·实验研究·

# 淫羊藿醇提物体外对乙型肝炎病毒抑制作用及机制探析

郑艳芳[1,2],赵　旭[2],曹梦珍[2],葛斐林[2],思兰兰[3],李　乐[3],王伽伯[2],刘　妍[3],肖小河[1,2]
(1 福建中医药大学药学院,福州 350122; 2 中国人民解放军总医院第五医学中心肝病医学部研究所,北京 100039; 3 中国人民解放军总医院第五医学中心感染病医学部研究所,北京 100039)

**[摘要]** **目的:**基于体外实验和网络药理学方法探究淫羊藿(epimedii folium,EF)醇提物对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)的抑制作用及潜在机制。**方法:**使用 EF 醇提物处理野生型 HBV 稳定复制细胞系 HepG 2.2.15 细胞,采用 CCK8 法进行药物毒性评价;应用 PCR-荧光探针"一管法"、ELISA 法检测乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)水平,计算抑制率;利用 TCMSP,GeneCards 数据库筛选 EF 主要活性成分及 HBV 相关靶点,借助 Cytoscape 软件构建药物-活性成分-潜在疾病靶点网络,对核心靶点运用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。**结果:**EF 醇提物单独用药对 HepG 2.2.15 细胞的半数毒性浓度($CC_{50}$)值为 1.21 $mg·mL^{-1}$;对 HBV DNA 最大抑制率为 59.54%,对 HBsAg 和 HBeAg 最大抑制率分别为 63.07% 和 45.73% ($P<0.05$);对照药替诺福韦酯(tenofovir disoproxil fumarate, TDF)对 HBsAg 和 HBeAg 均未见明显抑制作用(抑制率 <20.00%)。EF 醇提物联合 TDF 对 HBV DNA 的最大抑制率为 93.66%,对 HBsAg 和 HBeAg 的最大抑制率分别为 54.97% 和 61.28% ($P<0.05$)。通过网络药理学分析共筛选出 EF 23 个候选活性成分及 104 个治疗 HBV 潜在靶点;GO 富集分析得到 624 个条目,包括生物过程 442 个、细胞组分 73 个、分子功能 109 个;KEGG 分析主要聚集在癌症通路、PI3K-Akt、脂质与动脉粥样硬化、人类乳头瘤病毒感染、乙型肝炎等信号通路。**结论:**EF 可有效抑制野生型 HBV 复制,和 TDF 联合用药有协同抑制作用,尤其对抗原抑制效果显著;EF 抗 HBV 具有多成分多靶点的作用特点,预测可以通过多条信号通路发挥作用,为后续深入探讨 EF 治疗 HBV 感染作用机制提供了理论基础。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒;淫羊藿醇提物;替诺福韦酯;抗病毒作用;网络药理学

**[中图分类号]** R965　　**[文献标志码]** A　　**[文章编号]** 1003-3734(2023)14-1458-09

# Inhibitory effect and mechanism of Epimedii Folium ethanol extract on hepatitis B virus *in vitro*

ZHENG Yan-fang[1,2],ZHAO Xu[2],CAO Meng-zhen[2],GE Fei-lin[2],SI Lan-lan[3],LI Le[3],WANG Jia-bo[2],LIU Yan[3],XIAO Xiao-he[1,2]
(1 *College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine*,*Fuzhou* 350122,*China*; 2 *Department of Hepatology, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital*, *Beijing* 100039,*China*; 3 *Department of Infectious Diseases, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital*, *Beijing* 100039,*China*)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effect and potential mechanism of Yinyanghuo (epimedii folium,EF) alcohol extract on hepatitis B virus (HBV) based on *in vitro* experiments and network pharmacology.

[基金项目] 国家自然科学基金重点资助项目(81930110);国家自然科学基金创新群体资助项目(81721002)

[作者简介] 郑艳芳,女,硕士研究生,主要从事临床中药学研究。联系电话:(010)66933231,E-mail: 1301460250@qq.com。

[通讯作者] 刘妍,女,副研究员,主要从事中药抗病毒作用研究工作。联系电话:(010)66933231, E-mail: liuyan5360@163.com。肖小河,男,研究员,主要从事中药鉴定学和临床中药学工作。联系电话:(010)66933322,E-mail: pharmacy_302@126.com。

**Methods**: The wild-type HBV stably replicating cell line HepG 2.2.15 cells were treated with EF alcohol extract and the drug toxicity was evaluated using CCK8 assay. The HBV DNA, HBsAg and HBeAg levels were detected by PCR-fluorescent probe "one-tube method" and ELISA, and the inhibition rate was calculated. The TCMSP and GeneCards databases were used to screen the main active ingredients of EF and HBV-related targets, and the drug-active ingredient-potential disease target network was constructed with Cytoscape software. GO and KEGG enrichment analyses were performed on the core targets using the DAVID database. **Results**: The $CC_{50}$ value of EF alcohol extract alone on HepG 2.2.15 cells was 1.21 $mg \cdot mL^{-1}$, and the maximum inhibition rates for HBV DNA, HBsAg and HBeAg were 59.54%, 63.07% and 45.73%, respectively ($P < 0.05$). While the control drug tenofovir disoproxil fumarate (TDF) did not show significant inhibition for both HBsAg and HBeAg (inhibition rate <20.00%). The maximum inhibition rate of EF alcohol extract combined with TDF was 93.66% on HBV DNA, and the maximum inhibition rates on HBsAg and HBeAg were 54.97% and 61.28%, respectively ($P < 0.05$). A total of 23 candidate active ingredients of EF and 104 potential targets for HBV treatment were screened by network pharmacology analysis. GO enrichment analysis yielded 624 entries, including 442 biological processes, 73 cellular components and 109 molecular functions; and the KEGG analysis mainly focused on signaling pathways such as cancer pathway, PI3K-Akt, lipids and atherosclerosis, human papillomavirus infection and hepatitis B. **Conclusion**: EF can effectively inhibit the replication of wild-type HBV, and the combination of EF and TDF has a synergistic inhibitory effect, especially on antigen inhibition. EF has the characteristics of multi-component and multi-target action against HBV, which can be predicted to play roles through multiple signaling pathways. The findings provide a theoretical basis for subsequent in-depth exploration of the mechanism of EF in the treatment of HBV infection.

