【基础研究】

基于网络药理学和分子对接探讨小柴胡汤合当归芍药散治疗桥本甲状腺炎的作用机制

黄 慧，许嘉慧，陆 灏*

（上海中医药大学附属曙光医院内分泌科，上海 201203）

摘要：目的 采用网络药理学和分子对接技术探讨小柴胡汤合当归芍药散治疗桥本甲状腺炎（Hashimoto's thyroiditis，HT）的作用机制。**方法** 通过中药系统药理学、TCMSP 数据库筛选复方中 13 味中药主要活性成分及作用靶点；通过 OMIM、GeneCards 数据库筛选 HT 靶点；通过 Cytoscape 3.9.1 构建中药 - 成分 - 靶点网络图及蛋白互作网络图，筛选关键靶点；通过 DAVID 数据库对交集靶点进行基因本体论、京都基因与基因组百科全书通路分析；通过 AutoDock Vina 进行分子对接，初步筛选并进一步验证复方核心化学成分。**结果** 共获得复方中活性成分 190 个，主要包括槲皮素、木犀草素及山柰酚等；成分靶点 292 个，疾病靶点 2 132 个，交集靶点 171 个，主要关键靶点为肿瘤蛋白 p53、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）3 及蛋白激酶 B 等；本复方可能通过调节 MAPK、白介素 -17 以及肿瘤坏死因子等信号通路对 HT 发挥治疗作用。**结论** 小柴胡汤合当归芍药散的复方核心成分可能为槲皮素、木犀草素、山柰酚及汉黄芩素，可能通过调节肿瘤相关信号通路对 HT 发挥治疗作用。

关键词：网络药理学；分子对接；小柴胡汤；当归芍药散；桥本甲状腺炎

中图分类号：R259；R285 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2024）04-0372-08

DOI：10.13683/j.wph.2024.04.005

Mechanism analysis of Xiaochaihu decoction with Danggui Shaoyao powder in the treatment of Hashimoto's thyroiditis based on network pharmacology and molecular docking techniques

HUANG Hui, XU Jiahui, LU Hao*

(*Department of Endocrinology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the mechanism of Xiaochaihu decoction combined with Danggui Shaoyao powder in the treatment of Hashimoto's thyroiditis (HT) based on network pharmacology and molecular docking techniques. ***Methods*** Traditional Chinese medicine (TCM) system pharmacology and TCMSP database were used to screen the main active components of 13 TCM compounds and their action targets. OMIM and GeneCards databases were used to screen the HT targets. Cytoscape 3.9.1 was used to construct the TCM-component-target network diagram and protein-protein interaction network diagram, and screen the key targets. The Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway analysis were conducted for the intersection targets through the DAVID database. Molecular docking was carried out by AutoDock Vina, preliminary screening and further verification of the core chemical components of

收稿日期：2024-02-06

作者简介：黄慧，硕士研究生，研究方向：糖尿病、甲状腺疾病中医药临床及实验研究。

通信作者：陆灏，主任医师，博士研究生导师，研究方向：中医药防治内分泌疾病。

基金项目：华东片区及市级中医专科专病联盟建设-长三角中医内分泌代谢病专科联盟建设[ZY（2021-2023）-0302]；上海市中医临床重点实验室（20DZ2272200）

the compound. ***Results*** A total of 190 active ingredients were obtained, including quercetin, luteolin and kaempferol. There were 292 component targets, 2 132 disease targets and 171 intersection targets. The main key targets were tumor protein p53, mitogen-activated protein kinase（MAPK）3 and protein kinase B. This compound may play a therapeutic role in HT by regulating MAPK, interleukin-17, tumor necrosis factor and other signaling pathways. ***Conclusion*** The core components of Xiaochaihu decoction and Danggui Shaoyao powder may be quercetin, luteolin, kaolin and baicalin, which may play a therapeutic role in HT by regulating tumor-related signaling pathways.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Xiaochaihu decoction; Danggui Shaoyao powder; Hashimoto's thyroiditis

全球碘充足地区人群常患自身免疫性甲状腺疾病，其中桥本甲状腺炎（Hashimoto's thyroiditis，HT）尤为常见，HT 亦是甲状腺功能减退症最常见的原因[1]。HT 主要临床特征为无痛性、弥漫性甲状腺肿大，患者通常表现为抗甲状腺球蛋白抗体（anti-thyroglobulin antibody，TGAb）、抗甲状腺过氧化物酶抗体（anti-thyroid peroxidase antibody，TPOAb）水平异常升高，伴或不伴甲状腺功能异常[2]。

