

基于网络药理学和动物实验探讨当归补血汤抗肝纤维化的作用

陶柏楠¹, 王咏兰¹, 刘道忠¹, 万 星², 黄德斌¹, 袁 林^{1*}
(1. 湖北民族大学风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000; 2. 四川大学华西基础医学与法医学院, 四川 成都 610064)

摘要: **目的** 基于网络药理学和动物实验验证探讨当归补血汤抗肝纤维化的作用机制。**方法** 通过检索 TCMSP、TCMID 数据库筛选出当归补血汤活性成分, 运用 PubChem 平台获取靶点 Canonical SMILES 号, SwissTarget、TargetNet 数据库筛选出当归补血汤对应的靶点, 通过 GeneCards、OMIM 和 TTD 数据库检索获得肝纤维化相关疾病靶点, Venny 2.1.0 获取当归补血汤活性成分靶点与肝纤维化的交集疾病靶点; STRING 数据库获取 PPI 网络, Cytoscape 3.9.1 软件获取核心靶点, 构建“药物-活性成分-靶点”网络; DAVID 数据库对核心靶点进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析, 并进行可视化处理。动物实验验证网络药理学预测结果, 采用腹腔注射 CCl₄ 制备肝纤维化小鼠模型, 造模同时给药, 持续 6 周; 采用 HE、Masson 染色观察肝组织病理学变化, 试剂盒检测血清 ALT、AST 水平, ELISA 法检测血清 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平, Western blot 法检测肝组织 α-SMA、Col-1、p-PI3K、p-Akt、p-JNK、p-P38 MAPK 蛋白表达。**结果** 从当归补血汤中筛选得到作用于肝纤维化的活性成分 29 种, 肝纤维化相关疾病靶点 2 901 个, 药物与疾病有 259 个交集基因, 核心靶点为 MAPK、c-Jun、Akt 等。KEGG 通路富集分析主要涉及癌症通路、PI3K/Akt 信号通路、乙型肝炎、脂质与动脉硬化信号通路、MAPK 信号通路等。动物实验结果表明, 当归补血汤能够下调肝纤维化小鼠血清 ALT、AST、IL-6、TNF-α、IL-1β 水平和肝组织 α-SMA、Col-1、p-PI3K、p-Akt、p-JNK、p-P38 MAPK 蛋白表达。**结论** 当归补血汤可通过多组分、多靶点、多通路发挥抗肝纤维化作用, 其机制可能与下调炎症因子释放, 调节 PI3K/Akt 和 JNK/P38 MAPK 信号通路相关。

关键词: 当归补血汤; 肝纤维化; 网络药理学; 炎症因子; PI3K/Akt 信号通路; JNK/P38 MAPK 信号通路

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)02-0651-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.051

肝纤维化的发病率很高, 通常见于高脂肪饮食、酗酒、乙型肝炎 (HBV) 感染^[1]。在病理性肝纤维化肝脏中, 主要表现为肝细胞损伤和肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 活化, 进而产生细胞外基质 (ECM) 沉积的过程^[2]。肝纤维化是肝损伤发展为肝硬化、肝癌等危重疾病的中间阶段, 在早期是可逆的, 但在肝硬化阶段会发展为肝细胞癌前病变^[3-4]。因此, 阻止肝纤维化的发生发展具有重要意义。由于肝纤维化机制复杂且临床治疗药物疗效有限, 因而研究与开发治疗肝纤维化特效药物尤为关键^[5-6]。传统中医药有多靶点、多环节等特点, 在抗肝纤维化方面有其独特优势。

当归补血汤是中医经典方剂, 由黄芪和当归以 5 : 1 的比例组成, 其中当归属肝、心、脾经, 具有活血、补血功效^[7]; 黄芪属肺、脾经, 具有补气、固表功效^[8], 该方在临床常用来治疗正虚血瘀类疾病。且现代药理学研究表明, 当归补血汤抗肝纤维化有显著效果, 有改善肝功能、抗肝脏脂质过氧化损伤、降低肝组织羟脯氨酸 (Hyp) 水平、减少 ECM 沉积等作用^[9-12]。尽管当归补血汤在抗肝纤维化

方面有一定研究, 但对于其抗肝纤维化的具体作用机制的探究仍然十分有限。本研究利用网络药理学构建“药物-成分-作用靶点-疾病”网络, 分析其相关生物学途径, 预测当归补血汤抗肝纤维化的作用靶点及信号通路, 并运用体内动物实验对相关通路和靶点进行验证, 以期为中医药防治肝纤维化提供新思路。

1 材料

1.1 动物 48 只雄性 C57BL/6 鼠, 6~8 周龄, 购自重庆医科大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (渝) 2018-0003], 普通喂养 7 d 后开始实验, 控制饲养室温 (22±2)℃, 相对湿度 (55±15)%。实验所有操作均通过湖北民族大学医学伦理会审查批准 (伦理号 2022-047)。

