

基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨莪术-鳖甲药对抗肝纤维化的作用机制

周玉娇¹, 廖珊珊¹, 高攀¹,

杨钰敏¹, 李秋杏¹, 秦旭华^{1*}, 金沈锐^{2*}

¹成都中医药大学药学院; ²成都中医药大学基础医学院, 成都 611137

摘要: 采用网络药理学、分子对接技术和实验验证探讨莪术-鳖甲药对 (Curcumae Rhizoma-Trionycis Carapax, CRTC) 抗肝纤维化的作用机制。首先搜集鳖甲和莪术的化学成分和靶点信息; 然后将两味药的作用靶点合并去重。使用疾病数据库以获取肝纤维化的相关基因。提取 CRTC 和肝纤维化的交集靶点, 进一步对“药物-潜在活性成分-潜在靶点”网络进行可视化展示。将交集靶点导入 STRING 数据库以构建蛋白-蛋白相互作用网络 (PPI); 然后进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析并可视化, 再用 Autodock Vina 软件实现分子对接模型的构建。最后通过体内实验对网络药理学预测的靶点及通路进行实验验证。共筛选得到 CRTC 与肝纤维化的交集靶点共 65 个。PPI 网络中筛选得到度值排名前四的靶点分别为白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (Akt serine/threonine kinase 1, AKT1)、信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferative activated receptor gamma, PPAR γ)。GO 功能富集分析显示涉及的生物过程有 1 025 条, 细胞组分有 41 条, 分子功能有 84 条; KEGG 通路富集分析得到 149 条通路, 其中关键通路有 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性。分子对接结果显示 IL-6、STAT3 等核心靶点与其对应成分均有良好的结合活性。体内动物实验结果证实 CRTC 能改善肝纤维化的病理学形态, 且显著抑制了 IL-6、EGFR、STAT3 的表达。综上所述, CRTC 通过多靶点、多通路发挥其抗肝纤维化作用, 其机制与网络药理和分子对接技术预测的 IL-6/EGFR/STAT 信号轴相关。

关键词: 莪术-鳖甲药对; 肝纤维化; 网络药理学; 分子对接; 实验验证

中图分类号: R285 文献标识码: A

Mechanism of Curcumae Rhizoma-Trionycis Carapax drug pair in the treatment of liver fibrosis based on network pharmacology, molecular docking and experiment validation

ZHOU Yu-jiao¹, LIAO Shan-shan¹, GAO Pan¹,

YANG Yu-min¹, LI Qiu-xing¹, QIN Xu-hua^{1*}, JIN Shen-ru^{2*}

¹College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; ²College of Basic Medicine,

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract:The mechanism of Curcumae Rhizoma-Trionycis Carapax drug pair (CRTC) in treating liver fibrosis was explored by using network pharmacology, molecular docking technology and experiment validation. Firstly, we collected the chemical components and targets information of Curcumae Rhizoma (CR) and Trionycis Carapax (TC); then merged the targets of the two drugs and removed duplicates. We used diverse disease databases to obtain genes information related to liver fibrosis. And we extracted the intersection targets of CRTC and liver fibrosis, further visualized the network of “drugs-potential active ingredients-potential targets”. We imported intersection targets into the STRING database to construct a protein-protein interaction (PPI) network; performed GO function and KEGG pathway enrichment analysis and visualization, and then used AutodockVina software to construct molecular docking models. Finally, the targets and pathways predicted by network pharmacology were experimentally validated through *in vivo* experiments. Totally, 65 intersection targets between CRTC and liver fibrosis were identified. In PPI network, the top 4 with the highest node connection values are interleukin-6 (IL-6), Akt serine/threonine kinase 1(AKT1), signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) and peroxisome proliferative activated receptor gamma(PPARG), respectively. GO functional enrichment analysis involved 1 025 biological processes, 41 cell components, and 84 molecular functions. KEGG pathway enrichment analysis identified 149 pathways, including key pathways such as EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance. Molecular docking results showed that IL-6, STAT3 and other core targets had good binding activity with their corresponding components. The *in vivo* animal experimental results confirmed that CRTC can improve the pathological morphology of liver fibrosis and significantly inhibit the expression of IL-6, EGFR, and STAT3. In conclusion, CRTC acts against liver fibrosis through multiple targets and multiple pathways, its mechanism is related to the IL-6/EGFR/STAT axis predicted by network pharmacology and molecular docking.

Key words:Curcumae Rhizoma-Trionycis Carapax; liver fibrosis; network pharmacology; molecular docking; experiment validation

肝纤维化是指在各种致病因子持续作用下,造成肝细胞慢性炎症、坏死,肝内某些非实质细胞激活,使得肝脏内弥漫性细胞外基质增生、纤维增生和纤维分解不平衡,从而导致肝内纤维结缔组织增生,开启肝纤维化进程,发展到后期肝小叶改建、假小叶形成,肝脏质地变硬,肝功能减退,即为肝硬化;肝纤维化不是一个独立的疾病,而是许多慢性肝病的共同病理过程^[1]。调查显示全球范围内超过 5 000 万成年人患有慢性肝病;在中国,约有 3 亿人受肝病影响,中国占全球肝硬化死亡人数的 11%^[2-4]。因此,寻找预防和治疗肝纤维化的

药物，对于肝纤维化等肝病患者有着重要意义。据研究，中药及复方制剂（如复方鳖甲软肝片/胶囊、扶正化瘀片/胶囊、大黄蛰虫丸等）在防治肝纤维化方面有着良好疗效，且具有多成分、多靶点的优势^[5]。

肝纤维化归属于中医学的“胁痛”“肝着”“肝积”“积聚”等范畴。莪术（*Curcumae Rhizoma*, CR）和鳖甲（*Trionycis Carapax*, TC）为中医临床治疗肝纤维化的常用药物，TC入肝，软坚散结，化瘀消癥，CR活血化痰，软坚通滞、消癥散结，两者相须为用，增加了活血化瘀、软坚散结的效果^[6]。现代药理研究表明，CR可以通过多种作用机制发挥其抗肝纤维化作用^[7]。此外，由TC所组成的多种中药复方制剂可以改善患者肝功能，缓解纤维化进程^[8-10]。临床和实验研究提示CR和TC均具有明确的抗肝纤维化作用，但这两味药配伍成为药对协同抗肝纤维化的具体作用机制尚未探明。本研究采用网络药理学、分子对接技术和实验验证等多种研究方法，从成分、靶点、生物功能、信号通路等方面来探讨传统药对CRTC抗肝纤维化的作用环节和可能的机制，希望为CRTC抗肝纤维化的现代研究提供一定的依据和参考。

