

引用:王雅欣,刘思彤,吴颖,宋思琦,高翔,宋瑾,田敬华,刘汶,张会存.基于真实世界数据挖掘及实验探讨酒精性肝病肝郁脾虚证的用药规律及作用机制[J].中医药导报,2025,31(5):56-62,70.

基于真实世界数据挖掘及实验探讨 酒精性肝病肝郁脾虚证的 用药规律及作用机制^{*}

王雅欣¹,刘思彤²,吴 颖¹,宋思琦¹,高 翔¹,宋 瑾^{1,3},田敬华¹,刘 汶¹,张会存^{1,3}

(1.首都医科大学附属北京中医医院,北京 100010;

2.北京中医药大学,北京 100029;3.北京市中医药研究所,北京 100010)

[摘要] 目的:基于真实世界数据,探究中医药治疗酒精性肝病肝郁脾虚证的用药规律,分析核心药物可能的作用机制,并通过体外实验进行验证。方法:筛选酒精性肝病肝郁脾虚证患者处方信息,建立数据库,使用Microsoft Excel 2019、IBM SPSS Statistics 22.0和SPSS Molder 18.0软件进行频数统计、性味归经统计、关联规则和聚类分析,筛选出核心药物。应用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)获取核心药物的有效成分及靶点,GeneCards数据库获取酒精性肝病疾病靶点,应用Cytoscape 3.8.0软件构建“药物-成分-靶点”网络,应用String平台进行PPI网络分析,应用Metascape平台进行基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。采用MTT法筛选核心药物最佳干预浓度,将大鼠肝星状细胞(HSC-T6)分为正常对照组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,采用不同浓度含药培养基对酒精诱导活化的HSC-T6细胞进行干预,MTT法检测细胞活力,RT-PCR法检测各组HSC-T6细胞中 α -SMA mRNA、Col-1 mRNA及Col-3 mRNA的表达水平及PI3K/Akt信号通路中PI3K mRNA、Akt mRNA的表达水平。结果:治疗酒精性肝病肝郁脾虚证中药药性以寒、温为主,药味以甘、苦、辛味为主,归经以肝、胃经为主。共获得27组关联药物,药物聚类6组。根据药物应用频数筛选核心药物为白术、黄芪、泽兰、茯苓。有效成分共26种,药物与疾病共同靶点100个。GO分析获得生物过程239个,细胞成分33个,分子功能126个,KEGG通路富集分析主要与PI3K/Akt信号通路、JAK/STAT信号通路、NF- κ B信号通路等有关。MTT结果显示,低剂量组、中剂量组、高剂量组均能抑制酒精诱导的HSC-T6细胞活化增殖($P<0.05$)。RT-PCR结果显示,低、中、高剂量组能够显著下调酒精诱导活化的HSC-T6细胞中 α -SMA mRNA、Col-1 mRNA、Col-3 mRNA、PI3K mRNA及Akt mRNA表达水平($P<0.05$)。结论:治疗酒精性肝病肝郁脾虚证的核心药物组合“白术-黄芪-泽兰-茯苓”能够通过调控PI3K/Akt信号通路抑制酒精性肝病进展。

[关键词] 酒精性肝病;肝郁脾虚证;用药规律;网络药理学;肝纤维化;大鼠肝星状细胞;PI3K/Akt信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)05-0056-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.05.010

Exploring the Medication Patterns and Mechanisms of Alcoholic Liver Disease with Liver Depression and Spleen Deficiency Based on Real World Data Mining and Experimental Research

WANG Yaxin¹, LIU Sitong², WU Ying¹, SONG Siqi¹, GAO Xiang¹, SONG Jin^{1,3},

TIAN Jinghua¹, LIU Wen¹, ZHANG Huicun^{1,3}

(1. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China;

2. Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100010, China)

[Abstract] Objective: To explored the medication patterns of traditional Chinese medicine (TCM) in treating alcoholic liver disease (ALD) with liver depression and spleen deficiency based on real world data, analyze the possible mechanisms of core Chinese medicine, and verify the mechanisms through in vitro experiments. Methods: The prescription information for patients with ALD of liver depression and spleen

*基金项目:国家自然科学基金项目(81873244)

通信作者:张会存,男,研究员,研究方向为中西医结合治疗消化系统疾病

deficiency was screened. A database was set up and Microsoft Excel 2019, IBM SPSS Statistics 22.0 and SPSS Molder 18.0 software were used for frequency statistics, property analysis, association rules analysis and cluster analysis. Then the core Chinese medicine was screened. Traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) was used to obtain the active components and targets of core drugs. GeneCards database was used to obtain the targets related to ALD. Cytoscape 3.8.0 software was used to construct a "drugs -components -targets" network. String platform was used for protein -protein interaction (PPI) network analysis, and Metascape platform was used for gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. The MTT method was used to screen the optimal intervention concentration of drugs. HSC-T6 cells were divided into normal control group, model group, low dose group, medium dose group and high dose group. Different concentrations of drug containing culture medium were used to intervene in alcohol induced activation of HSC-T6 cells. MTT method was used to detect cell viability. RT-PCR method was used to detect the expression levels of α -SMA mRNA, Col-1 mRNA, and Col-3 mRNA in each group of HSC-T6 cells, as well as the expression levels of PI3K mRNA and Akt mRNA in PI3K/Akt signaling pathway. Results: The Chinese medicine used to treat ALD with liver depression and spleen deficiency was mainly cold and warm in nature, sweet, bitter, and spicy in taste, and mainly based on the liver and stomach meridians. A total of 27 groups of associated Chinese medicine were obtained, with 6 clusters. Based on the frequency of drug application, the core Chinese medicine selected were Baizhu (tractylodes macrocephala koidz), Huangqi (hedysarum multijugum maxim), Zelan (lycopi herba), and Fuling (poria cocos wolf), with a total of 26 active ingredients and 100 common targets both in drugs and disease. GO analysis obtained 239 biological processes, 33 cellular components, and 126 molecular functions. KEGG pathway enrichment analysis was mainly related to PI3K/Akt signaling pathway, JAK/STAT signaling pathway, and NF- κ B signaling pathway. The MTT results showed that the low, medium, and high dose groups could inhibit alcohol induced activation and proliferation of HSC-T6 cells ($P<0.05$). The RT-PCR results showed that the low, medium, and high dose group could significantly down-regulate the expression levels of α -SMA mRNA, Col-1 mRNA, Col-3 mRNA, PI3K mRNA and Akt mRNA in alcohol induced activated HSC-T6 cells ($P<0.05$). Conclusion: The core Chinese medicine combination "Baizhu (tractylodes macrocephala koidz) - Huangqi (hedysarum multijugum maxim) - Zelan (lycopi herba) - Fuling (poria cocos wolf)" can inhibit the progression of ALD with liver depression and spleen deficiency by regulating the PI3K/Akt signaling pathway.

