

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.16.009

枳椇子抗肝纤维化作用网络药理学研究*

吾斯曼·艾海提,艾则孜江·艾尔肯[△]

(新疆医科大学第一附属医院药学部,新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要:目的 探讨枳椇子抗肝纤维化的作用机制。方法 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)获取枳椇子的活性成分,构建活性成分库。利用 GeneCards 和人类孟德尔遗传数据库(OMIM)获取肝纤维化的潜在靶点,利用 Venny 平台与枳椇子活性成分靶点取交集,通过 Cytoscape 软件构建成分-靶点网络,并根据节点度值筛选得到核心成分。将共有靶点导入 String 构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络,并根据节点度值筛选得到核心靶点;采用 R 语言软件进行基因本体论(GO)功能富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。结果 共获得活性成分 7 个,对应靶点 183 个,与肝纤维化共同靶点 166 个;枳椇子中槲皮素、山柰酚、柚皮素等 6 个成分为抗肝纤维化的核心成分;PPI 网络分析得到 AKT1, JUN, MAPK3 等 10 个核心靶点;GO 功能富集分析主要涉及金属离子应答、药物应答及化学刺激细胞应答等生物学过程,KEGG 通路富集分析主要涉及肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素 17(IL-17)及晚期糖基化终末产物及其受体等信号通路。结论 枳椇子可能通过槲皮素、山柰酚及柚皮素等多种成分,作用于 AKT1, JUN 及 MAPK3 等多个靶点,通过 TNF、IL-17 及 AGE-RAGE 等信号通路发挥抗肝纤维化作用。

关键词:枳椇子;肝纤维化;作用机制;网络药理学

中图分类号:R975+.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)16-0036-05

Effect of *Hovenia Dulcis* for Anti-Hepatic Fibrosis Based on Network Pharmacology

Wusiman AIHAITI, Aizezjiang AIERKEN

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830054)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of *Hovenia dulcis* for anti-hepatic fibrosis based on network pharmacology. **Methods** The active components of *Hovenia dulcis* were obtained through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the active component library was constructed. The potential targets of hepatic fibrosis were obtained through the GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). The intersection of liver fibrosis targets and the active component targets of *Hovenia dulcis* was obtained by the Venny platform. The component-target network was constructed by Cytoscape software, and the key components were screened according to node degree value. The common targets were imported into the String database to construct the protein-protein interaction (PPI) network, and the key target was screened according to the node degree value. Gene Ontology (GO) function enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were conducted through the R language software. **Results** Seven active components were obtained, with 183 corresponding targets and 166 common targets with hepatic fibrosis. Six components of *Hovenia dulcis* such as quercetin, kaempferol and naringenin were the key components for anti-hepatic fibrosis. PPI network analysis showed that 10 targets such as AKT1, JUN, MAPK3 were the key targets. GO function enrichment analysis mainly involved biological processes such as metal ion response, drug response and chemical stimulated cell response. KEGG pathway enrichment analysis mainly involved signal pathways such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin-17 (IL-17), advanced glycation end products and their receptors (AGE-RAGE). **Conclusion** *Hovenia dulcis* may play an anti-hepatic fibrosis role through acting on AKT1, JUN, MAPK3 and other targets by quercetin, kaempferol, naringin and other components, and acting on multiple signal pathways such as TNF, IL-17 and AGE-RAGE.

Key words: *Hovenia dulcis*; hepatic fibrosis; mechanism; network pharmacology

肝纤维化是因肝脏受到长期刺激时,细胞外基质分泌过多沉积导致,是慢性肝炎-肝纤维化-肝硬化发展过程中的重要中间环节^[1-2]。肝病在我国的发病率呈持续升高趋势,其中慢性肝炎进展为肝硬化的发生率为2%~10%^[3]。目前,有研究发现肝纤维化可逆,但临床尚无有效的治疗药物与方法^[4]。近年来,中医药在

