网络出版时间:2024 - 03 - 11 10:23:02 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1086.r.20240306.1727.046

◇网络药理学◇

基于网络药理学和分子对接方法探讨健脾利湿养肝方治疗慢加急性肝衰竭的作用机制

黄 琦[1,2],李 静[3],马文峰[1,2],韩志毅[1,2],孙嘉玲[1,2],张 卫[1,2],孙新锋[1,2],陈剑平[1,4],周小舟[1,2,3]

[1. 广州中医药大学第四临床医学院,广东 广州 510006;2. 深圳市中医院国家临床肝病(中医)重点专科,广东 深圳 518033;3. 澳门科技大学中医药学院,澳门 999078;4. 深圳市中医院中药制剂研究重点实验室,广东 深圳 518033]

doi:10.12360/CPB202210053

文献标识码:A **文章编号**:1001 - 1978(2024)03 - 0557 - 08

中国图书分类号:R-332;R242;R289.5;R319;R575.3

摘要:目的 运用网络药理学和分子对接探究养肝方治疗慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure,ACLF)的作用机制。**方法** 依托 TCMSP 及 GeneCards 等多种数据库,获得健脾利湿养肝方治疗 ACLF 疾病的相关靶点。应用 String 及 Cytoscape 构建作用靶点的 PPI 网络,筛选出核心作用靶点并采用 DAVID 进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。对健脾利湿养肝方重复出现的活性成分以生物利用度 OB 值≥30%,类药性 DL≥0.18 为筛选条件,分选出中药复方健脾利湿养肝方的主要活性成分,并对该主要活性成分与核心作用靶点亲和力进行分子对接及动物体内实验验证。**结果** 共获得健脾利湿养肝方治疗 ACLF 的活性成分 536 个,交集靶点基因 244 个,并筛选出核心靶点基因 7 个。分子对接显示核心靶基因 AKT1、SRC、VEGFA、STAT3、EGFR、MAPK3、HRAS 与健脾利湿养肝方中的主要活性成分槲皮素亲和力较好,具有很强的结合活性。另外,体内实验验证健脾利湿养肝方能够降低 HRAS、EGFR、STAT3、SRC、VEGFA 的表达,以延缓 ACLF 疾病进展。**结论** 健脾利湿养肝方可能作用于 HRAS、EGFR、STAT3、SRC、VEGFA 等核心靶点,以达到治疗 ACLF 的作用。

关键词:健脾利湿养肝方;慢加急性肝衰竭;网络药理学;分子对接;信号通路;槲皮素

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

收稿日期:2023 - 11 - 18,修回日期:2024 - 01 - 08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No 82205209);深圳市科研计划项目(No JCYJ20210324120405015,JCYJ20180302173542393)

作者简介:黄 琦(1996 -),女,硕士生,研究方向:中医药防治肝脏疾病,E-mail:janethhq@163.com;

周小舟(1964 -),女,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治肝脏疾病,通信作者,E-mail:zxz1006@gzucm.edu.cn

慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure,ACLF)是继发于慢性肝病的一个危急重症综合征候群,临床症状复杂多变,并且尚无特效的治疗方法。在慢性肝病中的发病率常大于 10%,且死亡率可达 50% 以上[1]。西医对 ACLF 的治疗主要是处理诱发事件、减少炎症反应及防止器官衰竭等对症支持治疗。中医没有 ACLF 病名,根据其复杂多样的症状,可将其纳入"急黄"、"瘟黄"、"鼓胀"、"血证"、"肝厥"等重症范畴。现代中医总结本病辨证定位多以肝、脾为主,辨证定性则多以湿热、气虚为主,病理变化过程多呈现为"湿热 - 热毒 - 瘀虚"[2]。病久传脾,而热邪亦可伤阴血,且"见肝之病,知肝传脾",故中医治疗以调和气血为大法,气血运行畅达,则病情向好。

前期本课题通过对全国不同区域 18 家单位 962 例 ACLF 及慢性肝衰竭进行多中心大样本临床观察发现:临床联合中药复方治疗可有效降低血清内毒素水平、减少并发症并降低病死率[3]。在此基础上,筛选出有效中药方剂健脾利湿养肝方(后简称养肝方),其由黄芪、绵茵陈、山药、山茱萸、草果、田基黄、焦山楂、砂仁、香附组成,具有健脾益气、清利湿热的功效[4]。

近年来中医在理论、临床、中药三方面的分子生物研究已经起步,网络药理学和分子对接技术可以从中医理论上拓展生物信息学的空间,在中药临床疗效基础上说明分子机制,并深化对中药的基因研究[5]。本研究基于网络药理学和分子对接方法,构建养肝方治疗 ACLF 的中药 - 成分 - 靶点 - 疾病网络关系,并对其潜在靶点和分子机制进行了系统地研究。

1 材料与方法

1.1 网络药理学方法

1.1.1 *养肝方活性成分和靶点搜集* 在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP,https://tcmsp-e.

com/)、BATMAN-TCM 生物信息学分析平台(http://bionet. ncpsb. org/batman-tcm/)及 SwissTargetPrediction(http://swisstargetprediction. ch/)数据库查找获得养肝方中黄芪、绵茵陈、山药、山茱萸、草果、田基黄、焦山楂、砂仁、香附的所有有效成分及作用靶点,选取人源靶点,合并删除重复靶点。

1.1.2 *ACLF 疾病靶点搜集* 使用 Acute-on-chronic liver failure 及 Acute on chronic liver failure 作为关键词,搜索 DrugBank(https://www. drugbank. ca/),人类疾病相关的基因与突变位点信息的数据库(Disgenet,http://www. disgenet. org/home/),基因数据库(GeneCards,https://www. genecards. org/),治疗靶标数据库(TTD,http://db. idrblab. net/ttd),人类孟德尔遗传病数据库(OMIM,https://www. omim. org/),获得 ACLF 疾病相关靶点,合并所有靶点并去除重复靶点。

