

茵陈蒿汤体内成分分析及其抗肝癌作用机制的网络药理学研究

张霖峰, 孙宇恒, 王冬尧, 李丹, 曹岩, 吕狄亚

Analysis of blood entry component of Yinchenhao decoction *in vivo* and study on the mechanism of its anti-hepatocellular carcinoma by network pharmacology

ZHANG Linfeng, SUN Yuheng, WANG Dongyao, LI Dan, CAO Yan, LYU Diya

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202501017>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于网络药理学和分子对接技术探究定清片活性成分治疗白血病的作用机制

Mechanism of effective ingredients of Dingqing tablets in the treatment of leukemia based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 479–486 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202401073](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202401073)

基于UHPLC-Q-TOF/MS结合网络药理学研究柴胡桂枝干姜汤治疗慢性非萎缩性胃炎的物质基础及疗效机制

Exploring effective components and therapeutic mechanism of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction in treatment of chronic non-atrophic gastritis by UHPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacology

药学实践与服务. 2025, 43(9): 455–462 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202312061](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202312061)

基于网络药理学探讨参苓白术散治疗肿瘤恶病质的作用机制

Molecular mechanism of Shenling Baizhu powder in treatment of cancer cachexia based on network pharmacology

药学实践与服务. 2025, 43(5): 242–250 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202208115](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202208115)

基于网络药理学与分子对接预测鸡骨草特征图谱研究

Prediction of characteristic chromatogram for Abri Herba based on network pharmacology and molecular docking

药学实践与服务. 2024, 42(8): 350–358 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202303048](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202303048)

基于网络药理学与分子对接技术研究制痲酊治疗Ⅱ度烧伤的作用机制

The mechanism of Medicoscab tincture in the treatment of second-degree burns based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2025, 43(8): 377–382, 399 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202307014](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202307014)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

茵陈蒿汤体内成分分析及其抗肝癌作用机制的网络药理学研究

张霖峰, 孙宇恒, 王冬尧, 李 丹, 曹 岩, 吕狄亚 (海军军医大学药理学系, 上海 200433)

[摘要] **目的** 完善茵陈蒿汤体内入血成分的分析, 探究其抗肝癌的作用机制。**方法** ①采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术, 对单次灌胃给予茵陈蒿汤 25 ml/kg (含生药 0.1 g/ml) 2 h 后的小鼠进行血液样本采集并分析, 系统研究茵陈蒿汤在体内的化学成分; ②利用网络药理学方法筛选茵陈蒿汤成分及其靶点与肝癌靶点; ③找出茵陈蒿汤与肝癌的共同靶点进行 GO 富集和 KEGG 富集; ④对主要靶点进行分子对接, 以验证活性成分与核心靶点结合能力。⑤通过 qPCR 技术分析茵陈蒿汤水煎液及口服预防给药 14 d 后和未经预防给药的, 刀豆蛋白 A (con-A) 所致急性肝损伤小鼠以及未作任何处理的对照组小鼠的肝脏组织中 AKT1 和 TP53 的 mRNA 的相对表达量。**结果** ①以体外成分分析数据检索, 鉴定了茵陈蒿汤入血后的活性成分。分别是大黄酚、7-甲氧基香豆素、芦荟大黄素、水晶兰苷; ②利用网络药理学方法进一步分析入血成分抗肝癌的作用机制, 共筛选茵陈蒿汤成分 30 个, 靶点 213 个、肝癌靶点 215 个; ③茵陈蒿汤与肝癌交集靶点 17 个, 包括丝氨酸和苏氨酸激酶 (AKT1)、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、酪氨酸激酶受体 2 (ERBB2)、人类转录因子 MYC、白介素-1 β (IL-1 β) 等; GO 富集结果显示, 这些靶点主要涉及 DNA 复制、染色体分离、白细胞介导的免疫、白细胞细胞间黏附等; KEGG 富集结果显示, 其主要涉及多种癌症通路、柠檬酸循环 (TCA 循环) 丙酮酸代谢、p53 信号通路等; ④分子对接结果显示, 大黄酚、7-甲氧基香豆素、芦荟大黄素与 AKT1、TP53、ERBB2、MYC、IL-1 β 皆有较强的结合能力。⑤造模组的 AKT1 和 TP53 的 mRNA 相对表达量明显高于对照组, 给药组的 AKT1 和 TP53 的 mRNA 相对表达量明显低于造模组。**结论** 鉴定得到茵陈蒿汤 4 种入血成分, 其中, 大黄酚、7-甲氧基香豆素、芦荟大黄素可能作用于 AKT1、TP53、ERBB2、MYC、IL-1 β , 进而参与调控癌症通路、p53 信号通路等, 是茵陈蒿汤抗肿瘤作用的潜在活性成分。

[关键词] 茵陈蒿汤; UPLC-Q-TOF/MS; 入血成分; 网络药理学; 分子对接; 肝癌

[文章编号] 2097-2024(2025)00-0001-09 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202501017

Analysis of blood entry component of Yinchenhao decoction *in vivo* and study on the mechanism of its anti-hepatocellular carcinoma by network pharmacology

ZHANG Linfeng, SUN Yuheng, WANG Dongyao, LI Dan, CAO Yan, LYU Diya (School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To improve the analysis method of the blood components of Yinchenhao decoction (YCHD) *in vivo* and explore its anti-hepatocellular carcinoma mechanism. **Methods** ①Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) was used to collect and analyze blood samples from mice. The mice were given a single dose of YCHD with a concentration of 0.1 g/ml and a dose of 25 ml/kg, and then the samples were collected 2 h post-administration, which was to systematically study the chemical components of YCHD *in vivo*. ②Network pharmacological methods were used to screen the components and targets of YCHD, and the targets of hepatocellular carcinoma; ③The common targets of YCHD and hepatocellular carcinoma were identified for GO enrichment and KEGG enrichment; ④Molecular docking was performed on the main targets to verify the binding ability between the active ingredients and the core targets. ⑤Analysis of the relative mRNA expression levels of AKT1 and TP53 in liver tissues via qPCR, including the following mouse groups: mice with concanavalin A (Con-A)-induced acute liver injury without preventive administration, mice with Con-A-induced acute liver injury that received 14-day preventive oral administration of YCHD, and untreated control mice. **Results** ①The active ingredients of YCHD in the blood were identified by retrieving the data from the *in vitro* component analysis. They were chrysophanol, herniarin, aloe-emodin, and monotropein. ②The mechanism of action of the blood components against hepatocellular carcinoma (HCC) was further analyzed using network pharmacological methods, and a total of 30 components