1 材料与方法

1.1 软件与数据库

软件：Venny2.1.0、Cytoscape3.7.2、PyMOL2.6.0、Autodock4.2.6、SPSS21.0、GraphPadPrism8等；数据库：TCMSP数据库（<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>）、中国知网（<https://www.cnki.net/>）、HERB数据库（<http://herb.ac.cn/>）、SwissTargetPrediction数据库（<http://www.swisstargetprediction.ch/>）、Uniport数据库（<https://www.uniprot.org/>）、GeneCards数据库（<https://www.genecards.org/>）、OMIM数据库（<https://omim.org/>）、String12.0数据库（<https://cn.string-db.org/>）、Metascape数据库（<https://metascape.org/gp/index.html>）、PubChem数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）、PDB数据库（<https://www.rcsb.org/>）、微信在线生物信息学分析、可视化云平台（<https://www.bioinformatics.com.cn/>）等。

1.2 实验动物

SPF级雄性Sprague-Dawley大鼠，6~8周龄，体质量170~200g，购于斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物生产许可证号：SCXK（京）2019-0010。动物饲养于成都中医药大学实验动物中心。动物房内温度（22~25℃），相对湿度（50%~60%）。本研究获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号：2018-20）。

1.3 实验药品与试剂

CRTC煎煮提取物，由成都中医药大学制剂研究室提供。根据课题组前期预实验筛选最佳剂量，按照人临床等效剂量的14倍、7倍、3.5倍煎煮提取物，给药剂量为7.46、3.73、

1.87g/kg, 分别作为高、中、低剂量组, 4 °C冰箱保存备用。水飞蓟宾葡甲胺片(江苏中兴药业有限公司, 国药准字: H32026145; 批号: 210514); 大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(上海爱萌优宁生物技术有限公司, 批号: AOG2310111082); 大鼠 EGFR、STAT3 ELISA 试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司, 批号: 202309); 猪血清(平睿生物科技北京有限公司, 生产批号: 20220110)。

1.4 仪器设备

Varioskan LUX 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司); UPH-1-10T 优普超纯水制造系统(成都超纯科技有限公司); SQP 万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); NDP.view2 图像分析软件(日本滨松); S60 数字切片扫描系统(日本滨松)。

1.5 方法

1.5.1 药物有效成分靶点的获取

采用 TC MSP 数据库获得 CR 的有效成分, 初步筛选了所获得成分的 ADME 参数, 要求: 口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 20\%$ 及类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.14 。然后通过 Uniport 数据库对靶点命名进行统一, 并选择已验证过的、人类物种来源, 获得靶点对应的基因名。利用中国知网查阅 TC 相关文献以及 HERB 数据库查询 TC 潜在成分, 筛选得到 TC 的有效成分, 进一步导入 SwissTargetPrediction 数据库对其有效成分对应的潜在靶点进行收集和整理。

1.5.2 疾病靶点与交集靶点获取

分别在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库里以“Liver fibrosis”为关键词检索其相关靶点, 以 Relevance score ≥ 12 分为筛选标准, 得到与肝纤维化疾病相关的所有靶点。用 Venny2.1 在线工具制作韦恩图, 得到 CRTC 潜在作用靶点与肝纤维化疾病靶点的交集, 以明确药物和疾病间的关键靶点。

1.5.3 药物-潜在活性成分-潜在靶点网络图构建

创建药物、潜在活性成分以及潜在靶点的表格文件, 将其导入 Cytoscape3.7.2 软件以建立药物-潜在活性成分-潜在靶点网络图。用软件中的 Network Analysis 功能对网络进行拓扑结构分析, 获得度值信息, 得到排名前 4 位的潜在活性成分, 作为 CRTC 治疗肝纤维化的主要成分。

1.5.4 PPI 网络的构建及核心靶点的筛选

将“1.5.2”所得的关键靶点上传至 String12.0 数据库, 选择选项“Homo sapiens”作为进行分析处理的物种, 其他所有参数均设置为默认值, 得到并下载 PPI 网络的相关文件。进一步

导入 Cytoscape3.7.2 软件作图，并通过 Centiscape 功能分别计算中介中心性（betweenness centrality, BC）、接近中心性（closeness centrality, CC）、点度中心性（degree centrality, DC），将此值作为筛选核心靶点的标准，选择合适数目的核心靶点进行分子对接实验。

1.5.5 京都基因与基因组百科全书通路富集分析和基因本体论生物过程富集分析

把“1.5.4”所得的关键靶点导入 Metascape 数据库，对 CRTC 抗肝纤维化的关键靶点进行京都基因与基因组百科全书（kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）通路富集分析和基因本体论（gene ontology, GO）生物过程富集分析，选择的物种为“Homo sapiens”，按照 *P*-Value 值升序排列，对 *P* 值前 10 位条目进行可视化展示；使用微生信在线生物信息学分析、可视化云平台进行可视化分析并绘制 KEGG 通路富集气泡图以及 GO 功能富集柱状图。

1.5.6 疾病-关键靶点-关键通路网络图的构建

选择“1.5.5”中 *P* 值前 20 位条目作为 CRTC 治疗肝纤维化的关键通路。将“1.5.2”获得的关键靶点、“1.5.5”获得的关键通路以及疾病建立属性文件，导入 Cytoscape3.7.2 软件作图，获得疾病-关键靶点-关键通路网络图。

1.5.7 分子对接模型构建

取“1.5.4”中排名前 4（以度值排序）的核心靶点作为受体蛋白，其对应的潜在活性成分为配体小分子进行分子对接实验。我们首先在 TCMSP 中下载 4 个潜在活性成分的 InChKey 号，再通过 PubChem 数据库检索得到其配体的 2D 结构，并运用 Chem3D 转化为 3D 格式。再运用 PDB 数据库获得受体的 PDB 文件。最后运用 Autodock4.2.6 进行分子对接，PyMOL2.6.0 可视化显示。

1.5.8 实验验证

1.5.8.1 实验分组及造模方法

将 60 只 SD 大鼠按体重随机分为 6 组：空白组（control, Con）、模型组（model, Mod）、阳性药组（positive, Pos）、CRTC 高剂量给药组（CRTC high dose, CRTC-H）、CRTC 中剂量给药组（CRTC middle dose, CRTC-M）、CRTC 低剂量给药组（CRTC low dose, CRTC-L），每组 10 只。其中高、中、低剂量组的给药剂量分别为 7.46、3.73、1.87 g/kg，阳性药组的给药剂量为 0.10 g/kg。采用腹腔注射猪血清来制备大鼠肝纤维化模型^[1]。除空白组外，其余 5 组大鼠腹腔注射猪血清 0.5 mL/只，每周注射 2 次，注射前称重，持续 8 周。空白组的大鼠腹腔注射等量 0.85%氯化钠溶液。实验过程中不限制大鼠的饮食和饮水。

1.5.8.2 处理与检测

末次给药后，称重并麻醉。取出肝脏固定，用于 HE 染色。采集腹主动脉血，处理得到上层血清，以备 ELISA 检测使用。运用 ELISA 法测定血清中 IL-6、EGFR、STAT3 的表达。