[**Key words**] hepatitis B virus; epimedii folium alcohol extract; tenofovir disoproxil fumarate; antiviral effect; network pharmacology

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染不但可导致急性和慢性乙型肝炎,而且会增加机体发生肝硬化和肝细胞癌风险[1]。HBV 感染影响全球约 2.57 亿人,全球每年因 HBV 感染相关肝病死亡人数约 88.7 万人[2]。我国慢性 HBV 感染者约 9 300 万例,慢性乙型肝炎向肝硬化进展的患者每年约 372 万例,由肝硬化引起的肝细胞癌每年约 465 万例[3]。当前核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogues,NAs]是国际和国内指南推荐的临床主要抗 HBV 药物,其靶向乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)聚合酶/逆转录酶,但不能彻底根除 HBV 复制模板共价闭合环状 cccDNA,因此需要长期服用,但是单独长期使用 NAs 容易产生剂量依赖性和耐药性[4],且很难达到"乙肝功能性治愈"目标[即连续给药后在血清中检测不到乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和 HBV DNA[5]]。因此,迫切需要寻找新的治疗药物,以提高乙型肝炎的临床治愈水平。在我国,中药治疗乙型肝炎历史悠久,经研究证实,其治疗 HBV 感染具有耐药性低、毒副作用小和预后良好的效果[6]。

淫羊藿(EF)为小檗科淫羊藿属植物,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿、益精气、强心力的作用,现代药理研究证实其还具有抗病毒、提高免疫力等功效,而且研究发现含 EF 的复方制剂治疗 HBV 感染疗效显著[7-9]。虽然含有 EF 的复方制剂在临床上被广泛应用,但是目前对 EF 治疗 HBV 感染缺乏更加系统、深入的研究,所以对新靶点和新机制的探究就显得尤为重要。本研究分别以 EF 醇提物单独或联合替诺福韦酯(TDF)作用于野生型 HBV 复制细胞系 HepG 2.2.15 细胞,评价 EF 醇提物对 HBV 抑制效果。继而运用网络药理学方法探究 EF 醇提物抗 HBV 的潜在作用机制,为深入研究 EF 治疗 HBV 感染的作用机制提供参考。

## 材料与方法

### 1 药品、细胞与试剂

EF 生品饮片(产地:甘肃,批号:211201,安国市

安兴中药饮片有限公司),经解放军总医院第五医学中心肖小河教授鉴别为小檗科植物淫羊藿(*Epimedium brevicornu* Maxim.)的干燥叶。HBV 稳定复制型 HepG 2.2.15 细胞是 D 基因型/ayw 亚型野生 HBV 稳定复制细胞系,由解放军总医院第五医学中心原病毒性肝炎研究室细胞库保藏;TDF(葛兰素史克公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(FBS,德国 PAN-biotech 公司);Cell Counting Kit-8(CCK8)细胞增殖-毒性检测试剂盒(日本同仁化学研究所);ELISA 试剂盒(北京万泰公司);HBV 定量检测试剂盒(北京纳捷诊断公司)。

## 2 EF 醇提物的制备

称取 EF 叶片 20 g,按照料液比(1∶100)精密加入 2 000 mL 70% 乙醇,置 3 000 mL 烧杯中,超声处理(功率 400 w)1 h,冷却后称定重量,用 70% 乙醇补足减失的重量,混匀后过滤,取续滤液置大烧杯中;旋转蒸发仪进行浓缩,50 ℃,转速为 80 $r\cdot min^{-1}$,得到浓缩液,再利用圆底离心管进行分装,置于真空离心冷冻浓缩仪进行干燥,得浸膏粉(每克含生药 4.37 g)分装备用。

## 3 细胞培养及 CCK8 法检测细胞增殖

配制 DMEM 完全培养基(10% FBS、2% 青霉素、链霉素),传代培养 HepG 2.2.15 细胞。实验设置为空白组、模型组和给药组;取对数生长期细胞,模型组和给药组按照 $1\times10^4$ 细胞·孔$^{-1}$铺板于 96 孔板中,空白组加入等体积的 DMEM 完全培养基,培养箱孵育 18 h;待细胞贴壁后弃去上清液,给药组加入含有不同浓度 EF 醇提物的 DMEM 完全培养基(浓度设置为 0,0.012 5,0.025,0.05,0.1,0.2,0.4,0.8,1.6 $mg\cdot mL^{-1}$),每孔 100 μL,空白组和模型组加入等体积的 DMEM 完全培养基,每组设置 6 个复孔,分别培养 24,72 和 120 h,在每个时间段检测时,弃除上清液,加入 CCK8 工作液(CCK8∶DMEM = 1∶10)继续孵育 1 h,在 450 nm 波长处检测吸光度(OD)值,计算细胞存活率以确定后续安全用药浓度。

## 4 EF 醇提物对 HBV 抑制作用研究

取对数生长期的 HepG 2.2.15 细胞,加入 2 mL 0.25% 胰酶消化 2 min,消化完全后,再加入 4 mL DMEM 完全培养基终止消化,实验设置为模型组和给药组,以 $2\times10^4$ 细胞·孔$^{-1}$铺种于 48 孔板,培养箱孵育 18 h 弃去上清液,给药组加入含有不同浓度 EF 醇提物的 DMEM 完全培养基(0.05,0.1,0.2,0.4 $mg\cdot mL^{-1}$)或 TDF(0.2,2,20,200 $\mu mol\cdot L^{-1}$),每孔 200 μL,模型组加入等体积的 DMEM 完全培养基,每组设置 3 个复孔,分别培养 24,72 和 120 h,收集各时间段样品上清液,应用 PCR-荧光探针"一管法"对细胞上清液 HBV DNA 滴度进行检测,确定 EF 醇提物对 HBV DNA 的抑制作用;采用双抗体夹心法检测细胞上清液 HBsAg 和乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)水平,使用酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔吸光度(OD)值,计算 HBsAg,HBeAg 抑制率。HBsAg/HBeAg 抑制率 = 100% -(各组细胞上清 HBsAg/HBeAg 的 OD 值/对照组细胞上清 HBsAg/HBeAg 的 OD 值)×100%。

