

桂枝加桂汤治疗免疫性肝损伤的作用机制研究

胡存杨¹, 刘研展², 张祺莲³, 孙芳¹, 姚静^{1*}

¹济宁医学院基础医学院, 山东 济宁

²天津医科大学总医院胸部肿瘤中心肺部肿瘤外科, 天津

³山东第一医科大学附属人民医院病理科, 山东 济南

收稿日期: 2026年2月5日; 录用日期: 2026年2月27日; 发布日期: 2026年3月10日

摘要

目的: 基于网络药理学、分子对接和细胞体外实验探究桂枝加桂汤治疗免疫性肝损伤(immune liver injury, ILI)的作用机制。方法: 通过ETCM检索桂枝加桂汤中的活性成分, 利用Pubchem、Swiss Target数据库预测成分的作用靶点; 采用Genecards、OMIM数据库获取ILI疾病相关靶点; 绘制韦恩图并获取交集靶点; 使用String平台构建“药物-疾病”共同靶点的蛋白互作网络, 分析网络并筛选出关键靶点; 利用Metascape平台对交集靶点开展GO功能注释与KEGG通路富集分析; 采用Cytoscape3.9.0软件构建“成分-靶点-通路”网络, 并筛选出关键活性成分; 采用分子对接进行验证。用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠腹腔巨噬细胞构造炎症模型, 设置空白对照组、LPS模型组($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、LPS + 10-姜酚组($15.625 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)探究重要活性成分10-姜酚的抗炎效果。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测巨噬细胞上清中炎症因子IL-6、IL-1 β 及TNF- α 的水平。结果: 获得200个活性成分和69个交集靶点, GO分析得到1908个条目; 通路富集结果显示, 54条显著富集的通路主要与PPAR、AMPK、JAK-STAT等信号传导途径相关; 获得关键活性成分有10-姜酚、6-姜酚、6-姜烯酚等, 重要靶点基因有AKT1、TNF、ESR1等; 分子对接显示重要活性成分与重要靶点基因结合活性较好。体外实验显示, 与LPS组相比, 10-姜酚组细胞上清中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量显著减少。结论: 桂枝加桂汤可能通过10-姜酚、6-姜酚、6-姜烯酚等化学成分作用于AKT1、TNF、ESR1等靶点基因, 进而调控PPAR信号通路、AMPK信号通路、JAK-STAT信号通路等通路, 发挥治疗ILI的作用。

关键词

桂枝加桂汤, 免疫性肝损伤, 10-姜酚, 网络药理学, 分子对接

Study on Therapeutic Mechanism of Guizhi Jiagui Decoction against Immune Liver Injury

Cunyang Hu¹, Yanzhan Liu², Qilian Zhang³, Fang Sun¹, Jing Yao^{1*}

*通讯作者。

文章引用: 胡存杨, 刘研展, 张祺莲, 孙芳, 姚静. 桂枝加桂汤治疗免疫性肝损伤的作用机制研究[J]. 临床医学进展, 2026, 16(3): 1577-1589. DOI: 10.12677/acm.2026.163941

¹School of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining Shandong

²Department of Lung Cancer Surgery, Center of Thoracic Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin

³Department of Pathology, The People's Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan Shandong

Received: February 5, 2026; accepted: February 27, 2026; published: March 10, 2026

Abstract

Objective: To investigate the mechanism of Guizhi Jiagui Decoction in the treatment of immune liver injury (ILI) using network pharmacology, molecular docking, and *in vitro* cell experiments. **Methods:** Active components screened from the ETCM database for Guizhi Jiagui Decoction had their targets mapped using PubChem and Swiss Target Prediction, while disease targets for ILI were collated from GeneCards and OMIM. A Venn diagram was constructed to identify common targets. A protein-protein interaction (PPI) network of the common targets was built using the STRING platform and analyzed to identify key targets. GO and KEGG enrichment analyses of the overlapping targets were performed via the Metascape platform. To visualize and prioritize important active ingredients, a “component-target-pathway” interaction network was visualized with Cytoscape 3.9.0. To further assess the predicted interactions, the binding stability of key components to core targets was examined via molecular docking. For *in vitro* validation, lipopolysaccharide (LPS) was used to induce an inflammatory state in mouse peritoneal macrophages, establishing the experimental model. The experimental groups included a blank control group, an LPS model group ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), and an LPS + 10-gingerol group ($15.625 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). ELISA was employed to detect the levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the macrophage culture supernatant. **Results:** A total of 200 active ingredients and 69 common targets were identified. GO enrichment analysis yielded 1908 entries, and KEGG analysis revealed 54 significantly enriched pathways, primarily involving PPAR, AMPK, JAK-STAT, and related signaling pathways. Key active components included 10-gingerol, 6-gingerol, and 6-shogaol, while important target genes included *AKT1*, *TNF*, and *ESR1*. The docking simulations demonstrated favorable binding interactions between the primary active constituents and the central targets. *In vitro* experiments demonstrated that, compared with the LPS group, the 10-gingerol treatment group exhibited significantly reduced levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the cell supernatant. **Conclusion:** Guizhi Jiagui Decoction may exert therapeutic effects against ILI by targeting genes such as *AKT1*, *TNF*, and *ESR1* via active components including 10-gingerol, 6-gingerol, and 6-shogaol, thereby modulating PPAR, AMPK, JAK-STAT, and other related pathways.

Keywords

Guizhi Jiagui Decoction, Immune Liver Injury, 10-Gingerol, Network Pharmacology, Molecular Docking

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝脏是人体最大的实质性器官，是重要的能量调节枢纽，具有产生胆汁、储存糖原和过滤有害物质的重要作用[1]。免疫性肝损伤(immune liver injury, ILI)是一种常见的由免疫应答介导的自身免疫性疾病，

其主要特征是肝脏组织中有大量的炎症细胞, 炎症因子和转氨酶水平显著升高。ILI 是导致肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝脏肿瘤的重要因素之一, 决定着疾病的转归或发生发展[2]。当前 ILI 的西医主要疗法(如糖皮质激素、免疫抑制剂)因长期毒副作用及易复发等问题, 致使患者临床获益受限。由此可见, 发展安全有效的新型疗法对于改善 ILI 预后至关重要。