1.5.8.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS21.0 软件进行数据统计处理，判断数据是否符合正态分布，在相关资料符合正态分布的前提下，所有计量资料用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。计量资料多组间比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析，两组间差异比较方差齐时采用 LSD 法，方差不齐时采用 T2 检验；计数资料用非参数秩和检验比较分析， $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。采用 GraphPadPrism8 软件进行作图。

2 结果

2.1 CRTC 有效活性成分的筛选和靶点预测

检索数据库和文献后，CRTC 共筛选得到 17 个化合物，其中 TC 有 6 个有效成分，CR 有 11 个有效成分。在 PubChem 和 Swiss 上收集得到 CR 对应靶点 193 个，TC 对应靶点 159 个，删除两药的重复靶点，共得到 268 个潜在作用靶点。

2.2 肝纤维化相应基因及与 CRTC 共同靶点

在 OMIM 数据库里检索肝纤维化获得 226 个疾病靶点，在 GeneCards 数据库中共获得肝纤维化相关基因 924 个，将两个数据库所得靶点合并、删除重复值后共得到 1 088 个疾病靶点。利用 Venny2.1 工具取 CRTC 及肝纤维化靶点的交集，得到 65 个交集靶点，即 CRTC 治疗肝纤维化的潜在治疗靶点 (见图 1)。

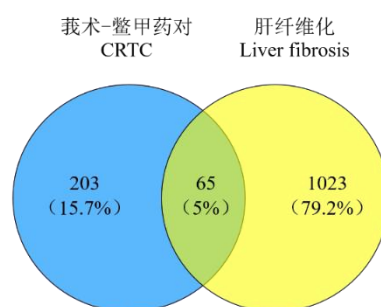


图 1 CRTC-肝纤维化交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram for the intersection targets of CRTC-liver fibrosis

2.3 药物-潜在活性成分-潜在靶点网络构建

将药对、潜在活性成分、潜在靶点导入 Cytoscape3.7.2 软件以建立药物-潜在活性成分-潜在靶点网络。该网络中有 288 个节点，1 013 条边 (见图 2)。通过 Network Analysis 功能分析各度值，排名前五的潜在活性成分为 9, 12-十八碳二烯酸、常春藤皂苷元、8-十八碳烯酸、9-十八碳烯酸、11-十八碳烯酸，说明它们在 CRTC 治疗肝纤维化中发挥重要作用 (见

表 1 和表 2)。

表 1 CRTC 潜在活性成分

Table 1 Potential active ingredients in CRTC

药物 Drug	潜在活性成分 Potential active ingredient	编号 Number
CR	胡萝卜苷 Alexandrin	EB01
CR	常春藤皂苷元 Hederagenin	EB02
CR	Gweicurculactone	EB03
CR	(1S, 10S), (4S, 5S)-吉马酮-1(10), 4-二环氧化物 (1S,10S),(4S,5S)-germacrone-1(10),4-diepoxide	EB04
CR	Wenjine	EB05
CR	二脱甲氧基姜黄素 Bisdemethoxycurcumin	EB06
TC	11-十八碳烯酸 11-Octadecenoic acid	EB07
TC	肉豆蔻酸 Tetradecanoic acid	EB08
TC	十五烷酸 Pentadecanoic acid	EB09
TC	十八碳酸 Octadecanoic acid	EB10
TC	十七碳酸 Heptadecanoic acid	EB11
TC	9-十八碳烯酸 9-Octadecenoic acid	EB12
TC	9, 12-十八碳二烯酸 9,12-Octadecadienoic acid	EB13
TC	8-十八碳烯酸 8-Octadecenoic acid	EB14
TC	棕榈酸 Hexadecanoic acid	EB15
TC	8,11-十八碳二烯酸 8,11-Octadecadienoic acid	EB16
TC	11-Eicosenoicacid	EB17

表 2 CRTC 治疗肝纤维化排名前 5 的潜在活性成分

Table 2 Top 5 potential active ingredients of CRTC in the treatment of liver fibrosis

药物 Drug	潜在活性成分 Potential active ingredient	度值 Degree
TC	9, 12-十八碳二烯酸 9,12-Octadecadienoic acid	95
CR	常春藤皂苷元 Hederagenin	94

TC	8-十八碳烯酸 8-Octadecenoic acid	85
TC	9-十八碳烯酸 9-Octadecenoic acid	84
TC	11-十八碳烯酸 11-Octadecenoic acid	82

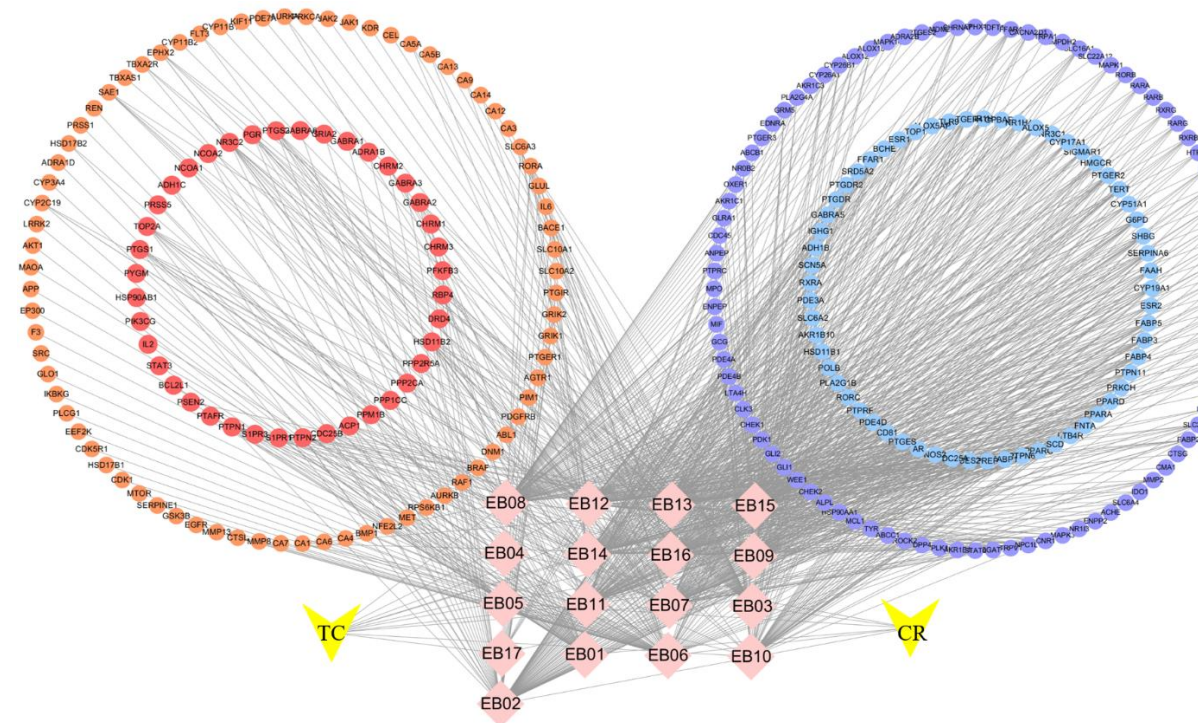


图 2 药物-潜在活性成分-潜在靶点网络

Fig. 2 Network diagram of drug-potential active ingredient-potential targets

注：圆点代表潜在靶点；粉色菱形代表潜在活性成分；黄色箭头代表药物；EB01~EB17 分别对应表 1 中的化合物。Note: The rounds represent potential targets; the pink rhombus represents the potential active ingredient; the yellow arrows represent drugs; EB01-EB17 correspond to the compounds in Table 1 respectively.