1.1.3 *养肝方与 ACLF 相关靶点交集的构建* 养肝方的作用靶点与 ACLF 疾病靶点使用韦恩图取交集,获得养肝方治疗 ACLF 作用靶点。

1.1.4 *构建 PPI 蛋白互作网络关系图及筛选关键作用靶点* 将养肝方治疗 ACLF 作用靶点上传到 STRING 数据库 (http://string-db. org)获取 PPI 信息。置信度得分为 0.7。以 TSV 格式导出后由 Cytoscape 可视化,构建中药-靶点 - 疾病的网络关系图。使用 Cytoscape 中 Network analyzer 和 CytoNCA 计算网络拓扑参数及阈值,包括度中心性(degree)、紧密中心性(closeness centrality)、介数中心性(betweenness centrality)。

1.1.5 *养肝方治疗 ACLF 作用靶点的富集分析* 使用注释及可视化整合分析工具 DAVID(https://david. ncifcrf. gov/)进行养肝方治疗 ACLF 作用靶点的富集分析,包括基因本体(Gene Ontology,GO)分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)分析。依托 R 语言绘制出 GO 功能和 KEGG 通路富集气泡图、柱状图。

1.1.6 *关键作用靶点和主要活性成分的分子对接* 关键作用靶点蛋白的 3D 蛋白结构从蛋白质数据库 PDB(http://www. rcsb. org/)中获得。对养肝方有效成分进行两两交集求重复性进行排序筛选,后以生物利用度 OB 值≥30%,类药性 DL≥0.18 为筛选条件,分选出养肝方中的主要活性成分,并通过 Pubchem(https://pubchem. ncbi. nlm. nih. gov/)数据库下载其 3D 结构图。使用 AutoDock 对蛋白质受体文件和配体文件进行处理,后再进行主要活性成分与关键作用靶点的分子对接。使用 PyMOL 软件将主要活性成分与关键作用靶蛋白之间的相互作用可视化,并显示为 2D 图。

1.2 体内实验验证

1.2.1 *实验材料与试剂* 雄性 C57BL/6J 小鼠,6 - 8 周龄,购于广东省医学实验动物中心,适应性喂养 1 周。养肝方(黄芪 20 g、绵茵陈 30 g、山药 15 g、山茱萸 10 g、草果 10 g、田基黄 20 g、焦山楂 15 g、砂仁 5 g、香附 10 g)中药材购自深圳市中医院。SRC(GB111035)、EGFR(GB111504)购买于 Servicebio 生物技术公司,VEGFA(bs-1313R)、HRAS(bs-1071R)购买于 Bioss 公司,STAT3(ab68153)购买于 Abcam 公司。LPS(L4391)、D-galactosamine(G1639)购买于 Sigma 公司。本实验经中科产业控股(深圳)有限公司动物福利伦理委员会批准,批准号:20220059。

1.2.2 *动物模型构建及给药* 建立肝纤维化小鼠模型,将小鼠随机分为对照组、模型组和养肝方组,每组 4 只。第 1 ~ 8 周,对照组腹腔注射生理盐水,每周 2 次;模型组及养肝方组腹腔注射四氯化碳溶液(0.2 mL),每周 2 次。第 9 ~ 12 周,对照组每周 3 次腹腔注射生理盐水,模型组每周 3 次腹腔注射四氯化碳,每天灌胃生理盐水 0.6 mL;养肝方组每周 3 次腹腔注射四氯化碳,每天灌胃养肝方水煎剂 0.6 mL。在上述模型构建成功后,小鼠腹腔注射 LPS($10\ \mu g \cdot kg^{-1}$)和 D-Gal($500\ mg \cdot kg^{-1}$)的 PBS 溶液(200 mL),24 h 后通过腹腔注射麻醉剂(如三溴乙醇类)对小鼠进行深度麻醉,麻醉稳定后对收集小鼠的肝脏进行检测。

1.2.3 *HE 染色* 取出肝脏,多聚甲醛固定组织 48 h 时,梯度乙醇及二甲苯脱水透明后石蜡包埋。切片后用苏木精 - 伊红进行染色及封片。

1.2.4 *免疫组化测定组织内蛋白的表达* 将石蜡包埋组织切片后依次放入二甲苯及梯度乙醇脱蜡,后放入柠檬酸钠抗原修复液沸水煮 20 min 以组织修复,将抗原修复后切片置于内源性过氧化物酶阻断剂 H_2O_2 并滴加一抗过夜孵育。次日充分洗涤后,切片滴加辣根酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物反应及适量 DAB 显色剂,5 ~ 20 min 终止显色并封片。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 25.0 对实验数据结果进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 养肝方治疗 ACLF 作用靶点的获得 通过 TCMSP 数据库平台及 BATMAN-TCM 数据库,查找得到养肝方的所有化学成分。其中养肝方有 536 个化学

成分,821 个基因靶点。利用疾病数据库,得到1 580 个 ACLF 靶点。通过 Venn 图取交集,共得到 244 个交集靶点,即养肝方治疗 ACLF 作用靶点,见 Fig 1。

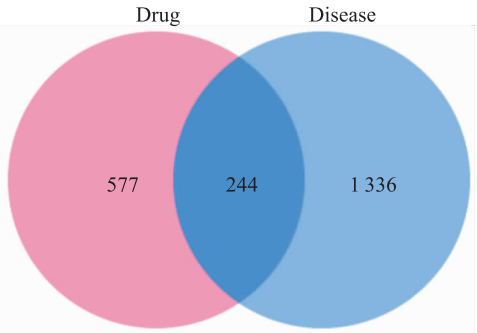

Fig 1 Venn diagram of drug-disease target intersection

2.2 养肝方治疗 ACLF 靶点蛋白的 PPI 网络图及核心靶点蛋白的筛选 养肝方治疗 ACLF 靶点蛋白的 PPI 网络图见 Fig 2,共 237 个点,2 294条边。选取 PPI 网络图中,度中心性、紧密中心性及介数中心性均较大的 7 个蛋白为核心蛋白即 AKT1、SRC、VEGFA、STAT3、EGFR、MAPK3、HRAS。养肝方与 ACLF 交集基因中核心靶点基因的拓扑学参数见 Fig 3。

