

· 数据挖掘 ·

基于分子对接技术探讨残黄片退黄作用机制

吉日木巴图^{1,2,3}, 范娜², 王蕊⁴, 牛莹², 王啸洋², 韩晋^{1,2*}

(1. 江西中医药大学 药学院, 南昌 330004; 2. 中国人民解放军第 302 医院, 北京 100039;
3. 内蒙古医科大学 蒙医药研究院, 呼和浩特 010110; 4. 中国医学科学院 药物研究所, 北京 100050)

[摘要] 目的:通过分子对接技术研究残黄片治疗黄疸的作用机制。方法:在中药系统药理学分析平台(TCMSP)中筛选残黄片的化学成分,从比较毒理基因组数据库(CTD)和 DrugBank 数据库中搜集黄疸治疗相关靶点,利用 Discovery Studio 2016 软件 LibDock 模块进行分子对接,分析成分和靶点的相互作用和网络特征。结果:分子对接发现残黄片 37 个成分与锁定的孕烷受体,雄烷受体,法尼醇 X 受体,环氧合酶-2,单胺氧化酶 A,诱导型一氧化氮合酶等 14 个靶点作用较强,可通过调节胆红素代谢、调控胆汁酸合成与转运、抑制免疫与炎症反应、影响肝脏胶原形成等多个途径发挥治疗黄疸作用。成分-靶点作用网络分析发现,残黄片中穆坪马兜铃酰胺,氢化小檗碱,槲皮素,去甲氧基姜黄素,黄柏酮,姜黄素,黄麻甲苷,小檗浸碱,枳木酮,柚皮素共 10 个成分作用于 7 个以上靶点,可能为其退黄主要活性成分。结论:通过分子对接揭示了残黄片可能的退黄活性成分和作用机制,有助于后续质控标准的提升和退黄机制的研究。

[关键词] 残黄片; 黄疸; 胆汁淤积; 分子对接; 成分; 靶点; 网络药理学

[中图分类号] R22;R24;R28;C37;R256.41;R442.4 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)10-0154-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20182410

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180927.1133.004.html>

[网络出版时间] 2018-09-27 16:18

Discussion on Therapeutic Mechanism of Canhuang Tablets for
Jaundice with Molecular Docking

JIRIMU Ba-tu^{1,2,3}, FAN Na², WANG Rui⁴, NIU Ying², WANG Xiao-yang², HAN Jin^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
2. 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;
3. Academy of Mongolian Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China;
4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of treatment of jaundice with Canhuang tablets by molecular docking. Method: The compounds of Canhuang tablets were screened in traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP), and targets for treatment of jaundice were collected from the comparative toxicogenomics database (CTD) and DrugBank database. Molecular docking was carry out on the LibDock module of Discovery Studio 2016 software to evaluate the compound-target interaction, and network characteristics were analyzed. Result: A total of 37 compounds in Canhuang tablets had strong interaction on 14 targets, such as pregnane receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), farnesoid X receptor (FXR), et al. These targets played an important role in the treatment of jaundice by regulating bilirubin metabolism, regulating bile acid synthesis and transport, inhibiting immune and inflammatory response,

[收稿日期] 20180510(009)

[基金项目] 北京市科技计划“十病十药”研发专项(Z171100001717002,Z131100002513005)

[第一作者] 吉日木巴图,在读博士,从事中药制剂研究,E-mail:328022578@qq.com

[通信作者] *韩晋,主任药师,博士生导师,从事中药制剂与工程技术研究,Tel:010-66933225,E-mail:hanjin302emba@163.com

and affecting the formation of collagen in the liver. The compound-target network analysis found that moupinamide, canadine, quercetin, demethoxycurcumin, obacunone, curcumin, corchoroside A, berlambine, alnustone, naringenin were the possible main active compounds of Canhuang tablets, which could interact with more than 7 targets. **Conclusion:** Molecular docking reveals the possible active compounds and the mechanism of treatment of jaundice with Canhuang tablets, and which is conducive to improvement of quality control standard of this preparation and study of its mechanism for jaundice.

[**Key words**] Canhuang tablets; jaundice; cholestasis; molecular docking; compounds; targets; network pharmacology

黄疸是一种常见临床病证,始载于《黄帝内经》,其临床症状以目黄、身黄、小便黄为主证;是身体感受湿热疫毒,肝胆气机受阻,疏泄失常,胆汁外溢所致。黄疸的诊治理论经过历代医者的发展,其治疗准则从围绕脾胃为中心转为以肝胆为中心的治黄理论^[1]。西医所述黄疸与胆汁淤积属此病范畴^[2]。黄疸的主要特征为肝细胞功能不全或肝内毛细胆管阻塞引起胆红素、胆汁酸的摄取、转运、排泄异常,胆汁淤积而反流入血液,导致血液中胆红素、胆汁酸水平明显升高。此病证可见于毛细胆管型病毒性肝炎、药物性黄疸、原发性胆汁性肝硬化、妊娠期复发性黄疸、酒精中毒、家族性肝内胆汁淤积与全身感染^[3-4],若不及时干预可进一步发展为肝纤维化、肝硬化,甚至导致慢性肝衰竭^[5]。因此,黄疸的治疗对于延缓肝病的进程具有重要意义。