2.4 交集靶点的 PPI 网络构建

将交集靶点导入 STRING 中构建 PPI 网络，将结果以 TSV 格式导入 Cytoscape3.7.2。运用 Network Analyzer 和 cytoNCA 插件分析后得到 BC、CC、DC 分别为 46.15、0.0093、21.69，通过筛选（即 BC、CC、DC 均大于中位数）得出核心节点 13 个。进一步运用 Cytoscape3.7.2 使网络清晰化，该网络包括 65 个节点，705 条边（见图 3）。在 PPI 网络中节点越大、颜色越深，表明其度值较大，在此网络中占有重要位置。经过数据分析可得度值排名前 4 的核心节点为 IL-6、AKT1、STAT3、PPARG。

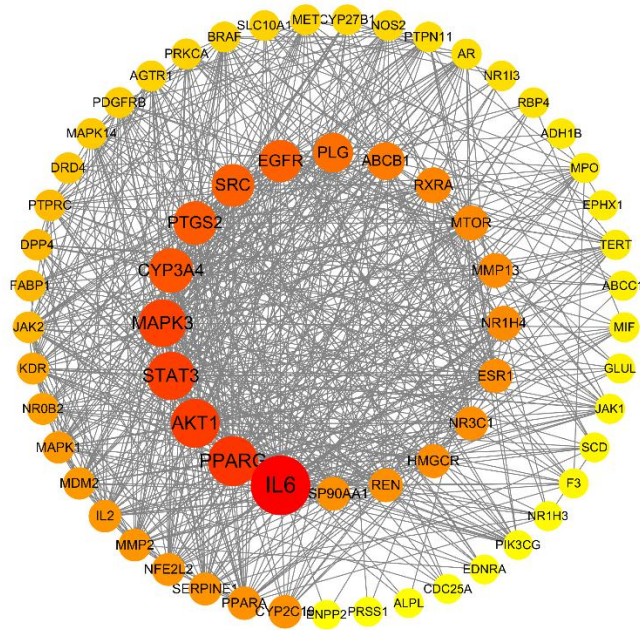


图 3 CRTC 关键靶点的 PPI 图

Fig. 3 PPI network diagram of key targets of CRTC

2.5 CRTC 抗肝纤维化的 GO、KEGG 富集分析

在 Metascape 数据库中录入数据获得富集分析结果。我们共得到 1 150 个 GO 注释结果，其中生物过程（biological process, BP）有 1 025 个、细胞组分（cellular component, CC）有 41 个、分子功能（molecular function, MF）有 84 个，按照 *P*-Value 进行排序，分别取前 10 位并借助微生信网站进行可视化处理。在 BP 中主要涉及对激素的反应、对磷代谢过程的正向调控、对磷酸盐代谢过程的正向调控等；在 CC 中主要涉及受体复合体、膜筏、膜微区等；在 MF 中主要涉及转录因子结合、激酶结合、激酶活性等（见图 4）。

KEGG 分析共获得 149 条通路，按照 *P*-value 进行排序，选取 *P* 值较小、富集基因数较大的前 20 条通路进行可视化展示（见图 5）。图示中越偏向红色，则 *P*-Value 值越小，通路基因富集数目越多则越有意义。CRTC 治疗肝纤维化可能与 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、PI3K-Akt 信号通路等通路相关，说明 CRTC 可通过多条通路协同治疗肝纤维化。其中 CRTC 抗肝纤维化的核心靶点 IL-6、AKT1、STAT3 均富集在 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性通路上。

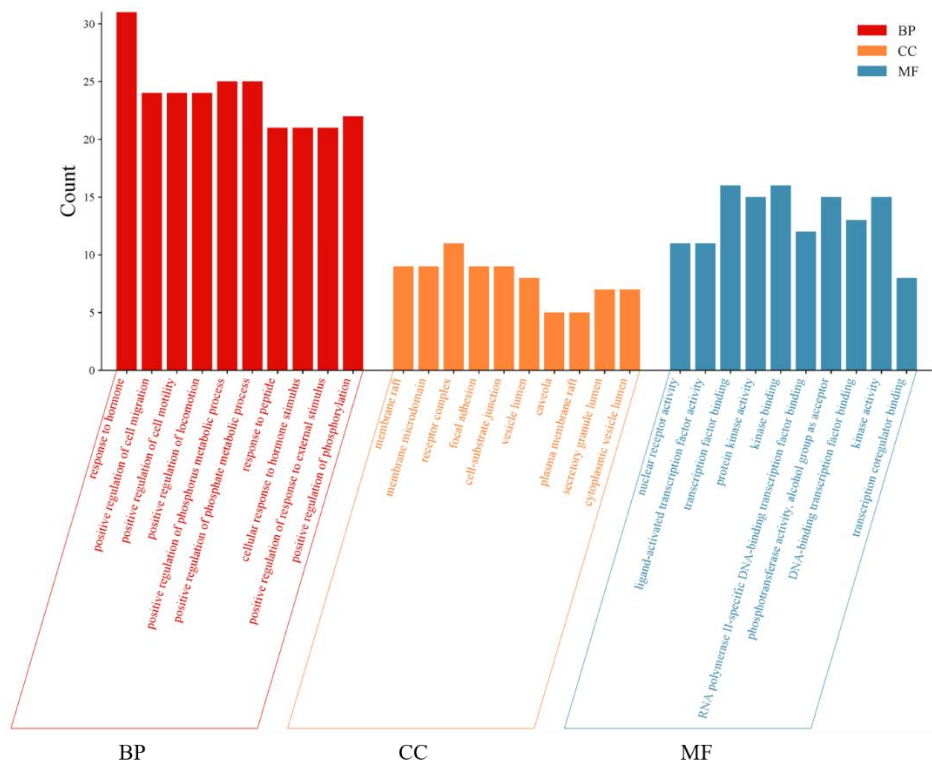


图 4 CRTC 与肝纤维化交集靶点的 GO 功能分析图

Fig. 4 GO functional analysis diagram of intersection targets of drugs and diseases