1.2 药物 当归补血汤由当归、黄芪 (甘肃九州天润中药产业有限公司, 批号 G01220507、G031903141) 组成。根据《《内外伤辨惑论》中记载用量, 称取黄芪 500 g、当归 100 g, 用水煎煮 2 次, 过滤, 将滤液混合, 于旋转蒸发仪中将药液浓缩至 2.16 g/mL, 再根据所需剂量稀释使用。水飞蓟宾胶囊 (天津天士力圣特制药有限公司, 批号

收稿日期: 2023-07-05
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560675); 湖北省卫健委面上项目 (ZY2019M076)
作者简介: 陶柏楠 (1996—), 男, 硕士生, 研究方向为中医药防治肝胆疾病。Tel: 13355244267, E-mail: 2373247494@qq.com
* 通信作者: 袁 林 (1974—), 男, 博士, 副教授, 从事中医药及民族医药开发与研究。Tel: 18986842468, E-mail: 171354806@qq.com

H20040299)。

1.3 试剂 ALT、AST 试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号 20220927）；SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，批号 P0012A）；IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒（杭州联科生物技术有限公司，批号 EK201B/3-96、EK282/3-96、EK206/3-96）； β -actin 抗体（美国 Proteintech 公司，批号 18725-1-AP）；PI3K、p-PI3K 抗体（武汉华美生物工程有限公司，批号 CSB-RA578819A0HU、CSB-PA000712）；Akt、p-Akt、P38 MAPK、p-P38 MAPK 抗体（美国 CST 公司，批号 4691、4060、D13E1、4511）；JNK、p-JNK 抗体（沈阳万类生物科技有限公司，批号 WL01295、WL01813）；HRP 标记兔抗、鼠抗（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号 GB23204、GB23301）；BCA 试剂盒、ECL 化学发光剂（武汉科瑞生物技术有限公司，批号 KR0008、KR0016）；其他化学试剂为国产分析纯。

1.4 仪器 垂直电泳仪、蛋白转印仪（美国 Bio Rad 公司）；纯水制备机（上海乐枫生物科技有限公司）；高压蒸汽灭菌锅（日本 SANYO 公司）；多功能酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；低速离心机、高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；FM40 制冰机（北京长流科学仪器有限公司）；红细胞超声仪（南京舜玛仪器设备有限公司）；脱色摇床（北京六一生物科技有限公司）；倒置生物显微镜（日本 Olympus 公司）。

2 方法

2.1 当归补血汤抗肝纤维化的网络药理学研究

2.1.1 筛选药物有效成分及药物靶点 在 TCMSP 和 TCMID 数据库，分别以关键词“当归”“黄芪”检索，根据 2 味药物口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 以及 2020 年版《中国药典》2 味药物质量控制成分并结合文献中报道当归补血汤配伍有效成分纳入分析。从 TCMSP 和 TCMID 数据库中检索化合物靶点，并运用 PubChem 平台 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取靶点 Canonical SMILES 号，SMILES 号导入至 SwissTarget Prediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>)，设置物种为“*Homo sapiens*”，筛选条件为 Probability ≥ 0.1 ，Targetnet 数据库 (<http://targetnet.scbdd.com/calcnnet/index/>) 设置筛选条件为 AUC ≥ 0.7 ，将以上数据库预测到的靶点进行整合，去除重复靶点，并通过 UniProt 数据库校正，得到靶蛋白的基因名。

2.1.2 获取疾病的靶点 登录基因数据库 (GeneCards, <https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传病数据库 (OMIM, <https://www.omim.org/>) 和疗效药靶数据库 (TTD, <https://db.idrblab.net/ttd/>)，以“liver fibrosis”为检索词获取疾病靶点，去除重复基因，结合 UniProt 数据库将靶点名标准化，确定肝纤维化的潜在作用靶点。在 Venny 2.1.0 平台中将当归补血汤的有效成分及肝纤维化的相关基因靶点取交集，绘制韦恩图。

2.1.3 构建“药物-成分-疾病-靶点”网络 建立当归补血汤“药物-活性成分”“活性成分-疾病-靶点”相互对应关系数据集，导入 Cytoscape 3.9.1 软件中构建“药物-成分-疾病-靶点”网络。

2.1.4 蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建及核心靶点筛选 将当归补血汤作用于肝纤维化的交集靶点导入 String 数据库 (<https://cn.stringdb.org/>) 构建 PPI 网络，设定物种为“*Homo sapiens*”，置信度为 0.9，去除游离靶点，导入 Cytoscape 3.9.1 软件根据交集靶点对药物有效成分。Analyze Network 进行拓扑学参数分析，并通过 degree 排序，构建“当归补血汤成分-疾病靶点”网络图。其中节点越大，颜色越深，表明该节点 degree 值越高，即该靶点的作用越关键。

2.1.5 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 使用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 将潜在作用靶点导入数据库，设定条件 $P < 0.05$ ，进行基因本体 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析，并在微信网 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 分析绘制 GO 功能富集分析柱状图和 KEGG 通路富集气泡图。