目前，HT 的西医疗法主要包括口服西药、外科手术[2]，但对 TGAb、TPOAb 水平的影响并不显著。由于甲状腺相关抗体水平异常升高及甲状腺外表变化等，HT 患者易焦虑，而既往研究提示中医药在降低 TGAb、TPOAb、中医证候积分及改善焦虑情绪等方面显著有效[3—5]。在中医学中，HT 病因主要包括情志内伤、饮食、水土失宜及体质因素等，以气滞、痰凝、血瘀壅结颈前为基本病机，主要以理气化痰、消瘿散结为基本治则[6]。方剂小柴胡汤出自《伤寒论》，具有和解少阳之功；当归芍药散则源于《金匮要略》，功擅养血调肝、健脾利湿。两方同用共奏利水化瘀、疏肝健脾之效。有学者发现小柴胡汤合当归芍药散内服可有效改善 HT 症状，促进甲状腺、免疫功能恢复[7]，但具体机制尚不明。

近年来，中医网络药理学在预测药物靶点、认识药物与疾病生物学基础、寻找疾病与证候生物标志物等方面取得重要进展。现拟通过网络药理学挖掘小柴胡汤合当归芍药散治疗 HT 的潜在作用靶点，探讨该复方治疗 HT 的机制，并采用分子对接技术进行验证，为临床提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物活性成分筛选及作用靶点搜集

利用中药系统药理学数据库与分析平台（Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform，TCMSP），以口服生物利用度（oral bioavailability，OB）≥ 30%、类药性（drug-like，DL）≥ 0.18 为中药活性成分的筛选标准，得到小柴胡汤合当归芍药散中 13 味中药活性成分及作用靶点，合并并删除重复值，利用蛋白质数据库（https://www.uniprot.org/）将作用靶点转化为对应的官方基因名，筛选物种为人类靶点基因名称。

1.2 HT 靶点搜集

以“Hashimoto's thyroiditis”为关键词，使用 GeneCards（https://www.genecards.org/）、在线人类孟德尔遗传（Online Mendelian Inheritance in Man，OMIM，https://www.omim.org）数据库搜集 HT 靶点，合并去重。

1.3 中药复方与 HT 交集靶点筛选

利用 Venny 2.1（http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny）得到中药复方与 HT 交集靶点。

1.4 中药复方 - 有效活性成分 - 靶点网络构建

使用 Cytoscape 3.9.1 软件构建中药小柴胡汤合当归芍药散 - 活性成分 - 交集靶点网络图。

1.5 蛋白质 - 蛋白质互作（protein-protein interaction，PPI）网络图构建

利用 String（https://string-db.org）构建 PPI 网络图，限定物种为“人”。通过度值（degree，D）、中

介中心性、紧密中心性筛选关键靶点。

1.6 基因本体论（Gene Ontology，GO）、京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集及通路分析

利用 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行 GO 功能富集、KEGG 通路分析，并通过微生信软件进行可视化分析，以气泡图展示结果。

1.7 分子对接验证

利用 AutoDock Tools 1.5.6（http://autodock.scripps.edu/resources/tools）将 PPI 网络中关键靶点与小柴胡汤合当归芍药散主要活性成分进行分子对接，并根据结果，选择较理想的对接组合进行模拟展示。

2 结果

2.1 小柴胡汤合当归芍药散的主要活性成分及作用靶点收集

共得到小柴胡汤合当归芍药散中 190 种活性成分。利用 TCMSP 进行作用靶点预测，删除重复值，得到小柴胡汤合当归芍药散作用靶点 292 个。

2.2 HT 靶点收集及其与药物作用靶点交集分析

通过 GeneCards、OMIM 数据库共获取 HT 靶点 2 132 个，经交集分析得到 171 个交集靶点。

2.3 中药复方 - 有效活性成分 - 靶点网络构建

利用 Cytoscape 3.9.1 软件，构建中药小柴胡汤合当归芍药散 - 有效活性成分 - 交集靶点网络，共得到 369 个节点、1 969 条作用关系，见图 1（其中紫色圆圈为多种中药共有成分）。根据 D 值排名前 4 位的化合物分别为槲皮素（quercetin，D 值＝ 113）、木犀草素（luteolin，D 值＝ 49）、山柰酚（kaempferol，D 值＝ 43）、汉黄芩素（wogonin，D 值＝ 34）。

2.4 PPI 网络构建

PPI 网络共得到 154 个节点，860 条边，见图 2。图中由内到外颜色越浅，PPI 程度越低。通过 D、介数中心性、接近中心性大于等于平均值以上的节点作为关键靶点，得到小柴胡汤合当归芍药散治疗 HT 的关键靶点分别为肿瘤蛋白 p53（tumor protein p53，Tp53）、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated

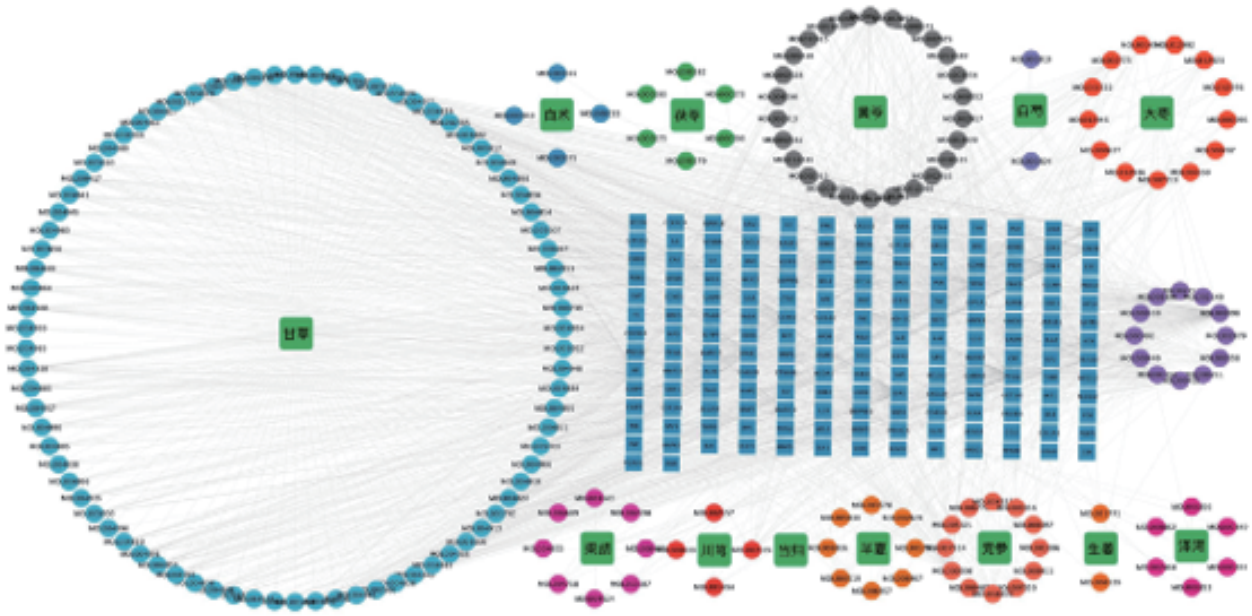


图 1 小柴胡汤合当归芍药散 - 有效活性成分 - 交集靶点网络图

Figure 1 Network diagram of Xiaochaihu decoction combined with Danggui Shaoyao powder-active ingredient-intersection target

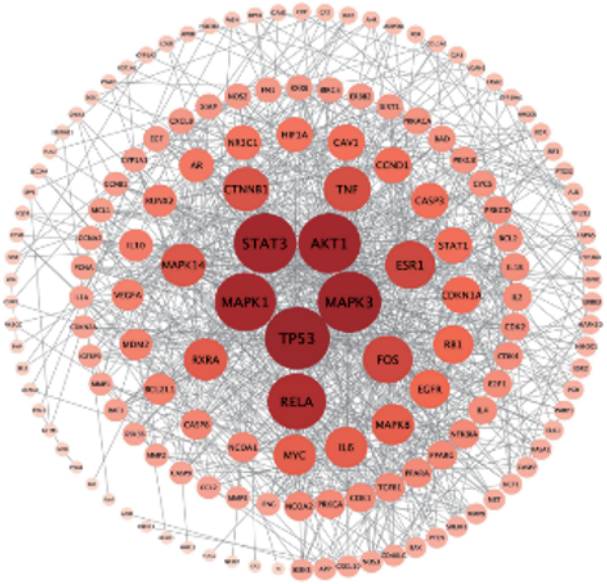


图 2　小柴胡汤合当归芍药散 -HT 靶蛋白 PPI 网络图

Figure 2　PPI network of HT target protein of Xiaochai-hu decoction combined with Danggui Shaoyao powder

protein kinase，MAPK）3、蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）1、信号转录和激活因子（signal transducer and activator of transcription，STAT）3、MAPK1 等。

2.5　GO 功能富集、KEGG 通路分析

GO 富集分析得到 1 111 个条目，包含 BP 849 个、CC 100 个和 MF 162 个。以横坐标为基因比率，纵坐标为功能注释名称绘制气泡图，见图 3（其中气泡颜色表示 p 值高低，气泡大小表示交集基因与该通路中基因重叠个数），涉及通路有癌症相关信号通路、磷酸磷脂酰肌醇 -3 羟基激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）-Akt、MAPK、细胞凋亡、白介素（interleukin，IL）-17、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）等信号通路。

