

基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨 肉苁蓉治疗肝纤维化的作用机制

张博锐¹, 马倩倩¹, 王雯艺¹, 张石蕾¹, 刘 涛¹, 赵 军², 马 龙^{1*}

¹新疆医科大学公共卫生学院, 乌鲁木齐 830054; ²新疆药物研究所维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004

摘要:从药物、疾病、靶点角度研究肉苁蓉中活性成分治疗肝纤维化的作用机制。通过中药数据库(TCMSP)、中医药百科全书数据库(ETCM)、中医药研究综合数据库(TCMID)、CNKI数据库、PubMed等数据库收集肉苁蓉的有效成分,利用Uniprot数据库获取肉苁蓉活性成分对应的靶标基因,通过GeneCards数据库和OMIM数据库收集肝纤维化疾病基因做映射,将有效成分靶点与肝纤维化靶点取交集,并绘制中药-有效成分-疾病网络;通过String数据库及Cytoscape 3.7.1软件构建蛋白相互作用网络(PPI);通过DAVID数据库对交集靶点进行GO功能富集与KEGG通路富集;建立动物肝纤维化模型,采用ELISA试剂盒检测小鼠肝组织中LN、HA、PCIII、Col IV含量变化,并进行HE和Masson染色观察肝病理组织学变化,通过实时荧光定量PCR法检测PI3K、AKT mRNA的转录情况。收集并筛选肉苁蓉有效成分8个,靶点157个,肝纤维化疾病靶点1 005个,二者交集靶点92个,涉及5条主要信号通路,包括癌症信号通路、乙肝病毒信号通路、PI3K-AKT信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、蛋白多糖与癌症。动物实验表明:与模型组相比,肉苁蓉苯乙醇总苷高、中、低剂量组(700、350、175 mg/kg)能显著降低肝纤维化小鼠肝组织LN、HA、PCIII、Col IV含量($P < 0.01$),肝组织病理切片观察发现肉苁蓉苯乙醇总苷能减少肝细胞损伤及胶原纤维沉积,通过实时荧光定量PCR检测表明:与正常组相比,模型组小鼠肝组织中PI3K、AKT的mRNA表达量显著上调;与模型组相比,肉苁蓉苯乙醇总苷高、中、低剂量组中PI3K、AKT的mRNA表达量显著减少,其机制可能是通过抑制PI3K-AKT通路的激活,延缓肝纤维化的进展。肉苁蓉苯乙醇总苷具有抗纤维化作用,本实验为进一步深入探讨肉苁蓉的中药药理作用奠定基础。

关键词:肉苁蓉;网络药理学;分子对接;肝纤维化;靶点

中图分类号:R961.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)4-0677-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.4.016

Study on mechanism of Cistanches Herba in the treatment of liver fibrosis based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification

ZHANG Bo-rui¹, MA Qian-qian¹, WANG Wen-yi¹, ZHANG Shi-lei¹, LIU Tao¹, ZHAO Jun², MA Long^{1*}

¹School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

²Key Laboratory of Uygur Medicine, Xinjiang Pharmaceutical Research Institute, Urumqi 830004, China

Abstract: To study the mechanism of active components of Cistanches Herba in the treatment of liver fibrosis from the point of view of drugs, diseases and targets. The effective components of Cistanches Herba were collected through traditional Chinese medicine system pharmacology database and analysis platform (TCMSP), traditional Chinese medicine encyclopedia database (ETCM), traditional Chinese medicine research comprehensive database (TCMID), CNKI database, PubMed and other databases. The target genes of active components of Cistanches Herba were obtained by Uniprot database, and the disease genes of liver fibrosis were collected by GeneCards database and OMIM database, the active component targets were intersected with liver fibrosis targets, and the traditional Chinese medicine-active components-disease network was drawn. Protein interaction network (PPI) was constructed by String database and Cytoscape 3.7.1 software. GO function and KEGG pathway were en-

riched by DAVID database. Animal model of liver fibrosis was established, the contents of LN, HA, PCIII and Col IV in mouse liver tissue were detected by ELISA kit, liver histopathological changes were observed by HE and Masson staining, and the transcription of PI3K and AKT mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Eight active components of Cistanches Herba, 157 targets and 1 005 targets of liver fibrosis were collected and screened, and 92 targets intersected with each other, involving 5 main signal pathways, including cancer signal pathway, hepatitis B virus signal pathway, PI3K-AKT signal pathway, tumor necrosis factor signal pathway, proteoglycan and cancer. The animal experiment showed that compared with the model group, the high, middle and low dose groups of total phenylethanol glycosides of Cistanches Herba (700, 350, 175 mg/kg) could significantly reduce the contents of LN, HA, PCIII and Col IV in liver tissue of mice with liver fibrosis. The pathological observation of liver tissue showed that total phenylethanol glycosides of Cistanches Herba could reduce hepatocyte injury and collagen fiber deposition. The real-time fluorescence quantitative PCR detection showed that the mRNA expression of PI3K and AKT in the liver tissue of model group was significantly up-regulated compared with normal group. Compared with model group, the mRNA expression of PI3K and AKT in the high, middle and low dose groups of total phenylethanol glycosides of Cistanches Herba significantly decreased, and its mechanism may delay the progression of liver fibrosis by inhibiting the activation of PI3K-AKT pathway. The total phenylethanol glycosides of Cistanches Herba have the effect of anti-fibrosis, which lays a foundation for further study on the pharmacological effects of Cistanches Herba.