2.2 当归补血汤对 CCl₄ 诱导 C57BL/6 小鼠肝纤维化的作用

2.2.1 造模、分组与给药 随机数字表法将小鼠分为正常组、模型组、水飞蓟宾组和当归补血汤低、中、高剂量组，每组 8 只。小鼠适应性喂养 7 d 后，模型组小鼠腹腔注射 25% 橄榄油四氯化碳 (CCl₄) 混合溶液 1.6 mL/kg 造模^[13]，每周 2 次，连续 6 周。各组在造模的同时给药，根据人与大鼠体表面积换算标准^[14]，水飞蓟宾组灌胃给予 54.6 mg/kg 水飞蓟宾；当归补血汤低、中、高剂量组分别灌胃给予 5.4、10.8、21.6 g/kg 当归补血汤，分别相当于人临床用量的 1、2、4 倍；正常组和模型组灌胃给予等体积生理盐水，早晚各 1 次。6 周后，小鼠禁食不禁水 24 h，处死，分别采集血液和肝组织进行后续检测。

2.2.2 肝组织病理学检查 取小鼠肝脏右叶相同位置，放入组织固定液中固定，2 d 后使用全自动组织脱水仪进行组织脱水，石蜡包埋，切片，分别进行苏木精-伊红 (HE) 与 Masson 三色染色，脱水，二甲苯透明，封片，玻片扫描仪进行扫描拍照。

2.2.3 血清指标检测 小鼠摘眼球取血后静置 60 min，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 500 r/min 离心 15 min，取上层血清。根据试剂盒说明书，检测血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、白介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β) 水平。

2.2.4 Western blot 法检测肝组织 α -SMA、Col-1、p-PI3K、p-Akt、p-JNK、p-P38 MAPK 蛋白表达 取约 0.1 g 肝组织，用含有蛋白酶抑制剂的裂解液裂解组织，12 000 r/min 离心 10 min，提取蛋白上清，BCA 法测定蛋白浓度，通过凝胶电泳将蛋白分离，随后转印到 0.45 μm PVDF 膜上，用封闭液于室温封闭 1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，加一

抗（1：1 000）于 4 ℃ 孵育过夜，次日 TBST 洗膜 3 次。加入对应的二抗（1：20 000），室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，加入 ECL 化学发光显影液避光反应 1 min，进行显影，分析条带灰度值。

2.2.5 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析，满足正态分布条件及方差齐时，两两比较采用 LSD 检验；不满足方差齐性检验时，采用非参数检验（Kruskal-Wallis），用 Bonferroni 校正检验调整显著性值。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 当归补血汤活性成分

编号	MOL 编号	活性成分	OB/%	DL
1	MOL000211	mairin(丁子香酚)	55.38	0.78
2	MOL000239	jaranol(华良姜素)	50.83	0.29
3	MOL000296	hederagenin(常春藤皂苷元)	36.91	0.75
4	MOL000033	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-10,13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
5	MOL000354	isorhamnetin(异鼠李素)	49.60	0.31
6	MOL000371	3,9-di- <i>O</i> -methylnissolin	53.74	0.48
7	MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di- <i>O</i> -glucoside	41.72	0.69
8	MOL000378	7- <i>O</i> -methylisomucronulatol	74.69	0.30
9	MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside	36.74	0.92
10	MOL000380	(6 <i>aR</i> ,11 <i>aR</i>)-9,10-dimethoxy-6 <i>a</i> ,11 <i>a</i> -dihydro-6 <i>H</i> -benzofurano[3,2- <i>c</i>]chromen-3-ol	64.26	0.42
11	MOL000387	bifendate(联苯双酯)	31.10	0.67
12	MOL000392	formononetin(芒柄花素)	69.67	0.21
13	MOL000398	isoflavanone(二氢异黄酮)	109.90	0.30
14	MOL000417	calycosin(毛蕊异黄酮)	47.75	0.24
15	MOL000422	kaempferol(山柰酚)	41.88	0.24
16	MOL000433	folic acid(叶酸)	68.96	0.71
17	MOL000438	(3 <i>R</i>)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl) chroman-7-ol	67.67	0.26
18	MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di- <i>O</i> -glucosiole	49.28	0.62
19	MOL000442	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48
20	MOL000098	quercetin(槲皮素)	46.43	0.28
21	MOL009290	calycosin-7-glucoside(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)	5.49	0.81
22	MOL000401	astragaloside I(黄芪皂苷 I)	46.79	0.11
23	MOL000403	astragaloside II(黄芪皂苷 II)	46.06	0.13
24	MOL000405	astragaloside III(黄芪皂苷 III)	31.83	0.10
25	MOL000407	astragaloside IV(黄芪甲苷 IV)	17.74	0.15
26	MOL000358	beta-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75
27	MOL000449	stigmasterol(豆甾醇)	43.83	0.76
28	MOL000389	ferulic acid(阿魏酸)	54.97	0.06
29	MOL002201	cis-ligustilide(藁本内酯)	51.30	0.07

3.2 当归补血汤抗肝纤维化作用靶点筛选 将 OMIM、GeneCards、TDD 数据库获得的肝纤维化疾病相关靶点进行整理，去除重复，结果得到 2 901 个潜在靶点。在 Venny 工具中对药物与疾病交集靶点进行映射，得到当归补血汤作用于肝纤维化的潜在靶点 259 个，见图 1。