## 5 EF 醇提物联合 TDF 对 HBV 抑制作用研究

HepG 2.2.15 细胞以 $2\times10^4$ 细胞·孔$^{-1}$铺种于 48 孔板,培养箱孵育 18 h 弃去上清液。选择 0.4 $mg\cdot mL^{-1}$的 EF 醇提物(记作 EF-0.4),分别与 0.2,2,20,200 $\mu mol\cdot L^{-1}$的 TDF(记作 T)联合,即按照:0,EF-0.4,0.2 $\mu mol\cdot L^{-1}$ TDF,EF-0.4 + 0.2 $\mu mol\cdot L^{-1}$ TDF,2 $\mu mol\cdot L^{-1}$ TDF,EF-0.4 + 2 $\mu mol\cdot L^{-1}$ TDF,20 $\mu mol\cdot L^{-1}$ TDF,EF-0.4 + 20 $\mu mol\cdot L^{-1}$ TDF,200 $\mu mol\cdot L^{-1}$ TDF,EF-0.4 + 200 $\mu mol\cdot L^{-1}$ TDF 组合形式。分别作用 HepG 2.2.15 细胞 120 h,按照 HBV DNA,HBsAg,HBeAg 检测试剂盒说明书进行检测分析。

## 6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,若数据符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析最小显著差检验法(LSD)检验法统计分析,若方差不齐,采用单因素方差分析 Games-Howell 检验法统计;若不符合正态分布,则采用非参数检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 7 EF 活性成分筛选及作用靶点收集和预测

利用 TCMSP 数据库(TCMSP,http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php)检索 EF 所有活性成分,以口服生物利用度(oral bioavailability,OB)≥30% 和类药性(drug likeness,DL)≥0.18 作为阈值,筛选出 EF 中具有较好成药性的候选化合物。采用 TCMSP 数据库检索并整理获取 EF 活性成分对应靶点,为了提高数据的标准性及统一性,进一步运用 Uniprot 数据库(https://www.uniprot.org/),查询其蛋白靶点所对应的人类基因名称并匹配整理药物靶点。在 Genecards 数据库,以"homo species"和"hepatitis B"为关键词进行检索,获取 HBV 相关的所有基因。对该结果与 EF 有效成分靶点对应取交集,最终获得

EF 抗 HBV 关键作用靶点。

### 8 药物-活性成分-潜在疾病靶点网络图的构建

将筛选的 EF 活性成分对应靶点基因与 HBV 相关靶点基因进行匹配,获得二者的共同基因即为 EF 抗 HBV 关键靶点。采用 Cytoscape 3.9.1 软件绘制“药物-活性成分-关键靶点基因”关系网络。网络中节点(node)分别代表药物、药物活性成分和关键靶点基因;网络中边(edge)用来连接药物-活性成分,活性成分-疾病靶点;图中节点连接线多少用度(degree)表示。此网络图的外围节点代表疾病与药物活性成分的关键靶点基因;网络中显示的是药物的活性成分。整个网络展示药物-活性成分-疾病靶点之间的联系,通过构建这一网络探析 EF 抗 HBV 的作用机制。

### 9 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建和关键靶点筛选

将 EF 抗 HBV 的潜在靶点导入到 STRING 数据库(https://string-db.org/),限定物种为“Homo sapiens”进行检索,将最低相互作用阈值设为中等置信度(medium confidence)0.4,其余参数保持默认设置,构建 EF 抗 HBV 作用靶点的 PPI 网络图,结果以 TSV 格式导出。网络图中靶蛋白以节点呈现,连接边以不同颜色表示其功能的相关性。

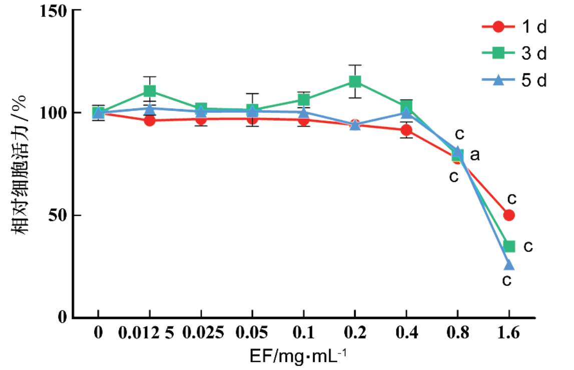
### 10 关键靶点 GO 和 KEGG 通路富集分析

将关键靶点基因输入到 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov/),分别得到基因本体(gene ontology,GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)信号通路富集分析,获得 EF 抗 HBV 的生物过程(biological process,BP)、分子功能(molecular function,MF)和细胞成分(cellular component,CC)。再通过微生信在线作图工具选取 $P$ 值排名靠前的结果以柱状图和气泡图形式展示。

## 结　　果

### 1 EF 醇提物对细胞增殖的影响

EF 醇提物在不同作用时间条件下,当 EF 醇提物 $>0.4\ \mathrm{mg\cdot mL^{-1}}$ 时,HepG 2.2.15 细胞活力下降趋势具有显著性差异。在最长作用时间(120 h)下,HepG 2.2.15 细胞半数毒性浓度($CC_{50}$)值为 1.21 $\mathrm{mg\cdot mL^{-1}}$(见图 1)。选择细胞活力≥90% 的药物浓度(HepG 2.2.15 细胞:EF≤0.4 $\mathrm{mg\cdot mL^{-1}}$,即 0,0.05,0.1,0.2,0.4 $\mathrm{mg\cdot mL^{-1}}$),进行后续抗 HBV 实验。

