

基于网络药理学探讨加减四逆散治疗胆囊结石的作用机制

王菲菲¹ 李 壮² 孙艳军² 孙登群^{2*}

1. 安徽中医药大学第一临床医学院 安徽合肥 230022

2. 武警安徽省总队医院 安徽合肥 230041

摘 要: 目的 本研究旨在利用网络药理学的方法, 对加减四逆散治疗胆囊结石的作用机制进行研究。方法 所有化合物均从相应的数据库中获得, 根据 ADME 参数筛选活性化合物。利用 TCMSP 数据库, 结合文献查询, 对其主要活性成分及其相应靶点进行评价和筛选, 而胆囊结石相关靶点来源于 Drug Bank、Gene Cards、DisGeNET 数据库, 并对加减四逆散与胆囊结石的相关靶点取其交集。基于 STRING 数据库, 建立 PPI 网络筛选靶点, 利用 Cytoscape 3.9.1 软件, 将加减四逆散活性成分与胆囊结石靶点建立可视化网络。利用 Metascape 平台, 进行 GO 和 KEGG 富集分析确定与基因相关的潜在途径。结果 加减四逆散主要活性成分 152 个, 对应靶点 231 个, 其中潜在干预胆囊结石的核心成分槲皮素、山奈酚、异鼠李素、柚皮素、刺槐素、木樨草素等, 胆囊结石靶点 1227 个, 其中潜在核心靶点有 AKT1、TP53、IL6、CASP3、JUN、ESR1 等。GO 功能富集到 5805 个条目, KEGG 通路富集分析获得 262 条信号通路。结论 加减四逆散可通过网络药理学预测的成分、靶点和通路作用于胆囊结石, 本研究表明网络药理学方法可成为从整体视角揭示中医药作用机制的有效工具。

关键词: 加减四逆散; 网络药理学; 胆囊结石; 作用机制

胆囊结石发病机制与胆固醇含量过高或各种成分比例失调、胆囊排空功能受损、胆囊胆汁中的胆固醇结晶能力加快等相关^[1]。随着我国人民生活水平提高, 膳食结构的改变, 胆囊结石发病率近年来呈上升趋势。胆囊结石首见于《内经》胆瘕之名,《素问·奇病论》有言;“口苦者, 病名为何? ……病名曰胆瘕。”中医认为胆囊结石由外感之邪气, 情志致病, 或饮食失宜, 湿热邪毒壅积于胆, 胆汁及气血瘀滞而化热, 胆失通降, 疏泄失职, 胆郁热结, 而蕴久成石^[2]。四逆散出自东汉张仲景《伤寒杂病论》, 随着现代学者对四逆散组方研究的不断深入, 四逆散已广泛运用于临床各科疾病。近年来, 加减四逆散在治疗肝胆疾病方面深入拓展, 药理研究发现加减四逆散具有降脂护肝、抗炎镇痛、抑菌、加强胆囊收缩、增加胆道括约肌运动等功效^[3]。有临床报道四逆散加减治疗胆石症疗效显著^[4-5]。然而, 其作用机制目前尚不清楚。网络药理学是一个以药理学和药效学为基础的研究领域, 网络药理学方法通过构建“药物-成分-靶点-通路-疾病”的网络关系从整体角度揭示中医药与疾病的作用机制^[6], 从而更好地促进中医药发展与现代化进程。本研究旨在利用网络药理学方法, 深入探讨加减四逆散治疗胆囊结石的作用机制, 为后续的药理研究和临床治疗提供思路与方法。

1 资料和方法

1.1 加减四逆散相关成分鉴定及靶点筛选

从中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform) 数据库中检索加减四逆散中七味中药 (柴胡、白芍、枳实、甘草、黄芩、金钱草、海金沙) 的所有成分及其相应的吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 参数, 全部成分结合中国知网、万方、维普等数据库文献进行补充筛选。然后利用 TCMSP 数据库对加减四逆散组方各药物生物活性成分的靶点进行预测, 并通过 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 验证查询对相关靶标进行规范。

1.2 胆囊结石靶点获取

为确保数据质量的准确性和全面性, 以“Cholecystolithiasis”、“Gallstone disease”、“Calculous of gallbladder”等作为关键词, 在 Drug Bank 数据库 (<https://go.drugbank.com/drugs>)、Gene Cards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 中检索胆囊结石相关靶点。