中医古籍中对免疫性肝损伤病名并无记载, 因其临床特征以上腹部不适、胁肋隐痛、身目黄染及神疲乏力为主, 故常从“肝郁”、“胁痛”、“虚劳”、“黄疸”等病证进行论治, 中医认为其发病机理与“湿热疫毒、瘀、痰、虚”有关, 是湿热疫毒在人体正气不足基础上侵于血分所致。中医治疗多采用疏肝理气、清热解毒、活血化瘀、健脾益肾的方法[3]。

首载于《伤寒论》的桂枝加桂汤, 是张仲景为治疗奔豚证而设。本方配伍如下: 桂枝(去皮, 五两)、芍药(三两)、生姜(切, 三两)、炙甘草(二两)及大枣(擘, 十二枚)。研究认为, 心阳不振是奔豚气发生的关键。方中以桂枝为君, 禀温通助阳之效, 不仅能益心阳、助肝阳、运脾阳以斡旋中焦, 更能布散阳气于周身, 尤擅推动心肝阳气之生发。心阳复则脏腑气化恢复常度, 冲逆之气自平[4]。

网络药理学以系统和生物网络的整体视角为核心, 与中药治疗疾病的整体观、辨证理论相契合, 广泛用于中药潜在靶点的挖掘和具体治疗机制的阐述, 为研究中药复杂体系拓展了思路[1]。分子对接是在此基础上预测蛋白和配体亲和力和结合模式的工具, 在分子层面对药物成分与疾病靶点的相互作用关系及机制作进一步探索和验证。

本研究结合了网络药理学、分子对接和体外细胞炎症模型, 以探究桂枝加桂汤治疗 ILI 为核心, 较为系统地探索桂枝加桂汤有效成分治疗 ILI 的关键靶点蛋白。并在细胞水平上对桂枝加桂汤中的关键活性成分 10-姜酚的抗炎作用进行探索, 揭示了桂枝加桂汤可能的有效成分和潜在作用机制, 为桂枝加桂汤的进一步开发应用提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

本研究使用雄性昆明小鼠, 周龄为 6~8 周, 体重范围 18~22 克, 所有动物均达到 SPF 级标准, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 所有动物实验均获得济宁医学院动物伦理委员会(JNMC-2023-DW-145)的批准; 10-姜酚(纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司; 液体硫乙醇酸盐培养基、Tris-NH₄Cl 及二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购于北京索莱宝科技有限公司; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)来源于美国 Sigma-Aldrich 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)由杭州四季青生物有限公司供应; RPMI-1640 培养基和磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)购自德国 Boehringer-Ingelheim 公司; CCK-8 购自上海碧云天生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国 Biolegend 公司。

2.2. 仪器

5810R 台式高速离心机(Eppendorf 公司); D1008 低速离心机(DLAB 公司); HZK-FA210 电子分析天平(华志天平有限公司); Ti-U 荧光倒置显微镜(Nikon 公司); Research plus 移液枪(Eppendorf 公司)。

2.3. 网络药理学与分子对接

2.3.1. 桂枝加桂汤活性成分和相关靶点筛选

本研究通过中医药百科全书数据库(encyclopedia of traditional Chinese medicine, ETCM) [5]获取桂枝

加桂汤全方(桂枝、芍药、生姜、甘草、大枣)的化学成分信息,并进一步结合相关文献进行数据补充与筛选。随后,利用 Pubchem 数据库检索各化学成分的 SMILES 结构式与二维结构,将其导入 Swiss ADME 平台进行类药性评价。筛选条件设定为:胃肠吸收等级为“高”,且 Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge 五条类药性规则中至少满足两项[6],符合上述条件的成分被认定为活性化合物。进一步采用 Swiss Target Prediction 数据库对活性成分的作用靶点进行预测[7],限定物种为“人源”,并以置信度大于 0.4 为阈值筛选潜在靶点。将所有预测靶点经过去重处理后,提交至 Universal Protein (Uniprot)数据库进行基因名称标准化校正[8],最终确立桂枝加桂汤的药物相关靶点集。

2.3.2. ILI 疾病靶点筛选

为获取免疫性肝损伤的相关疾病靶点,本研究整合了 Genecards 与在线人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)两大数据库资源,以“immune liver injury”为统一检索词,在上述平台中进行系统检索。初步获取的靶点列表经过合并与去重处理后,进一步借助 UniProt 数据库对基因名称进行统一规范化校正,最终建立起本研究所需的 ILI 疾病相关靶点集。

2.3.3. “药物-疾病”交集靶点的获取及关键靶点蛋白互作(Protein Protein Interaction, PPI)网络构建

通过 VENN2.1 在线作图工具平台将桂枝加桂汤活性成分相关靶点及 ILI 相关靶点进行交集,获得“药物-疾病”交集靶点,并绘制韦恩图进行可视化。应用 String11.5 数据库对“药物-疾病”共同靶点进行分析,物种选择“Homo sapiens”,设置 highest confidence > 0.4,并隐藏网络中断开连接的节点,得到 PPI 网络。将 PPI 网络的 TSV 文件导入 Cytoscape3.9.0 软件,根据网络拓扑学分析结果进行筛选,即获得桂枝加桂汤活性成分治疗 ILI 的关键靶点。

2.3.4. 基因本体(Gene Ontology, GO)生物功能分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析

将筛选得到的药物与疾病交集靶点提交至 Metascape 平台,分别进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析,筛选标准设置为 $P < 0.01$,富集分析所得结果进一步通过微生信平台完成可视化呈现。

2.3.5. “中药-药物成分-靶点-信号通路”网络的构建

将“桂枝加桂汤的活性成分”、“桂枝加桂汤治疗 ILI 的作用靶点”以及“KEGG 富集通路”导入 Cytoscape3.9.0 软件构建“中药-药物成分-靶点-信号通路”网络图,并利用网络分析仪(Network Analyzer)功能对网络进行分析,根据分析结果并结合文献获得桂枝加桂汤发挥治疗 ILI 作用的重要活性成分。

2.3.6. 分子对接验证

为验证潜在活性成分的作用机制,选取前期筛选所得 10 个重要活性成分与 10 个核心靶点,利用分子对接技术模拟其相互作用,评估成分与靶点的结合效能,从而对其潜在有效性进行初步验证。从 PDB 数据库获得核心靶蛋白的 PDB 格式文件,从 PubChem 平台下载重要活性成分的 SDF 格式文件,利用 DockThor 将靶蛋白与化合物进行分子对接,将对接结果绘制成热图,并使用 Autodock 软件进行可视化展示。

