

基于网络药理学及实验验证探究清热利胆汤治疗胆汁瘀积性肝损伤的作用机制

黄 彭^{1,2,3}, 曲佳琳^{1*}, 段文倩², 韦天夫^{1,2}, 张 洋², 蔡明宸⁴, 张雪扬^{5*}, 张桂信⁶, 冷爱晶^{2,4*}

1. 大连医科大学附属第一医院 中西医结合临床重点学科实验室, 辽宁 大连 116011

2. 大连医科大学中西医结合学院, 辽宁 大连 116044

3. 河南睢县人民医院 呼吸与危重症医学科, 河南 商丘 476900

4. 大连医科大学附属第一医院 中药科, 辽宁 大连 116011

5. 大连医科大学附属第一医院 内分泌与代谢病科, 辽宁 大连 116011

6. 大连医科大学附属第一医院 中西医结合普外科, 辽宁 大连 116011

摘要: **目的** 基于网络药理学及实验验证探究清热利胆汤治疗胆汁瘀积性肝损伤的作用机制。**方法** 采用网络药理学方法筛选清热利胆汤和胆汁瘀积性肝损伤相关的核心靶点, 构建基于活性成分与疾病共同靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 利用 DAVID 数据库对潜在作用靶点进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 通过分子对接方法验证活性成分与关键靶点的结合作用。采用胆管结扎方法建立胆汁瘀积性肝损伤大鼠模型, 给予思美泰及清热利胆汤进行干预, 考察各组大鼠血清中天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性以及总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL) 和总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 水平; 考察各组大鼠肝组织病理变化; 考察各组大鼠肝组织蛋白激酶 C α (protein kinase C α , PRKCA)、原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (protooncogene serine/threonine-protein kinase 1, RAF1)、双特异性丝裂原活化蛋白激酶 1 (dual specificity mitogen-activated protein kinase 1, MAP2K1) 和丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1) mRNA 表达情况。**结果** 网络药理学分析显示, 清热利胆汤可能通过作用于 PRKCA、RAF1、MAP2K1 和 MAPK1 靶点, 参与 MAPK 信号通路, 从而治疗胆汁瘀积性肝损伤; 原花青素 B₂ 与 MAP2K1、槲皮素与 MAPK1 具有较好的结合能力。与模型组比较, 清热利胆汤组大鼠血清中 ALT 活性和 TBA 水平显著降低 ($P < 0.05$), 肝组织病理损伤得到改善; 肝脏组织中 PRKCA、MAP2K1 和 MAPK1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), RAF1 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。**结论** 清热利胆汤能够通过调控 PRKCA、RAF1、MAP2K1 和 MAPK1, 从而治疗胆汁瘀积性肝损伤。

关键词: 清热利胆汤; 胆汁瘀积性肝损伤; 网络药理学; 原花青素 B₂; 槲皮素; PRKCA; RAF1; MAP2K1; MAPK1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)15-4577-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.016

Mechanism of Qingre Lidan Decoction on cholestatic liver injury based on network pharmacology and experimental validation

HUANG Peng^{1,2,3}, QU Jia-lin¹, DUAN Wen-qian², WEI Tian-fu^{1,2}, ZHANG Yang², CAI Ming-chen⁴, ZHANG Xue-yang⁵, ZHANG Gui-xin⁶, LENG Ai-jing²

1. Clinical Laboratory of Integrative Medicine, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China

2. Institute of Integrative Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

3. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Suixian People's Hospital of Henan Province, Shangqiu 476900, China

收稿日期: 2021-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703675); 辽宁省自然科学基金指导计划项目 (2019-ZD-0914, 2019-ZD-0631); 辽宁省教育厅科学研究经费项目自然科学类 (LZ2020015)

作者简介: 黄 彭 (1991—), 硕士研究生, 研究方向为中西医结合治疗内科疾病。E-mail: huang_peng68@126.com

***通信作者:** 曲佳琳, 女, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药药效及药动学研究。E-mail: jialin_qu@126.com

冷爱晶, 女, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量控制研究。E-mail: ajl670823@163.com

4. Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China

5. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China

6. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Qingre Lidan Decoction (清热利胆汤) on cholestatic liver injury based on network pharmacology and experimental verification. **Methods** Core targets related to Qingre Lidan Decoction and cholestatic liver injury were screened, and protein-protein interaction (PPI) network based on common target of active ingredients and disease was constructed by network pharmacology. DAVID database was used to perform Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on potential targets, molecular docking methods was used to verify the binding effect of active ingredients with key targets. Bile duct ligation was used to establish a rat model of cholestatic liver injury, Simeite and Qingre Lidan Decoction were administered to intervene, levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL) and total bile acid (TBA) in serum of rats in each group were investigated; Pathological changes of liver tissues of rats in each group were investigated; mRNA expressions of protein kinase C α (PRKCA), protooncogene serine/threonine-protein kinase 1 (RAF1), dual specificity mitogen-activated protein kinase 1 (MAP2K1) and mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1) in liver of rats were investigated. **Results** Network pharmacological analysis showed that Qingre Lidan Decoction participated in MAPK signaling pathway by acting on the targets of PRKCA, RAF1, MAP2K1 and MAPK1, thereby treating cholestatic liver injury; Procyanidin B2 and MAP2K1, quercetin and MAPK1 had a good binding ability. Compared with model group, levels of ALT and TBA in serum of rats in Qingre Lidan Decoction group were significantly reduced ($P < 0.05$), and pathological damage in liver tissue was improved; Expressions of PRKCA, MAP2K1 and MAPK1 mRNA in liver tissue were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), RAF1 mRNA expression was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Qingre Lidan Decoction can treat cholestatic liver injury by regulating PRKCA, RAF1, MAP2K1 and MAPK1.

Key words: Qingre Lidan Decoction; cholestatic liver injury; network pharmacology; procyanidin B2; quercetin; PRKCA; RAF1; MAP2K1; MAPK1

胆汁淤积性肝损伤是由胆汁分泌和排泄受阻引起的病理过程,可能与肝内外胆管病变有关。正常情况下,胆汁排入肠道;当胆汁排泄受阻时,引起吸收不良、营养不良和骨骼改变^[1],淤积的胆汁会导致肝细胞损伤,长期的胆汁淤积引起肝纤维化甚至肝硬化^[2]。胆汁淤积分为肝内胆管淤积和肝外胆管淤积。目前,肝外胆汁淤积症需要尽早行内镜或手术治疗。研究表明,胆内胆管淤积与胆汁酸代谢途径中的钠-牛磺胆酸共转运蛋白(sodium-taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)、胆汁酸盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)、多药耐药蛋白2(multidrug resistance associated protein 2, MRP2)、MRP3等转运蛋白密切相关^[3]。

清热利胆汤为大连医科大学附属第一医院协定处方,由金钱草、黄芩、枳壳、木香、栀子、大黄组成,具有清热、利湿、退黄的功效,广泛用于治疗胆囊炎、胆石症等疾病,临床疗效较好^[4]。目前,清热利胆汤治疗胆汁淤积性肝损伤的作用机制尚未见报道,本研究采用网络药理学^[5-6]方法系统分析清热利胆汤治疗胆汁淤积性肝损伤的作用机制,并通过体内实验进行验证。

1 材料和方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 胆汁淤积性肝损伤候选靶点的确定 以“胆汁淤积性肝损伤”为关键词,在 Gene Cards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 NCBI 基因数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)进行检索,获得胆汁淤积性肝损伤相关靶点。

1.1.2 化合物筛选和靶点预测 本课题组前期采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UHPLC-QTOF-MS)法,初步鉴定了清热利胆汤中72种成分^[7],依据“类药五原则”进行筛选:相对分子质量 ≤ 500 、油水分配系数 ≤ 5 、氢键供体数 ≤ 5 、氢键受体数 ≤ 10 。此外,黄芩苷、汉黄芩苷、芦丁等成分虽然在类药五原则之外,但经文献报道具有较好的生物活性,合并此类化合物。从中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <https://lsp.nwu.edu.cn/>)和 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)收集各活性成分对应的靶点。

1.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interactions, PPI)分析 采用 Cytoscape 3.2.1 软件将成分靶点映射到疾病靶点,取交集靶点作为潜在

作用靶点;采用 STRING 在线数据库对作用靶点进行分析,采用 Cytoscape 3.2.1 软件构建 PPI 网络。

1.1.4 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 利用 DAVID 在线分析工具对潜在作用靶点进行 KEGG 通路富集分析^[8],采用 Cytoscape 3.2.1 软件构建“成分-靶点-通路-疾病”网络,并利用 Network Analyzer 插件对其拓扑特性进行分析,确定关键成分和靶点。

1.1.5 分子对接 利用 SYBYL-X2.0 软件对潜在作用靶点和活性成分进行分子对接。从 RCSB 蛋白质数据库 (<http://www.pdb.org/>) 下载候选蛋白的晶体结构,从 PubChem 数据库获得活性成分的二维结构文件,通过去水、加氢、转换格式,得到活性成分和靶点的结合分数,对接得分 ≥ 5 表明活性成分与靶蛋白具有较好的结合作用。

