸 *Corni Fructus*、白芍 *Paeoniae Radix Alba* 的化学成分信息。结合口服生物利用度 (OB) ≥30% 和类药性 (DL) ≥0.18<sup>[1]</sup> 作为活性成分的筛选标准, 建立三七合剂化学成分数据库采用 Pharm Mapper (<http://lialb-ecust.cn/pharmmapper/>)、Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库预测 3 种药物成分对应的蛋白靶点, 并将其整理查重后统一在 UniProt 服务平台上校正和转化, 最终以 UniProt ID 表示, 建立三七合剂活性成分靶点数据库。

### 1.4 活性成分-HIRI 靶点网络的构建

通过 OMIM (<http://www.omim.org/>) 数据库以

hepatic ischemia refocuses the injury 为关键词进行搜索, 获得与 HIRI 相关的蛋白靶点, 并在 UniProt 服务平台上校正和转化, 最终以 UniProt ID 表示。使用 Excel 表查找重复功能, 收集成分与 HIRI 的交集靶点 46 个, 用 Cytoscape 3.7.2 软件构建三七合剂的活性成分-HIRI 疾病靶点可视化网络, 并使用其插件 Network Analyzer 分析网络节点的拓扑参数, 并以度 (degree) ≥5 (平均自由度为 4.5) 为筛选条件得到成分对应的 HIRI 靶点; 同时为监控三七合剂的质量对活性成分也进行了筛选。

### 1.5 成分-HIRI 靶点 PPI 网络的构建

将上述“1.4”项获得的成分与 HIRI 交集靶点共 46 个导入 STRING (<https://string-db.org/>) 服务平台, 限定种类为人 (homo sapiens), 构建蛋白相互作用关系网络 (PPI), 以置信度得分 (confidence score) ≥0.85 为筛选条件得到关键 PPI 网络; 同时并运用 Cluster 功能将这些靶蛋白进行聚类分析, 进一步阐述靶蛋白间的相互关系。

### 1.6 生物通路富集及 GO (Gene ontology) 生物学功能分析

利用 FunRich\_V3 分析软件对“1.5”项中得到的 46 个成分与 HIRI 交集靶点进行生物通路富集及 GO 生物学功能分析。

### 1.7 中药-活性成分-HIRI 靶点-生物通路网络构建

根据“1.5”项中筛选的活性成分-HIRI 靶点及“1.6”项中得到的基因生物通路, 构建中药-活性成分-HIRI 靶点-生物通路网络。

## 2 结果与分析

### 2.1 三七合剂对小鼠血清中 AST、ALT 检测结果

与假手术组比较, HIRI 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 HIRI 模型组比较, 三七合剂组小鼠血清中 ALT、AST 水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1。

表 1 三七合剂对 HIRI 小鼠 ALT、AST 的影响

Table 1 Effect of Sanqi Mixture on ALT and AST in HIRI mice

组别	剂量/ (mg·g <sup>-1</sup> )	AST/(IU·L <sup>-1</sup> )	ALT/(IU·L <sup>-1</sup> )
假手术		125.557 ± 36.612	31.057 ± 6.692
HIRI 模型		1 076.929 ± 316.926**	686.314 ± 256.300**
三七合剂	10	548.386 ± 150.586##	321.186 ± 120.447##

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

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

### 2.2 成分及其对应靶蛋白的收集与筛选

通过 TCMSP 数据库并以  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18$  为筛选条件, 得到 3 种药物的活性成分。其中, 三七 9 个成分、山茱萸 20 个成分、白芍 11 个成分; 另外结合文献对未纳入筛选标准, 但研究报道有重

要生物活性和药理作用的也纳入候选活性成分<sup>[2-5]</sup>, 三七 3 个成分、山茱萸 4 个成分、白芍 4 个成分。合并共有成分后, 最终共得到 45 种活性成分, 见化合物基本信息表 2。