[Keywords] alcoholic liver disease; liver depression and spleen deficiency syndrome; medication patterns; network pharmacology; liver fibrosis; rat hepatic stellate cells; PI3K/Akt signaling pathway

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是一种长期饮酒引起的肝脏疾病,是我国常见肝脏疾病之一。初期通常表现为脂肪肝,后期可发展成酒精性肝炎、肝纤维化及肝硬化等。ALD严重时可诱发广泛肝细胞坏死,引起肝衰竭,甚至发展为肝细胞癌^[1]。目前西医治疗主要以戒酒、营养支持、药物对症治疗、肝移植等为主,治疗方法具有一定的局限性^[2]。中医采用整体观念及辨证施治,能更好地提高ALD患者的生命质量,减轻或消除临床症状^[3]。肝郁脾虚证是ALD的常见证型之一^[4]。ALD患者常因过度饮酒,酒毒湿热内蕴,致气血、痰浊、湿热相互搏结,后期致脾失健运,气机壅滞不畅,而致肝气郁结。肝、脾同属中焦,肝主疏泄,促进脾的消化吸收;脾主运化,协助肝之疏泄条达,二者在疾病过程中常相互传变。中医常用解毒化湿、疏肝健脾等法治疗ALD肝郁脾虚证^[5]。然而目前临床对于治疗ALD肝郁脾虚证的中药用药规律尚不统一,药物作用机制尚不明确。本研究基于真实世界数据采用数据挖掘的方法探索ALD肝郁脾虚证的用药规律,运用网络药理学的方法探讨核心药物治疗ALD的有效成分、作用靶点及信号通路,并通过体外实验对关键信号通路进行验证,旨在为

临床应用中药治疗ALD提供理论基础和科学依据。

1 用药规律分析

1.1 研究对象 病例资料来源于2018年2月至2021年9月在首都医科大学附属北京中医医院就诊的ALD肝郁脾虚证患者,按纳入标准与排除标准进行筛选,最终共纳入110例患者,所有数据均来源于门诊HIS电子病历系统。本研究经首都医科大学附属北京中医医院医学伦理委员会审核批准。

1.2 纳入标准 (1)确诊为ALD,符合《酒精性肝病防治指南(2018年更新版)》^[6]中的诊断标准。中医辨证分型符合肝郁脾虚证。主症:胁肋胀痛或窜痛;脘腹痞满,食后加重。次症:纳差;肠鸣;矢气;排便不爽;情绪抑郁或善太息。舌脉:舌质淡红,舌苔薄白,脉弦或细。主症必备,次症2个,参照舌脉象,可明确诊断^[6]。(2)患者的病历资料信息记录完整者,如中医证候分型、中药复方组成及药物剂量等;(3)采用单纯中药复方治疗者。

1.3 排除标准 (1)不符合上述ALD诊断标准及中医证型者;(2)病历数据收录不完善者,如西医诊断、中医诊断及中医证候分型、中药处方等信息记录不全或存在缺失者;(3)合并其

他肝脏疾病及其他系统疾病者。

1.4 数据清洗 采取双人录入,确保数据准确性,再一次复核无误后,对录入数据进行清洗,按照纳入标准对每条数据进行人工核对,对于不符合标准的数据进行剔除。选取治疗时间超过1个月且至少复诊1次的患者,以及病历信息及化验结果提示好转的患者,当部分患者存在多次就诊记录时,保留患者第一次就诊记录。

1.5 药物名称规范 参考2020年版《中华人民共和国药典》⁷、《中华本草》⁸对中药名称进行规范化命名,对于异名同药的药物则规范为标准名称,如玄胡索、元胡统一规范为延胡索;对于不同的炮制方法但功效类似的中药归属于同一药物,如盐杜仲统一规范为杜仲。

1.6 数据分析 采用Microsoft Excel 2019软件分析药物应用频数,筛选高频中药,分析药物四气、五味、归经。采用IBM SPSS Modeler 18软件中的Apriori算法分析高频药物关联规则并绘制网络图。采用IBM SPSS Statistics 20软件,聚类方法选择组间联结分析,度量标准选择Jaccard系数,对高频中药进行聚类分析。

2 网络药理学分析

2.1 核心药物活性成分筛选及药物与疾病共同靶点的筛选 根据药物应用频数筛选治疗ALD肝郁脾虚证的核心药物。利用中药系统药理学分析平台(TCMSP,<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)按照口服生物利用度(oral bioavailability,OB)≥30%,类药性(drug-likeness,DL)≥0.18,检索核心药物的有效成分和作用靶点^[9]。利用GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)检索“Alcoholic liver disease”相关靶点,筛选出Relevance score≥30的疾病靶点^[10]。利用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)规范靶点名称。将上述靶点导入Venny 2.1.0平台(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>),得到药物与疾病共同靶点及韦恩图。

2.2 蛋白质相互作用(protein–protein interaction,PPI)网络构建及核心靶点筛选 利用Cytoscape 3.8.0软件构建“药物–成分–靶点”网络图,将共同靶点上传至String数据库(<https://string-db.org/>),得到PPI网络,将该网络导入Cytoscape 3.8.0软件进行拓扑学分析,依据度值获取核心靶点。

2.3 基因本体(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集分析 将共同靶点导入Metascape数据库(<http://metascape.org/>),分别进行GO和KEGG通路富集分析,使用微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)将结果进行可视化处理,基于KEGG通路富集分析结果,选择信号通路进行后续实验验证。