残黄片是中国人民解放军第 302 医院军队医疗机构制剂,由黄连、青黛、郁金、白矾 4 味药物组成,具有搜邪祛湿之功效,用于治疗肝炎后期及肝硬化残留黄疸^[6]。本课题组前期研究发现,对 α -萘异硫氰酸酯 (ANIT) 诱导的黄疸模型大鼠灌胃残黄片 ($0.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后具有促进胆汁排泄,缓解肝内胆汁淤积作用^[7];并通过降低血清中升高的总胆红素^[7-9]、直接胆红素^[8] 和胆汁酸含量发挥退黄作用^[9]。残黄片能抑制 ANIT 引起的大鼠肝损伤,显著降低大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT),天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和碱性磷酸酶 (ALP) 等保肝降酶相关指标^[7-8],在降低 ALT 和谷氨酰转肽酶作用上甚至优于熊去氧胆酸片^[8]。肝组织病理学观察显示,残黄片能抑制黄疸模型大鼠肝细胞肿胀、坏死和胆管上皮细胞变性,降低胆管周围胶原纤维增生,减轻胞浆疏松及炎症细胞浸润,改善肝损伤程度^[9]。然而,关于残黄片促进胆汁排泄、降低血清胆红素和胆汁酸含量、减轻肝脏炎症细胞浸润与胶原纤维增生等的作用机制并不清晰,且以黄连中小檗碱作为残黄片含量测定指标^[10] 很难全面控制药

品质量和保障退黄疗效。为了进一步探索残黄片的退黄作用机制,本研究以该方潜在活性成分和黄疸治疗相关靶点为研究对象,采用 Discovery Studio 2016 软件的 LibDock 模块进行分子对接,分析成分和靶点的相互作用和网络特征,筛选可能的退黄活性成分,从胆红素代谢、胆汁酸合成及转运、免疫与炎症反应调节等方面阐述残黄片的退黄作用机制,为提升该制剂的质控标准和疗效,以及其作用机制研究提供新依据。

1 资料与方法

1.1 残黄片成分的筛选准备 在中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 中分别以黄连 (Coptidis Rhizoma), 青黛 (Indigo Naturalis), 郁金 (Curcumae Radix) 为关键词逐一搜集 3 味药的化学成分。在结果数据中限定口服吸收利用率 $\geq 30\%$, 并依据 Lipinski 类药五原则设定相对分子质量 ≤ 500 ; 氢键供体数目 ≤ 5 个; 氢键受体数目 ≤ 10 个; 脂水分配系数 ≤ 5 为条件筛选^[11] 获得了 174 个类药成分,下载其 mol2 结构。将下载的残黄片成分用 Discovery Studio 2016 软件打开,对每个成分进行加氢,赋予 CHARMm 力场,保存为分子对接配体。残黄片中白矾为矿物药,含水硫酸铝钾 $[\text{KAl}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}]$, CAS: 7784-24-9 质量分数 $>99.0\%$ 。其氢键供体数 12 个、氢键受体数 20 个,不符合 Lipinski 类药五原则,且属易形成离子的无机盐,不适合分子对接,故不进行成分准备。

1.2 黄疸治疗靶点的准备 从比较毒理基因组数据库 (CTD, <http://ctdbase.org>) 的 Diseases 界面以 “jaundice” “cholestatic liver disease” 为关键词,搜集黄疸及胆汁淤积相关基因,选择标记有 M 的基因,输入到 DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.ca>) 中查询已上市药物的作用靶点及其蛋白质数据库 (PDB) ID,选取了与治疗黄疸相关的 14 个靶点,见表 1,并通过 RCSB PDB 数据库 ([• 155 •](http://www.</p></div><div data-bbox=)

rcsb.org) 下载其晶体结构。用 Discovery Studio 2016 软件删去靶点原配体和水分子, 去除蛋白多构象, 补充非完整的氨基酸残基, 加氢, 定义为分子对接受体。

表 1 治疗黄疸的相关靶点

Table 1 Related targets for treatment of jaundice

PDB ID	靶点	靶点功能	参考文献
5A86	孕烷受体 (PXR)	调节肝内有害物质的清除、胆红素代谢	[12-13]
1XV9	雄烷受体 (CAR)	参与药物清除、胆红素代谢	[12-13]
5Q0I	法尼醇 X 受体 (FXR)	调控胆汁酸的合成和转运	[14-15]
1D3H	二氢乳清酸脱氢酶 (DHODH)	与活化淋巴细胞的增殖和 T 细胞依赖性自体抗体的形成有关, 调节免疫和炎症反应	[16]
1DFI	诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)	调节炎症反应	[17]
1M8E	内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)	一氧化氮 (NO) 合成限速酶, 调节炎症反应	[18]
1FB1	三磷酸鸟苷 (GTP) 环化水解酶 1 (GCH-1)	调控四氢生物蝶呤合成而调节 iNOS 活性及 NO 产生	[19-20]
3PGH	环氧合酶-2 (COX-2)	调节花生四烯酸代谢, 调控炎症反应	[21-22]
1HPC	甘氨酸脱羧酶 (GLDC)	抑制 Kupffer 细胞的激活	[23-24]
3E6I	细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)	参与脂质过氧化物形成	[25]
1M8A	巨噬细胞炎性蛋白 3 α (MIP-3 α)	抑制肝星状细胞激活和胶原形成	[26]
1IEP	酪氨酸激酶 ABL1 (TK-ABL1)	调节细胞增殖和存活, 抗纤维化	[27-28]
1O5W	单胺氧化酶 A (MAOA)	参与肝星状细胞激活、胶原的代谢	[29-30]
1S2Q	单胺氧化酶 B (MAOB)	参与肝星状细胞激活、胶原的代谢	[29-30]