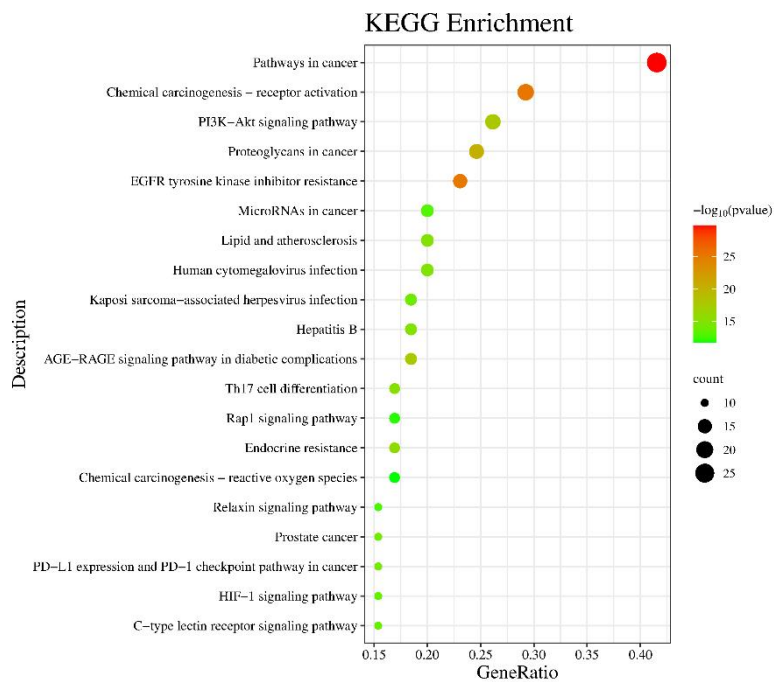


图 5 CRTC 与肝纤维化交集靶点的 KEGG 通路富集分析图

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis diagram of intersection targets of CRTC and liver fibrosis

2.6 疾病-关键靶点-关键通路网络图构建与分析

将“2.5”得到的前 20 条通路（见表 3）及其所涉及的靶点导入 Cytoscape3.7.2 软件，并建

立疾病-关键靶点-关键通路网络图（见图 6）。该图包括 64 个节点，259 条边。表明 CRTC 抗肝纤维化的作用机制是涉及多成分、多靶点、多通路的。

表 3 前 20 条关键通路

Table 3 The top 20 critical pathways

通路编号 Pathway number	通路名称 Pathway name
hsa05200	癌症通路 Pathways in cancer
hsa05207	化学致癌-受体激活 Chemical carcinogenesis-receptor activation
hsa01521	EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性 EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance
hsa05205	癌症中的蛋白多糖 Proteoglycans in cancer
hsa04151	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway
hsa04933	糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications
hsa01522	内分泌抵抗 Endocrine resistance
hsa04659	Th17 细胞分化 Th17 cell differentiation
hsa05417	脂质与动脉粥样硬化 Lipid and atherosclerosis
hsa05161	乙型肝炎 Hepatitis B
hsa05163	人巨细胞病毒感染 Human cytomegalovirus infection
hsa05235	癌症中 PD-L1 的表达和 PD-1 检查点通路 PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer
hsa05167	卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染 Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection
hsa05215	前列腺癌 Prostate cancer
hsa04625	C 型凝集素受体信号通路 C-type lectin receptor signaling pathway
hsa04066	HIF-1 信号通路 HIF-1 signaling pathway
hsa05223	非小细胞肺癌 Non-small cell lung cancer
hsa05214	胶质瘤 Glioma
hsa05206	癌症中的微核糖核酸 MicroRNAs in cancer
hsa04926	松弛素信号通路 Relaxin signaling pathway

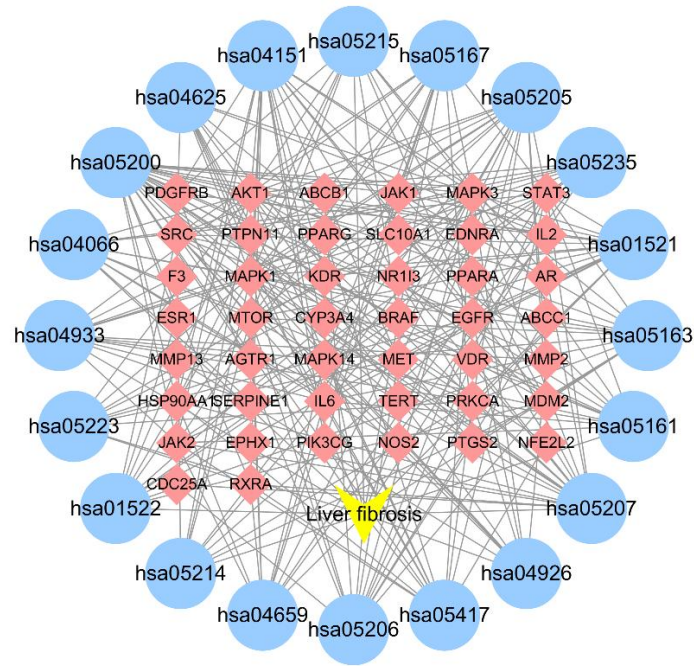


图 6 CRTC 治疗肝纤维化的疾病-关键靶点-关键通路网络图

Fig. 6 Disease-key targets-key pathways network diagram of CRTC in treating liver fibrosis

注：粉色菱形代表关键靶点，蓝色圆形代表关键通路，黄色箭头代表肝纤维化。Note: The pink rhombus represents the key targets; the blue rounds represents key pathways; the yellow arrows represent liver fibrosis.

2.7 分子对接结果

在 PPI 网络中，排名前 4 的核心靶点分别为 IL-6、AKT1、STAT3、PPARG，我们将它们分别与 8，11-十八碳二烯酸、wenjine、胡萝卜苷、9，12-十八碳二烯酸进行分子对接。一般认为结合能 < 0 kcal/mol 可自发结合，结合能的数值越小，则表明靶点与成分之间具有更稳定的结合构象和更大的相互作用可能性。在本研究中，4 组靶点与活性成分的结合能均小于 -4.0 kcal/mol，提示 4 种化合物与其相应靶蛋白均有良好的结合活性，范围在 $-7.18 \sim -4.45$ kcal/mol 之间（见表 4）。图 7 描绘了 4 组受体与配体的可视化结果，我们发现 AKT1 与 wenjine，PPARG 与 9，12-十八碳二烯酸的对接结合能 ≤ -6.0 kcal/mol，且均形成稳定的氢键。综上所述，这四种化合物可能对其相应的靶标具有很强的抑制活性，从而发挥抗肝纤维化作用。

表 4 核心成分与核心作用靶点的分子对接结合能

Table 4 The molecule docking binding energy between core components and core targets

活性成分 Active ingredient	靶点 Target	PDB ID	结合能 Binding energy (kcal/mol)
8, 11-十八碳二烯酸	IL-6	1ALU	-4.45