3.3 当归补血汤“药物-成分-疾病-靶点”网络构建 采用 Cytoscape 3.9.1 软件得到“药物-成分-疾病-靶点”网络，其中化合物节点的大小与化合物 degree 值呈正相关，见图 2。Analyze Network 进行拓扑分析，该网络有 290 个节点、631 条边，网络中平均相邻节点数为 7.80，网络异质性为 2.10，网络中心度 0.57。其中，排名前十的有效化学成分

3 结果

3.1 当归补血汤有效成分及药物靶点筛选 通过 TCMSP 和 TCMID 数据库，筛选得到当归补血汤中黄芪有效化学成分 20 种，当归有效化学成分 2 种。根据 2020 年版《中国药典》质量控制成分并结合文献 [15] 报道，将当归补血汤配伍中生物活性良好、利用价值大的活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷、阿魏酸及藁本内酯 7 种有效成分纳入本研究，见表 1。通过各数据库检索出的靶点进行整理并去除重复，获得 522 个活性潜在靶点。

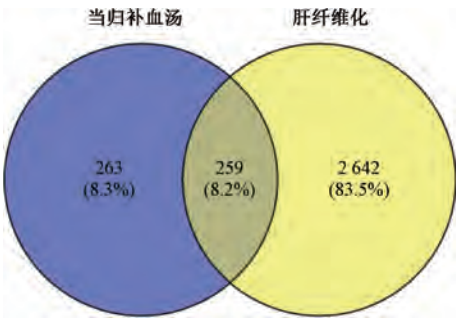


图 1 当归补血汤抗肝纤维化的靶点 Venn 图

为槲皮素 (quercetin)、阿魏酸 (ferulic acid)、山柰酚 (kaempferol)、异鼠李素 (isorhamnetin)、联苯双酯 (bifendate)、藁本内酯 (cis-ligustilide)、芒柄花素 (formononetin)、毛蕊异黄酮 (calycosin)、华良姜素 (jaranol)、二氢异黄酮 (isoflavanone)。

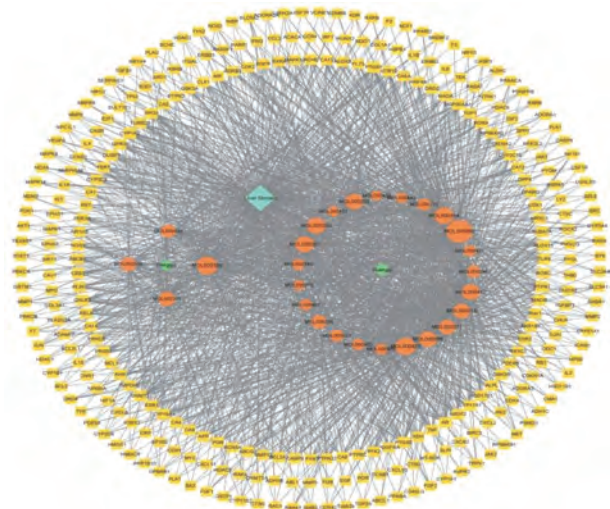


图 2 “药物-成分-疾病-靶点”网络图

3.4 蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析 当归补血汤作用于肝纤维化的核心靶点前 10 位分别为肿瘤 P53 基因 (TP53)、热休克蛋白 90α 家族 A 类成员基因 (HSP90AA1)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、RelA/p65 基因 (RelA)、c-Jun 氨基末端蛋白激酶 (JNK)、E1A 结合蛋白 P300 (EP300)、蛋白激酶 B1 (Akt)、组蛋白去乙酰化酶 1 基因 (HDAC1)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14)，见图 3。

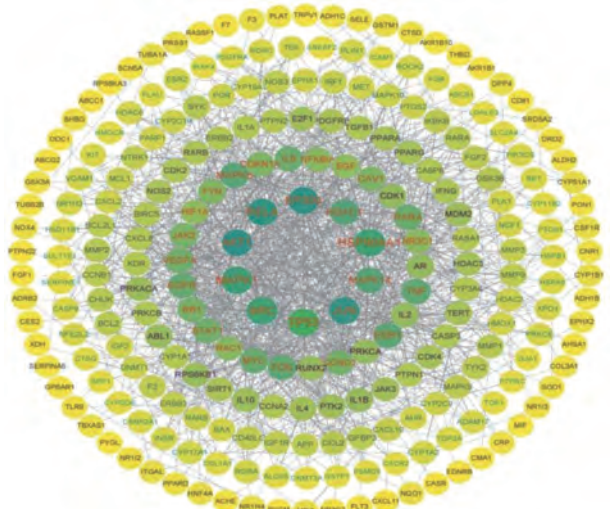


图 3 当归补血汤抗肝纤维化的靶点 PPI 网络

3.5 GO 功能富集分析 GO 功能富集分析得到 1 161 个富集条目，包括 897 个生物过程 (BP)、80 个细胞组分 (CC) 和 184 个分子功能 (MF)。筛选出排名前 10 条进行可视化，见图 4。其中，BP 主要涉及 RNA 转录的正向调