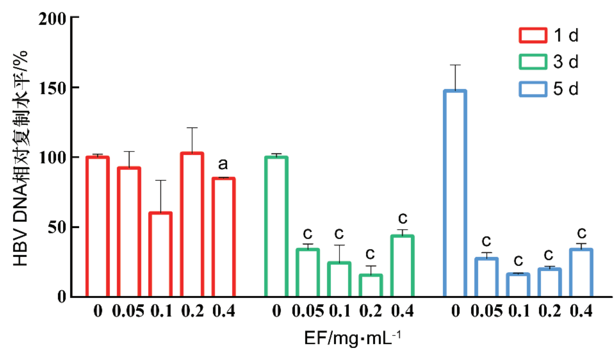



与空白对照组比较,a:$P<0.05$;b:$P<0.01$;c:$P<0.001$

**图 1** EF 醇提物对 HepG 2.2.15 细胞毒性评价

### 2 EF 醇提物作用在细胞不同时间条件下对 HBV DNA 的抑制作用分析

最大安全浓度为 0.4 $\mathrm{mg\cdot mL^{-1}}$ 的 EF 醇提物作用于 HepG 2.2.15 细胞 24,72,120 h 后对 HBV DNA 载量的抑制率分别为 15.11%,56.59% 和 66.02%(见图 2);随作用细胞时间延长,药物对 HepG 2.2.15 细胞中 HBV DNA 的抑制效果增强,因此选择药物最佳作用时长 120 h 进行后续实验。



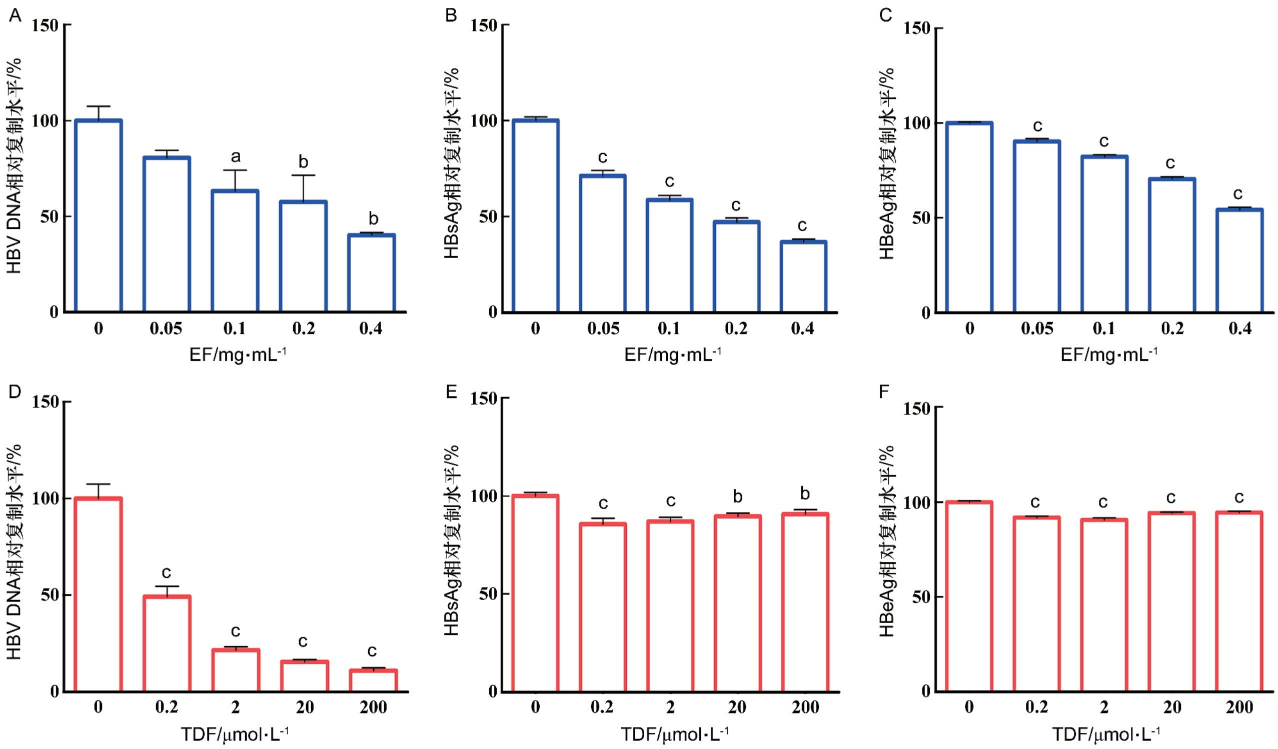

与空白对照组比较,a:$P<0.05$;b:$P<0.01$;c:$P<0.001$

**图 2** 不同作用时间下 EF 醇提物对 HepG 2.2.15 细胞 HBV DNA 的抑制效果

### 3 EF 醇提物对 HBV 抑制作用分析

最大安全浓度为 0.4 $\mathrm{mg\cdot mL^{-1}}$ 的 EF 醇提物、200 $\mu\mathrm{mol\cdot L^{-1}}$ 的 TDF 分别作用于 HepG 2.2.15 细胞 120 h 后,EF 醇提物对 HBV DNA 的抑制率为 59.54%,半抑制浓度($IC_{50}$)值为 0.25 $\mathrm{mg\cdot mL^{-1}}$(见图 3A),对 HBsAg 的抑制率为 63.07%,$IC_{50}$ 值为 0.18 $\mathrm{mg\cdot mL^{-1}}$(见图 3B),对 HBeAg 的抑制率为 45.73%,$IC_{50}$ 值为 0.45 $\mathrm{mg\cdot mL^{-1}}$(见图 3C);TDF 对 HBV DNA 的抑制率为 88.96%,$IC_{50}$ 值为 0.13 $\mu\mathrm{mol\cdot L^{-1}}$(见图

3D),对 HBsAg 的抑制率为 14.24%(见图 3E),对 HBeAg 的抑制率为 9.31%(见图 3F)。EF 醇提物对野生型 HBV 有抑制作用,尤其对 HBsAg,HBeAg 的抑制作用显著优于 TDF。