2.3 养肝方治疗 ACLF 作用靶点的 GO 分析结果 GO 分析包括细胞组分、分子功能及生物过程的分析,见 Fig 4。养肝方治疗 ACLF 的生物过程主要包括 T 细胞共刺激、信号转导、DNA 模板正转录调控、RNA 聚合酶Ⅱ对转录的正调控、平滑肌细胞增殖的正调节等。细胞组分主要涉及转录因子复合物、突触后特化、突触后密度、质膜、磷脂酰肌醇 3-激酶复合物。分子功能主要集中在跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、转录因子结合、支架蛋白结合、RNA 聚合酶Ⅱ转录、蛋白酪氨酸激酶活性等。

2.4 养肝方治疗 ACLF 作用靶点的 KEGG 分析 养肝方治疗 ACLF 作用靶点的 KEGG 分析结果见 Fig 5。富集显著性较高的通路主要包括:癌症中 PD-1 和 PD-L1 检查点信号抑制通路、JAK-STAT 信号通路、趋化因子信号通路、C 型凝集素受体信号通路等。表明养肝方主要通过以上通路来治疗 ACLF。

2.5 养肝方主要活性成分筛选 对养肝方 536 个有效成分的重复性进行排序筛选,再以 OB≥30%,类药性 DL≥0.18 为筛选条件过滤,见 Tab 1。其中槲皮素重复性为 6,且 OB = 46.43%,DL = 0.28,即选择槲皮素作为后续分子对接的靶点蛋白。