抗肝纤维中显示出显著优势^[5]。枳椇子为鼠李科植物北枳椇 *Hovenia dulcis* Thunb. 的干燥成熟种子,始载于《新修本草》,具有止渴除烦、清热利尿之功效。现代药理学研究显示,枳椇子可改善模型大鼠肝纤维化程度^[6-7]。其能改善肝功能,下调基质金属蛋白酶抑制因子1 (TIMP-1)的表达,进而改善肝脏胶原的降解功能,逆

*基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金[2020D01C165]。

第一作者:吾斯曼·艾海提,男,维吾尔族,大学本科,主管药师,研究方向为天然药物化学,(电子信箱)honeykidd@163.com。

[△]通信作者:艾则孜江·艾尔肯,男,维吾尔族,在读博士研究生,药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)aizi1009@sina.com。

转肝纤维化^[8-9],但枳椇子抗肝纤维化的有效活性物质及作用机制尚待阐明。因此,本研究中基于网络药理学,通过预测分析枳椇子的活性成分及其治疗肝纤维化的靶点、信号通路,探讨其抗肝纤维化的作用机制,以为临床防治肝纤维化提供理论依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 活性成分及靶点获取

以枳椇子为关键词输入中医药系统药理学平台(TCMSP),设口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18,检索枳椇子的活性成分,并获取成分靶点,同时借助蛋白质数据库(Uniprot, <https://www.uniprot.org>)标准化处理成分靶点。

1.2 肝纤维化靶点获取

以“hepatic fibrosis”为关键词,分别输入GeneCards、人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org>)及疾病关联关系数据库(DisGeNET, <https://www.disgenet.org>),检索肝纤维化的靶点并合并,剔除重复靶点后即得肝纤维化潜在靶点。

1.3 抗肝纤维化靶点获取及成分-靶点网络构建

将得到的成分靶点及肝纤维化靶点输入Venny平台,取交集,即得枳椇子抗肝纤维化的潜在靶点。将枳椇子活性成分及枳椇子抗肝纤维化的潜在靶点一一对应导入Cytoscape 3.7.0软件中,构建成分-靶点网络,并借助软件分析工具对网络进行拓扑参数分析,节点的节点度(Degree)值越大,代表节点越重要,最后根据Degree值排序筛选靠前的成分为核心成分。

1.4 蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络构建

将枳椇子抗肝纤维化的潜在靶点导入String数据库中,设置物种为Homo sapiens,最小交互打分为0.7,隐藏离散的蛋白,得到PPI关系。将结果导入Cytoscape软件中构建PPI网络,并借助软件分析工具对网络进行拓扑参数分析,根据Degree值筛选靠前的靶点为核心靶点。

1.5 潜在靶点富集分析

利用R语言软件对枳椇子抗肝纤维化的潜在靶点进行基因本体论(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,其中GO富集分析包括生物学过程(BP)、细胞成分(CC)及分子功能(MF)3个部分。根据P值筛选靠前的结果进行绘图分析。

2 结果

2.1 活性成分及靶点

共得活性成分7个(见表1),靶点289个,剔除重复及无标准名靶点后得187个靶点。

2.2 肝纤维化潜在靶点

在GeneCards, OMIM及DisGeNET数据库分别检索

表1 枳椇子的活性成分

Tab. 1 Active components of *Hovenia dulcis*

Mol ID	Molecule Name	OB(%)	DL
MOL002140	perlolyrine	65.95	0.27
MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
MOL004328	naringenin	59.29	0.21
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
MOL008034	ceanothic acid	73.52	0.77
MOL000098	quercetin	46.43	0.28

