

茅苍术醇提物的肝功能保护作用及其机制研究



王 琦, 王 燕, 陈思妙, 雷茜怡, 曹皇亮, 周仲实, 成焕波, 王光忠

湖北中医药大学药学院 (武汉 430065)

【摘要】目的 基于网络药理学和动物实验探究茅苍术醇提物对胆管结扎肝纤维化小鼠肝功能的保护作用及可能分子机制。**方法** 选取经文献和实验验证的茅苍术主要活性成分苍术素、白术内酯 I、II、III, 通过 SwissTargetPrediction 数据库获取其靶点; 通过在线人类孟德尔遗传数据系统 (OMIM)、DisGeNET、GeneCards 数据库获取肝纤维化疾病靶点。将靶点导入微生信平台, 获取茅苍术抗肝纤维化的交集靶点; 采用 Cytoscape 3.10.1 构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图、蛋白-蛋白相互作用核心靶点网络图, 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析, 并将活性成分与核心靶点进行分子对接。采用胆管结扎构建肝纤维化小鼠模型, 进行肝功能相关指标检测。**结果** 共得到苍术素、白术内酯 I、II、III 对应靶点 91 个, 肝纤维化疾病靶点 9 296 个, 交集靶点 74 个, 核心靶点 31 个; KEGG 富集分析显示, 主要涉及的信号通路有表皮生长因子受体 (EGFR) 及磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (Akt) 等炎症通路; 分子对接结果显示其活性成分与核心靶点蛋白之间具有较强的结合活性。动物实验结果表明, 与假手术组比较, 模型组小鼠的肝损伤明显, 肝脏指数、脾脏指数、血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性、肝纤维化程度、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原 $\alpha 1$ (COL1A1) 的 mRNA 和蛋白表达水平以及 IV 型胶原 $\alpha 2$ (COL4A2) 的 mRNA 表达水平显著升高, 胸腺指数显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 茅苍术给药组小鼠肝损伤情况减轻, 肝脏指数、脾脏指数、血清 ALT、AST 活性、肝纤维化程度、 α -SMA、COL1A1 的 mRNA 和蛋白表达水平以及 COL4A2 的 mRNA 表达水平显著降低, 胸腺指数显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 茅苍术可改善肝功能, 减轻肝纤维化小鼠组织病理损伤, 这可能与激活 PI3K/Akt 等通路、抑制氧化应激和炎症反应, 进而干预肝纤维化有关。

【关键词】 茅苍术; 胆管结扎; 肝纤维化; 网络药理学; 分子对接; 肝功能; 苍术素; 白术内酯

【中图分类号】 R969 **【文献标识码】** A

Study on the liver function protective effect and mechanism of ethanol extract from *Atractylodes lancea*

WANG Qi, WANG Yan, CHEN Simiao, LEI Xiyi, CAO Huangliang, ZHOU Zhongshi, CHENG Huanbo, WANG Guangzhong

College of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Corresponding author: WANG Guangzhong, Email: wgzhong4067@sina.com

【Abstract】Objective Based on the network pharmacology and animal experiments, to investigate the protective effect and possible molecular mechanism of ethanol extract from

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202404042

基金项目: 湖北省自然科学基金联合基金项目 (2022CFD062)

通信作者: 王光忠, 博士, 教授, 博士研究生导师, Email: wgzhong4067@sina.com

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

Atractylodes lancea on liver function in mice with liver fibrosis induced by bile duct ligation.

