

基于网络药理学和分子对接研究“柴胡-丹参”药 对治疗慢性乙型肝炎的作用机制*

任思思¹, 范 妤^{1,2△}, 郭东艳², 李 倩¹, 陈 阳¹, 翟秉涛², 史晓燕¹, 段丽芳¹

(1. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046;

2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 运用网络药理学和分子对接的方法分析“柴胡-丹参”药对治疗慢性乙型肝炎的潜在作用机制。**方法** 借助 TCMSp、Drugbank、Uniprot 等数据库及参考文献获取中药柴胡-丹参的有效成分及靶标。通过 Genecards、Drugbank、OMIM 平台检索有关与慢性乙型肝炎疾病相关的靶标,并借助 Venny 数据库、String 数据库和 Cytoscape 平台构建有效成分-靶点相互作用网络图,运用 R 语言对其核心靶点进行功能和通路富集分析,预测“柴胡-丹参”药对治疗慢性乙型肝炎的潜在关键成分与作用靶标,进一步使用 Autodock 和 Pymol 软件对其有效成分与慢性乙型肝炎 HBcAg、HBeAg、HBsAg 进行分子对接,分析其治疗的作用机制及可行性。**结果** 获得“柴胡-丹参”药对治疗慢性乙型肝炎发挥作用的有效活性成分 73 个,疾病潜在靶点 985 个。对其“柴胡-丹参”药对治疗慢性乙型肝炎的共有化合物-靶点网络图可知,有槲皮素、木樨草素、山柰酚、丹参酮等 67 个有效活性成分,PTGS2、ADRB2、HSP90AA1、ESR1 等 88 个共有靶点。通过 GO 和 KEGG 分析可知,参与了细胞因子受体结合等生物过程及乙型肝炎等信号通路发挥其治疗作用。运用核心成分与靶蛋白对接可知,槲皮素、木樨草素与 HBcAg、HBeAg、HBsAg 具有较好的亲和力。**结论** 通过网络药理学和分子对接,充分体现了“柴胡-丹参”药对治疗慢性乙型肝炎“多成分-多靶点-多通路”复杂的作用特点,为进一步的实验和临床提供了理论依据和新的治疗方向。

关键词: 网络药理学;分子对接;柴胡;丹参;慢性乙型肝炎

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)01-0076-12

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.01.010

Study on the Mechanism of “Bupleurum- Salvia Miltiorrhiza” on Chronic Hepatitis B Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

REN Sisi¹, FAN Yu^{1,2}, GUO Dongyan², LI Qian¹, CHEN Yang¹,
ZHAI Bingtao², SHI Xiaoyan¹, DUAN Lifang¹

(1. The Basic Medical College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Shaanxi Province Key Laboratory of Basic and New Herbal Medicament Research, Xianyang 712046, China)

ABSTRACT: Objective The potential mechanism of “Bupleurum-Salvia miltiorrhiza” in the treatment of chronic hepatitis B was analyzed by means of network pharmacology and molecular docking. **Methods** The effective components and targets of “Bupleurum-Salvia miltiorrhiza” were obtained by using references and databases like TCMSp, Drugbank, Uniprot and so on. Genecards, Drugbank and OMim were used to search for targets related to chronic hepatitis B, and Venny database, String database and Cytoscape platform to build effective components - target interaction network. The function

收稿日期: 2021-01-18

* 基金项目: 陕西省科技厅项目(2021JM-472);陕西省中药基础与新药研究重点实验室开放基金(2017KF03);陕西中医药大学创新团队项目(2019-YL14);陕西省教育厅重点科研计划项目(重点实验室项目)(21JS007)

第一作者简介: 任思思(1996-),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合基础研究。

△通信作者: 范妤, E-mail: 806919125@qq.com

and pathway enrichment analysis of the core targets were carried out by R language to predict the potential key components and action targets of “Bupleurum-Salvia miltiorrhiza” in the treatment of chronic hepatitis B. Autodock and Pymol software were further used to conduct molecular docking between its active components and HBcAg, HBeAg and HBsAg in order to analyze the mechanism and feasibility of its treatment. **Results** We obtained 73 active components of “Bupleurum-Salvia miltiorrhiza” in the treatment of chronic hepatitis B. There were 985 potential targets of chronic hepatitis B. According to the network of common compounds and targets of “Bupleurum-Salvia miltiorrhiza” in the treatment of chronic hepatitis B, there were 67 effective active ingredients such as quercetin, luteolin, kaempferol and tanshinone, and 88 common targets such as PTGS2, ADRB2, HSP90A1 and ESR1. Through GO and KEGG analysis, it can be seen that it is involved in biological processes such as cytokine receptor binding, as well as signaling pathways such as hepatitis B, to play an important role in treatment. The docking of core components with target proteins showed that quercetin and luteolin had a good affinity with HBcAg, HBeAg and HBsAg. **Conclusion** Through network pharmacology and molecular docking, the complex action characteristics of “Bupleurum-Salvia miltiorrhiza” in the treatment of chronic hepatitis B were fully reflected, which provides theoretical basis and new therapeutic direction for further experiment and clinical practice.

KEY WORDS: network pharmacology; molecular docking; Bupleurum; Salvia miltiorrhiza; chronic hepatitis B

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是指检测乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)为阳性,具有潜伏期长、治愈率低、病情易恶化等特点的一类慢性传染性疾病,被我国法典列入乙类传染病的范畴^[1]。中国是世界上感染 HBV 病毒最多的国家,为了就关于防治肝炎的可持续发展目标采取了一系列的治疗措施,在过去 30 年里,我国取得了良好的进展,将在 2030 年前成为全球消除 CHB 的主要贡献者^[2]。但中国作为人口基数大的国家,国内感染 HBV 病毒的患者高达 7 000 万左右,中国在实现到 2030 年消除乙型肝炎的目标方面仍然面临挑战^[3]。目前西医对 CHB 以核苷酸类似物和干扰素两大类为主,但存在无法完全消除或灭活 cccDNA,造成疾病停药后易复发等缺点^[4]。

CHB 根据症状、体征,中医学属于“鼓胀”“黄疸”“肝热病”等肝脏疾病的范畴,并因本病具有广泛的传染性,亦归属“疫邪”的范畴。本病病位在肝,肝胆湿热兼气滞血瘀为本病常见证型,清热利湿、理气化瘀是主要治法^[5]。查阅大量文献,对治疗 CHB 的证型、用药频率、用药规律、归经等进行统计学分析^[6-7],其中柴胡、丹参两味药材在多种证型中为主治药物,选用频次较高,是 CHB 主治方剂的多用中药。现有研究表明,柴胡中的有效成分具有疏肝理气、解毒除湿、抗病毒、抗肝炎损伤等生物活性^[8]。丹参具有抗炎镇痛、活血化瘀、清心除烦、抗纤维化、抗心血管疾病等功效^[9]。尽管两药相配伍共奏清热利湿、疏肝理气、养血柔肝之效,但因其中药化学成分复杂,为阐明其治疗 CHB 的作用机制带来了一定困难。