1.3 “药物-疾病”交集基因的获取

应用 Bioinformatics & Evolutionary Genomics 平台 ([98](http://</p></div><div data-bbox=)

bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/) 对 1.1 和 1.2 中获得的加减四逆散药物靶点与胆囊结石疾病靶点进行匹配获取“药物-疾病”共同靶点, 作为加减四逆散治疗胆囊结石的关键潜在靶点并绘制韦恩图。

1.4 构建 PPI 网络, 筛选关键靶点

PPI 数据来自 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>, Version11.5), 该数据库用于预测具有置信度分数范围(低置信度分数 < 0.4; 中等: 0.4–0.7; 高等 > 0.7–0.9; 最高置信度 > 0.9) 蛋白互作网络 (protein-protein interaction network, PPI)。通过 STRING 方法获得加减四逆散和胆囊结石共同靶标直接或间接相互作用的相关蛋白, 并通过 Cytoscape3.9.1 进行可视化处理, 依据度值调整节点大小和颜色。

1.5 GO 和 KEGG 富集分析

对于基因富集分析, 基因本体 (GO) 富集包括生物学过程 (Biological process, BP)、分子功能 (Molecular function, MF) 和细胞成分 (Cellular component CC), 京都百科全书基因和基因组 (KEGG) 途径富集则研究主要信号通路。为了比较加减四逆散和胆囊结石基因集, 采用 Metascape 平台 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 设置 $p \leq 0.01$, 筛选前 20 主要功能富集信息和信号通路, 输出富集分析结果应用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制柱状图和气泡图。

1.6 “中药-化合物-靶点-疾病”网络图

为了进一步研究加减四逆散治疗胆囊结石的作用机制, 应用 Cytoscape3.9.1 构建“中药-化合物-靶点-疾病”网络图, 中药、化合物、靶点和疾病被表示为节点, 而中药、化合物、靶点和疾病的相互作用被表示为边。采用 Network Analyzer 插件分析网络, 重点关注连接度 (Degree), 连接度越大, 所包含的生物功能越多, 重要性也就越高, 最后对结果进行可视化处理。

2 结果

2.1 加减四逆散-胆囊结石共同靶点

经过 ADME 筛选, 获得 152 个非重复化合物和 231 个非重复靶点。我们发现这七味中药在目标水平上有潜在的协同作用, 在化合物水平上没有太多的重叠。然后将 Drug Bank、Gene Cards、DisGeNET 数据库检索到的疾病靶点汇总, 剔除冗余后共收集了 1227 个已知的胆囊结石治疗靶点。通

过 UniProt 数据库对疾病靶基因进行标准化处理。将加减四逆散靶点与胆囊结石靶点取交集, 作加减四逆散-胆囊结石靶点韦恩图, 共获得交集候选基因 124 个, 见图 1。

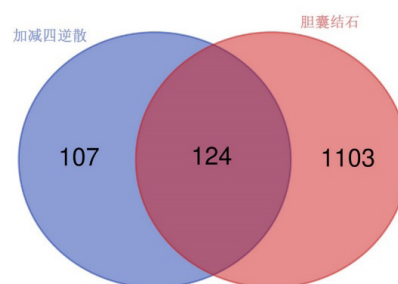


图 1 加减四逆散与胆囊结石共同靶点韦恩图

2.2 药物-疾病交集靶点蛋白互作网络

124 个药物-疾病交集靶点基因即为加减四逆散治疗胆囊结石潜在的关键靶点。将 124 个关键靶点上传到 STRING 数据库, 将物种设置为“Homo sapiens”, 构建 PPI 网络。然后将 PPI 网络导入 Cytoscape3.9.1 进行可视化处理, 见图 2。Degree 的平均值为 33.5, 筛选出度值大于 2 倍平均度值的靶点有 20 个, 猜测这 20 个靶点可能为加减四逆散作用于胆囊结石的核心靶点, 见表 1。