1.3 分子对接 利用分子对接技术筛选残黄片退黄活性成分与作用的靶点。首先在 Discovery Studio 2016 中抽离靶点原配体, 重新对接计算其均方根偏差 (RMSD), 一般认为 $RMSD \leq 0.2$ nm 则说明该对接方法可行^[31]。受体活性位点选择 PDB 侧位点, 并将筛选的成分定义为配体, 在 LibDock 模块设定 docking preferences 为 user specified, 设定最大对接匹配保存数 (max hits to save) 为 200 个, 最大对接匹配数 (max number of hits) 为 1 000 个, 最小 LibDock 分数 (minimum LibDock score) 为 105 分, 对接匹配方法 (conformation method) 为 FAST, 其他参数取默认值进行分子对接。对接结果以打分函数 LibDock score 给出, LibDock score 越高, 预测成分与靶点结合的活性越高。

1.4 构建成分-靶点作用网络 将成分-靶点数据对导入 Gephi 0.9.2 中, 采用 FR 算法 (Fruchterman-Reingold) 布局, 绘制成分-靶点作用网络, 设置节点大小和颜色用于反映度的大小, 经软件数据统计模块分析网络的密度、介数和平均路径, 评价其稳定性, 明确对作用网络稳定性有重要贡献的残黄片成分。

2 结果

2.1 分子对接结果 通过残黄片 174 个成分与黄

疸治疗相关 14 个靶点的对接评价, 得到了 LibDock score 高于原配体或 >105 分的 37 个成分。其中氢化小檗碱, 小檗浸碱, 穆坪马兜铃酰胺, 槲皮素, 咖啡酸乙酯, 黄麻甲苷 (corchoroside A), 黄柏酮, magnograndiolide 共 8 个成分来自黄连; 靛玉红、靛蓝、异靛蓝、青黛酮、靛苷、喹叻啉 (quindoline) 和 N-苯基-2-萘胺共 7 个成分来自青黛; 姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、桉木酮等 22 个成分来自郁金, 见表 2。

残黄片中氢化小檗碱、小檗浸碱、穆坪马兜铃酰胺等 9 个共有成分作用于 PXR 和 CAR, 使肝脏胆红素摄取增加并提高其与葡萄糖醛酸结合, 促进胆红素排出肝脏; 小檗浸碱、穆坪马兜铃酰胺、姜黄素等 10 个成分作用于 FXR, 抑制胆汁酸合成, 促进胆汁外排; 靛玉红、靛蓝、异靛蓝等 13 个成分作用于 DHODH, 抑制免疫细胞的活化与增殖。小檗浸碱、穆坪马兜铃酰胺、槲皮素等 17 个成分作用于 iNOS; 黄柏酮、姜黄素、去甲氧基姜黄素等 18 个成分作用于 eNOS, 通过抑制 NO 生成, 降低肝损伤。异郁金二酮和 zedoarolide B 等 17 个成分与 GCH-1 作用, 抑制过度炎症反应; 姜黄内酯 A 和姜黄新酮、姜黄醇酮等 27 个成分与 COX-2 作用, 抑制过度炎症反应;

表 2 分子对接确定的残黄片退黄潜在活性成分

Table 2 Potential active compounds of Canhuang tablets for treatment of jaundice determined by molecular docking

TCMSP ID	成分	TCMSP ID	成分	TCMSP ID	成分
MOL002903	氢化小檗碱	MOL011332	quindoline	MOL004243	姜黄醇酮
MOL002904	小檗浸碱	MOL000570	N-苯基-2-萘胺	MOL000955	姜黄酮醇 A
MOL008647	穆坪马兜铃酰胺	MOL002581	姜黄素	MOL000966	姜黄酮醇 B
MOL000098	槲皮素	MOL000946	去甲氧基姜黄素	MOL000960	原莪术二醇 (procurcumadiol)
MOL002902	咖啡酸乙酯	MOL000945	双去甲氧基姜黄素	MOL004257	curzeone
MOL002907	corchoroside A	MOL000227	桉木酮	MOL004310	zedoarol
MOL013352	黄柏酮	MOL004250	姜黄内酯 A	MOL004311	zedoarolide A
MOL000622	magngrandiolide	MOL004253	姜黄内酯 C	MOL004313	zedoarolide B
MOL002309	靛玉红	MOL004328	柚皮素	MOL004309	zedoalactone E
MOL001781	靛蓝	MOL004256	莪术二酮	MOL004333	芳香黄酮 (ar-turmerone)
MOL011335	异靛蓝	MOL004277	异郁金二酮	MOL000963	芳姜黄醇 (bisacumul)
MOL001810	青黛酮	MOL000970	姜黄新酮		
MOL011105	靛苷	MOL004241	莪术内酯		

咖啡酸乙酯、桉木酮和 quindoline 等 8 个成分作用于 GLDC,增强肝脏抗氧化能力;青黛酮、姜黄酮醇 A 和姜黄酮醇 B 等 14 个成分与 CYP2E1 作用,抑制脂质过氧化物形成;黄柏酮、青黛酮、去甲氧基姜黄素等 8 个成分与 MIP-3 α 作用,抑制肝星状细胞激活和胶原形成;穆坪马兜铃酰胺、靛玉红、去甲氧基姜黄素等 12 个成分作用于 TK-ABL1,抑制肝纤维化;氢化小檗碱、靛玉红、黄柏酮等多个成分作用于 MAOA 和 MAOB,抑制肝纤维化。对接结果见表 3。说明残黄片可通过调节胆红素、胆汁酸代谢转运,抑制免疫细胞的活化,降低过度炎症反应,阻止胶原形成等多个方面产生退黄疗效。

