

基于网络药理学、分子对接、体外细胞实验预测珠子参保肝机制

张海潮，周 瑞*，唐志书*，苏 洁，刘妍如，潘亚磊，刘红波，宋忠兴
[陕西中医药大学/陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心/秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育)/陕西省创新药物研究中心，陕西 咸阳 712083]

摘要：目的 借助网络药理学、分子对接、体外细胞实验预测珠子参保肝的主要成分及作用机制。**方法** 通过 ETCM、SwissTargetPrediction、SymMap、Melacards 数据库以及文献查阅，搜索整理珠子参的活性成分以及 与疾病的作用靶点，利用 STRING 数据库构建蛋白互作网络以及 GO 和 KEGG 富集分析，并采用 Cytoscape3. 7. 2 构建“成分-靶点-通路”图，预测其可能的保肝作用机制，进一步采用分子对接和细胞实验检测珠子参对肝细胞损伤模型的保护作用。**结果** 获得珠子参活性成分 43 种，作用靶点 247 个，与 309 个疾病靶点相交后，得到 TNF、CASP3、IL6、IL1B、JUN 等 27 个靶点及竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Re、人参皂苷 Ro、越南皂苷 R4 和三七皂苷 R1 等 37 种对应成分。GO 富集分析共得到条目 616 条 ($P<0.05$)，KEGG 富集共得到通路 122 条，主要涉及乙型肝炎、Th17 细胞分化、TNF 信号通路和 IL17 信号通路等。分子对接结果显示，预测的珠子参保肝的重要活性化合物与关键靶点具有较好的结合活性。体外结果显示，珠子参皂苷对 LPS 诱导 L02 细胞的炎性损伤模型具有一定的保护作用。**结论** 本研究通过网络药理学、分子对接技术和体外细胞实验表明，珠子参具有一定的保肝作用。**关键词：**珠子参；保肝作用；网络药理学；分子对接；体外细胞实验
中图分类号：R966 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2021)09-2342-10
doi:10. 3969/j.issn.1001-1528. 2021. 09. 012

Prediction of hepatoprotective mechanism of *Panacis majoris Rhizoma* based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* cellular test

ZHANG Hai-chao，ZHOU Rui*，TANG Zhi-shu*，SU Jie，LIU Yan-ru，PAN Ya-lei，LIU Hong-bo，SONG Zhong-xing
[Shaanxi University of Chinese Medicine/Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry/State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivative) /Shaanxi Innovative Drug Research Center, Xianyang 712083, China]

ABSTRACT: **AIM** To predict the main components and mechanism of the hepatoprotective effect of *Panacis majoris Rhizoma* through network pharmacology, molecular docking and *in vitro* cellular test. **METHODS** The active constituents and targets of *Panacis majoris Rhizoma* and the targets of diseases were searched by ETCM, SwissTargetPrediction, SymMap, Melacards databases and literature review. The STRING database helped with the building of the protein-protein interaction network, and further GO and KEGG enrichment analysis, and use of Cytoscape3. 7. 2 achieved a components-targets-pathways network for prediction of possible hepatoprotective effect of

收稿日期：2021-01-22
基金项目：国家自然科学基金项目（81773919）；国家自然科学基金青年项目（81803946）；国家中药材产业技术体系咸阳综合试验站补贴项目（2019JCW-06）；陕西省教育厅 2020 年度重点科学研究计划（协同创新中心项目）（20JY010）；陕西省中药基础与新药研究重点实验室开放基金项目（2017KF06）
作者简介：张海潮（1995—），女，硕士生，从事生物药剂学和药物新剂型给药系统研究。Tel: 13772199512, E-mail: 1301297473@qq.com
*** 通信作者：**周 瑞（1985—），女，博士，副教授，从事中药药理学作用机制研究。Tel: (029) 38182205, E-mail: zhouruiswg@126.com
唐志书（1972—），男，教授，博士生导师，从事中药制剂技术与质量分析研究。Tel: (029) 38185060, E-mail: tzs6565@163.com

Panacis majoris Rhizoma, which could be verified by molecular docking and cellular tests on hepatocellular injury models. **RESULTS** *Panacis majoris Rhizoma* contributed 43 candidate compounds targeting 247 corresponding sites, overlapped with 309 disease targets, among which the 27 targets including TNF, CASP3, IL6, IL1B, JUN, etc. were found to be components of chikusetsusaponin IVa, ginsenoside Re, ginsenoside Ro, Vina-ginsenosides R4 and notoginsenoside R1, etc.. 616 items were gained through the function enrichment analysis of GO ($P<0.05$). KEGG pathway enrichment analysis revealed 122 signal pathways mainly involving hepatitis B, Th17 cell differentiation, TNF signaling pathway and IL17 signaling pathway, etc.. The results of molecular docking showed that there was better binding activity on the predicted important active compounds of hepatoprotective effect of *Panacis majoris Rhizoma* with key targets. The cellular tests verified protective effect of the total glycosides of *Panacis majoris Rhizoma* on L02 cell models of LPS-induced inflammatory injury. **CONCLUSION** Certain hepatoprotective effect exerted by *Panacis majoris Rhizoma* can be identified by network pharmacology, molecular docking technology and *in vitro* cellular tests.

KEY WORDS: *Panacis majoris Rhizoma*; hepatoprotective effect; network pharmacology; molecular docking; *in vitro* cellular test

珠子参为五加科植物珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *Major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 或羽叶三七 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *Bipinnatifidus* (Seem) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎, 是秦巴特色中草药资源“太白七药”之一^[1], 据《中国药典》记载, 珠子参归肝经、胃经、肺经, 早在《本草纲目拾遗》就记载其具有止血、活络、养阴等功效^[2], 其熟品常用于气血双亏。研究报道, 珠子参中主要成分为珠子参总皂苷, 其具有保肝、抗炎镇痛、抗氧化损伤和诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡等药理作用^[3-4]。

肝脏是维持人体新陈代谢稳定的重要器官, 具有抵抗病原菌感染, 产生多种凝血因子, 维持血液循环以及排毒解毒等生理功能^[5]。药源性损伤, 辐射、环境污染等外部损伤, 酗酒、饮食不规律等生活中的不良生活习惯以及糖尿病等疾病并发症均会导致肝脏损伤。肝疾病进行到终末期肝硬化等症状时, 常会使肝实质细胞发生病变, 结果导致肝再生能力降低, 功能减弱, 最终发展到肝功能衰竭。肝损伤是各种类型肝病的病理基础, 因此抑制以及治疗肝损伤是防止肝病进一步发展的有效措施之一^[6]。