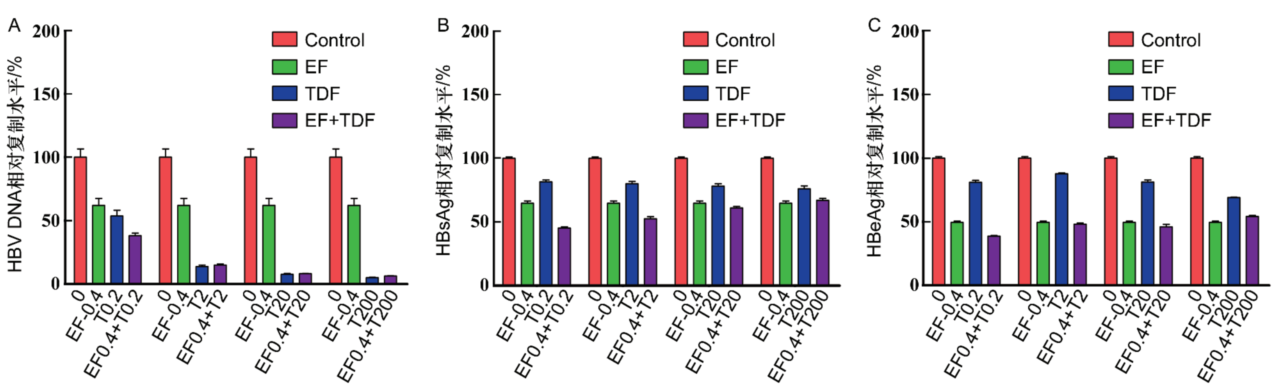



与空白对照组比较,a:$P<0.05$;b:$P<0.01$;c:$P<0.001$

**图 3** EF 醇提物和 TDF 单独用药对 HBV 抑制作用分析

## 4 EF 醇提物联合 TDF 对 HBV 抑制作用分析

最大安全浓度为 0.4 mg·mL$^{-1}$的 EF 醇提物与 TDF 按照 0,EF-0.4,0.2 μmol·L$^{-1}$ TDF,EF-0.4 + 0.2 μmol·L$^{-1}$ TDF,2 μmol·L$^{-1}$ TDF,EF-0.4 + 2 μmol·L$^{-1}$ TDF,20 μmol·L$^{-1}$ TDF,EF-0.4 + 20 μmol·L$^{-1}$ TDF,200 μmol·L$^{-1}$ TDF,EF-0.4 + 200 μmol·L$^{-1}$ TDF 组合形式,分别作用于 HepG 2.2.15 细胞 120 h 后对 HBV DNA 抑制率分别为 0.00%,37.92%,46.31%,36.84%,86.13%,84.99%,92.25%,91.80%,94.92%,93.66%(见图 4A);EF 醇提物联合 TDF 用药对野生型 HBsAg 的最大抑制率为 54.97%(见图 4B),对 HBeAg 的最大抑制率为 61.28%(见图 4C),二者联合应用显示协同抑制作用。




与空白对照组比较,a:$P<0.05$;b:$P<0.01$;c:$P<0.001$

**图 4** EF 醇提物联合 TDF 对 HBV 抑制作用分析

## 5 EF 的活性成分获取

检索 TCMSP 数据库并结合筛选条件:OB ≥ 30% 和 DL≥0.18,共获得 23 个候选活性成分,活性成分基本信息见表 1。

**表 1** EF 主要活性成分基本信息

| 分子 ID | 化合物名称 | OB/% | DL |
|---|---|---|---|
| MOL001510 | 24-epicampesterol | 37.58 | 0.71 |
| MOL001645 | linoleyl acetate | 42.1 | 0.2 |
| MOL001771 | poriferast-5-en-3beta-ol | 36.91 | 0.75 |
| MOL001792 | DFV | 32.76 | 0.18 |
| MOL003044 | chryseriol | 35.85 | 0.27 |
| MOL003542 | 8-Isopentenyl-kaempferol | 38.04 | 0.39 |
| MOL000359 | sitosterol | 36.91 | 0.75 |
| MOL000422 | kaempferol | 41.88 | 0.24 |
| MOL004367 | olivil | 62.23 | 0.41 |
| MOL004373 | anhydroicaritin | 45.41 | 0.44 |
| MOL004380 | C-homoerythrinan, 1,6-didehydro-3,15,16-trimethoxy-, (3. beta. )- | 39.14 | 0.49 |
| MOL004382 | Yinyanghuo A | 56.96 | 0.77 |
| MOL004384 | Yinyanghuo C | 45.67 | 0.5 |
| MOL004386 | Yinyanghuo E | 51.63 | 0.55 |
| MOL004388 | 6-hydroxy-11,12-dimethoxy-2,2-dimethyl-1,8-dioxo-2,3,4,8-tetrahydro-1H-isochromeno [3,4-h] isoquinolin-2-ium | 60.64 | 0.66 |
| MOL004391 | 8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenyl-chromone | 48.54 | 0.25 |
| MOL004394 | anhydroicaritin-3-O-alpha-L-rhamnoside | 41.58 | 0.61 |
| MOL004396 | 1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propan-1,3-diol | 52.31 | 0.22 |
| MOL004425 | icariin | 41.58 | 0.61 |
| MOL004427 | icariside A7 | 31.91 | 0.86 |
| MOL000006 | luteolin | 36.16 | 0.25 |
| MOL000622 | magnograndiolide | 63.71 | 0.19 |
| MOL000098 | quercetin | 46.43 | 0.28 |

## 6 EF 活性成分对应靶点与 HBV 相关靶点交集靶点的获取

通过检索 GeneCards 数据库共筛选出 3 679 个 HBV 相关靶点基因,与 169 个 EF 相关靶基因匹配后,交集得到 104 个 EF 抗 HBV 的关键作用靶点。