[基金项目] 海军军医大学大学生创新能力培养计划课题 (MS2024042)

[作者简介] 张霖峰, 本科生, Tel: 15821830354, Email: 2945405415@qq.com

[通信作者] 曹 岩, 硕士生导师, 研究方向: 高通量筛选分子相互作用, Email: caoyan@smmu.edu.cn; 吕狄亚, 硕士生导师, 研究方向: 中药复杂体系分析, Email: lvydy2020@smmu.edu.cn

of YCHD were screened for 213 targets and 215 HCC targets; ③There were 17 intersection targets between YCHD and hepatocellular carcinoma, including RAC- α serine/threonine-protein kinase(AKT1), Cellular tumor antigen p53(TP53), receptor tyrosine-protein kinase erbB-2(ERBB2), Myc proto-oncogene protein(MYC), interleukin-1 β (IL-1 β), etc. The GO enrichment results indicated that these components were primarily involved in DNA replication, chromosome segregation, leukocyte mediated immunity, leukocyte cell-cell adhesion. The KEEG enrichment results demonstrated that these components were predominantly associated with diverse cancer pathways. Additionally, the results indicated involvement in the citrate cycle (TCA cycle), pyruvate metabolism, and p53 signaling pathway, ect. ④the results of molecular docking showed that chrysophanol, herniarin, and aloe - emodin had strong binding abilities with AKT1, TP53, ERBB2, MYC, and IL-1 β .⑤the relative expression of AKT1 and TP53 mRNA was significantly higher in the modelling group than in the control group. The relative expression of AKT1 and TP53 mRNA was significantly lower in the drug administration group than in the modelling group. **Conclusion** There were 4 blood components in YCHD, among which chrysophanol, herniarin, and aloe-emodin may act on AKT1, TP53, ERBB2, MYC, IL-1 β and then participated in the regulation of cancer signaling pathways and p53 signaling pathway to play a role in the treatment of HCC.

[Key words] Yinchenhao decoction; UPLC-Q-TOF/MS; blood components; network pharmacology; molecular docking; hepatocellular carcinoma

茵陈蒿汤是《伤寒杂病论》中治疗湿热黄的名方,具有保肝利胆等功效,由茵陈、栀子和大黄三味药材组成,其中,茵陈为君药,栀子为臣药,大黄为佐药,3种药材协同作用^[1]。肝癌属于中医“黄疸”“肝积”“瘤瘕”等范畴,在治疗肝癌的经典方剂中,该方使用频次位列前三^[2]。然而,目前对于茵陈蒿汤体内发挥抗肝癌作用的化学物质基础和作用机制缺乏深入系统的研究。

目前,茵陈蒿汤的研究集中在对其体外化学物质组进行定性定量及其保肝成分的探究^[3],为了解茵陈蒿汤的化学成分、保肝作用机制提供了全面的分析,并通过实验数据支持了其保肝效果,为茵陈蒿汤的进一步研究和临床应用提供了科学依据。为了完善茵陈蒿汤体内入血成分的分析,本研究首先采用超高效液相色谱结合四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)对茵陈蒿汤的入血成分进行分析。该技术全面的数据采集方法及数据后处理分析策略,可实现复方提取物及体内微量成分的准确、高效、全面的识别,为茵陈蒿汤的入血成分分析及鉴定提供有效帮助。其次,采用高通量的分子对接技术,预测茵陈蒿汤中活性化学成分的潜在作用靶点,构建“成分-靶标”网络,从网络药理学的角度阐述茵陈蒿汤抗肝癌的作用机制,为推进茵陈蒿汤的药效研究提供基础,并为其体内有效成分的鉴定提供新的有效的检测与鉴定体系,为茵陈蒿汤现代化研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 仪器

UPLC-Q-TOF/MS, 包含 Infinity-6538 UHD 及

Accurate-Mass QTOF 系统、Agilent 6538 UHD 飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司); LABOFUGE 400R←HERAEUS FRESCO17 离心机(美国 Thermo-Fisher 公司); VORTEX GENIE 2 涡旋仪(美国 Scientific Industries 公司); JY10001 十分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司); DJ-04 药材粉碎机(上海定久中药机械制造有限公司)。

1.2 试剂与材料

甲酸(德国 Honeywell 公司, 色谱级); 乙腈(德国 Merck 公司, 质谱级); 屈臣氏蒸馏水(屈臣氏香港有限公司); 茵陈蒿汤组方饮片[茵陈蒿(干燥地上部分)、栀子(干燥成熟果实)和大黄(干燥根和茎)]均来自上海长海医院。刀豆蛋白 A(ConA) Sigma 公司, 用生理盐水配制成 2.5 mg/ml 溶液; TRIzol 试剂(Invitrogen)、BCA 蛋白测定试剂盒(Biotech)、反转录试剂盒(Applied Biosystems)、SYBR Green 荧光染料(Applied Biosystems); 引物: AKT、TP53 及内参基因 β -actin 的引物(由 MWG Operon 合成, 序列经 Primer Express 软件验证)。

1.3 茵陈蒿汤水煎液的制备

称量茵陈约 18 g、栀子约 9 g、大黄约 6 g, 粉碎栀子和大黄。茵陈加入适量蒸馏水浸泡 50 min, 之后先取茵陈加入蒸馏水 600 ml, 煮沸后慢煎至 300 ml, 约 20 min; 随加入栀子和大黄煎煮约 30 min, 趁热过滤。沉渣再加入蒸馏水 600 ml 煎煮 30 min, 趁热过滤。合并滤液浓缩至 330 ml, 相当于生药浓度 0.1 g/ml。经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