Key words: Cistanches Herba; network pharmacology; molecular docking liver fibrosis; target

肝脏作为人体重要的消化腺,一旦发生病变将影响人体正常的代谢功能^[1]。研究显示^[2],形成肝癌的重要途径是肝纤维化(liver fibrosis)。肝脏受到刺激时,免疫细胞则分泌大量免疫调控因子,导致肝星状细胞活化、增殖,合成大量胶原,在肝内沉积大量细胞外基质,造成纤维化形成^[3]。因此,在肝脏病变过程的任何一个阶段进行控制,都可能会减轻肝脏疾病的损伤,治疗肝纤维化的研究显得十分重要^[4]。近些年来,有研究表明^[5],肉苁蓉治疗肝病具有明显疗效,在治疗肝纤维化的方面表现出明显优势。

新疆道地药材肉苁蓉(*Cistanches Herba*)素有“沙漠人参”之称,临床应用已有数千年的历史^[6]。现代研究表明^[7],其具有抵抗衰老、保护肝脏、缓解疲劳、抗骨质疏松、润肠通便等多种生物活性。You 等^[8]研究表明,肉苁蓉苯乙醇苷能缓解肝脏纤维化程度。Zhang 等^[9]研究发现,肝脏星状细胞的活化及肝纤维化能被肉苁蓉苯乙醇苷脂质体抑制。然而目前对于肉苁蓉治疗肝纤维化的药理作用及其机制尚不明确且有待阐明。

本研究应用网络药理学构建“成分-疾病-靶点-通路”网络图^[10],再进行蛋白质相互作用和靶点富集分析^[11],最终预测肉苁蓉治疗肝纤维化的相关靶点和通路,通过分子对接技术和动物实验,为肉苁蓉有效成分治疗肝纤维化的药理作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 筛选肉苁蓉活性成分相关靶点

1.1.1 肉苁蓉化学活性成分的筛选

以“肉苁蓉”作为检索词,在中药系统药理学分

析平台(TCMSP,<https://tcmsp.w.com/tcmsp.php>)中筛选出口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%、类药性(drug-likeness, DL)≥0.18 的成分作为活性成分^[12],再结合中医药百科全书数据库(ETCM,<http://www.tcmip.cn>)、中医药研究综合数据库(TCMID,<http://www.megabionet.org/tcmid/>)、CNKI 数据库(<https://www.cnki.net>)、PubMed 数据库(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>)进行肉苁蓉有关成分补充。

1.1.2 肉苁蓉活性成分及肝纤维化疾病靶点

使用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org>),筛选肉苁蓉活性成分对应的蛋白靶点^[13]。再利用基因组注释数据库(GeneCards,<https://www.genecards.org>)和孟德尔遗传数据库(OMIM,<https://omim.org>)数据库,以“肝纤维化”作为关键词检索,在数据库中获得相关的蛋白靶点,最终获得两者共同的蛋白靶点^[14]。

1.1.3 “肉苁蓉活性成分-肝纤维化-蛋白靶点”网络的构建与分析

利用 String 数据库(<https://cn.string-db.org>)构建“肉苁蓉活性成分-肝纤维化-蛋白靶点”网络,进行可视化处理^[15]。其中每个节点代表基因、蛋白或活性成分,节点之间的连接代表活性成分与相关靶点之间的联系,根据网络中度值(degree)分析网络中的核心基因,最终获得蛋白互作网络。

1.1.4 GO、KEGG 富集分析

David 数据库(<https://david.ncifcrf.gov>)导入

肉苁蓉治疗肝纤维化的靶点,进行 GO、KEGG 富集分析,根据 Count 数值进行筛选^[16]。

1.1.5 分子对接

通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取肉苁蓉主要活性成分的 2D 化学结构,在 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中查找相关核心靶点蛋白 3D 结构,通过 Autodock 软件进行分子对接,获取结合能最高的位点,最后通过 Pymol 软件进行可视化处理。

1.2 动物实验

1.2.1 实验动物

昆明种雄性小鼠 60 只,SPF 级,体重 18~22 g,购自新疆医科大学实验动物中心。生产许可证号为 SCXK(新)2018-0002,使用许可证号为 SYXK(新)2018-0003,伦理审批号:IACUC-20210326-10。

1.2.2 主要试剂

肉苁蓉苯乙醇苷(CPhGs)(购于新疆和田帝辰医药生物有限公司,批号:20180502);复方鳖甲软肝片(蒙古福瑞科技股份有限公司产品);小鼠层粘连蛋白(LN)、小鼠透明质酸(HA)、小鼠 III 型前胶原(PIII)、小鼠 IV 型胶原(Col IV)酶联免疫 ELISA 试剂盒(北京江莱试剂公司,批号:JL20286-96T、JL2406-96T、JL20169-96T、JL20128-96T);Masson 三色染色液(珠海贝索,批号:20210115);苏木素伊红(HE)染色试剂盒(索莱宝 HE 染色试剂盒 G1120);SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版(SYBR Green,天根 FP205-02);FastKing RT Kit(With gDNase,天根 KR116-02);Transzol up(全式金 ET111-01)。

1.2.3 主要仪器

HZQ-C 全湿恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司);DK-8D 电热恒温水浴锅(江苏金怡仪器科技有限公司);HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);Varioskan Flash 酶标仪、QuantStudio 6 实时荧光 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司);Retsch 莱驰高通量组织研磨仪 MM400;ST5020 多功能染色机(上海徕卡贸易有限公司)。

1.2.4 实验方法

动物随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组(840 mg/kg)、CPhGs 高剂量组(CPhGs-H, 700 mg/kg)、中剂量组(CPhGs-M, 350 mg/kg)、低剂量组(CPhGs-L, 175 mg/kg);阳性对照组给予复方鳖甲软肝片,参照药品说明书(一次 4 片,一天 3 次;每片