将化学成分结构以 MOL2 格式上传至 Pharm

表 2 三七合剂核心化合物基本信息

Table 2 Basic information of core compounds of Sanqi Mixture

化合物代码	化合物名称	OB/%	DL	药物	化合物代码	化合物名称	OB/%	DL	药物
MOL008457	四氢鸡骨常山碱	32.42	0.81	山茱萸	MOL001925	芍药苷 qt	68.18	0.40	白芍
MOL004687	甲基己基甲酮	19.29	0.01	三七	MOL001924	芍药苷	53.87	0.79	白芍
MOL007489	三七皂苷 3	3.04	0.04	三七	MOL001921	芍药新苷	49.12	0.80	白芍
MOL007488	三七皂苷 2	7.69	0.28	三七	MOL001911	白芍苷 R1	21.29	0.82	白芍
MOL007476	人参皂苷 rb1	6.29	0.04	三七	MOL001910	环氧树脂-2 羟基油橄榄	64.77	0.38	白芍
MOL007475	人参皂苷 f2	36.43	0.25	三七	MOL000874	芍药醇	28.74	0.04	白芍
MOL005537	Z-5-十九烯	18.81	0.11	山茱萸	MOL001792	磷脂素	32.76	0.18	三七
MOL005532	正十四碳烷-三甲基	3.93	0.06	山茱萸	MOL001771	$\beta$ 多孔菌	36.91	0.75	山茱萸
MOL005531	远华蟾蜍精	69.99	0.79	山茱萸	MOL001680	马钱子苷	59.00	0.44	山茱萸
MOL005530	羟基芫花素	36.47	0.27	山茱萸	MOL001495	亚麻酸乙酯	46.10	0.20	山茱萸
MOL005503	腺齿紫金牛甙	36.66	0.33	山茱萸	MOL001494	甘露醇	42.00	0.19	山茱萸、三七
MOL005489	3,6-己二烯葡萄糖	31.42	0.66	山茱萸	MOL000554	没食子酸酰基葡萄糖苷	30.25	0.67	山茱萸
MOL00548	3,4-脱氢哥本哈根蓝色	46.64	0.49	山茱萸	MOL000511	熊果酸	16.77	0.75	山茱萸
MOL005481	五甲基酰胺戊二醇	33.40	0.24	山茱萸	MOL000492	儿茶酸	54.83	0.24	白芍
MOL005360	莫克硝酸甘油	57.71	0.63	山茱萸	MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	山茱萸、三七
MOL005344	人参皂苷 rh2	36.32	0.56	三七	MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	白芍
MOL003137	亮氨酸角黄素	32.12	0.78	山茱萸	MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	白芍
MOL002883	油酸乙酯	32.40	0.19	山茱萸	MOL000358	$\beta$ -谷固醇	36.91	0.75	山茱萸、三七、白芍
MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯	43.59	0.39	山茱萸、三七	MOL000263	齐墩果酸	29.02	0.76	白芍、山茱萸
MOL001933	羟基芍药苷	21.88	0.78	白芍	MOL000211	丁香香萜	55.38	0.24	白芍
MOL001930	苯甲酰芍药苷	31.77	0.75	白芍	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	三七
MOL001928	芍药内酯苷 qt	66.64	0.33	白芍	MOL000069	棕榈酸	19.30	0.10	山茱萸
MOL001927	芍药内酯苷	12.09	0.77	白芍					

Mapper 服务平台进行靶点预测; 将化学成分 SMILES 上传到 Swiss Target Prediction 数据库平台进行靶点预测。收集靶点, 整理并去除重复项后以 UniProt ID 表示, 最终得到 3 273 个靶点。

### 2.3 活性成分-HIRI 靶点网络的分析

从 OMIM 数据库获得 HIRI 相关的靶蛋白 196 个, 其与上述成分对应的靶点 3 273 个取交集得到 46 个靶蛋白, 见图 1; 利用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制成成分-HIRI 靶点网络可视图, 结果见图 2; 绘制节点度  $\geq 5$  的成分-HIRI 核心靶点网络图, 结果见图 3, 同时应用 Cytoscape 3.7.2 软件 Select-Node degree 筛