2.2 成分-靶点作用网络分析 残黄片成分-靶点作用网络共涉及 51 个节点,208 个边。其中,红色节点代表了残黄片潜在活性成分,深浅不同的蓝绿色节点代表了治疗黄疸相关靶点,边代表了成分和靶点间的相互作用。该网络平均度 8.157,密度 0.163,直径 4,平均路径 2.179,是一个稳定的生物网络,见图 1。进一步分析发现,接近中心度 > 0.5 的穆坪马兜铃酰胺,corchoroside A,槲皮素,去甲氧基姜黄素,小檗浸碱,桉木酮,黄柏酮,氢化小檗碱,姜黄素,柚皮素共 10 个成分与 MAOA,COX-2,eNOS 等 7 个以上靶点作用,对成分-靶点网络稳定性具有重要贡献,可能是残黄片退黄主要活性成分,见表 4。

3 讨论

分子对接结果表明残黄片潜在活性成分能作用

于调控胆红素代谢、胆汁酸合成转运、免疫与炎症反应等多个靶点,具有协同调节治疗黄疸靶点的特点。根据分子对接结果,结合残黄片降低黄疸模型大鼠血清总胆红素和胆汁酸含量,抑制肝细胞肿胀、坏死和炎症细胞浸润等前期研究结果,提示残黄片通过 PXR,CAR 调节胆红素代谢;FXR 调节胆汁酸合成转运;COX-2,eNOS,iNOS,GCH-1,DHODH,GLDC,CYP2E1 调控免疫与炎症反应;MAOA,MIP-3 α ,TK-ABL1,MAOB 影响肝脏胶原形成等多个途径协同发挥退黄作用。

3.1 残黄片调节胆红素代谢 血液中胆红素含量明显升高是黄疸的主要特征之一。肝脏对胆红素的代谢包括肝细胞基底外侧膜的有机阴离子转运多肽(OATP)摄取未结合胆红素,经尿苷二磷酸(UDP)葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)催化结合葡萄糖醛酸转为亲水性结合胆红素,再由毛细胆管膜多药耐药相关蛋白 2(MRP2)运载到毛细胆管形成胆汁流排出肝脏。黄疸时由于肝内胆红素排泄受阻引起胆红素反流入血液,导致血液胆红素水平升高。核受体 PXR,CAR 是胆红素代谢转化的重要调控因子,被激活时诱导 OATP1B1,UGT1A1 和 MRP2 的表达上调,增加血液胆红素的摄取和亲水性结合胆红素形成,并促进其排出肝脏^[12-13]。残黄片中氢化小檗碱、小檗浸碱、穆坪马兜铃酰胺等成分与 PXR,CAR 作用,可能为其退黄有效成分。

3.2 残黄片调节胆汁酸合成转运 FXR 是胆汁酸合成和转运的关键调节因子,激活 FXR 能够下调

表 3 残黄片的分子对接分析

Table 3 Molecular docking analysis of Canhuang tablets

靶点	潜在活性化合物
PXR	氢化小檗碱,小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,corchoroside A,黄柏酮,姜黄素,去甲氧基姜黄素,枳木酮
CAR	氢化小檗碱,小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,咖啡酸乙酯,corchoroside A,黄柏酮,姜黄素,去甲氧基姜黄素,枳木酮
FXR	小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,corchoroside A,黄柏酮,姜黄素,去甲氧基姜黄素,双去甲氧基姜黄素,枳木酮,姜黄内酯 C
DHODH	小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,咖啡酸乙酯,corchoroside A,靛玉红,靛蓝,异靛蓝,青黛酮,靛苷,去甲氧基姜黄素,柚皮素,ar-turmerone
iNOS	氢化小檗碱,小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,corchoroside A, magnograndiolide, 靛玉红,靛蓝,异靛蓝,青黛酮,靛苷,quindoline, <i>N</i> -苯基-2-萘胺,柚皮素,zedoarol,zedoarolide A,zedoalactone E
eNOS	小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,corchoroside A,黄柏酮,姜黄素,去甲氧基姜黄素,双去甲氧基姜黄素,枳木酮,姜黄内酯 C,姜黄内酯 A,柚皮素,姜黄新酮,姜黄酮醇 A,姜黄酮醇 B,curzeone,ar-turmerone,bisacumol
GCH-1	氢化小檗碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,magnograndiolide,靛玉红,靛蓝,异靛蓝,青黛酮,靛苷,去甲氧基姜黄素,双去甲氧基姜黄素,枳木酮,姜黄内酯 C,柚皮素,异郁金二酮,姜黄酮醇 A,zedoarolide B
COX-2	氢化小檗碱,小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,咖啡酸乙酯,黄柏酮,magnograndiolide,quindoline,姜黄素,去甲氧基姜黄素,双去甲氧基姜黄素,枳木酮,姜黄内酯 A,柚皮素,莪术二酮,异郁金二酮,姜黄新酮,姜黄醇酮,姜黄酮醇 A,姜黄酮醇 B,procurcumadiol,zedoarol,zedoarolide A,zedoalactone E,ar-turmerone,bisacumol,corchoroside A
GLDC	穆坪马兜铃酰胺,咖啡酸乙酯,quindoline,去甲氧基姜黄素,枳木酮,姜黄酮醇 A,姜黄酮醇 B,bisacumol
CYP2E1	氢化小檗碱,小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,咖啡酸乙酯,青黛酮,姜黄素,去甲氧基姜黄素,双去甲氧基姜黄素,枳木酮,姜黄内酯 A,姜黄内酯 C,姜黄酮醇 A,姜黄酮醇 B
MIP-3 α	氢化小檗碱,小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,corchoroside A,黄柏酮,青黛酮,去甲氧基姜黄素
TK-ABL1	穆坪马兜铃酰胺,黄柏酮,靛玉红,靛蓝,异靛蓝,青黛酮,靛苷,姜黄素,去甲氧基姜黄素,双去甲氧基姜黄素,枳木酮,柚皮素
MAOA	氢化小檗碱,小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,corchoroside A,黄柏酮,magnograndiolide,靛玉红,靛蓝,异靛蓝,青黛酮,靛苷,姜黄素,去甲氧基姜黄素,双去甲氧基姜黄素,枳木酮,姜黄内酯 A,柚皮素,莪术二酮,异郁金二酮,姜黄新酮,莪术内酯,姜黄酮醇 A,姜黄酮醇 B,姜黄内酯 C,zedoarolide A,zedoarolide B,zedoalactone E,bisacumol
MAOB	氢化小檗碱,小檗浸碱,穆坪马兜铃酰胺,槲皮素,黄柏酮,magnograndiolide,靛玉红,异靛蓝,青黛酮,靛苷