## 7 药物-活性成分-潜在疾病靶点网络构建与分析

将关键靶点导入 Cytoscape 软件进行网络构建及可视化分析(见图 5),图中"绿色"和"蓝色"菱形节点代表作用靶点,"红色"六边形节点代表 EF 活性成分。EF 中连接度前 10 位的潜在活性分子为 quercetin(槲皮素),kaempferol(山柰酚),luteolin(木犀草素),anhydroicaritin(脱水淫羊藿素),8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenyl-chromone, 8-isopentenyl-kaempferol, chryseriol, Yinyanghuo C, Yinyanghuo E, DFV,可认为是 EF 抗 HBV 的关键成分。

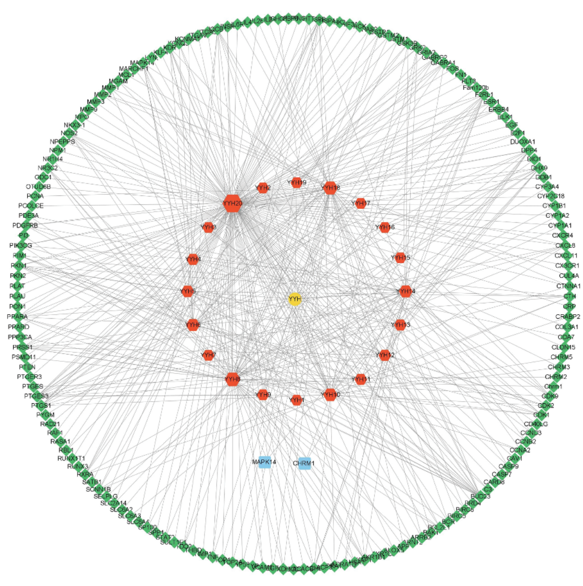


**图 5** 药物-活性成分-潜在疾病靶点网络

## 8 PPI 网络的构建和关键靶点筛选

将 EF 抗 HBV 的潜在关键靶点基因导入 STRING 数据库平台,选择物种为"Homo sapiens",获取蛋白质相互作用关系,利用该平台绘制蛋白关系网络(见图 6)。排除游离的(无相互作用蛋白),该网络图共包括 138 个节点,372 条边。用节点大小和颜色表示 degree 值大小,节点越大对应的 degree 值越大,颜色由红变蓝对应的 degree 值越大。用边的粗细表示 Combine score 值的大小,边越粗 Combine score 值越大。其中度值最高的 10 个节点为 TP53,VEGFA,TNF,FN1,CXCL8,EGF,MMP9,CXCR4,LYN,MAPK14,即可认为是靶点互作网络中 EF 抗 HBV 的关键靶点。

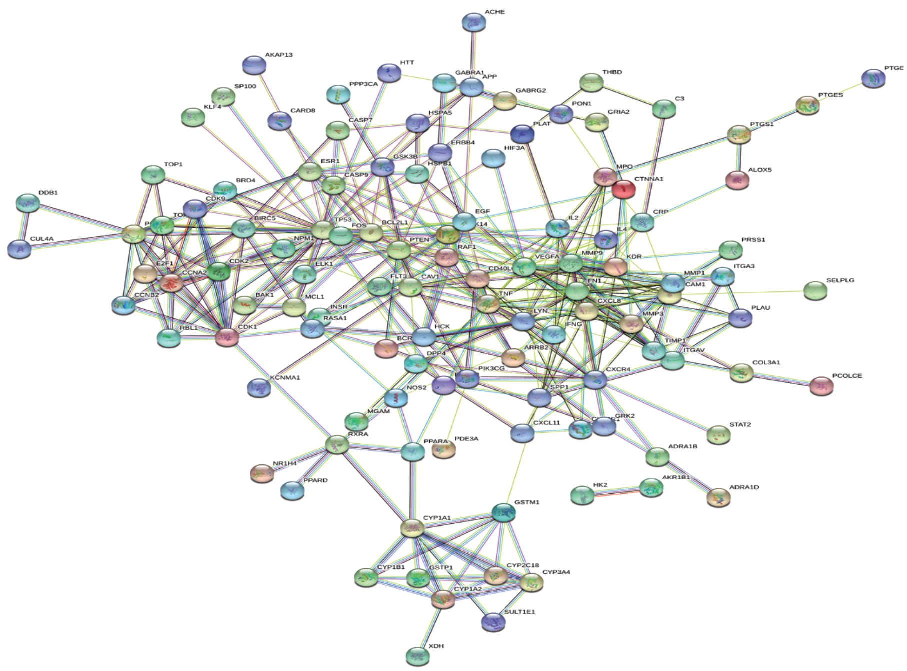


**图 6** EF-HBV 靶点蛋白相互作用网络

## 9 GO 及 KEGG 通路富集分析

为进一步阐明 EF-HBV 交集靶点的潜在作用,本研究运用 DAVID 数据库对 EF 抗 HBV 的潜在靶点进行 GO 生物学过程及 KEGG 信号通路富集分析。对关键靶基因校正后的 $P$ 值进行排序,选择前 10 个进行条形图展示(见图 7A)。