2.4. 探究关键活性成分 10-姜酚的抗炎作用

2.4.1. 小鼠腹腔巨噬细胞的培养

参照以往文献报道[9][10],每只小鼠腹腔注射 2 mL 3%的液体硫乙醇酸盐培养基,刺激 72 h 后处死,用 75%乙醇浸泡 3 min 后放入无菌超净台中操作,在小鼠下腹部剪一切口,暴露腹膜,向腹腔中注射 5

mL 预冷的 PBS 冲洗, 充分揉捏腹部 5 min 后用针管吸取灌洗液到离心管中, 重复 3 次, 灌洗液以 1500 r/min 的转速离心 5 min, 离心后每管加入 1 mL Tris-NH₄Cl, 静置 5 min, 再次离心 5 min, 弃上清, 重复直至红细胞全部裂解。最后用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞, 得到小鼠腹腔巨噬细胞。

2.4.2. 巨噬细胞活力测定

将小鼠腹腔巨噬细胞计数后, 接种到 96 孔板中, 每孔 4×10^4 个, 贴壁培养后, 设置空白组(不接种细胞)、对照组及不同浓度(250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.953125 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)的 10-姜酚溶液给药组, 每组 6 个复孔, 给药 24 h 后, 每孔加入含 10% CCK-8 溶液的完全培养基 100 μL 培养 2 h 后, 使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度。计算细胞存活率, 细胞存活率(%) = $(A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$, 上述试验重复 3 次。

2.4.3. 巨噬细胞上清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量测定

将小鼠腹腔巨噬细胞接种于 24 孔板, 每孔 2.5×10^5 个细胞, 贴壁培养后, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 设置空白组、LPS 模型组($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、LPS ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) + 10-姜酚给药组($15.625 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 共同处理 24 h 后收集细胞上清液, 用 ELISA 法测定上清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

2.4.4. 数据统计与分析

使用 GraphPad Prism 软件对数据进行统计学分析。独立样本 *t* 检验进行两组间均数比较; 单因素方差分析用于多组间比较, 所有实验均相同条件重复三次。*P* 值 < 0.05 被认为具有统计学意义。

3. 结果

为系统阐明桂枝加桂汤治疗 ILI 的潜在作用机制, 本研究采取了整合网络药理学预测与体外实验验证的研究策略, 整体技术路线如图 1 所示。

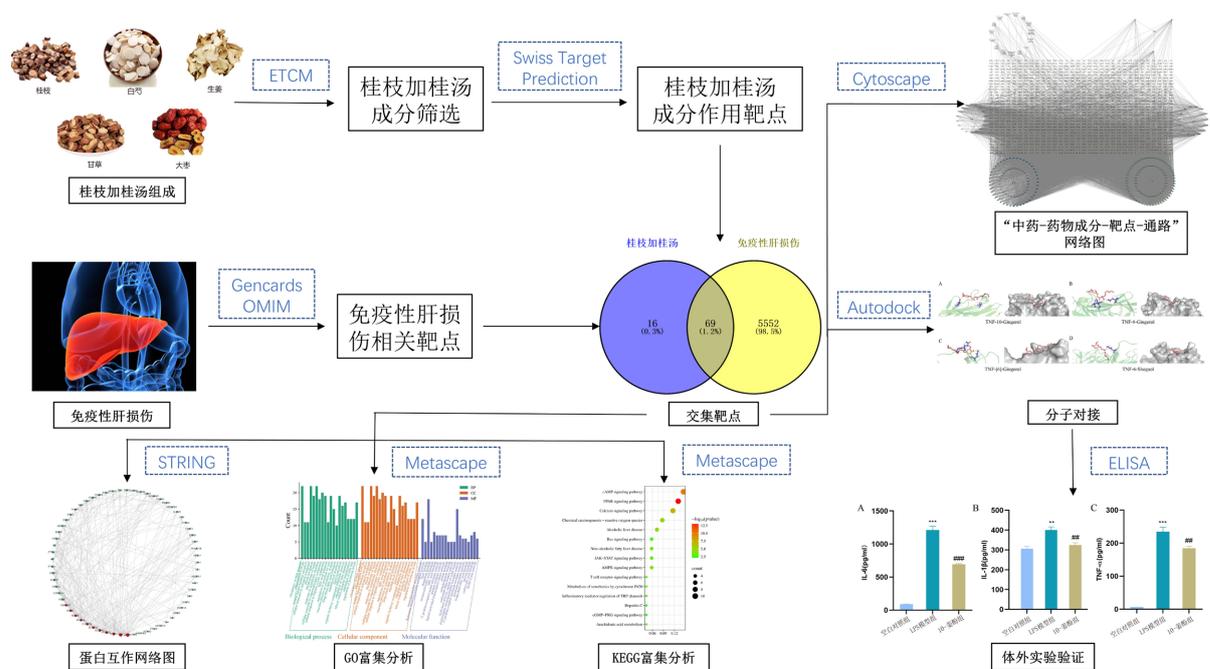


Figure 1. Guizhi Jiagui Decoction in the treatment of immune liver injury: An analytical process

图 1. 桂枝加桂汤治疗免疫性肝损伤的分析流程

3.1. 桂枝加桂汤活性成分及相关靶点

通过 ETCM 数据库、Swiss ADME 数据库,并结合文献检索筛选后,得到 200 个桂枝加桂汤活性成分,其中桂枝 3 个、芍药 15 个、生姜 74 个、甘草 90 个、大枣 18 个,最终得到 10-姜酚、6-姜酚、6-姜烯酚等 200 个桂枝加桂汤活性成分。运用 Swiss Target Prediction 数据库预测药物的作用靶点,筛选置信度(probability)>0.4 的靶点,其中桂枝 13 个、芍药 21 个、生姜 2 个、甘草 31 个、大枣 51 个,删除重复靶点后,共得到桂枝加桂汤活性成分相关靶点 86 个。

3.2. ILI 疾病靶点

以“immune liver injury”为关键词,在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中检索,最终得到 5621 个 ILI 相关靶点。