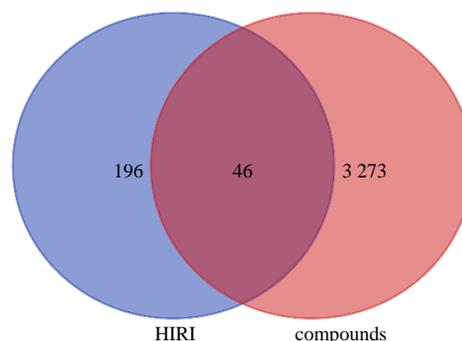
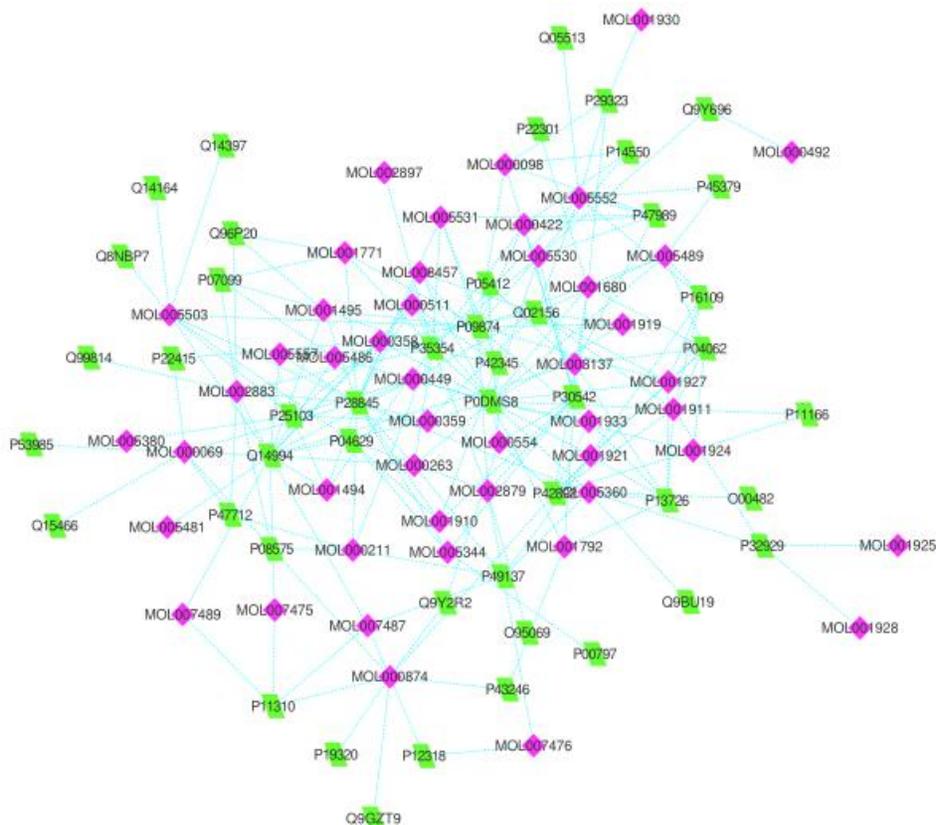


图 1 成分与疾病靶点交集示意图

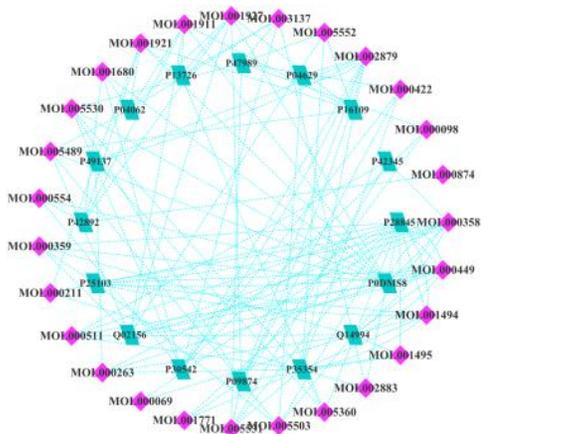
Fig. 1 Schematic diagram of intersection of components and disease targets



菱形代表成分，矩形代表靶点  
the rhombus represents the ingredients, the rectangle represents the targets

图 2 成分与疾病靶点交集示意图

Fig. 2 Schematic diagram of intersection of components and disease targets



菱形代表成分，矩形代表靶点  
the rhombus represents the ingredients, the rectangle represent targets

图 3 活性成分-HIRI 核心靶点网络图

Fig 3 Active ingredient-HIRI core target network diagram

选核心靶点，绘制成分-HIRI 核心网络图，它们依次为 HSD11B1、ADORA3、NR1I3、PTGS2、PARP1、ADORA1、PRKCE，见图 4 和表 3。同时为后续应用 HPLC 更好的监测三七合剂的质控应用 Hempl.Heatmap Illustrator 1.0 软件绘制了活性成分的

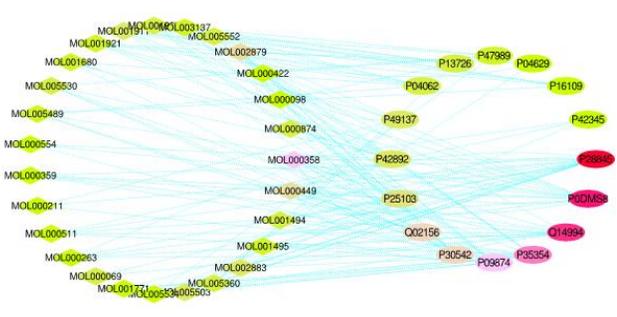


图 4 HIRI 重要靶蛋白网络图

Fig. 4 Network diagram of important target proteins in HIRI

热图，结果见图 5。主要核心成分分别为 MOL000098 (槲皮素)、MOL007475 (人参皂苷 f2)、MOL000263 (齐墩果酸)、MOL001924 (芍药苷)、MOL001680 (马钱子苷)、MOL000511 (熊果酸)，见表 4。