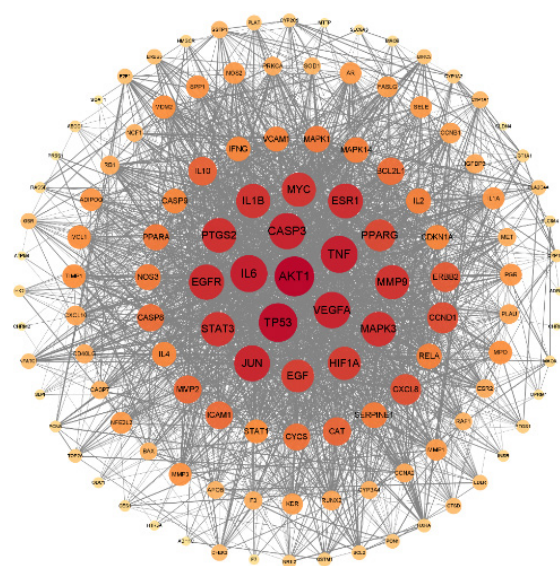


图 2 加减四逆散-胆囊结石靶点 PPI 网络

注: 节点颜色和大小根据度值调整, 节点越大, 颜色越深, 边线越粗, 度值越大。

表 1 PPI 网络中大于平均度值的靶点蛋白

ID	Target name	Degree
AKT1	蛋白激酶	93
TP53	P53 抑癌基因	90
TNF	肿瘤坏死因子	85
IL6	白细胞介素 6	85
CASP3	胱天蛋白酶 3	83
VEGFA	血管内皮生长因子 A	83
JUN	原癌基因	82
EGFR	人类表皮生长因子受体	83
ESR1	雌激素受体 1	79
MAPK3	丝裂原活化蛋白激酶 3	78
PTGS2	环加氧酶 2	78
MYC	核蛋白类癌基因	77
STAT3	信号转导和转录激活因子 3	77
IL1 β	白介素 1 β	77
MMP9	基质金属蛋白酶 9	77
HIF1A	缺氧诱导因子-1 α	74
EGF	表皮细胞生长因子	73
PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体	70
CCND1	细胞周期蛋白 D1	68
CXCL8	白细胞介素-8	67

2.3 “中药-化合物-靶点-疾病”网络图

为了更好地阐明中药、化合物、疾病以及相关靶点的作用关系，我们进一步构建了一个由中药-化合物-靶点-疾病组成的 PPI 网络，见图 3。其中潜在干预胆囊结石的核心成分为槲皮素 (MOL000098)、山奈酚 (MOL000422)、异鼠李素 (MOL000354)、柚皮素 (MOL004328)、刺槐素 (MOL001689)、木樨草素 (MOL000006) 等。

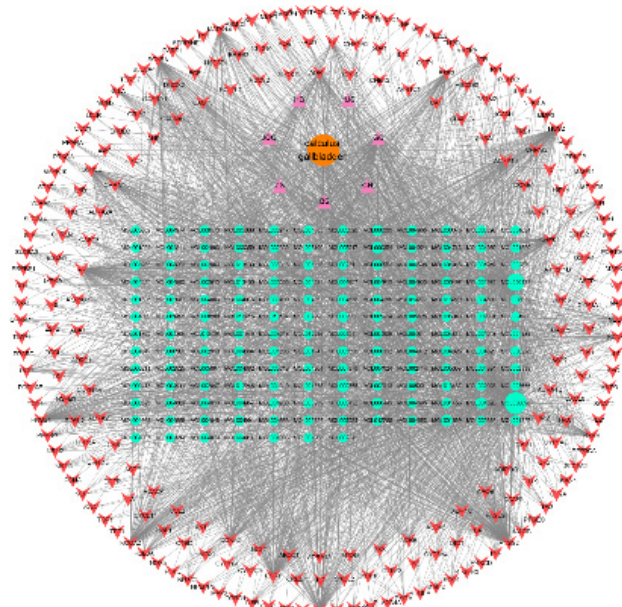


图 3 “中药-化合物-靶点-疾病”网络

注：红色箭头表示靶点，绿色椭圆表示化合物活性成分，粉色三角表示中药，橙色椭圆表示疾病。

2.4 GO 功能富集分析

为了详细鉴定加减四逆散治疗胆囊的生物学特性，将药物-疾病交集的 124 个靶点进行了 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。共有生物过程 (BP)4692 项，细胞成分 (CC)408 项，分子功能 (MF)705 项，以 $P \leq 0.01$ 为主要筛选标准，GO 信息见图 4。分析结果表明，加减四逆散通过调节多个生物学过程 (BP) 发挥作用，其中排名前五的分别是激素应答 (GO:0009725)、对无机物的反应 (GO:0010035)、细胞迁移的正调控 (GO:0030335)、对外源性刺激的反应 (GO:0009410)、细胞对脂质的反应 (GO:0071396)，排名前五的细胞成分 (CC) 有脂筏 (GO:0045121)、转录调节复合物 (GO:0005667)、囊腔 (GO:0031983)、细胞外基质 (GO:0031012)、质膜外侧 (GO:0009897)，而排名前五的分子功能 (MF) 包括蛋白结构域特异性结合 (GO:0019904)、DNA 结合转录因子结合 (GO:0140297)、激酶结合 (GO:001990)、蛋白质同源二聚化活性 (GO:0042803)、细胞因子活性 (GO:0005125)。