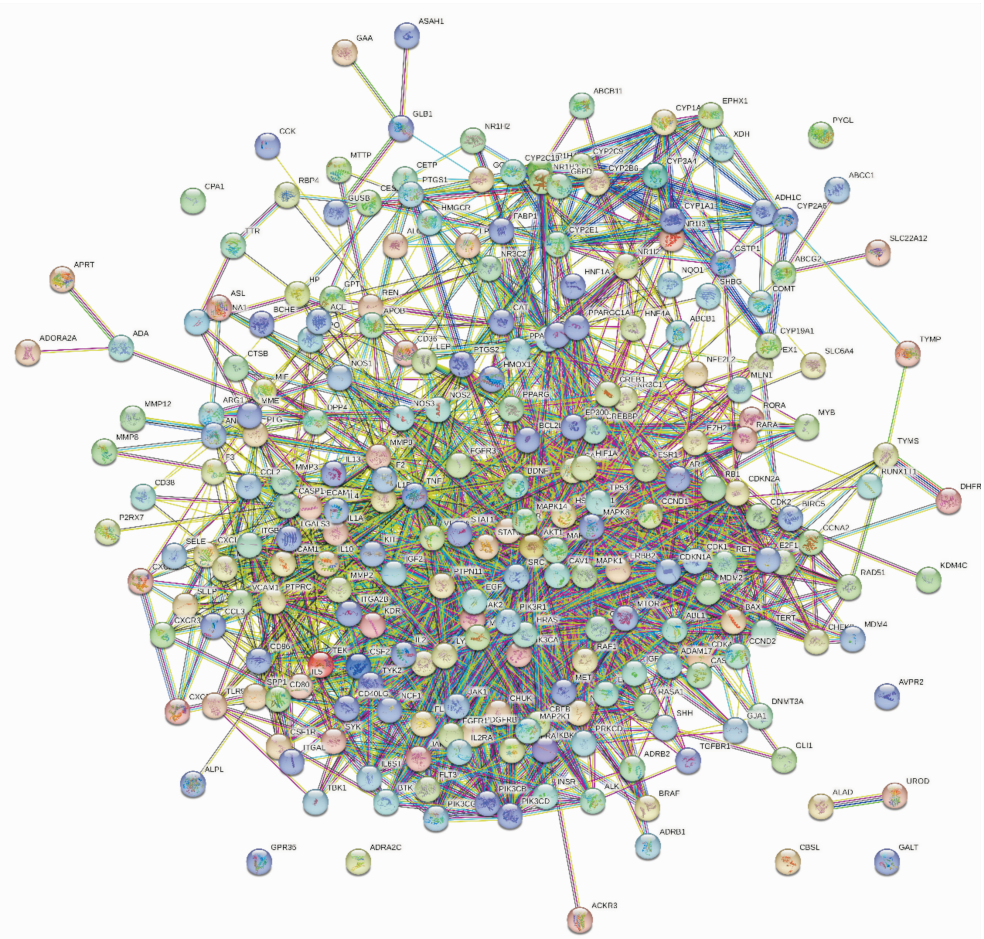

Fig 2 PPI Network diagram of potential target

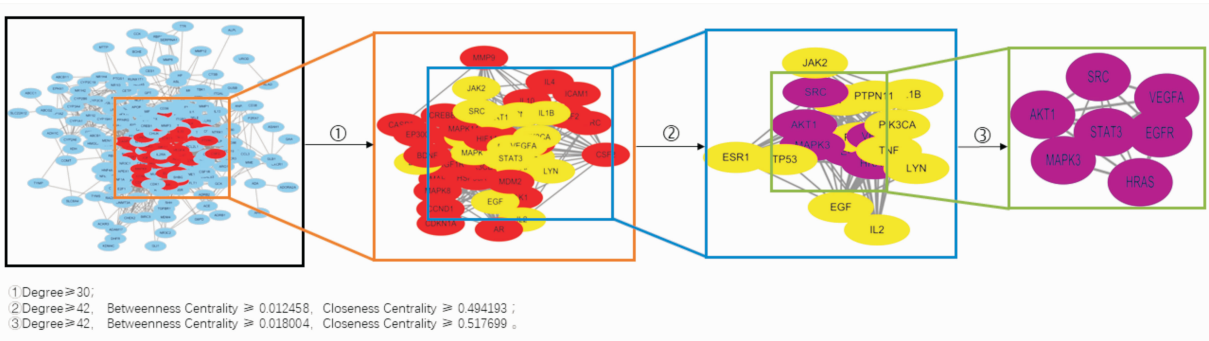

Fig 3 Core gene screening

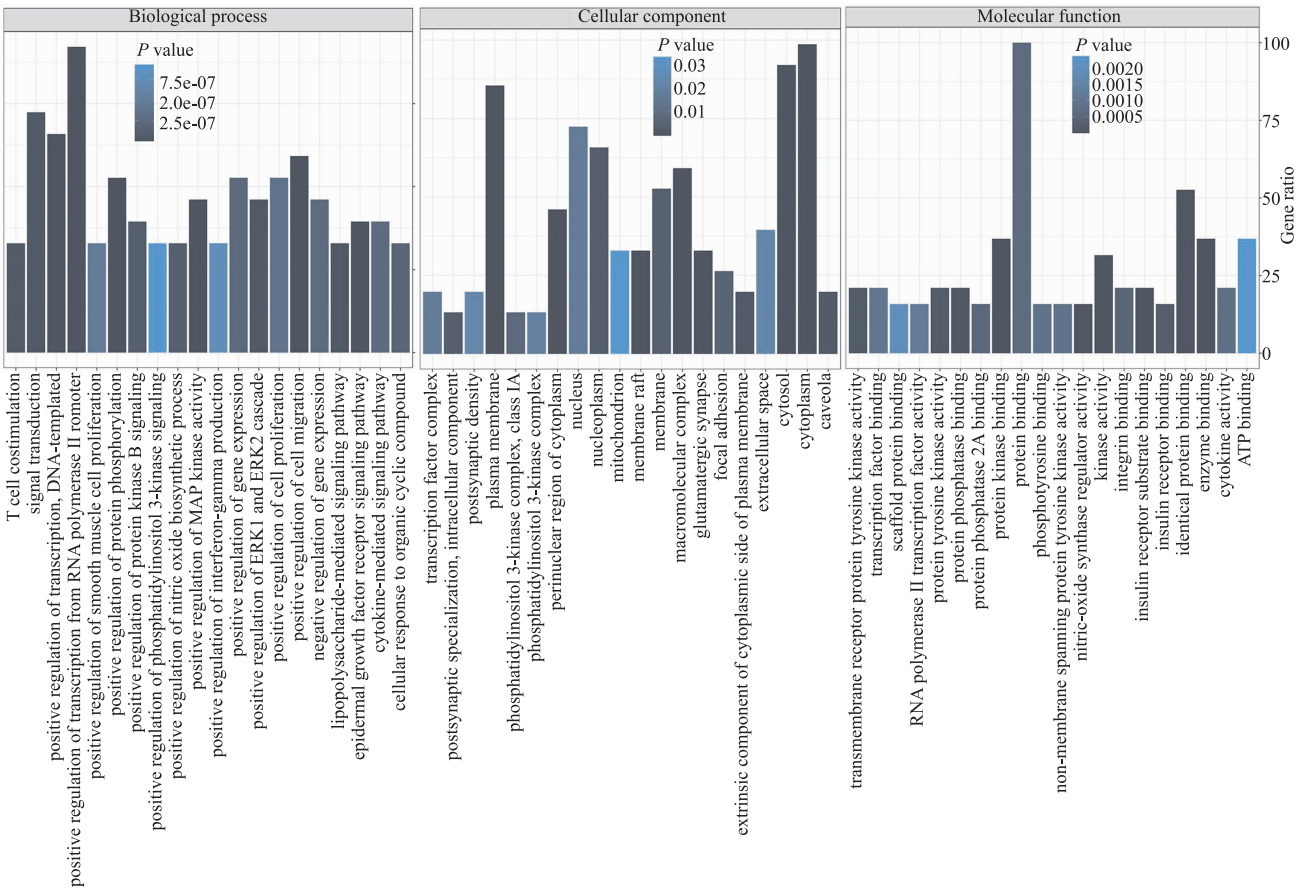

Fig 4 Visual analysis diagram of biological process, cell composition, molecular function

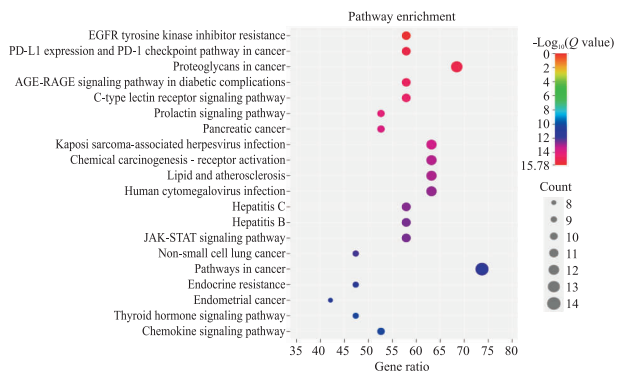

Fig 5 Visual analysis diagram of KEGG

Tab 1 The main active ingredients of JPLSYGF

Molecule name	OB≥30%	DL≥0.18	Multiplicity
EIC	41.9	0.14	10
Prolinum	77.57	0.01	6
Vanillic acid	35.47	0.04	6
Quercetin	46.43	0.28	6
Palmitic acid	19.30	0.10	5
Stigmasterol	43.83	0.76	5
Gamma-aminobutyric acid	24.09	0.01	3
L-Arginin	47.64	0.03	3
Coumarin	29.17	0.04	3
Hirsutrin	1.86	0.77	3
(-)-nopinene	44.84	0.05	3
Mairin	55.38	0.78	1
Jaranol	50.83	0.29	1