网络药理学是运用网络数据库和相应软件及算

法,借助生物信息学、系统生物学等相关学科理论,对其进行系统性、整体性网络分析的一门新兴学科^[10]。本研究采用网络药理学和分子对接的方法,对柴胡-丹参药对治疗 CHB 数据中的药物及疾病成分、靶点进行多层次、多通路、多角度分析,构建相互靶点作用网络,并对其有效成分与慢性乙型肝炎 HBcAg、HBeAg、HBsAg 进行分子对接,深入探讨柴胡-丹参药对治疗 CHB 的潜在作用机制,为以后的实验研究和临床应用奠定了新的思路和理论依据,方案流程图如图 1 所示。

1 材料与方法

1.1 获取“柴胡-丹参”有效活性成分及靶点筛选 借助 TCMSp 数据库(<https://tcmspw.com/tcmsp.php>)和 CNKI(<https://www.cnki.net/>)获取中药的有效活性成分。在 TCMSp 的“Herbname”中分别以“柴胡”“丹参”为关键词进行检索,获取相对应的全部有效化学成分信息。设置条件为口服利用度(oral bioavailability, OB)≥30%,类药性(drug-like, DL)≥0.18,筛选满足口服利用度高且药物相似性较好的有效成分纳入研究。同时在 CNKI 中查阅文献和药典,将已有文献报道对治疗疾病的潜在化学成分纳入其中。

利用 TCMSp 数据库查询化合物的靶点,在 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)和 Drugbank 数据库(<http://www.drugbank.ca/>)中查找对应基因,设置物种为“Homo Sapiens”,且校正所有靶点基因名称,删除与标准不符的基因。

运用网络图像化软件 Cytoscape3.7.2(<http://www.cytoscape.org/>)将查询到的化合物成分及其作用

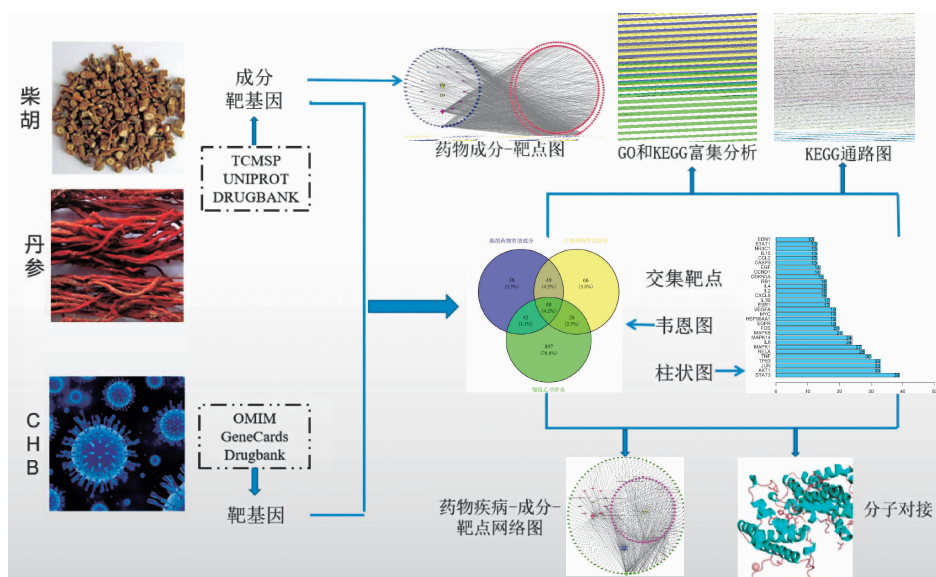


图 1 网络药理学流程图

靶基因构建相关的网络图,其节点大小和颜色深浅与 Degree 值呈正比关系。

1.2 慢性乙型肝炎靶点的筛选 在 OMIM 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)、Drugbank 数据库 (<http://www.drugbank.ca/>) 和 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org>) 中,以“chronic hepatitis B”为关键词进行检索,查询到与 CHB 相关的靶点基因。将得到的基因合并、去重,得到 CHB 的靶点基因。

1.3 获取“柴胡-丹参”药对与 CHB 共同靶点及 PPI 网络的构建 运用 venny 2.1 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将“柴胡-丹参”药对化合物成分中潜在靶点与疾病靶点取交集,得到共同的靶基因。将靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>),设置物种为“Homo Sapiens”,置信度“highest confidence(0.9)”,获取相对应的 PPI 网络图,保存 TSV 格式,应用 R 语言绘制“柴胡-丹参药对-CHB-靶点柱状图”,可直观反映基因在 PPI 网络中的连接节点,连接节点的数目越多,代表该基因在药物与疾病中发挥的作用越重要。

1.4 “柴胡-丹参”药对与 CHB-有效成分-靶点网络图的构建 通过共同核心靶点反向找到相应的有效成分,删除重复成分,得到共有活性成分。将其导入 Cytoscape3.7.1 软件绘制相互作用网络,并分析结果,图中节点的大小与度值呈正比关系,获得最终“柴胡-丹参药对与 CHB-有效成分-靶点图”。

1.5 靶点富集通路分析及可视化处理 为了阐明“柴胡-丹参”药对靶点蛋白的基因功能以及中药化合物对于治疗 CHB 的潜在作用靶点在信号通路中的具体作用,应用 R 语言中的 ClusterProfiler 对核心靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路分析,并对富集分析结果进行可视化处理,以及 GO 功能和 KEGG 代谢通路图作具体分析。

1.6 核心有效成分与慢性乙型肝炎 HBcAg、HBeAg、HBsAg 分子对接 HBV 是一个小的圆形的部分双链、有包膜的脱氧核糖核酸病毒,属嗜肝 DNA 病毒科,包括核心抗原(HBcAg)、包膜抗原(HBeAg)和表面抗原(HBsAg)。这 3 种抗原存在于基因组中的编码蛋白,也是导致和维持 CHB 在病毒与宿主细胞结合中发挥免疫耐受的重要原因之一^[11]。故将 HBsAg、HBcAg、HBeAg 作为 CHB 的主要基因蛋白,在 PDB (<http://www.rcsb.org/>) 数据库中找到对应的蛋白结构。从 1.4 的条件中找到度值最高的有效成分,在 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中找到其相对应的 2D 结构,导入 chem3D 16.0 软件对结构优化转为 mol2 结构。将蛋白与小分子结构导入 Autodocks 4.2.6 软件中进行相互作用,在 cmd 中运用 vina 系统得到有效成分与靶蛋白的结合能,在 Pymol 软件中对其可视化处理。