中药是多组分的天然药物, 其机制复杂, 各种组学技术、高内涵技术等为分析中药作用机制提供了技术支撑^[7]。有研究表明珠子参总皂苷对 CCl₄ 导致大鼠肝纤维化具有保护作用^[8], 但珠子参保肝的作用机制尚不清楚。近几年, 网络药理学研究发展迅速, 它是基于现代药理学研究药物开发设计

的新方法和新策略^[9], 可通过构建生物分子“疾病-药物-靶点-通路”网络来对机体复杂生物系统进行分析, 预测药物的作用机理, 发现和优化先导化合物以及药物临床前安全性有效性评估^[10]。因此, 本研究采用网络药理学研究技术构建“成分-靶点-通路”网络, 探讨珠子参保肝的活性成分及作用机制, 并通过分子对接和细胞实验进一步验证珠子参的保肝作用。

1 方法

1.1 珠子参活性化合物及相应靶点的获取 借助 ETCM (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/index.htm>) 数据库以及现有文献, 以“珠子参”为关键词检索, 获得其化学成分, 利用中医药百科全书数据库 ETCM、SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、中医药证候关联数据库 SymMap (<https://www.symmap.org/>) 数据库获得候选化合物的相应靶点, 并在 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对靶点校正。

1.2 疾病潜在靶点的获取 在人类疾病数据库 (Melacards) (<https://www.genecards.org/>) 中, 以“肝炎 (hepatitis)、乙肝 (hepatitis B)、酒精性及非酒精性肝炎 (alcoholic /non-alcoholic hepatitis)、病毒性肝炎 (viral hepatitis)、脂肪肝 (fatty liver disease)、肝硬化 (liver cirrhosis) 以及急性肝衰竭 (acute liver failure)”等为关键词检索其相关靶点, 删除重复靶点后, 通过 Venny 2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 在线作图, 收集珠子参保肝的

潜在靶点。

1.3 蛋白互作网络的构建 将筛选后的潜在靶点导入到蛋白互作分析平台 STRING 11.0 (<https://string-db.org/>)，选择种属为“人类 (*Homo sapiens*)”，获取蛋白互作关系的 PPI 网络，PPI 网络中线的粗细表示互相作用的强弱，靶点的度值表示节点的连接情况，度值越大，代表此节点在蛋白互作网络中越重要。

1.4 “活性化合物-疾病-靶点”网络的构建 利用 Cytoscape3.7.2 构建“活性化合物-疾病-靶点”可视化网络。借助“网络分析(network analyzer)”功能,获得参与互作蛋白的度值 (Degree) 和介数 (Betweenness)，筛选出珠子参中潜在的具有保肝作用的活性化合物和相应的疾病靶点。

1.5 GO 和 KEGG 功能富集分析 将筛选后的靶点导入蛋白质互作分析平台 STRING 11.0，设定物种为“*Homo sapiens*”，经上述数据库检索和转化操作，对生物学过程 (biological Process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 及细胞组成 (cellular component, CC) 进行 GO (gene ontology) 富集分析，通过京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 对代谢通路进行富集分析，并应用微生物信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 在线作图，将结果分别绘制成柱状图和气泡图。

1.6 “活性化合物-靶点-通路”网络的构建 通过文献挖掘，对 KEGG 通路进行分析，并利用 Cytoscape3.7.2 软件构建“活性化合物-靶点-通路”网络，获得珠子参保肝的相关通路、靶点以及有效成分。

1.7 分子对接 应用 UCSF Chimera 软件将上述网络中度值靠前的 5 个靶点分别与 5 个度值靠前的活性化合物进行分子对接验证。在 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中分别下载 5 个靶点的蛋白结构，并导入到 UCSF Chimera 软件进行蛋白预处理成 mol2 格式。在 SciFinder-Explore 数据库 (<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>) 中下载保存活性化合物 mol 格式，利用 ChemBioDraw Ultra 14.0 软件将其转化成 cdx 格式，再使用 Chem3D 19.0 软件进行能量最小化处理并保存 mol2 格式。将处理成 mol2 格式的靶点和分子在 UCSF Chimera 软件中进行分子对接，得到结合能 (affinity)。

1.8 珠子参总苷对 L02 细胞炎症损伤模型的影响

1.8.1 MTT 法检测珠子参总苷对细胞炎症损伤模

型的保护作用 将 L02 细胞以 1.5×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板中，培养 24 h 后，吸出培养基，给药，将细胞分为空白组 (基础培养基)、脂多糖 (LPS) ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$) 组、(LPS) ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$) + 珠子参 (50、100 $\mu\text{g/mL}$) 组，放入培养箱培养 2 h 后加入 10 μL LPS，24 h 后进行 MTT 检测。

1.8.2 酶联免疫法 (ELISA) 检测细胞上清中 IL-6、NO 水平 按“1.8.1”项下方法培养细胞，24 h 后收集细胞上清，根据 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 H201211-007b，欣博盛生物科技有限公司)、Griess 试剂盒 (批号 DC15BA0731，BBI Life Science Corporation) 说明书操作，分别检测 L02 各组细胞上清中白介素 6 (IL-6) 和一氧化氮 (NO) 的水平。

1.8.3 DAPI 染色观察 L02 细胞形态 将 L02 细胞以 1.5×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔板中，培养 24 h 后给药，2 h 后取出在 LPS 组和 LPS+珠子参组加入 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ LPS。经过 24 h 的培养，用 DAPI 染色剂染色，分别在明场和荧光成像模式下，对细胞形态进行拍照。

2 结果

2.1 珠子参活性化合物的筛选 通过 ETCM 数据库以及文献检索整理得到珠子参的候选活性化合物有 43 个，同时将其编号，并在 ETCM、SwissTargetPrediction、SyMmap 中获得靶点 247 个。珠子参中活性化合物的基本信息见表 1。

2.2 疾病潜在靶点分析 通过 Melacards 数据库检索与保肝相关的靶点，获得了 309 个。再将珠子参候选活性化合物的靶点和保肝相关靶点通过 Venny 2.1.0 取交集，得到共同靶点 27 个 (图 1)，对应成分 37 个。

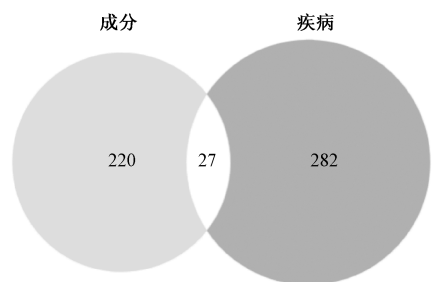


图 1 珠子参成分和疾病的共有靶点
Fig. 1 Common targets of *Panacis majoris* Rhizoma components and diseases