KEGG 分析得到 180 条通路，根据 p 值选取前 20 个 KEGG 生物学过程，以纵坐标为通路名称，横坐标为富集于通路靶点数绘制气泡图，见图 4。

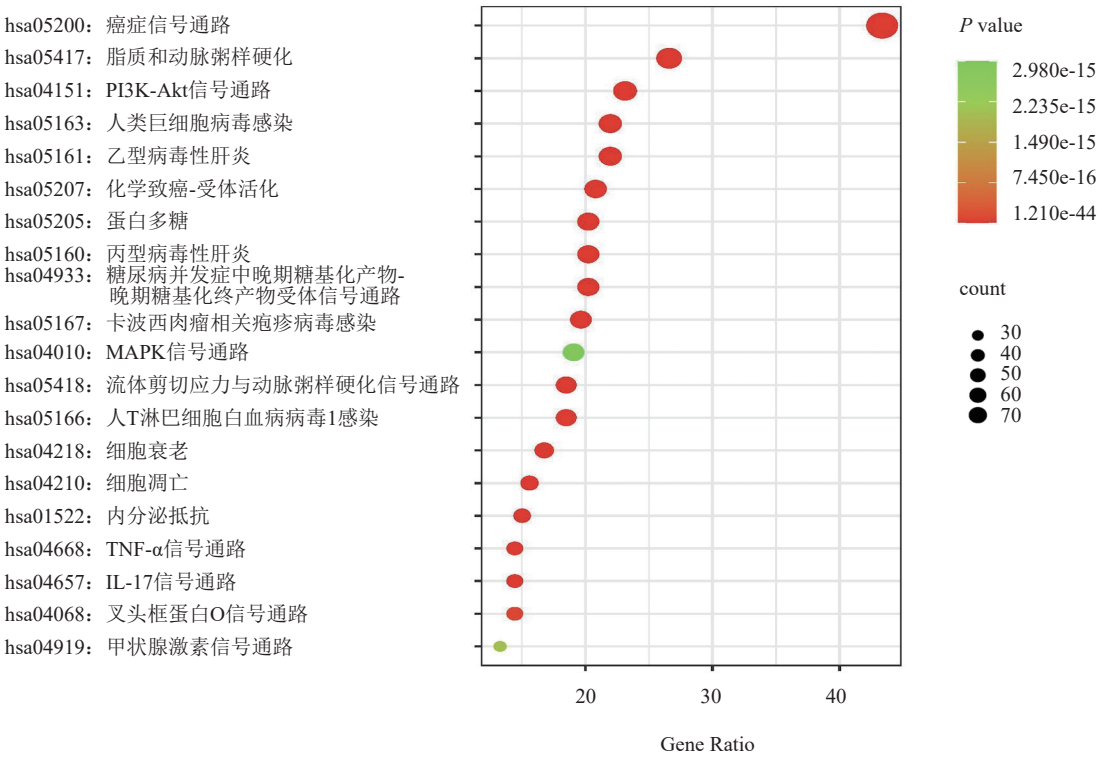


图 3　GO 富集前 20 名

Figure 3　Top 20 of GO enrichment

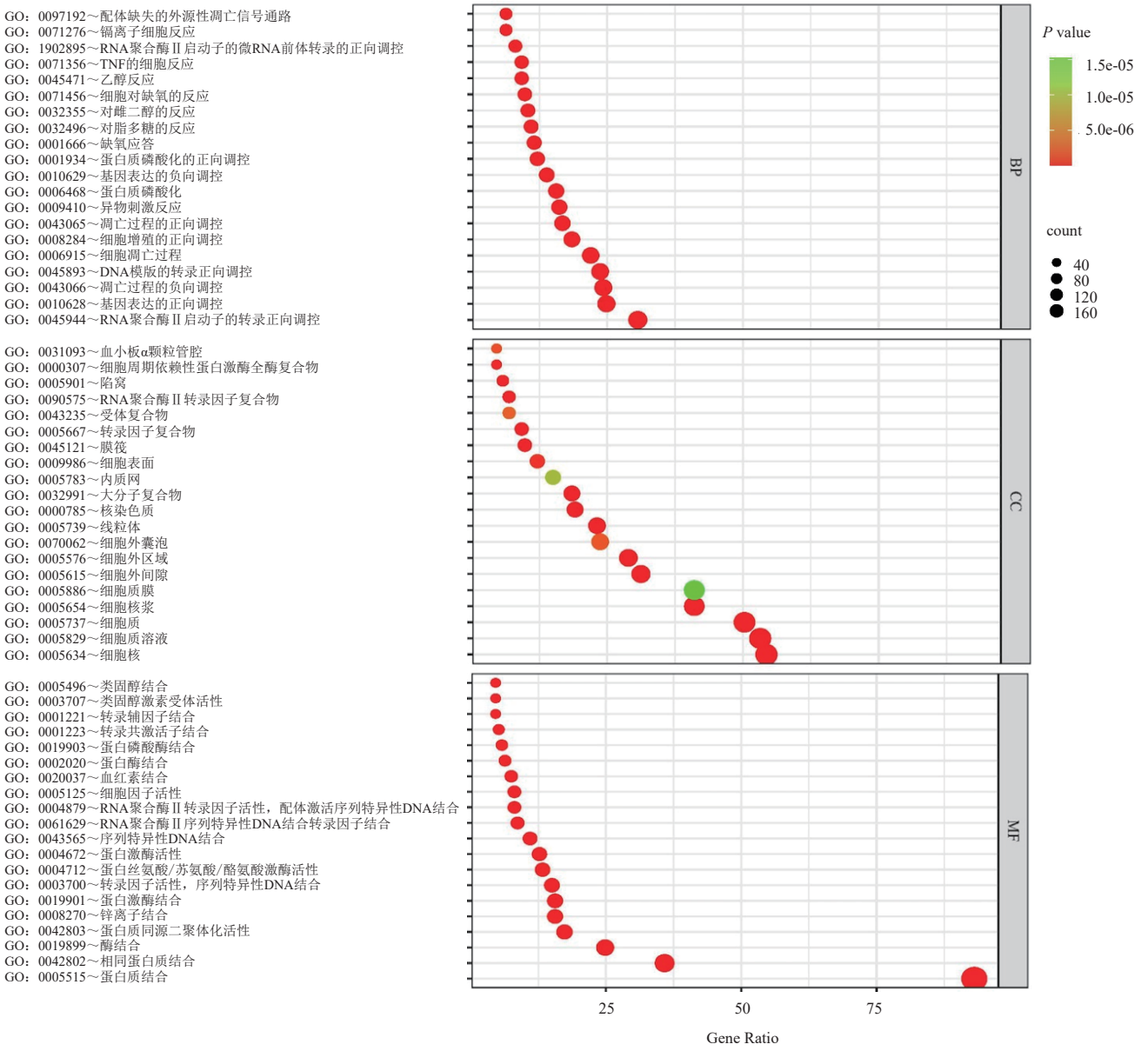


图 4　KEGG 富集前 20 名

Figure 4　Top 20 of KEGG enrichment

将通路和靶点导入 Cytoscape 3.9.1，构建通路 - 靶点网络图，见图 5。

2.6　分子对接

将 PPI 网络中的关键靶点与小柴胡汤合当归芍药散主要活性成分进行分子对接，对接结果见表 1。

根据结合能判断其结合力，结合自由能数值越小，越有利于配体与蛋白结合。结合能＜ −5.0 kcal/mol，说明亲和力较好；结合能＜ −7.0 kcal/mol，表示结合活性极佳。根据分子对接结果，选择较理想的对接组合进行模拟展示，见图 6。

3　讨论

中医认为，HT 属“瘿病”，是因情志内伤、饮食及水土失宜，以致气滞、痰凝、血瘀壅结颈前，日久可引起血脉瘀阻，进而气、痰、瘀三者交织为



图 5　通路 - 靶点网络图

Figure 5　Network diagram of pathway-target

表 1　主要活性成分与关键靶点的分子对接结果（单位：kcal/mol）

Table 1　Results of molecular docking of main active ingredients with key targets (unit: kcal/mol)

活性成分	Tp53	MAPK3	Akt1	STAT3	MAPK1
quercetin	−6.9	−9.5	−10.2	−7.8	−7.6
luteolin	−7.4	−9.3	−10.3	−7.6	−7.6
kaempferol	−6.8	−9.4	−9.8	−7.7	−7.5
wogonin	−7.3	−8.7	−9.4	−6.9	−7.8