1.2 实验验证

1.2.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 28 只,8 周龄,体质量 280 g,购自大连医科大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK (辽) 2018-0003。动物饲养于大连医科大学第一附属医院中心实验室,温度 (22 ± 1) °C、湿度 (65 ± 5) %、光暗循环 12 h,自由进食饮水。动物实验经大连医科大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 AE18015)。

1.2.2 药材 金钱草 (批号 170301)、黄芩 (批号 170505)、枳壳 (批号 170305)、木香 (批号 170503)、栀子 (批号 170305)、大黄 (批号 160702) 由大连医科大学第一附属医院提供,经大连医科大学第一附属医院中药局冷爱晶教授鉴定分别为报春花科植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的干燥全草、唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实、菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根、茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实、药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎。

1.2.3 药品与试剂 RNA 提取试剂盒 (批号 AJ12064A)、逆转录试剂盒 (批号 AJ10742A)、SYBR Green 染料试剂盒 (批号 AJE1687A) 购自日本 Takara 公司;注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸 (思美泰,批号 16186TB23) 购自上海雅培制药有限公司;蛋白激酶 C α (protein kinase C α , PRKCA)、原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (protooncogene serine/

threonine-protein kinase 1, RAF1)、双特异性丝裂原活化蛋白激酶 1 (dual specificity mitogen-activated protein kinase 1, MAP2K1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物由大连宝生物工程技术有限公司设计并合成。

1.2.4 仪器 7180 型全自动生化分析仪 (日本日立公司);PCR 反转录仪 (美国 Bio-Rad 公司);ABI 7500 型 qRT-PCR 仪 (美国 Applied Biosystem 公司);显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2.5 清热利胆汤的制备 称取金钱草 30 g、黄芩 15 g、木香 15 g、枳实 15 g、栀子 15 g、大黄 10 g,将除大黄外的药材于 10 倍量的水中浸泡 1 h,加热回流 1 h,经 6 层吸水纱布滤过;向残留物中加入 8 倍量的水,煮沸 30 min;加入大黄,再煮沸 30 min,经 6 层吸水纱布滤过;合并 2 次滤液,真空浓缩至 100 mL (以生药量计,相当于 1 g/mL),本课题组前期采用 UHPLC 法对清热利胆汤进行了分析^[7],通过直接与对照品的保留时间和质谱相比较,鉴定了没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、儿茶素和原酸等 23 个化合物;对于没有对照品的化合物,相对分子质量误差在 1×10^{-5} 以内的化合物,参考同位素丰度和文献中的裂解模式,根据 $[M-H]^-$ 、 $[M+HCOO]^-$ 、 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 等准分子离子峰确定分子式。

1.2.6 造模、分组与给药 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、思美泰 (50 mg/kg) 组和清热利胆汤 (8 g/kg, 相当于临床等效剂量) 组,每组 7 只。模型组和各给药组大鼠 ip 戊巴比妥 (50 mg/kg) 麻醉,分离胆总管,用 4.0 丝线在近端和远端结扎胆总管,建立胆汁淤积性肝损伤模型^[9],术后 im 酮洛芬 (3 mg/kg) 镇痛^[10];对照组大鼠只分离胆总管,不进行结扎。思美泰溶于纯水配制成质量浓度为 20 mg/mL 的溶液,术后 3 d,思美泰组 im 2 mL 药物,清热利胆汤组 ig 2 mL 药物,对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液,1 次/d,连续 2 周。

1.2.7 清热利胆汤对胆汁淤积性肝损伤大鼠血清中天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性以及总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL) 和总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 水平的影响 给药结束后,

各组大鼠 ip 戊巴比妥 (50 mg/kg) 麻醉, 腹主动脉取血, 采用全自动生化分析仪检测血清中 AST、ALT 活性以及 TBIL、DBIL 和 TBA 水平。

1.2.8 清热利胆汤对胆汁瘀积性肝损伤大鼠肝组织病理变化的影响 大鼠脱颈椎处死, 分离肝组织, 于 10% 福尔马林中固定, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切片 (厚 5 μ m), 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察肝组织病理变化。