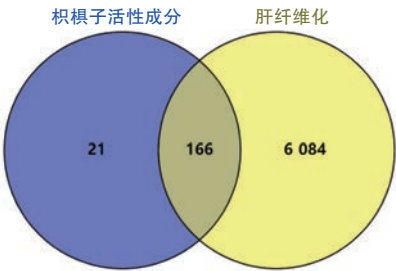


图1 活性成分-肝纤维化靶点维恩图

Fig. 1 Venn diagram of active component-hepatic fibrosis targets

得到6241, 28, 63个肝纤维化靶点,剔除重复靶点后与上述枳椇子活性成分及靶点取交集,得到枳椇子抗肝纤维化的靶点,详见图1。

2.3 活性成分-靶点网络

成分-靶点网络包含172个节点,258条边,详见图2,图中红色为枳椇子活性成分,绿色为其抗肝纤维化潜在靶点。表明山柰酚、柚皮素、槲皮素等6个黄酮类化合物为参与抗纤维化过程的核心成分,其在抗肝纤维化过程中起关键作用。

2.4 PPI网络

网络中包含152个节点,892条边,其中节点越大,蓝色越深,代表其Degree值越大,连线越粗代表蛋白间的相互作用越强,详见图3。根据Degree值得到AKT1, JUN及MAPK3等10个靶点为核心靶点,详见表2。

2.5 富集分析

GO功能富集分析结果涉及对金属离子的应答、对脂多糖的应答、药物应答、对细菌来源分子的应答、细胞对化学压力的反应等1877条BP通路(图4A);膜筏、膜微区、质膜筏、小窝及细胞器外膜等64个CC通路(图4B);核受体活性、配体激活的转录因子活性、DNA结合转录因子结合、RNA聚合酶II特异性DNA结合转录因子结合及G蛋白偶联受体活性等163条MF通路(图4C)。KEGG富集分析结果主要涉及肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素17(IL-17)及晚期糖基化终末产物及其受体(AGE-RAGE)等177条通路(图4D)。