2.4 成分-HIRI 核心靶点 PPI 分析

成分与 HIRI 的 46 个交集靶点经 STRING 数据库分析发现，置信度得分 (confidence score) ≥0.85 的互助蛋白如腺苷 A3 受体 (ADORA3)、腺苷 A1 受体 (ADORA1)、神经生长因子受体 Trk-A

表 3 HIRI 重要靶蛋白及拓扑参数信息

Table 3 Important target protein and topological parameter information of HIRI

蛋白 ID	靶蛋白	靶基因	度
P28845	11-β-羟类固醇脱氢酶型 (11-β-hydroxysteroid dehydrogenase)	1HSD11B1	21
P0DMS8	腺苷受体 A3 (Adenosine A3 receptor)	ADORA3	20
Q14994	核受体亚家族 1 I 组成员 3 (Nuclear receptor subfamily 1 group I member)	NR1I3	19
P35354	环氧化酶 2 (Cyclooxygenase-2)	PTGS2	16
P09874	ADP-核糖聚合酶 1 (Poly [ADP-ribose] polymerase-1)	PARP1	13
P30542	腺苷 A1 受体 (Adenosine A1 receptor)	ADORA1	11
Q02156	蛋白激酶 C-ε (Protein kinase C-epsilon)	PRKCE	11