0.5 g)和人民军医出版社出版的《机能实验教程》,进行人和小鼠体重等效剂量换算;CPhGs 高、中、低剂量组根据相关文献^[17]和预实验结果,大鼠 CPhGs 高、中、低剂量组(500、250、125 mg/kg),依据大鼠与小鼠用药剂量换算比例 1:1.4,换算小鼠给药剂量 CPhGs 高、中、低剂量组(700、350、175 mg/kg),每组各 10 只;正常对照组注射等量生理盐水,其余各组小鼠均经腹腔注射 10% 的 CCl₄ 橄榄油溶液(5 mL/kg),1 周注射 2 次,注射 8 周,建立肝纤维化小鼠模型;正常对照组、模型组灌胃给予蒸馏水,其余各组均按设定剂量灌胃给药 8 周^[18]。

1.2.5 生化指标检测

ELISA 法以酶标仪检测肝组织匀浆中 LN、HA、PIII、Col IV 的含量,严格遵守试剂盒的说明。

1.2.6 肝组织病理学观察

肝组织经 4% 多聚甲醛溶液固定、乙醇脱水、石蜡包埋后切片,进行 HE、Masson 染色,观察肝组织切片。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法检测 PI3K、AKT mRNA 的转录情况

取出小鼠肝组织并加入 Transzol up 试剂提取小鼠肝脏组织总 RNA,采用 RT-PCR 法测定小鼠肝脏 PI3K、AKT 的 mRNA 转录情况。相关基因序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称 Name	序列 Sequence
PI3K	F:5'-ACACCACGGTTGGACTATGG-3' R:5'-GGCTACACTAGTGGCTTGG-3'
AKT	F:5'-ATGAACGACGTAGCCATTGTG-3' R:5'-TTGTAGCCAATAAGGTGCCAT-3'
GAPDH	F:5'-AGGTCGGTGTCAACGGATTTG-3' R:5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

1.2.8 统计学方法

采用 SPSS 21.0 进行统计分析,数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;若方差齐采用多组间均数比较方差分析 One-way ANOVA;反之采用秩和检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 筛选肉苁蓉有效成分

筛选出肉苁蓉已知成分 75 种,设定 OB≥30%、DL≥0.18 为筛选的阈值,得到 8 个符合条件的活性

成分： β -谷甾醇 (β -sitosterol)、花生四烯酸 (arachidonate)、苏齐内酯 (suchilactone)、鹅掌楸树脂酚 B 二甲醚 (yangambin)、槲皮素 (quercetin)、丁派卡因

(marckine)、毛蕊花糖昔(acteoside)、松果菊昔(echinacoside),通过Uniprot数据库共得到157个靶点基因(见图1)。

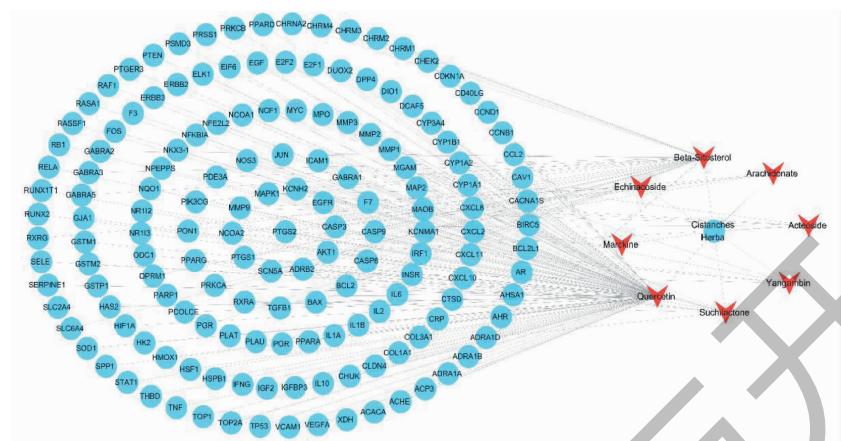


图 1 肉苁蓉-有效成分-靶点图

Fig. 1 Cistanches Herba-active ingredient-target map

2.2 “肉苁蓉活性成分-肝纤维化-蛋白靶点”网络构建与分析

检索 GeneCards 和 OMIM 数据库获得肝纤维化相关靶点 1 005 个, 将筛选出来的肉苁蓉 157 个潜在蛋白靶点和疾病肝纤维化相关的 1 005 个蛋白靶点进行去重处理, 绘制韦恩图(见图 2), 将 92 个共同靶点 导入 String 数据库, 进行可视化处理构建

“肉苁蓉活性成分-肝纤维化-蛋白靶点”网络(见图3),其中核心靶点为:AKT、ICAM1、MMP9、BCL-2、ADRB2、CASP3、JUN、PON1、PIK3CG、RXRA、CASP8、PPARG、BAX、NOS3、PRKCA、TGFB1、CASP9等。degree > 50 作为阈值,根据 degree 和 combine score 值大小绘制蛋白互作网络图(见图4)。

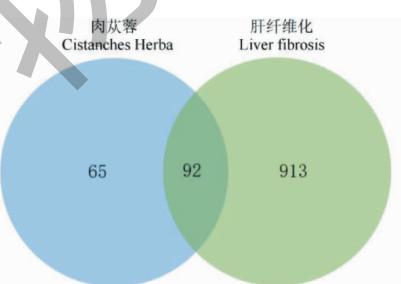


图2 肉苁蓉治疗肝纤维化的药物-疾病共同靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of drug-disease common target of *Cistanches Herba* in the treatment of liver fibrosis

2.3 GO-KEGG 宣集分析

通过 David 数据库, 将肉苁蓉治疗肝纤维化的 92 个蛋白靶点导入数据库进行富集分析(见图 5)。分别选取细胞组分、生物过程和分子功能 Count 值排名前十的条目。其中生物过程涉及 DNA 转录的正调控、负调控凋亡过程、衰老、炎症反应、对细胞增殖的正调控、凋亡、信号传导等; 分子功能主要包括酶、蛋白、转录因子和相同蛋白的结合、DNA 结合、锌离子结合等; 细胞组分主要包括细胞核、细胞质、