Molecule name	OB≥30%	DL≥0.18	Multiplicity
Rhamnocitrin	12.90	0.27	1
alexandrin	20.63	0.63	1
hederagenin	36.91	0.75	1
(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]	36.23	0.78	1
isorhamnetin	49.60	0.31	1
Lupeol	12.12	0.78	1
3-Hydroxy-2-picoline	62.47	0.02	1
(2S)-4-methoxy-7-methyl-2-[1-methyl-1-[(2S	5.38	0.81	1
5′-hydroxyiso-muronulatol-2′	3.65	0.8	1
7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.3	1
(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42	1
13-hydroxy-9	35.60	0.17	1
Arabinose	1.87	0.02	1
isoferulic acid	50.83	0.06	1
Fucopyranose	42.51	0.03	1
Bifendate	31.10	0.67	1
FERULIC ACID (CIS)	54.97	0.06	1
daidzein	19.44	0.19	1
Ononin	11.52	0.78	1
formononetin	69.67	0.21	1
(+)-Syringaresinol	3.29	0.72	1
cis-p-Coumarate	45.98	0.04	1
Flavaxin	8.18	0.5	1
Astraisoflavanin	18.37	0.86	1
Mucronulatol	4.22	0.26	1
Caffeate	54.97	0.05	1
rutin	3.2	0.68	1
Lariciresinol	5.53	0.38	1
Calycosin	47.75	0.24	1
3′-Hydroxy-4′-methoxyisoflavone-7-O-beta-D-glucoside	10.05	0.81	1
XLS	51.08	0.02	1
nicotinic acid	47.65	0.02	1
kaempferol	41.88	0.24	1
rhamnocitrin-3-O-glucoside	2.87	0.76	1
RAM	50.5	0.04	1
Crystal VI	83.96	0.02	1
betaine	40.92	0.01	1
linolenic acid	45.01	0.15	1
FA	68.96	0.71	1
(Z)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one	87.51	0.15	1
isomucronulatol-7	49.28	0.62	1
1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48	1
Pellitorin	23.81	0.06	1
L-Serin	98.47	0.01	1
Threonin	73.52	0.01	1
PHA	41.62	0.04	1
LPG	87.69	0.01	1
GLY	48.74	0	1
Gulutamine	6.66	0.02	1
h-Met-h	70.87	0.01	1
ASI	79.74	0.02	1
L-Ile	59.05	0.02	1
Istidina	53.18	0.03	1
protocatechuic acid	25.37	0.04	1
(L)-alpha-Terpineol	48.8	0.03	1
myristic acid	21.18	0.07	1
Methyllinolenate	46.15	0.17	1
MLT	59.62	0.02	1
Linalool	49.37	0.04	1
poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	1
2-[(1R,3S,4S)-3-isopropenyl-4-methyl-4-vinylcyclohexyl]propan-2-ol	19.03	0.07	1
calacorene	16.2	0.08	1
beta-sitosterol	36.91	0.75	1
alpha-amyrin	10.28	0.76	1
Nonox D	39.82	0.13	1
vanillin	52	0.03	1
DBP	64.54	0.13	1
stearic acid	17.83	0.14	1
Cymol	27.2	0.02	1
ZINC02040970	40.43	0.06	1
1,8-Cineol	39.73	0.05	1
geraniol	23.93	0.02	1
(-)-alpha-Pinene	46.25	0.05	1
NERYLACETATE	25.94	0.04	1
CAM	67.17	0.05	1

2.6 槲皮素与核心靶点蛋白分子对接 将槲皮素与7个核心靶点蛋白AKT1、SRC、VEGFA、STAT3、EGFR、MAPK3、HRAS进行分子对接,结合能数据依次为-5.9、-8.2、-7.2、-8.2、-8.6、-6.8、-8.8 kJ·mol^{-1}。一般认为,结合能-5.0 kJ·mol^{-1},表明这种成分与核心靶点蛋白结合性较好,结合能<-7.0 kJ·mol^{-1},表明此种物质与核心靶点蛋白有很强结合活性。除槲皮素与AKT1、MAPK3的结合能为-5.9、-6.8 kJ·mol^{-1}之外,其余的结合能均<-7.0 kJ·mol^{-1},说明槲皮素与核心靶点蛋白结合良好。槲皮素与和核心靶点蛋白分子对接示意图见Fig 6。

2.7 动物实验验证 随后我们研究了养肝方是否通过以上核心靶点对ACLF发挥治疗作用。收集小鼠血清进行生化指标检验。Fig 7A、B可见与正常组比较,模型组与养肝方组小鼠血清ALT和AST均升高;且与模型组比较,养肝方组ALT及AST均降低,这说明养肝方对ACLF的肝损伤有保护作用,具有一定的生物安全性。Fig 7C HE染色结果可见,