1.4 实验动物

BALB/c 小鼠 27 只, 雄性, 质量 22 ~ 28 g, 鼠龄

6~8 周,购自上海中英合作 SIPPR/BK 实验动物有限公司。小鼠于动物房中饲养 1 周以适应环境。给药前禁食 12 h,自由饮水。饲养环境保持 12h 光照与黑暗循环,环境温度 20~25℃,相对湿度 50%~70%,期间自由饮水进食,实验前禁食 12 h,自由饮水。本实验动物饲养于海军军医大学药理学系动物实验中心,本研究中所有实验动物的使用获得海军军医大学伦理委员会批准(批号 19YF1459400)。待实验结束,遵循医药科委员会动物实验职业道德的规定执行。

1.5 给药方案

取 9 只小鼠禁食 12 h(可自由饮水)后随机分为对照组、给药组、空白组。每组 3 只给药组灌胃给予茵陈蒿汤水煎液 25 ml/kg(含生药 0.1 g/ml),对照组以相同体积无菌生理盐水灌胃,空白组不做任何处理。2 h 后 3 组小鼠分别眼眶取血,于预冷肝素钠离心管内静置 2 h,于 4℃ 环境中 3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清于-80℃ 冰箱保存,待测。

1.6 血浆样品处理

精密量取血清 200 μ l,用 3 倍量预冷甲醇(含 2 μ g/ml 氯苯丙氨酸,内标)复溶,涡旋混合 10 min;在 4℃ 条件下,13 000 r/min 离心 15 min,取上清液;冷冻浓缩后,用预冷甲醇 100 μ l 复溶。在 4℃ 条件下,13 000 r/min 再次离心 15 min,取上清液,待测。

1.7 茵陈蒿汤体内成分鉴定的检测条件

1.7.1 液相条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm \times 100 mm, 2.5 μ m, Waters, Milford, MA),流动相采用 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)溶液系统,梯度洗脱如下:0~2 min, 2%B;2~17 min, 2%~98%B;17~19 min, 98%B;平衡时间 5 min,流速 0.4 ml/min;柱温 40℃,自动进样器温度 4℃,血清进样量 4 μ l,分析时间 19 min。

1.7.2 质谱条件

质谱仪采用电喷雾离子源,毛细管电压 4 000 V(正离子)/3 500 V(负离子);离子源温度,350℃;干燥气体流速,11 L/min;雾化器压力,45 psig;碎片电压,120 V;skimmer 电压,60 V。采集范围,50~1 500 m/z ,参比离子正离子 $[M+H]^+$, 121.050 9 和 922.009 8;负离子 $[M-H]^-$, 119.036 3 和 966.000 7。

1.8 茵陈蒿汤入血成分的网络药理学研究

1.8.1 体内鉴定茵陈蒿汤的有效成分

运用质谱技术分别在正、负离子模式下获得茵

陈蒿汤入血成分的总离子流图。采集与处理数据,根据课题组前期研究结论^[4],整理得到茵陈蒿汤原形入血有效化合物成分,对比分析正负离子模式、保留时间对应入血成分、极性、水溶性及波峰等,定性分析入血化学成分。

1.8.2 茵陈蒿汤成分-靶点相互作用图绘制

采用 TCMSP 2.3、TCMID 2.0 数据库^[5-6]获取茵陈、栀子、大黄入血成分及蛋白靶标获取,然后利用 UniProt 数据库^[7]中 UniProt KB 检索功能对蛋白靶标进行逐一检索,对蛋白靶标进行一一对应的基因名称转换,获取茵陈蒿汤入血成分的作用靶点并利用 Cytoscape 对成分-靶点进行绘图。

1.8.3 肝癌靶点的获取

利用数据库 Gene Cards 数据库(<https://www.genecards.org/>)^[8]以“Hepatocellular carcinoma”进行检索,获取肝癌作用靶点。利用 Venny2.1.0 在线工具,获得茵陈蒿汤和肝癌共同作用靶点,即是茵陈蒿汤治疗肝癌的作用靶点。

1.8.4 蛋白互作网络的构建

靶点蛋白关系网络构建将共同作用靶点输入到 String 数据库(<https://cn.string-db.org/>)^[9]“Multipleproteins”检索框中,蛋白种类设置为“homosapiens”,获取蛋白质相互作用关系,并通过 Cytoscape 3.7.2 软件绘制蛋白互作 PPI 网络图。

1.8.5 GO 通路和 KEGG 通路富集分析

利用 Metascape(<https://metascape.org/gp/index.html>)^[10]以及 WebGestalt 2024(<https://www.webgestalt.org/>)^[11]对 17 个共同作用靶点进行生物过程、细胞组分和分子功能的 GO 分析和 KEGG 富集分析。

1.8.6 茵陈蒿汤体内活性成分与靶标的分子对接

选择 PPI 网络中 Dgree 值最高的 5 个靶点,认为这 5 个靶点是茵陈蒿汤治疗肝癌的核心靶点。使用 AutoDock Tools v4.2.6 和 PYMOL 3.1.1 等软件对将筛选得到的 3 个活性成分与交集靶点进行分子对接验证,分析其结合能和相互作用模式。

1.9 基于 qPCR 的茵陈蒿汤网络药理学结果验证

1.9.1 预防给药及急性肝损伤模型建立

将 18 只小鼠随机分为 3 组,给药组、模型组与空白组,每组 3 只。给药组按照体重灌胃给药茵陈蒿汤水煎液(30 ml/kg),连续 14 d;模型组与空白组相同剂量灌胃无菌生理盐水。末次灌胃后,模型组与给药组按照小鼠体重 15 mg/kg 的剂量给予尾静脉注射 con-A 构建急性肝损伤模型^[12];空白组小鼠给予等量的无菌生理盐水;给药组剂量 30 ml/kg^[13-15]。