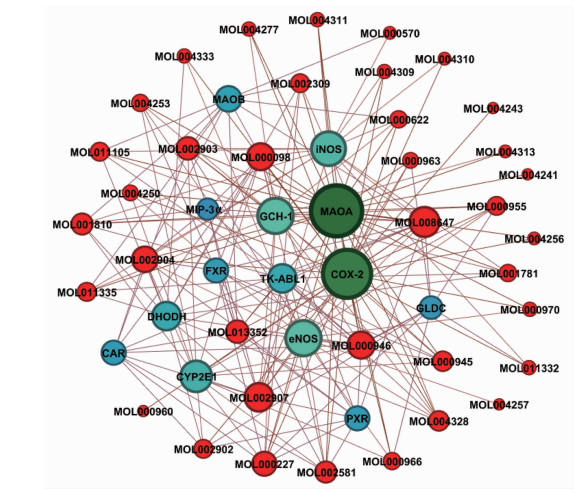


图 1 残黄片的成分-靶点作用网络

Fig.1 Compound-target network of Canhuang tablets

胆汁酸合成限速酶胆固醇 7 α -羟化酶,抑制胆汁酸的合成^[14];下调肝细胞基底外侧膜钠离子-牛磺胆酸共转运体(NTCP)表达,抑制胆汁酸的重吸收;上调胆酸盐外排泵(BSEP)和MRP2表达,促进胆汁酸从肝脏排出,减轻肝内胆汁淤积^[15]。炎症反应会抑

表 4 残黄片成分-靶点网络中主要成分的度和介数

Table 4 Degree and betweenness of key compounds in compound-target network of Canhuang tablets

TCMSP ID	成分	度	介数	接近中心度
MOL008647	穆坪马兜铃酰胺	14	60.196	0.581
MOL002907	corchoroside A	13	49.149	0.568
MOL000098	槲皮素	12	43.688	0.556
MOL000946	去甲氧基姜黄素	12	38.444	0.543
MOL002904	小檗浸碱	11	37.414	0.531
MOL000227	枳木酮	10	26.655	0.521
MOL013352	黄柏酮	9	24.426	0.521
MOL002903	氢化小檗碱	9	24.261	0.510
MOL002581	姜黄素	8	16.056	0.500
MOL004328	柚皮素	7	16.046	0.500

制多种胆汁酸转运体调节因子的表达和活性,FXR能够诱导过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)的表达,抑制肝星状细胞的活化^[32-33],抑制白细胞介素-6(IL-6),iNOS,核转录因子- κ B,COX-2等多种

炎症因子的表达,减轻炎症反应,改善和恢复相关转运体的活性^[34]。残黄片中槲皮素、黄柏酮、去甲氧基姜黄素等成分与 FXR 对接较强,可能是调节胆汁酸合成转运、缓解胆汁淤积的有效成分。