节、基因表达的正调控、凋亡的负调控、DNA 转录的正调控、细胞增殖的正调节等过程；CC 主要涉及细胞内溶质、细胞核、细胞质、细胞基质、细胞外间隙等组分；MF 主要涉及细胞内离子的结合、受体的结合、蛋白的结合、信号传导、酶的结合等功能。

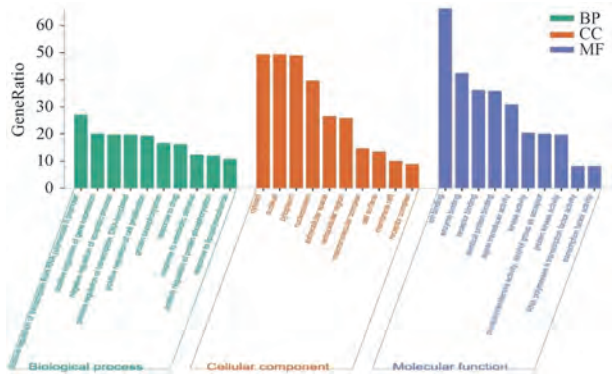


图 4 当归补血汤抗肝纤维化靶点的 GO 功能富集分析

3.6 KEGG 通路富集分析 KEGG 通路富集分析得到当归补血汤抗肝纤维化的重要相关信号通路 180 条。选取排名前 20 位的通路，绘制 KEGG 可视化气泡图，见图 5。富集通路主要有癌症通路 (pathways in cancer)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway)、脂质与动脉硬化信号通路 (lipid and atherosclerosis)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK signaling pathway)、乙型肝炎 (hepatitis B)、IL-17 信号通路、TNF 信号通路等。其中，当归补血汤抗肝纤维化相关的通路中 PI3K/Akt 及 MAPK 信号通路富集程度最高，且 PPI 网络分析中多个核心靶点如 Akt、c-Jun、MAPK 等蛋白靶点均富集于这 2 条通路，故后续动物实验选用这 2 条信号通路来进行验证。

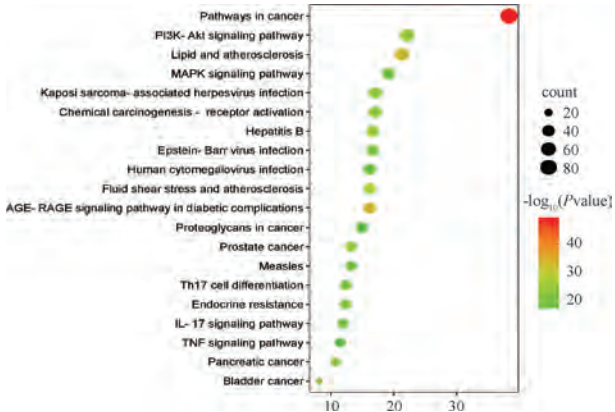
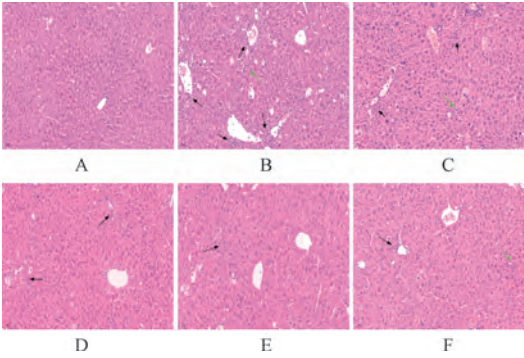


图 5 当归补血汤抗肝纤维化靶点的 KEGG 通路富集分析

3.7 当归补血汤对肝纤维化小鼠肝组织病理学变化的影响 正常组小鼠肝脏细胞排列整齐，肝组织形态正常；模型组小鼠肝组织结构严重破坏，假小叶增加，肝血窦压缩变形，肝细胞大小不均，细胞核受到挤压变形，出现大量炎性浸润以及明显蓝染纤维索，提示有大量胶原纤维沉积 ($P<0.01$)；与模型组比较，当归补血汤各剂量组和水飞蓟宾组小鼠肝组织细胞形态异常情况有所好转，假小叶结构

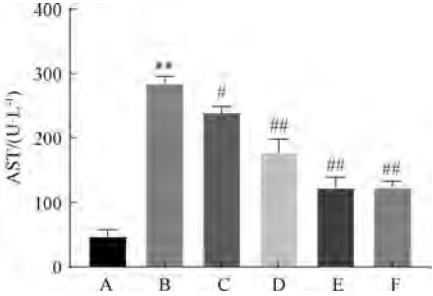
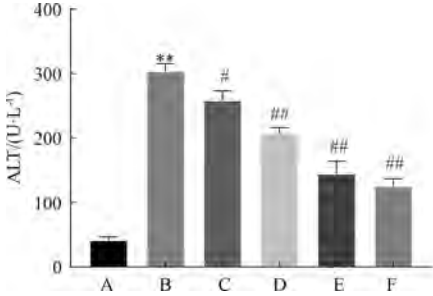
明显减少，炎性浸润区域减少，蓝染纤维组织沉积有所减轻，纤维条索减少 ($P<0.01$)，见图 6~7。