1.2.9 清热利胆汤对胆汁瘀积性肝损伤大鼠肝组织 PRKCA、RAF1、MAP2K1、MAPK1 mRNA 表达的影响 按照试剂盒说明书提取各组大鼠肝组织中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: PRKCA 上游引物 5'-TCCAGGATGACGACGTGGAG-3', 下游引物 5'-CGTTGACGTATTCATGACGAAG-3'; RAF1 上游引物 5'-CATCATCCACAGAGACATGAAATCC-3', 下游引物 5'-TCAACCTGCTGAGAACCCTCC-3'; MAP2K1 上游引物 5'-AGCTAATTGACTCCATGGCCAAC-3', 下游引物 5'-TGGCATCCAAACAGCAGCTC-3'; MAPK1 上游引物 5'-ATGCTGTCAATTTGTCATGCTGTG-3', 下游引物 5'-CAGAACTGTCTGGAGTGCTCTGAA-3'; GAPDH 上游引物 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAG-AATG-3', 下游引物 5'-ATGGTGGTGAAGACGCC-AGTA-3'。

1.3 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行分析, 多组数据间的两两比较采用单因素方差分析和 LSD 方法, 两组间的比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 PPI 网络分析 利用 Gene Cards 和 NCBI 数据库共得到 686 个与胆汁瘀积性肝损伤相关的疾病靶点; 共筛选得到清热利胆汤中的 49 个活性成分, 见表 1。利用 Cytoscape 3.2.1 软件将成分靶点映射到疾病靶点, 获得 125 个交集靶点。以交集靶点作为网络节点, 采用 Cytoscape 3.2.1 软件构建 PPI 网络, 见图 1。PPI 网络包含 124 个节点、2249 个边, 节点大小代表度值的高低, 靶点的重要性与度值呈正相关, 清热利胆汤可能通过作用于胰岛素 (insulin, INS)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC- α serine/threonine-protein kinase, AKT1)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL6)、细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53, TP53)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、半胱氨酸蛋白酶 9 (Caspase 9, CASP9)、MAPK1、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 等靶点, 从而治疗胆汁瘀积性肝损伤。

表 1 清热利胆汤中活性成分的类型五原则信息

Table 1 Information of Lipinski rule related active compound in Qingre Lidan Decoction

活性成分	油水分配系数	相对分子质量	氢键受体数	氢键供体数	来源
(-)-epicatechin	1.37	290.27	6	5	枳实
(+)-catechin	1.37	290.27	6	5	枳实、大黄
4-hydroxybenzoic acid	1.37	138.12	3	2	黄芩、金钱草
acteoside	-0.45	624.59	15	9	黄芩
aloe-emodin	2.42	270.24	5	3	大黄
baicalein	2.68	270.24	5	3	栀子
baicalin	0.55	446.36	11	6	黄芩
caffeic acid	0.94	180.16	4	3	黄芩、金钱草
carthamidin	1.65	288.25	6	4	黄芩
chlorogenic acid	-0.45	354.31	9	6	栀子
chrysophanol	3.54	254.24	4	2	大黄
costunolide	2.89	232.32	2	0	木香
cryptochlorogenic acid	-0.67	354.31	9	6	栀子
dehydrocostuslactone	2.29	230.31	2	0	黄芩
emodin	3.01	270.24	5	3	木香
gallic acid	0.59	170.12	5	4	大黄、金钱草
gardenone	1.96	212.29	3	0	金钱草
gardenoside	-2.31	404.37	11	6	栀子
genipin	0.18	226.23	5	2	栀子
geniposide	-1.53	388.37	10	5	栀子
hesperetin	1.94	302.28	6	3	栀子
hesperidin	-0.55	610.57	15	8	枳实
jasminoside B	-1.37	346.38	8	5	栀子
jasminoside D	-0.57	346.38	8	5	栀子



Fig. 2 KEGG pathway enrichment analysis



Fig. 3 “Component-target-pathway-disease” network

由 168 个节点和 765 条边组成。网络拓扑学分析显示, 前列腺素 G/H 合成酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、磷脂酰肌醇 3-激酶 p110 γ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit γ isoform, PI3KCG)、AKT1、TNF、MAPK1、PRKCA 和 CASP3 等靶点具有较高的度值, PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路和 MAPK 信号通路等具有较高的度值, 表明清热利胆汤可能通过以上靶点及通路治疗胆汁瘀积性肝损伤。PRKCA 和 MAPK1 具有较高的度值, 参与了 MAPK 等信号通路; RAF1、MAP2K1 和 MAPK1 是 MAPK 信号通路的关键连接点, 将这些靶点映射到成分, 发现原花青素 B₂、槲皮素与 MAP2K1 和 MAPK1 关联, PRKCA 与毛蕊花糖苷、芦荟大黄素、栀子苷、京尼平苷、原花青素 B₂、原儿茶酸、槲皮素、山柰苷关联, RAF1 与柚皮苷、槲皮素关联。