Methods The main active ingredients atractylodin, atractylenolide I, II and III from Atractylodes lancea were selected, which had been verified by literature and experiments, and the targets of these active ingredients were obtained through the SwissTargetPrediction database. The liver fibrosis disease targets were obtained through On-line Mendelian Inheritance in Man (OMIM), DisGeNET and GeneCards databases. The targets were added to the Wei Sheng Xin platform to find the intersection target for Atractylodes lancea in treating liver fibrosis. Cytoscape 3.10.1 was used to construct the “drug-component-target-disease” network diagram and protein-protein interaction core target network diagram. GO functional enrichment analysis and KEGG pathway analysis were performed, and molecular docking was performed between active components and core targets. Liver fibrosis was induced in mice by bile duct ligation, and liver function markers were measured. **Results** A total of 91 corresponding targets of atractylodin, atractylenolide I, II and III and 9 296 liver fibrosis disease targets were obtained, including 74 intersecting targets and 31 core targets. KEGG enrichment analysis showed that the main signaling pathways involved included inflammatory pathways such as epidermal growth factor receptor (EGFR) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt). Molecular docking results showed that the active ingredients had strong binding activity with the core target protein. The results of animal experiments showed that, compared with the sham surgery group, the model group displayed notable, the liver index, spleen index, activity of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), degree of liver fibrosis, mRNA and protein expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and recombinant collagen type I alpha 1 (COL1A1), and mRNA of recombinant collagen type IV alpha 2 (COL4A2) were significantly increased, and the thymus index was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with the model group, the liver injury of mice in the Atractylodes lancea administration group reduced liver injury, its liver index, spleen index, activity of serum ALT and AST, degree of liver fibrosis, mRNA and protein expression of α -SMA and COL1A1, and mRNA of COL4A2 were significantly decreased, and the thymus index was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Atractylodes lancea can improve liver function and alleviate tissue pathological damage in mice with liver fibrosis, which may be related to activating pathways such as PI3K/Akt, inhibiting oxidative stress and inflammatory reactions, and intervening in liver fibrosis.

【Keywords】 Atractylodes lancea; Bile duct ligation; Liver fibrosis; Network pharmacology; Molecular docking; Liver function; Atractylodin; Atractylenolide

肝纤维化是多种慢性肝病发展至肝硬化、肝癌所共有的病理改变，也是其病理发展必经阶段中唯一可被逆转的过程^[1-2]。目前，临床治疗肝纤维化的药物如干扰素、皮质类固醇等存在长期服用后毒性大、不良反应多等问题。采用中医药治疗肝纤维化，因运用了辨证论治，具备整体观和多靶点的药理作用，且安全性较高，具有显著的优势，有进一步发展的潜力^[3]。

《金匱要略》中“见肝之病，知肝传脾”，肝脏疾病常累及脾脏，导致脾运失调，现代中

医药研究表明，肝纤维化的治疗病机复杂，而肝郁脾虚是肝纤维化最常见的证型，故治疗肝纤维化中医建议以疏肝健脾为主^[4-6]。苍术，归脾、胃、肝经，具有燥湿健脾的功效。且应用历史悠久，清朝黄元御撰《玉楸药解》曰：“苍术走而不守……泄水开郁，苍术独长”，朱丹溪亦指出苍术“能解诸郁”^[7-8]。而郁证以肝郁多见，提示苍术可能有疏肝解郁的功效，具有抗肝纤维化的潜力。且在具有解六郁之功效的解郁行气经典名方越鞠丸中，苍术处于重要地

位^[9]。另有越鞠丸加方被验证具有调节肝功能、抗肝纤维化的作用^[10]。近年来有研究表明,苍术的有效成分具有抗炎和保肝活性,如:苍术素、白术内酯 III 具有改善非酒精性脂肪肝病和抑制肝纤维化的药理作用^[11-13];白术内酯 I 可以改善对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤,降低肝脏炎症^[14-15];白术内酯 II 能改善自发性高血压大鼠纤维化和氧化应激^[16]等,具有良好的保肝活性。但其保护肝功能的可能分子机制尚不明确。基于此,本研究拟采用网络药理学结合动物实验,探究茅苍术缓解肝纤维化组织病理学改变、减轻肝损伤及肝功能保护可能作用的靶点和通路,以期为茅苍术抗肝纤维化的临床应用提供实验依据和理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