病，故其治则以理气化痰、消癥散结为主[6]。小柴胡汤作为和解少阳的代表方剂，常被用于治疗外邪郁于半表半里，不得透发，少阳气机郁滞或肝胆胃的气机逆乱，常伴气滞或血瘀。此方以柴胡为君药，柴胡苦平，入肝胆经，透泄少阳之邪，并能疏泄气机之郁滞，使少阳之邪得以疏散；黄芩为臣，苦寒以泄少阳之热；半夏、生姜和胃降逆止呕；人参大枣益气健脾。诸药合用，以和解少阳为主，兼和胃气，使邪气得解，则诸症自除[8]。当归芍药散归属《金匮要略》的理血剂，常被用于治疗妇女肝脾失调，血滞湿阻。方中以白芍为君药，当归、川芎为臣药，重用芍药以缓急止痛、柔肝养血；当归助白芍养血行血，川芎行血、去滞开郁；茯苓、白术健脾除湿；

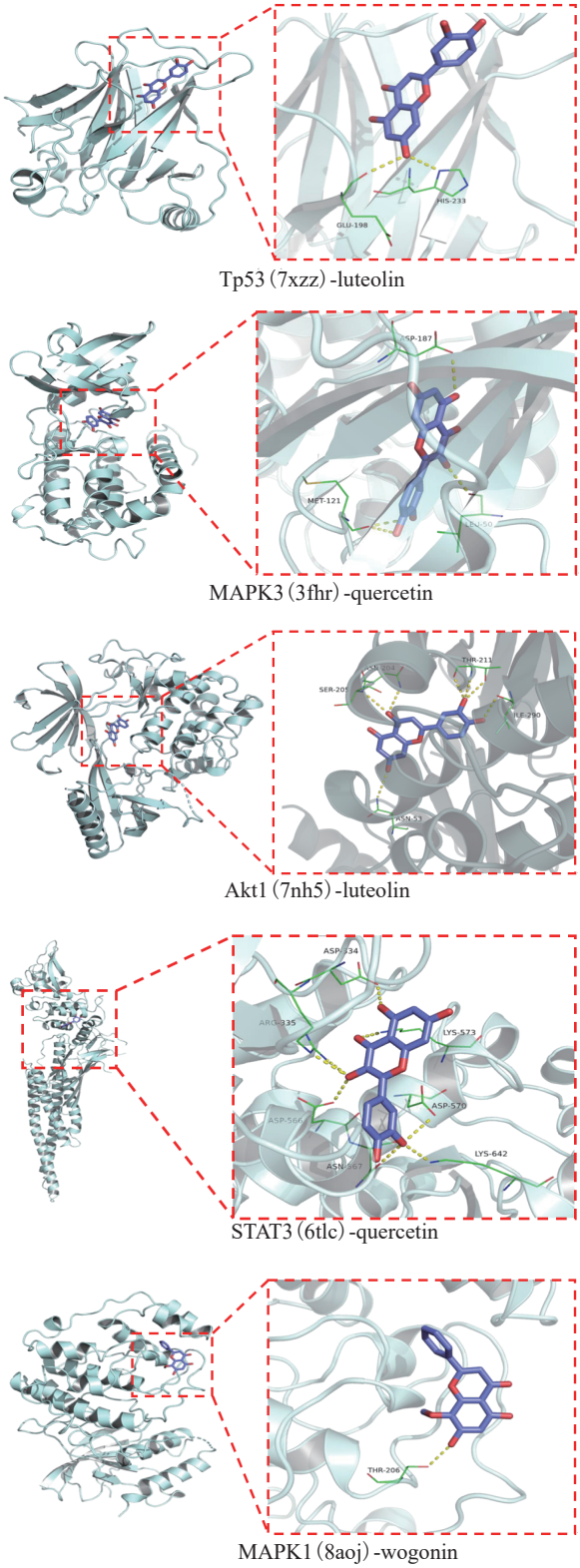


图6　主要活性成分与关键靶点分子对接的模拟展示图

Figure 6　Simulation of molecular docking between main active ingredients and key targets

泽泻渗利湿浊。两方合用，肝脾同治，共奏理气活血，健脾化痰之功。

本研究通过网络药理学分析、结合 D 值排序得到中药复方治疗 HT 前 4 位主要活性成分，包含槲皮素、木犀草素、山柰酚及汉黄芩素。槲皮素具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、免疫调节及调节细胞关键酶功能等作用，参与多种炎症相关信号通路分子间相互作用，降低细胞因子、趋化因子及炎症相关酶活性[9]。TPO 是 HT 主要抗原，而 TPOAb 则可诱导补体依赖性细胞毒性的发生[10]。研究显示，槲皮素、山柰酚对 TPO 活性有抑制作用，这为 HT 的治疗提供新思路[10—11]。木犀草素在体内、体外均具有抗炎活性[12—13]，可治疗多发性硬化症、自身免疫性脑炎等自身免疫性疾病[14—15]。Xia 等[16] 通过动物试验发现，木犀草素对 HT 模型小鼠具有较强抗炎作用，可显著改善其甲状腺淋巴细胞浸润。汉黄芩素可直接作用于淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞，并抑制 IL-6、TNF-α 等炎性细胞因子及前列腺素、白三烯、活性氧等炎症介质产生[17]。前述提示，小柴胡汤合当归芍药散主要活性成分可能通过抗炎、免疫调节等途径发挥治疗 HT 的作用。