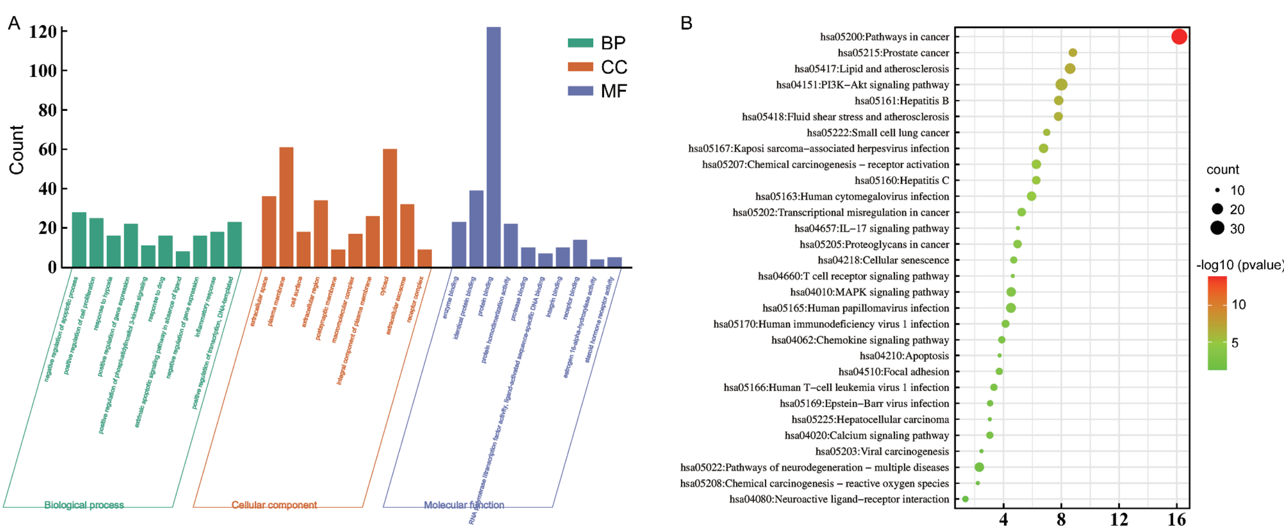



**图 7** EF 抑制 HBV 关键靶点 GO 及 KEGG 富集分析

得出 BP 442 条，涉及负调节凋亡过程、促进细胞增殖、对缺氧的反应、正向调控基因表达、正向调节磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）信号通路等；MF 109 条，涉及酶结合、相同的蛋白结合、蛋白结合、蛋白同源二聚体活性、蛋白酶结合等；CC 73 条，涉及细胞外间隙、细胞质膜、细胞表面、胞外区、突触后膜等。以上结果体现了 EF 可能通过调控多种生物学过程发挥对 HBV 的抑制作用。KEGG 共富集得到 118 条信号通路，对 *P* 值排名前 30 位的通路进行气泡图展示（见图 7B）。其中有癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、人类乳头瘤病毒感染、乙型肝炎通路等，表明 EF 能够通过多个信号通路发挥抗 HBV 作用。

## 讨　　论

HBV 感染是我国最严重的公共卫生问题之一[12]。HBV 基因型有 A，B，C，D，E，F，G，H 8 型，在我国 HBV 感染主要以 C 型和 B 型为主[13-14]。HepG 2.2.15 细胞系是经典的 D 基因型 HBV 细胞复制模型，无耐药突变位点[15]；而且能长期稳定支持 HBV 复制，可用于评价抗野生型 HBV 的药物活性。

目前，已批准上市的两大类抗病毒药物包括 NAs 和干扰素，干扰素因治疗不良反应明显，且治疗成本较高，限制了其临床广泛应用；NAs 作为目前临床用于治疗 HBV 感染的一线用药，患者长期服用会导致耐药率升高[16]。因此，寻找新的有效治疗 HBV 感染的药物已成为临床面临的新挑战。近年来，以天然药用植物为来源的抗 HBV 中药越来越受到人们的关注，EF 在我国资源极为丰富，化学成分多样，主要含有黄酮类化合物、木脂素、多糖类等多种活性物质[17]；目前，对于 EF 的研究主要集中在单体成分且以淫羊藿苷为代表的黄酮类化合物，有关 EF 水提物和醇提物的治疗作用也有报道，但迄今为止，有关 EF 醇提物对 HBV 的作用及机制研究尚未见报道。

本研究显示，EF 醇提物可有效抑制野生型 HBV 的复制能力，尤其对抗原抑制效果显著，EF 醇提物组对野生型 HBV 的 HBsAg 抑制率为 63.07%，优于 TDF 组（14.24%）；对 HBeAg 抑制率为 45.73%，优于 TDF 组（9.31%）。EF 醇提物抑制 HBV 复制作用明显，表明中药 EF 可能成为治疗 HBV 感染的一种新的选择。

中医药在治疗 HBV 感染方面具有独特的优点，采用辨病与辨证相结合的诊疗模式，利用中药多成分、多途径、多靶点整体调节的治疗优势，与 NAs 靶向病毒本身，抑制 HBV DNA 作用强方面的优势互补，为寻求药效最优化的治疗 HBV 感染方案提供理论依据。EF 醇提物联合 TDF 实验结果显示，EF 醇提物联合 TDF 对野生型 HBV DNA 具有协同抗病毒效应，对 HBV DNA 的最大抑制率为 93.66%，联用后针对野生型 HBV DNA 抑制作用显著优于 EF 醇提物单用（37.92%）；两药联用对野生型 HBsAg 的抑制率为 54.97%，相对于未用药组显著升高，优于单用 TDF 组（18.79%）；对 HBeAg 也有抑制效果，抑制率为 61.28%，优于单用 TDF 组（18.53%）。EF 醇提物与 TDF 联用后抗病毒效果较好，可以降低单药用药剂量，减少长期使用 NAs 所致的耐药问题。

此外，本研究从网络药理学的角度寻找 EF 治疗 HBV 感染的作用机制及潜在治疗靶点。“药物-活性成分-潜在疾病靶点”相互作用网络图显示，其中例如 quercetin（槲皮素），kaempferol（山柰酚），luteolin（木犀草素），匹配的靶点较多，是 EF 发挥治疗 HBV 感染作用的重要物质基础。研究表明，槲皮素、山柰酚、木犀草素均具有抗 HBV 作用[1,17-18]，槲皮素可抑制 HBV DNA，HBsAg 和 HBeAg 水平，但其具体机制尚不清楚[19]，木犀草素通过调节肝细胞核因子 4α（HNF 4α）的表达从而抑制 HBV 复制[20]，kaempferol（山柰酚）通过干扰 HBV 蛋白来抑制 HBV 活性[21]。通过 PPI 网络分析筛选得到的核心靶点例如 TP53，VEGFA，TNF 等，预测它们可能是 EF 治疗 HBV 感染的主要靶标。研究表明，*TP53* 基因在 HBV 相关的肝细胞癌肿瘤中显著下调，提示 TP53 在肝细胞癌中起抑制肿瘤的作用[22-23]；HBV 的小包膜蛋白（SHBs）诱导内质网（ER）应激，从而激活未折叠蛋白反应（UPR）信号，增加 VEGFA 的表达和分泌，在 HBV 相关肝癌中发挥重要的促血管生成作用[24]。而 TNF-α 多态性与 HBV 易感性程度有关，影响 HBV 的病程与转归[25]。根据 KEGG 通路富集分析的结果得知 EF 主要通过调节癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、乙型肝炎通路等信号通路来发挥治疗 HBV 感染的作用，一项研究表明，PI3K-Akt 信号通路被认为是 HBV 复制的负调控因子，该信号通路抑制剂 Ly294002 可作为抑制表面抗原分泌药物开发的工具[26]。网络药理学分析初步验证了 EF 治疗 HBV 感染作用机制，为后续深入研究 EF 治疗 HBV 感染的分子机制奠定了基础。