细胞外环境、等离子体膜、细胞膜、线粒体等。通过 David 数据库并根据 Count 值筛选出前 20 条通路, 对肉苁蓉治疗肝纤维化的潜在作用靶点进行通路富集分析(见图 6), 得到的主要通路有: PI3K-AKT(见图 7)、TNF 信号通路、HBV 信号通路等。

2.4 构建肉苁蓉活性成分-肝纤维化-靶点-通路网络

可视化处理构建“肉苁蓉活性成分-肝纤维化-靶点-通路”网络(见图8)。

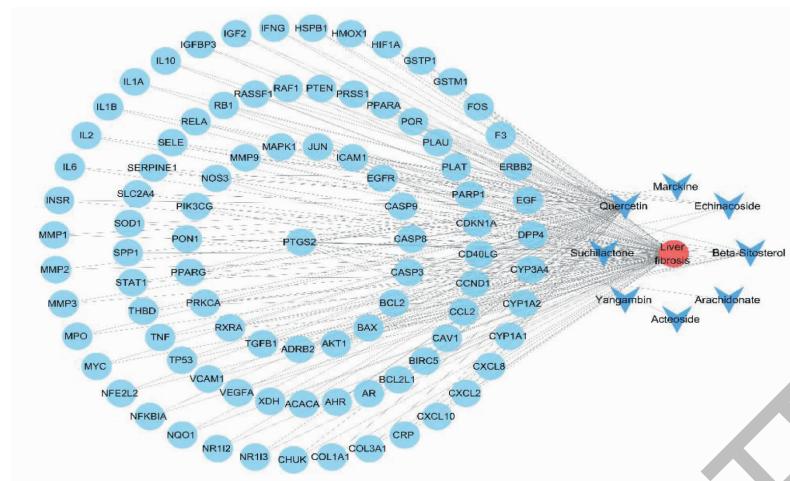


图3 肉苁蓉治疗肝纤维化的“成分-共同靶点-疾病”网络图

Fig. 3 Network diagram of “component-common target-disease” of *Cistanches Herba* in the treatment of liver fibrosis

注:红色代表肝纤维化;深蓝色代表肉苁蓉活性成分;其他代表肉苁蓉活性成分与肝纤维化相关靶点,边代表两者之间的关系。Note: Red represents liver fibrosis; Dark blue represents the active components of *Cistanches Herba*; Other active components of *Cistanches Herba* and related targets of liver fibrosis, and the edge represents the relationship between them.

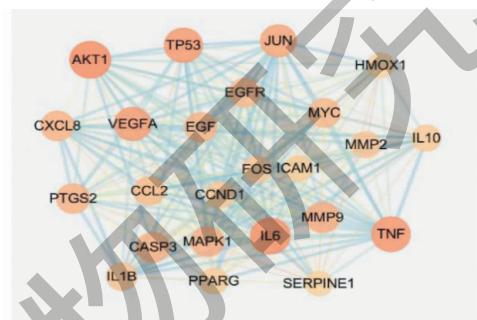


图4 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network diagram

注:图中节点面积代表 degree 值,连线粗细代表 combine score 值。Note: The node area in the figure represents degree value, and the connection thickness represents the combine score value.

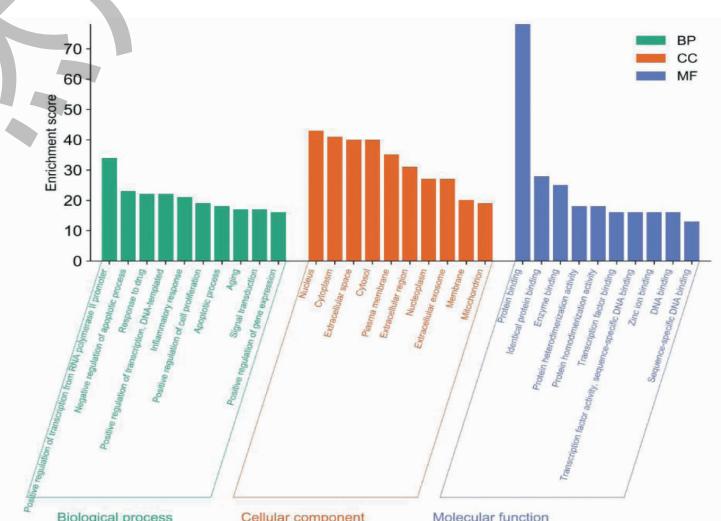


图5 肉苁蓉治疗肝纤维化的潜在作用靶点的 GO 分析

Fig. 5 GO analysis of potential targets of *Cistanches Herba* in the treatment of liver fibrosis

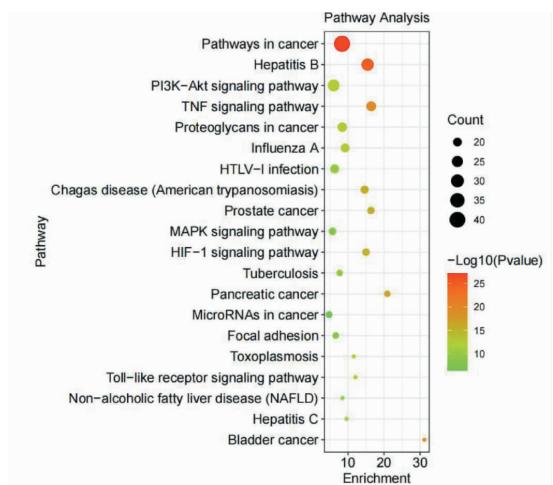


图 6 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 6 Enrichment analysis of KEGG signal pathway

