

# ·论著·

## 基于网络药理学的芹菜子活性成分抗肝纤维化作用机制研究

谯明<sup>1</sup>, 朱毅<sup>1</sup>, 赵耀<sup>2</sup>, 胡君萍<sup>2\*</sup>, 杨建华<sup>1\*</sup>(1.新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

**摘要:** 目的 构建芹菜子活性成分-作用靶点网络和蛋白相互作用网络, 对靶点涉及的功能和通路进行分析, 初步探讨芹菜子抗肝纤维化的作用机制。方法 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)、文献挖掘和笔者所在实验室已有研究获取芹菜子主要活性成分, SwissTargetPrediction 平台和 BATMAN-TCM 数据库获取成分靶点, 利用 GeneCards 和 OMIM 数据库预测和筛选肝纤维化相关的作用靶点。采用 Cytoscape 软件构建活性成分-作用靶点网络, String 数据库和 Cytoscape 软件绘制蛋白相互作用网络。采用生物学信息注释数据库(DAVID)对靶点进行基因本体(GO)分类富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路富集分析, 结合相关文献分析芹菜子抗肝纤维化的作用机制。结果 筛选得到芹菜子 17 个活性成分, 涉及 69 个作用靶点。网络分析结果表明, 芹菜子主要涉及胶原蛋白分解代谢、炎症反应和胆固醇合成等生物过程, 通过调节 TGF-β1、NF-κB 和 PI3K/AKT 等信号通路来发挥抗肝纤维化作用。结论 本研究体现了芹菜子多成分-多靶点-多途径的作用特点, 其所作用的多条信号通路均存在直接或间接关联性, 为进一步研究提供了新思路和新方法。

**关键词:** 网络药理学; 芹菜子; 肝纤维化; 作用机制

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)03-0257-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.03.001

引用本文: 谌明, 朱毅, 赵耀, 等. 基于网络药理学的芹菜子活性成分抗肝纤维化作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(3): 257-265.

### Study on Mechanism of Active Compounds of Celery Seed in the Treatment of Liver Fibrosis Based on Network Pharmacology

QIAO Ming<sup>1</sup>, ZHU Yi<sup>1</sup>, ZHAO Yao<sup>2</sup>, HU Junping<sup>2\*</sup>, YANG Jianhua<sup>1\*</sup>(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the anti-liver fibrosis mechanism of celery seed through establishing the active components-targets network and protein interactions network and analyzing the functions and pathways of targets. **METHODS** The active ingredients of celery seed were obtained by TCMSP, literature study and previous work of the laboratory which author study in. SwissTargetPrediction and BATMAN-TCM databases were used to obtain the targets of constituent, GeneCards and OMIM databases were used to predict and screen the targets associated with liver fibrosis. The Cytoscape software was used to construct the active components-targets network. The protein-protein interaction network was constructed by using the String database and Cytoscape software. The GO and KEGG pathways involved in the targets were analyzed by DAVID, and the mechanism of anti-liver fibrosis of celery seed was analyzed in combination with relevant literatures. **RESULTS** The results showed that 17 active components and 69 targets of celery seed were involved. The network results showed that celery seed was mainly involved in the process of collagen catabolic, inflammatory response and negative regulation of cholesterol storage, by adjusting the TGF-β1, NF-κB, PI3K/AKT and other signaling pathways to exert anti-liver fibrosis effect. **CONCLUSION** This study reflects the characteristics of multicomponent, multitarget and multipathway of celery seed, and multiple signaling pathways which it act on are correlated with each other, providing new ideas and methods for further research.

**KEYWORDS:** network pharmacology; celery seed; liver fibrosis; mechanism

肝纤维化是各种原因所致慢性肝损伤后出现的实质细胞再生、间质细胞活化增生和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积的肝组织修复重建过程, 是各种慢性肝病共同的病理基础, 是

发展为肝硬化的必经阶段<sup>[1-2]</sup>, 其病理特征是以胶原为主的 ECM 合成降解失衡而在肝内过度沉积<sup>[3]</sup>。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)激活并转换为肌成纤维细胞, 合成大量 ECM, 是肝纤维化

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560688)

作者简介: 谌明, 女, 博士 Tel: 15099183961 E-mail: 1532527694@qq.com \*通信作者: 胡君萍, 女, 博士, 教授 Tel: 13899853561  
E-mail: 89229613@qq.com 杨建华, 男, 博士, 教授 Tel: 18119185216 E-mail: 609571241@qq.com

发生、发展的关键<sup>[4-5]</sup>。全球肝癌及肝硬化死亡人数逐年上升，由于肝癌通常于末期才可确诊，故死亡率颇高。中国又是病毒性肝炎的高流行区，乙型肝炎慢性感染者约有1.2亿，因此，在肝纤维化演变成肝硬化甚至肝癌前进行药物治疗，阻止病情进一步发展，成为近年来国内外研究的热点。近年来，越来越多的研究及数据表明，肝纤维化如能及时接受治疗是可以逆转的，但传统的西药治疗效果不理想，带来一系列不良反应，且由于肝纤维化病理机制的多环节性、复杂性，靶向治疗效果一直不理想，临幊上仍然缺乏特异有效的药物。目前，抗肝纤维化药物的研究报道较多，如中药单体橙皮苷、羟基红花黄色素A、甲基莲心碱和姜黄素等；单味中药丹参、柴胡、黄芪和冬虫夏草等，但转化为临床新药极少<sup>[6]</sup>。目前国家药品监督管理局批准的以肝纤维化为适应证的中成药主要有扶正化瘀胶囊(片)、复方鳖甲软肝片、安络化纤丸等。因此，中医药在抗肝纤维化研究领域具有多环节、多靶点、多途径复合作用的独特优势，在防治肝纤维化方面展示了传统中医药的特色<sup>[7]</sup>。