1.9.2 样本制备

3 组小鼠分别于造模后 8 h 处死, 收集肝组织。取肝组织约 100 mg, 加入 Trizol 试剂匀浆, 12 000×g 离心 10 min, 收集上清液, 通过紫外分光光度计检测 RNA 浓度, 取 250 ng 总 RNA, 使用反转录试剂盒合成 cDNA, 反应条件: 25 ℃ 10 min, 37 ℃ 120 min, 85 ℃ 5 min。

1.9.3 qPCR 检测

反应体系 (20μl): cDNA 模板 2μl, 2×SYBR Green Master Mix 10μl, 正/反向引物 (10μmol/L) 各 0.5μl, 无菌水 7μl; 反应条件: 95 ℃ 预变性 10 min; 40 个循环 (95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min); 使用 2-ΔΔCt 计算并比较 AKT1 和 TP53 基因的相对表达量。

2 结果与讨论

2.1 体内探究鉴定茵陈蒿汤的有效成分

整理得到茵陈蒿汤原形入血有效化合物成分库, 对比分析正负离子模式、保留时间对应量化入血成分、极性、水溶性及波峰(图 1)。采集与处理数据, 整理得到茵陈蒿汤原型入血成分共 4 个

(表 1), 分别是大黄酚(chrysophanol)、7-甲氧基香豆素(herniarin)、芦荟大黄素(aloe-emodin)和水晶兰苷(monotropein)。

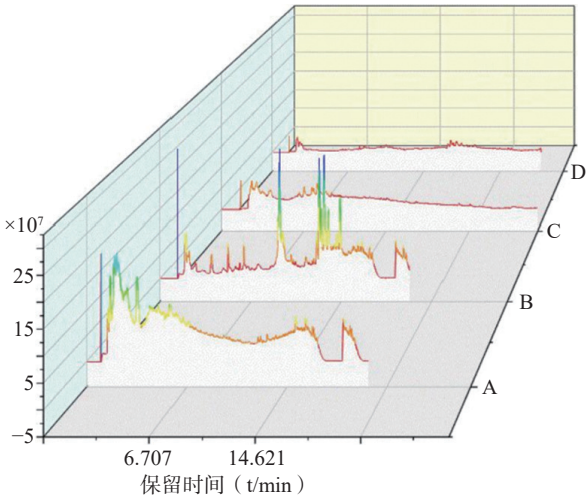


图 1 茵陈蒿汤体内外成分对比
A. 正离子模式下茵陈蒿汤体外成分质谱图^[4]; B. 正离子模式下茵陈蒿汤入血成分质谱图; C. 负离子模式下茵陈蒿汤体外成分质谱图^[4]; D. 负离子模式下茵陈蒿汤入血成分质谱图

表 1 通过 UPLC-QTOF/MS 鉴定出的血浆样品中茵陈蒿汤的入血成分

序号	化学式	加合物	保留时间(t/min)	质荷比	得分	误差率	名称
1	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	8.261	254.056 9	92.6	-5.15	大黄酚
2	C ₁₀ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	5.388	177.055 1	85.46	-2.95	7-甲氧基香豆素
3	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	9.858	270.052 3	98.51	-1.86	芦荟大黄素
4	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	4.382	390.116 5	74.5	-3.04	水晶兰苷

2.2 茵陈蒿汤成分-靶点的获取以及网络图的构建
通过 TCMSP 数据库对茵陈蒿汤入血成分的

靶点进行预测。将入血成分和靶点输入 Cytoscape 软件形成网络图(图 2)。

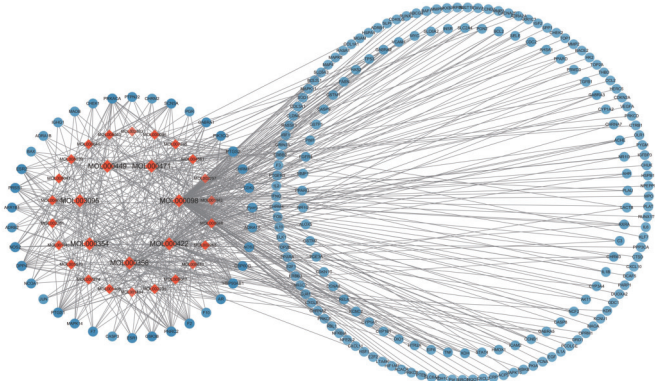


图 2 茵陈蒿汤关键成分-靶点相互作用网络图
注: 红色代表茵陈蒿汤关键成分; 蓝色代表茵陈蒿汤主要作用靶点。

根据高通量对接得到的茵陈蒿汤活性化合物靶标信息, 构建“成分-靶标”网络, 直观地表现中药复方“多成分-多靶标”的作用特点, 揭示复方配伍起效的机制。构建的网络图如图 4 所示, 该图包含 244 个节点: 红色代表茵陈蒿汤关键成分, 蓝色

代表茵陈蒿汤主要作用靶点。

2.3 交集靶点及相互作用网络构

利用在线 Venn2.1 分析工具获得茵陈蒿汤成分的靶点和肝癌靶点的交集, 并绘制 Venn 图(图 3)。交集靶点信息具体见表 2。将交集靶点输

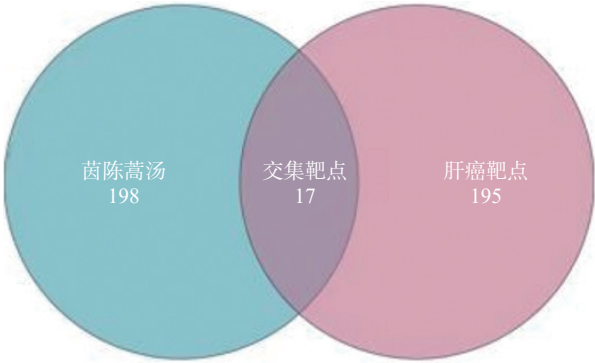


图 3 茵陈蒿汤潜在作用靶点与肝癌靶点交集的韦恩图

入 String 网站,将其数据文件导入 Cytoscape 软件,最终得到其 PPI 网络图(图 4),Degree 值越大节点越大。筛选出 Degree 值排前五位的靶点,分别为 AKT1、TP53、ERBB2、MYC 和 IL-1 β ,并认为这是茵陈蒿汤作用的关键靶点。