3.3. “药物 - 疾病”共同靶点及 PPI 网络

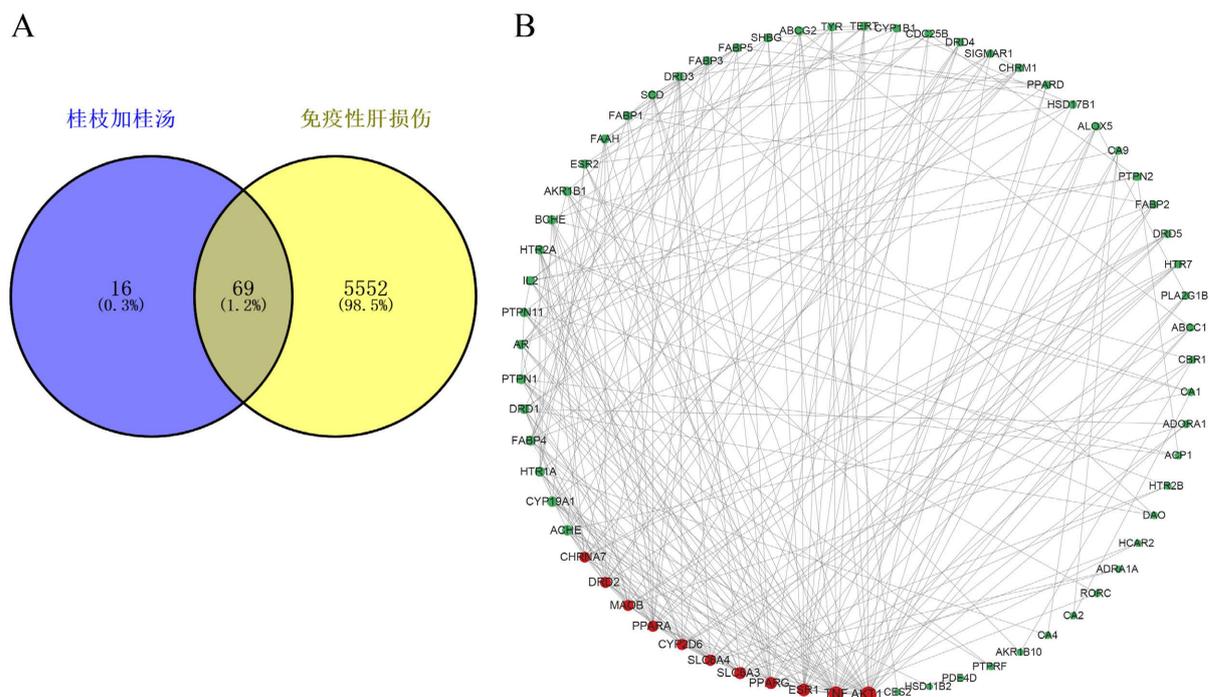


Figure 2. Common targets and protein-protein interaction network of Guizhi Jiagui Decoction in the treatment of immune liver injury (A) Venn diagram of common targets between Guizhi Jiagui Decoction and immune liver injury; (B) Protein-protein interaction network of the common targets

图 2. 桂枝加桂汤治疗免疫性肝损伤共同靶点和蛋白相互作用关系 图(A) “桂枝加桂汤 - 免疫性肝损伤”共同靶点 Venn 图; 图(B) “桂枝加桂汤 - 免疫性肝损伤”共同靶点相互作用关系

Table 1. The result of primary target network topology analysis

表 1. 主要作用靶点网络拓扑学分析结果

靶点基因	degree 值	介度	接近中心性
AKT1	30	1142.863683	0.01010101
TNF	26	591.502221	0.008849558
ESR1	19	464.0238313	0.008695652

续表

<i>SLC6A3</i>	17	354.6140227	0.008196721
<i>PPARG</i>	17	191.6148583	0.007874016
<i>SLC6A4</i>	15	160.972876	0.007407407
<i>CYP2D6</i>	14	240.5853932	0.007692308
<i>DRD2</i>	14	192.4137474	0.007874016
<i>MAOB</i>	14	65.58615519	0.006802721
<i>PPARA</i>	14	135.9643383	0.007874016
<i>CHRNA7</i>	13	136.0760441	0.007633588

使用 VENNY 2.1 在线工具对活性成分靶点与疾病靶点进行交集分析，绘制韦恩图(图 2(A))，共获得 69 个“药物-疾病”共同靶点。在此基础上，借助 STRING 11.5 数据库构建蛋白质相互作用网络，该网络包含 69 个节点和 257 条相互作用边。进一步将网络数据导入 Cytoscape 3.9.0 软件进行拓扑分析(图 2(B))，结果显示，*AKT1* 在网络中具有最高的节点度值(Degree = 30)，其介数中心性为 1142.86，接近中心性为 0.010(表 1)。

3.4. GO 生物功能和 KEGG 通路富集分析

本研究将 69 个“药物-疾病”共有靶点导入 Metascape 平台，在设定显著性阈值 $P < 0.01$ 的条件下，进行基因本体(GO)功能注释与 KEGG 通路富集分析。结果显示，共获得 1908 条 GO 功能条目，其中涉及生物学过程(BP)921 项、细胞组分(CC)44 项及分子功能(MF)66 项。将排名前 20 的 BP、CC 和 MF 绘制成柱状图进行可视化展示。KEGG 通路富集分析识别出 54 条显著富集的信号通路。为进一步突出关键通路，选取富集显著性排名前 15 位的通路，绘制气泡图实现可视化展示(图 3)。