芹菜(*Apium L.*)为伞形科药食同源植物，我国栽植有旱芹(*Apium graveolens L.*)和细叶旱芹(*Apium leptophyllum*)2种<sup>[8]</sup>，分布于新疆的主要为旱芹，已收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(维吾尔药分册)和《维吾尔药材标准》<sup>[9-10]</sup>。新疆维药芹菜不但有较高的食用价值，同时其功能性成分具有良好的降压、降脂、护肝、降糖、抗肿瘤、抗氧化、镇静、抑菌及杀虫等药理活性<sup>[11]</sup>。芹菜以子和根入药，在维吾尔医药中广泛应用，为护肝布祖热颗粒、肝保康颗粒、寒喘祖帕颗粒和复方木尼孜其颗粒等多种保肝制剂的主要药味。芹菜子为伞形科植物旱芹(*Apium graveolens L.*)的干燥成熟果实，除了含有丰富的营养元素外，还含有多种具生理活性的物质，主要包括不饱和脂肪酸、类黄酮物质、丁基苯酞类、氨基酸、膳食纤维、香豆素衍生物、挥发油化合物等<sup>[12-13]</sup>。目前的研究表明芹菜子具有多种药理活性，芹菜子多肽和芹菜素具有抗氧化活性<sup>[14-15]</sup>；芹菜子粗提物具有抑制植物病原真菌的作用<sup>[16]</sup>；黄酮类化合物具有降压安神、保护血管和增强免疫等功效<sup>[17]</sup>；挥发油中主要成分正丁基苯酞可治疗局部缺血的脑血管疾病，还能够改善微循环，抑制细胞凋亡和降低氧化性应激，已经被开发成脑血管疾病领域的国家一类新药<sup>[18-19]</sup>。

网络药理学是在现代药理学研究的基础上提出的药物设计与开发的新方法和新策略，强调了将生物学网络与药物作用网络整合，分析药物在网络中与节点或网络模块的关系，由寻找单一靶点转向综合网络分析。近年来通过对疾病基因网络与药物作用网络整合分析，发现不仅大多数药物通过多靶点作用，而且约有>40%的药物作用靶点与多种疾病相关，因此药物与疾病基因之间形成了复杂的交叉网络<sup>[20]</sup>。网络药理学是以系统生物学为基础，从整体水平探讨“药物-靶点-疾病”复杂网络关系，进而指导新药研发及药理作用研究<sup>[21]</sup>。网络药理学提供了一个系统层次的方法来了解疾病的发病机制，其研究策略整体性和系统性的特点与中医药整体观和辨证论治的原则不谋而合，可用于发现先导化合物、识别靶标和预测适应证<sup>[22-23]</sup>。网络药理学可建立“多成分-多靶点-多通路”网络，反映中药“多成分-多靶点-多途径”的整合作用特点。

本课题组在前期研究<sup>[24]</sup>工作中，对芹菜子和根提取物进行了体外抗肝纤维化活性筛选，研究结果显示芹菜子具有较强的抗肝纤维化活性，为了深入挖掘芹菜子抗肝纤维化作用的分子机制，故利用网络药理学的方法，在前期芹菜子化学成分研究基础上选取活性成分进行潜在靶点和作用通路预测，得到“化合物-靶点”和“通路-靶点”网络药理图。通过分析实验数据，获取了活性成分特异性靶点和通路及其共同作用靶点和通路，为深入开展芹菜子抗肝纤维化的实验研究及临床合理应用提供参考。

## 1 方法

### 1.1 化学成分的获取与活性成分的筛选

根据芹菜子中化合物含量、相关生物功能、研究热度，通过大量文献挖掘与整理获取已报道的芹菜子活性成分，通过TCMSP数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/>, Version 2.3)，按照口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug-likeness, DL) $\geq 0.18$ 的筛选条件，获取芹菜子关键活性成分。其中已有文献报道具有抗肝纤维化作用的化合物直接纳入。

### 1.2 活性成分作用靶点的获取

将活性成分输入BATMAN-TCM数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)，设置参数：Score cutoff $\geq 20$ 且P值 $<0.05$ ，选取符合参数要求的靶点<sup>[25]</sup>；将活性成分输入SwissTargetPrediction平台(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)，选取预

测结果中参数 Probability $\geq 0.7$  的靶点<sup>[26]</sup>。然后将预测出的靶点蛋白名通过 Uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)转换为基因名。

### 1.3 活性成分-靶点网络构建

将芹菜子的活性成分和作用靶点导入 Cytoscape 软件(<http://www.cytoscape.org/>, Version 3.2.1), 构建芹菜子活性成分-靶点蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。

### 1.4 肝纤维化作用靶点的获取

通过 GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>) 和 OMIM 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)与疾病靶点相关的数据库, 以“liver fibrosis”作为关键词搜索与肝纤维化相关的基因, 去除重复基因得到肝纤维化相关的作用靶点。

### 1.5 PPI 网络的构建

String 数据库(<http://string-db.org/>)可以自动对每个蛋白质相互作用信息打分, 分值越高代表蛋白质的相互作用置信度越高。将筛选得到的与肝纤维化相关的作用靶点导入 String 数据库, 限定物种为人, 从而获取蛋白质相互作用信息。选取打分值 $\geq 0.7$  的高置信度的数据, 构建 PPI 网络, 通过 Cytoscape 软件对网络进行可视化分析和处理。网络中交集的蛋白质很可能是芹菜子活性成分抗肝纤维化的潜在靶点。节点表示潜在作用靶点、活性成分和作用通路, 边用来连接活性成分及其作用靶点, 也用于连接潜在作用靶点及其相关通路。

### 1.6 靶点的生物过程分析和代谢通路分析

生物学信息注释数据库(DAVID)可以提供全面系统的生物功能注释信息, 筛选出显著富集的生物学注释。在 DAVID 数据库中导入筛选获得的芹菜子活性成分抗肝纤维化作用靶点, 限定物种为人, 将全部靶基因校正为官方基因名称后进行基因本体(GO, <http://www.geneontology.org>)生物学过程富集分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG, <http://www.kegg.jp/pathway.html>)代谢通路富集分析。