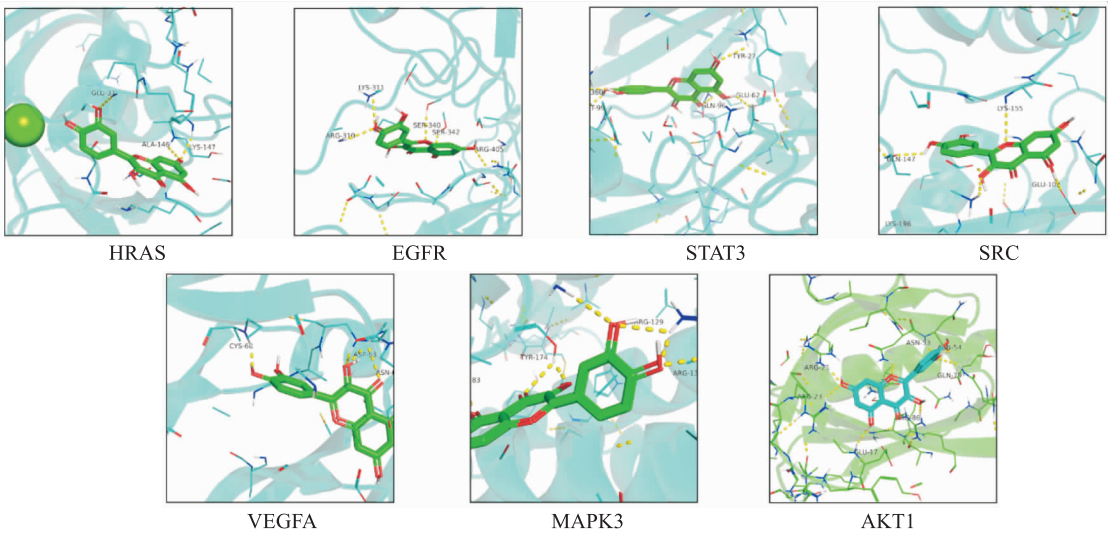

Fig 6 Molecular docking diagram

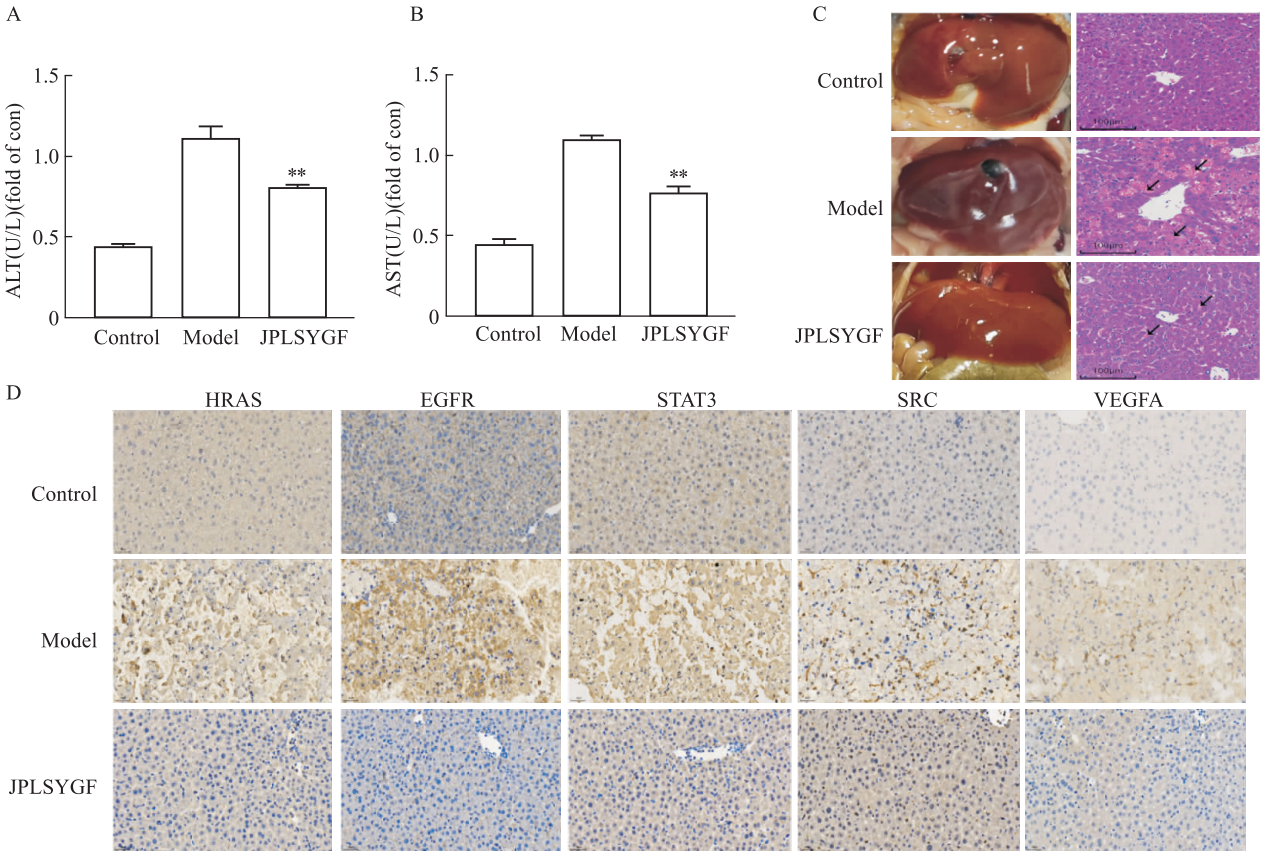

Fig 7 *In vivo* test

The groups in this figure are blank control, model, and JPLSYGF. A. Serum ALT kit detection; B. Serum AST kit detection; C. A general view of liver and HE (×400); D. IHC (×400), $^{**}P<0.01$ *vs* Model group.