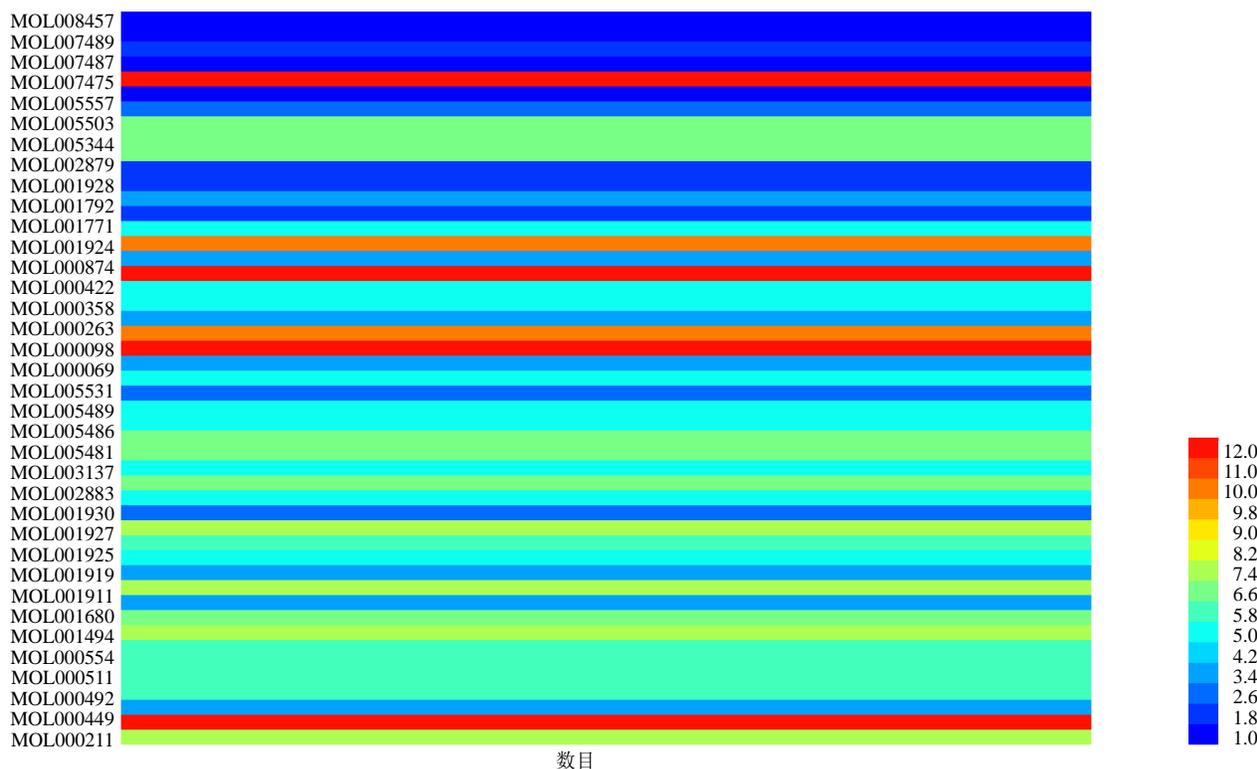


图 5 三七合剂中活性化合物作用强弱热图

Fig. 5 Heat map of activity of active compounds in Sanqi Mixture

表 4 三七合剂核心化合物基本信息

Table 4 Basic information of hub compounds in Sanqi mixture

化合物代码	化合物名称	OB/%	DL	来源药物	化合物代码	化合物名称	OB/%	DL	来源药物
MOL000511	熊果酸	16.77	0.75	山茱萸	MOL001680	马钱子苷	59.00	0.44	山茱萸
MOL005530	羟基芫花素	36.47	0.27	山茱萸	MOL001924	芍药苷	53.87	0.79	白芍
MOL000263	齐墩果酸	29.02	0.76	山茱萸、白芍	MOL007475	人参皂苷 f2	36.43	0.25	三七
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	三七、山茱萸	MOL000358	β-谷固醇	36.91	0.75	山茱萸、三七

(NTRK1)、蛋白激酶 C (PRK CZ)、凝血因子 VII/组织因子(F3)、P-选择素(SELP)、白介素 10(IL10)、环氧化酶-2 (PTGS2)、原癌基因 c (JUN) 在 PPI 中起着重要作用, 见图 6。

将 46 个交集靶点运用 KMEANS 法聚为 3 类,

进一步阐述靶蛋白间的紧密关系, 间的紧密关系, 为后续验证靶蛋白的表达提供理论依据, 见图 7 和见表 5。

### 2.5 靶标生物学通路富集及生物学功能分析

46 个成分与 HIRI 交集靶点生物通路富集及生



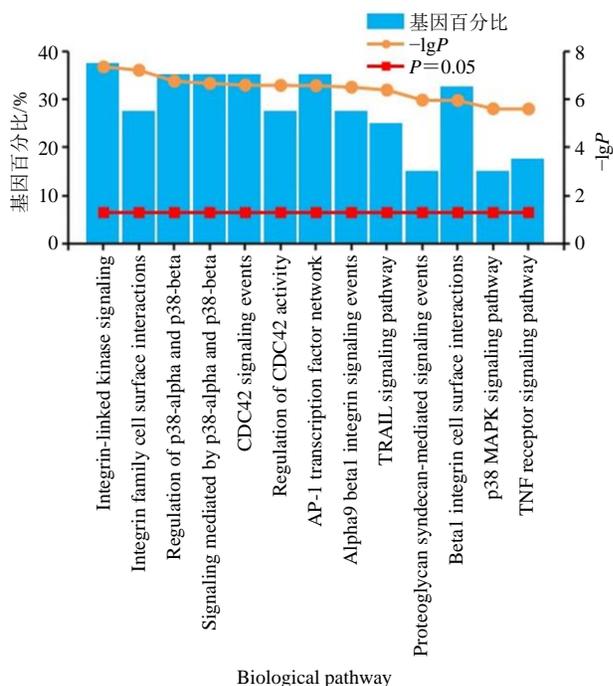


图 8 成分与 HIRI 交集靶点生物通路富集分析

Fig. 8 Enrichment analysis of intersection target biological pathway between components and HIRI

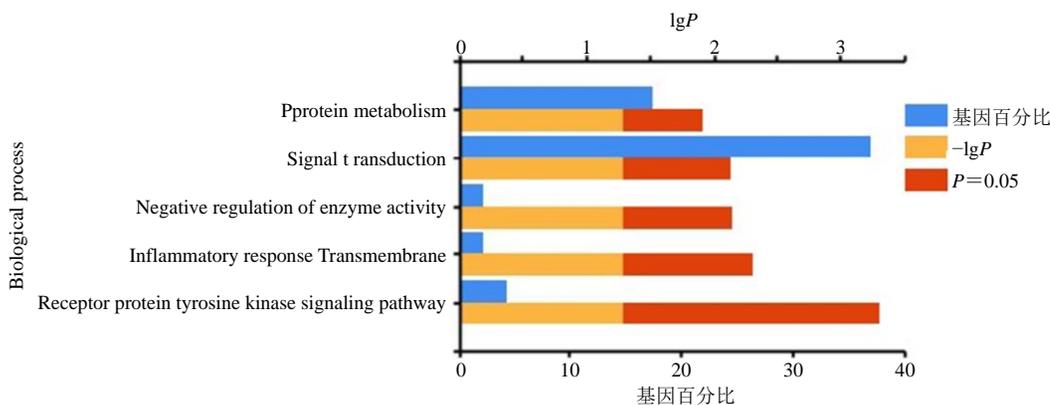


图 9 成分与 HIRI 交集靶点生物学过程富集分析

Fig. 9 Biological process enrichment analysis of intersection target of components and HIRI

