

基于生物信息学和细胞实验探讨肝豆扶木汤调控铁死亡治疗肝豆状核变性的作用

郝文杰^{1,2,3}, 杨文明^{1,3*}, 魏涛华^{1,2,3}, 唐露露^{1,3}, 杨悦^{2,3}, 钱南南^{1,3}, 杨玉龙^{2,3}

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038; 3. 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230038)

摘要: **目的** 探究肝豆扶木汤对 Erastin 诱导的肝癌细胞 HepG2 铁死亡的影响, 以及对溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)/谷胱甘肽过氧化酶 4 (GPX4) 轴的调控作用。**方法** 利用 BATMAN-TCM 数据库获取肝豆扶木汤的活性成分及潜在靶点, GeneCards 数据库检索铁死亡相关靶点, 将所得的肝豆扶木汤活性成分的潜在靶点与铁死亡相关靶点进行交集筛选后, 再借助 CB-Docking 软件进行分子对接, 最后对结合度较好的靶点进行细胞实验初步验证。体外细胞实验构建 Erastin 诱导的 HepG2 细胞铁死亡模型, 设置空白组、模型组和肝豆扶木汤低、中、高剂量组, 检测细胞还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA)、活性氧 (ROS) 水平, RT-qPCR 和 Western blot 法验证细胞 P53、SLC7A11、GPX4 mRNA 和蛋白表达。**结果** 肝豆扶木汤中有效成分共 215 种, 潜在靶点 1 741 个, 铁死亡相关靶点 275 个, 其中 Relevance score ≥ 3 的共 23 个。取交集后, 肝豆扶木汤中活性成分为 19 种, 铁死亡相关靶点为 11 种。肝豆扶木汤关键有效成分与靶点 SLC7A11、P53、VDAC2/3、ACSL4、HMOX1、ALOX15、PRKAA1 等均有一定的结合活性, 其中与 SLC7A11 蛋白靶点结合能力最强。肝豆扶木汤能提高细胞 GSH、ROS、MDA 水平 ($P<0.01$), 上调 SLC7A11、GPX4 mRNA 和蛋白表达 ($P<0.01$), 下调 P53 mRNA 和蛋白表达 ($P<0.01$)。**结论** 肝豆扶木汤可能是通过调控 SLC7A11/GPX4 轴来抑制 Erastin 诱导肝癌细胞 HepG2 铁死亡的发生, 从而起到保护肝细胞的作用。

关键词: 肝豆扶木汤; 铁死亡; 生物信息学; 细胞实验; SLC7A11/GPX4 轴

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3461-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.053

肝豆状核变性, 又称 Wilson 病, 是铜代谢障碍导致以大脑基底节变性和肝功能损害为主要表现的常染色体隐性遗传性疾病, 临床上以进行性加重的肝损害、神经系统症状等为主要特征^[1]。研究发现该病不仅存在铜代谢障碍, 其铁代谢障碍在发病机制中也起着重要作用^[2]。由于肝脏是金属离子代谢的主要靶器官, 肝损害为 Wilson 病患者最常见的症状, 暴发性肝衰竭是最常见的致死因素^[3]。进行早期干预对保护患者肝损害具有重要的临床意义。据相关研究报道, 铁死亡在 Wilson 病肝损害中具有起到关键作用^[4]。铁死亡是一种被公认的以铁依赖性脂质过氧化为特征的细胞调控死亡形式^[5]。

肝豆扶木汤是杨文明教授根据新安医学固本培元的理论, 针对 Wilson 病创制的专方, 全方行滋补肝肾、豁痰化瘀之功。课题组前期研究发现, 肝豆扶木汤能有效改善 Wilson 病患者和模型鼠的肝功能及肝纤维化程度, 发挥肝

保护作用^[6], 且其作用机制可能与调控转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β , TGF- β 1)/Smad^[7]、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)/Jun 氨基末端激酶, Jun N-terminal kinase, JNK^[8] 信号通路有关, 但与铁死亡相关作用机制尚待深入研究。故本研究借助生物信息学系统预测肝豆扶木汤干预铁死亡的活性成分、潜在靶点, 并结合体外实验进行初步验证。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞 HepG2 (货号 CL-0103) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 用含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 待细胞生长至 70%~80% 时开始传代, 用于后续实验。

1.2 药物 肝豆扶木汤由制何首乌 4 g、枸杞子 20 g、三七 3 g、土茯苓 12 g、白芍 15 g、郁金 12 g、柴胡 12 g 组成,

收稿日期: 2023-01-10

基金项目: 国家自然科学基金 (81973825); 国家中医药管理局中医药循证能力建设项目 (2019XZZX-NB001); 安徽省自然科学基金 (2108085QH366); 安徽高校协同创新项目 (GXXT-2020-025)

作者简介: 郝文杰 (1992—), 男, 博士生, 住院医师, 从事中医药防治神经系统疾病研究。Tel: 15755167077, E-mail: 928766395@qq.com

***通信作者:** 杨文明 (1964—), 男, 博士, 教授, 主任医师, 岐黄学者, 从事中医药防治神经系统疾病研究。Tel: 18156078368, E-mail: yangwm8810@126.com

均购自安徽中医药大学第一附属医院,符合 2020 年版《中国药典》标准,加 10 倍量水浸泡 30 min,武火煮沸后转文火再煎 30 min,滤过,再加 8 倍量水重复以上步骤,将 2 次水煎液混匀,纱布过滤后于旋转蒸发仪上浓缩至 0.3 g/mL,冷冻干燥得冻干粉 17.5 g,得率为 22.4%,于 -20 ℃冰箱中保存备用。肝豆扶木汤冻干粉溶液用无菌 PBS 制成 1 g/L (1 g 冻干粉相当于 4.46 g 生药量)母液,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