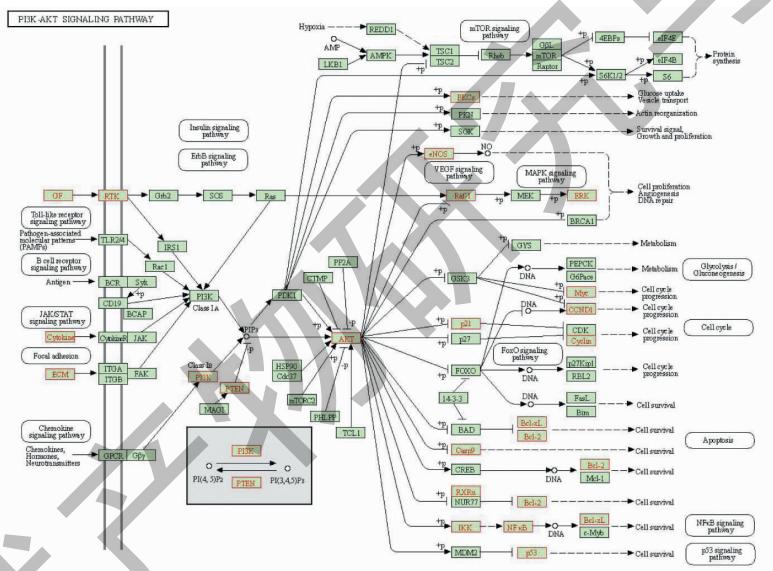


图 7 肉苁蓉治疗肝纤维化作用的 PI3K-AKT 通路

Fig. 7 PI3K-AKT pathway of Cistanches Herba in the treatment of liver fibrosis

2.5 肉苁蓉治疗肝纤维化的活性成分分子对接结果

通过 Autodock 软件对肉苁蓉最重要的 2 种活性成分毛蕊花糖苷、松果菊苷与关键白蛋白靶点 ICAM1、AKT1、MMP9 进行分子对接,结合能见表 2。将结果导入 Pymol 软件进行可视化,分子对接结果显示,毛蕊花糖苷与 AKT 在 ASN-54、TYR-272、LYS-297 位置处形成氢键;毛蕊花糖苷与 ICAM1 在 GLN-168、LYS-8、ILE-10 位置处形成氢键;毛蕊花糖苷与 MMP9 在 LEU-188、ALA-189、GLU-227、HIS-230、HIS-236、HIS-226 位置处形成氢键;松果菊苷与 AKT 在 GLU-356、HIS-297、ASN-296、ALA-226、LYS-

294、GLU-228 位置处形成氢键;松果菊苷与 ICAM1 在 DA-7、DT-8、DT-11、DT-12、DC-13 位置处形成氢键;毛蕊花糖苷与 MMP9 在 HIS-230、HIS-236、HIS-226、GLU-227、ALA-189、LEU-188、TYR-248 位置处形成氢键(见图 9)。

2.6 各组小鼠 LN、HA、PCIII、Col IV 含量的差异

模型组与正常组相比 LN、HA、PCIII、Col IV 含量升高,且差异具有统计学意义($P < 0.01$);CPhGs 高、中、低剂量组与模型组相比明显降低 LN、HA、PCIII、Col IV 含量($P < 0.01$),结果说明 CPhGs 具有抗肝纤维化的作用(见表 3)。

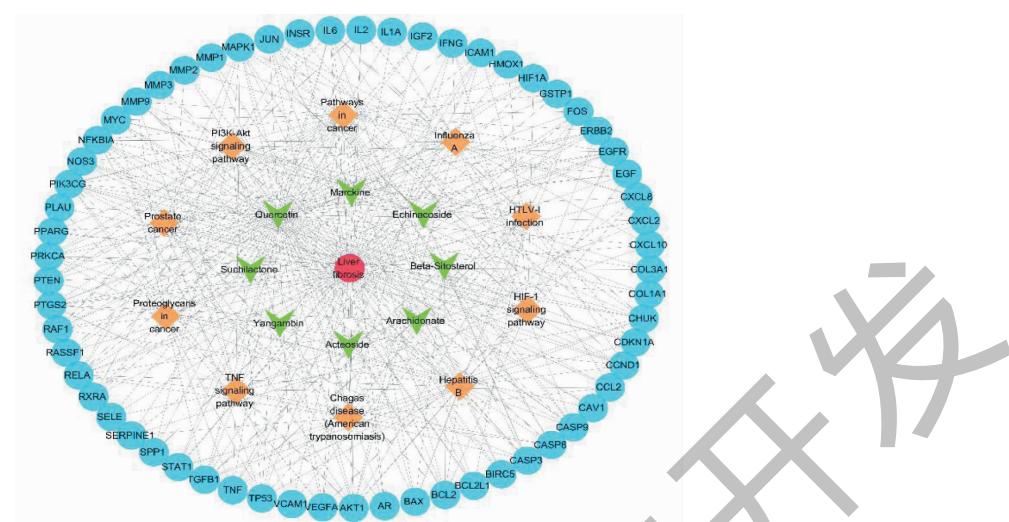


图 8 肉苁蓉活性成分-肝纤维化-蛋白靶点-通路

Fig. 8 Active ingredient of Cistanches Herba-liver fibrosis-protein target-pathway

注:红色代表肝纤维化;绿色代表肉苁蓉活性成分;橘黄色代表通路,蓝色代表蛋白靶点,线段代表两者之间的关系。Note: Red represents liver fibrosis; Green represents active components of Cistanches Herba; Orange represents pathway, blue represents protein target, and line segment represents the relationship between Cistanches Herba and liver fibrosis.