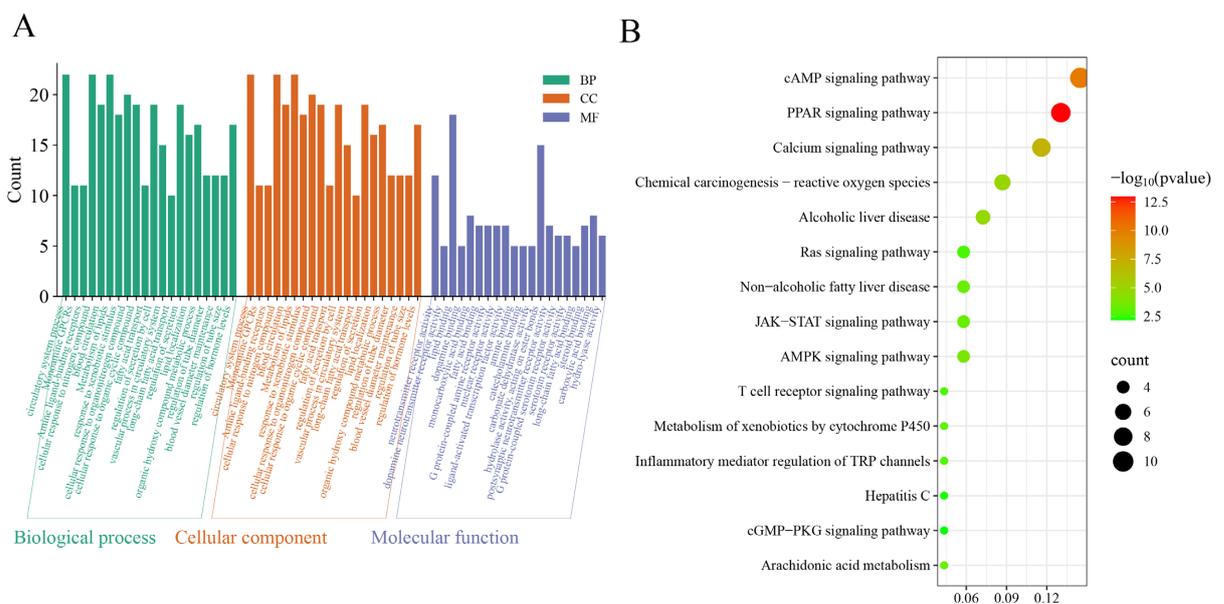
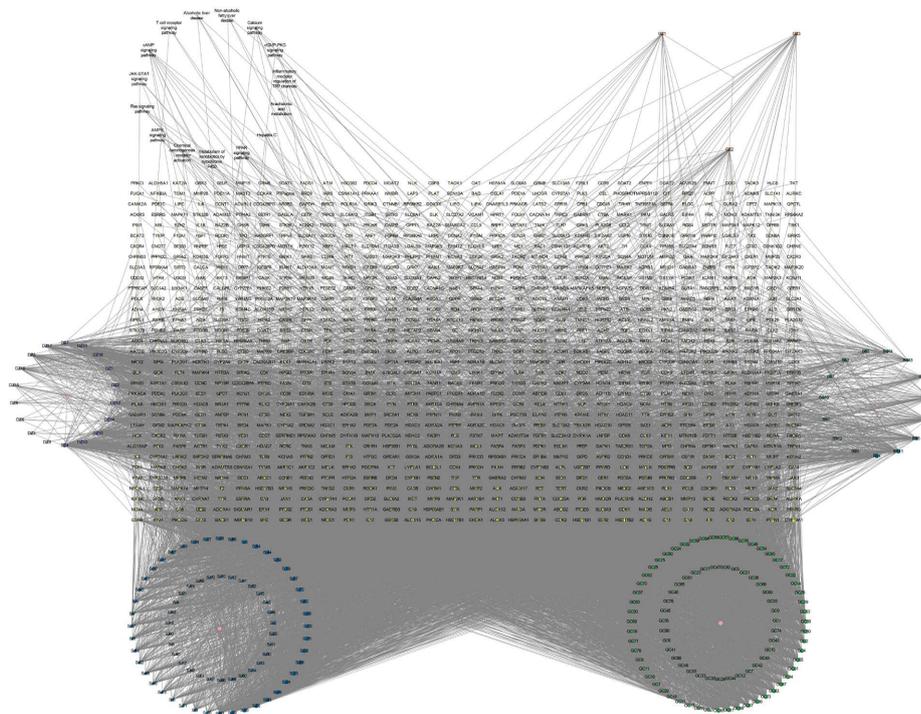


Figure 3. GO and KEGG enrichment analyses of Guizhi Jiagui Decoction in the treatment of immune liver injury. (A) GO functional analysis; (B) KEGG pathway enrichment analysis

图 3. 桂枝加桂汤治疗免疫性肝损伤 GO 和 KEGG 富集分析图。(A) GO 功能分析; 图(B) KEGG 通路富集分析

3.5. “中药 - 药物成分 - 靶点 - 通路”网络的构建和可视化分析

采用 Cytoscape 3.9.0 软件构建如图 4 所示的“中药 - 成分 - 靶点 - 通路”互作网络。该网络包含 1276 个节点与 10,961 个相互关系，其中中药、活性成分、靶点及通路分别以粉色六边形、圆形、菱形及 V 形节点表示。利用 NetworkAnalyzer 插件分析网络拓扑属性，以节点自由度(Degree)作为中心性指标。结合分析结果并检索相关文献，筛选出 10 个重要活性成分(表 2)，其中 degree 值最高的是 6-姜二酮，其 degree 值为 101，介度为 0.013141766，接近中心性为 0.370963049。



注: SJ24: 6-Gingerdione; SJ25: Gingerenone A; SJ28: [6]-Gingerol; SJ29: 10-Gingerol; SJ33: 6-Gingerol; SJ43: Citronellyl Acetate; SJ53: [6]-Gingediol; SJ68: 6-Paradol; SJ72: 8-Gingerol; BS4: Paeonilactone C。

Figure 4. The network diagram of “Drug-active ingredient-disease-target-pathway”
图 4. “中药 - 药物成分 - 靶点 - 通路”网络图

Table 2. The result of network topology analysis of main active ingredients
表 2. 主要活性成分网络拓扑学分析结果

中药	活性成分	degree 值	介度	接近中心性
生姜	6-Gingerdione	101	0.013141766	0.370963049
生姜	Gingerenone A	101	0.01454508	0.366063738
生姜	[6]-Gingerol	101	0.010625695	0.367753101
生姜	10-Gingerol	101	0.013417103	0.367117766
生姜	6-Shogaol	101	0.016158494	0.367541078
生姜	Citronellyl Acetate	101	0.021050379	0.370316584
生姜	[6]-Gingediol	101	0.012151873	0.370531822
生姜	6-Paradol	101	0.013607224	0.37074731
生姜	8-Gingerol	101	0.014113751	0.367117766
芍药	Paeonilactone C	101	0.026252548	0.367117766

3.6. 分子对接

通过 DockThor 将筛选出的 10 个活性成分和 10 个核心靶点蛋白进行分子对接, 数值越小说明结合效果越好, 结合能 ≤ -5.0 kcal/mol 说明蛋白与配体的结合活性良好, 结合能 ≤ -7.0 kcal/mol 说明蛋白与配体的结合活性强烈[11]。对接结果显示, 所有重要活性成分与关键靶点的结合能均 < -5.0 kcal/mol, 且结合能 < -7.0 kcal/mol 的在对接结果中占 84%, 其中 10-姜酚与关键靶点 *TNF* 结合效果最好, 将结果绘制成对接分数热图(图 5), 其中横坐标为桂枝加桂汤中重要活性成分, 纵坐标为关键靶蛋白, 颜色越深代表结合分数越小, 并将效果最好的前四位进行可视化展示(图 6), 靶点蛋白基本信息如表 3 所示。