1.3 试剂 DMEM 培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司,批号 WH0022C021);Erastin 试剂 (上海麦克林生化科技股份有限公司,批号 C13632104);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (日本 TaKaRa 公司,批号 AJ51485A);CCK8 检测试剂盒、2×SYBR Green qPCR Master Mix (High ROX) (武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 CR2112050、LT202201);山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG (上海张沈生物医药科技有限公司,批号 142637、139931);溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 抗体、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体、P53 抗体 (美国 Affinity 公司,批号 84a5792、78p5366、23y9837);RIPA 裂解液 (强)(合肥白鲨生物科技有限公司,批号 69128033);PAGE 胶促凝剂 (北京索莱宝科技有限公司,批号 1020F024);PVDF 膜 (美国 Millipore 公司,批号 R8KA7385);胰酶、Western 一抗二抗去除液 (上海碧云天生物技术有限公司,批号 C0201、051418180626);ECL 超敏发光试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号 S1257444);丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所,批号 20220518、20220525);活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (上海贝博生物科技有限公司,批号 BB20081)。

1.4 仪器 3111 型恒温 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);超净工作台 (上海力辰仪器科技有限公司);CKX53 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司);电泳仪、转膜仪 (上海天能科技有限公司);自动曝光仪 (上海培清科技有限公司);酶标分析仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

2 方法

2.1 生物信息学

2.1.1 活性成分筛选 利用 BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>) 检索肝豆扶木汤方中何首乌、枸杞子、三七、柴胡、白芍、土茯苓、郁金 7 味中药的化学成分,以靶点预测的得分值 (Score cutoff) ≥20、靶点分析 $P<0.05$ 为标准^[9],筛选出具有较高活性的成分和潜在靶点。利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载对应的活性成分信息,以 3D 结构保存为 SDF 格式,用于分子对接。

2.1.2 铁死亡靶点筛选 在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://www.omim.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 中输入检索词 “Ferroptosis”,收集铁死亡相关的非重复靶基因。将铁死亡相关靶点的相关度值 (Relevance score) 定义为 ≥3,与药物活性成分作用潜在靶点进行匹配,最终获得肝豆扶木汤干预铁死亡的作用靶点,用于后续分析。

2.1.3 分子对接 选取匹配后筛选得到的核心靶蛋白作为核心受体蛋白,在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中输入靶蛋白名称,设置种属为 “Homo sapiens”,选取分辨率高的靶蛋白三维结构。使用 CB-Docking 数据库^[10] (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/index.php>) 将筛选出来的受体与配体进行在线对接处理,比较对接后的 Vina score 值,再进行对比分析。

2.2 细胞实验

2.2.1 Erastin 诱导剂最佳作用剂量和时间筛选 将 HepG2 细胞分为空白组、Erastin 诱导剂组,空白组只加 DMEM 培养基,Erastin 诱导剂组分别加入含 10、20、30、40 μmol/L Erastin 的 DMEM 培养基,分别培养 12、24、36、48 h 后弃培养液,每孔加入 10 μL CCK8,继续培养 1 h,在酶联免疫检测仪上 450 nm 波长处测量各孔吸光度。

2.2.2 肝豆扶木汤冻干粉最佳作用剂量和时间筛选 将 HepG2 细胞分为空白组、肝豆扶木汤冻干粉组,空白组只加 DMEM 培养基,肝豆扶木汤冻干粉组分别加入含 5、10、20、40、80、160、320、640 μg/mL 冻干粉和最佳作用浓度 Erastin 的 DMEM 培养基,在 Erastin 最佳作用时间点换液 3 次后弃培养液,每孔加 10 μL CCK8,继续培养 1 h,在酶联免疫检测仪上 450 nm 波长处测量各孔吸光度。

2.2.3 分组及给药 实验分为空白组 (HepG2 细胞+PBS)、模型组 (HepG2 细胞+Erastin 诱导剂) 和肝豆扶木汤低、中、高剂量组 (HepG2 细胞+Erastin 诱导剂+160、320、640 μg/mL 肝豆扶木汤冻干粉)。取对数生长期 HepG2 细胞,接种于平底培养板,每组设 3 个复孔,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h,模型组加入最佳浓度的 Erastin 诱导剂,肝豆扶木汤组同时加入最佳浓度的 Erastin 诱导剂和不同质量浓度的冻干粉,空白组加入等量 PBS 溶液,处理至 Erastin 诱导剂最佳时间点时进行换液,继续处理至冻干粉最佳作用时间后检测相关指标。

2.2.4 GSH、MDA 水平检测 取对数生长期 HepG2 细胞,接种于 6 孔板,按 “2.2.3” 项下方法处理,按照相关试剂盒说明书操作步骤检测 GSH、MDA 水平。

2.2.5 ROS 水平检测 取对数生长期 HepG2 细胞,接种于 6 孔板,按 “2.2.3” 项下方法处理,加入 10 μmol/L DCFH-DA,37 ℃避光孵育 30 min,其间颠倒混匀 4~5 次,使细胞与探针充分接触,再用无血清培养基洗涤细胞 3 次,除去多余的 DCFH-DA,于倒置荧光显微镜下观察荧光强度,NovoExpress 软件分析并计算荧光强度值。