2.3 珠子参成分靶点与疾病靶点蛋白互作网络的构建 通过查找资料，得到珠子参保肝的 18 个相关靶点，分别为 AKT1、ALB、CASP3、CD81、

表 1 珠子参中活性成分

Tab. 1 Active components in *Panacis majoris Rhizoma*

编号	CAS 号	成分	中文名
ZZS1	65-85-0	Benzoic Acid	苯甲酸
ZZS2	57096-02-3	4'-Hydroxywogonin	4'-羟基汉黄芩素
ZZS3	68555-08-8	beta-sitosterol	β-谷甾醇
ZZS4	1131372-16-1	β-Sitosterol 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -Glucopyranoside	β-谷甾醇-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷
ZZS5	118-41-2	3,4,5-Trimethoxybenzoic Acid	3, 4, 5-三甲氧基苯甲酸
ZZS6	1991-10-1	2,6-Dimethoxyphenol	2, 6-二甲氧基苯酚
ZZS7	57-88-5	Cholesterol	胆固醇
ZZS8	566-93-8	4,6-Cholestadien-3-One	4,6-胆固醇二烯-3-酮
ZZS9	55722-32-2	6-Hydroxystigmast-4-En-3-One	6-羟基豆甾-4-烯-3 酮
ZZS10	80321-63-7	Gypenoside IX	七叶胆皂苷 IX
ZZS11	51415-02-2	Chikusetsusaponin IVa	竹节参皂苷IVa
ZZS12	11021-13-9	Ginsenoside Rb2	人参皂苷 Rb2
ZZS13	474-62-4	Campesterol	菜油甾醇
ZZS14	34367-04-9	Ginsenoside Ro	人参皂苷 Ro
ZZS15	80418-25-3	Notoginsenoside R2	三七皂苷 R2
ZZS16	52286-58-5	Ginsenoside Rf	人参皂苷 Rf
ZZS17	164990-98-1	Taibaienoside IV	太白木皂苷IV
ZZS18	206559-02-6	Taibaienoside I	太白木皂苷 I
ZZS19	51542-56-4	Ginsenoside Re	人参皂苷 Re
ZZS20	52286-74-5	Ginsenoside Rg2	人参皂苷 Rg2
ZZS21	52705-93-8	Ginsenoside Rd	人参皂苷 Rd
ZZS22	81534-62-5	Majonoside R1	珠子参皂苷 R1
ZZS23	81534-63-6	Majonoside R2	珠子参皂苷 R2
ZZS24	—	OleanicAcid-28- <i>O</i> -β- <i>D</i> -Glucopyranoside	齐墩果酸-28- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷
ZZS25	—	OleanolicAcid3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6'-Methylester)-Glucuronopyranoside	齐墩果酸-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6'-甲酯)-吡喃葡萄糖醛酸苷
ZZS26	—	3- <i>O</i> -[β- <i>D</i> -Glucopyranosyl-(1 → 2)-β- <i>D</i> -Glucuronopyranosyl]-OleanolicAcid-28- <i>O</i> -β- <i>D</i> -Glucopyranoside	3- <i>O</i> -[β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖基-(1→2)-β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖基-齐墩果酸-28- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷
ZZS27	58546-61-5	Chikusetsusaponin IVa methyl Ester	竹节参皂苷IVa 甲酯
ZZS28	41753-43-9	Ginsenoside Rb1	人参皂苷 Rb1
ZZS29	22427-39-0	Ginsenoside Rg1	人参皂苷 Rg1
ZZS30	98474-74-9	Pseudoginsenoside RT1	拟人参皂苷 RT1
ZZS31	—	Dammar-20(22)- <i>E</i> -24-Di-Ene-3β, 6α, 12β-Triol	20(22)- <i>E</i> -24-达玛二烯-3β, 6α, 12β-三醇
ZZS32	—	Dammar-20(22)- <i>Z</i> , 24-Di-Ene-3β, 6α, 12β-Triol	20(22)- <i>Z</i> -24-达玛二烯-3β, 6α, 12β 三醇
ZZS33	11021-14-0	Ginsenoside Rc	人参皂苷 Rc
ZZS34	68406-26-8	Ginsenoside Rb3	人参皂苷 Rb3
ZZS35	156009-80-2	Vina-ginsenosides R4	越南参皂苷 R4
ZZS36	80418-24-2	Notoginsenoside R1	三七皂苷 R1
ZZS37	85013-02-1	Quinquenoside R1	西洋参皂苷 R1
ZZS38	87733-67-3	Ginsenoside Rs1	人参皂苷 Rs1
ZZS39	88105-29-7	Notoginsenoside-Fe	三七叶苷
ZZS40	83480-64-2	Ginsenoside Rd2	人参皂苷 Rd2
ZZS41	7518-22-1	chikusetsusaponin IV	竹节参皂苷IV
ZZS42	508-02-1	Oleanic acid	齐墩果酸
ZZS43	481-16-3	Stigmasterol	豆甾醇

F2、F3、IL1B、IL2、IL6、IKBKB、JAK1、JUN、NFKBIA、NR1H4、PRKAB1、STAT3、TNF、TP53，将上述靶点导入 STRING 11.0 数据库中，构建 PPI 网络（图 2）。其中，节点代表靶点，有 94 条边相互连接，图中越接近中心的节点即连接靶点较多的节点，在整个网络中起到重要作用，可能是蛋白互作网络中的核心靶点。

2.4 “活性化合物-疾病-靶点”网络的构建 将筛选到的 18 个靶点与对应的 35 个活性化合物进行映射并生成关联表，将数据导入 Cytoscape3.7.2 软件中构建“活性化合物-疾病-靶点”可视化网络（图 3）。其中，节点大小代表度值（Degree）大小，度值越大，该节点在网络中越重要，参与药理作用越明显。