3.3 残黄片调控免疫炎症反应 肝脏过度免疫炎症反应可诱发肝细胞功能不全或毛细胆管阻塞。黄疸多个治疗靶点涉及免疫炎症反应调节功能。DHODH 是免疫相关疾病的治疗靶点,抑制 DHODH 可以阻断新生嘧啶合成,致使 DNA 合成障碍,抑制活化的 T 淋巴细胞, B 淋巴细胞以及肿瘤细胞的增殖,从而抑制肝细胞炎性浸润,减轻肝损伤^[16]。NOS 是催化 L-精氨酸产生 NO 调节多种免疫炎症反应的酶系。抑制 iNOS 可减少 NO 的释放,减轻肝损伤,并能抑制 I, III 型前胶原的表达而降低肝纤维化程度^[17];抑制 eNOS 过度表达可减少 NO 释放,缓解肝三磷酸腺苷(ATP)含量降低造成的肝损伤和血清 ALT 和 AST 的升高^[18]。GCH-1 是四氢生物蝶呤(BH4)生物合成过程中的重要限速酶,而 BH4 又可以调节 iNOS 活性及 NO 产生。抑制 GCH-1 可以显著抑制脂多糖(LPS)诱导的 NO 产生和干扰素诱导的 iNOS 表达,调节过度炎症反应^[19-20]。COX-2 在巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞和单核细胞中均可被诱导表达,肝损伤时 Kupffer 细胞被激活产生大量的肿瘤坏死因子- α (TNF- α), IL-1 和 IL-6 等细胞因子,诱导 COX-2 表达及前列腺素合成,参与肝脏的炎性损伤^[21]。抑制 COX-2 能降低前列腺素 E₂ 生成引起的炎症反应,减少肝损伤风险^[22]。甘氨酸可抑制 Kupffer 细胞钙离子浓度升高而引起的过度激活,对释放大量的 TNF- α , 活性氧等毒性介质诱导的肝损伤有保护作用^[23]。GLDC 是甘氨酸分解代谢酶,肝损伤时抑制其活性可保持甘氨酸水平,降低肝实质细胞坏死,防止 Kupffer 细胞活化,减轻肝窦内皮细胞的损伤和凋亡^[24]。CYP2E1 是肝脏细胞色素 P450 酶系的主要成员,参与内、外源性有毒物质及极性分子的代谢。抑制 CYP2E1 可降低脂质过氧化物的产生,改善肝损伤^[25]。残黄片中穆坪马兜铃酰胺、槲皮素、姜黄素等多个成分作用于免疫与炎症反应调控靶点,可能是其抑制免疫细胞活化,调节炎症反应的活性成分。

3.4 残黄片影响胶原形成 黄疸持续发展可导致肝纤维化,治疗肝纤维化的主要机制为抑制肝星状细胞激活和胶原的形成。MIP-3 α 是 T 淋巴细胞激活聚集的趋化因子,对肝脏局部病灶辅助性 T 淋巴细胞 17(Th17)的聚集具有推动作用。抑制 MIP-3 α

可直接抑制 Th17 的激活和聚集,减少 IL-17 的分泌并进一步抑制肝星状细胞的激活和胶原等纤维化因子的产生,抑制肝纤维化的发生与发展^[26]。TK-ABL1 是一种酪氨酸激酶,参与细胞增殖和存活、细胞骨架的重组、细胞迁移、发育、炎症反应及恶性转化等过程的调控。在氧化应激条件下 TK-ABL1 介导线粒体功能障碍和细胞凋亡,其抑制剂与 ATP 竞争结合酪氨酸激酶结合位点,阻止酪氨酸激酶的磷酸化,造成信号传导中断,抑制成纤维细胞增殖和细胞外基质合成,抗纤维化^[27-28]。MAO 是一组催化多种单胺类物质氧化脱氨的酶,有 MAOA 和 MAOB 共 2 个亚型,广泛存在于肝、肾、胃、小肠和脑组织细胞的线粒体膜外。MAO 活性测定是诊断肝细胞损伤、坏死和肝纤维化病变的一项重要指标。抑制 MAO 活性可减少肝星状细胞的活化与增殖,阻止其向成纤维细胞转化和细胞外基质的合成,调节胶原形成,抑制肝纤维化^[29-30]。黄柏酮、青黛酮等成分与 MIP-3 α , TK-ABL1, MAOA 和 MAOB 作用,可能是残黄片抑制胶原形成、抗纤维化的有效成分。

3.5 残黄片退黄主要成分 通过查阅成分-靶点作用网络确定的 10 个主要成分的活性相关文献发现,穆坪马兜铃酰胺能抑制 LPS 诱导的小鼠单核巨噬细胞 iNOS 和 COX-2 酶 mRNA 表达、抑制活化蛋白-1 的核易位、降低 c-Jun N-末端激酶的表达和磷酸化,发挥抗炎作用^[35]。氢化小檗碱能抑制转化生长因子- β_1 诱导的胶原生成,具有细胞保护和抗纤维化作用^[36]。槲皮素能降低肝损伤大鼠肝脏丙二醛(MDA)水平,增强肝脏超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性来保护肝脏^[37]。去甲氧基姜黄素能抑制酪氨酸激酶的活性^[38],且能显著降低 LPS 诱导的炎症细胞模型 iNOS 表达和 NO 分泌,发挥抗炎作用^[39]。黄柏酮能显著降低 LPS 激活的巨噬细胞分泌的 NO, IL-6, IL-1 β 和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等炎症介质,具有抗炎作用^[40]。姜黄素具有显著降低阻塞性黄疸模型大鼠血清 ALT, AST 和总胆红素水平,减少肝组织 α -肌动蛋白表达量,抑制肝纤维化作用^[41]。柚皮素- β -环糊精包合物具有肝脏保护作用,能显著降低对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤模型小鼠血清 ALT 和 AST 水平,升高肝脏 SOD 和 GSH-Px 的活性^[42]。可见分子对接结果与实验研究结果基本一致,提示穆坪马兜铃酰胺、氢化小檗碱、姜黄素等 10 个成分可能是残黄片退黄主要活性成分。可为该方多成分含量测定指标的选择、全面控制该药品质量