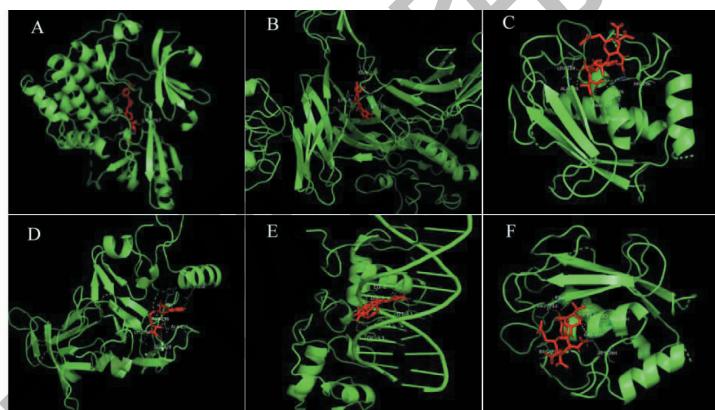


图 9 分子对接结果

Fig. 9 Results of molecular docking

注:A ~ F 分别为毛蕊花糖苷与 AKT、毛蕊花糖苷与 ICAM1、毛蕊花糖苷与 MMP9、松果菊苷与 AKT、松果菊苷与 ICAM1、松果菊苷与 MMP9 的分子对接图。Note: A-F are the molecular docking diagrams of acteoside and AKT, acteoside and ICAM1, acteoside and MMP9, echinacoside and AKT, echinacoside and ICAM1, and echinacoside and MMP9, respectively.

表 2 主要活性成分与关键蛋白靶点结合能

Table 2 Binding energy between main active components and key protein targets

编号 Number	活性成分 Active ingredient	蛋白名称 Protein name	结合能 Binding energy (kJ/mol)
MOL003333	毛蕊花糖苷 Acteoside	AKT	-7.11
MOL003333	毛蕊花糖苷 Acteoside	ICAM1	-9.67
MOL003333	毛蕊花糖苷 Acteoside	MMP9	-7.87
MOL008875	松果菊苷 Echinacoside	AKT	-10.51
MOL008875	松果菊苷 Echinacoside	ICAM1	-11.87
MOL008875	松果菊苷 Echinacoside	MMP9	-10.19

表 3 各组小鼠 LN、HA、PCIII、Col IV 含量的差异($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 3 Differences in the contents of LN, HA, PCIII and Col IV in mice of different groups ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	LN (ng/mL)	HA (ng/mL)	PCIII (ng/mL)	Col IV (ng/mL)
正常对照组 Normal control group	-	97.43 ± 22.40	23.31 ± 2.94	15.35 ± 2.20	6.16 ± 0.86
模型组 Model group	-	241.80 ± 15.27 [#]	50.17 ± 3.09 [#]	37.18 ± 1.85 [#]	17.22 ± 0.75 [#]
阳性对照组 Positive control group	840	130.50 ± 12.40 ^{**}	33.14 ± 2.84 ^{**}	24.34 ± 1.42 ^{**}	11.71 ± 0.94 ^{**}
CPhGs-H	700	144.00 ± 17.43 ^{**}	33.88 ± 3.00 ^{**}	25.68 ± 2.06 ^{**}	11.99 ± 0.87 ^{**}
CPhGs-M	350	154.20 ± 13.29 ^{**}	39.04 ± 1.56 ^{**}	27.16 ± 2.60 ^{**}	12.80 ± 0.97 ^{**}
CPhGs-L	175	183.60 ± 11.55 ^{**}	43.17 ± 2.22 ^{**}	28.48 ± 1.87 ^{**}	13.45 ± 0.85 ^{**}

注:与正常对照组比较,[#] $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, [#] $P < 0.01$; Compared with model group, ^{**} $P < 0.01$.

2.7 肝组织病理学观察

HE 染色(见图 10):正常组肝细胞形态正常,肝小叶结构完整,无变性坏死的肝细胞及炎细胞分布,汇管区清晰可见,中央静脉周围有放射整齐排列的肝细胞。模型组有明显的肝细胞点状坏死、增殖、水肿、炎细胞浸润和大量嗜酸性颗粒。高、中、低剂量组和阳性对照组肝细胞坏死程度较轻,嗜酸性颗粒

明显减少。

Masson 染色(见图 11):正常组肝细胞形态结构完整,胶原染色后仅见血管壁有少量胶原纤维;模型组出现大量蓝色纤维形成的假小叶包绕汇管区,可见大量空泡的形成。高、中、低剂量组和阳性对照组可显著降低肝脏组织肝纤维化水平,汇管区周围蓝色纤维明显减少。

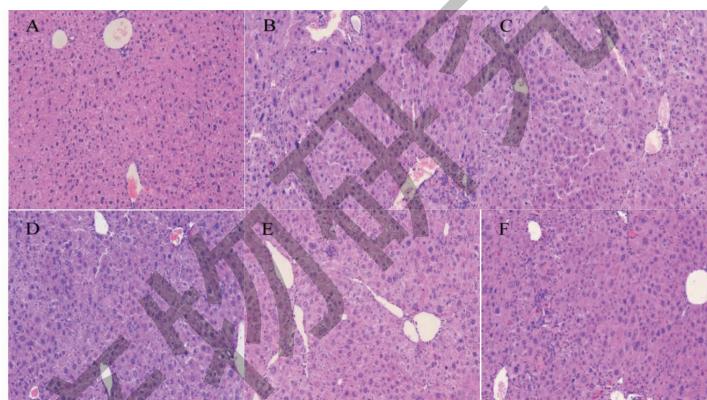


图 10 CPhGs 对 CCl_4 致肝纤维化小鼠肝组织病理学改变的影响

Fig. 10 Effect of CPhGs on hepatic histopathological changes in mice with liver fibrosis induced by CCl_4

注:A:空白组;B:模型组;C:阳性对照组;D:CPhGs 高剂量组;E:CPhGs 中剂量组;F:CPhGs 低剂量组。下同。Note: A: Normal; B: Model; C: Positive control group; D: CPhGs-H; E: CPhGs-M; F: CPhGs-L. The same below.