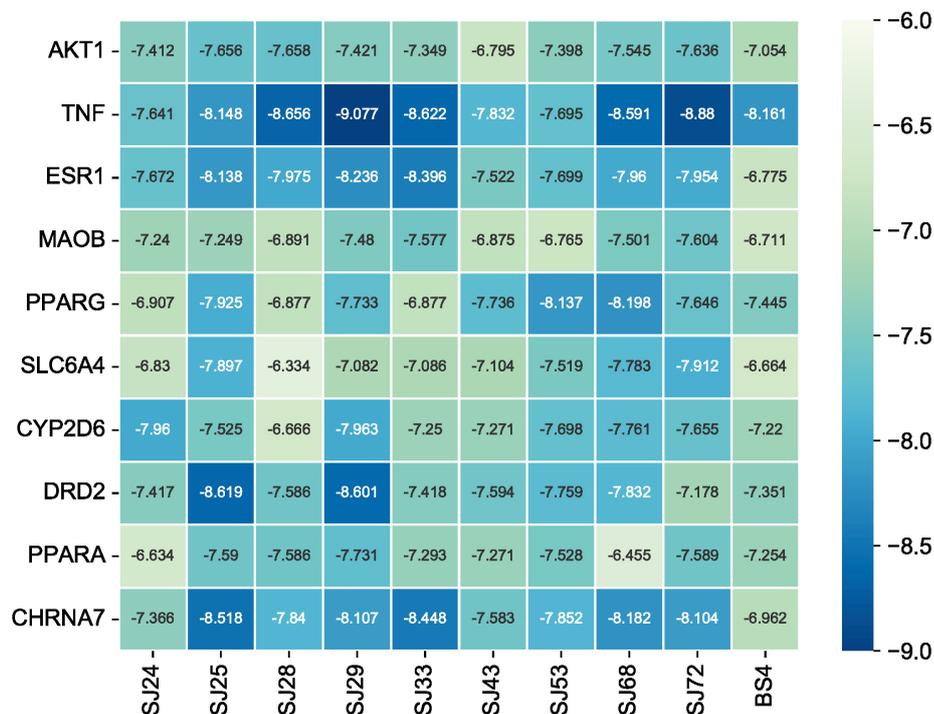
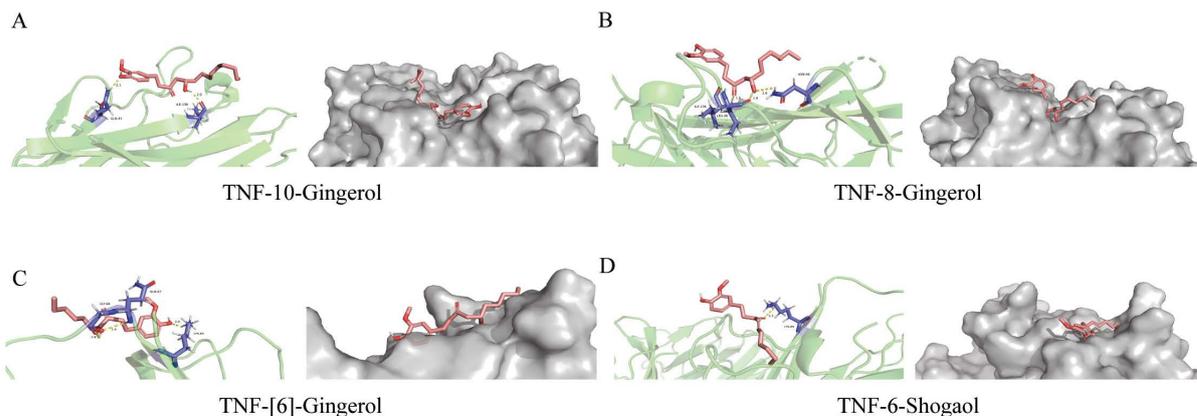


Figure 5. Heat map of docking fraction of important active ingredients and core target in Guizhi Jiagui Decoction
图 5. 桂枝加桂汤重要活性成分与核心靶点对接分数热图



(A) TNF 与 10-姜酚; (B) TNF 与 8-姜酚; (C) TNF 与 6-姜酚; (D) TNF 与 6-姜烯酚。

Figure 6. Molecular docking results

图 6. 分子对接结果

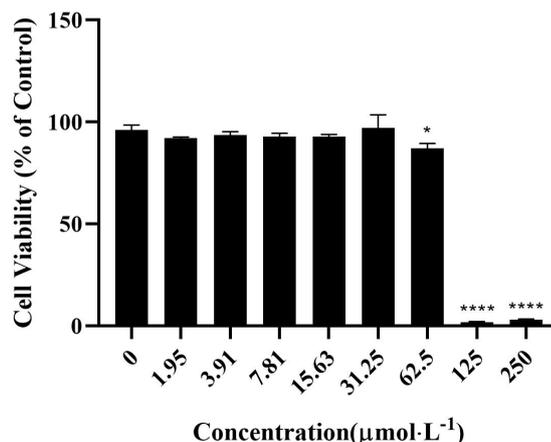
Table 3. Target protein information table**表 3.** 靶蛋白信息表

靶点	PDB-ID
AKT1	6CCY
TNF	5MU8
ESR1	6ZOQ
PPARG	2VV2
SLC6A4	5I6X
CYP2D6	3TBG
DRD2	6CM4
PPARA	3VI8
CHRNA7	5AFN
MAOB	6FWC

3.7. 体外实验验证

3.7.1. 细胞毒性评估与工作浓度选择

如图 7 所示, 10-姜酚浓度在 0~31.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 对小鼠腹腔巨噬细胞活力均无显著影响($P > 0.05$)。鉴于 31.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的数据变异较大, 为保证结果的高度可重复性及后续实验在明确无毒的条件下进行, 本研究选择 15.625 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为后续实验浓度。