2 结果与分析

2.1 “柴胡-丹参”药对主要活性成分 使用 TCMSP

数据库在 1.1 的条件下,筛选出符合条件的化合物成分柴胡 17 个,丹参 65 个,查阅相关文献[12]发现丹参中丹参素(danshensu)、丹酚酸 A(salvianolic acid A)不在其中,可能因不符筛选 OB 值与 DL 值的条件被系统删除,但考虑在治疗疾病中发挥积极作用,故纳

入这 2 个化合物。然后在 TCMSP 数据库进行靶点检索,部分化合物未匹配到相对应的靶点蛋白,将其删除,共得到“柴胡-丹参”有效成分 73 个。如表 1 所示,为便构建网络分析图,有效成分由简字母代替,如表 1。

表 1 “柴胡-丹参”有效成分汇总

中药	编号	MOL ID	化合物	OB%	DL
柴胡	CH1	MOL001645	Linoleyl acetate	42.1	0.2
	A1	MOL002776	Baicalin	40.12	0.75
	CH2	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
	CH3	MOL000354	Isorhamnetin	49.6	0.31
	CH4	MOL000422	Kaempferol	41.88	0.24
	CH5	MOL004598	3,5,6,7-tetramethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	31.97	0.59
	CH6	MOL004609	Areapillin	48.96	0.41
	CH7	MOL013187	Cubebin	57.13	0.64
	CH8	MOL004624	Longikaurin A	47.72	0.53
	CH9	MOL004653	(+)-Anomalin	46.06	0.66
	CH10	MOL004718	α -spinasterol	42.98	0.76
	CH11	MOL000490	Petunidin	30.05	0.31
丹参	CH12	MOL000098	Quercetin	46.43	0.28
	DS1	MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	38.75	0.36
	DS2	MOL001659	Poriferasterol	43.83	0.76
	DS3	MOL001771	Poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75
	DS4	MOL001942	Isoimperatorin	45.46	0.23
	DS5	MOL002222	Sugiol	36.11	0.28
	DS6	MOL002651	Dehydrotanshinone II A	43.76	0.4
	A1	MOL002776	Baicalin	40.12	0.75
	DS7	MOL000569	Digallate	61.85	0.26
	DS8	MOL000006	Luteolin	36.16	0.25
	DS9	MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	33.77	0.29
	DS10	MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	40.86	0.23
	DS11	MOL007045	3 α -hydroxytanshinone II a	44.93	0.44
	DS12	MOL007048	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	48.24	0.31
	DS13	MOL007049	4-methylenemiltirone	34.35	0.23
	DS14	MOL007050	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	62.78	0.4
	DS15	MOL007058	Formyltanshinone	73.44	0.42
	DS16	MOL007059	3-beta-Hydroxymethyllenetanshiquinone	32.16	0.41

续表 1

中药	编号	MOL ID	化合物	OB%	DL
	DS17	MOL007061	Methylenetanshinquinone	37.07	0.36
	DS18	MOL007063	Przewalskin A	37.11	0.65
	DS19	MOL007064	Przewalskin B	110.32	0.44
	DS20	MOL007068	Przewaquinone B	62.24	0.41
	DS21	MOL007069	Przewaquinone C	55.74	0.4
	DS22	MOL007070	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g] benzofuran-10,11-dione	41.31	0.45
	DS23	MOL007071	Przewaquinone F	40.31	0.46
	DS24	MOL007077	Sclareol	43.67	0.21
	DS25	MOL007079	Tanshinaldehyde	52.47	0.45
	DS26	MOL007081	Danshenol B	57.95	0.56
	DS27	MOL007082	Danshenol A	56.97	0.52
	DS28	MOL007085	Salvilenone	30.38	0.38
	DS29	MOL007088	Cryptotanshinone	52.34	0.4
	DS30	MOL007093	Dan-shexinkum D	38.88	0.55
	DS31	MOL007094	Danshenspiroketallactone	50.43	0.31
	DS32	MOL007098	Deoxyneocryptotanshinone	49.4	0.29
	DS33	MOL007100	Dihydrotanshinlactone	38.68	0.32
	DS34	MOL007101	Dihydrotanshinone I	45.04	0.36
	DS35	MOL007105	Epidanshenspiroketallactone	68.27	0.31
	DS36	MOL007107	C09092	36.07	0.25
	DS37	MOL007108	Isocryptotanshinone	54.98	0.39
	DS38	MOL007111	Isotanshinone II	49.92	0.4
	DS39	MOL007115	Manool	45.04	0.2
	DS40	MOL007119	Miltionone I	49.68	0.32
	DS41	MOL007120	Miltionone II	71.03	0.44
	DS42	MOL007121	Miltipolone	36.56	0.37
	DS43	MOL007122	Miltirone	38.76	0.25
	DS44	MOL007124	Neocryptotanshinone II	39.46	0.23
	DS45	MOL007125	Neocryptotanshinone	52.49	0.32
	DS46	MOL007127	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	34.72	0.37
	DS47	MOL007130	Prolithospermic acid	64.37	0.31
	DS48	MOL007132	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl] oxy-propionic acid	109.38	0.35
	DS49	MOL007141	Salvianolic acid g	45.56	0.61
	DS50	MOL007142	Salvianolic acid j	43.38	0.72

续表 1

中药	编号	MOL ID	化合物	OB%	DL
	DS51	MOL007143	Salvilenone I	32.43	0.23
	DS52	MOL007145	Salviolone	31.72	0.24
	DS53	MOL007150	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-quinone	75.39	0.46
	DS54	MOL007151	Tanshindiol B	42.67	0.45
	DS55	MOL007152	Przewaquinone E	42.85	0.45
	DS56	MOL007154	Tanshinone iia	49.89	0.4
	DS57	MOL007155	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	65.26	0.45
	DS58	MOL007156	Tanshinone VI	45.64	0.3
	DS59	MOL007134	Danshensu	36.91	0.06
	DS60	MOL007136	Salvianolic acid a	2.96	0.7