8,11-Octadecadienoic acid				
Wenjine	AKT1	1H10		-7.18
胡萝卜昔 Alexandrin	STAT3	6NJS		-4.54
9, 12-十八碳二烯酸	PPARG	2Q59		-6.42
9,12-Octadecadienoic acid				

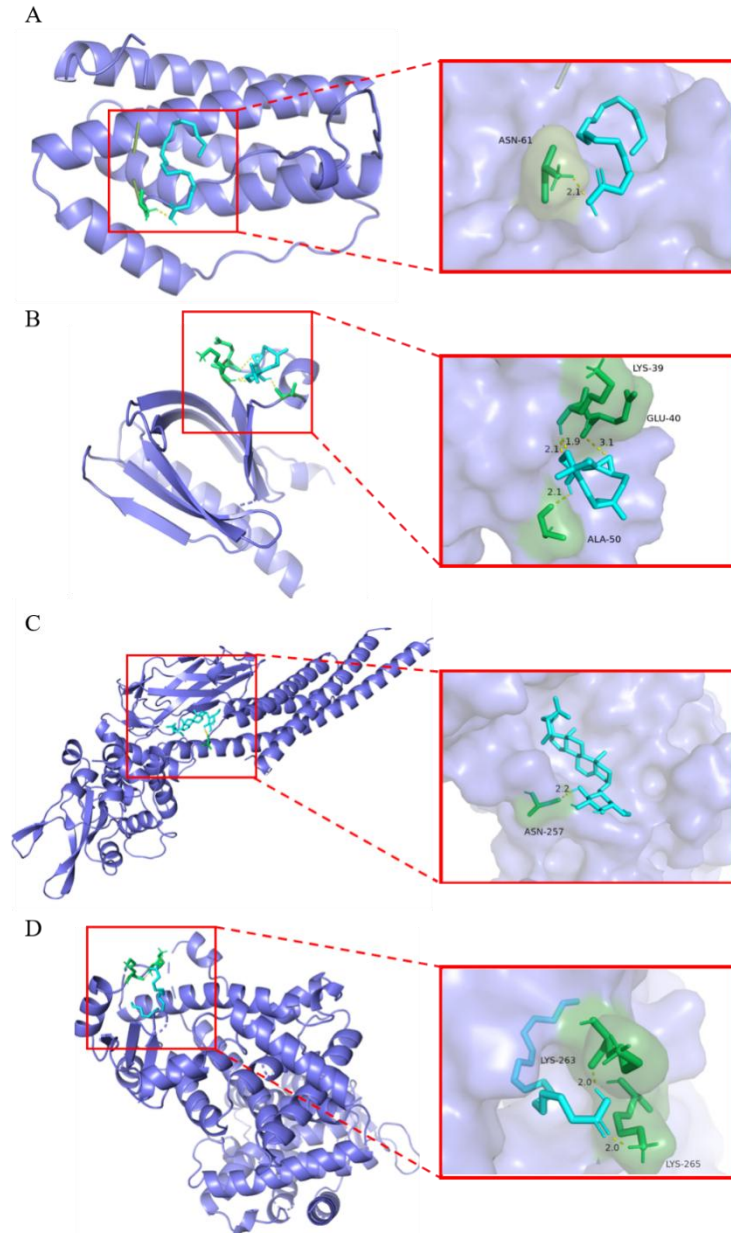


图 7 核心成分与核心作用靶点分子对接示意图

Fig. 7 Schematic diagram of molecule docking between core components and core targets

注：A：IL-6 与 8, 11-十八碳二烯酸；B：AKT1 与 wenjine；C：STAT3 与胡萝卜昔；D：PPARG 与 9, 12-十八碳二烯酸。Note: A: IL-6 and 8,11-octadecadienoic acid; B: AKT1 and wenjine; C: STAT3 and alexandrin; D: PPARG and 9,12-octadecadienoic acid.

2.8 CRTC 对肝纤维化大鼠的影响

2.8.1 大鼠一般情况

空白组大鼠生长状态良好，反应敏锐，皮毛光泽，摄食及大小便正常，未出现死亡情况。与模型组相比，阳性组和 CRTC 各剂量组的大鼠在药物干预后体重逐步增长，食量、饮水也有一定程度增加，精神状态转好，大便溏烂得到不同程度的缓解。

2.8.2 对大鼠肝脏组织形态的影响

空白组大鼠的肝小叶结构清晰完整，以中央静脉为中心，肝索呈放射状整齐排列，肝细胞未见脂肪变性、坏死及炎症细胞浸润现象。模型组大鼠的肝小叶结构紊乱，肝索排列紊乱，出现大量的脂肪变性及肝细胞坏死，伴有明显的炎症细胞浸润。与模型组对比，水飞蓟宾组和 CRTC 各剂量组的大鼠肝组织损伤情况均有不同程度的改善，肝小叶结构稍显清晰，肝细胞变性、坏死减少，炎症细胞浸润程度减轻（见图 8）。

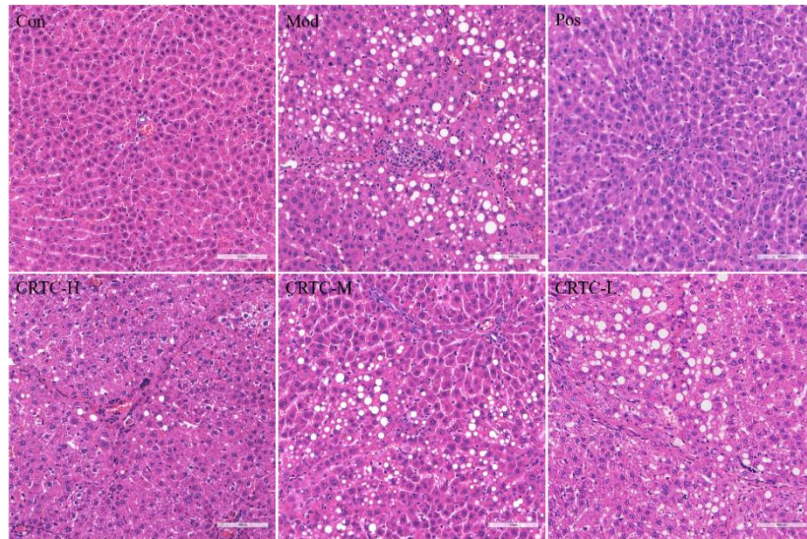


图 8 CRTC 对肝脏组织病理学影响 (HE,×20)

Fig. 8 Effects of CRTC on liver histopathology (HE, ×20)

2.8.3 CRTC 对肝纤维化大鼠 IL-6、EGFR、STAT3 的影响

ELISA 结果显示：与空白组相比，模型组大鼠血清中的 IL-6、EGFR、STAT3 水平均明显增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组相比，阳性组大鼠血清中的 IL-6、EGFR、STAT3 含量均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。我们发现 CRTC 的各剂量组大鼠血清中 IL-6、EGFR、STAT3 三者水平均有不同程度的降低，其中高剂量给药组对于这三个指标的影响最大，显著性最高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)（见表 5 和图 9~11）。