2.2.6 Western blot 法检测细胞 P53、SLC7A11、GPX4 蛋白表达 按 “2.2.3” 项下方法处理细胞,提取各组细胞

总蛋白，经电泳、转膜、封闭后，分别加 P53（1：500）、SLC7A11（1：500）、GPX4（1：500）、β-actin（1：500）一抗，4℃孵育过夜，加相应二抗继续孵育 2 h，显影，用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.2.7 RT-qPCR 法检测细胞 P53、SLC7A11、GPX4 mRNA 表达 按“2.2.3”项下方法处理细胞，提取 RNA，逆转录为 cDNA，然后进行 PCR 扩增，2^{-ΔΔCT}法计算目的基因相对表达，引物序列见表 1。

表 1 引物序列		
基因	序列(5'→3')	长度/bp
β-actin	正向 CCTGGAGAAGAGCTACGAG	96
	反向 GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT	
P53	正向 AAGCTGTCCCTCACTGTTGA	86
	反向 TGCACCTCTGTGAGGTAGCTG	
SLC7A11	正向 AACCGAAGGCCAGAGAATCA	195
	反向 AGCTTCAGGACCTCGAATGG	
GPX4	正向 AGTGAGGCAAGACCGAAGTA	108
	反向 GCTTCCCGAACTGGTTACAC	

2.3 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理，数据以(̄x±s)表示，若满足正态性和方差齐性，2 组间比较采用独立样本 t 检验，组间多重比较采用 LSD 法；反之，采用 Kruskal-Wallis 检验。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 生物信息学

3.1.1 活性成分及作用靶点 以 Score cutoff≥20、P<0.05 为条件进行检索，得到肝豆扶木汤方中化学成分 226 种，其中何首乌 16 种，枸杞子 46 种，白芍 18 种，三七 51 种，土茯苓 13 种，柴胡 63 种，郁金 18 种。以 OB≥30%、DL≥0.18 为条件，筛选得到 214 种化学成分。

3.1.2 作用靶点筛选 共得到肝豆扶木汤活性成分潜在作

用靶点 10 463 个，其中何首乌 298 个，枸杞子 2 077 个，白芍 300 个，三七 3 964 个，土茯苓 367 个，柴胡 1 845 个，郁金 1 612 个，剔除重复部分，得到潜在作用靶点 1 741 个。利用 GeneCards 数据库获得 274 个与铁死亡相关的靶基因，相关度值（Relevance score）定义为≥3，最终获得与铁死亡相关的靶基因 23 个。将药物活性成分靶点与疾病靶点取交集，最终收集 11 个共同作用靶点用于分子对接分析，见图 1。

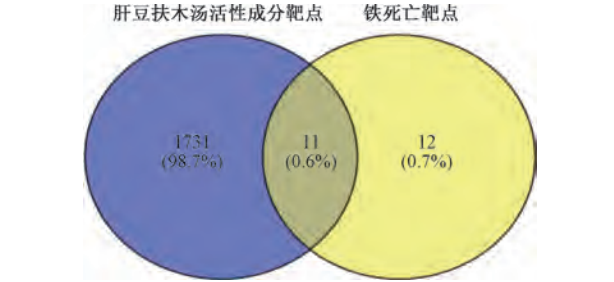


图 1 肝豆扶木汤活性成分靶点与铁死亡靶点的韦恩图

3.1.3 分子对接 将 11 个铁死亡核心靶蛋白与对应的肝豆扶木汤活性成分进行分子对接，并根据 Vina score 值绘制热图（图 2），其中 Vina score<-7.0，表明靶蛋白与活性成分结合性好，而且 Vina score 值越小，两者结合能力越强^[11]。由此可知，肝豆扶木汤的主要活性成分维生素 B2、抗坏血酸、γ-氨基丁酸、尼克酸、维生素 C、核黄素、芍药二酮、鬼伞毒素、苯乙酮、3，4-二甲基苯甲酸、邻苯二酸辛酯、白芷素、壬烯酸、亚麻酸、姜黄酮、莪术二酮、姜黄烯、香芹酮与铁死亡核心靶点 SLC7A11 蛋白均有很强的结合能力，再绘制对接模式图（图 3）。此外，维生素 B2、核黄素、芍药二酮、白芷素、莪术二酮与 TP53、ACSL4、ACSL4、VDAC2、VDAC3、ALOX15、PRKAA1、MDM2 靶蛋白均有良好的结合能力。