3 讨论

肝纤维化为慢性疾病,长期刺激可使肝脏结构改

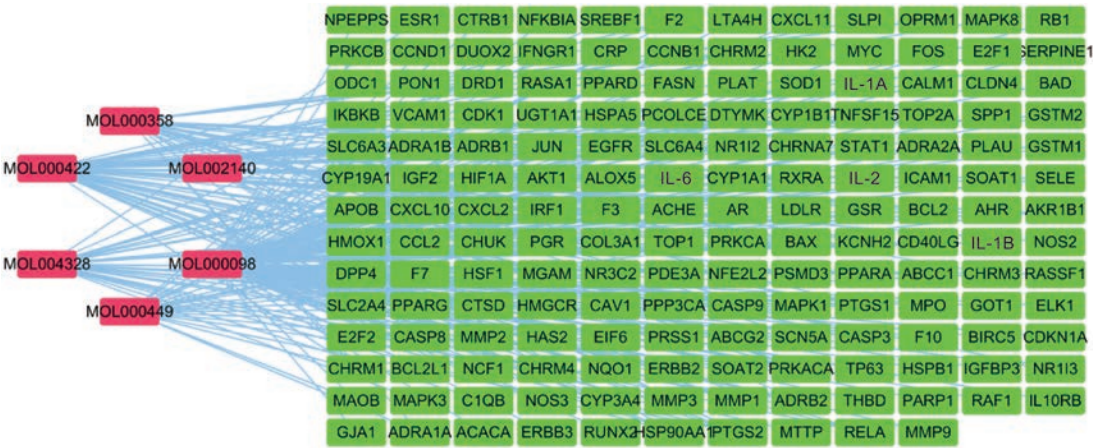


图 2 活性成分 - 靶点网络
Fig. 2 Active