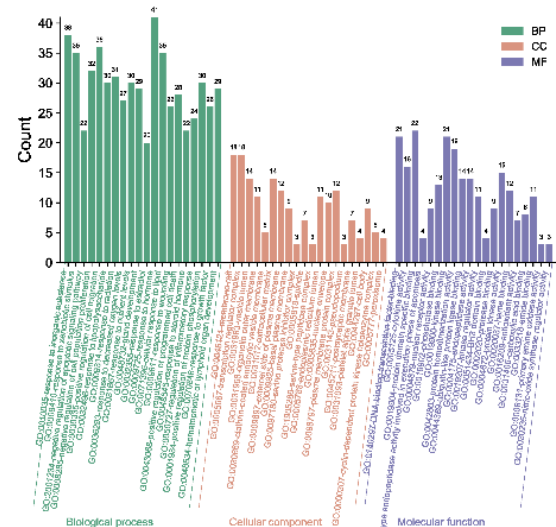


图 4 GO 富集分析柱状图 (前 20)

2.5 KEGG 通路富集分析

将药物疾病共同靶标进行 KEGG 通路富集分析，以 $P \leq 0.01$ 为主要筛选标准，总共富集到 262 条信号通路，排名前 20 见图 5。数据显示信号通路主要涉及有癌症中的信号通路 (hsa05200)、脂质与动脉粥样硬化 (hsa05417)、PI3K-Akt 信号通路 (hsa04151)、化学致癌-受体激活 (hsa05207)、NF- κ B 信号通路 (hsa04064)、FoxO 信号通路 (hsa04068)、甲型流感 (hsa05164) 等信号通路等。

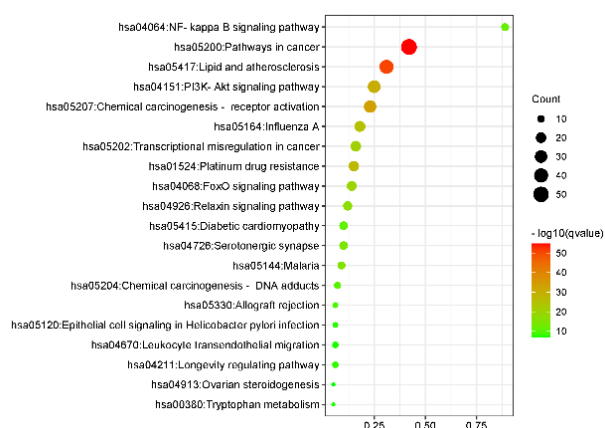


图5 KEGG 通路富集分析气泡图(前20)

3 讨论

胆囊结石归于中医“胆胀”“结胸”“胁痛”“黄疸”等范畴^[7]。肝胆疏泄功能失常是胆石证的基本病机,湿、热、痰、瘀、毒为胆石形成的诱发因素^[8]。加減四逆散中的多种成分具有抑菌,消炎镇痛,利胆排石等药理活性,但尚未有研究者从网络药理学角度分析其作用机理,本研究采用网络药理学的方法描述活性成分、化合物靶点和信号转导途径之间的关系,从而揭示加減四逆散治疗胆囊结石的潜在机制。

3.1 有效化学成分分析

本研究预测槲皮素(MOL000098)、山奈酚(MOL000422)、异鼠李素(MOL000354)、柚皮素(MOL004328)、刺槐素(MOL001689)、木樨草素(MOL000006)等为干预胆囊结石的主要的化学成分。槲皮素作为天然膳食化合物,在多种疾病中具有化学预防和治疗作用。研究发现槲皮素、金丝桃苷和姜黄素等对预防泌尿系结石(尿路结石形成过程)有效,在治疗尿石症方面的主要潜在机制包括利尿、解痉挛和抗氧化活性,以及对晶体结晶、成核和聚积的抑制作用^[9]。山奈酚具有抗氧化、抗炎活性、抗癌,以及保护神经、肝脏和心肌,抑制蛋白激酶活性等多方面的生物学功能活性^[10]。槲皮素和山奈酚可降低 AKT、VEGFA 和 IL-6 的蛋白表达,提高 p53 和 MAPK 的水平。研究发现^[11]异鼠李素活性成分对泌尿系结石和胆石症有良好的治疗效果,这些发现可能有助于开发一种可用于预防和胆结石和肾结石的标准化提取物。总体上推测,加減四逆散是一组具有多靶点治疗协同作用的方药,这些活性化合物与胆结石之间的关系应该得到深入研究。故在后续设计相关基础实验或临床研究时可重点