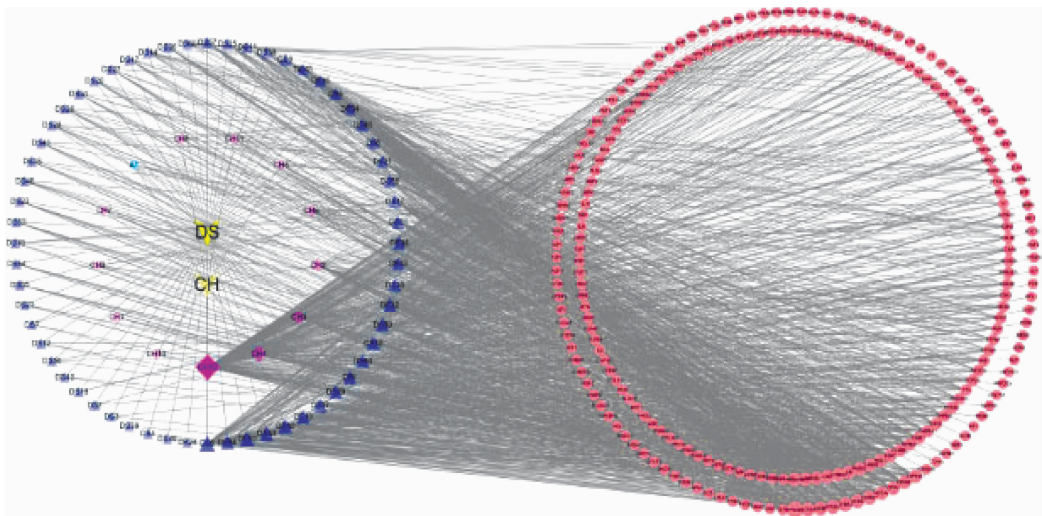
注:柴胡简称为 CH,丹参简称为 DS,柴胡、丹参共有化合物简称为 A。

2.2 药对活性成分对应的靶点及网络分析 在 Uniprot 和 Drugbank 数据库中, 设置物种为“Homo Sapiens”,将“柴胡-丹参”药对中有效蛋白靶点转化为对应基因名,删除重复靶点,共得到 239 个靶基因。使用 Cytoscape3.7.1 绘制“柴胡-丹参药对有效成分-靶点”网络图,如图 2 所示,图中包含 316 个节点和 1343 条边,其节点大小、颜色深浅与 Degree 值呈正比关系。从图中可以看出柴胡-丹参药对中的有效成

分能够与多个靶点相关联,而某些靶点又可作用于多个有效成分,从而反映出该药对多靶点、多成分特。

2.3 疾病对应的靶点 分别在 OMIM 数据库、Drugbank 数据库和 GeneCards 数据库取中位数获得与 CHB 密切相关的基因靶点,将 3 个数据库的基因合并去重得到 985 个。

2.4 中药-疾病核心靶点与 PPI 网络图分析 应用 venny 2.1 将柴胡-丹参化合物成分中潜在靶点与



注:蓝色表示丹参成分,紫色表示柴胡成分,橘色表示靶基因。

图 2 柴胡-丹参药对有效成分-靶点

CHB 靶点进行匹配,得到“柴胡-丹参”药对与 CHB 交集靶点韦恩图,如图 3 所示,图中柴胡-丹参药对和 CHB 三者共同交集靶点 48 个,“柴胡-丹参”药对与 CHB 交集靶点 88 个。

将共有的 88 个靶点导入 string 数据库中获取相对应的 PPI 网络图,保存为 TSV 结构,应用 R 语言筛选前 30 个靶点绘制“柴胡-丹参药对-CHB-靶点柱状图”,如图 4 所示。根据数值筛选前 10 的靶点分别是:STAT3、JUN、TP53、AKT1、TNF、RELA、MAPK1、IL6、MAPK14、MAPK8,表明柴胡-丹参药对治疗 CHB 中这些核心靶点发挥了重要意义。

在 HBV 感染中,信号转导和转录激活因子 3^[13-14](signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通过调节细胞介导因子 HBV 增强反应以及影响肝脏生长因子和表皮生长因子在 CD-95 介导细胞凋亡和 T 细胞毒性的细胞保护作用,参与抑制 HBV 和肝脏疾病的免疫反应;STAT3 也被证明在 HBV 感染相关的急慢性肝衰竭中使得 Th17 反应增强^[15]。转录因子 AP-1^[16](transcription factor AP-1, JUN)被激活后可促进细胞迁移,参与细胞内 HBV 感染和转移。细胞肿瘤抗原 P53(cellular tumor antigen p53,TP53)、钾通道 AKT1(potassium channel AKT1, AKT1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)均参与 CHB 病变进展过程。

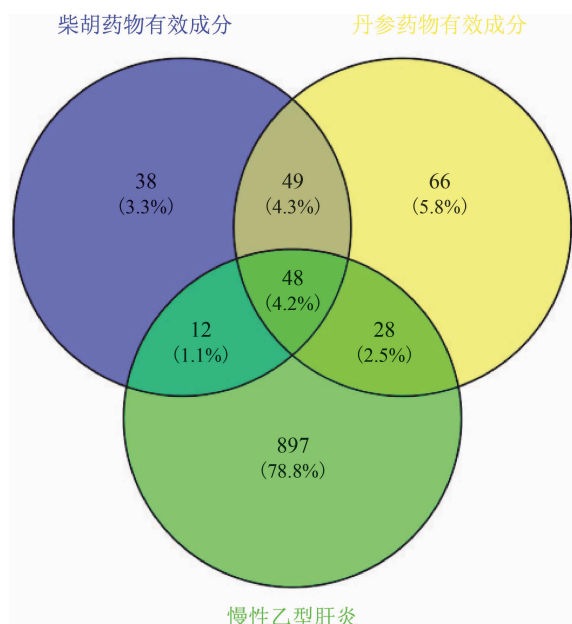


图 3 “柴胡-丹参”药对-CHB-靶点韦恩图

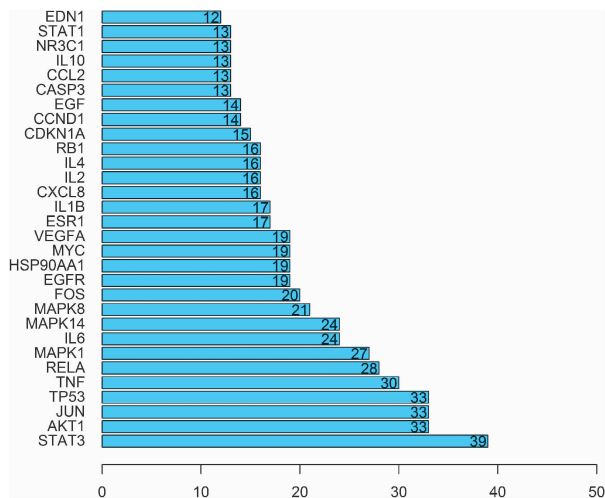
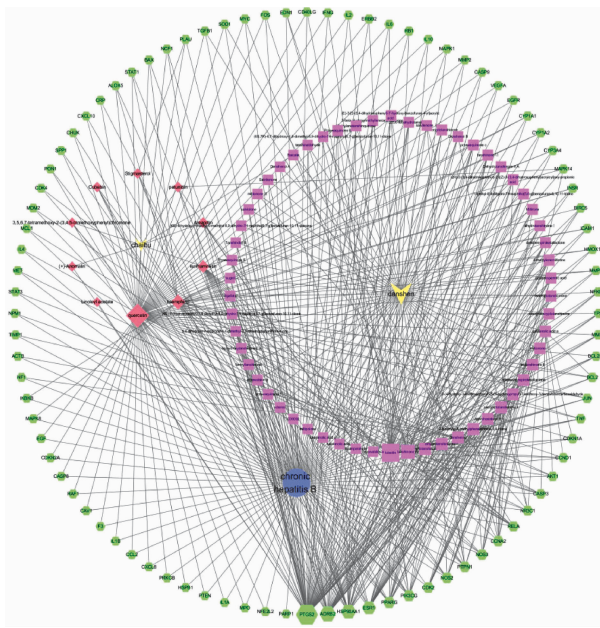