FA1004 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);BTC-8J 超声波清洗机(鼎泰生化科技设备制造有限公司);Eclipse Ci 型正置荧光显微镜(日本尼康公司);1580R 型多功能离心机(韩国 Gene Company Limited);Nano-600 型微量核酸蛋白测定仪(上海嘉鹏科技有限公司);qTOWER3G 型荧光定量 PCR 仪(德国 Analytik Jena AG 公司)。

1.2 主要药品与试剂

茅苍术购自湖北英山,经湖北中医药大学杨红兵教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的干燥根茎,按照《中国药典(2020 年版)》标准将茅苍术药材加工制成茅苍术饮片;天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST, 批号: C010-2-1)和丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT, 批号: C009-2-1)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Masson 三色染色试剂盒(批号: G1340)和苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号: G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;天狼星红染色试剂盒(海懋康生物科技有限公司,批号: MM1004);ECL 化学发光试剂(批号: E422-01)、TRIzol 试剂盒(批号: R401-01)、QRT SuperMix for qPCR(批号: R433-01)和 SYBR qPCR Master Mix(批号: Q312-02)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PCR 引物由擎科

生物合成;一抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH, 批号: 60004-1-Ig)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA, 批号: 14395-1-AP)、I 型胶原 α 1 (recombinant collagen type I alpha 1, COL1A1, 批号: 67288-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司; β -肌动蛋白(β -actin, 爱博泰克生物科技有限公司,批号: 9100026001);二抗兔抗(北京兰杰柯科技有限公司,批号: BL003A);二抗鼠抗(武汉艾美捷科技有限公司,批号: BS12478)。

1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 30 只,8 周龄,体重 18~20 g,购自生物科技股份有限公司,动物使用许可证号: SYXK(鄂)2017-0067。小鼠饲养于室温 21~25℃、12 h 明暗交替照明的分笼内,可自由进食饮水,适应性喂养 1 周后进行后续实验。本文所涉及的动物实验操作符合湖北中医药大学动物伦理委员会规定(伦理批件号: HUCMS202209003)。

1.4 方法

1.4.1 茅苍术的活性成分选择和靶点预测

结合文献及前期研究基础,选取茅苍术中主要活性成分苍术素、白术内酯 I、II 和 III,将其结构导入 SwissTargetPrediction 数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>),设置物种为“HomoSapiens”,筛选出潜在靶点($P > 0$),并使用蛋白质信息数据库 UniProt(<https://www.uniprot.org/>)获得潜在靶点对应的基因名。

1.4.2 肝纤维化靶点的收集

于在线人类孟德尔遗传数据库(On-line Mendelian Inheritance in Man, OMIM, <https://www.omim.org/>)、基因疾病关联数据库(DisGeNET, <https://www.disgenet.org/>)及人类基因注释数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>)检索关键词“Liverfibrosis”和“Hepaticfibrosis”获得肝纤维化的相关靶点。将 3 个数据库的结果合并,并删除重复靶点,最终获得肝纤维化的相关靶点。将茅苍术活性成分潜在靶点与肝纤维化疾病靶点在微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制韦恩图,得到交集靶点,即茅苍术干预肝纤维化的作用靶点,并运用 Cytoscape 3.10.1 软件构建药物-活性成分-靶点-疾病网络图。

1.4.3 靶点蛋白-蛋白相互作用网络

将交集靶点上传至 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 设置物种为“Homosapiens”, 其他均为默认条件, 得到蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络并导入 Cytoscape 3.10.1 软件中, 通过 Centiscape 2.2 插件进行核心靶点的筛选。以插件中的“度 (degree)”值进行筛选, 最终得到核心靶点。将核心靶点导入到 String 数据库中, 默认条件, 再将得到的网络图导入 Cytoscape 3.10.1 软件进行可视化中, 得到核心靶点 PPI 网络图。