综上所述,本研究采用体外药效学评价和网络药理学相结合的策略,解释了 EF 醇提物可有效抑制野生型 HBV 的复制能力和抗原表达,并初步揭示了 EF 在抗 HBV 方面的可能机制,也为进一步研究中药抗 HBV 潜在的治疗靶点提供线索。中药是多个成分从综合方面协同抗病毒,而非单一成分起作用,我们可以充分利用其自身这一优势,结合已有的一线治疗药物,为临床合理安全治疗 HBV 感染提供备选方案。

## [ 参 考 文 献 ]

[1] GE FL, SI LL, YANG Y, *et al*. Chinese patent medicine liuweiwuling tablet had potent inhibitory effects on both wild-type and entecavir-resistant hepatitis B virus (HBV) *in vitro* and effectively suppressed HBV replication in mouse model[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 756975.

[2] REVILL PA, CHISARI FV, BLOCK JM, *et al*. A global scientific strategy to cure hepatitis B[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(7): 545 - 558.

[3] 张莹, 聂红明, 汪蓉, 等. 乙型肝炎及其慢性化机制研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志, 2021, 31(6): 569 - 573.

[4] PERRILLO R. Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2009, 49(Suppl 5): S103 - S111.

[5] TESTONI B, LEVRERO M, ZOULIM F. Challenges to a cure for HBV infection[J]. *Semin Liver Dis*, 2017, 37(3): 231 - 242.

[6] 朱文凯, 梁海燕, 马平川, 等. 中药抗病毒活性及其作用机制的研究进展[J]. 江苏中医药, 2019, 51(6): 86 - 89.

[7] 李刚, 许波, 梁学振, 等. 基于网络药理学研究淫羊藿抗骨质疏松的分子机制[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(2): 267 - 273.

[8] 何丽君, 江金井, 陈豪, 等. 淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(2): 17 - 20.

[9] 董文玲. 益气解毒方治疗无症状乙肝病毒携带者 60 例[J]. 光明中医, 2008, 23(2): 218.

[10] 马堃, 宫林娟, 陈燕霞, 等. 基于网络药理学和分子对接研究补肾促卵方治疗多囊卵巢综合征不孕的分子机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2650 - 2659.

[11] 陈健, 陈启龙. 网络药理学在中医药研究中的现状及思考[J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(5): 1 - 6, 13.

[12] 刘芷希, 汪业胜, 王伟炳. 中国 1990 - 2017 年乙型肝炎疫情的变化趋势研究[J]. 中华流行病学杂志, 2021, 42(4): 613 - 619.

[13] 武甜甜, 张翔. HBV 基因型的研究现状与发展趋势探讨[J]. 传染病信息, 2022, 35(4): 366 - 371.

[14] LI HM, WANG JQ, WANG R, *et al*. Hepatitis B virus genotypes and genome characteristics in China[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(21): 6684 - 6697.

[15] SELLS MA, CHEN ML, ACS G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(4): 1005 - 1009.

[16] TERRAULT NA, LOK ASF, MCMAHON BJ, *et al*. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance[J]. *Hepatology*, 2018, 67(4): 1560 - 1599.

[17] 李英, 张小龙, 杨晶, 等. 淫羊藿中黄酮类成分研究[J]. 中草药, 2015, 46(14): 2057 - 2061.

[18] ALAM P, PARVEZ MK, ARBAB AH, *et al*. Quantitative analysis of rutin, quercetin, naringenin, and Gallic acid by validated RP- and NP-HPTLC methods for quality control of anti-HBV active extract of Guiera senegalensis[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1317 - 1323.

[19] PARVEZ MK, AHMED S, AL-DOSARI MS, *et al*. Novel anti-hepatitis B virus activity of Euphorbia schimperi and its quercetin and kaempferol derivatives[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(43): 29100 - 29110.

[20] CHENG ZK, SUN G, GUO W, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus replication by quercetin in human hepatoma cell lines[J]. *Virol Sin*, 2015, 30(4): 261 - 268.

[21] BAI L, NONG YH, SHI Y, *et al*. Luteolin inhibits hepatitis B virus replication through extracellular signal-regulated kinase-mediated down-regulation of hepatocyte nuclear factor 4α expression[J]. *Mol Pharmaceutics*, 2016, 13(2): 568 - 577.

[22] GAO Q, ZHU HW, DONG LQ, *et al*. Integrated proteogenomic characterization of HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Cell*, 2019, 179(5): 1240.

[23] HUANG FY, WONG DK, TSUI VW, *et al*. Targeted genomic profiling identifies frequent deleterious mutations in FAT4 and TP53 genes in HBV-associated hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 789.

[24] WU SX, YE SS, HONG YX, *et al*. Hepatitis B virus small envelope protein promotes hepatocellular carcinoma angiogenesis via endoplasmic reticulum stress signaling to upregulate the expression of vascular endothelial growth factor A[J]. *J Virol*, 2022, 96(4): e0197521.

[25] WOZIWODZKA A, RYBICKA M, SZNARKOWSKA A, *et al*. TNF-α polymorphisms affect persistence and progression of HBV infection[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(10): e00935.

[26] XIANG KL, WANG B. Role of the PI3K-AKT-mTOR pathway in hepatitis B virus infection and replication[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4713 - 4719.

编辑:毕晓帆/接受日期:2023 - 02 - 22