通过 Cytoscape 3.9.1 软件对 PPI 进行进一步分析，得到中药复方治疗 HT 的关键靶点可能为 Tp53、MAPK3、Akt1、STAT3 及 MAPK1 等。HT 是最常见的自身免疫性疾病之一，可致甲状腺功能异常，甚至增加甲状腺癌的发生风险[18—19]。Tp53 作为一种肿瘤抑制因子，被认为在甲状腺癌的发生发展中起到重要作用[20—21]，亦是抗炎、免疫调节的关键因素，与细胞凋亡密切相关[20—21]。MAPK3、MAPK1 均属蛋白激酶，在细胞生长、分化、增殖、存活及炎症反应方面发挥关键作用[22—23]。研究表明，MAPK1 水平在高碘培养的甲状腺癌细胞中显著上调，促进肿瘤生长[24]。在 HT 发生发展中，辅助性 T 细胞（T helper cell，Th）1/Th2 免疫失衡，此时调节性 T 细胞（regulatory cell，Treg）、Th17 起着重要作用[25]。Akt 已被证实可调节 T 细胞活化、增殖、葡萄糖摄取及细胞因子表达等[26]，Akt1 作为其亚型则在动物试验中被证实对胸腺来源的 Tregs 的增殖有抑制作用[27]。此外，STAT3 是细胞免疫的关键转录因子，在辅助 T 细胞增殖和迁移、分化转化成为 Th7 及维持 Treg、Th17 细胞间的平衡十分重要[16]。

通过 KEGG 富集分析得到主要信号通路，包括癌症相关信号通路、PI3K-Akt、MAPK、细胞凋亡、IL-17 及 TNF 信号通路等。IL-17 是由 Th17 产生的一类炎症因子。研究显示，HT 患者 IL-17 及其信使 RNA 表达水平与 IL-6、TPOAb、TG、TGAb 等表达水平呈正相关；IL-17 水平明显升高，且激活核因子 κB 信号通路，刺激炎症因子产生和释放，并参与自身免疫甲状腺损伤机制[28]。TNF 受体及其相应细胞因子涉及免疫及生物学功能，其在维持 T 细胞稳态中至关重要，与自身免疫性疾病密切相关[29]。综上，笔者发现本次 KEGG 富集分析得到的主要信号通路与 HT 发生发展密切相关。

本研究分子对接结果显示，关键靶点 Tp53、MAPK3、Akt1、STAT3、MAPK1 与复方主要活性成分槲皮素、木犀草素、山柰酚和汉黄芩素结合稳定。在所列关键靶点中，Akt1 与槲皮素、木犀草素、山柰酚和汉黄芩素结合活性极佳，可作为后续研究中药小柴胡汤合当归芍药散治疗 HT 的重点。

4 结论

综上所述，小柴胡汤合当归芍药散治疗 HT 发挥作用的主要活性成分可能是槲皮素、木犀草素、山柰酚、汉黄芩素等；发挥作用的关键靶点可能是 Tp53、MAPK3、Akt1、STAT3、MAPK1 等；涉及到的主要通路包括癌症相关信号通路、PI3K-Akt、MAPK、细胞凋亡、IL-17、TNF 信号通路等。但本研究只停留在理论预测分析，未来可通过更多试验验证相关结果。

参考文献：

[1] Cappellacci F, Canu GL, Lai ML, *et al*. Association between Hashimoto thyroiditis and differentiated thyroid cancer: a single-center experience[J]. Front Oncol, 2022, 12: 959595.

[2] 陈家伦, 宁光, 潘长玉, 等. 临床内分泌学[M]. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 388-391.

[3] 欧阳意, 邹宗智, 吴秋生, 等. 加味半夏厚朴汤治疗气郁痰阻型桥本甲状腺炎临床观察[J]. 山西中医, 2023, 39(4): 38-39.

[4] 乔雪, 罗润佳, 刘炳蔚, 等. 小金丸治疗桥本甲状腺炎的疗效评价与基于代谢组学的机制研究[J/OL]. 辽宁中医药大学学报, 2023: 1-29[2023-04-19]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1543.R.20230228.1002.012.html.