关注木樨草素、山奈酚、槲皮素、异鼠李素等在治疗胆囊结石中的相关作用机制。

3.2 潜在靶点分析

根据 PPI 网络分析结果显示 AKT1(蛋白激酶)、TP53(P53 抑癌基因)、TNF(肿瘤坏死因子)、IL6(白细胞介素 6)、CASP3(胱天蛋白酶 3)、VEGFA(血管内皮生长因子 A)等可能是加減四逆散治疗胆囊结石的潜在基因靶标。AKT1 编码丝氨酸/苏氨酸激酶,在一些正常和病理的细胞过程中起重要作用。在肥胖和胰岛素抵抗等情况下,脂肪酸和葡萄糖是控制 β 细胞生长和存活的主要信号,AKT1 是其维持重要原因^[12],AKT1 是高脂饮食诱导 β 细胞增殖所必需的,可引起脂质代谢紊乱,而脂质代谢紊乱可导致胆固醇结石形成。TP53 在肿瘤发生过程中的调控受到了密切关注,TP53 基因编码转录因子 p53,大量研究表明, p53 的生物学作用不仅限于阻止肿瘤的形成和发展,还涉及细胞内稳态的许多其他方面^[13]。TNF- α 是由单核细胞和巨噬细胞分泌释放的促炎细胞因子, TNF- α 通过刺激包括 IL-1 α 、IL-6 在内的其他炎症介质的表达,影响胆囊的吸收、分泌和平滑肌收缩,从而在炎症的发生中发挥重要作用^[14]。白细胞介素-6(IL-6)是一种炎性细胞因子,可诱导多种与急性炎症相关的蛋白表达,在人类细胞的增殖和分化中起重要作用^[15]。若胆囊结石造成胆囊感染性炎症,可引起炎症因子异常变化,患者会出现右侧上腹疼痛不适,反酸,恶心等症状。VEGFA 是一种信号蛋白,在血管通透性和血管生成中起基础作用。研究报道了 VEGFA 与胆囊结石之间的联系, VEGFA 在胆囊结石易感性中的作用可能归因于急性或慢性炎症过程中的血管形成过程^[16]。

3.3 信号通路分析

KEGG 通路富集分析的结果显示,加減四逆散治疗胆囊结石的靶点主要调控 PI3K-Akt、FoxO、NF- κ B 等信号通路。由此推测加減四逆散的有效成分可能通过作用于上述信号通路达到治疗胆囊结石的目的。PI3K-Akt 信号通路作为肿瘤发生过程中研究最深入的信号通路之一,可能参与胆管癌的发生、维持和转移^[17]。FoxO (Forkhead box O) 蛋白是一个转录因子家族,在哺乳动物中有 4 个成员,即 FoxO1、FoxO3a、FoxO4 和 FoxO6,而 FoxO1 则与代谢性疾病关系密切^[18]。调控 FoxO1 基因活性对肝脏胆固醇、胆汁酸和糖代谢,特别是对胆汁胆固醇饱和与胆结石形成有着直接影响^[19]。

NF- κ B 通路参与了广泛的生物学活动,包括细胞炎症,存活和凋亡。此外,NF- κ B 的激活会导致炎症和慢性疾病并可促进肿瘤的存活和转移^[20]。在 KEGG 分析的 TOP20 通路中,关键靶点还与血脂与动脉粥样硬化、甲型流感等癌细胞通路相关,提示加减四逆散具有潜在的抗癌作用,值得进一步深入研究探索其在胆囊癌中的作用机制。

4 结语

本研究在一定程度上揭示了加减四逆散对胆囊结石有治疗作用,其机制可能与槲皮素、山奈酚、木樨草素、异鼠李素等活性成分调控 JUN、CASP3、IL6、ESR1 等潜在核心靶点和 PI3K-Akt、FoxO、NF- κ B 等信号通路发挥溶胆排石、增加胆道括约肌运动、减轻炎症反应、增强体质、减少复发等作用有关,这些发现可能为临床预防和治疗胆囊结石提供新的见解。在后续的研究中,我们将继续关注加减四逆散的药理研究,利用分子生物学技术,研究活性成分在患者、动物建模和体外实验中筛选出的核心靶点和信号通路的调控机制。