## 2 结果

### 2.1 芹菜子活性成分的筛选

通过查询国内外文献, 收集已报道的芹菜子化学成分, 然后根据 TCMSP 数据库筛选满足 OB $\geq 30\%$  和 DL $\geq 0.18$  的活性成分。通过文献检索发现可能含有一些化学成分的 OB 值和 DL 值不满足筛选条件, 但已有相关文献报道具有抗肝纤维化活性的化合物直接纳入。最终筛选出的 17 个活性

成分基本信息见表 1, 其中度值(degree)表示该化合物连接的靶点数量。

表 1 芹菜子中 17 个活性成分的基本信息

Tab. 1 Basic information for 17 active compounds of celery seed

序号	名称	CAS	OB/%	DL	度值
1	新蛇床内酯	6415-59-4	62.46	0.07	56
2	月桂烯醛	4826-62-4	31.95	0.03	29
3	左旋色氨酸	73-22-3	75.93	0.08	69
4	香芹酮	499-75-2	43.28	0.03	55
5	秦皮乙素	305-01-1	22.97	0.07	93
6	芹菜素	520-36-5	23.06	0.21	98
7	罗汉柏烯	470-40-6	56.43	0.12	59
8	柯伊利素	491-71-4	35.85	0.27	48
9	槲皮素	117-39-5	46.43	0.28	48
10	反式香薷醇	2102-58-1	45.28	0.03	66
11	柏木烯	68608-32-2	55.56	0.10	39
12	蒎烯	18172-67-3	44.84	0.05	20
13	石竹烯氧化物	1139-30-6	35.94	0.13	55
14	香草酸	121-34-6	35.47	0.04	49
15	正丁基苯酞	6066-49-5	47.90	0.07	89
16	苯戊酮	1009-14-9	42.58	0.03	71
17	紫丁香甙	118-34-3	14.64	0.32	68

### 2.2 活性成分作用靶点的预测

通过 BATMAN-TCM 数据库和 SwissTarget Prediction 平台检索活性成分得到的所有靶点, 删除重复, 整合得到 615 个靶点蛋白, 并将预测出的全部靶点蛋白名通过 Uniprot 数据库转换为对应的基因名。

### 2.3 活性成分-靶点网络模型构建

芹菜子活性成分-靶点 PPI 网络由 615 个靶点节点和 17 个成分节点构成, 每条边表示活性成分与靶点之间的相互作用关系, 其中外周节点代表活性成分, 内部节点代表活性成分作用的靶点。度值的大小代表着与对应节点的连接程度, 即在网络中的关键度。因此, 观察度值可以得出在网络中相对重要的活性成分。结果显示, apigenin(芹菜素)的作用靶点最多(度值=98), 其次是 aesculetin(秦皮乙素)(度值=93)和 3-n-butylphthalide(正丁基苯酞)(度值=89), 见图 1。这些活性成分具有较多的作用靶点, 可能在芹菜子的药理功能中起到较为核心的作用。

### 2.4 PPI 网络的构建

GeneCards 数据库和 OMIM 数据库检索与肝纤维化相关基因 410 个。为进一步探讨芹菜子活性成分抗肝纤维化作用机制, 本研究构建了芹菜子活性成分抗肝纤维化作用靶点的 PPI 网络, 其中包含 69 个节点, 165 条边, 平均节点 4.78, 见图 2。