3 细胞实验

3.1 细胞 大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)购于大连美伦生物技术有限公司。

3.2 药物 根据药物应用频数及关联规则结果,结合药物剂量统计,采用白术20 g、黄芪30 g、泽兰30 g、茯苓20 g进行后续实验,中药饮片由首都医科大学附属北京中医医院药学部提供(生产厂家:北京杏林药业有限责任公司),经首都医科大学附属北京中医医院彭冰副研究员鉴定为正品。传统煎药方法煎煮2次后,合并滤液,加热浓缩至200 mL,取上述水煎液

10 mL至培养皿中,−80 ℃冷冻保存。真空冷冻干燥机预冷至−50 ℃,将培养皿放入冻干机中,真空低温干燥48 h,制成中药冻干粉(每克冻干粉含生药2.50 g),将制作好的中药冻干粉分装至冻存管中,−80 ℃冷冻保存。使用前完全溶解后用0.22 μm滤器过滤并分装,−20 ℃保存备用^[11]。

3.3 主要仪器及试剂

3.3.1 仪器 多功能酶标仪(美国BioTek公司,型号:Synergy H1);反转录仪(美国Thermo Fisher公司,型号:VeritiTM DX 96 Well Thermal Cycler);实时荧光定量PCR系统(美国Thermo Fisher公司,型号:QuantStudioTM 6 Flex);冷冻干燥机(德国CHRIST公司,型号:Alpha 1–2 LD plus);二氧化碳恒温培养箱(美国Thermo Fisher公司,型号:371);台式低温高速离心机(德国Hettich公司,型号:Hettich mzkro 220R);生物安全柜(中国Baker公司,型号:SG403A-HE)。

3.3.2 试剂 DMEM高糖培养基(美国Cytiva公司,批号:SH30243.02);胎牛血清(FBS,批号:A5669701)、胰蛋白酶(批号:25200114)均购自美国Gibco公司;无水乙醇(批号:E809061)、二甲基亚砜(DMSO,批号:D806647)均购自上海麦克林生化科技有限公司;MTT(碧云天生物技术有限公司,批号:ST316);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;RNAiso plus(日本Takara公司,批号:9109);逆转录试剂盒(批号:R201-02)和定量PCR–染料法miRNA qPCR Mix(批号:Q206-01)均购自新贝(上海)生物科技有限公司。

3.4 细胞培养 HSC-T6细胞株常规复苏后,采用DEME培养基(含10% FBS),置于5% CO₂、37 ℃恒温培养箱中进行无菌培养。当细胞密度达到90%左右时,按1:4的比例进行传代。48 h后再传代,选用生长状态良好、处于对数生长期的细胞进行试验。

3.5 药物最佳干预浓度筛选 取生长状态良好、处于对数生长期的HSC-T6细胞,调整细胞数为1×10⁵个/mL,接种于96孔板,置于5% CO₂、37 ℃恒温培养箱中,应用含10% FBS的DMEM培养基培养24 h,弃去上清液。正常对照组加入含10% FBS的DMEM培养基,其余组分别加入不同浓度的含药培养基(500、1 000、1 500、2 000 μg/mL)进行干预,每组设置6个平行复孔,培养24 h后应用MTT法测定细胞活力。具体方法如下:每孔加入10 μL的MTT溶液(5 mg/mL),37 ℃孵育4 h,弃去上清液,每孔加入150 μL DMSO,避光,振荡器振荡10 min,酶标仪检测490 nm处吸光度(A)值。细胞活力=[(实验组A值−调零孔A值)/(对照组A值−调零孔A值)]×100%。

3.6 细胞活力检测 取生长状态良好、处于对数生长期的HSC-T6细胞,调整细胞数为1×10⁵个/mL,接种于96孔板,将细胞分为正常对照组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。除正常对照组外,其余组均采用终浓度100 mmol/L含乙醇培养基干预24 h使细胞活化^[12],弃去上清液,正常对照组及模型组加入含10% FBS的DMEM培养液,低、中、高剂量组分别加入终浓度为500、1 000、1 500 μg/mL含药培养基进行干预,每组设置6个平行复孔。培养24 h后应用MTT法测定细胞活力。

3.7 实时荧光定量PCR检测 取生长状态良好、对数生长期的HSC-T6细胞,调整细胞个数为1×10⁵/mL,接种于6孔培养板中,细胞分组及干预方法同“3.6”,培养24 h后弃掉培养液,收

集各组细胞,提取各组细胞的总RNA。参照逆转录试剂盒说明书将总RNA反转录合成cDNA,然后进行RT-PCR检测。反应程序为:95℃预变性30 s,95℃变性10 s→60℃退火延伸30 s,循环45次。以GAPDH为内参,实验结果采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式法进行分析,引物序列见表1。

表1 引物序列表

目的基因	序列(5'-3')	扩增产物长度
α-SMA	正向 CAATGGCTCCGGGCTCTGTA 反向 CTCCTGCTCTGCGCTTCGTC	153
Col-1	正向 GGACACTACTGGATCGACCTAAC 反向 CTCACCTGCTCCATGTTGCA	185
Col-3	正向 CTACCTTGCTCAGTCCTATGACTCTAGA 反向 TCCCGACTCGCAGACACATAT	76
PI3K	正向 GCTAGAGCCAAAGCAATTAG 反向 GCAGTGTTAGAGACTCTATT	98
Akt	正向 GAAGGAGAAGGCCACAGGTC 反向 TTCTGCAGGACACGGTTCTC	111
GAPDH	正向 ATGGCACAGCTCAAGGCTGAGA 反向 CGCTCCTGGAAGATGGTGAT	70

3.8 统计学方法 所有数据均使用Graph prism 8.0软件进行统计分析,计量资料以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐者用LSD-t检验进行组间的两两比较,方差不齐者采用Welch校正法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

4 结 果

4.1 用药规律

4.1.1 用药频数统计 本研究共纳入110份处方,共涉及中药216味,其中中药累计应用频数为1718。应用频数最多的中药为白术(80)。应用频数 ≤ 5 的中药共计188味,应用频数 ≥ 15 的中药共计28味,将应用频数 ≥ 15 中药归为高频类,其中排名前4位的药物依次是白术、黄芪、泽兰、茯苓。(见表2)

表2 处方高频中药频数统计表(频数 ≥ 15)