注：黑色箭头表示炎性浸润，绿色箭头表示假小叶结构。A 为正常组，B 为模型组，C~E 分别为当归补血汤低、中、高剂量组，F 为水飞蓟宾组。

图 6 各组小鼠肝组织 HE 染色 (×200)

3.8 当归补血汤对肝纤维化小鼠肝功能的影响 与正常组比较，模型组小鼠血清 ALT、AST 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，当归补血汤各剂量组和水飞蓟宾组小鼠血清 ALT、AST 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 8。

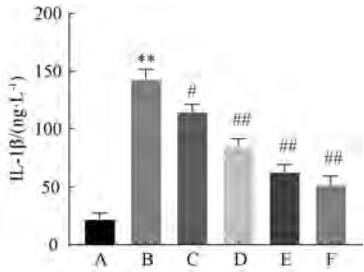
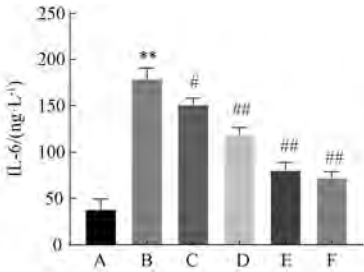
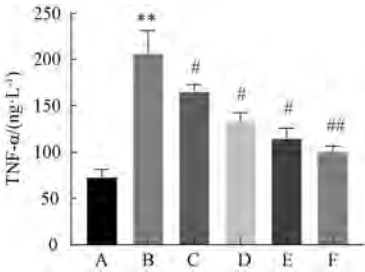


注：A 为正常组，B 为模型组，C~E 分别为当归补血汤低、中、高剂量组，F 为水飞蓟宾组。与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 8 当归补血汤对肝纤维化小鼠血清 ALT、AST 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

3.9 当归补血汤对肝纤维化小鼠血清炎性因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 与正常组比较，模型组小鼠血清炎性因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平升高 ($P<0.01$)；与模型

组比较，当归补血汤各剂量组和水飞蓟宾组小鼠血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 9。

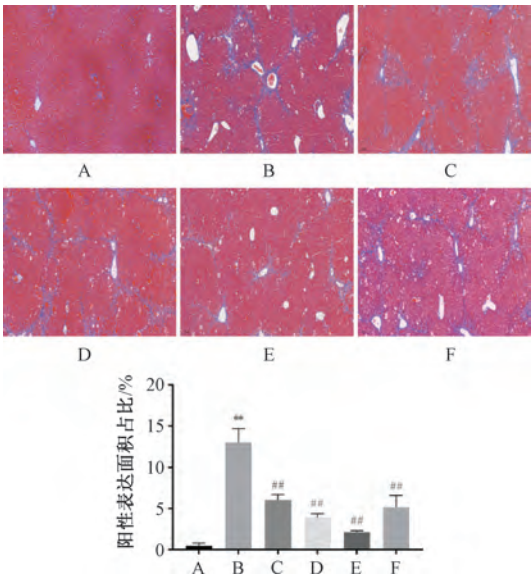


注：A 为正常组，B 为模型组，C~E 分别为当归补血汤低、中、高剂量组，F 为水飞蓟宾组。与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 9 当归补血汤对肝纤维化小鼠血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

3.10 当归补血汤对肝纤维化小鼠肝组织 α -SMA、Col-1 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠肝组织 α -SMA、

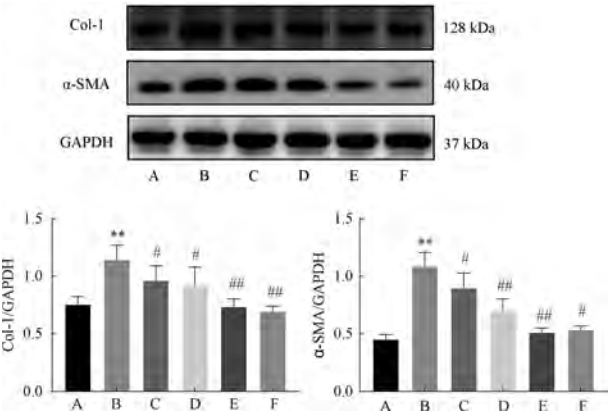
Col-1 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，当归补血汤各剂量组和水飞蓟宾组小鼠肝组织 α -SMA、Col-1 蛋白表



注：A 为正常组，B 为模型组，C~E 分别为当归补血汤低、中、高剂量组，F 为水飞蓟宾组。与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 7 各组小鼠肝组织 Masson 染色 (×100, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