表 5 CRTC 对肝纤维化大鼠 IL-6、EGFR、STAT3 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effects of CRTC on IL-6, EGFR, STAT3 in rats with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	IL-6	EGFR	STAT3
----	------	------	-------

Group	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
Con	1.98±0.75	83.09±25.05	96.31±6.58
Mod	5.47±2.61 ^{##}	118.6±23.39 [#]	114.5±5.63 ^{##}
Pos	2.02±1.71 ^{**}	83.99±13.87 [*]	97.03±8.42 ^{**}
CRTC-H	2.24±1.49 ^{**}	84.57±25.22 [*]	97.92±8.12 ^{**}
CRTC-M	2.35±1.65 [*]	85.70±28.62	99.42±8.10 ^{**}
CRTC-L	2.64±1.65 [*]	89.36±15.66	100.4±10.73 [*]

注：与空白组相比，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组相比，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Con, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; compared with M, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

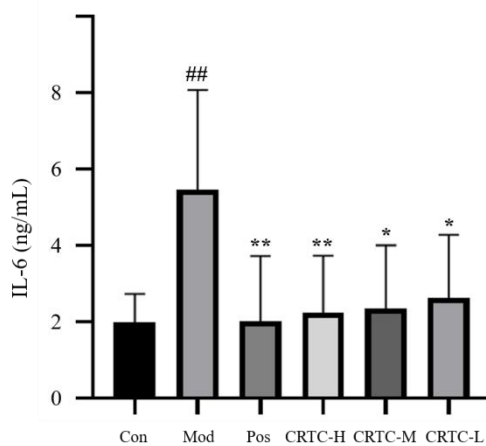


图 9 CRTC 对 IL-6 含量的影响

Fig. 9 Effects of CRTC on IL-6 expression

注：与空白组相比，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组相比，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con, ^{##} $P < 0.01$;

compared with M, ^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$.

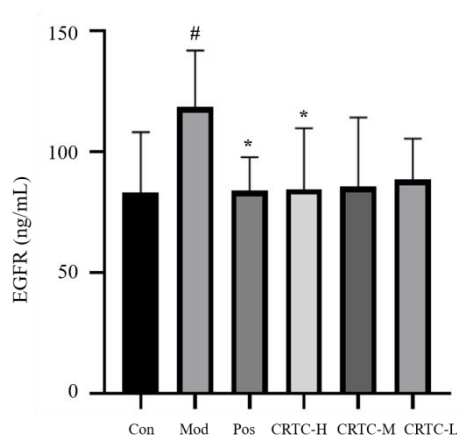


图 10 CRTC 对 EGFR 含量的影响

Fig. 10 Effects of CRTC on EGFR expression

注：与空白组相比， $^{\#}P<0.05$ ；与模型组相比， $^*P<0.05$ 。Note: Compared with Con, $^{\#}P<0.05$; compared with M, $^*P<0.05$.

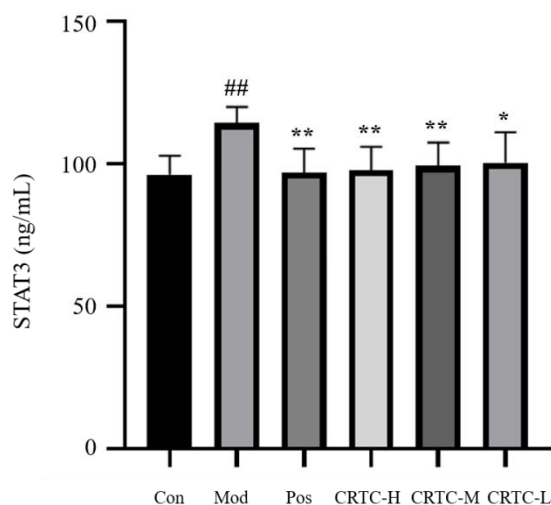


图 11 CRTC 对 STAT3 含量的影响

Fig. 11 Effects of CRTC on STAT3 expression

注：与空白组相比， $^{\#\#}P<0.01$ ；与模型组相比， $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。Note: Compared with Con, $^{\#\#}P<0.01$; compared with M, $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$.

3 讨论与结论

传统药物的现代作用特点和机制研究，一直是中医药现代研究的重点内容之一。鳖甲和莪术药对，为中医临床治疗肝纤维化的常用药物，临床上两者常常相须为用，发挥活血化瘀、软坚散结的作用，具有明确的抗肝纤维化的作用，但长期以来这两味药对协同抗肝纤维化的具体作用机制并不清楚。

本文运用现代网络药理学，首先筛选出了 CRTC 与肝纤维化的交集靶点，然后制作 PPI 网络，筛选出核心靶点有 IL-6、AKT1、STAT3、PPARG 等。其中 IL-6 是度值排名最高的关键靶点，IL-6 是促炎细胞因子家族的成员，它可以影响多种免疫和生理过程，例如急性期蛋白生成（例如 C 反应蛋白、铁调素等）、炎症、抗原特异性免疫反应、造血、细胞凋亡、分化和细胞代谢等。此外，有研究发现肝细胞中 STAT3 信号的激活通常会通过预防肝细胞损伤和抑制 STAT1 信号来改善肝脏炎症进而调控肝纤维化进程；STAT3 还能调控成纤维细胞向肌成纤维细胞的转变以及基质金属蛋白酶及其同源抑制蛋白的转录，从而在细胞外基质降解层面对肝纤维化起改善作用^[12,13]。分析可得 IL-6、STAT3 对于 CRTC 抗肝纤维化具有重要意义。