2.4 通路富集分析结果

利用 Metascape 对共同作用靶点进行 GO 富集

(图 5),主要涉及 DNA 复制、染色体分离、白细胞介导的免疫和白细胞细胞间黏附等;KEEG 富集结果(图 6)主要涉及多种癌症通路、柠檬酸循环(TCA 循环)、丙酮酸代谢、碳代谢铁突变、黑色素生成、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、P53 信号通路、Toll 样受体信号通路、军团菌病、醛固酮调节的钠重吸收途径、细菌入侵上皮细胞、碳水化合物消化和吸收、II 型糖尿病、小细胞肺癌、南美锥虫病、碱基切除修复、同源重组、内分泌和其他因子调节的钙重吸收以及补体和凝血级联等多条通路。

2.5 分子对接结果

采用 AutoDock 软件对“成分-靶点”中相关度较高并在入血成分中检测的主要成分与 PPI 网络中自由度较高的前 5 个重要靶点进行分子对接显示,大黄酚、7-甲氧基香豆素和芦荟大黄素与 5 个靶点的结合自由能均小于-18 kJ/mol(表 3)。分子对接可视化模型见图 7~11。

表 2 茵陈蒿汤与肝癌的交集靶点信息

中文名称	英文名称	简称
雌激素受体1	estrogen receptor 1	ESR1
雄激素受体	androgen receptor	AR
细胞色素P450-CAM	cytochrome p450-cam	FGFR4
凋亡调控蛋白BAX	apoptosis regulator bax	BAX
半胱氨酸蛋白酶-8	caspase-8	CASP8
RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	rac-alpha serine/threonine-protein kinase	AKT1
G1/S特异性周期蛋白D1	g1/s-specific cyclin-d1	CCND1
周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2a	CDKN2A
细胞肿瘤抗原p53(p53蛋白)	cellular tumor antigen p53	TP53
表皮生长因子受体2	receptor tyrosine-protein kinase erbb-2	ERBB2
原癌基因MYC蛋白	myc proto-oncogene protein	MYC
白介素-1 β	interleukin-1 β	IL-1 β
磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 3-磷酸酶和双特异性蛋白磷酸酶	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase	PTEN
髓过氧化物酶	myeloperoxidase	MPO
NAD(P)H脱氢酶(醌)1	nad(p)h dehydrogenase [quinone] 1	NQO1
检查点激酶2	serine/threonine-protein kinase chk2	CHEK2
干扰素调节因子1	interferon regulatory factor 1	IRF1