2.1.3 分子对接结果分析 如图 4 所示, 原花青素 B₂ 和 MAP2K1 对接得分为 9.16, 槲皮素和 MAPK1

对接得分为 5.83, 具有较高的结合活性, 阳性对照药物思美泰与 PRKCA、MAP2K1、MAPK1、RAF1 的对接得分分别为 5.06、7.64、7.87、4.40; 部分成分与靶点的对接构象见图 5。

2.2 实验验证

2.2.1 清热利胆汤对胆汁瘀积性肝损伤大鼠血清中 AST、ALT 活性以及 TBIL、DBIL 和 TBA 水平的影响 如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 AST、ALT 活性以及 TBIL、DBIL 和 TBA 水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 清热利胆汤组大鼠血清中 ALT 活性和 TBA 水平明显降低 ($P < 0.05$), 思美泰组大鼠血清中 AST、ALT 活性以及 TBIL、DBIL 和 TBA 水平均明显降低 ($P < 0.05$)。

2.2.2 清热利胆汤对胆汁瘀积性肝损伤大鼠肝组织病理变化的影响 如图 7 所示, 对照组大鼠肝细胞及肝内胆管区结构正常; 模型组出现肝细胞坏死和炎性细胞浸润、胆管增生、静脉扩张、瘀血、肝

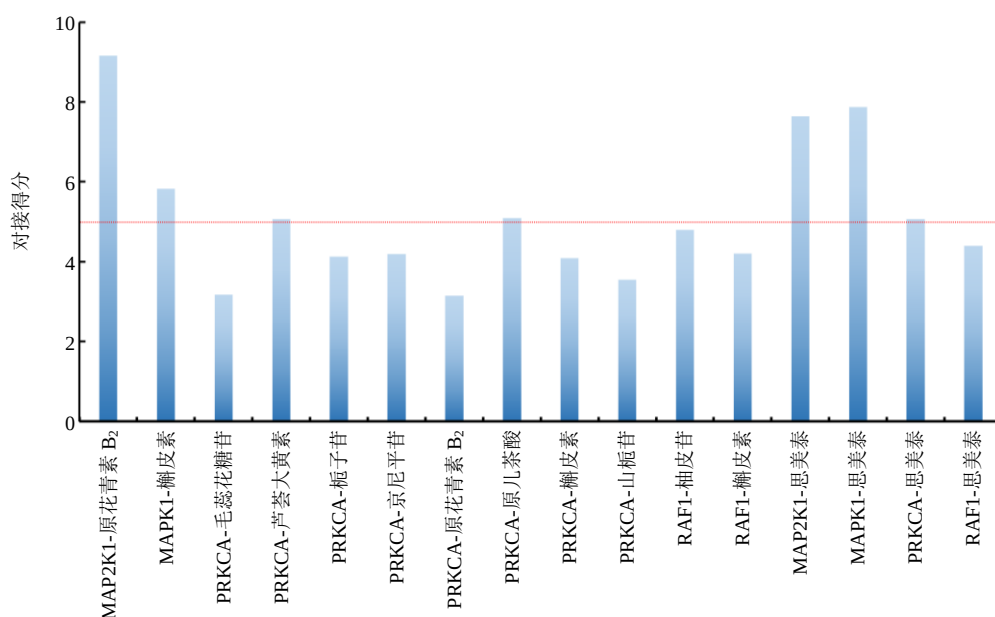


图 4 清热利胆汤中活性成分、思美泰与靶点的分子对接得分

Fig. 4 Docking total score of active compounds in Qingre Lidan Decoction, Simeite and targets