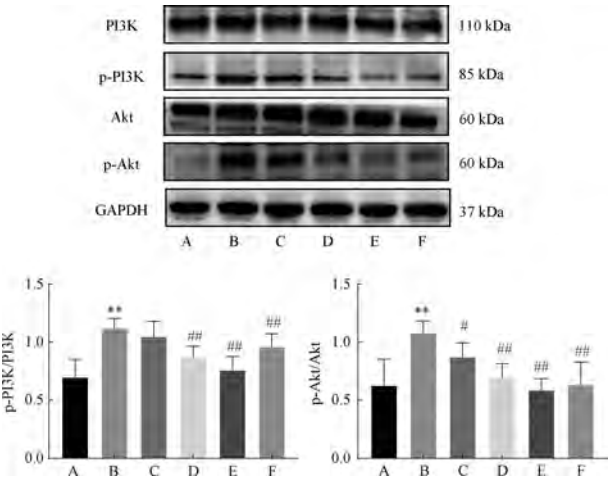
达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图 10。



注: A 为正常组, B 为模型组, C~E 分别为当归补血汤低、中、高剂量组, F 为水飞蓟宾组。与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 10 当归补血汤对肝纤维化小鼠肝组织 α -SMA、Col-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

3.11 当归补血汤对肝纤维化小鼠肝组织 PI3K/Akt 信号通路的影响 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 当归补血汤低剂量组小鼠肝组织 p-PI3K 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$), p-Akt 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 当归补血汤中、高剂量组和水飞蓟宾组小鼠肝组织 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图 11。

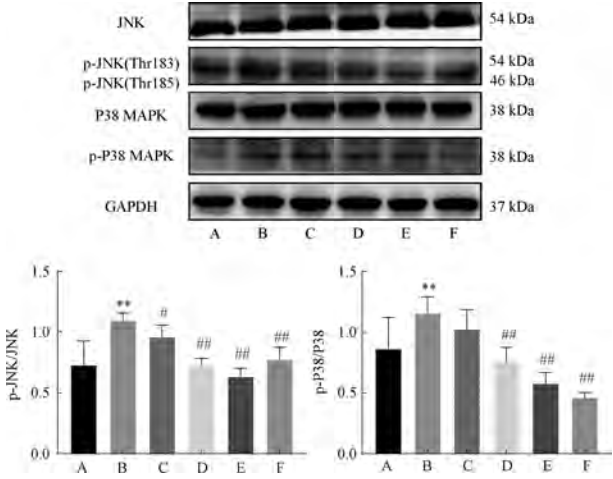


注: A 为正常组, B 为模型组, C~E 分别为当归补血汤低、中、高剂量组, F 为水飞蓟宾组。与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 11 当归补血汤对肝纤维化小鼠肝组织 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

3.12 当归补血汤对肝纤维化小鼠肝组织 JNK/P38 MAPK 信号通路的影响 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织 p-JNK、p-P38 MAPK 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 当归补血汤中、高剂量组和水飞蓟宾组小鼠肝组织 p-JNK、p-P38 MAPK 蛋白表达降低 ($P<0.01$), 当归补血汤

低剂量组小鼠肝组织 p-P38 MAPK 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$), p-JNK 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 见图 12。



注: A 为正常组, B 为模型组, C~E 分别为当归补血汤低、中、高剂量组, F 为水飞蓟宾组。与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 12 当归补血汤对肝纤维化小鼠肝组织 p-JNK、p-P38 MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

4 讨论

肝纤维化是一种肝脏受到各种刺激的可逆的伤口愈合反应, 是大多数慢性肝病的主要特征, 其特征是过量 ECM 积累。活化的 HSC 分泌促纤维化及促炎介质, 其中, 纤维化介质表现为 ECM 沉积产生的 Col-1 以及 α -SMA 等纤维化蛋白过表达^[16-17]; 促炎介质表现为 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症细胞因子的分泌, 且免疫细胞释放的炎症因子被大量招募到肝脏, 进一步促进肝纤维化的发展。本研究通过腹腔注射 CCl₄ 建立肝纤维化小鼠模型, 发现小鼠肝组织出现明显纤维化及炎症反应, 肝组织假小叶结构及蓝染纤维结构增加, 血清 ALT、AST 水平升高, 炎症因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平升高, 肝组织肝纤维化蛋白 α -SMA、Col-1 表达升高; 而当归补血汤组均能改善以上指标, 表明当归补血汤具有抗小鼠肝纤维化作用。

通过网络药理学筛选得到肝纤维化相关疾病靶点 2 901 个, 从当归补血汤中筛选得到抗肝纤维化的活性成分 29 种, 作用靶点 259 个, 得到核心靶点有 MAPK1、NF- κ B p65/RELA、c-Jun/JNK、Akt1、MAPK14 等, 并主要涉及 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路。MAPK 是一组进化保守的丝氨酸-苏氨酸激酶, 在哺乳动物细胞中发挥传递、放大和整合来自各种刺激范围信号的作用^[18]。MAPK 中 P38、JNK 可被 TNF- α 和 IL-1 β 等炎症细胞因子激活, 活化后的 P38 进一步可以激活 JNK 信号通路磷酸化, 通过 MKK4 磷酸化 Tyr185 位点和 MKK7 磷酸化 Thr183 位点发挥转录作用, 磷酸化的 JNK 可以磷酸化 c-Jun, 在肝纤维化中产生促炎症等相关生理效应^[19]。PI3K 包含 p110 和 p85 两个亚基, 受到上游受体激活后在质膜上产生第二信使 PIP3, 与包含 PH 结构域的信号蛋白结合, 实现对下游 Akt 蛋白的调控^[20],