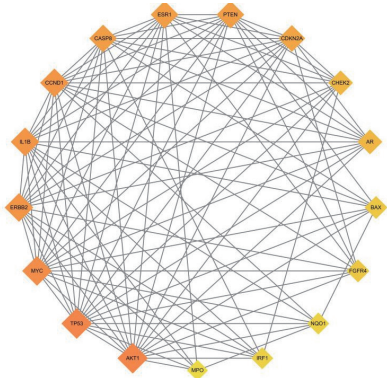


图 4 茵陈蒿汤与肝癌交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图

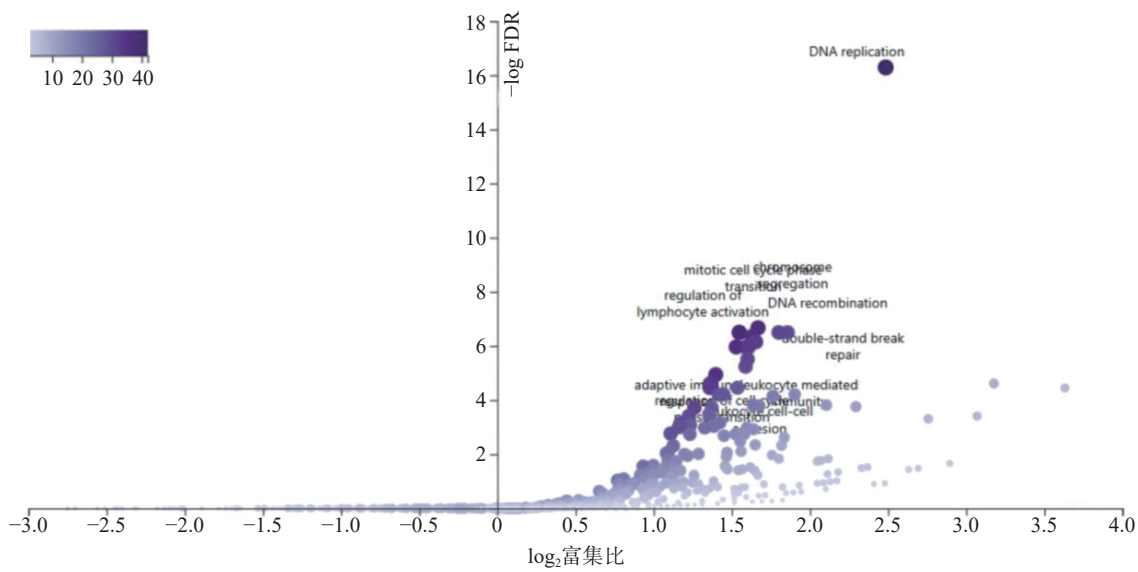


图 5 茵陈蒿汤与肝癌交集靶点的 GO 富集分析

注: 图中的点代表不同的 GO 富集通路, 点的颜色深浅反映该 GO 富集通路中基因的数量, 颜色越深表示基因数量越多。

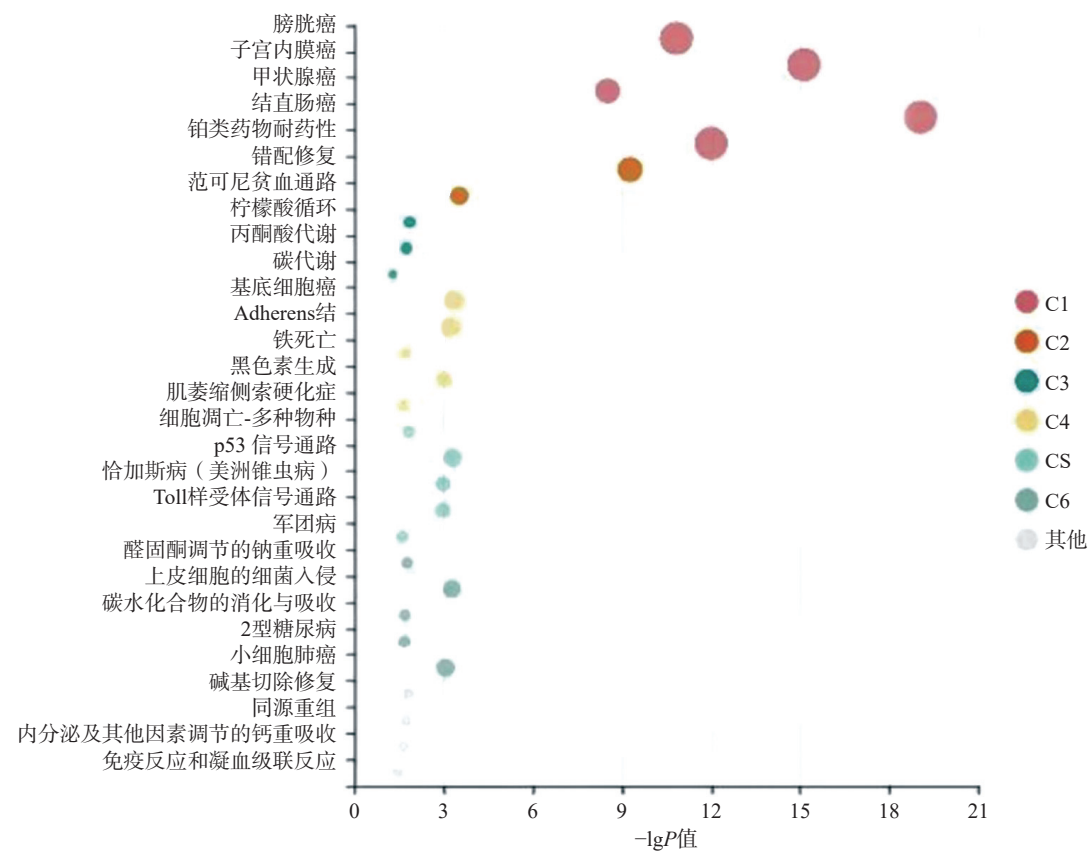


图 6 茵陈蒿汤与肝癌交集靶点的 KEEG 富集分析

注: 点的大小反映了该 KEEG 富集通路中基因的数量, 点越大表示基因数量越多。

表 3 茵陈蒿汤 3 种活性成分与核心靶点的分子对接结合自由能分析

活性成分	结合自由能(kJ/mol)				
	AKT1	TP53	ERBB2	MYC	IL-1β
大黄酚	-22.175 2	-23.221 2	-22.509 92	-21.003 68	-27.028 64
7-甲氧基香豆素	-22.258 88	-20.961 84	-21.673 12	-18.702 48	-20.292 4
芦荟大黄素	-23.597 76	-22.886 48	-22.091 52	-19.957 68	-24.894 8