释放大量的炎性介质，如 TNF、IL-6、IL-1 等，同时促进白细胞、血小板与肝窦内皮细胞的黏附，最终导致肝细胞损伤<sup>[22]</sup>；在 HIRI 晚期中性粒细胞在各种炎性介质作用下被激活并释放大量的氧自由基，引起长时间的蛋白酶的释放和氧化应激，最终导致大量的肝实质细胞丧失功能或死亡，造成肝损伤<sup>[23]</sup>。

本研究筛选出的靶标 HSD11B1 是一种氧化还原酶，它存在于人类的多种组织器官中，如肝、肺、脂肪组织、及中枢神经系统等，在体内主要调控活性的皮质醇和无活性皮质酮之间的转化，同时它也是高血压、心血管疾病、肥胖等代谢综合征的重要

分-HIRI 靶点-生物学通路”网络图，见图 10。该多层网络图的构建为后续深入研究三七合剂干预 HIRI 的作用机制提供参考。

### 3 讨论

本研究通过“中药-活性成分-HIRI 靶点-生物学通路”关系网络的构建，对三七合剂干预 HIRI 的活性成分、潜在作用靶点及其分子机制进行了探讨。结果显示三七合剂中熊果酸、齐墩果酸、人参皂苷 f2、槲皮素、芍药苷、马钱子苷等化合物在干预 HIRI 发生时具有重要的药理活性；11-β-羟类固醇脱氢酶 (HSD11B1)、腺苷受体 A3 (ADORA3)、环氧化酶 2 (PTGS2)、腺苷受体 A1 (ADORA1)、蛋白激酶 Cε (PKCε) 等是三七合剂干预 HIRI 的关键靶标。HIRI 靶点蛋白与该合剂化合物有着直接或间接作用的关系。目前关于 HIRI 的机制研究有很多，主要包括炎性因子释放、补体激活、氧化应激、及细胞凋亡等<sup>[18-21]</sup>。在 HIRI 早期以 Kupper 细胞激活为特征，晚期以中性粒细胞浸润为特征。Kupper 细胞是肝血窦内的巨噬细胞，在 HIRI 早期被激活并

发病机制之一<sup>[24-25]</sup>；ADORA3、ADORA1 是 4 种腺苷受体 (A1、A2a、A2b 和 A3) 中的 2 种。熊红燕等<sup>[27]</sup>报道，ADORA3 可通过激活 PI3K 对心肌细胞在缺血再灌注损伤中起到保护作用。韩晶等<sup>[28]</sup>报道，ADORA1 与腺苷的亲合力最强，在机体各个系统都存在，尤其在炎症反应中，能发挥镇痛与抗炎作用；PTGS2，是产生前列腺 E2 (PGE2) 的关键步骤，而 PGE2 在多种生理反应中起重要作用。正常生理状态下不表达或表达极低，但在炎症因子等诱导情况下表达量急剧增加<sup>[29]</sup>；PKCε 是蛋白激酶 C (PKC) 的一种亚型，Zhu 等<sup>[30]</sup>报道，从高铁线莲中分离得到的一种新黄酮类苷 (APG) 通过预处