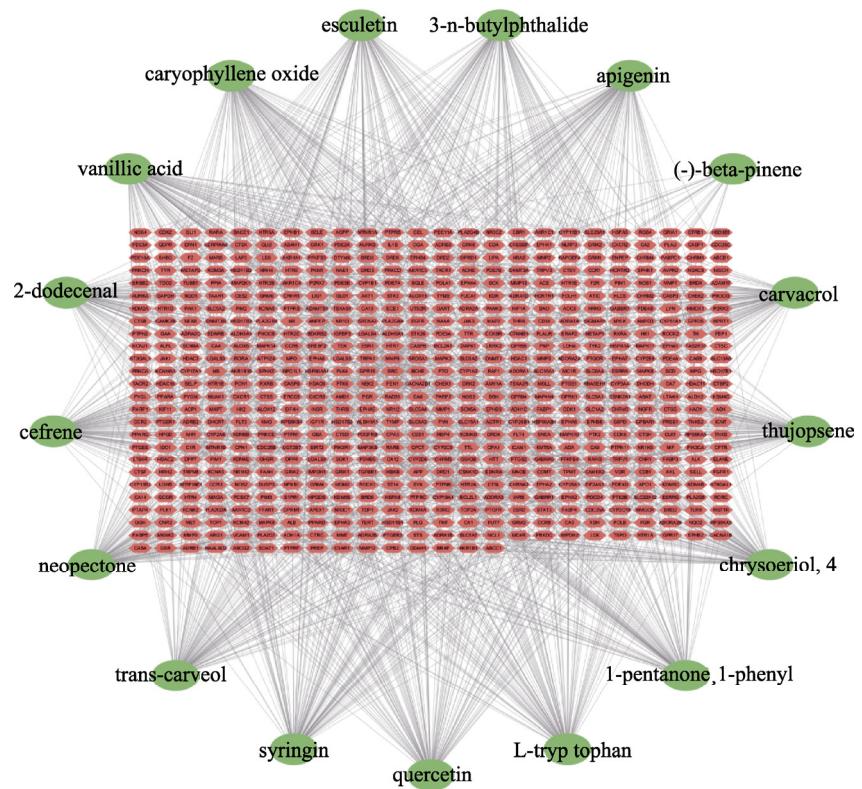


图 1 活性成分-靶点网络

**Fig. 1** Network of active components-targets

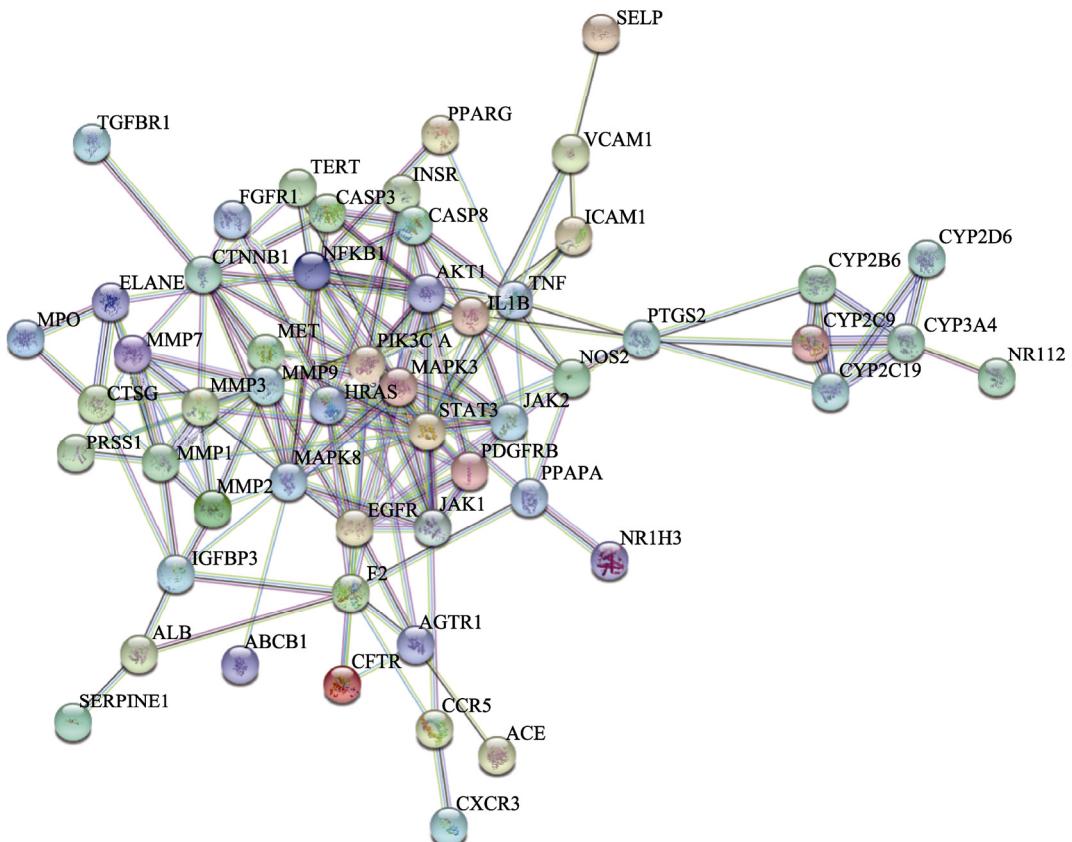


图 2 PPI 网络图

**Fig. 2** PPI network

## 2.5 GO 功能富集分析

通过 Cytoscape 3.2.1 软件对芹菜子活性成分构建的 PPI 网络所涉及的 69 个蛋白质进行功能富集分析。在 GO 功能富集分析中，分别选取生物过程、分子功能和细胞成分的前 10 个条目。生物过程涉及炎症反应、平滑肌细胞增殖的正向调节、胆固醇合成负调控和宿主共生体生长负调控等方面；分子功能主要涉及药物结合、ATP 结合、金属内肽酶活性、血红素结合和类固醇激素受体活

性等方面；细胞组成涉及细胞外基质、细胞核、细胞外间隙、质膜外侧和细胞分泌体等方面。结果见表 2。

## 2.6 KEGG 通路富集分析

筛选出的基因通过 Cytoscape 3.2.1 软件进行 KEGG 通路富集分析。在分析结果中，选取前 20 条信号通路，详细信息见表 3。FDR<0.01 为筛选标准，结果显示芹菜子活性成分主要参与 TGF-β、NF-κB 和 PI3K/AKT 等信号通路发挥抗肝纤维化作用。