正常组小鼠肝细胞形态正常且连接紧密,结构完整,无炎症细胞细润;模型组小鼠的肝细胞肿胀,肝小叶结构紊乱,炎症及 Kupffer 细胞浸润(黑色箭头处);养肝方组肝损伤细胞减少,细胞形态较为完整,结构基本正常,炎症浸润程度也明显降低(黑色箭头处)。随后我们对分子对接的结合能均 < −7.0 kJ · mol^{-1} 的靶点 SRC、VEGFA、STAT3、EGFR、HRAS 进行免疫组化实验,Fig 7D 可见与模型组相比,养肝方均可下调 HRAS、EGFR、STAT3、SRC、VEGFA 蛋白的表达。

3 讨论

ACLF 是一种具有挑战性的疾病,其特征在于不同的临床症状、疾病进展快和高短期死亡率。ACLF 通常由细菌感染(35%)、消化道出血(22%)

和酒精(19%)引发,病理生理学特征为全身性炎症反应并伴有矛盾的免疫缺陷[6]。这种疾病具有明确的发病机制和流行病学负担,因此临床上需要开发特定和有效的疗法来治疗这种疾病。本研究在前期临床研究中筛选出有效中药方剂养肝方,利用网络药理学策略,系统地研究养肝方治疗 ACLF 作用的潜在作用靶点和分子机制,并进行动物体内实验验证。

GO 富集分析显示,生物过程主要包括 T 细胞共刺激、信号转导、RNA 聚合酶 II 对转录的正调控等。细胞组分主要涉及转录因子复合物、突触后特化、突触后密度等。分子功能主要集中在跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、转录因子结合、支架蛋白结合等。ACLF 患者常表现出免疫功能障碍,T 淋巴细胞功能障碍是 ACLF 免疫抑制的重要机制[7]。研究发现,ACLF 中的 T 淋巴细胞功能障碍多表现为 T 淋巴细胞的凋亡增加、增殖能力减弱及反应性降低[8]。KEGG 分析显示,富集显著性较高的通路主要包括癌症中 PD-1 和 PD-L1 检查点信号抑制通路、JAK-STAT 信号通路、趋化因子信号通路、C 型凝集素受体信号通路等。PD-1 主要在活化的 $CD8^+$ T 淋巴细胞中表达,其配体是 PD-L1/PD-L2,PD-L1/PD-L2 共刺激信号通路在 T 淋巴细胞活化、增殖及分泌细胞因子中起重要的负调节作用[9]。Li 等[10]发现 SOCS3 主要通过 JAK/STAT3 信号通路执行其信号转导中的负调节作用,且其表达水平在 HBV-ACLF 患者的肝脏组织和 PBMC 中均显著升高,并与肝损伤程度呈正相关。总结以上研究提示,PD-1/PD-L1 信号通路、JAK/STAT 信号通路可能在 ACLF 的发生和发展中起着重要作用。

本研究选取养肝方治疗 ACLF 的 7 个核心靶点蛋白中结合能前 5 的 HRAS、EGFR、STAT3、SRC、VEGFA 蛋白进行了实验验证。HRAS 参与 RAS/MAPK 途径,负责控制基因转录活动和细胞循环周期,与细胞增殖有关[11]。HRAS 蛋白处于持续激活状态时可导致细胞增殖失控[12]。可见模型组 HRAS 高度活跃,同时养肝方可以下调 HRAS 表达并可维持正常细胞周期。RAS/MAPK 途径也是 EGFR 下游通路之一,EGFR 的过表达或发生突变时,也会导致细胞异常增殖[13]。本实验中模型组可见 EGFR 高度表达,相反养肝方逆转了这一趋势。SRC 作为一种人类普遍表达的蛋白酪氨酸激酶,其异常激活可促进内皮-间充质等过程,将正常细胞转为癌细胞[14]。Du 等[15]通过抑制 SRC 的激活,可阻止肝星状细胞的增殖和迁移,以延缓肝纤维化进程。同样的,养肝方可以抑制 SRC 的激活,这说明养肝方也可延缓慢性肝病肝脏的纤维化进程。Sole 等[16]通过对比研究 55 名肝硬化患者发现 ACLF 患者血浆细胞因子中的 VEGFA 与 ACLF 关系最显著。肝组织炎症及损伤后模型组 VEGFA 分泌增加,血管通透性增加,炎症细胞及细胞因子浸润增加,放大了炎症信号,导致血管渗透、水肿及炎症[17]。养肝方可降低体内炎症反应,下调 VEGFA 表达。促进肝细胞再生是 ACLF 的重要方面,而 STAT3 与肝脏促再生途径有关。Xiang 等[18]研究发现,IL-6/STAT3 通路的破坏会过度激活 IFN-γ/STAT1 通路导致肝再生能力减弱,STAT3 途径的下调有利于 ACLF 的恢复。这与 HE 的实验结果一致,同样在本研究中 ACLF 小鼠表现出显著激活的 STAT3 信号传导,养肝方下调了 STAT3 的表达。

综上所述,养肝方具有健脾益气、清利湿热的功效,其可以作用 HRAS、EGFR、STAT3、SRC、VEGFA 等核心靶点,通过控制细胞增殖、维持细胞周期、抑制内皮-间充质及炎症反应,以达到治疗 ACLF 的作用。

参考文献:

[1] Zaccherini G, Weiss E, Moreau R. Acute-on-chronic liver failure: definitions, pathophysiology and principles of treatment[J]. *JHEP Rep*, 2021, **3**(1): 100176.

[2] 周小舟, 黄俏光, 孙新锋,等. 慢加急性、慢性肝衰竭中医证候规律的研究[J]. 中国中医药科技, 2012, **19**(6): 483-4.

[2] Zhou X Z, Huang Q G, Sun X F, et al. Research on the syndrome of acute-on-chronic liver failure and chronic liver failure in traditional Chinese medicine[J]. *Chin Med Sci Tech*, 2012, **19**(6): 483-4.

[3] 王立福, 李 筠, 李丰衣,等. 中医辨证联合西药治疗慢加急性(亚急性)肝衰竭多中心随机对照研究[J]. 中医杂志, 2013, **54**(22): 1922-5.

[3] Wang L F, Li J, Li F Y, et al. A multicentered, randomize-controlled trail of integrative medicine for acute-on-chronic (subacute) liver failure[J]. *Chin Magazine*, 2013, **54**(22): 1922-5.