和疗效提供依据。

3.6 残黄片中白矾的作用 白矾为硫酸盐类矿物明矾石经加工提炼制成,主要成分是含水硫酸铝钾,收载于 2015 年版《中国药典》。其味酸、涩,性寒,归肺、脾、肝、大肠经,内服止血止泻、祛除风痰^[43]。由于白矾在胃肠溶液中易解离为钾、铝和硫酸根离子,而分子对接软件是计算靶点与分子间的静电、氢键、疏水和范德华力等作用^[44],尚不能对接无机离子,故本研究未对白矾进行分子对接。白矾和青黛是残黄片处方的组成药味,二者配伍后称为青矾散,在清代《卫生鸿宝》中载为主治湿热黄疸、面目遍体、指甲皆黄、体倦、胸腹饱闷、食下即胀^[45]。临床上白矾常与青黛配伍用于治疗黄疸型肝炎^[46-48]。有研究表明青矾片可显著促进狗的胆汁排泄,对小鼠具有保护肝脏,减少肝细胞坏死的作用^[49]。黛矾散[青黛-白矾(1:8)]以 1.08 g·kg⁻¹灌胃雌激素所致肝内胆汁淤积大鼠,可显著降低其血清总胆汁酸、总胆红素以及 ALT 和 ALP 含量($P<0.05$),且黛矾散作用优于青黛和白矾单用,具有协同治疗胆汁淤积作用^[50]。明矾以 2.0 g·kg⁻¹剂量单次给药健康狗,可显著增加其胆汁排泄量,并能持续 3 h,利胆作用明显^[51]。综上所述,白矾具有明显的促进胆汁排泄作用,与青黛配伍后其治疗胆汁淤积作用增强,但关于白矾对残黄片退黄作用的影响及相关机制仍需进一步研究。

[参考文献]

[1] 洪嘉禾.实用中医肝病学[M].上海:上海中医药大学出版社,1993:1-134.

[2] 吴孟超,李梦东.实用肝病学[M].北京:人民卫生出版社,2011:764.

[3] Pollock G, Minuk G Y. Diagnostic considerations for cholestatic liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2017,7(32):1303-1309.

[4] ZHAO Q, YANG R, WANG J, et al. PPAR α activation protects against cholestatic liver injury[J]. Sci Rep, 2017,doi:10. 1038/s41598-017-10524-6.

[5] 周光德,赵景民.不同病因致肝纤维化/肝硬化的病理特点[J].临床肝胆病杂志,2016,32(6):1086-1091.

[6] 吉日木巴图,张诗龙,范娜,等.基于超微粉碎工艺的残黄片质量稳定性提升[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(12):9-13.

[7] BAI J X, HAN J, CHEN H G, et al. Daily administration times of Canhuang tablet based on a pharmacodynamic/pharmacokinetic model in jaundiced rats[J]. J Tradit

Chin Med,2015,35(1):84-89.

[8] 陈红鸽,韩晋,袁海龙,等.微粉化增溶技术在残黄片工艺中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):14-17.

[9] 张诗龙,张木子荷,凌海慧,等.残黄片对 α -奈异硫氰酸酯致大鼠黄疸模型的退黄作用[J].解放军药学报,2017,33(1):65-67.

[10] 张诗龙,韩晋,刘峰群,等.残黄片质量标准的研究[J].解放军药学报,2011,27(6):506-508.

[11] 宋向岗.基于分子对接技术探讨中药川芎治疗脑缺血的物质基础及分子作用机制[D].广州:广东药学院,2015.

[12] Kakizaki S, Takizawa D, Tojima H, et al. Xenobiotic-sensing nuclear receptors CAR and PXR as drug targets in cholestatic liver disease[J]. Curr Drug Targets,2009,10(11):1156-1163.

[13] Tolson A H, WANG H B. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2010, 62(13):1238-1249.

[14] Forman B M, Goode E, CHEN J, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites[J]. Cell,1995,81(5):687-693.

[15] YAN J Y, AI G, ZHANG X J, et al. Investigations of the total flavonoids extracted from flowers of *Abelmoschus manihot* (L.) Medic against α -naphthylisothiocyanate induced cholestatic liver injury in rats[J]. J Ethnopharmacol,2015,172:202-213.

[16] 李顺来,王新磊,杜洪光.一类来氟米特类似物二氢乳清酸脱氢酶抑制剂作用模式的理论研究[J].计算机与应用化学,2011,28(3):325-328.

[17] 王广征,王蓓,刘淑云.复方甘草酸苷治疗慢性乙型肝炎肝硬化疗效和对一氧化氮的影响[J].中国医院药学杂志,2012,32(1):43-45.

[18] Palanisamy A P, CHENG G, Sutter A G, et al. Adenovirus-mediated eNOS expression augments liver injury after ischemia/reperfusion in mice[J]. PLoS One,2014,9(3):e93304.

[19] Geller D A, Billiar T R, Hatakeyama K, et al. GTP cyclohydrolase I is coinduced in hepatocytes stimulated to produce nitric oxide[J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,276(2):633-641.

[20] Bogdan C, Werner E, Stenger S, et al. 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidine, an inhibitor of tetrahydrobiopterin synthesis, down-regulates the expression of inos protein and messenger rna in primary murine macrophages[J]. FEBS Lett,1995,363(1/2):69-74.

[21] 吕月涛,刘江伟,冯德元,等.环氧化酶-2与肝损伤[J].中国现代普通外科进展,2007,10(4):341-343.

[22] Chung M Y, Mah E, Masterjohn C, et al. Green tea lowers hepatic COX-2 and prostaglandin E₂ in rats with dietary fat induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. J Med Food, 2015, 18 (6) : 648-655.

[23] Nichols J C, Bronk S F, Mellgren R L, et al. Inhibition of nonlysosomal calcium-dependent proteolysis by glycine during anoxic injury of rat hepatocytes [J]. Gastroenterology, 1994, 106 (1) : 168-176.