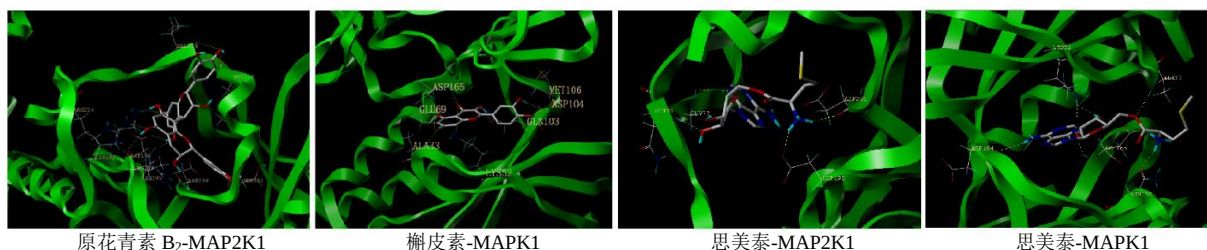


图 5 活性成分与靶点的对接构象

Fig. 5 Docking conformations of compounds and targets

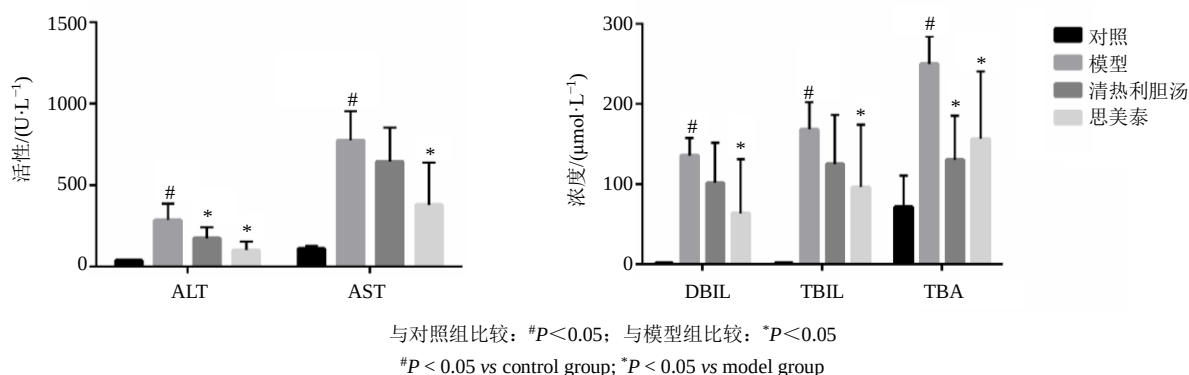
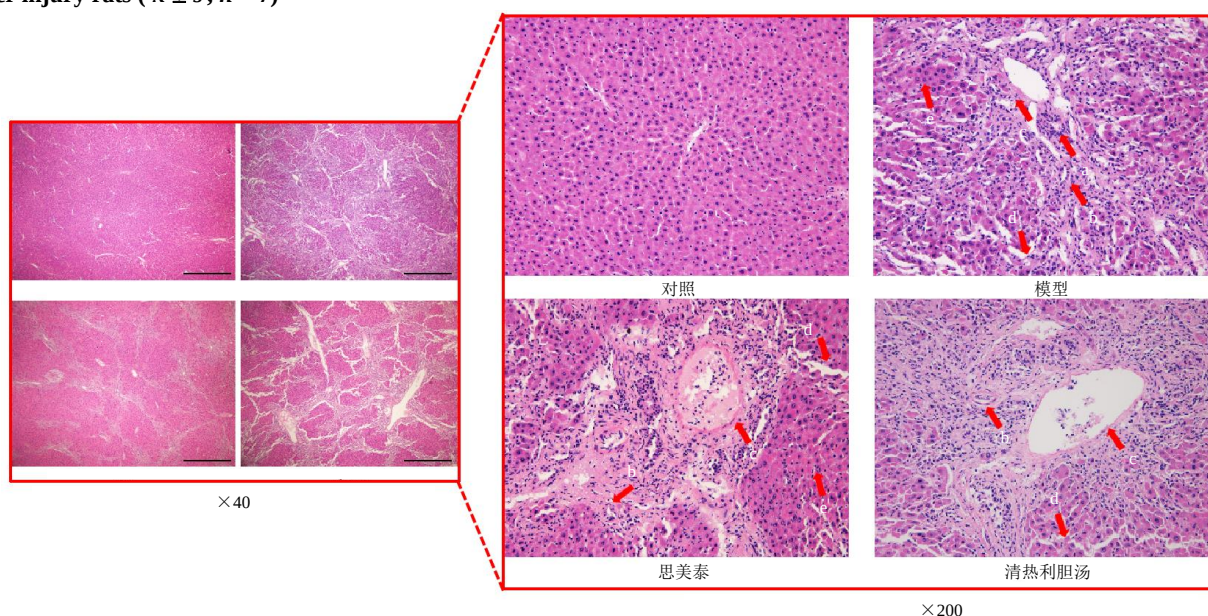


图 6 清热利胆汤对胆汁瘀积性肝损伤大鼠血清中 AST、ALT 活性以及 TBA、TBIL 和 DBIL 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Fig. 6 Effect of Qingre Lidan Decoction on activities of AST, ALT and levels of TBA, TBIL and DBIL in serum of cholestatic liver injury rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)



a-肝细胞坏死和炎性细胞浸润 b-胆管增生 c-静脉扩张、瘀血 d-肝窦扩张 e-肝细胞内脂肪空泡

a-partial hepatocytes necrosis and inflammatory cell infiltration b-hyperplastic choledochitis c-phlebotaxis and congestion d-hepatic sinusoid extension e-fat vacuoles within hepatocytes

图 7 清热利胆汤对胆汁瘀积性肝损伤大鼠肝组织病理变化的影响

Fig. 7 Effect of Qingre Lidan Decoction on pathological changes of liver tissue in cholestatic liver injury rats