序号	中药	频数	频率/%	序号	中药	频数	频率/%
1	白术	80	72.73	15	鸡内金	31	28.18
2	黄芪	67	60.91	16	薏苡仁	30	27.27
3	泽兰	59	53.64	17	丹参	29	26.36
4	茯苓	55	50.50	18	郁金	28	25.45
5	陈皮	53	48.18	19	小茴	27	24.55
6	茵陈	53	48.18	20	赤芍	26	23.64
7	白芍	46	41.82	21	香附	26	23.64
8	柴胡	46	41.82	22	党参	22	20.00
9	当归	42	38.18	23	枸杞子	20	18.18
10	白茅根	41	37.27	24	酸枣仁	20	18.18
11	牡蛎	41	37.27	25	金钱草	19	17.27
12	鳖甲	38	34.55	26	麦芽	19	17.27
13	黄芩	36	32.73	27	冬凌草	18	16.36
14	牡丹皮	33	30.00	28	山药	17	15.45

4.1.2 药物性味归经分析 依据《中华人民共和国药典(2020版)》^[1]和《中药学》^[2],对纳入的中药进行药物性味归经分析。药性分析结果显示,治疗ALD肝郁脾虚证的中药以寒性(79

味)、温性(60味)、平性(55味)为主。药味分析结果显示,治疗ALD肝郁脾虚证的中药以甘味(103味)、苦味(98味)、辛味(69味)为主。药物归经分析结果显示,治疗ALD肝郁脾虚证的中药以归肝、胃、肺和脾经为主。(见图1)

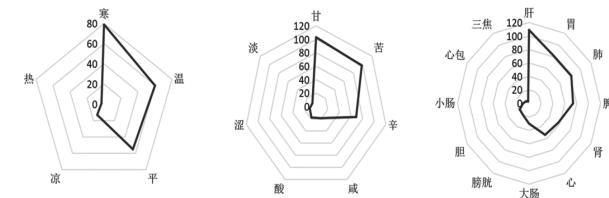


图1 药物性味归经分析

4.1.3 关联规则分析及网络图 采用IBM SPSS Modeler 18软件中的Apriori算法对药物进行关联规则分析,设置最低条件支持度10,最小规则置信度80,最大前项数2,共得到关联规则581项。其中置信度为100%的关联规则40项。药对关联规则分析中,支持度最高2组药对分别是泽兰→白术(53.636%),茯苓→白术(50.000%)。(见表3)在3味药组关联规则分析中,支持度最高的是泽兰+黄芪→白术(41.818%)。(见表4)药物关联规则分析结果可视化分析见图2。

表3 常用2种药物组合关联规则

序号	药物组合	支持度/%	置信度/%	提升度
1	泽兰→白术	53.636	86.441	1.189
2	茯苓→白术	50.000	92.727	1.275
3	当归→白芍	38.182	85.714	2.050
4	牡蛎→黄芪	37.273	82.927	1.361
5	白茅根→泽兰	37.273	87.805	1.637
6	白茅根→黄芪	37.273	82.927	1.361
7	白茅根→白术	37.273	85.366	1.174
8	鳖甲→牡蛎	34.545	84.211	2.259
9	鳖甲→黄芪	34.545	89.474	1.469
10	鳖甲→白术	34.545	84.211	1.158

表4 常用3种药物组合关联规则

序号	药物组合	支持度/%	置信度/%	提升度
1	泽兰+黄芪→白术	41.818	86.957	1.196
2	茵陈+泽兰→白术	33.636	81.081	1.115
3	茯苓+泽兰→白术	33.636	94.595	1.301
4	茯苓+黄芪→白术	33.636	97.297	1.338
5	当归+白芍→白术	32.727	80.556	1.108
6	白茅根+泽兰→黄芪	32.727	86.111	1.414
7	白茅根+泽兰→白术	32.727	86.111	1.184
8	陈皮+黄芪→泽兰	32.727	83.333	1.554
9	白芍+白术→当归	31.818	82.857	2.170
10	白茅根+白术→泽兰	31.818	88.571	1.651
11	白茅根+白术→黄芪	31.818	82.857	1.360
12	鳖甲+黄芪→牡蛎	30.909	82.353	2.209
13	牡蛎+黄芪→鳖甲	30.909	82.353	2.384
14	鳖甲+黄芪→泽兰	30.909	82.353	1.535
15	鳖甲+黄芪→白术	30.909	85.294	1.173
16	白茅根+黄芪→泽兰	30.909	91.176	1.700
17	白茅根+黄芪→白术	30.909	85.294	1.173

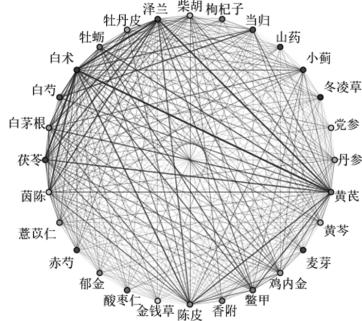


图2 高频药物关联网络展示图

4.1.4 聚类分析 应用IBM SPSS Statistics 20软件,对应用频数 ≥ 15 的高频药物进行聚类分析。(见图3)最小聚类数设定5,最大聚类数设定10;聚类方法选择组间联结,度量标准选择Jaccard系数,分析结果共得到6类药物组合。C1:白芍-当归-枸杞子-黄芩-酸枣仁-金钱草;C2:党参;C3:郁金;C4:柴胡-香附;C5:牡蛎-鳖甲-白茅根-小茴-鸡内金-白术-茯苓-黄芪-泽兰-陈皮-茵陈-薏苡仁-山药-牡丹皮-冬凌草-麦冬-丹参;C6:赤芍。