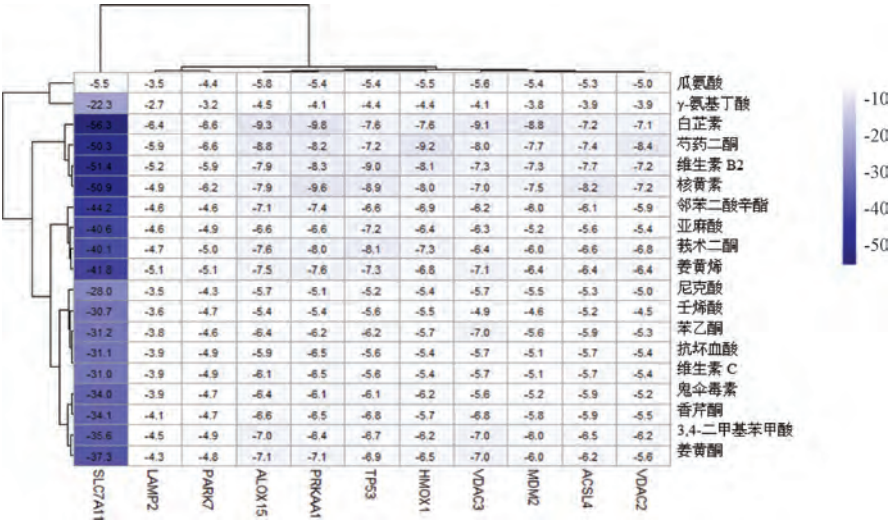


图 2 肝豆扶木汤活性成分与铁死亡核心靶蛋白分子对接热图

3.2 细胞实验

3.2.1 Erastin 诱导剂最佳作用剂量、时间筛选 与空白组比较，10 μmol/L Erastin 诱导剂作用 12、24、36、48 h 时细

胞活性均高于 50%，20 μmol/L Erastin 诱导剂作用 12、24 h 时细胞活性均高于 50%，30 μmol/L Erastin 诱导剂作用 36、48 h 时细胞活性均低于 50%，40 μmol/L Erastin 诱导剂作用

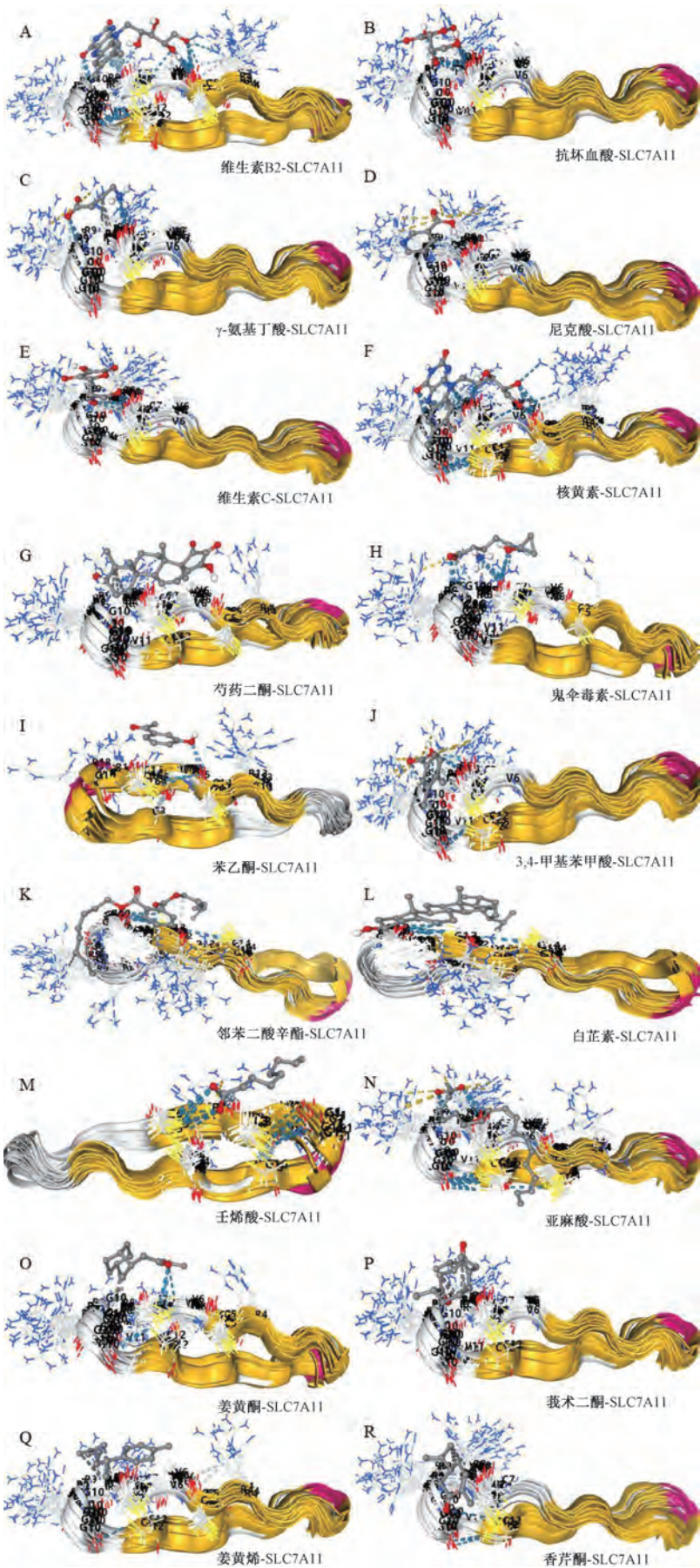


图 3 肝豆扶木汤活性成分与 SLC7A11 蛋白对接模式图

12、24、36、48 h 时细胞活性均低于 50%，故选择 时间，见表 2。
30 μmol/L、24 h 分别作为 Erastin 诱导剂最佳作用剂量、

表 2 Erastin 诱导剂不同作用剂量、时间下细胞相对活性 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(μmol·L ⁻¹)	12 h	24 h	36 h	48 h
空白组	0	1.002±0.011	1.003±0.022	1.014±0.016	1.001±0.021
Erastin 诱导剂组	10	0.879±0.041 *	0.825±0.029 *	0.783±0.027 *	0.692±0.063 *
	20	0.688±0.017 *	0.649±0.044 *	0.509±0.040 *	0.469±0.014 *
	30	0.557±0.060 *	0.496±0.029 *	0.282±0.011 *	0.249±0.018 *
	40	0.287±0.044 *	0.214±0.021 *	0.176±0.014 *	0.146±0.012 *