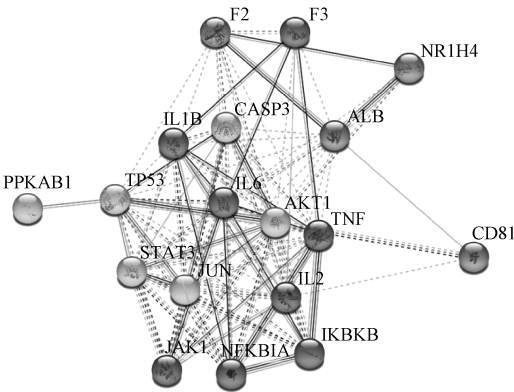
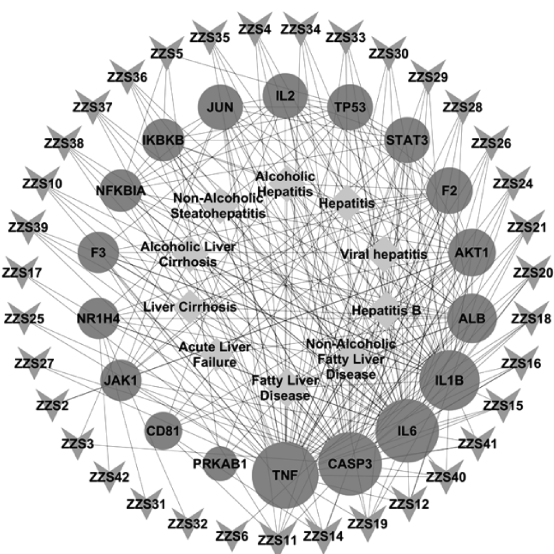


图 2 PPI 网络
Fig. 2 PPI network

结果，竹节参皂苷 IVa (Chikusetsusaponin IVa, ZZS11)、人参皂苷 Ro (Ginsenoside Ro, ZZS14)、人参皂苷 Re (Ginsenoside Re, ZZS19)、人参皂苷 Rb2 (Ginsenoside Rb2, ZZS12)、人参皂苷 Rd2 (Ginsenoside Rd2, ZZS40) 度值比较大，分别为 7、6、6、5、4，说明这些活性成分可能在珠子参发挥保肝作用的过程中起重要作用；排名靠前的靶点还有肿瘤坏死因子 (TNF, Uniprot ID P01375)、白细胞介素 6 (IL6, Uniprot ID P05231)、半胱天冬酶 3 (CASP3, Uniprot ID P42574)、白细胞介素 1B (IL1B, Uniprot ID P01584)、白蛋白 (ALB, Uniprot ID P02768)，分别为 50、45、45、40、23，说明珠子参活性成分可能通过抗炎、调节免疫和凋亡等作用来参与保肝，并具有多成分、多靶点的特点。

2.5 GO 和 KEGG 通路富集分析 将上述 18 个基因导入 STRING 数据库，经检索和转化操作，进行 GO 和 KEGG 富集分析，共得到 GO 条目 616 条 ($P<0.05$)，包括生物学过程 (BP) 550 条，分子功能 (MF) 47 条，细胞组成 (CC) 19 条，绘制各类别前 10 的条目 (图 4)，表明蛋白大部分在细胞外空间 (GO 0005615, extracellular space)、细胞外泌体 (GO 0070062, extracellular exosome) 以及核染色质 (GO 0000790, nuclear chromatin) 等位置；进行细胞因子受体结合 (GO 0005126, cytokine receptor binding)、蛋白质结合 (GO 0005515, protein binding) 以及信号受体结合 (GO 0005102, signaling receptor binding) 等分子功能；并参与细胞表面受体信号通路 (GO 000716, cell surface receptor signaling pathway)、凋亡过程的负调控 (GO 0043066, negative regulation of apoptotic process) 以及调节免疫系统过程 (GO 0002682,



注：绿色菱形节点代表疾病，蓝色圆形节点代表靶点，橘红色倒三角节点代表活性化合物。
图 3 “活性化合物-疾病-靶点”网络
Fig. 3 Active Compound-disease-targets network

regulation of immune system process) 等生物学过程。

富集共得到 KEGG 信号通路 122 条可能与珠子参保肝作用机制有关 (前 20 条通路气泡图见图 5)，其中与肝疾病相关通路 3 条，分别是乙型肝炎 (hsa05161, hepatitis B)、丙型肝炎 (hsa05160, hepatitis C) 及非酒精性脂肪性肝病 (hsa04932, NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease)；与炎症相关通路 5 条，分别是 Th17 细胞分化 (hsa04659, Th17 cell differentiation)、TNF 信号通路 (hsa04668, TNF signaling pathway)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路 (hsa04933, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、IL17 信号通路 (hsa04657, IL17 signaling pathway) 及 Toll 样受体信号通路 (hsa04620, Toll-like receptor signaling pathway)；与凋亡相关通路有 1 条为凋亡通路 (hsa04210, Apoptosis)；与癌症相关通路有 1 条为癌症通路 (hsa05200, pathways in cancer)，说明这些通路可能与珠子参的保肝作用有很大关系。

2.6 “活性化合物-靶点-通路”网络的构建 将上述通路及其基因整理得到 15 个基因以及对应活性成分 31 个，利用 Cytoscape3.7.2 构建“活性化合物-靶点-通路”网络 (图 6)，得到珠子参保肝的主要活性成分有竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Re、人参皂苷 Ro、越南皂苷 R4 (Vina-ginsenosides R4,