表 2 潜在靶点的 GO 分析

Tab. 2 GO analysis of potential targets

条目	基因数/个	P 值	基因
生物过程			
炎症反应	8	2.08×10 <sup>-5</sup>	SELP, LIPA, CCR5, PTGS2, JAK2, CXCR3, TLR9, MIF
平滑肌细胞增殖的正向调节	4	4.85×10 <sup>-5</sup>	TNF, HMOX1, ELANE, PDGFRB
胆固醇合成负调控	3	1.22×10 <sup>-4</sup>	PPARA, PPARG, NR1H3
宿主共生体生长负调控	3	1.24×10 <sup>-4</sup>	TNF, ELANE, MPO
白细胞栓系	3	1.72×10 <sup>-4</sup>	VCAMI, SELP, TNF
细胞对葡萄糖刺激的反应	3	2.93×10 <sup>-4</sup>	NOX4, ICAMI, PIK3CA
外源性凋亡负调控死亡结构域受体的信号通路	3	6.02×10 <sup>-4</sup>	ICAMI, HMOX1, SERPINE1
胶原细胞分解代谢过程	3	9.02×10 <sup>-4</sup>	MMP9, MMP2, MMP1
细胞对脂多糖的反应	4	1.27×10 <sup>-3</sup>	CCR5, SERPINE1, NOS2, NR1H3
ERK1 和 ERK2 级联正调节	5	1.32×10 <sup>-3</sup>	NOX4, ICAMI, MAPK3, PDGFRB, MIF
细胞成分			
细胞外间隙	14	7.55×10 <sup>-6</sup>	ICAMI, SELP, TNF, MMP9, ELANE, MMP2, MIF, VCAMI, ACE, ALB, SERPINE1, MPO, IGFBP3, GBA
质膜外侧	7	8.45×10 <sup>-6</sup>	VCAMI, ICAMI, SELP, ACE, TNF, CCR5, CXCR3
细胞外基质	6	2.04×10 <sup>-5</sup>	MMP9, SERPINE1, MMP7, MMP3, MMP2, MMP1
细胞外泌体	17	2.73×10 <sup>-5</sup>	ICAMI, LIPA, MMP9, ELANE, MMP7, CFTR, MIF, CTNNB1, VCAMI, ACE, ALB, F2, SERPINE1, MAPK3, MPO, PDGFRB, GBA
RNA 聚合酶 II 转录因子复合体	3	3.92×10 <sup>-5</sup>	PPARG, STAT3, NR1H3
胞浆核周区域	5	5.98×10 <sup>-5</sup>	NOX4, TYR, HMOX1, NOS2, CTNNB1
细胞核	15	3.58×10 <sup>-4</sup>	NOX4, PPARA, PPARG, NFKB1, STAT3, CTNNB1, AKT1, CASP3, NR1I2, GCK, ALB, HMOX1, MPO, JAK2, NR1H3
细胞膜	3	4.25×10 <sup>-4</sup>	ICAMI, TNF, TGFBR1
核内体	3	5.76×10 <sup>-4</sup>	ACE, CCR5, TLR9
胞液	7	6.89×10 <sup>-3</sup>	CASP3, GCK, ADK, MAPK3, CFTR, NOS2, CTNNB1
分子功能			
RNA 聚合酶 II 转录因子	4	1.46×10 <sup>-5</sup>	PPARA, PPARG, STAT3, NR1H3
药物结合	4	3.89×10 <sup>-5</sup>	PPARA, ACE, ALB, PPARG
ATP 结合	14	9.32×10 <sup>-5</sup>	EGFR, FGFR1, TGFBRI, MET, ABCB1, CFTR, AKT1, GCK, MAPK3, JAK1, PDGFRB, JAK2, MAPK8, INSR
金属内肽酶活性	5	1.56×10 <sup>-4</sup>	MMP9, MMP7, MMP3, MMP2, MMP1
血红素结合	5	1.87×10 <sup>-4</sup>	PTGS2, HMOX1, MPO, JAK2, NOS2
类固醇激素受体活性	4	2.05×10 <sup>-4</sup>	PPARA, NR1I2, PPARG, NR1H3
跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性	3	2.45×10 <sup>-4</sup>	EGFR, MET, INSR
肝素结合	4	3.47×10 <sup>-3</sup>	FGFR1, SELP, ELANE, MPO
相同蛋白结合	3	5.25×10 <sup>-3</sup>	TNF, PPARG, STAT3
锌离子结合	10	5.54×10 <sup>-3</sup>	PPARA, ACE, NR1I2, MMP9, PPARG, MMP7, MMP3, MMP2, MMP1, NR1H3

表3 靶点的KEGG代谢通路富集分析

Tab. 3 Enrichment analysis of target KEGG metabolic pathway

代谢通路	基因数/个	P值	基因
TGF-β信号通路	21	$1.91 \times 10^{-13}$	<i>Smad2, Smad3, Smad1, Smad5, MMP9, Smad4, PAK, PKC, AKT, LIMK, MMP1, Smad8, MAPK3, AKT, ROCK, c-ABI, mTOR, Smad9, JAK1, MAPK8, TF</i>
NF-κB信号通路	13	$1.95 \times 10^{-11}$	<i>NF-κB2, NF-κB1, Bcl-xl, c-Rel, RelA, RelB, NF-κB, Bcl-2, IKKa, JNK, Akt, IKKβ, IκB</i>
PI3K/AKT信号通路	12	$2.84 \times 10^{-10}$	<i>AKT1, AKT2, MAPK8, GSK3, CDK2, MAPK3, PI3K, JAK1, PDK1, JAK2, AKT3, IKKa</i>
丙型肝炎	8	$2.24 \times 10^{-9}$	<i>AKT1, EGFR, PPARA, TNF, MAPK3, CD81, PIK3CA, JAK1</i>
乙型肝炎	7	$1.41 \times 10^{-8}$	<i>AKT1, CASP3, MAPK3, TNF, MMP9, TGF-β1, CASP8</i>
癌症通路	8	$2.05 \times 10^{-8}$	<i>PIK3CA, MAPK8, TGFBRI, MAPK3, JAK1, STAT3, AKT1, EGFR</i>
胰腺癌	5	$2.15 \times 10^{-8}$	<i>AKT1, EGFR, MAPK3, PIK3CA, JAK1</i>
癌症蛋白聚糖	5	$1.52 \times 10^{-7}$	<i>AKT1, EGFR, FGFR1, CASP3, TNF</i>
癌症中心碳代谢	8	$3.86 \times 10^{-7}$	<i>AKT1, PDGFRB, EGFR, FGFR1, GCK, MAPK3, MET, PIK3CA</i>
催乳激素信号通路	8	$5.97 \times 10^{-7}$	<i>AKT1, GCK, MAPK3, PIK3CA, NF-κB, MAPK8, JAK2, STAT3</i>
HIF-1信号通路	9	$6.25 \times 10^{-7}$	<i>AKT1, EGFR, MAPK3, INSR, STAT3, SERPINE1, PIK3CA, NF-κB, NOS2</i>
肺结核	11	$6.45 \times 10^{-7}$	<i>AKT1, CASP3, TNF, MAPK3, CASP8, JAK1, NF-κB, MAPK8, JAK2, NOS2, TLR9</i>
胰岛素抵抗	9	$1.88 \times 10^{-6}$	<i>AKT1, PPARA, TNF, PIK3CA, NF-κB, MAPK8, INSR, STAT3, NR1H3</i>
疟疾	6	$2.46 \times 10^{-6}$	<i>CD81, VCAMI, ICAMI, SELP, TNF, MET</i>
非酒精性脂肪性肝病	10	$2.99 \times 10^{-6}$	<i>AKT1, PPARA, CASP3, TNF, CASP8, PIK3CA, NF-κB, MAPK8, INSR, NR1H3</i>
前列腺癌	8	$3.38 \times 10^{-6}$	<i>AKT1, EGFR, NF-κB, FGFR1, MAPK3, PIK3CA, PDGFRB, CTNNB1</i>
破骨细胞分化	9	$6.85 \times 10^{-6}$	<i>AKT1, TNF, TGF-β1, MAPK3, PPARG, PIK3CA, JAK1, NF-κB, MAPK8</i>
利什曼病	5	$6.99 \times 10^{-6}$	<i>TNF, PTGS2, MAPK3, JAK1, NF-κB</i>
Toll样受体信号通路	5	$1.07 \times 10^{-5}$	<i>AKT1, TNF, MAPK3, CASP8, PIK3CA</i>
黑色素瘤	5	$1.20 \times 10^{-5}$	<i>AKT1, EGFR, FGFR1, MAPK3, MET</i>