图 4 “柴胡-丹参”药对-CHB-靶点柱状图

2.5 中药疾病共同有效成分及靶点网络图分析 通过共同靶点找到 67 个有效成分,将其导入 Cytoscape 3.7.1 软件构建“柴胡-丹参药对-CHB-有效成分-靶点图”。如图 5 所示,得到的网络图中包含 159 个节点和 527 条边,图中节点的大小与 Degree 值呈正比,节点在网络中作用越强,其 Degree 值越大。图中粉色正方形为丹参有效成分,肉粉色为柴胡有效成分,绿色六边形为交集靶点,黄色箭头表示中药,蓝色圆形表示 CHB,可以看出靶点间相互联系的关系,可以看出



注:绿色表示交集靶点,紫色表示丹参与疾病有效成分,肉粉色表示柴胡与疾病有效成分,黄色表示中药,蓝色表示疾病。

图 5 柴胡-丹参药对-CHB-有效成分-靶点图

柴胡-丹参药对通过多靶点、多成分之间的相互作用共同治疗 CHB。

2.6 GO 功能和 KEGG 代谢分析及可视化结果 借助 R 软件中 ClusterProfiler 包,对柴胡-丹参药对治疗 CHB 的 88 个共同靶点进行 GO 功能和 KEGG 代谢分析,设置 $P \leq 0.05$,筛选前 20 个在治疗疾病中发挥显著作用的通路进行可视化处理,得到 GO 分析气泡图,如图 6 所示。从图中可以看出,在柴胡-丹参药对治疗慢性乙型肝炎的 GO 功能分析中,包括细胞因子受体结合(cytokine receptor binding)、受体配体活动(receptor ligand activity)、信号受体激活器的活性(signaling receptor activator activity)、细胞因子活性(cytokine activity)、DNA 结合转录因子结合(DNA-binding transcription factor binding)等生物过程。

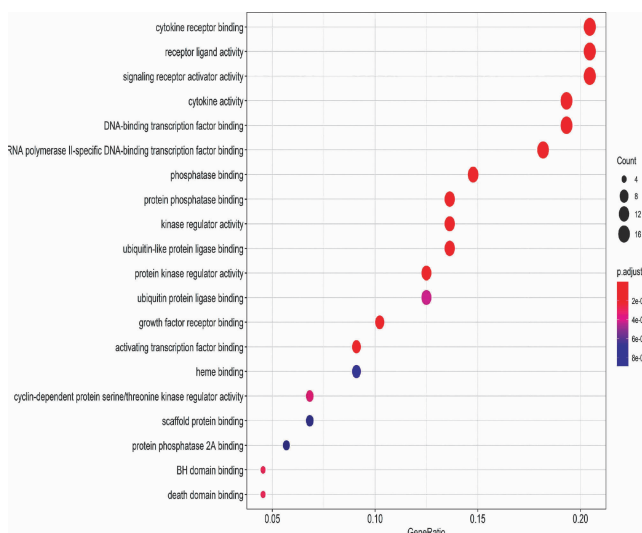


图 6 共同潜在靶点的 GO 功能富集分析

柴胡-丹参药对治疗 CHB 的 KEGG 代谢通路,筛选前 20 条通路进行可视化处理,得到 KEGG 分析气泡图,如图 7 所示。从图中可以看出,柴胡-丹参药对有多重通路可能与 CHB 有关,主要包括乙型肝炎通路(hepatitis B)、P13k-akt 信号通路(P13k-akt signaling pathway)、人类巨细胞病毒感染通路(human cytomegalovirus infection)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染通路(kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、Epstein-Barr 病毒感染通路(epstein-Barr virus infection)、在糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)等信号通路。

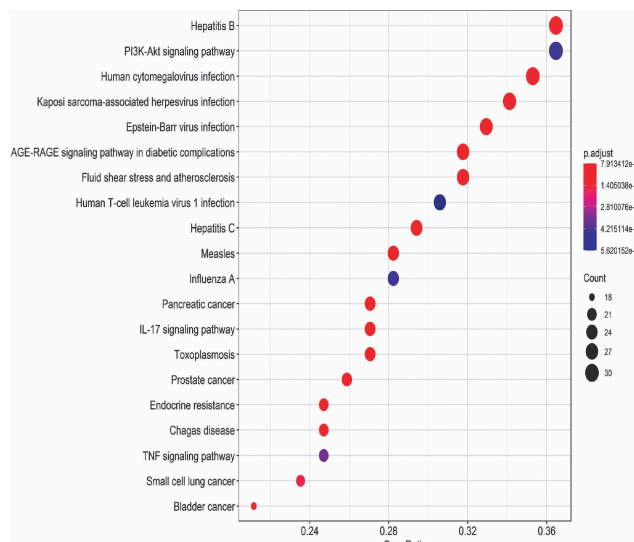


图 7 共同潜在靶点的 KEGG 通路富集分析

2.7 代谢通路图分析 观察图 6 可知,乙型肝炎通路与 P13k-akt 信号通路在所有通路中 P 值最高,与 CHB 联系最为紧密,在 1.5 的条件下,借助 R 软件绘制 KEGG 代谢通路图,如图 8、图 9 所示。从图 8 可知,柴胡-丹参药物成分能够调控乙型肝炎通路中多种蛋白的表达,减缓 HBV 病程的进展。促进 MMP-9、Bcl2 表达参与肝细胞侵袭转移和抗凋亡;对 STAT、STAT3 磷酸化后,作用于胞核,参与肝细胞增殖;可通过激活 IL-8 促进 HCC 发展;可调控 c-Myc、STAT3 基因等途径参与细胞增殖和分化。从图 9 可知,有效成分在 P13k-akt 信号通路中通过多途径控制细胞分化以及调节与其他通路的连接。通路中 AKT 对于 p21 磷酸化,从而抑制 CDK 和 Cyclin 控制细胞的周期;可抑制 Bcl-xL 和 Bcl-2 促进细胞凋亡;可诱导 PRK 磷酸化等途径参与细胞增殖和修复 DNA。P13k-akt 信号通路被认为是肝癌侵袭转移的诊断和预后指标,也是治疗肝癌的靶点^[17]。