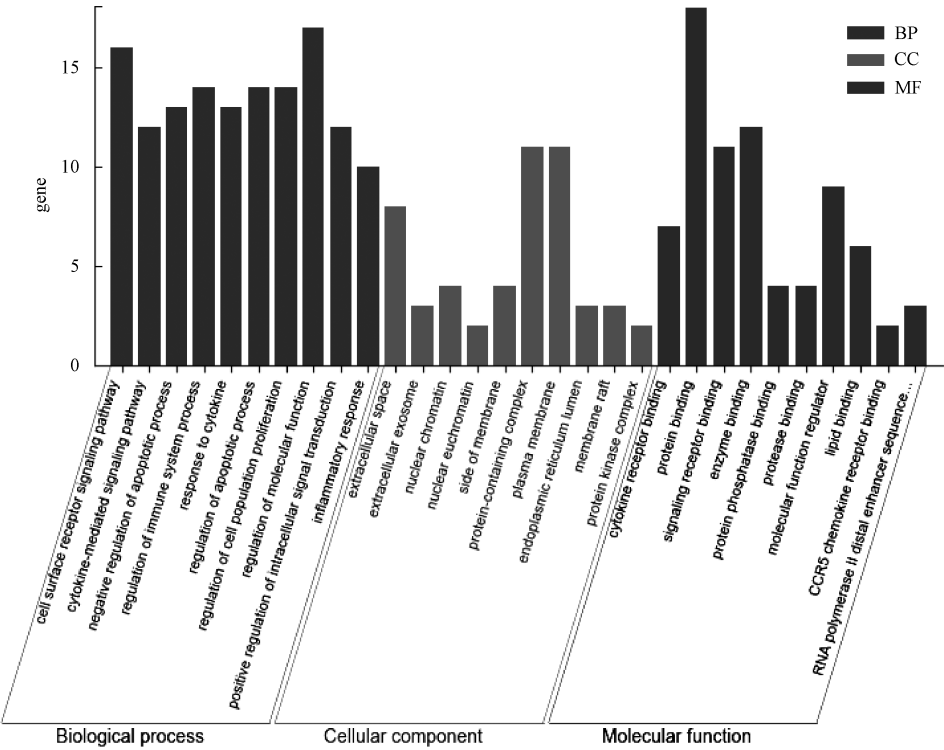


图 4 珠子参保肝靶点的 GO 富集分析

Fig. 4 Gene ontology enrichment analysis of the hepatoprotective targets of *Panacis majoris Rhizoma*

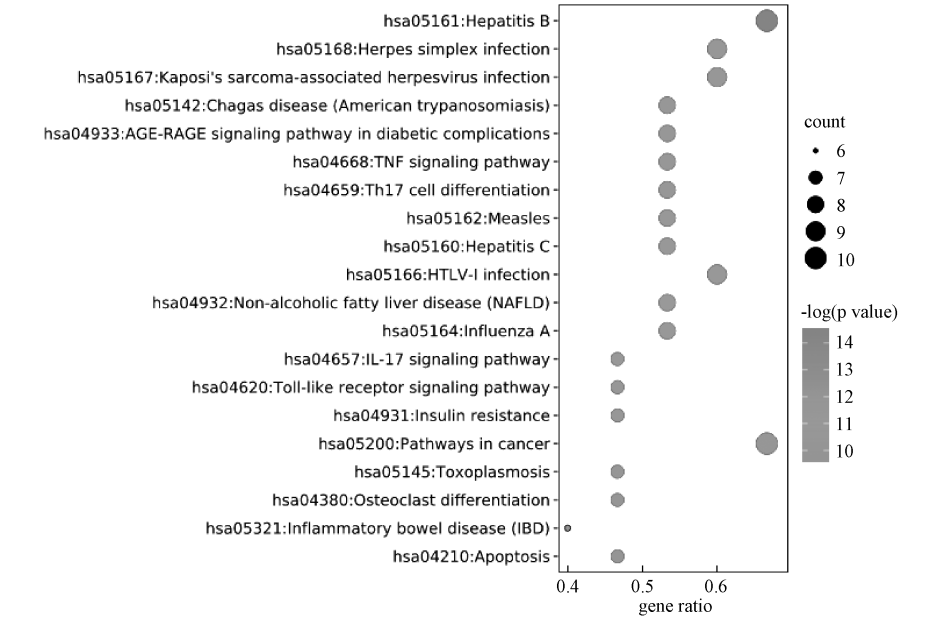
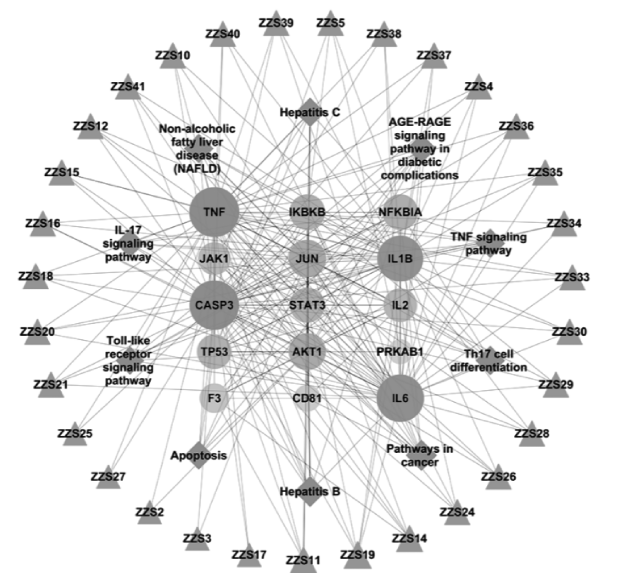


图 5 珠子参保肝靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis of the hepatoprotective targets of *Panacis majoris Rhizoma*

ZZS35)、三七皂苷 R1 (notoginsenoside R1, ZZS36) 等, 核心靶点主要包括 TNF、CASP3、IL6、IL1B、原癌基因蛋白 (JUN, Uniprot ID: P05412) 等, 通过乙型肝炎通路、Th17 细胞分化通路、TNF 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、非酒精性脂肪性肝病通路、IL17 信号通路等来发挥

作用。
2.7 分子对接 将“2.6”项下度值前 5 个重要靶点蛋白 TNF (PDB ID 2AZ5)、CASP3 (PDB ID 5KFA)、IL6 (PDB ID 1ALU)、IL1B (PDB ID 3LTQ)、JUN (PDB ID 2P33), 以及排名靠前的 5 个活性化合物竹节参皂苷 IVa、人參皂苷 Re、人參



注：绿色圆形节点代表靶点，紫色菱形节点代表通路，蓝色三角形节点代表活性化合物。

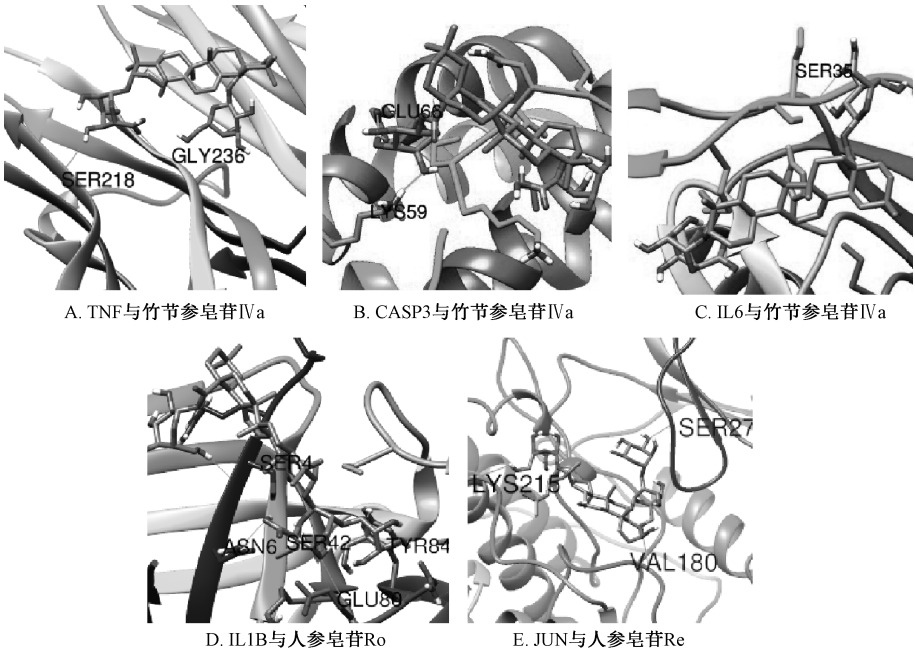
图 6 “活性化合物-靶点-通路”网络
Fig. 6 Active Compound-targets-pathways network