[5] 吴春丽, 郭奉琳, 秦美灵, 等. 温阳消瘿方治疗桥本甲状腺炎临床效果及对患者TPOAb、TGAb抗体滴度的影响[J/OL]. 实用中医内科杂志, 2023: 1-5[2023-04-19]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1187.R.20230210.1457.002.html.

[6] 吴勉华, 王新月. 中医内科学[M]. 第3版. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 296-301.

[7] 黄涛, 周燕华, 张梅. 内服小柴胡汤合当归芍药散联合针灸对桥本甲状腺炎患者甲状腺功能水平及免疫因子的影响[J]. 中国当代医药, 2022, 29(11): 49-51.

[8] 李冀, 连建伟. 方剂学[M]. 第3版. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 60-62.

[9] National Institutes of Health. LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury[EB/OL]. (2019-07-18)[2023-04-19]. https://www.nejmqianyan.cn/article-info?permalinks=YXQYra1816149&sg=AbW1NGsHw3NxPd6F.

[10] Habza-Kowalska E, Kaczor AA, Żuk J, *et al*. Thyroid peroxidase activity is inhibited by phenolic compounds-impact of interaction[J]. Molecules, 2019, 24(15): 2766.

[11] Habza-Kowalska E, Gawlik-Dziki U, Dziki D. Mechanism of action and interactions between thyroid peroxidase and lipoxygenase inhibitors derived from plant sources[J]. Biomolecules, 2019, 29, 9(11): 663.

[12] Kritas SK, Saggini A, Varvara G, *et al*. Luteolin inhibits mast cell-mediated allergic inflammation[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2013, 27(4): 955-959.

[13] Ziyan L, Yongmei Z, Nan Z, *et al*. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models[J]. Planta Med, 2007, 73(3): 221-226.

[14] Theoharides TC. Luteolin as a therapeutic option for multiple sclerosis[J]. J Neuroinflammation, 2009, 6: 29.

[15] Theoharides TC, Kempuraj D, Iliopoulou BP. Mast cells, T cells and inhibition by luteolin: implications for the pathogenesis and treatment of multiple sclerosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 601: 423-430.

[16] Xia N, Chen G, Liu M, *et al*. Anti-inflammatory effects of luteolin on experimental autoimmune thyroiditis in mice[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(6): 4049-4054.

[17] Liao H, Ye J, Gao L, *et al*. The main bioactive compounds of Scutellaria baicalensis Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: a comprehensive review[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 6, 133: 110917.

[18] Liang J, Zeng W, Fang F, *et al*. Clinical analysis of Hashimoto thyroiditis coexistent with papillary thyroid cancer in 1 392 patients[J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2017, 37(5): 393-400.

[19] Silva de Morais N, Stuart J, Guan H, *et al*. The impact of Hashimoto thyroiditis on thyroid nodule cytology and risk of thyroid cance[J]. J Endocr Soc, 2019, 3(4): 791-800.

[20] Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 family and cellular stress responses in cancer[J]. Front Oncol, 2014, 4: 285.

[21] Meylan F, Siegel RM. TNF superfamily cytokines in the promotion of Th9 differentiation and immunopathology[J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(1): 21-28.

[22] Chatterjee N, Das S, Bose D, *et al*. Lipid from infective L. donovani regulates acute myeloid cell growth via mitochondria dependent MAPK pathway[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120509.

[23] Johnson GL. Defining MAPK interactomes[J]. ACS Chem Biol, 2011, 6(1): 18-20.

[24] Wang JY, Yang HO, Si YR, *et al*. Iodine promotes tumorigenesis of thyroid cancer by suppressing miR-422a and up-regulating MAPK1[J]. Cell Physiol Biochemi, 2017, 43(4): 1325-1336.

[25] Kane LP, Weiss A. The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3[J]. Immunol Rev, 2003, 192: 7-20.

[26] Ouyang S, Zeng Q, Tang N, *et al*. Akt-1 and Akt-2 differentially regulate the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling proliferation of thymus-derived regulatory T cells[J]. J Immunol, 2019, 202(5): 1441-1452.

[27] 郑婷婷, 许铖铖, 毛朝明, 等. IL-23通过PI3K/AKT途径诱导甲状腺上皮细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(7): 954-957.

[28] Lu Y, Xing C, Zhang C, *et al*. Promotion of IL-17/NF-κB signaling in autoimmune thyroid diseases[J]. Exp Ther Med, 2022, 25(1): 51.

[29] Zhang X, Chen D, Xu K, *et al*. Deciphering the metabolomics-based intervention of Yanghe decoction on Hashimoto's thyroiditis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 6215573.

(编辑：虞 瑛)