2.8 中药核心成分与疾病靶蛋白分子对接结果分析

现代医学研究表明,配体与受体结合的结合能与活性呈反比,结合能越低其活性越好,药物治疗疾病的作用可能越大。根据图 4 的 Degree 值筛选度值最大的有效成分分别为槲皮素(querعتin)、木樨草素(luteolin),将其与 CHB 中靶蛋白 HBcAg、HBeAg、HBsAg 进行对接,结果见表 2,可知槲皮素、木樨草素与 HBcAg、HBeAg、HBsAg 靶蛋白的结合能数值较小,具有较好的亲和力。

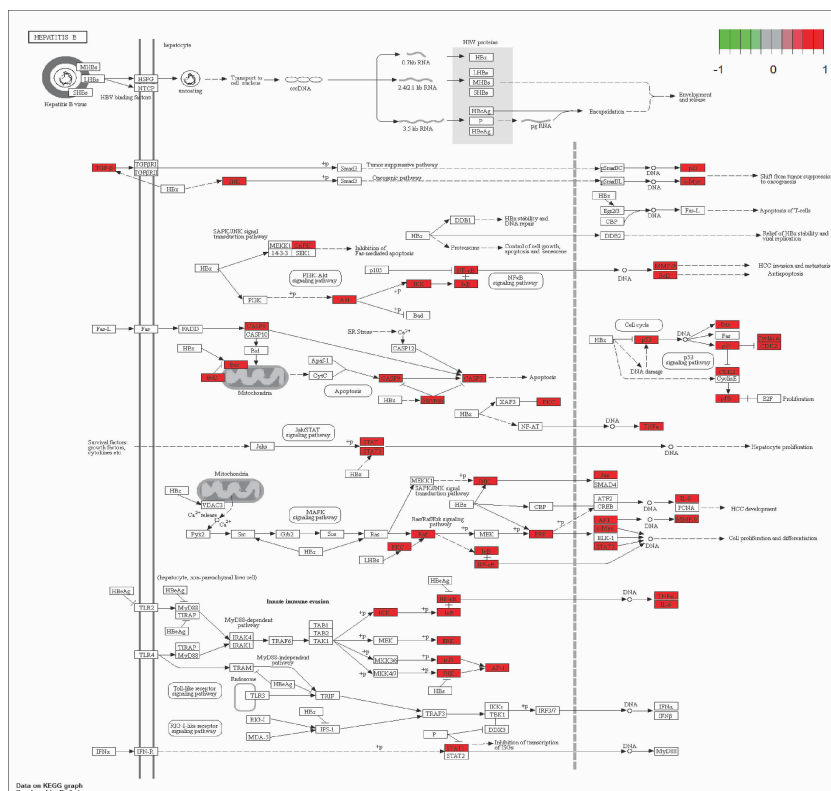


图 8 乙型肝炎通路图

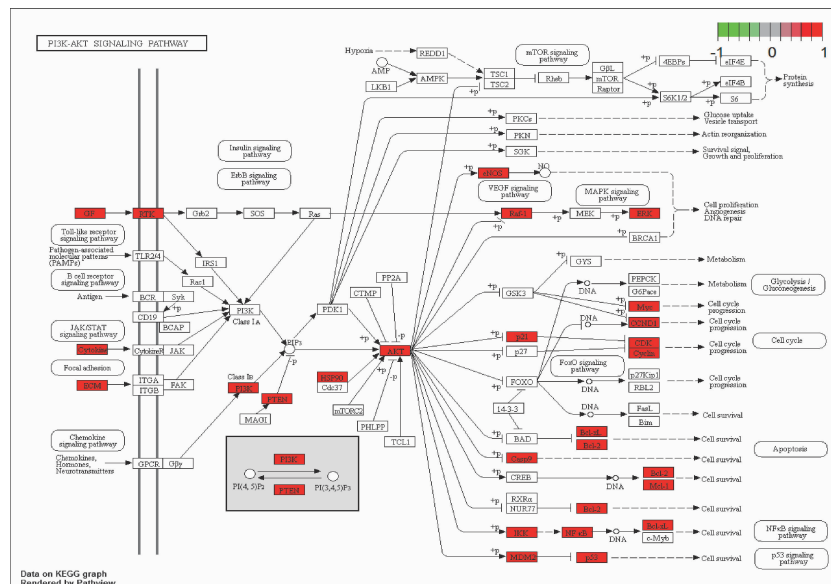


图 9 P13k-akt 信号通路图

表 2 有效成分与靶蛋白对接结果

名称	槲皮素	木樨草素
化学式	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
与 HBcAg 结合能/(kJ·mol ⁻¹)	-8.7	-8.3
与 HBeAg 结合能/(kJ·mol ⁻¹)	-7.0	-7.0
与 HBsAg 结合能/(kJ·mol ⁻¹)	-8.4	-8.4

其对接构像,如图 10 所示,具有较好的结合活性,分子的构像比较稳定。表明有效活性成分可以抑制 HBV,阻断其与宿主细胞的相互作用,因此,“柴胡-丹参”药对治疗 CHB 具有潜在的作用机制。