使 Akt 蛋白磷酸化, 发挥细胞代谢、存活和生长等关键生物作用^[21]。PI3K/Akt 途径与肝纤维化关系密切, 大量研究表明下调 PI3K/Akt 表达可阻止肝纤维化进程^[22-23]。本研究发现, 肝纤维化小鼠肝组织 p-PI3K、p-Akt、p-JNK、p-P38 MAPK 蛋白表达升高; 当归补血汤组小鼠肝组织 p-PI3K、p-Akt、p-JNK、p-P38 MAPK 蛋白表达降低。以上结果与网络药理学研究所预测的靶点相吻合, 表明当归补血汤抗小鼠肝纤维化可能与下调 PI3K/Akt 和 JNK/p38 MAPK 信号通路有关。

综上所述, 本研究基于网络药理学及动物实验证明了当归补血汤中多种主要活性成分可能通过下调肝纤维化的炎症反应, 减少纤维蛋白表达, 下调 JNK/P38 MAPK 和 PI3K/Akt 信号通路, 发挥抗肝纤维化的作用。本研究为当归补血汤能够通过多通路、多靶点抗肝纤维化提供了客观依据, 但肝纤维化的机制和中药的活性成分复杂, 课题组后续将通过体内外实验对当归补血汤抗肝纤维化的机制进行深入研究, 以期为当归补血汤临床运用及中医药的开发利用提供新的方向。

参考文献:

[1] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.

[2] Cai J, Hu M, Chen Z, *et al.* The roles and mechanisms of hypoxia in liver fibrosis [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 186.

[3] Mehta K J, Farnaud S J, Sharp P A. Iron and liver fibrosis: Mechanistic and clinical aspects [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(5): 521-538.

[4] Altamirano-Barrera A, Barranco-Fragoso B, Mendez-Sanchez N. Management strategies for liver fibrosis [J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(1): 48-56.

[5] Virarkar M, Morani A C, Taggart M W, *et al.* Liver fibrosis assessment [J]. *Semin Ultrasound CT MR*, 2021, 42 (4): 381-389.

[6] Acharya P, Chouhan K, Weiskirchen S, *et al.* Cellular mechanisms of liver fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 671640.

[7] 袁宇鹏, 杨玉华, 王莲萍, 等. 基于《中国药典》和《欧洲药典》的当归药材质量标准对比研究 [J]. *中成药*, 2015, 37(5): 1139-1142.

[8] 陶雨凡, 董凡, 兀琦, 等.《中国药典》2020 年版含黄芪成方制剂分析及其现代研究进展 [J]. *中国现代中药*,

2023, 25(1): 202-209.

[9] 陈园, 陶艳艳, 李风华, 等. 当归补血汤对大鼠肝纤维化与肝脏脂质过氧化的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(1): 39-42.

[10] 陶艳艳, 陈园, 陈高峰, 等. 当归补血汤不同配比组方的抗肝纤维化作用 [J]. *上海中医药大学学报*, 2008, 22(1): 40-44.

[11] 王志新, 张志立, 李哲诚, 等. 当归补血汤加味抗肝炎肝纤维化临床研究 [J]. *亚太传统医药*, 2014, 10 (23): 101-103.

[12] 王平, 梁逸曾. 当归补血汤治疗家兔血吸虫病肝纤维化的组织病理学分析 [J]. *中华地方病学杂志*, 2010, 29(3): 292-294.

[13] 万星, 李相国, 李修贤, 等. Beta-谷甾醇通过抑制 TNF- α -NF- κ B 和 T β R1-Smad2/3 信号通路抗小鼠肝纤维化损伤 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(1): 75-80.

[14] 邓文龙. 动物中人体剂量换算遵循的原则 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3): 196-197.

[15] 陈锦霞, 高永坚, 林碧珊, 等. 当归补血汤基准样品质量控制方法研究 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45 (11): 2247-2256.

[16] Khomich O, Ivanov A V, Bartosch B. Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis [J]. *Cells*, 2019, 9 (1): 24.

[17] 马迎春, 胡建辉, 段莹, 等. 当归补血汤的研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(2): 10-13.

[18] Zhang W, Liu H T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells [J]. *Cell Res*, 2002, 12 (1): 9-18.

[19] Papa S, Choy P M, Bubici C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming [J]. *Oncogene*, 2019, 38(13): 2223-2240.

[20] Hemmings B A, Restuccia D F. PI3K-PKB/Akt pathway [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(9): a11189.

[21] Mukherjee R, Vanaja K G, Boyer J A, *et al.* Regulation of PTEN translation by PI3K signaling maintains pathway homeostasis [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(4): 708-723.

[22] Xiu A Y, Ding Q, Li Z, *et al.* Doxazosin attenuates liver fibrosis by inhibiting autophagy in hepatic stellate cells *via* activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 3643-3659.

[23] Ji D, Zhao Q, Qin Y, *et al.* Germacrone improves liver fibrosis by regulating the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(9): 1866-1875.