进一步利用拓扑分析对网络模型进行分析，发现 CRTC 多成分多靶点的药理作用形成了

复杂的网络，筛选出关键的 5 种功效成分即为 9, 12-十八碳二烯酸、常春藤皂苷元、8-十八碳烯酸、9-十八碳烯酸、11-十八碳烯酸。其抗肝纤维化主要涉及的生物过程有激素的反应、磷代谢过程的正向调控、磷酸盐代谢过程的正向调控等，细胞组分涉及受体复合体、膜筏、膜微区等，分子功能主要涉及转录因子结合、激酶结合、激酶活性等；核心的信号通路包括 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、PI3K-Akt 信号通路等。我们发现，在 KEGG 通路富集分析中 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性的 *P*-value 值较小，富集在此通路上的基因数目较多，且核心靶点 IL-6、AKT1、STAT3 等均富集在 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性通路上。说明 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性通路对于 CRTC 抗肝纤维化具有重要意义，而它与 JAK-STAT、PI3K-Akt 等通路相互作用串联形成的信号网络在其作用机制中不可忽视。多项研究表明 IL-6/EGFR/STAT 信号轴参与细胞生长、增殖、分化、凋亡以及免疫调节等多种重要生物学过程^[4]。IL-6 作为机体免疫应答的重要炎症介质可以促进 JAK/STAT 信号激活，它结合受体后能促进 JAK1 的活化和 STAT3 的磷酸化与转录。多数研究表明，STAT3 在几乎所有的纤维化系统中都被频繁地激活；在肝脏中，STAT3 信号是控制肝脏炎症的关键抗炎信号，激活它能在肝纤维化过程中发挥着抗炎和免疫调控作用^[15,16]。此外，在临床前的动物模型中使用 STAT3 抑制剂显示出良好的抗纤维化活性，显然这说明 STAT3 是治疗患者纤维化疾病的真正靶点¹³。已知 EGFR 是肝再生初始阶段肝细胞增殖的关键调节因子；在所有组织中，EGFR 在成人肝脏的肝细胞中表达最高，表明其在维持肝功能中发挥重要作用。首先，EGF 是一种已知的参与 HSC 激活的可溶性介质，而 EGFR 能介导 HSC 的激活并促进促纤维化表型，其确切机制可能涉及肝组织中活性氧的产生^[17]。其次，在 Fuchs 等人的研究中发现，在多个肝纤维化模型中，EGFR 抑制剂能抑制几个已知的促纤维化基因的表达，这是首次证明抑制 EGFR 可以逆转肝纤维化^[18]。最后，EGFR 还能与其特异性配体结合形成二聚体，触发多种效应蛋白的磷酸化并激活多个经典下游信号通路，如信号转导子和转录激活子（STAT）途径等；EGFR 作为肝脏对损伤反应所有阶段的关键参与者，可诱导经典的 STAT3 Tyr⁷⁰⁵ 磷酸化，从而控制细胞因子的增殖和分化，进而抑制纤维化的形成^[19-21]。故通过网络药理学预测出核心靶点与通路，并进一步利用实验验证所预测的 IL-6/EGFR/STAT3 信号轴对肝纤维化的调控作用有助于我们对于 CRTC 抗肝纤维化作用机制的理解。

动物实验验证中，HE 染色结果表明给药后炎症浸润等病理形态得到改善，说明 CRTC 能缓解猪血清引起的肝纤维化。进一步 ELISA 的结果显示，模型组大鼠血清的 IL-6、EGFR、STAT3 含量显著升高，给药后均明显下调，且呈现出剂量相关性。本研究提示了 CRTC 治疗肝纤维化的作用机制可能与 IL-6/EGFR/STAT3 信号轴有关，为揭示传统 CRTC 治疗肝纤

维化的现代机制提供了一定的依据,也为网络药理学和分子对接技术用于传统药物的分子机制研究提供了有益的参考。

参考文献

- 1 Shi WQ,Pei YQ,Cai M.Clinical Practice of Integrated Diagnosis and Treatment of Traditional Chinese and Western Medicine for Liver Fibrosis(肝纤维化中西医结合诊疗的临床实践)[M].Beijing:Science Press,2019,10:2.
- 2 Li M,Wang ZQ,Zhang L,et al.Burden of cirrhosis and other chronic liver diseases caused by specific etiologies in China,1990-2016:findings from the global burden of disease study 2016[J].Biomed Environ Sci,2019,33:1-10.
- 3 Byass P.The global burden of liver disease:a challenge for methods and for public health[J].BMC Med,2014,12:159.
- 4 GBD 2015 DALYs and HALE Collaborators.Global,regional,and national disability-adjusted life-years(DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy(HALE),1990-2015:a systematic analysis for the global burden of disease study 2015[J].Lancet,2016,388:1603-1658.
- 5 Zhao D,Xu J.Research progress in the diagnosis and treatment of liver fibrosis with traditional Chinese medicine[J].Chin J Integr Tradit West Med Liver(中西医结合肝病杂志),2023,33:953-956.
- 6 Liu XB,Li X,Wu YX,et al.A review on treating liver fibrosis from Yu and Xu[J].Clin J Chin Med(中医临床研究),2020,12:137-142.
- 7 Lin MS,Chai ZS.Research progress of anti-hepatic fibrosis effect and compatibility of Curcumae Rhizoma[J].Res Zhuang Yao Ethnic Med(壮瑶药研究),2022,1:53-58.
- 8 Li Y,Hu ZB,Zhang X,et al.Research overview of TCM treatment of liver fibrosis[J].West J Tradit Chin Med(西部中医药),2023,36:138-141.
- 9 Wu FX,Wang XQ,Liu JB.Research progress in the treatment of liver fibrosis with traditional Chinese and Western medicine[J].Tradit Chin Med Res(中医研究),2022,35:87-91.
- 10 Yang JM,Lei XL,Pang L,et al.Analysis of medication rules of traditional Chinese medicine in the treatment of liver fibrosis based on traditional Chinese medicine inheritance computing platform[J].Chin J Integr Tradit West Med on Liver(中西医结合肝病杂志),2022,32:1012-1015.
- 11 Wei W.Methology on Pharmacological Research(药理研究方法学)[M].Beijing:The Medicine Science and Technology Press of China,2021:368.
- 12 Uciechowski P,Dempke WCM.Interleukin-6:a masterplayer in the cytokine

network[J].Oncology,2020,98:131-137.

- 13 Kasembeli MM,Bharadwaj U,Robinson P,et al.Contribution of STAT3 to inflammatory and fibrotic diseases and prospects for its targeting for treatment[J].Int J Mol Sci,2018,19:2299.
- 14 Lan Y,Zhang KF,Lian YY,et al.Study on the protective effect of bergenin on acute liver injury in rats based on IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:1445-1451.
- 15 Morris R,Kershaw NJ,Babon JJ.The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway[J].Protein Sci,2018,27:1984-2009.
- 16 Mair M,Blaas L,Österreicher CH,et al.JAK-STAT signaling in hepatic fibrosis[J].Front Biosci(Landmark Ed),2011,16:2794-811.
- 17 Liang D,Chen H,Zhao L,et al.Inhibition of EGFR attenuates fibrosis and stellate cell activation in diet-induced model of nonalcoholic fatty liver disease[J].Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis,2018,1864:133-142.
- 18 Fuchs BC,Hoshida Y,Fujii T,et al.Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma[J].Hepatology,2014,59:1577-90.
- 19 Zhou L,Wang X,Lu J,et al.EGFR transcriptionally upregulates UTX via STAT3 in non-small cell lung cancer[J].J Cancer Res Clin Oncol,2022,148:309-319.
- 20 Komposch K,Sibilia M.EGFR signaling in liver diseases[J].Int J Mol Sci,2015,17:30.
- 21 Waitkus MS,Chandrasekharan UM,Willard B,et al.STAT3-mediated coincidence detection regulates noncanonical immediate early gene induction[J].J Biol Chem,2013,288:11988-2003.

收稿日期：2023-11-28 接受日期：

基金项目：国家中医药管理局项目（003112011013）；四川省科技厅项目（319022032）

*通信作者 E-mail: Xuhuaqin0028@126.com, J15184436539@163.com