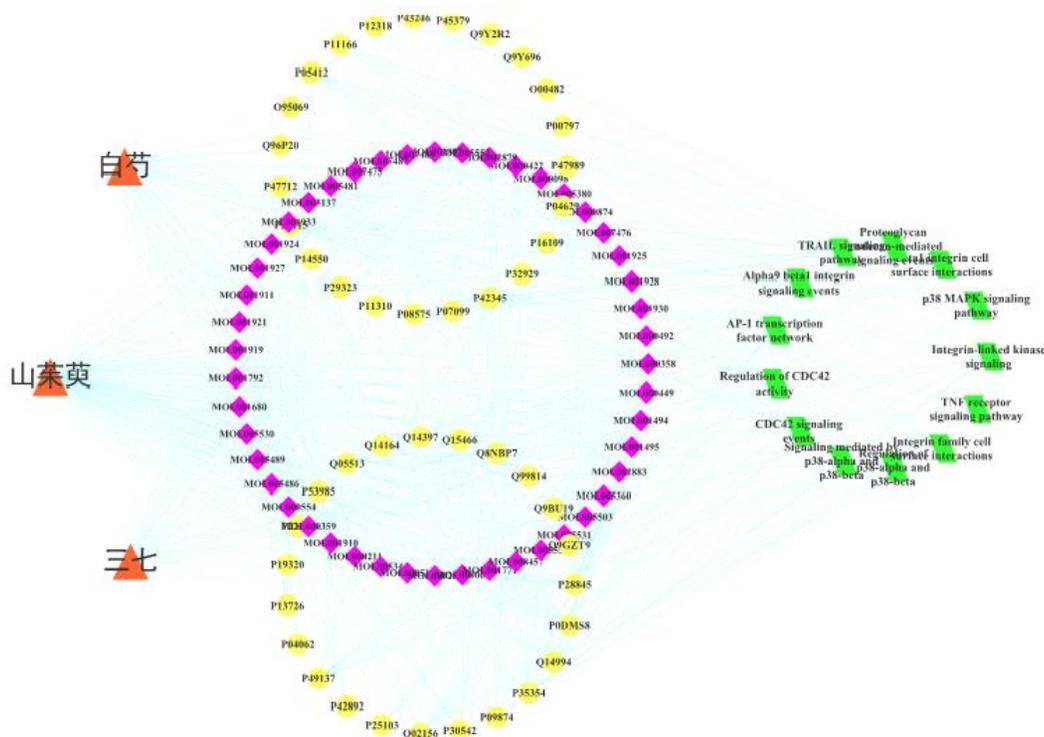


图 10 成分-HIRI 靶点-生物学通路网络图

Fig. 10 Component-HIRI target-biological pathway network

理小鼠可以诱导 PKCε 激活,降低线粒体氧化应激,促进 Nrf2/ho-1 介导的抗凋亡信号通路,从而起到对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。诸多文献报道为我们后续验证这些与 HIRI 相关的靶点提供了理论参考。同时应用 STRING 数据库分析得知 46 个交集靶标可分为 3 类,说明每一类靶蛋白间有紧密的相关性,也为进一步阐述干预 HIRI 的机制提供了帮助。从本研究已筛选得到的活性成分中经查阅文献得知,除齐墩果酸(预处理通过抑制缺血再灌注过程中 IKK/I-κB/NF-κB 信号转导通路的激活,抑制 NF-κB 活化进入核内而发挥介导反应的作用,因此减轻 HIRI 的损伤<sup>[31]</sup>)外,其它化合物如熊果酸、槲皮素、芍药苷、人参皂苷 F<sub>2</sub>、马钱子苷等均未见干扰 HIRI 的报道。因而,后续继续探讨这些化合物对 HIRI 的作用机制就更有意义了。

此外,运用 FunRich 软件分析得到的交集靶标的生物学过程及通路也同样为后续验证干预 HIRI 的核心靶标提供了参考。如 TNF 受体信号通路、p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路、TRAIL 信号通路等;蛋白质代谢作用、信号传导、炎症反应等。后续实验验证的靶蛋白也要参考参与这些生物学过程和通路的靶蛋白介导的信号事件、IFN-γ 通路、VEGF 与 VEGFR 信号事件及 TNF-受体信号通路。

本研究通过网络药理学分析平台,挖掘了三七合剂干扰 HIRI 的活性成分及对应靶标,并运用相关数据库及软件分析了成分与疾病交集靶标的生物学过程及生物学通路。挖掘得到的靶标经文献查阅简单阐述了其生物学功效及机制等,这些数据对本研究后续运用分子生物学验证三七合剂干预 HIRI 机制的真正核心靶蛋白、采用分子对接技术找到受体吻合的配体化合物及对应生物学通路中的靶基因研究等研究提供了很好的借鉴作用。

参考文献

- [1] 甘信利, 胡志高, 何松青. 肝脏缺血再关注损伤的机制研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(11): 2906-2907.
- [2] 陈鑫培, 苏松, 周鹏程, 等. MiR-494 通过激活 PI3/AKT 通路减轻大鼠肝缺血-再关注损伤 [J]. 器官移植, 2019, 10(3): 295-301.
- [3] 李伟男, 彭慈军, 舒德军, 等. 肝脏缺血再关注损伤的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(22): 3554-3559.
- [4] 陈文乐, 范华林, 赵莉, 等. 山茱萸提取物对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及对 SIRT1-p53 通路的影响 [J]. 中南药学, 2019, 17(5): 651-655.
- [5] Zhang Y Q, Ding N, Zeng Y F, et al. New progress in roles of nitric oxide uring hepatic ischemia reperfusion

- injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(14): 2505-2510.
- [6] Niu B, Zhang H, Li C, *et al.* Network pharmacology study on the active components of *Pterocypsela elata* and the on the mechanism of their effect against cerebral ischemia [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2009-3019.
- [7] 周 伟, 刘志刚. 三七皂苷 R<sub>1</sub> 预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及相关机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(20): 2589-2592.
- [8] 杨武韬. 三七化学成分分离及药理作用研究探讨 [J]. 航空航天医学杂志, 2019, 30(5): 586-592.
- [9] 王海桃, 朱 娜, 李海僊, 等. 人参三七茶抗疲劳及免疫调节作用研究 [J]. 西北药学杂志, 2018, 33(2): 203-206.
- [10] 袁 萍, 沈玉芹, 王乐民. 针药结合对急性心肌梗死(气虚血瘀证) 患者免疫功能调节的临床研究 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(11): 1927-1929.
- [11] 田会东, 郭丽娜, 王单单, 等. 三七主要活性成分作用机制的网络药理学研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(1): 72-77.
- [12] 马凤岐. 补益佳品山茱萸 [J]. 养生月刊, 2019(8): 684-686.
- [13] 南美卷, 唐 凯, 崔银萍, 等. 山茱萸果核的研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报, 2018, 41(5): 149-151.
- [14] 赵晨翔, 张雅敏, 刘宏胜, 等. 山茱萸总苷对小鼠免疫性肝损伤治疗作用的初步研究 [J]. 天津中医药, 2017, 34(2): 120-124.
- [15] 周迎春, 张廉洁, 张燕丽. 山茱萸化学成分及药理作用研究新进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 114-120.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [17] 刘 芬. 白芍总苷对急性化学性肝损伤小鼠的保护作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 100-102.
- [18] Lee H, Ko E H, Lai M, *et al.* Delineating the relationship among the formation of reactive oxygen species, cell membrane instability and innate autoimmunity in intestinal reperfusion injury [J]. *Mol Immunol*, 2014, 58(2): 151-159.
- [19] Yang J, Sun H, Guan R, *et al.* Hepatocellular protein profiles after hepatic ischemia/reperfusion injury with or without octreotide preconditioning in a rabbit mode [J]. *Transplant Proc*, 2014, 46(10): 3282-3288.
- [20] Selzner M, Selzner N, Chen L, *et al.* Exaggerated up-regulation of tumor necrosis factor alpha-dependent apoptosis in the older mouse liver following reperfusion injury: Targeting liver protective strategies to patient age [J]. *Liver Transpl*, 2009, 15(11): 1594-1604.
- [21] Patel R P, Lang J D, Smit A B, *et al.* Rrdox therapeutics in hepatic ischemia reperfusion injury [J]. *World J Hepatol*, 2014, 6(1): 1-8.
- [22] Rentsch M, Post S, Palma P, *et al.* Anti-ICAM-1 blockade reduces postsinusoidal WBC adherence following cold ischemia and reperfusion, but does not improve early graft function in rat liver transplantation [J]. *Hepatol*, 2000, 32: 821-828.
- [23] Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284: G15-G16.
- [24] 王 婉, 杨金菊, 刘 莉, 等. 抗 11 $\beta$  羟类固醇脱氢酶 1 的单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(1): 39-40.
- [25] 郝先才, 冯 博, 邵长伟, 等. 半滑舌鳎 hsd11b11 和 hsd11b2 基因的克隆及其温度相应的表达规律 [J]. 渔业科学进展, 2020, 4: 1-11.
- [26] 赵 伟, 张秀娜, 周有丽, 等. 雄激素及其受体在肝细胞癌中的研究进展 [J]. 药学研究, 2015, 34(3): 168-171.
- [27] 熊红燕, 杨金保, 周亚军, 等. 腺苷受体 A<sub>3</sub> 激动剂抗心肌缺血再灌注损伤保护效果和机制研究 [J]. 中国体外循环杂志, 2016, 14(3): 172-176.
- [28] 韩 晶, 王 健, 于晓华, 等. 电针对佐剂性关节炎大鼠下丘脑和脊髓 A<sub>1</sub> 表达的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(1): 71-75.
- [29] 李明杰, 孙芮芮, 李慧峰, 等. 益母草治疗寒凝血瘀型痛经的网络药理学作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4251-4258.
- [30] Zhu Y R, Di S Y, Hu W, *et al.* A new flavonoid glycoside (APG) isolated from *Clematis tangutica* attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via activating PKC $\epsilon$  signaling [J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 2016, 1863(3): 701-711.
- [31] 何明枫, 华福州, 张 杰, 等. 齐墩果酸预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤过程中 IKK/I- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 通路的影响 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(5): 697-700.