[24] Ikejima K, QU W, Stachlewitz R F, et al. Kupffer cells contain a glycine gated chloride channel [J]. Am J Physiol, 1997, 272 (6Pt1) : G1581-G1586.

[25] 吴黎艳, 陈芝芸, 严茂祥, 等. 三七对酒精性肝病大鼠肝组织 CYP2E1 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26 (6) : 1395-1398.

[26] 李校天, 尹燕, 郭永泽, 等. 1, 25 (OH)₂D₃ 干预 IL-17 及巨噬细胞炎症蛋白 3 α 表达抑制大鼠肝纤维化形成的作用机制 [J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32 (12) : 2331-2336.

[27] 何怡. 酪氨酸激酶抑制剂 IRESSA (易瑞莎) 在肝细胞性肝癌靶向治疗中作用的研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2006.

[28] 刘蔚. Abl 酪氨酸激酶抑制剂对小鼠梗阻性肾病肾间质纤维化的影响及机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.

[29] 徐士勋, 周桑, 绪扩, 等. 鳖甲水提物和醇提物对单胺氧化酶活性影响的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (1) : 139-142.

[30] 李广明, 周凤蕊, 刘俊华, 等. 六味五灵片治疗乙型肝炎肝纤维化 42 例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (21) : 276-279.

[31] RAO S N, Head M S, Kulkarni A, et al. Validation studies of the site-directed docking program LibDock [J]. J Chem Inf Model, 2007, 47 (6) : 2159-2171.

[32] 平键, 陈红云, 周扬, 等. 毛蕊异黄酮上调过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ 抑制大鼠肝星状细胞活化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (12) : 2383-2388.

[33] Renga B, Mencarelli A, Migliorati M, et al. SHP-dependent and-independent induction of peroxisome proliferator activated receptor γ by the bile acid sensor farnesoid X receptor counter regulates the pro-inflammatory phenotype of liver myofibroblasts [J]. Inflamm Res, 2011, 60 (6) : 577-587.

[34] WANG Y D, CHEN W D, WANG M, et al. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor κ B in hepatic inflammatory response [J]. Hepatology, 2008, 48 (5) : 1632-1643.

[35] JIANG Y Y, YU L L, WANG M H. *N-trans-feruloyl*tyramine inhibits LPS-induced NO and PGE₂ production in RAW 264. 7 macrophages; involvement of AP-1 and MAP kinase signalling pathways [J]. Chem Biol Interact, 2015, 235 : 56-62.

[36] Pietra D, Borghini A, Bianucci A M. *In vitro* studies of antifibrotic and cytoprotective effects elicited by protoberberine alkaloids in human dermal fibroblasts [J]. Pharmacol Rep, 2015, 67 (6) : 1081-1089.

[37] 张洋. 纳米脂质体槲皮素对肝损伤大鼠保肝作用的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.

[38] 杜志云, 徐学涛, 潘文龙, 等. 姜黄素类化合物及姜黄素衍生物对酪氨酸酶抑制作用的研究 [J]. 日用化学工业, 2008, 38 (3) : 172-175.

[39] Somchit M, Changtam C, Kimseng R, et al. Demethoxycurcumin from curcuma longa rhizome suppresses iNOS induction in an *in vitro* inflamed human intestinal mucosa model [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15 (4) : 1807-1810.

[40] GAO Y, HOU R, LIU F, et al. Obacunone causes sustained expression of MKP-1 thus inactivating p38 MAPK to suppress pro-inflammatory mediators through intracellular MIF [J]. J Cell Biochem, 2018, 119 (1) : 837-849.

[41] 李香丹, 刘兰, 李国鑫, 等. 姜黄素对阻塞性黄疸模型大鼠肝损伤的保护作用及其机制 [J]. 延边大学医学学报, 2014, 37 (1) : 15-17.

[42] 潘海华, 曹宇, 胡少洋, 等. 柚皮素- β -环糊精包合物对乙酰氨基酚致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2018, 32 (1) : 1-4, 6.

[43] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 107-108.

[44] 赵丽琴, 肖军海, 李松. 分子对接在基于结构药物设计中的应用 [J]. 生物物理学报, 2002, 18 (3) : 263-270.

[45] 李经纬, 余瀛鳌, 蔡景峰, 等. 中医大辞典 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 138.

[46] 葛宝田. 青矾散治疗黄疸型传染性肝炎 [J]. 山东医刊, 1963, 7 (4) : 15.

[47] 陈道权. 黛矾散治癒传染性黄疸型肝炎 [J]. 江苏中医, 1964, 8 (7) : 41.

[48] 许佳平, 王思印. 黛矾胶囊治疗肝炎后高胆红素血症 34 例 [J]. 中医杂志, 2002, 43 (2) : 129.

[49] 汪洋, 徐军弢, 马丽君. 青矾片治疗急性传染性肝炎的药理作用探析 [J]. 药学实践杂志, 1995, 13 (6) : 329-330.

[50] 程良斌, 赵友云, 汪晖, 等. 黛矾散对雌激素诱导的大鼠肝内胆汁淤积的影响 [J]. 临床肝胆病杂志, 2003, 19 (6) : 370-371.

[51] 李建平, 刘彦生, 李聪, 等. 青矾散保肝利胆作用的药理研究 [J]. 吉林中医药, 2006, 26 (4) : 57-58.

[责任编辑 刘德文]