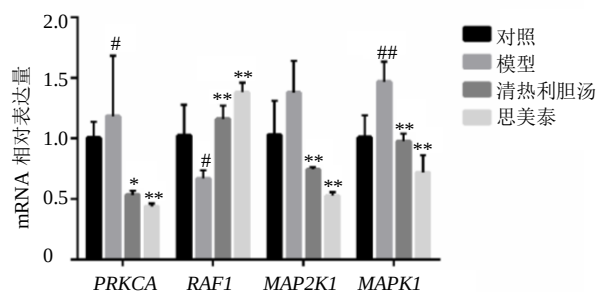
窦扩张、肝细胞内脂肪空泡以及明显的胆汁瘀积现象；各给药组肝组织损伤不同程度地改善，胆汁瘀积和炎性细胞浸润现象减轻，胆管区结构相对清晰。

2.2.3 清热利胆汤对胆汁瘀积性肝损伤大鼠肝组织 PRKCA、RAF1、MAP2K1 和 MAPK1 mRNA 表达的影响 如图 8 所示，与对照组比较，模型组大鼠肝组织中 PRKCA 和 MAPK1 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，RAF1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠肝组织中 PRKCA、MAP2K1 和 MAPK1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)，RAF1 mRNA 表达

水平显著升高 ($P < 0.01$)。

3 讨论

肝脏是人体重要的代谢器官，容易受多种因素影响。胆汁酸主要在肝脏合成和代谢，在肝细胞的基底膜和肝细胞膜上转运^[11]。肝内胆汁瘀积导致胆汁酸生成、吸收和流动障碍^[12]。肝脏中胆汁酸过度滞留，会导致肝纤维化、肝硬化甚至肝衰竭^[2]。中医认为胆汁瘀积症属于湿热范畴，应遵循清热、祛湿、解黄的治疗原则。清热利胆汤是根据上述病机，且临床有效的经典协定处方，已经广泛用于治疗肝胆系疾病。本研究基于前期化学成分表征，运用网



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 8 清热利胆汤对胆汁瘀积性肝损伤大鼠肝组织 *PRKCA*、*RAF1*、*MAP2K1*、*MAPK1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)
Fig. 8 Effect of Qingre Lidan Decoction on mRNA expressions of *PRKCA*, *RAF1*, *MAP2K1* and *MAPK1* in liver tissue of cholestatic liver injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

络药理学和分子生物学方法,探究清热利胆汤治疗胆汁瘀积性肝损伤的作用机制。

PPI 分析显示,清热利胆汤可能通过作用于 *INS*、*AKT1*、*IL6*、*TP53*、*TNF*、*VEGFA*、*CASP9*、*CXCL8*、*MMP9* 和 *MAPK1* 等靶点治疗胆汁瘀积性肝损伤。*PRKCA* 下游靶蛋白 *RAF1*、*MAP2K1* 和 *MAPK1* 是 *MAPK* 信号通路的关键连接点。*PRKCA* 通过调节 *RAF1*、*B* 淋巴细胞瘤 2 (*B-cell lymphoma*

2, *Bcl2*)、硫酸软骨素蛋白多糖 4 (*chondroitin sulfate proteoglycan 4*, *CSPG4*)、肌钙蛋白 T (*troponin T*, *TNNT2*) 或激活 *MAPK1* 信号级联,从而参与细胞增殖、凋亡、分化、迁移和黏附、肿瘤发生、心肌肥大、血管生成、血小板功能和炎症反应^[13]。研究表明,蛋白激酶 C (*protein kinase C*, *PKC*) 与胆汁瘀积症有关^[14-15];激活 *MAPK1* 会引起低渗细胞的肿胀反应,促进胆汁酸排泄^[16];调节 *MAP2K1* 为防止过量胆汁酸促癌作用的新靶点^[17]; *RAF1* 的激活会启动 *MAPK* 级联反应 (包括 *MAP2K1*、*MAPK1*)^[18]。

原花青素 *B₂* 是大黄中的黄酮类成分,槲皮素是黄芩、金钱草中的黄酮类成分,体内外均具有较好的肝保护活性^[19-20]。分子对接结果显示,原花青素 *B₂* 和 *MAP2K1*、槲皮素和 *MAPK1* 结合能力较好。体内实验结果显示,模型组大鼠肝组织中 *PRKCA*、*MAP2K1*、*MAPK1* mRNA 表达水平升高, *RAF1* mRNA 表达水平降低;各给药组大鼠肝组织中 *PRKCA*、*MAP2K1*、*MAPK1* mRNA 表达水平降低, *RAF1* mRNA 表达水平升高。