3 讨论

CHB 治疗的主要方案是抑制 HBV 复制以及提

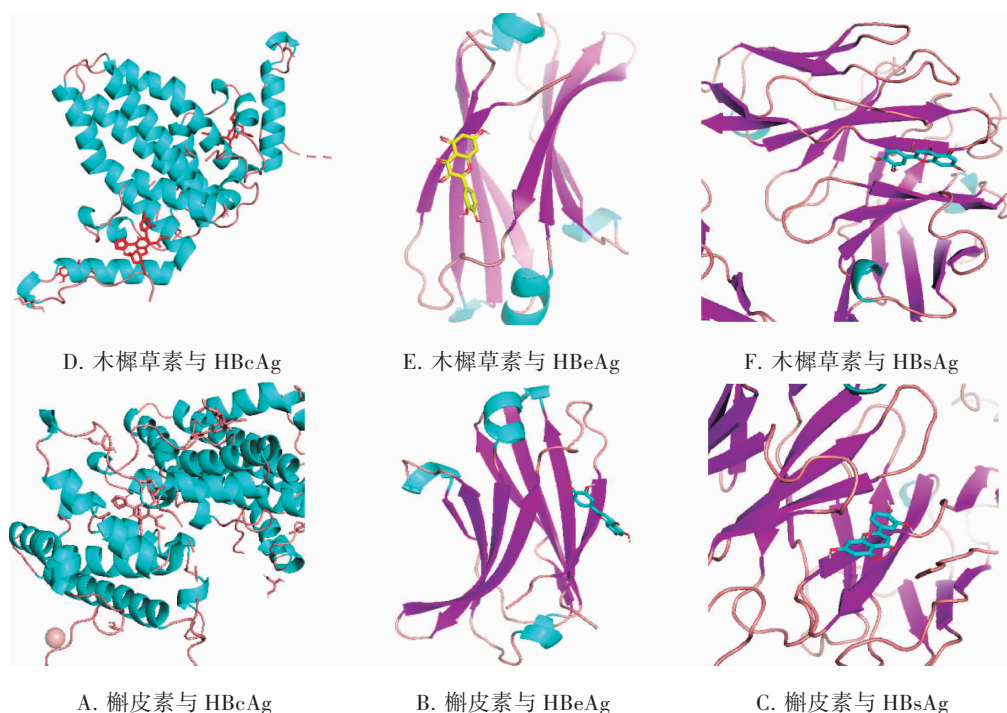


图 10 槲皮素、木槲草素与靶蛋白 HBcAg、HBeAg、HBsAg 的对接构像

高人体免疫能力,该疾病治疗的主要目标是阻止疾病进展,从而防止发展为肝纤维化和肝癌来提高存活率和生活质量^[18]。中医治疗疾病采用辨证论治的基本方法,认为 CHB 主要与人体正气亏虚及外感湿热疫毒侵袭有关,病理产物湿热贯穿于整个疾病阶段;同时本病长期代谢的病理产物淤血,是影响 CHB 病情发展变化的重要因素,故常使用清热利湿解毒、活血祛瘀药物。查阅 CHB 用药规律分析文献显示^[6-7],治疗 CHB 各证型的常用方剂中,均引入柴胡-丹参药对,选用频率较高;柴胡-丹参药对相配伍共奏疏肝理气、清热利湿、养血柔肝之效^[19]。

网络药理学分析后显示,“柴胡-丹参”药对治疗 CHB 发挥作用的有效活性成分 73 个,对应的潜在靶点 985 个。经柴胡-丹参药对-CHB-有效成分-靶点图网络筛选后 159 个节点,527 条边,体现出本药对的化学成分与靶点间具有复杂的相互作用;分析 Degree 值,得到药对治疗 CHB 的核心靶点 88 个,其中主要包括 PTGS2、ADRB2、HSP90AA1、ESR1、PPARG 等。有文献报道表明^[20],PTGS2 能够通过介质对 HBV 产生抑制作用,参与病毒表达和转录过程。ADRB2 在小细胞富集的转录簇中表达,其表达的高低与神经内分泌分化程度有关,并与缩短病人生存周期有关^[21]。

HSP90AA1 属于热蛋白家族,在肝细胞癌变和病毒性下进行差异表达,作用于该位点,可有效阻断病情进一步恶化^[22]。

临床实验研究表明^[23-25],柴胡调节机体的巨噬细胞,不影响细胞活性但刺激细胞代谢 MTT 和积累 NR 的能力,抑制炎症因子的生成,表明细胞的免疫功能增强和发挥抗炎作用;同时柴胡成分直接参与了与 α -对苯二甲酸类似的活性氧引起的氧化细胞过程,减少肝损伤程度。丹参中的有效成分可以激活酶的活性,抑制病毒在细胞增殖、侵袭、转移,减少肝脏的病理损伤,延缓疾病进展以及提高机体免疫能力^[26-27]。

通过 GO 功能分析和 KEGG 代谢富集通路对共同 88 个靶点分析,显示生物过程包括细胞因子受体结合(cytokine receptor binding)、受体配体活动(receptor ligand activity)、信号受体激活器的活性(signaling receptor activator activity)等,抑制了病毒与宿主细胞表面受体相结合、抑制细胞间复制、阻断信号传递、抑制病毒活性等生物活性。信号通路包括乙型肝炎通路(hepatitis B)、P13k-akt 信号通路(P13k-akt signaling pathway)、人类巨细胞病毒感染通路(human cytomegalovirus infection)等,在细胞生长、增殖及凋亡中起关键作用。其中柴胡-丹参药物成分能够调控乙

型肝炎通路中多种蛋白的表达,参与肝细胞增殖、侵袭、转移等过程,减缓 HBV 病程的进展。PI3k-akt 信号通路是调控细胞信号传导过程的重要通路,参与乳腺癌、膀胱癌和非小细胞肺癌的进展^[17]。通路中 PI3K 可以激活蛋白激酶 AKT,促进细胞的生长和增殖,PTEN 和活化的 AKT 与肝内转移、肿瘤分级和高增殖指数相关,通过多种途径参与代谢、凋亡、细胞生长和增殖,PI3k-akt 的表达与疾病临床分期呈正相关,表明该通路可抑制病毒复制、细胞周期进程、迁移和侵袭降低^[28]。

HBV 与肝细胞表面受体结合,入侵细胞后通过复制引起免疫应答,导致细胞损伤、炎症进而导致坏死^[29]。血清中大量存在的 HBsAg 是导致免疫耐受的主要原因,能够反应患者清除 HBV 的情况,也是临床上判断 CHB 得到控制的重要指标之一^[30]。HBcAg 与 HBeAg 都是 HBV 复制过程中同步产生的翻译蛋白,将其作为观察 HBV 复制的指标。HBcAg 是 HBV 内衣壳的成分之一,经过内源性抗体途径在肝细胞表面表达,参与免疫反应,进一步造成肝损伤^[31]。HBeAg 在细胞内加工后,分泌至胞外,能够在血清中检测,并且血清学表达阳性与患者停药后复发率相关^[32-33]。HBV 基因组中的编码蛋白 HBsAg、HBcAg、HBeAg,参与患者病毒学应答和疾病预后,也是导致和维持 CHB 在感染过程中免疫耐受的重要原因^[34]。其中,故将 HBsAg、HBcAg、HBeAg 作为 CHB 的主要基因蛋白,根据图 4 度值筛选有效活性成分槲皮素(querceetin)、木犀草素(luteolin)与 CHB 中靶蛋白 HBcAg、HBeAg、HBsAg 分子对接,结合能数值较小,则亲和力较好。有效成分与病毒表面抗原结合,能够减少 HBV 对肝细胞的吸附,并且抑制 HBcAg、HBeAg、HBsAg 的分泌,减少患者的耐药性、抗病毒效应^[35-36]。槲皮素是一种分布广泛的植物黄酮醇,据报道对脑膜炎病毒、HSV、HIV、副流感病毒 3 型、伪狂犬病病毒具有体外抗病毒活性,体外实验表明^[37]槲皮素具有较高的抗 HBV 潜力。

本研究运用网络药理学和分子对接相结合的方法,预测了“柴胡-丹参”药对治疗 CHB 的有效蛋白成分、关键靶点和生物活性通路,阐明了其抑制肝纤维化、抑制病毒活性、减少肝损伤、提高免疫力等作用机制,具有一定的预测性和准确性,后续还可以通过在

体、离体实验研究获得更可靠的实验依据。

参考文献:

- [1] 陆海英,徐小元.《慢性乙型肝炎防治指南》(2019 年版)解读[J]. 临床内科杂志,2020,37(8):540-542.
- [2] WANG F S,FAN J G,ZHANG Z,et al. The global burden of liver disease:the major impact of China[J]. Hepatology, 2014,60(6):2099-2108.
- [3] LIU J,LIANG W,JING W,et al. Countdown to 2030:e-eliminating hepatitis B disease,China [J]. Bull World Health Organ,2019,97(3):230-238.
- [4] REVILL P,LOCARNINI S. Antiviral strategies to eliminate hepatitis B virus covalently closed circular DNA(cc-cDNA)[J]. Curr Opin Pharmacol,2016,30:144-150.
- [5] 成春锋,袁鑫,焦爽,等. 李延治疗慢性乙型肝炎经验[J]. 中华中医药杂志,2019,34(1):176-178.
- [6] 焦云涛,李小科,杨先照,等. 基于关联规则和复杂系统熵聚类的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎用药规律分析[J]. 临床肝胆病杂志,2016,32(11):2075-2079.
- [7] 刘海涛,施家希,罗丹,等. 中医药辨证治疗慢性乙型肝炎用药规律文献研究 [J]. 中医杂志,2016,57(16):1421-1425.
- [8] 辛国,赵昕彤,黄晓巍. 柴胡化学成分及药理作用研究进展[J]. 吉林中医药,2018,38(10):1196-1198.
- [9] 孙宁远,朱雪林,陈君. 丹参化学成分抗纤维化药理作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(22):201-208.
- [10] LI S,ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology:theory,methodology and application [J]. Chin J Nat Med,2013,11(2):110-120.
- [11] KONDO Y,NINOMIYA M,KAKAZU E,et al. Hepatitis B surface antigen could contribute to the immunopathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. ISRN Gastroenterology, 2013,2013:935295.
- [12] 吴芳,李克明,隆毅,等. 丹参治疗糖尿病肾病的网络药理学研究 [J]. 广州中医药大学学报,2019,36(3):402-409.
- [13] LI M,LI F,LI N,et al. Association of polymorphism rs1053005 in STAT3 with chronic hepatitis B virus infection in Han Chinese population [J]. BMC Med Genet, 2018,19(1):52.
- [14] WARIS G,SIDDIQUI A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hep-

- atitis B virus enhancer 1 function [J]. *J Virol*, 2002, 76(6): 2721–2729.
- [15] KIM H Y, JHUN J Y, CHO M L, et al. Interleukin-6 up-regulates Th17 response via mTOR/STAT3 pathway in acute-on-chronic hepatitis B liver failure [J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(8): 1264–1273.
- [16] CHEN M J, WU D W, SHEN C J, et al. Hepatitis B virus X protein promotes tumor invasion and poor prognosis in hepatocellular carcinoma via phosphorylation of paxillin at Serine 178 by activation of the c-Jun NH2-terminal kinase[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(1): 275–283.
- [17] WANG F, LI L, CHEN Z, et al. MicroRNA-214 acts as a potential oncogene in breast cancer by targeting the PTEN-PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(5): 1421–1428.
- [18] 胡鹏, 任红. 2017 年欧洲肝病年会乙型肝炎病毒感染临床实践指南要点 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2017, 25(6): 415–418.
- [19] 孙元培, 郭晓霞. 基于中医传承辅助平台挖掘姜良铎教授治疗慢性乙型肝炎方药规律 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(6): 210–217.
- [20] LIN X M, LI S, ZHOU C, et al. Cisplatin induces chemoresistance through the PTGS2-mediated anti-apoptosis in gastric cancer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 116: 105610.
- [21] KWON D H, ZHANG L, QUIGLEY D A, et al. Down-regulation of ADRB2 expression is associated with small cell neuroendocrine prostate cancer and adverse clinical outcomes in castration-resistant prostate cancer [J]. *Urol Oncol*, 2020, 38(12): 931.
- [22] WANG L, ZHAO H, ZHANG L, et al. HSP90AA1, ADRB2, TBL1XR1 and HSPB1 are chronic obstructive pulmonary disease-related genes that facilitate squamous cell lung cancer progression[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(3): 2115–2122.
- [23] RADULOVIC N, STEVANOVIC M, NEŠIC M, et al. Constituents of *Bupleurum praealtum* and *Bupleurum veronense* with Potential Immunomodulatory Activity[J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(10): 2902–2914.
- [24] LIU A, TANAKA N, SUN L, et al. Saikosaponin d protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibiting NF- κ B and STAT3 signaling [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 223: 80–86.
- [25] 辛国, 赵昕彤, 黄晓巍. 柴胡化学成分及药理作用研究进展[J]. *吉林中医药*, 2018, 38(10): 1196–1198.
- [26] SHI J, LAI J, LIN Y, et al. Tanshinone IIA down-regulated p-Smad3 signaling to inhibit TGF- β 1-mediated fibroblast proliferation via lncRNA-HSRL/SNX9 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 129: 105863.
- [27] 陈忠辉. 丹参酮 II A 磺酸钠联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎的疗效探讨[J]. *中外医疗*, 2020, 39(5): 100–102.
- [28] LIU G L, YANG H J, LIU B, et al. Effects of MicroRNA-19b on the proliferation, apoptosis, and migration of Wilms' Tumor cells via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(10): 3424–3434.
- [29] GIERSCHE K, ALLWEISS L, VOLZ T, et al. Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(2): 460–462.
- [30] TSENG T C, HUANG L R. Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus[J]. *J Infect Dis*, 2017, 216(suppl 8): S765–S770.
- [31] MAK L Y, WONG D K, CHEUNG K S, et al. Review article: hepatitis B core-related antigen (HBcrAg): an emerging marker for chronic hepatitis B virus infection[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(1): 43–54.
- [32] 刘娜, 东冰, 周路路, 等. ALT 小于 2 倍正常上限的 HBeAg 阳性慢性 HBV 感染者肝纤维化的影响因素分析 [J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(21): 3110–3112.
- [33] 周莉, 邱源旺, 甘建和, 等. 白细胞介素-21 与 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者恩替卡韦停药后复发的相关性[J]. *中华传染病杂志*, 2017, 35(12): 725–729.
- [34] LI X, ZHOU D, CHI X, et al. Entecavir combining Chinese herbal medicine for HBeAg-positive chronic hepatitis B patients: a randomized, controlled trial [J]. *Hepatol Int*, 2020, 14(6): 985–996.
- [35] AL-MAHTAB M, BAZINET M, VAILLANT A. Safety and efficacy of nucleic acid polymers in monotherapy and combined with immunotherapy in treatment-naïve bangladeshi patients with HBeAg+ chronic hepatitis B infection[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0156667.
- [36] HEIM K, BINDER B, SAGAR, et al. TOX defines the degree of CD8⁺ T cell dysfunction in distinct phases of chronic HBV infection[J]. *Gut*, 2020, 2020: 322404.
- [37] PARVEZ M K, TABISH REHMAN M, ALAM P, et al. Plant-derived antiviral drugs as novel hepatitis B virus inhibitors: Cell culture and molecular docking study[J]. *Saudi Pharm J*, 2019, 27(3): 389–400.