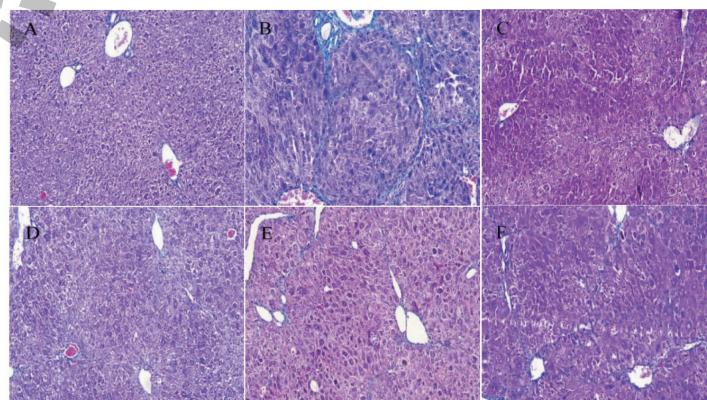


图 11 CPhGs 对 CCl_4 致肝纤维化小鼠肝组织胶原纤维改变的影响

Fig. 11 Effect of CPhGs on the changes of collagen fibers in liver tissue of mice with liver fibrosis induced by CCl_4

2.8 实时荧光定量 PCR 法检测 PI3K、AKT mRNA 的表达

与正常对照组相比,模型组小鼠肝组织中 PI3K、AKT mRNA 表达量显著上调($P < 0.01$);与模

型组相比,阳性对照组及肉苁蓉苯乙醇总苷高、中、低剂量组中 PI3K、AKT mRNA 表达量显著减少($P < 0.01$)(见表 4)。

表 4 小鼠肝组织 PI3K、AKT mRNA 转录($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 4 Transcription of PI3K and AKT mRNA in mouse liver tissue($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	PI3K	AKT
正常对照组 Normal control group	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组 Model group	-	$2.46 \pm 0.46^{\#}$	$2.43 \pm 0.90^{\#}$
阳性对照组 Positive control group	840	$0.17 \pm 0.08^{**}$	$0.47 \pm 0.25^{**}$
CPhGs-H	700	$0.36 \pm 0.13^{**}$	$0.76 \pm 0.13^{**}$
CPhGs-M	350	$0.66 \pm 0.15^{**}$	$1.02 \pm 0.32^{**}$
CPhGs-L	175	$1.42 \pm 0.34^{**}$	$1.44 \pm 0.30^{**}$

注:与正常对照组比较, $^{\#}P < 0.01$;与模型组比较, $^{**}P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, $^{\#}P < 0.01$; Compared with model group, $^{**}P < 0.01$.

3 讨论与结论

肝纤维化的发展过程复杂,各细胞因子及各细胞通路之间相互“交流”、相互影响,形成了一个相互作用的复杂网络。因此单靶点、单通路治疗很难起效,中药具有多成分、多作用靶点和作用途径复杂等特点,从而系统地对人体进行调节。肉苁蓉具有保护肝脏的作用,通过中药数据库 TCMSP 等数据库得到肉苁蓉有效成分:毛蕊花糖苷、松果菊苷、 β -谷甾醇、花生四烯酸、苏齐内酯、鹅掌楸树脂酚 B 二甲醚、槲皮素、丁派卡因。有研究表明^[19],肉苁蓉苯乙醇苷类是肉苁蓉主要活性成分,其中松果菊苷、毛蕊花糖苷被认为是肉苁蓉发挥药效的主要生物活性成分,通过网络药理学我们得到毛蕊花糖苷和松果菊苷作用与肝纤维化相关靶点,并通过分子对接进行验证。

松果菊苷、毛蕊花糖苷作为肉苁蓉中主要成分,通过调节肝星状细胞凋亡发挥抗肝纤维化的作用^[20]。ICAM1、AKT、MMP9 可能是松果菊苷、毛蕊花糖苷治疗肝纤维化的作用靶点,ICAM1 作为一种细胞黏附因子,肝脏损伤的情况下会大量表达,可以通过抑制 ICAM1 过表达,抑制肝纤维化的发展^[21]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT) 是 PI3K 下游的一个重要靶激酶,活化的 AKT 进一步激活,促进肝星状细胞增殖,加速肝纤维化的进展,相反通过抑制 AKT 则会抑制肝纤维化的发生^[22];MMP-9 可降解正常肝脏胶原基质,破坏肝细胞内环境,促进肝星状细胞活化、分泌大量的胶原蛋白,促进肝纤维化的发展,相反通过抑制 MMP-9 则会抑制肝纤维化的发生^[23];本实验使用 CCl₄ 建立肝纤维化小鼠模型是

经典的造模方法之一,CCl₄ 通过腹腔注射进入动物体内,相比较正常组,模型组小鼠 LN、HA、PCIII、Col IV 含量明显升高;相对于模型组,CPhGs 高、中、低剂量组明显降低 LN、HA、PCIII、Col IV 含量;HE 和 Masson 检测结果表明:与模型组比较,CPhGs 高、中、低剂量组肝细胞坏死程度较轻,嗜酸性颗粒明显减少,汇管区周围蓝色纤维明显减少。以上结果说明肉苁蓉苯乙醇总苷抑制肝纤维化的进展可能与 ICAM1、AKT、MMP9 靶点有关,需要进一步对相关蛋白表达进行检测。

肝纤维化的产生由多种因素引起,其中 PI3K-AKT 通路是由通路富集分析获得排名靠前的通路,PI3K-AKT 信号通路参与调控细胞增殖与凋亡、诱导人类肿瘤发生、乙肝病毒基因的转录、是治疗肝纤维的重要通路之一^[24]。PI3K-AKT 通路能激活肝血管的形成,改善血供,重建细胞外基质,调节细胞自噬,抑制肝细胞的凋亡,促进肝细胞的增殖,从而导致肝纤维化发生^[25]。松果菊苷、毛蕊花糖分别可以通过调节 ICAM1、AKT、MMP9 靶点抑制肝脏细胞的增殖和活化,肉苁蓉苯乙醇总苷可能通过参与肝脏细胞的能量代谢、增殖、凋亡三个方面干预肝脏纤维化的进展,通过实时荧光定量 PCR 检测表明:与正常组相比,模型组小鼠肝组织中 PI3K、AKT mRNA 表达量显著上调;与模型组相比,肉苁蓉苯乙醇总苷高、中、低剂量组中 PI3K、AKT mRNA 表达量显著减少,其机制可能抑制 PI3K-AKT 通路的激活,延缓肝纤维化的进展。