综上,本研究采用网络药理学方法和实验验证,发现清热利胆汤可能通过调节 *PRKCA*、*MAP2K1*、*MAPK1*、*RAF1* 等靶点,从而治疗胆汁瘀积性肝损伤 (图 9)。

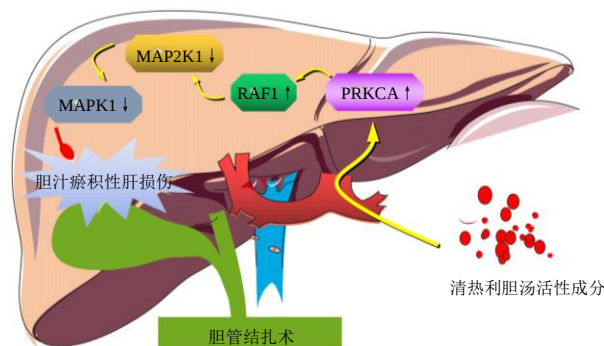


图 9 清热利胆汤治疗胆汁瘀积性肝损伤的作用机制

Fig. 9 Mechanism of Qingre Lidan Decoction in treatment of cholestasis liver injury

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hofmann A F. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease [J]. *Arch Intern Med*, 1999, 159(22): 2647.
- [2] Aigelsreiter A, Janig E, Sostaric J, et al. Clusterin expression in cholestasis, hepatocellular carcinoma and

liver fibrosis [J]. *Histopathology*, 2009, 54(5): 561-570.

- [3] Trauner M, Meier P J, Boyer J L. Molecular pathogenesis of cholestasis [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339(17): 1217-1227.
- [4] 王长建, 马秀明, 王竹风, 等. 自拟清热利胆汤治疗肝胆湿热型慢性胆囊炎临床观察 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(10): 183-186.
- [5] 李昊楠, 孔浩天, 史永平, 等. 基于网络药理学的双丹

- 方治疗冠心病的作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4985-4994.
- [6] 高耀, 吴丹, 田俊生, 等. 逍遥散和开心散“同病异治”抑郁症的网络药理学作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3483-3492.
- [7] Huang P, Ke H W, Qiu Y, *et al.* Systematically characterizing chemical profile and potential mechanisms of Qingre Lidan Decoction acting on cholelithiasis by integrating UHPLC-QTOF-MS and network target analysis [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2019, 2019: 2675287.
- [8] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [9] Tag C G, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, *et al.* Bile duct ligation in mice: Induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis [J]. *J Vis Exp*, 2015, 96: 52438.
- [10] Cooper D M, Hoffman W, Tomlinson K, *et al.* Refinement of the dosage and dosing schedule of ketoprofen for postoperative analgesia in Sprague-Dawley rats [J]. *Lab Animal*, 2008, 37(6): 271-275.
- [11] Quintero P, Arrese M. Regulation of bile acid metabolism: New insights from inside [J]. *Hepatology*, 2013, 58(5): 1850-1853.
- [12] Feldman A G, Sokol R J. Neonatal cholestasis: Emerging molecular diagnostics and potential novel therapeutics [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(6): 346-360.
- [13] St-Denis A, Chano F, Tremblay P, *et al.* Protein kinase C- α modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(49): 32787-32792.
- [14] Beuers U. Effects of bile acids on hepatocellular signaling and secretion [J]. *Yale J Biol Med*, 1997, 70(4): 341-346.
- [15] Beuers U, Throckmorton D, Anderson M, *et al.* Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes [J]. *Gastroenterology*, 1996, 110(5): 1553-1563.
- [16] Kurz A K, Graf D, Schmitt M, *et al.* Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38 (MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats [J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(2): 407-419.
- [17] Ibrahim Z S. Chenodeoxycholic acid increases the induction of CYP1A1 in HepG2 and H4IIE cells [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(5): 1976-1982.
- [18] Kawauchi K, Lazarus A H, Sanghera J S, *et al.* Regulation of BCR-and PKC/Ca(2⁺)-mediated activation of the Raf1/MEK/MAPK pathway by protein-tyrosine kinase and-tyrosine phosphatase activities [J]. *Mol Immunol*, 1996, 33(3): 287-296.
- [19] Feng J, Wang C F, Liu T, *et al.* Procyanidin B2 inhibits the activation of hepatic stellate cells and angiogenesis via the Hedgehog pathway during liver fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9): 6479-6493.
- [20] Yang H, Yang T, Heng C, *et al.* Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(12): 3140-3152.

[责任编辑 李亚楠]