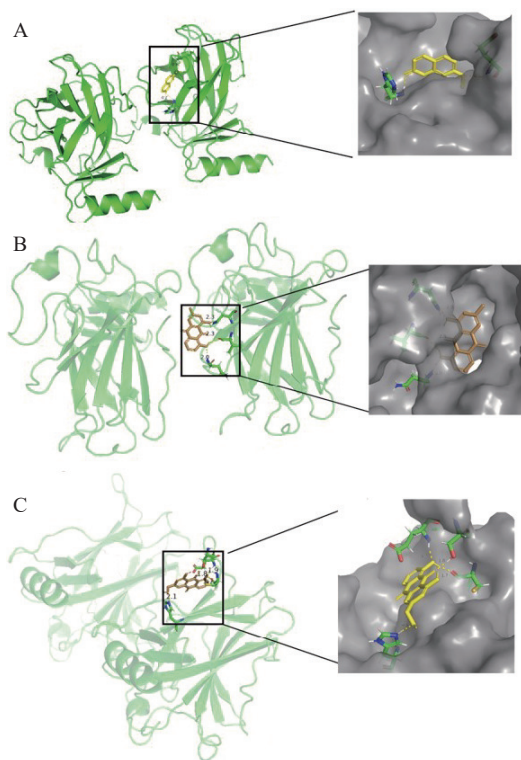


图 7 TP53 分子对接示意图

A.TP53-7-甲氧基香豆素分子对接; B.TP53-芦荟大黄素分子对接;
C.TP53-大黄酚分子对接

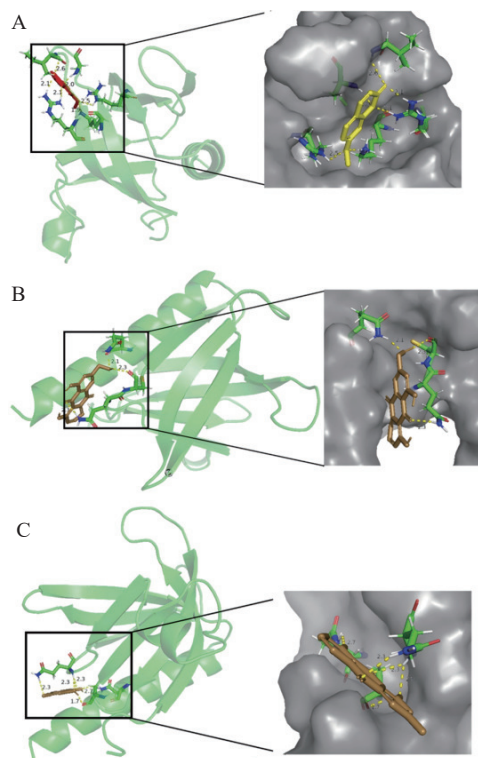


图 8 AKT1 分子对接示意图

A.AKT1-7-甲氧基香豆素分子对接; B.AKT1-芦荟大黄素分子对接;
C.AKT1-大黄酚分子对接

2.6 qPCR 检测

与对照组相比,模型组的 AKT1 和 TP53 的

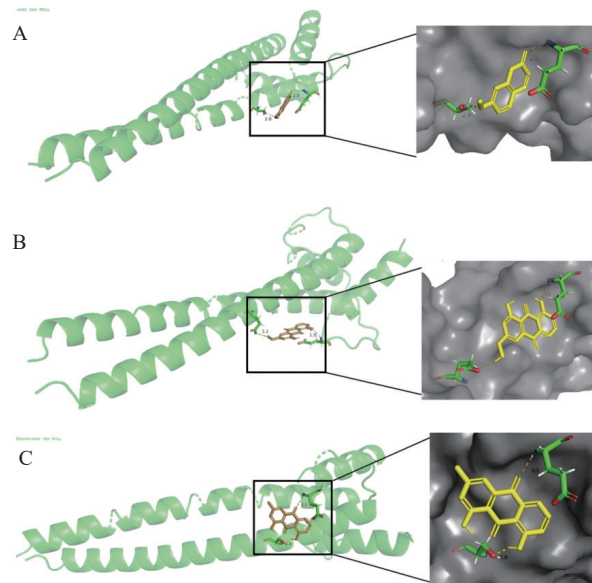


图 9 MYC 分子对接示意图

A.MYC-7-甲氧基香豆素分子对接; B.MYC-芦荟大黄素分子对接;
C.MYC-大黄酚分子对接

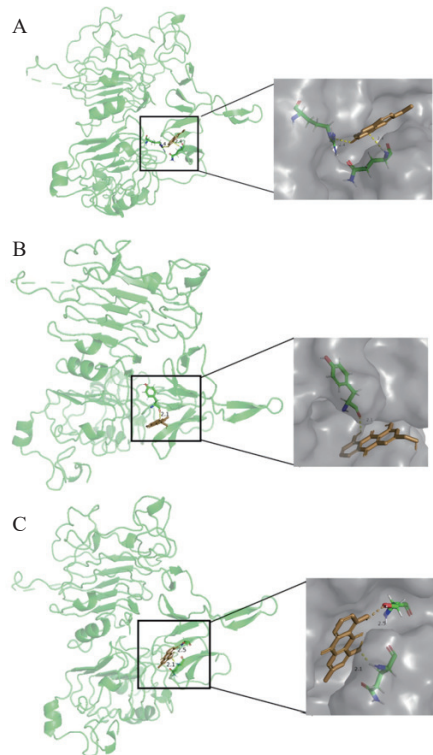


图 10 ERBB2 分子对接示意图

A.ERBB2-7-甲氧基香豆素分子对接; B.ERBB2-芦荟大黄素分子对接;
C.ERBB2-大黄酚分子对接

mRNA 相对表达量显著升高($P<0.05$); 给药茵陈蒿汤后, AKT1 和 TP53 的表达量显著降低($P<0.05$), 说明 Con-A 所造成的急性肝损伤可以被茵陈蒿汤明显改善, 如图 12。

3 讨论

本研究采 UPLC-Q-TOF/MS 方法, 对茵陈蒿汤

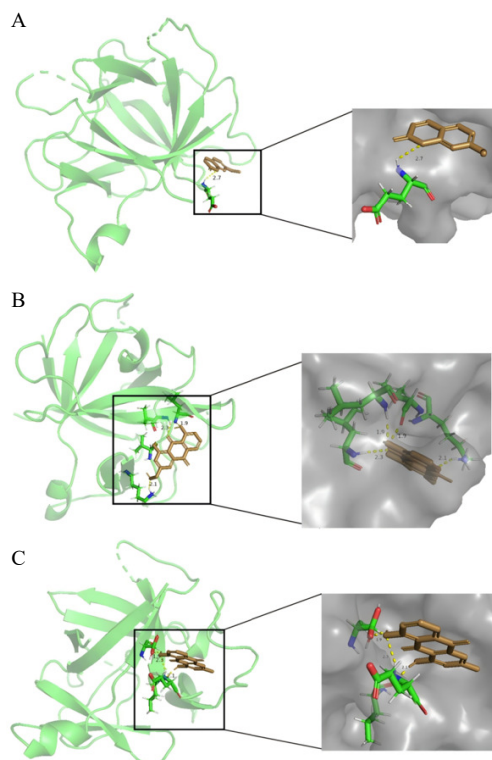


图 11 IL-1 β 分子对接示意图

A.IL-1 β -7-甲氧基香豆素分子对接; B.IL-1 β -芦荟大黄素分子对接;
C.IL-1 β -大黄酚分子对接

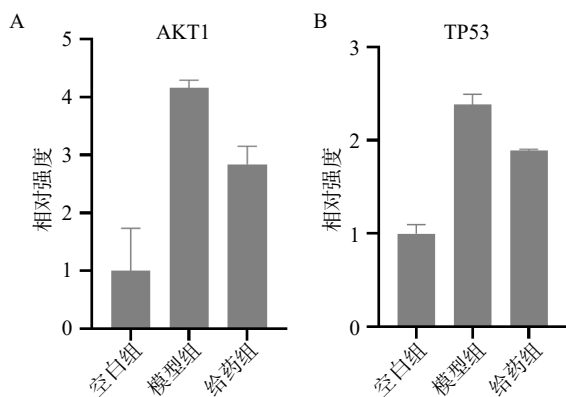


图 12 AKT1(A) 和 TP53(B) 在 3 个组中的 mRNA 相对表达量

进行体内成分鉴别,共鉴别出茵陈蒿汤 4 种原型入血成分,分别是芦荟大黄素、7-甲氧基香豆素、芦荟大黄素和水晶兰昔。结合网络药理学和分子对接探究芦荟大黄素、7-甲氧基香豆素、芦荟大黄素抗肝癌的主要机制发现,它们可能通过 AKT1、TP53、ERBB2、MYC 和 IL-1 β 作用于多种通路发挥作用。