注：与空白组比较，* $P<0.05$ 。

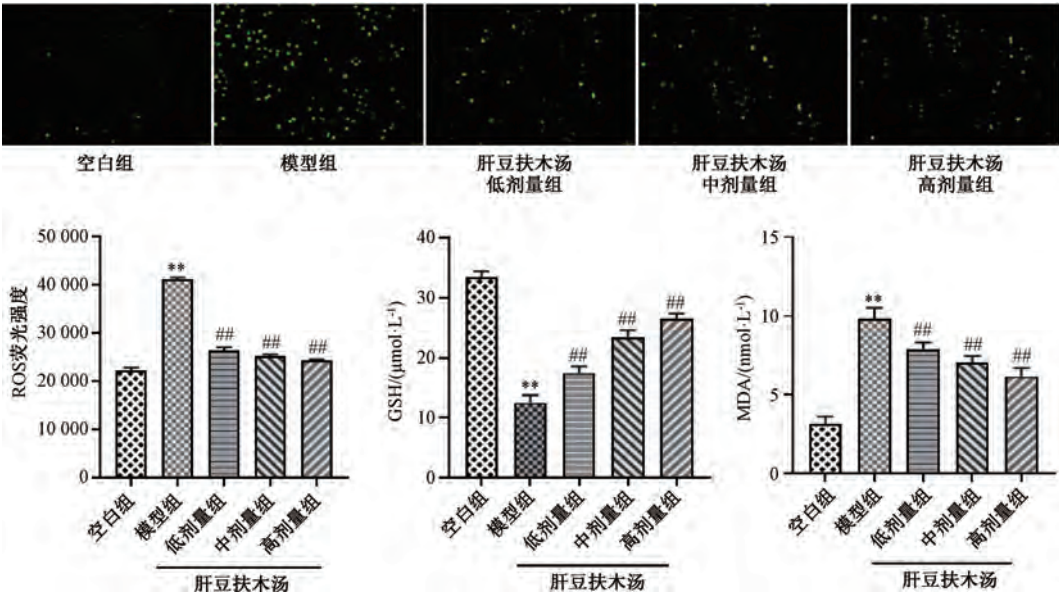
3.2.2 肝豆扶木汤冻干粉最佳作用剂量、时间筛选 与空白组比较，5 μg/mL 冻干粉作用 48、72 h 时，10、20、40、80 μg/mL 冻干粉作用 24、48 h 时，以及 160 μg/mL 冻干粉作用 24 h 时细胞活性降低 ($P<0.05$)；40、80、160 μg/mL 冻干粉作用 72 h 时，320 μg/mL 冻干粉作用 48、72 h 时，以及 640 μg/mL 冻干粉作用 24、48、72 h 时细胞活性升高 ($P<0.05$)，故选择 160、320、640 μg/mL 分别作为低、中、高剂量，见表 3。

表 3 肝豆扶木汤冻干粉不同作用剂量、时间下细胞相对活性 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	24 h	48 h	72 h
空白组	0	1.003±0.022	1.001±0.021	0.999±0.013
肝豆扶木汤冻干粉组	5	0.984±0.014	0.824±0.033 *	0.914±0.072 *
	10	0.935±0.010 *	0.846±0.068 *	0.991±0.048
	20	0.867±0.013 *	0.853±0.078 *	1.037±0.049
	40	0.822±0.008 *	0.917±0.034 *	1.084±0.061 *
	80	0.787±0.018 *	0.950±0.066 *	1.129±0.042 *
	160	0.920±0.014 *	1.075±0.034	1.174±0.01 *
	320	1.051±0.022	1.286±0.027 *	1.305±0.009 *
	640	1.170±0.061 *	1.330±0.068 *	1.364±0.029 *

注：与空白组比较，* $P<0.05$ 。

3.2.3 肝豆扶木汤对 Erastin 诱导 HepG2 细胞 GSH、MDA、ROS 水平的影响 与空白组比较，模型组细胞 GSH 水平降低 ($P<0.01$)，MDA 水平升高 ($P<0.01$)，ROS 荧光强度增强 ($P<0.01$)；与模型组比较，肝豆扶木汤各剂量组细胞 GSH 水平升高 ($P<0.01$)，MDA 水平降低 ($P<0.01$)，ROS 荧光强度减弱 ($P<0.01$)，并呈剂量依赖性，见图 4。结果表明，肝豆扶木汤能提高 HepG2 细胞 GSH 水平，降低 MDA、ROS 水平，提高抗氧化能力，抑制 HepG2 细胞的氧化应激损伤。