[4] 马文峰, 周小舟, 孙新锋,等. 中药治疗肝衰竭患者内毒素血症疗效评价[J]. 辽宁中医杂志, 2014, **41**(1): 127-8.

[4] Ma W F, Zhou X Z, Sun X F, et al. Evaluation of the efficacy of traditional Chinese medicine in the treatment of endotoxemia in patients with liver failure[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2014, **41**(1): 127-8.

[5] 柏 远, 陈 晓, 李 竣,等. 基于网络药理学和分子对接探讨藏药唐古特乌头抗炎作用机制[J]. 中国药理学通报, 2023, **39**(1): 161-9.

[5] Bai Y, Chen X, Li J, et al. The anti-inflammatory mechanism of Aconitum tanguticum based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2023, **39**(1): 161-9.

[6] Abbas N, Rajoriyan N, Elsharkawy A M, et al. Acute-on-chronic liver failure (ACLF) in 2022: Have novel treatment paradigms already arrived[J]? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, **16**(7): 639-52.

[7] Casulleras M, Zhang I W, Lopez-vicario C, et al. Leukocytes, systemic inflammation and immunopathology in acute-on-chronic liver failure[J]. *Cells*, 2020, **9**(12):2632.

[8] Albillos A, Lario M, Alvarez-mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance[J]. *J Hepatol*, 2014, **61**(6): 1385-96.

[9] Kuol N, Stojanovska L, Nurgali K, et al. PD-1/PD-L1 in disease[J]. *Immunotherapy*, 2018, **10**(2): 149-60.

[10] Li Y, Han M F, Li W N, et al. SOCS3 expression correlates with severity of inflammation in mouse hepatitis virus strain 3-induced acute liver failure and HBV-ACLF[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2014, **34**(3): 348-53.

[11] Simanshu D K, Nissley D V, Mccormick F. RAS proteins and their regulators in human disease[J]. *Cell*, 2017, **170**(1): 17-33.

[12] Jung J, Cho K J, Naji A K, et al. HRAS-driven cancer cells are vulnerable to TRPML1 inhibition[J]. *EMBO Rep*, 2019, **20**(4): e46685.

[13] Ma P, Fu Y, Chen M, et al. Adaptive and acquired resistance to EGFR inhibitors converge on the MAPK pathway[J]. *Theranostics*, 2016, **6**(8): 1232-43.

[14] Kalia L V, Gingrich J R, Salter M W. Src in synaptic transmission and plasticity[J]. *Oncogene*, 2004, **23**(48): 8007-16.

[15] Du G, Wang J, Zhang T, et al. Targeting Src family kinase member Fyn by saracatinib attenuated liver fibrosis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cell Death Dis*, 2020, **11**(2): 118.

[16] Sole C, Sola E, Morales-ruiz M, et al. Characterization of inflammatory response in acute-on-chronic liver failure and relationship with prognosis[J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 32341.

[17] Katoh M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/beta-catenin signaling activation (review)[J]. *Int J Mol Med*, 2018, **42**(2): 713-25.

[18] Xiang X, Feng D, Hwang S, et al. Interleukin-22 ameliorates acute-on-chronic liver failure by reprogramming impaired regeneration pathways in mice[J]. *J Hepatol*, 2020, **72**(4): 736-45.

The molecular mechanism of spleen-strengthening and moisture-nourishing liver prescription in treatment of acute-on-chronic liver failure based on network pharmacology and experimental verification

Huang Qi[1,2], LI Jing[3], MA Wen-feng[1,2], HAN Zhi-yi[1,2], SUN Jia-ling[1,2], ZHANG Wei[1,2], SUN Xin-feng[1,2], CHEN Jian-ping[1,4], ZHOU Xiao-zhou[1,2,3]

[1. *School of the Fourth Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou* 510006, *China*; 2. *National Key Specialty of Clinical Liver Disease (Traditional Chinese Medicine) of Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen Guangdong* 518033, *China*; 3. *School of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau* 999078, *China*; 4. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formulation Research, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen Guangdong* 518033]

Abstract: Aim To explore the mechanism of spleen-strengthening and moisture-nourishing liver prescription (JPLSYGF) in the treatment of acute-on-chronic liver failure using network pharmacology and the molecular docking. **Methods** Relying on TCMSP and GeneCards and other databases, the relevant targets of JPLSYGF in the treatment of acute-on-chronic liver failure were obtained. String and Cytoscape were used to construct PPI networks of targets, core targets were screened out, and DAVID was used for GO function annotation and KEGG pathway enrichment analysis. The main active ingredients of the traditional Chinese medicine compound formula for JPLSYGF were selected with a bioavailability OB value of ≥ 30% and a drug-like DL≥0.18 as the screening conditions, and the molecular docking and in vivo tests were carried out on the affinity of the main active ingredient with the core target. **Results** A total of 536 active ingredients were obtained for the treatment of acute-on-chronic liver failure, and 244 intersecting target genes and 7 core target genes were screened. Molecular docking showed that the core target genes AKT1, SRC, VEGFA, STAT3, EGFR, MAPK3, HRAS had good affinity with quercetin, the main active component in the JPLSYGF, and had strong binding activity. In addition, in vivo tests verified that the JPLSYGF could reduce the expression of HRAS, EGFR, STAT3, SRC, and VEGFA, to delay the progression of acute-on-chronic liver failure. **Conclusions** JPLSYGF may act on core targets such as HRAS, EGFR, STAT3, SRC, VEGFA and so on, to achieve the effect of treating acute-on-chronic liver failure.

Key words: spleen-strengthening and moisture-nourishing liver prescription; acute-on-chronic liver failure; network pharmacology; molecular docking; signaling pathway; quercetin