皂苷 Ro、越南皂苷 R4、三七皂苷 R1 进行分子对接验证。由表 2 可知，珠子参中重要化合物、靶点的结合能均<-5.0 kcal/mol，即结合性较好，主要为皂苷类化合物。由图 7 可知，这些化合物主要与蛋白受体结合位点发生氢键作用。

2.8 珠子参总苷对 L02 细胞炎症损伤模型的保护作用 由表 3 可见，珠子参总苷对 LPS 损伤的 L02 细胞有一定的保护作用，LPS 组细胞活性较空白组下降；而 LPS+珠子参组较 LPS 组细胞活性升高，损伤细胞恢复了 25%~29%，并且对细胞没有明显损伤。由表 4 可见，与空白组比较，LPS 组 IL-6、NO 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，LPS+珠子参 100 $\mu\text{g/mL}$ 组两者水平降低 ($P<0.01$)。如图 8 所示，空白组、LPS+珠子参 50 $\mu\text{g/mL}$ 组、LPS+珠子参 100 $\mu\text{g/mL}$ 组中细胞核几乎没有弥散现象及细胞表面损伤现象，但在 LPS 组中细胞数目少，细胞核有弥散现象。

表 2 珠子参重要成分、靶点分子对接结果

成分	TNF/(kcal·mol ⁻¹)	CASP3/(kcal·mol ⁻¹)	IL6/(kcal·mol ⁻¹)	IL1B/(kcal·mol ⁻¹)	JUN/(kcal·mol ⁻¹)
	(2AZ5)	(5KFA)	(1ALU)	(3LTQ)	(2P33)
竹节参皂苷 IVa	-8.9	-8.3	-6.8	-7.2	-7.1
人参皂苷 Re	-7.9	-7.6	-6.7	-7.1	-7.9
人参皂苷 Ro	-8.5	-8.3	-6.7	-7.3	-7.2
越南皂苷 R4	-7.8	-7.9	-6.3	-6.6	-6.5
三七皂苷 R1	-7.8	-6.7	-5.6	-7.0	-7.9



注：粉色球棍模型为候选化合物分子，红色为氧原子，蓝色为氮原子。

图 7 珠子参重要化合物与关键靶点相互作用图
Fig. 7 Interaction diagrams of core *Panacis majoris Rhizoma* compounds and key targets

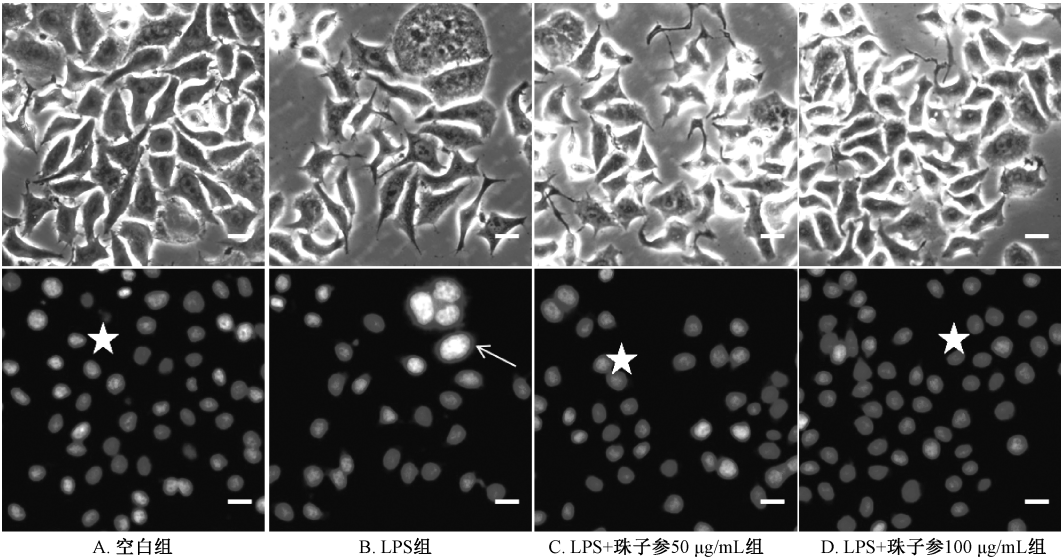
表 3 珠子参总苷对 LPS 损伤 L02 细胞的保护作用（%，n=3）

Tab. 3 Protection effect of total glycosides of <i>Panacis majoris Rhizoma</i> on LPS-injured L02 cells（%，n=3）						
细胞活性	空白组	LPS 组	LPS+珠子参总苷组		珠子参总苷组	
		1 μg/mL	50 μg/mL	100 μg/mL	50 μg/mL	100 μg/mL
试验 1	104.35	69.16	92.74	99.44	96.00	104.51
试验 2	99.48	67.84	95.69	102.10	95.63	105.02
试验 3	96.17	69.43	92.13	92.22	97.96	93.24
平均值	100.00	68.81	93.52	97.92	96.53	100.92

表 4 珠子参总苷对 L02 细胞中 IL-6、NO 水平的影响（ $\bar{x}\pm s$ ，n=3）

Tab. 4 Effects of total glycosides of <i>Panacis majoris Rhizoma</i> on IL-6 and NO levels in L02 cells（ $\bar{x}\pm s$ ，n=3）		
组别	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)
空白组	105.30±1.58	6.64±0.52
LPS 组	111.40±1.63**	12.12±0.32**
LPS+珠子参 50 μg/mL 组	108.42±2.28*#	9.38±1.02***
LPS+珠子参 100 μg/mL 组	107.53±0.86##	9.16±0.89***