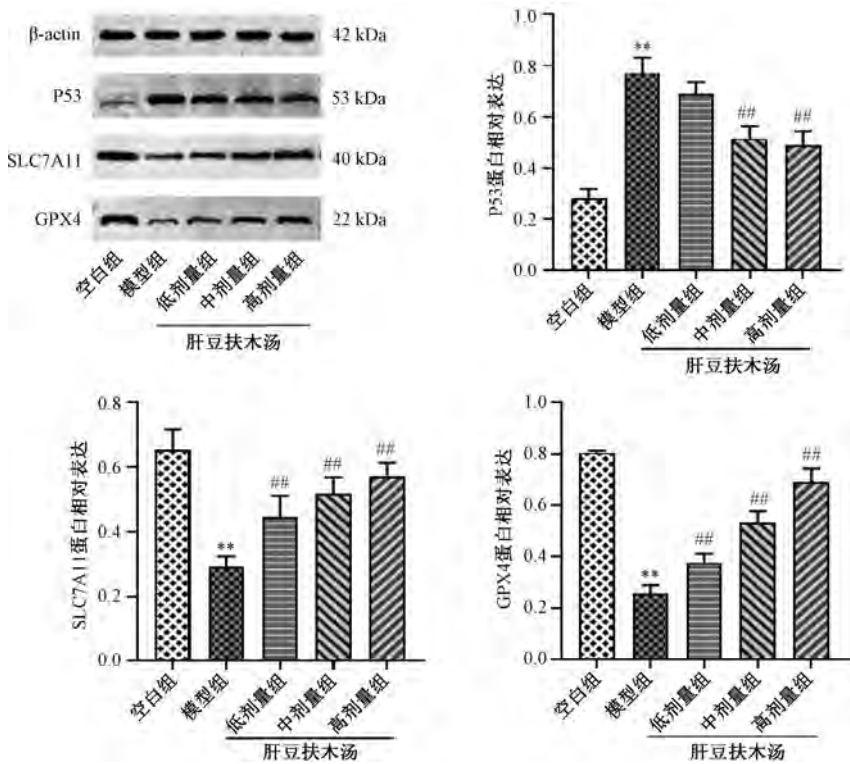


注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 4 肝豆扶木汤对 HepG2 细胞 GSH、MDA、ROS 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2.4 肝豆扶木汤对 Erastin 诱导 HepG2 细胞 P53、SLC7A11、GPX4 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组细胞 P53 蛋白表达升高 ($P<0.01$), SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较,肝豆扶木汤中、高剂量组细胞 P53 蛋白表达降低 ($P<0.01$), 肝豆扶木汤各

剂量组细胞 SLC7A11、GPX4 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 并呈剂量依赖性, 见图 5。结果表明, 肝豆扶木汤抑制 HepG2 细胞铁死亡的作用可能与其下调 P53 蛋白表达, 上调 SLC7A11、GPX4 蛋白表达有关。

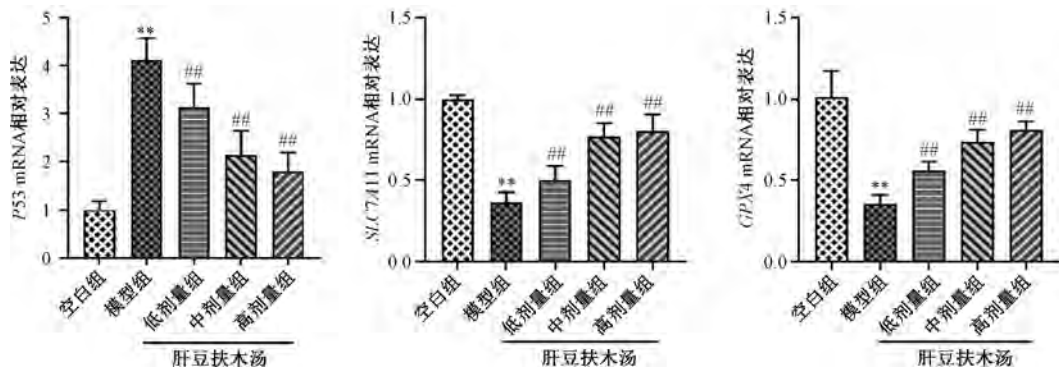


注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图 5 肝豆扶木汤对 HepG2 细胞 P53、SLC7A11、GPX4 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.2.5 肝豆扶木汤对 Erastin 诱导 HepG2 细胞 P53、SLC7A11、GPX4 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组细胞 P53 mRNA 表达升高 ($P<0.01$), SLC7A11、GPX4 mRNA 表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较,肝豆扶木汤各剂量组细胞 P53 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), SLC7A11、

GPX4 mRNA 表达升高 ($P<0.01$), 并呈剂量依赖性, 见图 6。结果表明, 肝豆扶木汤抑制 HepG2 细胞铁死亡的作用与其下调 P53 mRNA 表达, 上调 SLC7A11、GPX4 mRNA 表达有关。



注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图 6 肝豆扶木汤对 HepG2 细胞 P53、SLC7A11、GPX4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

4 讨论

肝损害几乎是每一个 Wilson 病患者都存在的症状, 如

不能及时有效地进行干预, 易出现暴发性肝衰竭, 甚至导致死亡^[3]。如能早期有效干预, 则能显著延缓肝损害的病

理进程^[12]。近年来,国内外学者对 Wilson 病肝损害的分子机制研究取得了一定的进展^[13-14]。Wilson 病患者存在铁代谢障碍,铁离子的沉积在疾病的进展中起到重要作用^[15-16]。分子对接技术是通过计算机模拟化合物与蛋白质受体匹配的模式和亲和力,是现代药物探索和新药发现的重要工具^[17]。故本研究将肝豆扶木汤的活性成分与铁死亡相关蛋白进行分子对接,结果显示铁死亡关键蛋白 SLC7A11 与肝豆扶木汤的活性成分具有良好的结合能力。