综上所述,肉苁蓉苯乙醇总苷可以有效缓解 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化,其机制可能与 PI3K-

AKT 信号通路介导的肝星状细胞的增殖活化有关，本研究结果为进一步深入探讨肉苁蓉的中药药理作用奠定基础。

参考文献

- 1 Roehlen N, Crouchet E, Baumert T. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. Cells, 2020, 9 (4): 875.
- 2 Chen Y, Gong J, Zhou W, et al. A novel prediction model for significant liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B [J]. Biomed Res Int, 2020: 6839137.
- 3 Guo J, Liu W, Zeng Z, et al. Tgfb3 and MMP13 regulated the initiation of liver fibrosis progression as dynamic network biomarkers [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25: 867-879.
- 4 Damiris K, Tafesh Z, Pyrsopoulos N. Efficacy and safety of anti-hepatic fibrosis drugs [J]. World J Gastroenterol, 2020, 26: 6304-6321.
- 5 Ma XT, Zhang SL, You SP, et al. Effects of *Cistanche glycosides* on apoptosis of rat T6 hepatic stellate cells and its mechanism [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2018, 34: 1450-1455.
- 6 Wang D, Wang H, Gu L. The antidepressant and cognitive improvement activities of the traditional Chinese herb *Cistanche* [J]. Evid-based Compl Alt, 2017: 3925903.
- 7 Yuan P, Li J, Aipire A, et al. *Cistanche tubulosa* phenylethanoid glycosides induce apoptosis in H22 hepatocellular carcinoma cells through both extrinsic and intrinsic signaling pathways [J]. BMC Complement Altern M, 2018, 18 (1): 275.
- 8 You S, Zhao J, Ma L, et al. Preventive effects of phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* on bovine serum albumin-induced hepatic fibrosis in rats [J]. Daru, 2015, 23: 52.
- 9 Zhang S, Ma L, Zhao J, et al. The phenylethanol glycoside liposome inhibits PDGF-induced HSC activation via regulation of the FAK/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Molecules, 2019, 24 (18): 3282.
- 10 Zhang R, Zhu X, Bai H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: review and assessment [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 123.
- 11 Yuan H, Ma Q, Cui H, et al. How can synergism of traditional medicines benefit from network pharmacology? [J]. Molecules, 2017, 22 (7): 1135.
- 12 Zhang YH, Zhou XQ, Wu DH, et al. Study on mechanism of Sijunzi Decoction in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33 (1): 127-136.
- 13 Hu W, Fu W, Wei X, et al. A network pharmacology study on the active ingredients and potential targets of *Tripterygium wilfordii* hook for treatment of Rheumatoid Arthritis [J]. Evid-based Compl Alt, 2019: 5276865.
- 14 Gan D, Xu X, Chen D, et al. Network pharmacology-based pharmacological mechanism of the Chinese medicine Rhizoma Drynariae against osteoporosis [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 5700-5716.
- 15 Wan Y, Xu L, Liu Z, et al. Utilising network pharmacology to explore the underlying mechanism of Wumei Pill in treating pancreatic neoplasms [J]. BMC Complement Altern, 2019, 19 (1): 158.
- 16 Song YJ, Bao JM, Zhou LY, et al. An analysis of the anti-neuropathic effects of Qishe Pill based on network pharmacology [J]. Evid-based Compl Alt, 2020: 7193832.
- 17 You SP, Zhao J, Ma L, et al. Effect and mechanism of *Cistanche phenylethanoid* glycosides on rats with immunological liver fibrosis [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2016, 30: 504-510.
- 18 Sun JC, Sun WY, Li XR, et al. Comparison of hepatic fibrosis model induced by different concentrations of CCl₄ in mice [J]. Lab Anim Comp Med (实验动物与比较医学), 2018, 38: 255-260.
- 19 Bi CC, Liu YL, Wei FF, et al. Research progress on main chemical constituents and biological activities of *Cistanches Herba* [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2019, 42: 1896-1900.
- 20 You SP, Zhao J, Ma L, et al. Effects of *Cistanche phenylethanoid* glycosides, acteoside and echinacoside on inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in rat hepatic stellate cells [J]. Carcinog Teratog Mutagen (癌变·畸变·突变), 2017, 29 (1): 13-17.
- 21 Wang XH, Gong MH, Yang B, et al. Effect of *Polygonatum sibiricum* on gene expressions of TGF-β1 and ICAM-1 in liver fibrosis model rats [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2021, 38 (3): 22-25.
- 22 Ding YJ, Lu SH, Wu J, et al. Effect of blueberry on PI3K/AKT signaling pathway in rats with hepatic fibrosis [J]. Chin J Public Health (中国公共卫生), 2017, 33: 747-750.
- 23 Shao YY, Fan YQ, Li SW, et al. The role of CaSR expression in diabetic cirrhosis injury and fibrosis in rats [J]. Chin J Appl Physiol (中国应用生理学杂志), 2020, 36 (1): 1-5.
- 24 Guo H, Zhou T, Jiang D, et al. Regulation of hepatitis B virus replication by the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signal transduction pathway [J]. J Virol, 2007, 81: 10072-10080.
- 25 Wang J, Chu E, Chen H, et al. Microrna-29b prevents liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation and inducing apoptosis through targeting PI3K/AKT pathway [J]. Oncotarget, 2015, 6: 7325-7338.