参考文献:

- [1]Chen G, Wu S.Role of Baicalin and Liver X Receptor Alpha in the Formation of Cholesterol Gallstones in Mice. *Gastroenterol Res Pract*.2020;2020:1343969.
- [2]申鹏,汪正飞.金钱草联合中成药治疗胆囊结石临床研究[J].*新中医*,2020,52(17):75-77.
- [3]高改娅,白艳艳,康艳,等.名老中医张瑞霞应用四逆散合五苓散加减治疗慢性结石性胆囊炎医案举隅[J].*亚太传统医药*,2020,16(03):111-112.
- [4]黄建华,高超.茵陈四逆散联合熊去氧胆酸胶囊治疗肝胆气郁型肝内胆管结石随机平行对照研究[J].*实用中医内科杂志*,2015,29(01):121-122.
- [5]吴红伟,李东辉,张育贵,等.四逆散研究进展及质量标志物的预测分析[J].*中华中医药学刊*,2021,39(12):13-20
- [6]Gao L, Wang XD, Niu YY, et al.Molecular targets of Chinese herbs: a clinical study of hepatoma based on network pharmacology.*Sci Rep*.2016;6:24944.
- [7]李渝萍,王玲玲,王鸿章,等.治疗胆石症的中成药临床应用及药理研究梳理[J].*环球中医药*,2013,6(05):383-387.
- [8]李璐璐.胆石症中医证候研究及中医药治疗疗效回顾性分析[D].广西中医药大学,2021.
- [9]Nirumand MC, Hajialyani M, Rahimi R,et al.Dietary Plants for the Prevention and Management of Kidney Stones:Preclinical and Clinical Evidence and Molecular Mechanisms.*Int J Mol Sci*. 2018;19(3):765.
- [10]张雅雯,邵东燕,师俊玲,等.山奈酚生物功能研究进展[J].*生命科学*,2017,29(04):400-405.
- [11]van Dooren I,Foubert K,Bijtteeblie S,et al.Saponins and Flavonoids from an Infusion of *Herniaria hirsuta*. *Planta Med*.2016;82(18):1576-1583.
- [12]Peng Z,Aggarwal R,Zeng N,et al.AKT1 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress and Mediates the Adaptive Response of Pancreatic β Cells.*Mol Cell Biol*.2020;40(11):e00031-20.
- [13]Hu W,Chen S,Thorne RF,et al.TP53,TP53 Target Genes (DRAM, TIGAR),and Autophagy.*Adv Exp Med Biol*. 2019;1206:127-149.
- [14]Kasprzak A,Szmyt M,Malkowski W,et al.Analysis of immunohistochemical expression of proinflammatory cytokines (IL-1 α , IL-6, and TNF- α) in gallbladder mucosa:comparative study in acute and chronic calculous cholecystitis.*Folia Morphol (Warsz)*.2015;74(1):65-72.
- [15]Uciechowski P,Dempke WCM.Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network.*Oncology*. 2020;98(3):131-137.
- [16]Castro FA,Koshiol J,Hsing AW,et al.Inflammatory gene variants and the risk of biliary tract cancers and stones: a population-based study in China.*BMC Cancer*.2012;12:468.
- [17]Alzahrani AS.PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer:At the bench and bedside.*Semin Cancer Biol*. 2019;59:125-132.
- [18]Link W.Introduction to FOXO Biology.*Methods Mol Biol*.2019;1890:1-9.
- [19]王宇翔,王维东,胡海.FOXO1 在代谢综合征时胆结石形成中的调节作用[J].*外科理论与实践*,2013,18(06):590-591.
- [20]Kunnumakkara AB,Shabnam B,Girisa S,et al.Inflammation,NF- κ B,and Chronic Diseases: How are They Linked?. *Crit Rev Immunol*.2020;40(1):1-39.

作者简介:

王菲菲(1991-),女,汉,安徽省安庆市人,硕士研究生在读,安徽中医药大学第一临床医学院,学生,中医药防治外科疾病方向

通讯作者:孙登群(1973-),博士,主任医师,硕士生导师。

研究方向:中医药防治外科疾病方向。

基金项目:

安徽省卫生健康委科研项目(AHWJ2023BAa20148);武警部队高层次人才培养项目(ZG202193);武警部队装备科研项目(ZZKY20233109)