肝豆扶木汤是针对 Wilson 病肝损害的病机特点创立而成^[18],由枸杞子、白芍、制何首乌、三七粉、土茯苓、柴胡、郁金组成,课题组前期临床和基础实验研究证实该方对 Wilson 病肝损害具有保护作用^[19]。现代药理表明,肝豆扶木汤的活性成分具有抗氧化等作用^[20-21]。本研究采用 Erastin 诱导 HepG2 细胞构建铁死亡模型,以肝豆扶木汤干预,发现肝豆扶木汤能提高 HepG2 细胞的抗氧化能力,对细胞具有保护作用。细胞内 ROS、MDA 升高及 GSH 消耗是氧化应激的标志,也是铁死亡发生的标志之一。本研究结果显示, HepG2 细胞经 Erastin 诱导后,其 ROS 和 MDA 水平升高, GSH 水平降低,说明 Erastin 诱导 HepG2 细胞发生氧化应激;而肝豆扶木汤干预降低了 ROS 和 MDA 水平,提高了 GSH 水平,说明肝豆扶木汤具有抗氧化的作用。

SLC7A11 可促进细胞对胱氨酸的摄取和 GSH 合成,提高抗氧化能力,保护细胞免受铁死亡^[22]。P53 可以抑制 SLC7A11 表达,导致 GSH 合成受损并增加消耗,促进铁死亡^[23]。GPX4 是一种抗氧化酶,能降低 ROS 水平来抑制铁死亡的发生,而 GSH 缺失可使 GPX4 失活^[24]。抑制 GPX4 活性可导致脂质过氧化物积累发生铁死亡^[25]。当 SLC7A11 表达被抑制,胱氨酸吸收减少, GSH 合成被影响,导致 GPX 活性降低,抗氧化能力下降, ROS 积聚,最终导致铁死亡^[26]。本研究采用 Erastin 诱导处理 HepG2 细胞后,其 P53 蛋白和 mRNA 表达升高, SLC7A11、GPX4 蛋白和 mRNA 表达降低,说明 Erastin 处理后的 HepG2 细胞发生了铁死亡;而肝豆扶木汤干预后下调了 P53 蛋白和 mRNA 表达,上调了 SLC7A11、GPX4 蛋白和 mRNA 表达,说明肝豆扶木汤能够抑制铁死亡,且可能通过 SLC7A11/GPX4 轴对细胞产生保护作用。

综上所述,肝豆扶木汤能通过降低 ROS 和 MDA 水平,提高 GSH 水平,下调 P53 表达,上调 SLC7A11 和 GPX4 表达来减轻 HepG2 细胞的铁死亡,其作用可能是通过调控 SLC7A11/GPX4 轴实现的。本研究为临床运用肝豆扶木汤治疗 Wilson 病患者肝损害提供科学证据。

参考文献:

[1] 杨文明. 中西医结合神经病学临床研究[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 236- 237.

[2] Dusek P, Lescinskij A, Ruzicka F, *et al.* Associations of brain atrophy and cerebral iron accumulation at MRI with clinical severity in Wilson disease[J]. *Radiology*, 2021, 299 (3): 662-672.

[3] Gerosa C, Fanni D, Congiu T, *et al.* Liver pathology in Wilson’s disease: From copper overload to cirrhosis[J]. *J Inorg Biochem*, 2019, 193(2): 106-111.

[4] Capelletti M M, Manceau H, Puy H, *et al.* Ferroptosis in liver diseases: An overview [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (14): 4908.

[5] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.

[6] Wei T H, Hao W J, Tang L L, *et al.* Comprehensive RNA-seq analysis of potential therapeutic targets of Gan-Dou-Fu-Mu Decoction for treatment of Wilson disease using a toxic milk mouse model[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 15(12): 622268.

[7] 唐露露, 刘丹青, 李 睿, 等. 肝豆扶木汤对 TX 小鼠肝纤维化的保护作用及机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(12): 1461-1466.

[8] 唐露露, 张 静, 魏涛华, 等. 肝豆扶木汤对 CuCl₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用和机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 48-56.

[9] Liu Z Y, Guo F F, Wang Y, *et al.* BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 211146.

[10] Liu Y, Grimm M, Dai W T, *et al.* CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein ligand blind docking[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(1): 138-144.

[11] Cao Y, Li L. Improved protein-ligand binding affinity prediction by using a curvature dependent surface-area model [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(12): 1674-1680.

[12] Roberts E A, Schilsky M L, American Association for Study of Liver Diseases (AASLD). Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update [J]. *Hepatology*, 2008, 47 (6): 2089-2111.

[13] Szeligowska J, Ilczuk T, Nehring P, *et al.* Liver injury in Wilson’s disease: An immunohistochemical study[J]. *Adv Med Sci*, 2022, 67(2): 203-207.

[14] Lamboux A, Couchonnal-Bedoya E, Guillaud O, *et al.* The blood copper isotopic composition is a prognostic indicator of the hepatic injury in Wilson disease [J]. *Metallomics*, 2020, 12 (11): 1781-1790.