注：与空白组比较，*P<0.05，**P<0.01；与模型组比较，#P<0.05，##P<0.01



注：星号表示细胞正常生长，箭头指示细胞受到 LPS 损伤后的细胞核。

图 8 DAPI 染色后各组细胞形态（×200）
Fig. 8 Cell morphologies in various groups after DAPI staining（×200）

3 讨论

藏象学说认为，肝的生理功能主要有“肝主疏泄”和“肝主藏血”两方面^[11]，它可促进人体的消化和气、血、水的正常运行^[12]。本研究基于网络药理学方法，建立成分-疾病-靶点的关联研究网络，从微观的分子角度系统预测分析珠子参保肝的作用机制，为其进一步研究提供理论参考。

据报道^[13]，珠子参总皂苷是珠子参保肝的有效部位，其中竹节参皂苷 IVa 和人参皂苷 Ro 是其主要有效成分，已有研究表明竹节参皂苷 IVa 在原代培养大鼠肝细胞体外免疫性肝损伤的保护模型中显示出肝保护活性^[14]。李聪等^[15]研究发现竹节参皂苷 IVa 通过 miR-17-5p/mitofusin 2 信号通路抑制

线粒体功能障碍，使得转化生长因子-β（TGF-β）、TNF-α、IL-1β 等细胞因子的表达和合成降低，从而降低 IL-6 等炎性因子表达，另一方面也降低肝星状细胞的活化，改善了非酒精性脂肪性肝炎、肝细胞炎症、肝纤维化及肝细胞坏死等症状^[16-18]。有研究^[19]表明人参皂苷 Ro 对急慢性肝炎均有抑制作用。肝纤维化是肝硬化的早期阶段，其中乙型肝炎是其最主要的病因之一。在肝纤维化形成过程中，三七皂苷 R1 可通过降低 TGF-β 等的表达减少肝星状细胞的活化，降低细胞外基质积累来减轻肝纤维化^[20]。本研究通过“成分-疾病-靶点”网络关联分析，发现珠子参发挥保肝作用的主要活性成分为竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Re、人参皂苷 Ro、

越南皂苷 R4 和三七皂苷 R1 等。

TNF、IL-6、IL-1 β 是细胞促炎因子，目前认为，在脂肪肝的发病机制中 TNF- α 是主要因子，它诱导肝脏脂质合成，同时还促进脂肪细胞分解，从而加快肝细胞发生脂肪变性^[21]。IL-6 能够促进细胞毒性淋巴细胞（CTL）、自然杀伤细胞（NK）的分化并增强杀瘤活性，且肝细胞坏死程度与 IL-6、TNF- α 的高表达密切相关^[22]。IL-1 β 在炎症反应过程中起继发作用，IL-1 β 增多可增加慢性炎症反应和组织破坏^[23]。CASP3 主要参与凋亡过程，但在炎症过程中也起着重要作用^[24]。转录因子 c-Jun 能够参与多种细胞过程，包括细胞增殖与凋亡，且可调控凋亡基因也可调控促凋亡基因。研究表明，从正常肝组织到肝硬化再到肝发生癌变，c-fos、c-jun 因子的表达水平呈上升趋势^[25]。因此，TNF、CASP3、IL6、IL1B、JUN 靶点对于保肝作用的研究非常重要。本研究通过 KEGG 通路富集发现，珠子参主要是通过 TNF 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、Th17 细胞分化等通路中的 TNF、CASP3、IL6、IL1B、JUN 等靶点来进行保肝。

TNF 能诱导细胞凋亡从而使机体产生炎症反应，TNF 信号通路、AGE-RAGE 信号通路的激活，能够激

活诱导 NF- κ B 入核，促进 TNF- α 、IL-6、IL-8 等炎症因子的释放，从而引起和加重机体炎症反应^[26-27]。Th17 细胞是一种 CD4⁺T 细胞亚群，具有独立的分化和调节机制。Th17 细胞主要分泌 IL-17 和 IL-21 等标志性细胞因子^[28]。乙型肝炎（HBV）主要通过自身免疫系统对已感染 HBV 的肝细胞进行攻击而致肝细胞损伤，此时具有强大促炎作用的 Th17 细胞发挥着重要作用。近年研究发现慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 数目和 IL-17 表达水平显著升高，表明 Th17 与 HBV 感染后引起的肝细胞损伤有关^[29-30]。另有研究显示，IL-17 不仅参与肝纤维化过程^[31]，还参与了肝细胞炎症损伤过程。结合以往的研究以及本文研究结果，竹节参皂苷 IVa 和人参皂苷 Ro 和三七皂苷 R1 保肝作用预测分析机制图见图 9。分子对接结果显示，与 TNF、CASP3 和 IL1B 结合性较好的是竹节参皂苷 IVa 和人参皂苷 Ro，与 IL6 结合性较好的是竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Ro 和人参皂苷 Re，与 JUN 结合性较好的是人参皂苷 Re 和三七皂苷 R1，因此，与这 5 种重要蛋白受体作用的主要成分是竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Ro 和人参皂苷 Re。由此表明，竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Ro 和人参皂苷 Re 有可能是珠子参中起保肝作用的核心成分。

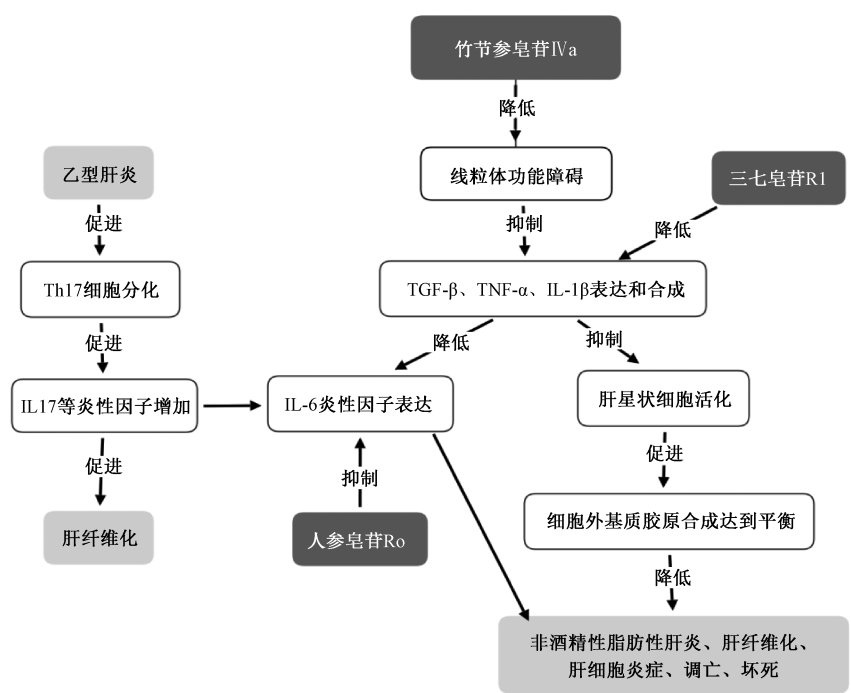


图 9 竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Ro 和三七皂苷 R1 保肝作用预测机制图

Fig. 9 Diagram for the predictive mechanism of the hepatoprotective effect of Chikusetsusaponin IVa, Ginsenoside Ro and Notoginsenoside R1