### 3 讨论

肝纤维化是肝脏对各种慢性损伤产生的一种修复反应，其主要病理特征是ECM在肝组织内的过度合成和异常沉积。当肝脏受到慢性损伤时，纤维组织生成，损伤因素若不及时去除，纤维组织则持续性增生，最终形成肝硬化甚至肝癌。肝纤维化是肝硬化发展的必经途径，肝纤维化是可逆的，而肝硬化则难以逆转。因此，研究肝纤维化的发病机制，从而阻断甚至逆转肝纤维化至关重要。本研究通过网络药理学的方法，根据设置的筛选条件，对芹菜子抗肝纤维化作用的活性成分及作用靶点进行挖掘，通过成分、疾病与靶蛋白间的相互作用关系构建“成分-靶点”和“通路-靶点”网络药理图，从而为芹菜子多成分、多靶点、多途径的抗肝纤维化作用机制提供参考。

本研究结果发现芹菜子中的活性成分多与多个靶点蛋白作用，其中度值前三的活性成分分别为芹菜素、秦皮乙素和正丁基苯酞。芹菜素可用于抗肿瘤、心脑血管保护和抗菌等<sup>[27]</sup>，秦皮乙素主要用于平喘和抗菌<sup>[28]</sup>，正丁基苯酞主要用于治疗脑血管疾病<sup>[29]</sup>，这3个活性成分可能在芹菜子

的药理作用中起到较为核心的作用。芹菜子活性成分抗肝纤维化作用的关键靶点包括基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)和TGF-β1等。当肝脏受损产生炎症逐步发展为肝纤维化时，HSCs被激活并转化为成肌纤维细胞，通过调节MMP和TIMP的表达，I型胶原、III型胶原和IV型胶原等ECM合成并释放，导致ECM合成与降解失衡，使得ECM过度沉积，产生大量炎症细胞和因子共同促进肝纤维化形成<sup>[30-31]</sup>。目前PDGF被认为是HSCs最强的丝裂原，当肝脏组织受损后，PDGF诱导HSCs活化和增殖，促使HSCs内细胞骨架分布发生巨大改变，使之逐渐转化为成肌纤维细胞，HSCs聚集于肝组织炎症区域并合成大量的ECM沉积于肝脏组织，促进肝纤维化的发生与发展<sup>[32-34]</sup>。TGF-β1是目前公认致纤维化能力最强的细胞因子，是具多种生物学功能的TGF-β超家族成员，它主要通过诱导HSCs活化，促进ECM合成及抑制其降解，促进肝纤维化的形成与发展<sup>[35]</sup>。在肝炎-肝硬化-肝癌的发

展过程中, TGF- $\beta$ 1 从最初的 HSCs 活化、炎症和纤维化的形成到肝癌病变细胞形成的每个阶段都发挥着至关重要的调节作用<sup>[36-37]</sup>。

为进一步挖掘芹菜子活性成分抗肝纤维化调节的生物通路, 本研究对关键靶蛋白进行 KEGG 通路富集分析, 结果显示芹菜子活性成分主要参与 TGF- $\beta$ 、NF- $\kappa$ B 和 PI3K/AKT 等信号通路改善肝纤维化病理过程。

TGF- $\beta$ /Smads 信号通路介导了 TGF- $\beta$  信号在体内的传导, TGF- $\beta$  是 TGF- $\beta$  超家族特异性受体信使蛋白分子 Smad 蛋白的启动子。TGF- $\beta$  分别与 II 型受体和 I 型受体结合, 配体与受体的结合使 II 型受体和 I 型受体发生磷酸化而被激活; TGF- $\beta$  RI 活化后促使 Smad2 和 Smad3 磷酸化而与受体分离, Smad4 与之结合生成 Smad 复合物随后进入细胞核; 目的基因 DNA 与进入细胞核的 Smad 结合在一起共同调节目的基因的表达; 最终活化的 Smad2 和 Smad3 在磷酸酶催化下脱磷酸失去活性, 通过蛋白降解酶的作用和泛素化使 Smad 蛋白失去活性, 从而中止信号的传导<sup>[38-39]</sup>。TGF- $\beta$ /Smads 信号通路介导了 TGF- $\beta$  信号从细胞膜进入细胞核从而发挥中介作用, 与活性氧簇和 PDGF 等细胞因子共同激活 HSCs, 促使 HSCs 增殖, 改变 HSCs 内细胞骨架分布, 使之逐渐转化为成肌纤维细胞, 导致 ECM 合成与降解失衡并大量沉积于肝细胞间, 最终导致肝纤维化的发生<sup>[40]</sup>。

NF- $\kappa$ B 是各种炎症因子发挥促炎反应促使纤维化形成的共同信号通路, 其调控产物的过度表达在慢性肝脏炎症及肝纤维化的发展中发挥重要作用<sup>[41]</sup>。TNF- $\alpha$  诱导 HSCs 活化, 导致 HSCs 大量增殖, 同时 NF- $\kappa$ B 活性明显提高, NF- $\kappa$ B 调控的下游因子合成分泌也随之增加<sup>[42]</sup>, 由此可见 HSCs 活化及 NF- $\kappa$ B 活性增强是肝纤维化发生发展的重要环节。肝纤维化导致的 NF- $\kappa$ B 活性增强可加速肝脏炎症反应, 促使炎症因子诱导中性粒细胞损伤正常肝细胞, 从而使肝损伤及肝纤维化程度加重<sup>[43]</sup>。