[15] Gromadzka G, Wierzbicka D W, Przybyłowski A, *et al.* Effect of homeostatic iron regulator protein gene mutation on Wilson’s disease clinical manifestation: original data and literature review [J]. *Int J Neurosci*, 2022, 132(9): 894-900.

[16] Gromadzka G, Wierzbicka D, Litwin T, *et al.* Iron metabolism is disturbed and anti-copper treatment improves but does not normalize iron metabolism in Wilson’s disease[J]. *Biometals*, 2021, 34(2): 407-414.

[17] Rahman J, Tareq A M, Hossain M M, *et al.* Biological evaluation, DFT calculations and molecular docking studies on the antidepressant and cytotoxicity activities of *Cycas pectinata* Buch. -Ham compounds[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13(9): 232.

[18] 郝文杰, 杨文明, 魏涛华, 等. 基于“肝络微癥积”学说探讨中医药抗肝豆状核变性肝纤维化治疗策略[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(3): 307-312.

[19] 唐露露, 杨文明, 董 婷, 等. 肝豆扶木颗粒治疗肝肾亏虚兼痰瘀互结型 Wilson 病患者的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 127-132.

[20] 张育贵, 张淑娟, 边甜甜, 等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中草药, 2019, 50(15): 3735-3740.

[21] 郑雪花, 杨 君, 杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 94-98; 102.

[22] Koppula P, Zhang Y L, Zhuang L, *et al.* Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(1): 12.

[23] Stockwell B R, Friedmann Angeli J P, Bayir H, *et al.* Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.

[24] Kagan V E, Mao G, Qu F, *et al.* Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 81-90.

[25] Yang W S, Stockwell B R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS harboring cancer cells[J]. *Chem Biol*, 2018, 15(3): 234-245.

[26] Yang W S, SriRamaratnam R, Welsch M E, *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1-2): 317-331.

基于网络药理学和动物实验探讨葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病的作用

范尧夫, 许 娟, 孙洪平, 曹 琳*
(南京中医药大学附属中西医结合医院内分泌科, 江苏 南京 210028)

摘要: **目的** 基于网络药理学和动物实验探讨葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病 (T2DM) 的作用机制。**方法** 利用中药系统药理学技术平台 (TCMSP) 对葛根芩连汤有效成分进行筛选及靶点预测, GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD、DrugBank 数据库获得 T2DM 相关疾病靶标基因, Cytoscape 技术整合药物与疾病的交集靶点基因, 建立蛋白质相互作用 (PPI) 网络, R 语言进行 GO 功能、KEGG 通路富集分析。通过动物实验验证葛根芩连汤治疗 T2DM 的作用机制。**结果** 获得活性化合物 140 个, 有效靶点 212 个。葛根芩连汤治疗 T2DM 涉及靶点 204 个, 涉及炎症 TNF 信号通路等 119 条信号通路。与模型组比较, 葛根芩连汤可降低 T2DM 小鼠体质量、空腹血糖、空腹胰岛素、HOMA-IR、TNF-α 及 IL-17 水平 ($P<0.05$), 改善肝细胞形态, 减少脂质空泡数目, 减轻淋巴细胞浸润及脂质沉积, 降低肝组织 TNF-α、NF-κB 蛋白表达 ($P<0.05$)。**结论** 葛根芩连汤治疗 T2DM 具有多成分、多靶点特性, 可能通过 TNF-α 信号通路抑制炎症反应来发挥降糖疗效。

关键词: 葛根芩连汤; 2 型糖尿病; 网络药理学; 动物实验; TNF-α; 炎症反应

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3468-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.054

目前全球有超过 4.63 亿糖尿病患者, 到 2045 年糖尿病患病人数将达到 7 亿^[1-2]。在糖尿病人群中, 约 90% 以上为 2 型糖尿病 (T2DM), 其主要病理特征是胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞功能障碍^[3]。目前针对 T2DM 的治疗主要以化学药物为主, 虽然降糖疗效确切, 但常伴随各种不良反应的发生。研究已证实, 肝脏糖异生作用的增加是糖尿病发病机制中极为关键的一点, 且该作用可贯穿 T2DM 的整个

病程。因此, 调控肝脏异常糖异生作用, 减少肝糖原输入是治疗 T2DM 的重要且有前景的方法。近年来, 中医药在改善糖脂代谢方面取得了显著成效。葛根芩连汤作为治疗早中期肠道湿热型 T2DM 的代表方剂收录于《中国 2 型糖尿病防治指南》^[4]。葛根芩连汤出自《伤寒论》, 具有清利湿热功效, 在改善肝脏胰岛素抵抗、调节肝糖异生方面具有独特优势^[5-6], 但是其治疗 T2DM 的确切机制和靶点并不

收稿日期: 2022-08-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81603585, 81804070); 江苏省卫生健康委医学科研项目 (M2021086); 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20211388)

作者简介: 范尧夫 (1986—), 男, 硕士, 主治中医师, 从事中医药治疗内分泌代谢疾病临床、基础研究。Tel: 13701471403, E-mail: fanyaofu2010@163.com

* 通信作者: 曹 琳 (1984—), 女, 博士, 副主任中医师, 从事中医药治疗内分泌代谢疾病临床、基础研究。Tel: 15195985341, E-mail: guodongcl@163.com