component - target network

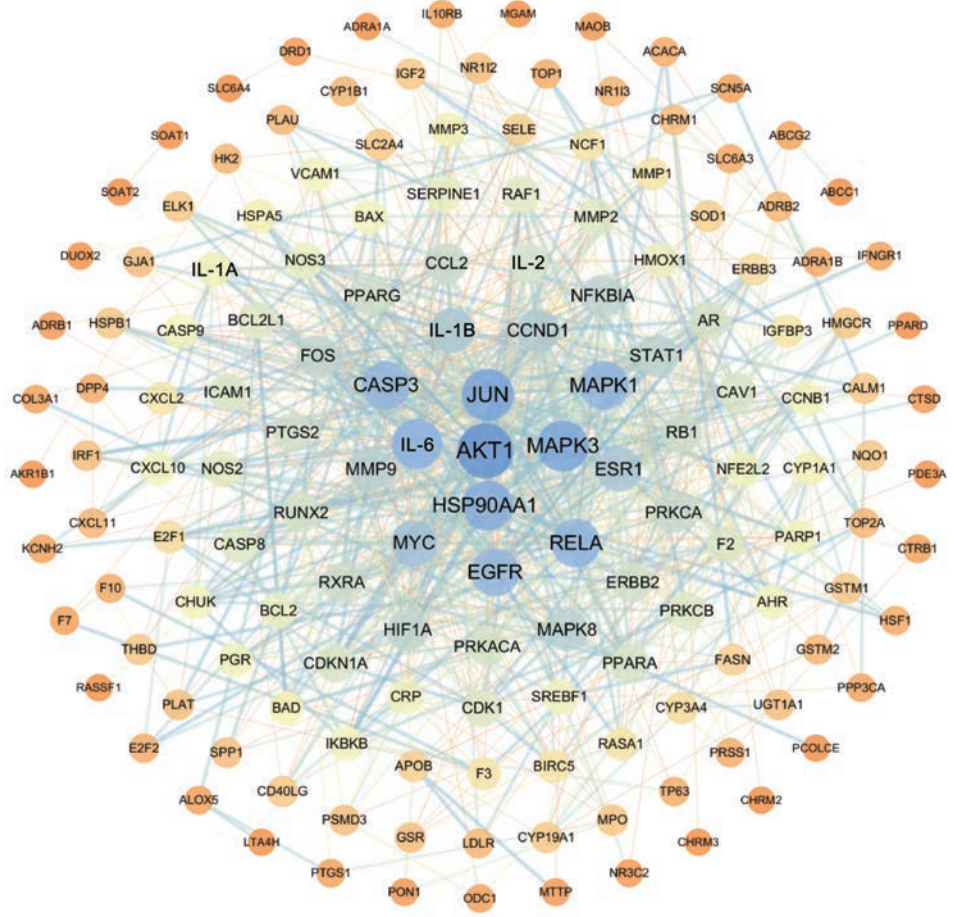
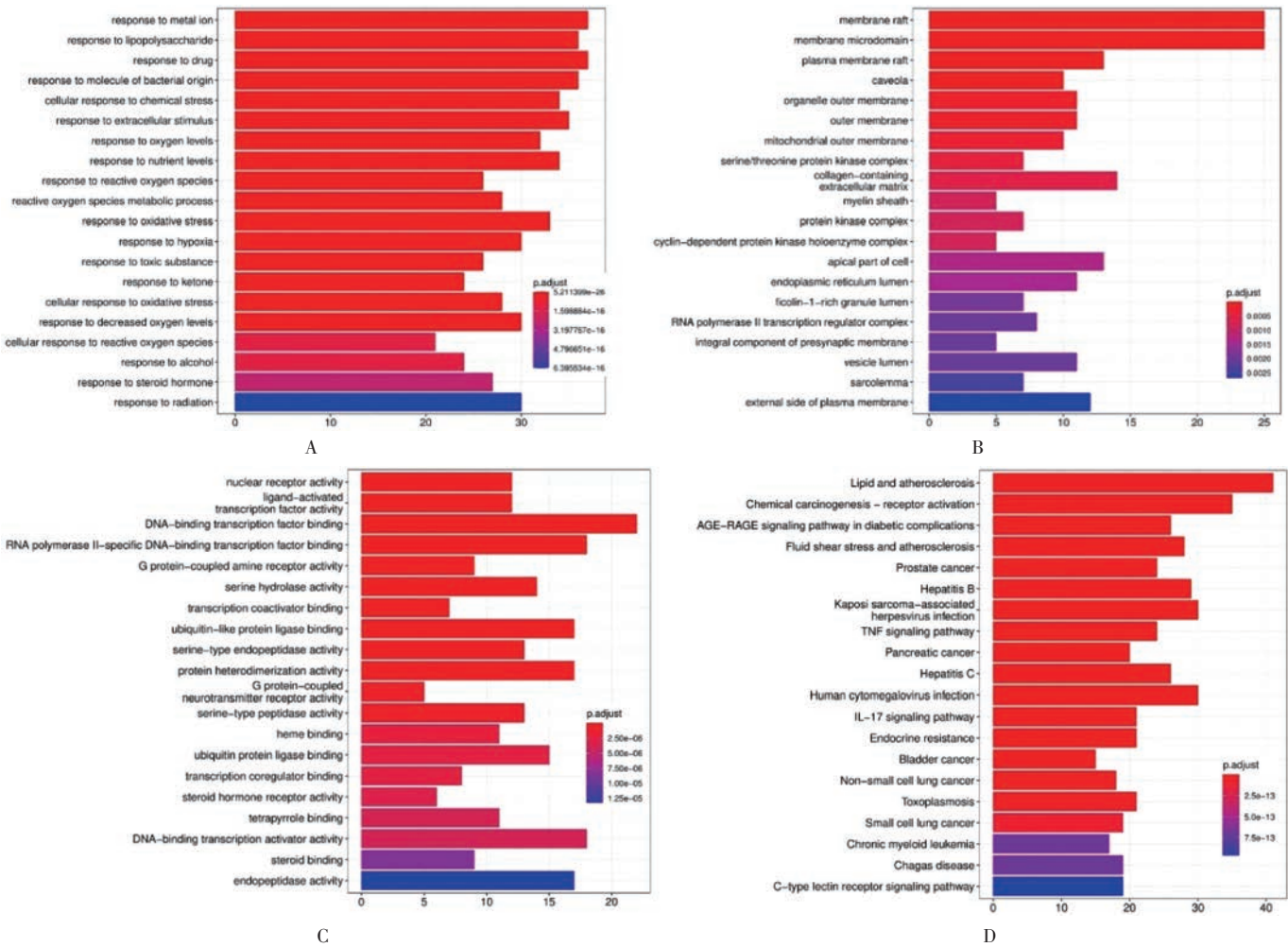