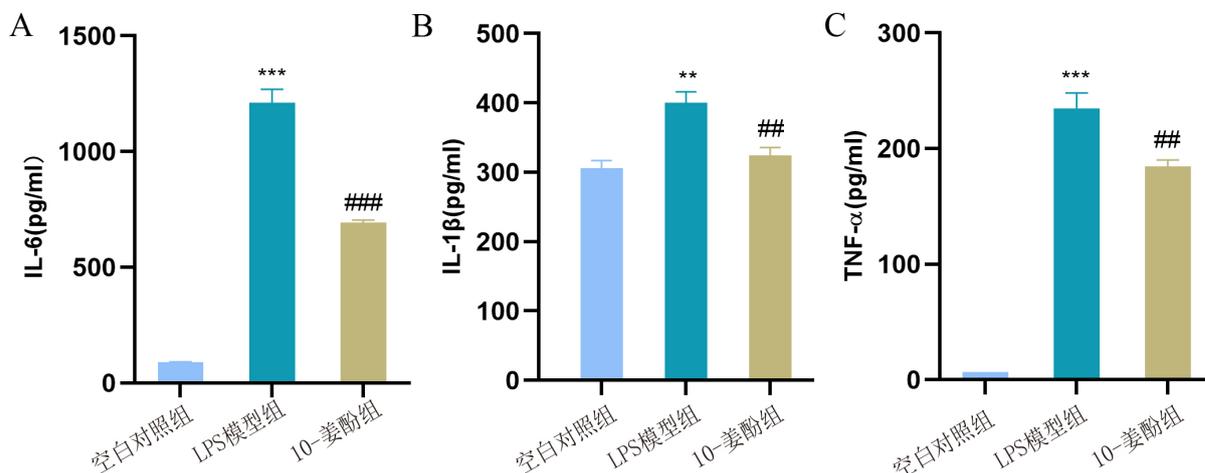
与对照组相比, $*P < 0.05$, $****P < 0.0001$ 。

Figure 7. Effect of 10-gingerol on the activity of mouse peritoneal macrophages

图 7. 10-姜酚对小鼠腹腔巨噬细胞生存率的影响

3.7.2. 10-姜酚对小鼠腹腔巨噬细胞上清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量的影响

为探究 10-姜酚的抗炎作用, 我们使用前述筛选出的安全浓度(15.625 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行干预, 如图 8 所示, 与空白对照组相比, LPS 模型组巨噬细胞上清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量显著升高($P < 0.001$; $P < 0.01$; $P < 0.001$); 与 LPS 模型组相比, 10-姜酚组巨噬细胞上清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量显著降低($P < 0.001$; $P < 0.01$; $P < 0.01$)。



与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 LPS 模型组相比, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

Figure 8. Effect of 10-gingerol on the levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the supernatant of mouse peritoneal macrophages; The concentrations of IL-6 (A); IL-1 β (B); and TNF- α (C) in the macrophage supernatant were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

图 8. 10-姜酚对小鼠腹腔巨噬细胞上清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量的影响; 巨噬细胞上清中 IL-6 (A); IL-1 β (B)和 TNF- α (C)浓度的酶联免疫吸附试验分析

4. 讨论

据世界卫生组织统计, 全球超过 13 亿人患有肝脏疾病, 这已成为全球关注的公共卫生问题[12]。多种肝脏疾病都是导致急性肝衰竭甚至死亡的主要病因[13]。其中 ILI 是加速各种肝病进展的一个关键过程。

桂枝味辛性温, 能散能行, 宣通痹闭, 重用桂枝可以温和脾胃, 疏解肝气郁结[14]。现有研究表明, 桂枝具有良好的抗炎和抗肿瘤活性[15]。方中白芍味酸而苦, 能养血护肝, 滋阴敛阴, 可以清肝胆之热[16]。方中桂枝与炙甘草合用可以达到辛甘化阳、温助心阳的效果[4]。

本研究筛选出桂枝加桂汤治疗 ILI 的 10 个核心靶点, 包括 *AKT1*、*TNF*、*ESR1* 等, 提示其多靶点治疗潜力。其中, *AKT1* 在多种恶性肿瘤组织中呈现高表达状态, 其活性与调控细胞增殖、凋亡等关键生命过程密切相关[17][18]。*TNF- α* 是 ILI 中 Kupffer 细胞分泌的关键炎症因子, 其抗体可减轻肝损伤[19]。本研究的分子对接结果显示, *TNF* 与多种活性成分结合良好, 进一步支持其在 ILI 中的核心地位。KEGG 分析表明, 桂枝加桂汤主要通过调控 *PPAR*、*AMPK* 和 *JAK/STAT* 等信号通路发挥作用。*JAK/STAT* 通路在肝损伤中被激活, 抑制该通路可降低炎症因子表达并改善肝功能[20]。*AMPK* 通路参与代谢调节与细胞稳态, 在胆汁淤积性肝病中具有重要作用[21], 并可经由抑制 *NF- κ B* 通路缓解肝损伤[22]。这些通路共同构成桂枝加桂汤抗炎与免疫调节的分子基础。

分子对接显示 10-姜酚与 *TNF* 的结合效果最好, 提示其可能在抗炎过程中发挥关键作用。本研究利用细胞炎症模型验证了 10-姜酚的抗炎作用。实验结果表明, 在无毒浓度下, 10-姜酚能显著抑制 LPS 所诱导的炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 *TNF- α* 的释放, 表明其有明确的抗炎活性。该结果与既往研究一致, 姜酚类可通过抑制 *NF- κ B* 磷酸化及 *MAPK* 通路激活, 下调诱导型一氧化氮合酶和 *TNF- α* 的表达, 从而缓解肝纤维化[23]。此外, 10-姜酚具有更长的非支链烷基侧链, 在抑制细胞增殖方面表现出优于 6-姜酚和 8-姜酚的潜力, 且体内毒性低, 耐受性良好[24]。其在动脉损伤模型中可抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移, 此作用可能与直接激活 *AMPK* 有关[24]。另有研究指出, 10-姜酚还可通过靶向 *PI3K/Akt* 通路, 诱导肿瘤细胞周期阻滞与线粒体途径凋亡, 进而抑制增殖与迁移[25]-[27]。

综上,本研究整合网络药理学、分子对接及体外细胞实验,揭示了桂枝加桂汤通过“多成分-多靶点-多通路”方式干预ILI的潜在机制,为其“异病同治”该病症提供了现代科学依据。需要指出的是,当前结论主要基于体外细胞模型。未来需进一步通过动物实验(如ConA诱导的肝损伤模型)开展在体药效学评价,并采用含药血清或复方整体提取物进行验证,以全面评估其治疗潜力。