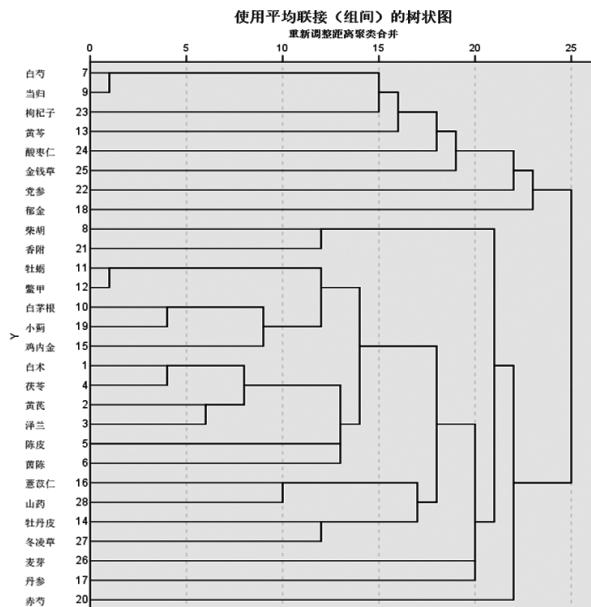


图3 中药聚类分析树状图

4.2 网络药理学分析结果

4.2.1 核心药物有效成分及靶点获取 结合关联规则分析结果,将应用频数最高的前4味中药定义为核心药物,分别为白术、黄芪、泽兰、茯苓。应用TCMSP数据库检索药物有效成分和药物作用靶点,共筛选得到26个化学成分,214个药物作用靶点。应用Genecard数据库检索ALD相关靶点,共筛选得到945个疾病靶点,最终得到疾病与药物交集靶点100个。(见图4)

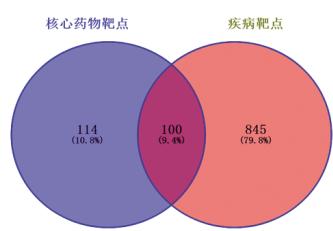


图4 疾病与药物交集靶点韦恩图

4.2.2 “药物-成分-靶点”网络的构建 利用Cytoscape 3.8.0软件对药物、活性成分及靶点的关系进行网络分析,黄色三角形代表中药,紫色代表白术活性成分,绿色代表黄芪活性成分,粉色代表泽兰活性成分,橙色代表茯苓活性成分,A1、B1为几种中药共有的活性成分,蓝色菱形代表基因靶点。(见图5)根据degree值将核心药物活性成分进行排序,排前5位的化合物为:槲皮素、常春藤皂苷元、山柰酚、7-O-甲基异微凸剑叶莎醇、芒柄花黄素。(见表5)

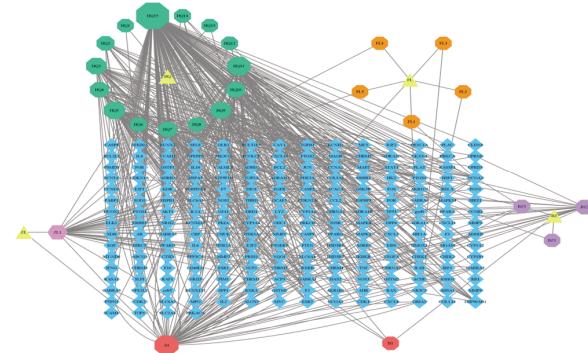


图5 “药物-成分-靶点”网络图

表5 排名前10的化合物成分信息

MOLID	成分名称	OB(%)	DL	来源	编号
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	黄芪	HQ15
MOL000296	常春藤皂苷元	36.91	0.75	黄芪、泽兰、茯苓	A1
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	黄芪	HQ11
MOL000378	7-O-甲基异微凸剑叶莎醇	74.69	0.30	黄芪	HQ5
MOL000392	芒柄花黄素	69.67	0.21	黄芪	HQ9
MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75	泽兰	ZL1
MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31	黄芪	HQ3
MOL000371	3,9-二-O-甲基尼索林	53.74	0.48	黄芪	HQ4
MOL000417	毛蕊异黄酮	47.75	0.24	黄芪	HQ10
MOL000380	3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷	64.26	0.42	黄芪	HQ7

4.2.3 PPI网络分析 将100个交集靶点导入String数据库中进行PPI网络分析,共有个100节点和2 111条边,将PPI网络导入Cytoscape 3.8.0软件进行进一步拓扑学分析。(见图6)其中图形节点大小及颜色深浅与度值呈正相关。图形节点越大,颜色越深,提示该靶点在治疗ALD的过程中越关键。

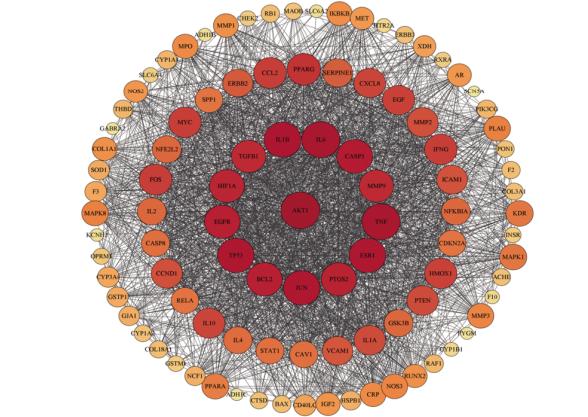


图6 PPI网络分析图

4.2.4 GO及KEGG富集分析 运用Metascape数据库对交集

靶点进行GO功能分析与KEGG通路富集分析。其中生物过程(biological process, BP)239个,主要与细胞迁移的正向调控、对激素的反应、细胞群体增殖的负调控等相关;细胞组分(cellular component, CC)33个,主要与膜筏、质膜蛋白复合物、薄膜侧面等相关;分子功能(molecular function, MF)126个,主要与DNA结合转录因子结合、激酶结合、氧化还原酶活性等相关。(见图7)KEGG通路富集共分析出181条通路,主要与PI3K/Akt信号通路、JAK/STAT信号通路、NF-κB信号通路等有关。(见图8)结合PPI网络分析结果,选择PI3K/Akt信号通路进行实验验证。