TP53 是抑癌基因,能诱导细胞周期阻滞、凋亡、衰老和 DNA 修复,其突变与多种人类癌症发病机理密切相关^[16]。AKT1 能通过调节肝糖原的储存进而影响与凋亡信号有关激酶的活性,从而诱导炎症相关基因的表达,诱导细胞凋亡和坏死,对

肝癌起抑制作用^[17]。IL-1 β 已被证实有刺激肿瘤微环境以促进细胞增殖和组织血管生成的特性^[18],为肿瘤的生长提供有利条件。MYC 是与细胞增殖密切相关的基因,可影响细胞生长和增殖功能的复制、转录和翻译,以及细胞代谢和凋亡^[19],在肝癌中,MYC 的过度表达可能促进肿瘤细胞的增殖和存活,从而加速癌症的发展。ERBB2 可以调节细胞生长、增殖、分化和凋亡^[20],可能发挥抑制肝癌细胞的生长的作用。

本研究结合 UPLC-Q-TOF/MS、网络药理学、分子对接和 qPCR 等方法,找到茵陈蒿汤的体内入血成分、可能的靶点及作用通路并通过 qPCR 加以验证。研究结果不仅为茵陈蒿汤的药效物质基础提供了数据支持,也为深入理解其多成分、多靶点协同作用机制提供了新的视角,有望为中药现代化研究提供了可借鉴的思路与方法。然而,本研究尚存在一定的局限性,体内入血成分的功能验证仅停留在虚拟预测阶段,缺乏细胞和动物水平的实验验证;茵陈蒿汤的药代动力学过程及成分间的相互作用机制尚需进一步研究。未来可结合体内外实验,对预测的靶点和通路进行验证,为茵陈蒿汤的临床应用和新药开发提供更为坚实的理论依据。

【参考文献】

- [1] WANG S, LI X, NIU Y, et al. Identification and screening of chemical constituents with hepatoprotective effects from three traditional Chinese medicines for treating jaundice[J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(19): 3690-3699.
- [2] 张玉梅, 朱琳, 师健, 等. 茵陈蒿汤对肝癌原位移植瘤小鼠肝胆汁酸和肠道微生态的影响 [J]. *光明中医*, 2022, 37(16): 2939-2942.
- [3] 王韵, 赵亮, 柴逸峰, 等. RP-HPLC 法同时测定茵陈蒿汤中 14 个成分 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(3): 393-401.
- [4] 姚一青, 曹奇, 王璇, 等. 基于 UPLC-QTOF/MS 的茵陈蒿汤体外成分鉴定和急性肝损伤保护作用入血成分研究 [J]. *药理学报*, 2023, 58(5): 1173-1180.
- [5] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [6] HUANG L, XIE D, YU Y, et al. TCMID 2.0: a comprehensive resource for TCM[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1117-D1120.
- [7] COUDERT E, GEHANT S, DE CASTRO E, et al. Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI[J]. *Bioinformatics*, 2023, 39(1): btac793.
- [8] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30. 1-1.30. 33.
- [9] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced

- genome of interest[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [10] ZHOU Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [11] ELIZARRARAS J M, LIAO Y, SHI Z, et al. WebGestalt 2024: faster gene set analysis and new support for metabolomics and multi-omics[J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(w1): W415-W421.
- [12] Huang NN, Sun R. Application of animal models for the discovery and efficacy evaluation of anti acute liver injury in Chinese medicine[J]. *ChinJPharmacovigil*, 2015, 12: 669-673.
- [13] Sancheti S, Sancheti S, Seo SY. Ameliorative effects of 7-methyl coumarin and 7-methoxycoumarin against CCl₄-induced hepato toxicity in rats [JJ. *Drug Chem Toxicol*, 2013, 36: 42-47.
- [14] Kuo CY, Chiu V, Hsieh PC, et al. Chrysophanol attenuates hepatitis B virus X protein-induced hepatic stellate cell fibrosis by regulating endoplasmic reticulum stress and ferroptosis[J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 144: 172-182.
- [15] Zhang YL, Gan ML, Li S, et al. Chemical constituents of stems and branches of *Adina polycephala* [JJ]. *China J Chin Mater Med*, 2010, 35: 1261-1271.
- [16] MAREI H E, ALTHANI A, AFIFI N, et al. p53 signaling in cancer progression and therapy[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21: 703.
- [17] CHEN M, QU X S, ZHANG Z Q, et al. Cross-talk between Arg methylation and *Ser phosphorylation* modulates apoptosis signal-regulating kinase 1 activation in endothelial cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(8): 1358-1366.
- [18] APTE R N, VORONOV E. Is interleukin-1 a good or bad ‘guy’ in tumor immunobiology and immunotherapy?[J]. *Immunol Rev*, 2008, 222: 222-241.
- [19] GONSALVES W I, BRONIOWSKA K, JESSEN E, et al. Metabolomic and lipidomic profiling of bone marrow plasma differentiates patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance from multiple myeloma[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10250.
- [20] GROENENDIJK F H, DE JONG J, FRANSEN VAN DE PUTTE E E, et al. ERBB2 mutations characterize a subgroup of muscle-invasive bladder cancers with excellent response to neoadjuvant chemotherapy[J]. *Eur Urol*, 2016, 69(3): 384-388.
- [收稿日期] 2025-01-13 [修回日期] 2025-08-08
[本文编辑] 齐春会