图 3 蛋白 - 蛋白互作网络图
Fig. 3 PPI network

表 2 核心靶点信息

Tab. 2 Information of key targets							
序号	靶点	Degree 值	蛋白名	序号	靶点	Degree 值	蛋白名
1	AKT1	51	RAC - α serine / threonine - protein kinase	6	RELA	38	Transcription factor p65
2	JUN	44	Transcription factor AP - 1	7	MAPK1	38	Mitogen - activated protein kinase 1
3	MAPK3	43	Mitogen - activated protein kinase 3	8	EGFR	37	Epidermal growth factor receptor
4	HSP90AA1	41	Heat shock protein HSP 90 - α	9	CASP3	37	Caspase - 3
5	IL - 6	40	Interleukin - 6	10	MYC	33	Myc proto - oncogene protein



A. 生物学过程 B. 细胞成分 C. 分子功能 D. KEGG 信号通路

图4 富集分析结果

A. Biological processes B. Cell composition C. Molecular function D. KEGG signaling pathway

Fig. 4 Results of the enrichment analysis

变甚至导致肝功能丧失,多种细胞因子及细胞外基质(ECM)在肝纤维的发生发展中至关重要^[10]。中医学中根据肝纤维化的病理特征,将其归属于“积聚”“胁痛”等范畴^[3]。枳椇子可促进肝星状细胞(HSC)凋亡,减少ECM的过量堆积,并减少转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)及TIMP-1的表达,进而阻滞肝纤维化的发展^[11]。本研究中通过网络药理学分析发现,枳椇子主要通过 β -谷甾醇、山柰酚、槲皮素及柚皮素等活性成分发挥疗效。 β -谷甾醇能下调活化HSC中胶原-1和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)mRNA的蛋白表达水平,防止胶原积累,从而治疗肝纤维化^[12]。山柰酚在体内外均能显著抑制胶原的合成和HSC的活化,显著降低肝组织坏死炎症的评分,抑制激活素受体样激酶5而减轻肝纤维化^[13];其通过降低丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的活性,减少羟脯氨酸(HYP)的含量及炎症因子水平,进而阻止肝纤维化进展,保护肝组织,这可能与山柰酚抑制 β -catenin的表达从而抑制

β -catenin/Wnt通路有关^[14-15]。柚皮素可通过阻断氧化应激、炎症反应以及TGF- β -Smad3和JNK-Smad3通路,灭活HSC和抑制促纤维化途径减轻肝纤维化^[16]。此外,柚皮素可通过抑制内质网应激和自噬改善四氯化碳(CCl_4)诱导的大鼠肝损伤^[17]。

GO及KEGG富集分析结果显示,枳椇子通过对金属离子、脂多糖、药物及细菌来源分子的反应等生物学过程,涉及AKT1、JUN及MAPK3等核心靶点,调控TNF、IL-17及AGE-RAGE等通路发挥抗肝纤维化作用。通过下调AKT1及p-AKT1的表达,能抑制PI3K/Akt信号通路的活化,进而促进HSC凋亡起保护肝纤维化作用^[18]。c-Jun是AP1激活蛋白(AP1)的一个组成部分,其可被PI3K/AKT信号通路激活,从而参与HSC的活化和肝纤维化^[19]。通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和Akt信号通路的磷酸化而抑制LPS诱导的炎症反应,进而保护大鼠免受肝轴异常引起的肝纤维化^[20]。此外,通过下调MAPK、P-MAPK、P38的蛋白表

达水平,抑制MAPK信号通路,可显著改善CCl₄诱导的纤维化^[21]。TNF为一种免疫细胞因子,参与机体免疫功能的调节。通过降低TNF- α 和IL-1 β 的表达水平,能抑制HSC增殖及活化,减少ECM的生成,增加其降解,进而改善肝纤维化^[22]。IL-17作为炎性细胞因子,在各种肝脏疾病中起重要作用,可调节HSC的活化和肝纤维化进展。3型细胞因子IL-17及IL-22可增强p38丝裂原激活蛋白激酶依赖的TGF- β 信号通路,进而参与肝纤维化^[23]。晚期糖基化终末产物(AGE)受体(RAGE)阻断抗体及可溶性RAGE,可抑制AGE-RAGE信号通路。RAGE可降低AGE诱导的HSC的自噬和活化,进而促进丙型肝炎相关肝纤维化的形成,提示阻断AGE-RAGE信号可缓解肝纤维化^[24]。本研究中网络药理学预测结果与目前相关研究结果一致,提示枳椇子通过AKT1, JUN, MAPK3调控TNF, IL-17, AGE-RAGE信号通路发挥抗肝纤维化作用。

综上所述,枳椇子抗肝纤维化是通过 β -谷甾醇、山柰酚、槲皮素及柚皮素等活性成分作用于AKT1, JUN及MAPK3等核心靶点,调控TNF, IL-17, AGE-RAGE信号通路参与抗肝纤维化进程中。