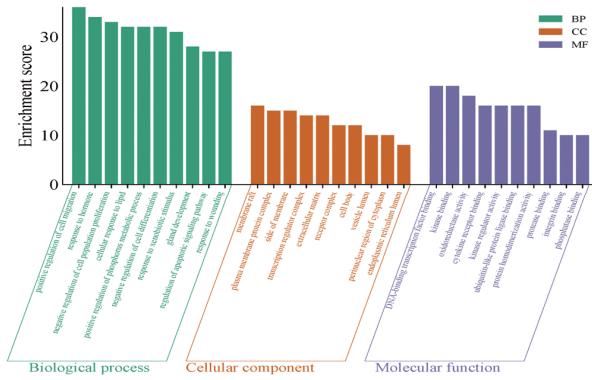


图7 GO功能富集分析条形图

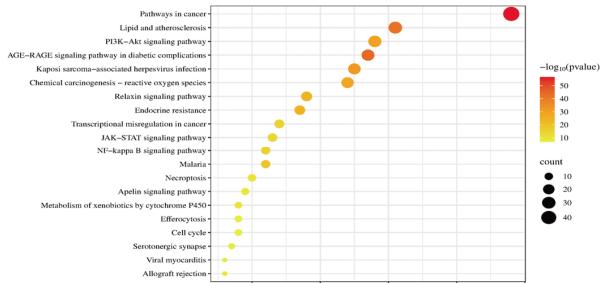


图8 KEGG通路富集分析气泡图

4.3 细胞实验结果

4.3.1 核心药物对HSC-T6细胞活力的影响 MTT结果显示,与正常组比较,培养基中核心药物终浓度达到2 000 μg/mL后细胞存活率开始显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。故选择细胞存活率未明显下降时的药物浓度500、1 000、1 500 μg/mL作为药物干预浓度。(见表6)

表6 核心药物对HSC-T6的细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$)

药物浓度/(μg/mL)	n	24 h细胞存活率/%
0	6	100.00±7.96
500	6	101.90±8.24
1 000	6	109.80±12.32
1 500	6	106.50±5.98
2 000	6	81.47±9.09 ^a

注:与0 μg/mL组比较,^a $P<0.05$ 。

4.3.2 核心药物对酒精诱导活化的HSC-T6细胞活力的影响 MTT结果显示,与正常对照组比较,模型组HSC-T6细胞出现增殖活化,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,低、中、高剂量组HSC-T6细胞增殖活化能力受到抑制,差异均有统计学意义($P<0.05$),且药物浓度越高,抑制HSC-T6细

胞增殖活化的能力越强。(见表7)

表7 核心药物对酒精诱导活化的HSC-T6细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	24 h细胞存活率
正常对照组	6	100.00±11.80
模型组	6	114.30±7.50 ^a
低剂量组	6	90.00±4.54 ^b
中剂量组	6	85.49±4.28 ^b
高剂量组	6	78.22±2.31 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

4.3.3 核心药物对酒精诱导活化的HSC-T6细胞中Col-1 mRNA、Col-3 mRNA、α-SMA mRNA、PI3K mRNA、Akt mRNA表达水平的影响 与正常对照组比较,模型组Col-1 mRNA、Col-3 mRNA、α-SMA mRNA、PI3K mRNA和Akt mRNA表达水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,低、中、高剂量组Col-1 mRNA、Col-3 mRNA、α-SMA mRNA、PI3K mRNA和Akt mRNA表达水平明显降低($P<0.05$)。(见表8)

表8 各组HSC-T6细胞Col-1 mRNA、Col-3 mRNA、α-SMA mRNA、PI3K mRNA、Akt mRNA相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Col-1 mRNA	Col-3 mRNA	α-SMA mRNA	PI3K mRNA	Akt mRNA
正常对照组	6	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
模型组	6	2.607±0.753 ^a	3.124±1.521 ^a	1.939±0.481 ^a	1.435±0.066 ^a	3.294±0.983 ^a
低剂量组	6	1.353±0.198 ^b	1.136±0.111 ^b	0.357±0.090 ^b	0.392±0.059 ^b	0.956±0.009 ^b
中剂量组	6	0.891±0.112 ^b	0.356±0.016 ^b	0.778±0.014 ^b	0.353±0.227 ^b	1.299±0.315 ^b
高剂量组	6	1.042±0.239 ^b	0.524±0.056 ^b	1.007±0.107 ^b	0.604±0.135 ^b	1.323±0.125 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

5 讨 论

中医学中虽无“酒精性肝病”这一病名,但根据其临床表现可归属于“酒伤”“酒癖”“酒疸”“酒臌”等范畴^[14]。现代研究发现,酒精性肝病是由于患者长期大量饮酒或酗酒,导致酒精及其代谢产物在体内蓄积,且短时间内难以代谢、消除,进而使得酒精及其代谢物对肝脏组织产生持续性刺激性损伤。酒精性肝病的主要病理改变为肝细胞的脂肪变性,且随着病情的进展,还会导致酒精性肝病患者肝脏组织产生炎症反应和纤维化^[3]。

本研究共纳入处方110首,涉及中药216味。药味以甘、苦、辛为主。甘能补能缓,具有补益和中、缓急止痛之功;苦味能泄能燥,具有清热解毒之功;辛味能散能行,具有行气和血之功。功效与ALD湿热内蕴,肝失疏泄,脾虚亏虚的病机相符。中药药性以寒、温为主,说明随着病情发展,病性多寒热错杂,故用药当以寒温并用,阴阳并调。药物归经属肝、胃经居多,胃为五脏六腑之海,脾为胃行其津液,脾胃以膜相连,太阴阳明为之表里,因此肝脾关系可看做是肝脾关系中的一部分^[15]。肝主升发,胃主纳降,升降相因,从而维持气机正常运动。从药物频数统计结果可以看出,治疗ALD肝郁脾虚证药物以白术、黄芪、泽兰、茯苓等健脾利湿药为主。白术归脾、胃经,可健脾益气,燥湿利水。黄芪归脾、肺经,可补气升阳,利水消肿。泽兰归肝、脾经,可活血祛瘀,利水消肿。茯苓归心、

肺、脾、肾经,能利水渗湿,健脾宁心。张仲景言“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”,脾土健运有助于肝气调达,肝气疏泄也协助脾气升清和运化。关联规则结果显示,支持度最高的药对为泽兰→白术以及泽兰+黄芪→白术。应用上述核心药物旨在使脾气健运,水湿得化。脾胃为后天之本,气血生化之源,脾胃健运,肝体得脾胃所化水谷精微滋养而发挥功能,同时肝的疏泄是促进脾胃运化水谷精微的重要因素。二者相辅相成,使脾气健运,肝气得舒。