声明

本研究获得济宁医学院动物伦理委员会批准(JNMC-2023-DW-145)。

基金项目

济宁医学院大学生创新创业项目(cx2023009z)。

参考文献

- [1] 沈朝壮, 王晓虎, 李超, 等. 基于网络药理学与分子对接探讨五味子治疗急性肝损伤的作用机制[J]. 湖北民族大学学报(自然科学版), 2022, 40(1): 33-39, 91.
- [2] Wang, M., Yin, H., Xia, Y., Tu, Y., Zou, X., Song, W., *et al.* (2021) Huginbuzure Granule Attenuates Concanavalin-A-Induced Immune Liver Injury in Mice via Regulating the Balance of Th1/Th2/Th17/Treg Cells and Inhibiting Apoptosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, Article ID: 5578021. <https://doi.org/10.1155/2021/5578021>
- [3] 刘松灿, 彭勃. 免疫性肝损伤的研究进展[J]. 光明中医, 2009, 24(10): 2045-2047.
- [4] 金会, 方盛泉. 桂枝加桂汤治疗胃痛浅析[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(12): 23-24.
- [5] Xu, H., Zhang, Y., Liu, Z., Chen, T., Lv, C., Tang, S., *et al.* (2018) ETCM: An Encyclopaedia of Traditional Chinese Medicine. *Nucleic Acids Research*, 47, D976-D982. <https://doi.org/10.1093/nar/gky987>
- [6] 付静思, 姜泉, 夏聪敏, 等. 基于网络药理学探讨四神煎治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. 中医学报, 2022, 37(1): 156-164.
- [7] Gfeller, D., Grosdidier, A., Wirth, M., Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V. (2014) Swisstargetprediction: A Web Server for Target Prediction of Bioactive Small Molecules. *Nucleic Acids Research*, 42, W32-W38. <https://doi.org/10.1093/nar/gku293>
- [8] Chen, C., Huang, H. and Wu, C.H. (2010) Protein Bioinformatics Databases and Resources. In: Wu, C. and Chen, C., Eds., *Bioinformatics for Comparative Proteomics*, Humana Press, 3-24. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-977-2_1
- [9] 金鑫, 李鸿洋, 李敬双, 等. 大蒜素对小鼠腹腔巨噬细胞的抗炎作用[J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(12): 85-88.
- [10] 王特日格乐, 王翠芳, 丹妮, 等. 沙葱总黄酮对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症介质的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(9): 3702-3709.
- [11] 范晓艳, 王元耕, 陈泽涛. 黄芪桂枝五物汤治疗心衰的网络药理学机制[J]. 山东大学学报(医学版), 2022, 60(11): 70-81.
- [12] Megahed, F.A.K., Zhou, X. and Sun, P. (2020) The Interactions between HBV and the Innate Immunity of Hepatocytes. *Viruses*, 12, Article 285. <https://doi.org/10.3390/v12030285>
- [13] 韩冰, 程栋梁, 林世源, 等. 矮地茶对刀豆蛋白 A 致大鼠免疫性肝损伤的保护作用及机制探讨[J]. 中南药学, 2022, 20(5): 979-984.
- [14] 钱纯果, 金路, 朱龙平, 等. 桂枝中化学成分及抗肿瘤和抗炎活性研究[J]. 中草药, 2022, 53(1): 31-40.
- [15] Park, G.H., Song, H.M., Park, S.B., Son, H., Um, Y., Kim, H., *et al.* (2018) Cytotoxic Activity of the Twigs of *Cinnamomum cassia* through the Suppression of Cell Proliferation and the Induction of Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, Article No. 28. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2096-x>
- [16] 杨慧. 桂枝加桂汤联合小陷胸汤治疗血管神经性头痛 21 例疗效观察[J]. 山西医药杂志, 2004(5): 388.
- [17] Yan, P., Tang, S., Zhang, H., Guo, Y., Zeng, Z. and Wen, Q. (2016) Palmitic Acid Triggers Cell Apoptosis in RGC-5 Retinal Ganglion Cells through the Akt/FoxO1 Signaling Pathway. *Metabolic Brain Disease*, 32, 453-460. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9935-6>
- [18] Chen, J., Liang, J., Liu, S., Song, S., Guo, W. and Shen, F. (2018) Differential Regulation of AKT1 Contributes to Survival

- and Proliferation in Hepatocellular Carcinoma Cells by Mediating Notch1 Expression. *Oncology Letters*, **15**, 6857-6864. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8193>
- [19] 王涛, 林琴, 刘凤婷, 等. IL-1、TNF- α 在免疫性肝损伤过程中对代谢酶 CYP2E1 的调控作用[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(8): 1160-1164.
- [20] 王茜, 郝蕾, 韩雪, 等. 解毒护肝方对药物性肝损伤大鼠 JAK2/STAT3 通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(6): 144-149.
- [21] Ding, W., Zhang, Q., Dong, Y., Ding, N., Huang, H., Zhu, X., *et al.* (2016) Adiponectin Protects the Rats Liver against Chronic Intermittent Hypoxia Induced Injury through AMP-Activated Protein Kinase Pathway. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 34151. <https://doi.org/10.1038/srep34151>
- [22] Zhu, H., Chai, Y., Dong, D., Zhang, N., Liu, W., Ma, T., *et al.* (2018) AICAR-Induced AMPK Activation Inhibits the Noncanonical NF- κ B Pathway to Attenuate Liver Injury and Fibrosis in BDL Rats. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **2018**, Article ID: 6181432. <https://doi.org/10.1155/2018/6181432>
- [23] Algandaby, M.M., El-halawany, A.M., Abdallah, H.M., Alahdal, A.M., Nagy, A.A., Ashour, O.M., *et al.* (2016) Gingerol Protects against Experimental Liver Fibrosis in Rats via Suppression of Pro-Inflammatory and Profibrogenic Mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **389**, 419-428. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1210-1>
- [24] Deng, B., Jiang, X., Xu, Y., Chen, S., Cai, M., Deng, S., *et al.* (2022) 10-Gingerol, a Natural AMPK Agonist, Suppresses Neointimal Hyperplasia and Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Food & Function*, **13**, 3234-3246. <https://doi.org/10.1039/d1fo03610f>
- [25] Nafees, S., Zafaryab, M., Mehdi, S.H., Zia, B., Rizvi, M.A. and Khan, M.A. (2021) Anti-Cancer Effect of Gingerol in Cancer Prevention and Treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **21**, 428-432. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200918100833>
- [26] Delbridge, A.R.D., Valente, L.J. and Strasser, A. (2012) The Role of the Apoptotic Machinery in Tumor Suppression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4**, a008789. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008789>
- [27] Wang, S., Sun, X., Jiang, L., Liu, X., Chen, M., Yao, X., *et al.* (2016) 6-gingerol Induces Autophagy to Protect HUVECs Survival from Apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, **256**, 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.020>