本研究通过采用不同浓度梯度的珠子参总苷提取液对脂多糖诱导 L02 细胞的炎症损伤进行细胞实验，结果表明珠子参总苷可以在一定程度上恢复 L02 细胞的炎症损伤，进一步验证了珠子参总苷对

炎性损伤的肝细胞具有保护作用，但只是从网络药理学、分子对接和细胞实验初步证明了珠子参总苷对于炎性损伤的肝细胞有一定保护作用，对于更深层次的研究还需要更多实验去证明。综上所述，珠子参发挥保肝作用是主要通过活性成分竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Re、人参皂苷 Ro、越南皂苷 R4 以及三七皂苷 R1 等，与 TNF、CASP3、IL6、IL1B、JUN 等靶点相互作用，并调控乙型肝炎通路、Th17 细胞分化、TNF 信号通路和 IL17 信号通路等来发挥作用。通过分子对接技术和细胞实验进一步验证，珠子参可通过多成分、多靶点、多通路实现保肝作用。

参考文献：

[1] Song X, Wang W, Zhang X, *et al.* Deglucose chikusetsusaponin IVa isolated from *Rhizoma Panacis Majoris* induces apoptosis in human HepG2 hepatoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5494-5500.

[2] 赵 仁, 赵 毅, 李东明, 等. 珠子参研究进展[J]. 中国现代中药, 2008, 10(7): 3-7.

[3] 贺海波, 石孟琼, 陈 涛, 等. 珠子参水提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(20): 2224-2227.

[4] 陈 涛, 陈龙飞, 金国琴, 等. 珠子参体外诱导人肝癌细胞凋亡效应及机制研究[J]. 肿瘤, 2006, 26(2): 144-147.

[5] 刘颖妹. 急性肝损伤早期诊断指标 GSTA1 的研究及保肝药物初筛[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.

[6] 杜 夏. 蜂胶保肝活性成分的分离及其保肝机制初探[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.

[7] 郭晴晴. 基于网络药理学方法研究乌头汤治疗类风湿关节炎的作用机理[D]. 成都: 西南交通大学, 2016.

[8] 张继红, 邓 为, 石孟琼, 等. 珠子参皂苷对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5): 73-78.

[9] 宋京美. 基于数据挖掘的中医治疗肝病临床用药规律与作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.

[10] 张新庄. 基于网络药理学研究思路探索热毒宁注射液治疗 URTI 的作用机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.

[11] 于 宁. 两汉与当代肝藏象理论对比研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.

[12] 陈 欢, 敖海清, 黎颖贤. 浅谈情志病病机与“肝藏血, 主疏泄”功能的关系[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(11): 2282-2283.

[13] 许苗苗, 张 旋, 宋 蓓, 等. 珠子参抗肝损伤药效的物质基础研究[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(5): 486-489.

[14] Kinjo J, Okawa M, Udayama M, *et al.* Hepatoprotective and hepatotoxic actions of oleanolic acid-type triterpenoidal glucuronides on rat primary hepatocyte cultures[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1999, 47(2): 290-292.

[15] 李 聪, 刘小慧, 熊海容, 等. 竹节参皂苷 IVa 调节 miR-17-5p/MFN2 信号通路改善非酒精性脂肪性肝炎[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(19): 4725-4731.

[16] Marques P E, Oliveira A G, Pereira R V, *et al.* Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice[J]. *Hepatology*, 2015, 61(1): 348-360.

[17] Zhang Q, Raoof M, Chen Y, *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury[J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 104-107.

[18] Hernández-Alvarez M I, Sebastián D, Vives S, *et al.* Deficient endoplasmic reticulum-mitochondrial phosphatidylserine transfer causes liver disease[J]. *Cell*, 2019, 177(4): 881-895.

[19] Matsuda H, Samukawa K, Kubo M. Anti-hepatitic activity of ginsenoside Ro1[J]. *Planta Med*, 1991, 57(6): 523-526.

[20] 吴 朕, 马 微, 臧成昊, 等. 三七皂苷 R1 保护四氯化碳诱导肝纤维化模型大鼠的作用[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(26): 4213-4217.

[21] Zhang C, Chen X, Zhu R M, *et al.* Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 212(3): 229-240.

[22] Flamment M, Kammoun H L, Hainault I, *et al.* Endoplasmic reticulum stress: a new actor in the development of hepatic steatosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2010, 21(3): 239-246.

[23] Xu X, Wang B, Ye C, *et al.* Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2008, 261(2): 147-157.

[24] Khalilzadeh B, Shadjou N, Kanberoglu G S, *et al.* Advances in nanomaterial based optical biosensing and bioimaging of apoptosis *via* caspase-3 activity: a review[J]. *Mikrochim Acta*, 2018, 185(9): 434.

[25] Yuen M F, Wu P C, Lai V C, *et al.* Expression of c-Myc, c-Fos, and c-Jun in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2001, 91(1): 106-112.

[26] Liu F, Fu Y, Wei C, *et al.* The expression of GPR109A, NF- κ B and IL-1 β in peripheral blood leukocytes from patients with type 2 diabetes[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2014, 44(4): 443-448.

[27] Yu X H, Zheng X L, Tang C K. Nuclear factor- κ B activation as a pathological mechanism of lipid metabolism and atherosclerosis[J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 70: 1-30.

[28] 宋晓达, 向晓星. Th17 和 Treg 细胞在肝细胞癌发生发展中作用的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2019, 39(1): 9-12.

[29] Ge J, Wang K, Meng Q H, *et al.* Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(1): 60-67.

[30] Zhang J Y, Zhang Z, Lin F, *et al.* Interleukin-17-producing CD4⁺ T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 81-91.

[31] 秦来英, 杜文军, 刘葵花, 等. 白细胞介素 17 的肝内表达与慢性乙型肝炎肝纤维化的相关性[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(3): 221-222.