网络药理学结果显示,核心药物治疗ALD肝郁脾虚证的主要活性成分为槲皮素、常春藤皂苷元、山柰酚、7-O-甲基异微凸剑叶莎醇、芒柄花黄素等。其中槲皮素能够通过上调miR-146影响PI3K/Akt信号通路来抑制肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)增殖,促进其凋亡^[16],发挥抑制肝纤维化的作用。常春藤皂苷元可以通过抑制IL-6蛋白表达,进而调控肝癌细胞内PD-1/PD-L1和MAPK免疫信号通路活性,从而抑制癌细胞的增殖^[17]。山柰酚能够通过抑制炎症反应减轻急性肝衰竭过程中的肝脏损伤和肝细胞凋亡^[18]。芒柄花黄素联合下调miR-4326能够通过抑制Wnt/β-catenin信号通路激活,抑制肝癌细胞生长和侵袭^[19]。说明上述有效成分可能在抑制ALD进展的过程中发挥着重要的作用。PPI网络分析结果显示,关键核心靶点包括Akt1、TNF、IL-6、IL-1B、TP53等。Akt1是一种蛋白质激酶,在细胞增殖、凋亡、迁移和肿瘤发生过程中起着关键作用,Akt1能够通过调控炎症及纤维化进程促进ALD的形成^[20]。在ALD发生发展过程中伴随着炎症因子的释放,过量酒精摄入会激活库普弗细胞,从而产生促炎因子TNF-α和IL-6,会导致氧化损伤、肝细胞坏死和炎性细胞浸润,同时TNF-α和IL-6会抑制巨噬细胞的吞噬作用,促进肝星状细胞增殖^[21]。IL-1B被认为在先天免疫系统调节和局部组织损伤修复中较为重要,并参与细胞增殖、分化和凋亡等细胞活动,在酒精性肝损伤过程中显著升高^[22]。TP53是一种抑癌蛋白,激活TP53能够导致ALD大鼠的胰岛素抵抗,进而导致肝脂肪变性等代谢异常^[23]。

KEGG富集发现核心药物治疗ALD肝郁脾虚证主要与PI3K/Akt信号通路、JAK/STAT信号通路、NF-κB信号通路等等有关。摄入过量酒精会促进肝脏库普弗细胞分泌促炎性细胞因子,促炎因子能够导致JAK的激活,而后介导STAT的磷酸化,进而介导炎症反应的发生,促进ALD的形成和发展^[24]。NF-κB是重要炎症转录调控因子,正常情况下,NF-κB由多个亚基组成复合物存在于胞质中,在ALD过程中,受到TNF-α等细胞因子及氧化应激等信号刺激,复合物中的抑制亚基IκB解离掉,发挥转录活性,导致肝细胞产生炎症及损伤^[25]。PI3K/Akt信号通路作为细胞内重要的一条传导通路,与HSC的增殖活化密切相关。研究^[26]表明,PI3K/Akt信号通路参与调节HSC活化、增殖,进一步促使HF进展。当肝脏受到损伤时,静止的HSC会通过上皮-间质转化,增殖并分化成肌成纤维细胞样细胞,分泌α-SMA和胶原蛋白,同时以更快的速度增殖^[27]。目前认为HSC的活化是肝纤维化的关键环节。本研究也通过体外研究发现,应用终浓度为100 mmol/L乙醇干预HSC-T6细胞24 h,可以有效刺激HSC-T6细胞的增殖活化,使其表达α-SMA并分泌Col-1和Col-3,同时在乙醇诱导活化的HSC-T6细胞中,

PI3K mRNA、Akt mRNA水平明显升高,而不同浓度的核心药物可以有抑制乙醇诱导的HSC-T6细胞的增殖活化,减少α-SMA、Col-1和Col-3的表达,达到抑制细胞外基质沉积的作用,同时下调PI3K mRNA、Akt mRNA水平。上述研究结果表明,“白术-黄芪-泽兰-茯苓”核心药物组合可能通过抑制PI3K/Akt信号通路抑制乙醇诱导HSC细胞增殖活化,从而达到抑制ALD进展的作用。

综上所述,本研究采用真实世界数据挖掘的方法,归纳总结中医药治疗ALD肝郁脾虚证的用药规律,探讨了“白术-黄芪-泽兰-茯苓”核心药物组合治疗ALD可能的有效成分、作用靶点及信号通路,并通过体外细胞实验进一步验证结果的合理性和准确性。但由于本研究是基于体外细胞实验结果,采用中药冻干粉的给药方式虽然保留了药物有效成分的完整性,但无法包含药物体内代谢物产物对细胞的影响,仍存在一定的局限性,同时由于中药成分的复杂性,可能存在多个信号通路的共同作用。因此在此基础上,后续研究将进行动物实验及大样本临床试验,以期更好地指导ALD肝郁脾虚证临床用药。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会.酒精性肝病防治指南(2018年更新版)[J].实用肝脏病杂志,2018,21(2):170-176.
- [2] 潘家妹,喻晓,邢练军.中医药治疗酒精性肝病的相关研究进展[J].中西医结合肝病杂志,2022,32(10):957-960.
- [3] 王艳丽,宁宇,丁莹.中医药治疗酒精性肝病研究进展[J].中医药信息,2022,24(9):80-84.
- [4] 袁泳维,李建鸿,梁秋艳,等.不同中医证型酒精性肝病患者的临床特点分析[J].广州中医药大学学报,2024,41(8):1956-1962.
- [5] 詹宗颖,孙明瑜.酒精性肝病的中医治疗及研究进展[J].四川中医,2014,32(10):182-186.
- [6] 张声生,陶琳.肝脾不调证中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中医杂志,2017,58(16):1436-1440.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [8] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999.
- [9] 尹萍,白媛媛,莫荣莲,等.基于数据挖掘及网络药理学探讨肝郁脾虚型肝癌用药规律及作用机制[J].中西医结合肝病杂志,2024,34(6):530-535.
- [10] 陈占科,陈凯丽,刘昊霖,等.中医药治疗糖尿病肾脏疾病湿热血瘀证用药规律及作用机制[J].中医学报,2024,39(5):1114-1124.
- [11] 周盈,史扬,谢惠迪,等.芪地糖肾方抑制IRE1α/XBP1s改善高糖诱导足细胞内质网应激的研究[J].北京中医药,2022,41(11):1209-1215.
- [12] 何月,贾宝辉,刘曼,等.自噬抑制剂对乙醇诱导的肝星状细胞活化作用的影响[J].天津医药,2014,42(7):630-633.
- [13] 钟赣生.中医药学[M].3版.北京:中国中医(下转第70页)