PI3K/AKT 信号通路在与肝纤维化进程密切相关的细胞增殖、活化、分化、转移和凋亡过程中发挥着重要作用, PI3K/AKT 通路抑制剂可明显抑制肝纤维化的发生与发展<sup>[44]</sup>。PI3K/AKT 信号通路中活化的 AKT 可以上调特异性周期蛋白 D1, 下调 p53 促进细胞生长和增殖; 上调 FOXO1 和 NF- $\kappa$ B, 下

调 BAD 阻止细胞凋亡<sup>[45]</sup>。此外, 活化的 AKT 可以抑制 RhoA、Rac1 和 GSK3 $\beta$  的表达, 激活 NF- $\kappa$ B 促进 Snail1/2 蛋白的表达, 抑制肝纤维化的形成<sup>[46]</sup>。PI3K/AKT 通路抑制剂还可以通过诱导 Smad3 活化促进细胞凋亡及其周期停滞, 从而阻止肝纤维化向肝癌发展。

肝纤维化是各种信号通路及细胞因子共同参与的病理生理过程, 因此单靶点、单通路治疗很难起效, 唯有多靶点、多通路治疗的药物才有可能逆转肝纤维化。本研究结果显示芹菜子活性成分主要通过 TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 和 PI3K/AKT 等信号通路逆转肝纤维化, 与目前肝纤维化相关重要细胞因子及信号通路研究结果几乎一致, 表明芹菜子活性成分具有多靶点、多通路抗肝纤维化的潜能。

但是本研究所得到的结果仍然存在一定的局限性。本研究是完全依托于数据库, 通过数据挖掘对芹菜子活性成分的功能和作用机制进行预测, 而通过现有数据库收集得到的活性成分并没有含量信息, 而要发挥疗效, 必须达到一定的血药浓度, 即活性成分未必是药效成分, 若要将得出的结论应用于临床, 尚需要在药理实验研究中进一步证实; 化合物口服生物利用度和类药性的筛选本身也存在着限制, 药物在人体的吸收利用不仅仅局限于口服, 例如红景天注射液已在临幊上广泛使用, 因此在以后的新药预测和开发中还需要重视口服利用度较低的成分, 可能有更广泛的潜在治疗作用。故本研究仅为进一步药理实验及机制研究提供思考方向。

## REFERENCES

- [1] XU D D, LI X F, LI Y H, et al. TIPE2 attenuates liver fibrosis by reversing the activated hepatic stellate cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(1): 199-206.
- [2] HIGASHI T, FRIEDMAN S L, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017(121): 27-42.
- [3] LI M, HONG W X, HAO C Z, et al. Hepatic stellate cell-specific deletion of SIRT1 exacerbates liver fibrosis in mice[J]. Biochim et Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis, 2017, 1863(12): 3202-3211.
- [4] LI M, HONG W X, HAO C Z, et al. SIRT1 antagonizes liver fibrosis by blocking hepatic stellate cell activation in mice[J]. FASEB J, 2018, 32(1): 500-511.
- [5] HU Z T, QIN F, GAO S L, et al. Paeoniflorin exerts protective effect on radiation-induced hepatic fibrosis in rats via

- TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(3): 1012-1021.
- [6] BELLAN M, CASTELLO L M, PIRISI M. Candidate biomarkers of liver fibrosis: A concise, pathophysiology-oriented review[J]. J Clin Transl Hepatol, 2018, 6(3): 1-9.
- [7] NALLAGANGULA K S, NAGARAJ S K, VENKATASWAMY L, et al. Liver fibrosis: A compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression[J]. Futur Sci OA, 2018, 4(1): FSO250. Doi: 10.4155/fsoa-2017-0083.
- [8] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1985, 55(2): 6-9.
- [9] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1998: 141.
- [10] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 维吾尔药材标准[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993.
- [11] LIU X, MA T, GAO D, et al. Research progress on the medicinal value of *Apium graveolens* L.[J]. J Gansu Coll TCM (甘肃中医药大学学报), 2015, 32(2): 74-77.
- [12] LYU J L, MOU X L, WANG W B, et al. Studies on chemical constituents of seeds of *Apium graveolens* L[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2006, 17(1): 6-7.
- [13] SOWBHAGYA H B, SRINIVAS P, KRISHNAMURTHY N. Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds [J]. Food Chem, 2010, 120(1): 230-234.
- [14] POWANDA M C, WHITEHOUSE M W, RAINSFORD K D. Celery seed and related extracts with antiarthritic, antiulcer, and antimicrobial activities[J]. Prog Drug Res, 2015(70): 133-153.
- [15] ZHAO J, WANG L, LI L, et al. Protective effect and mechanisms of apigenin against free radical-induced DNA damage[J]. Food Sci(食品科学), 2011, 32(13): 1-4.
- [16] LIU T, LIU F G, XIE H Q, et al. Phytopathogenic fungal inhibitors from celery seeds[J]. Nat Prod Commun, 2012, 7(7): 889-890.
- [17] TASHAKORI-SABZEVAR F, RAMEZANI M, HOSSEINZADEH H, et al. Protective and hypoglycemic effects of celery seed on streptozotocin-induced diabetic rats: Experimental and histopathological evaluation[J]. Acta Diabetol, 2016, 53(4): 609-619.
- [18] ZHANG X C, CHENG X, HU J Q, et al. Improvement of dl-3-n-butylphthalide on behavioral of rats with cerebral ischemia induced by endothelin[J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2018, 33(7): 1561-1565.
- [19] HE W, HU Z. Chinese herbal extract dl-3n-butylphth-alide a commonly use drug for the treatment of ischemic stroke as a novel therapeutic approach to treat for neurodegenerative disease[J]. Neu Reg Res, 2015, 22(5): 273-278.
- [20] CUI Y M, LI C H, ZENG C, et al. Tongmai Yangxin pills anti-oxidative stress alleviates cisplatin-induced cardiotoxicity: Network pharmacology analysis and experimental evidence[J]. Biomed Pharmacother, 2018(108): 1081-1089.
- [21] CHEN C, MA X, MAN G F, et al. New trends in research and development of combination medicine-modern medicine[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2017, 18(14): 310-312.
- [22] HUANG R F, TANG Q, LYU B. Study on the underlying mechanism of Baoshen Paidu decoction in sepsis and acute kidney injury treatment based on network pharmacology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(21): 2657-2665.
- [23] LIU C J, YANG L H, YU S C. Study on network pharmacology of the main active ingredients of Jiao-ai Tang for the treatment of uterine diseases[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(17): 2136-2143.
- [24] QIAO M, YANG J H, ZHAO Y, et al. Anti-liver fibrosis screening of active ingredients from *Apium graveolens* L. seeds via GC-TOF-MS and UHPLC-MS/MS[J]. Evid Based Comp Alternat Med, 2020(8): 1-12. Doi:10.1155/2020/8321732.
- [25] 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): 21146.
- [26] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [27] WANG F, LIU J C, ZHOU R J, et al. Apigenin protects against alcohol-induced liver injury in mice by regulating hepatic CYP2E1-mediated oxidative stress and PPAR $\alpha$ -mediated lipogenic gene expression[J]. Chem Biol Interactions, 2017(275): 171-177.
- [28] LEE J, YANG J, JEON J, et al. Hepatoprotective effect of esculetin on ethanol-induced liver injury in human HepG2 cells and C57BL/6J mice[J]. J Funct Foods, 2018(40): 536-543.
- [29] CHEN Y H, JIANG M J, LI L, et al. DL-3-n-butylphthalide reduces microglial activation in lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease model mice[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 3884-3890.
- [30] NAIM A, PAN Q W, BAIG M S. Matrix metalloproteinases (MMPs) in liver diseases[J]. J Clin Exp Hepatol, 2017, 7(4): 367-372.
- [31] LOUKA M L, RAMZY M M. Involvement of fibroblast-specific protein 1 (S100A4) and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in CCl<sub>4</sub>-induced reversible liver fibrosis[J]. Gene, 2016, 579(1): 29-33.
- [32] PARK H J, KIM H G, WANK J H, et al. Comparison of TGF-beta, PDGF and CTGF in hepatic fibrosis models using DMN, CCl<sub>4</sub> and TAA[J]. Drug Chem Toxicol, 2016, 39(1): 111-118.
- [33] WANG X Q, WU X F, ZHANG A H, et al. Targeting the PDGF-B/PDGFR- $\beta$  interface with destruxin A5 to selectively block PDGF-BB/PDGFR- $\beta\beta$  signaling and attenuate liver fibrosis[J]. EBioMedicine, 2016(7): 146-156.
- [34] VAN DIJK F, TEEKAMP N, BELJAARS L, et al. Pharmacokinetics of a sustained release formulation of PDGF  $\beta$ -receptor directed carrier proteins to target the fibrotic liver [J]. J Control Release, 2018(2690): 258-265.

- [35] KEMPINSKI R, NEUBAUER K, PONIEWIERKA E, et al. The immunoreactivity of TGF- $\beta$ 1 in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Folia Histochem et Cytopiol*, 2019, 57(2): 74-83.
- [36] DAL N E, AFAGH A, KANIT N, et al. TGF- $\beta$ 1 promotes cell migration in hepatocellular carcinoma by suppressing REELIN expression[J]. *Gene*, 2020(724): 143923.
- [37] LI J, WANG Y H, MA M Z, et al. Autocrine CTHRC1 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis by activating TGF- $\beta$  signaling[J]. *EBioMedicine*, 2019(40): 43-55.
- [38] DAI J Y, XU M C, ZHANG X R, et al. Bi-directional regulation of TGF- $\beta$ /Smad pathway by arsenic: A systemic review and meta-analysis of *in vivo* and *in vitro* studies[J]. *Life Sci*, 2019(220): 92-105.
- [39] DONG Z C, GAO Q, GUO H. Glaucomalyxin A attenuates the activation of hepatic stellate cells through the TGF- $\beta$ 1/smad signaling pathway[J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37(3): 227-232.
- [40] LIN I Y, CHIOU Y S, WU L C, et al. CCM111 prevents hepatic fibrosis via cooperative inhibition of TGF- $\beta$ , Wnt and STAT3 signaling pathways[J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27(1): 184-194.
- [41] SUN H T, CHEN G X, WEN B, et al. Oligo-peptide I-C-F-6 inhibits hepatic stellate cell activation and ameliorates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by suppressing NF- $\kappa$ B signaling and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 136(3): 133-141.
- [42] CHEN Y X, ZHAO C, LIU X M, et al. Plumbagin ameliorates liver fibrosis via a ROS-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019(116): 108923. Doi: 10.1155/2015/624037.
- [43] YANG J F, LIU Q X, CAO S Y, et al. MicroRNA-145 increases the apoptosis of activated hepatic stellate cells induced by TRAIL through NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2017(8): 980. Doi: 10.3389/fphar.2017.00980.
- [44] ZUO L Q, ZHU Y Q, HU L L, et al. PI<sub>3</sub>-kinase/Akt pathway-regulated membrane transportation of acid-sensing ion channel 1a/Calcium ion influx/endoplasmic reticulum stress activation on PDGF-induced HSC Activation[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 3940-3950.
- [45] XU A J, LI Y M, ZHAO W S, et al. PHP14 regulates hepatic stellate cells migration in liver fibrosis via mediating TGF- $\beta$ 1 signaling to PI3K $\gamma$ /AKT/Rac1 pathway[J]. *J Mol Med*, 2018, 96(2): 119-133.
- [46] TU W, YE J, WANG Z J. Embryonic liver fordin is involved in glucose glycolysis of hepatic stellate cell by regulating PI3K/Akt signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(38): 8519-8527.

收稿日期：2020-02-27  
(本文责编：李艳芳)