参考文献

- [1] 曹婷婷,车军勇,郭海燕,等. 紫七软肝颗粒对肝纤维化模型大鼠TGF- β /Smad信号通路的影响[J]. 中药材,2021,44(3):694-698.
- [2] DHAR D, BAGLIERI J, KISSELEVA T, et al. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245(2): 96-108.
- [3] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(7): 494-504.
- [4] 徐诗雨,郭惠婕,刘 揭,等. 肝纤维化治疗靶标研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(10): 1930-1934.
- [5] 丁茂鹏,韦凌霄,王志旺,等. 鳖甲育肝颗粒对复合因素所致肝纤维化大鼠TGF- β_1 /Smads通路的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(5): 463-467.
- [6] 耿文学,丁宏翼,易云苏. 枳椇子提取物对实验性大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 中药材, 2008, 31(10): 1550-1552.
- [7] 王文香,田菊霞,关媛媛,等. 枳椇子对大鼠酒精性肝损害的影响[J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(5): 370-371.
- [8] 施 震,张 洪,尹银嘉. 枳椇子提取物抗实验性肝纤维化[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(9): 22-24.
- [9] 刘秀玲,张 洪,王 飞. 枳椇子提取物对实验大鼠肝组织中TIMP-1与MMP-13表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13): 1097-1100.
- [10] 王 飞,张 洪,刘秀玲. 枳椇子醋酸乙酯提取物对肝纤维化大鼠血清学指标及TGF- β_1 的影响[J]. 中药材, 2006, 29(6): 577-580.
- [11] 叶丽萍. 枳椇子对大鼠肝纤维化预防及治疗作用的研究[D]. 武汉:武汉大学, 2005.
- [12] KIM KS, YANG HJ, LEE JY, et al. Effects of β -sitosterol derived from *Artemisia capillaris* on the activated human hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-induced mouse liver fibrosis[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 363.
- [13] XU T, HUANG S, HUANG Q, et al. Kaempferol attenuates liver fibrosis by inhibiting activin receptor-like kinase 5[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(9): 6403-6410.
- [14] 陈文龙,戴富臻,邵正勇,等. 槲皮素对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化抑制作用和肝保护作用[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(1): 46-50.
- [15] 许火龙,聂 磊,李春玉,等. 槲皮素抗纤维化机制的研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2021, 38(3): 70-73.
- [16] HERNÁNDEZ - AQUINO E, QUEZADA - RAMÍREZ MA, SILVA - OLIVARES A, et al. Naringenin attenuates the progression of liver fibrosis via inactivation of hepatic stellate cells and profibrogenic pathways[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 865: 172730.
- [17] USTUNER D, KOLAC UK, USTUNER MC, et al. Naringenin Ameliorate Carbon Tetrachloride - Induced Hepatic Damage Through Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Rats[J]. J Med Food, 2020, 23(11): 1192-1200.
- [18] 胡晓霞,王 艳,王晋星一. 汉丹肝乐对大鼠肝纤维化PI3K/Akt信号通路的影响及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(14): 1915-1920.
- [19] ZHU X, JIA X, CHENG F, et al. c-Jun acts downstream of PI3K/AKT signaling to mediate the effect of leptin on methionine adenosyltransferase 2B in hepatic stellate cells *in vitro* and *in vivo*[J]. J Pathol, 2020, 252(4): 423-432.
- [20] HAN C, WU X, ZOU N, et al. Cichorium pumilum Jacq Extract Inhibits LPS-Induced Inflammation via MAPK Signaling Pathway and Protects Rats From Hepatic Fibrosis Caused by Abnormalities in the Gut-Liver Axis[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 683613.
- [21] 孙雪梅,黄秀昆,朱勋帅,等. 基于MAPK信号通路研究4-羟基苯并噻唑-2-酮抗肝纤维化的作用机制[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(1): 25-28.
- [22] 曹庆生,李志超,韩立旺,等. 矮地茶黄酮对肝纤维化大鼠免疫细胞因子TNF- α /IL-1 β 水平的影响[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(7): 904-908.
- [23] FABRET, MOLINAMF, SOUCY G, et al. Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF- β -dependent liver fibrosis[J]. Sci Immunol, 2018, 3(28): eaar7754.
- [24] HE Y, ZHU J, HUANG Y, et al. Advanced glycation end product (AGE)-induced hepatic stellate cell activation via autophagy contributes to hepatitis C-related fibrosis[J]. Acta Diabetol, 2015, 52(5): 959-969.

(收稿日期:2021-09-23;修回日期:2021-12-26)