- [13] 秦军燕,王琛,杨婧,等.5/6肾切除大鼠残肾组织HIF-1 α 、nNOS蛋白表达及丹参多酚酸盐的作用机制[J].中华肾脏病杂志,2014,30(2):147-148.
- [14] 向清,邓伟,李宝,等.丹参对大鼠肾间质纤维化肾组织TSP-1、VEGF及TGF- β 1表达的影响[J].广西医学,2013,35(12):1582-1584.
- [15] 何立群,黄迪,王云满,等.丹酚酸B改善马兜铃酸肾病作用机制的研究[J].西安交通大学学报(医学版),2010,31(6):766-769.
- [16] 刘建国,杨胜兰,孙勇.丹酚酸B对肾小管上皮细胞转分化的影响及机制[J].中国医院药学杂志,2012,32(11):824-827.
- [17] 时洁,耿晓康.丹参酚酸B对慢性肾炎大鼠的疗效及作用机制研究[J].解放军医药杂志,2017,29(10):5-9.
- [18] 杨茹茜,徐倩,杨旖,等.黄芪甲苷对肾纤维化小鼠Toll/MyD88依赖性通路的作用研究[J].中草药,2017,48(18):3775-3782.
- [19] YU Q, ZHANG M D, QIAN L F, et al. Luteolin attenuates high glucose-induced podocyte injury via suppressing NLRP3 inflammasome pathway[J]. Life Sci, 2019,225:1-7.
- [20] ZHANG M Y, HE L Y, LIU J S, et al. Luteolin attenuates diabetic nephropathy through suppressing inflammatory response and oxidative stress by inhibiting STAT3 pathway[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2021, 129(10):729-739.
- [21] 许强,文豪,李修身,等.丹参酮ⅡA磺酸钠治疗糖尿病肾病的Meta分析[J].中药新药与临床药理,2020,31(1):113-119.
- [22] 于力,张蕾,郝志宏,等.甘草甜素对大鼠肾小球硬化早期的防护作用[J].中草药,2010,41(2):250-255.
- [23] DU L, LI C C, QIAN X, et al. Quercetin inhibited mesangial cell proliferation of early diabetic nephropathy through the Hippo pathway[J]. Pharmacol Res, 2019,146:104320.
- [24] 应巧,张伟,泮瑛瑛,等.二氢槲皮素对糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用及mTORC2/Akt信号通路的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(7):581-584,660.
- [25] SHARMA D, GONDALIYA P, TIWARI V, et al. Kaempferol attenuates diabetic nephropathy by inhibiting RhoA/Rho-kinase mediated inflammatory signalling [J]. Biomed Pharmacother, 2019,109:1610-1619.
- [26] 王苑菲,沈美晓,吴祖荣,等.金丝桃苷对糖尿病肾病大鼠TGF- β 1/smad通路及肾上皮间质转化的影响[J].广西医科大学学报,2021,38(9):1654-1660.

(收稿日期:2024-09-11 编辑:蒋凯彪)

(上接第62页)药出版社,2012.

- [14] 聂晶晶,王晓,唐艳萍.酒精性肝病的中西医结合治疗进展[J].河南中医,2016,36(4):738-740.
- [15] 陈佳慧,马重阳,徐甜,等.从“肝脾相关”与“肝胃不和”探析张仲景肝病证治思想[J].中西医结合肝病杂志,2024,34(3):262-264.
- [16] 高晓阳,赵晓璐,张春艳,等.槲皮素诱导肝星状细胞凋亡:基于调控miR-146影响PI3K/Akt信号通路[J].南方医科大学学报,2023,43(10):1725-1733.
- [17] 崔文超,刘明远,关宝生,等.长春藤皂苷元调控IL-6抑制肝癌细胞增殖的免疫机制[J].中国免疫学杂志,2023,39(9):1864-1871.
- [18] 宋金玥,任锋,张向颖,等.山奈酚干预对D-氨基半乳糖/脂多糖诱导小鼠急性肝衰竭的保护作用[J].中国中西医结合杂志,2017,37(5):569-574.
- [19] 章涵,赵玉霞,杨惠然,等.芒柄花黄素联合下调miR-4326对肝癌细胞HCCLM3生长和侵袭的影响[J].中成药,2022,44(5):1636-1640.
- [20] REYES-GORDILLO K, SHAH R, ARELLANES-ROBLEDO J, et al. Akt1 and Akt2 isoforms play distinct roles in regulating the development of inflammation and fibrosis associated with alcoholic liver disease[J]. Cells, 2019,8(11):1337.
- [21] TIEGS G, HORST A K. TNF in the liver: Targeting a central player in inflammation[J]. Semin Immunopathol, 2022,44(4):445-459.
- [22] NELSON J E, HANDA P, AOUIZERAT B, et al. Increased parenchymal damage and steatohepatitis in Caucasian non-alcoholic fatty liver disease patients with common IL-1 β and IL-6 polymorphisms[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2016,44(11-12):1253-1264.
- [23] DERDAK Z, LANG C H, VILLEGRAS K A, et al. Activation of p53 enhances apoptosis and insulin resistance in a rat model of alcoholic liver disease[J]. J Hepatol, 2011,54(1):164-172.
- [24] NEUMAN M G, BRENNER D A, REHERMANN B, et al. Mechanisms of alcoholic liver disease: Cytokines[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2001,25(5 Suppl ISBRA):251S-253S.
- [25] 杨季云,张思仲,郭红,等.肿瘤坏死因子 α 通过激活NF- κ B信号通路加快肝细胞周期进程[J].生物化学与生物物理进展,2007,34(6):604-610.
- [26] 杨星,王振,李淑娣,等.基于PI3K/Akt信号通路探讨中药活性成分抗肝纤维化的研究现状[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(13):230-240.
- [27] 黄冰,杨光宇,张岩,等.3,3'-二吲哚甲烷通过PI3K/AKT/NF- κ B通路抑制肝星状细胞的活化[J].右江民族医学院学报,2022,44(3):325-329.

(收稿日期:2024-10-11 编辑:罗英姣)