1.4.4 GO功能富集分析和KEGG通路分析

将“1.4.3”项下最终筛选得到的核心靶点上传至 DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 设置相关参数: 物种选择为“Homosapiens”, 列表类型设置为“Genelist”, 设置 SELECT identifier 为“OFFICIAL_GENE_SYMBOL”进行 GO 功能富集和 KEGG 信号通路分析。GO 和 KEGG 分析分别选择 *P* 值排名前 10 和前 20 的结果, 通过微生信平台进行可视化。

1.4.5 活性成分与靶点蛋白的分子对接

从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载活性成分的结构文件, 蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank, PDB, <https://www.rcsb.org/>) 下载 degree 值前 10 的关键靶点的蛋白 3D 结构文件, 通过 AutoDock Tools 1.5.6 处理并保存为 pdbqt 文件。使用 AutoDock Vina 1.1.2 将配体与受体进行分子对接, 计算活性成分与靶点蛋白的最低结合效能, 在 PyMol 软件中对结果进行可视化。

1.4.6 动物实验验证

①茅苍术醇提物的制备与给药剂量换算。将 100 g 生茅苍术饮片粉碎, 过 2 号筛, 用 10 倍体积的 80% 乙醇浸泡过夜; 第 2 天将浸泡后的样品超声 (功率: 400 W) 提取 3 次, 每次 2 h, 过滤, 合并滤液; 滤液在旋转蒸发器中浓缩; 真空干燥, 称重, 计算醇提物得率^[17]。《中国药典 (2020 版)》中茅苍术的临床用量为 3~9 g, 9 g 为 60 kg 的成人剂量, 每日用量为 150 mg/kg, 故计算得小鼠的等效剂量为 150 mg/kg × 12.3 = 1 845 mg/kg; 因茅苍术 80% 乙醇提取物得率为 32.57%, 计算得茅苍术给药剂量为 1 845 mg/kg × 32.57% ≈ 601 mg/kg。

②动物分组、造模及给药。将 30 只 C57BL/6

小鼠随机分为 3 组: 假手术组、模型组、茅苍术组 (601 mg/kg), 每组 10 只。其中模型组和茅苍术组小鼠进行胆总管结扎术, 采用苯巴比妥对小鼠进行腹腔麻醉, 沿小鼠腹中线剪开后, 用不可吸收的外科缝线双重结扎胆管, 全程均采用无菌器械; 假手术组小鼠除结扎胆管外, 其余步骤同上^[18]。将茅苍术醇提物溶于生理盐水, 按 1 mL/100 g 予以茅苍术组小鼠灌胃, 1 次/d, 连续 2 周; 假手术组和模型组小鼠予以同体积的双蒸水灌胃。

③免疫器官指数检测。小鼠造模后第 14 天, 称量体重, 处死后分别摘取肝脏、脾脏和胸腺, 用磷酸盐缓冲液冲洗后吸干, 用天平称量湿重, 计算免疫器官指数, 包括肝脏指数、脾脏指数和胸腺指数。计算公式为: 免疫器官指数 (%) = 器官湿重 / 体重 × 100%。

④血清学指标检测。小鼠摘除眼球取血约 0.5 mL, 4 °C 静置过夜后, 754.65 × g 离心 10 min, 取上清 100 μL, 按试剂盒说明书测定血清中 ALT 和 AST 活性。

⑤肝组织病理学观察。小鼠肝脏经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 进行常规石蜡包埋, 切片机切取 4 μm 薄片, 进行 HE、Masson 和天狼星红染色后, 于显微镜下观察肝细胞变性坏死情况、炎症程度、肝脏组织结构和胶原纤维增生情况。使用 Ishak 评分系统评定 HE 染色后肝组织纤维化分期情况。

⑥qRT-PCR 检测肝组织中 α-SMA、COL1A1 和 IV 型胶原 α2 的 mRNA 水平。取小鼠肝组织 50 mg 于 1.5 mL 的无酶 EP 管中, 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 并在无 RNA 酶的条件下使用带有基因组 DNA 清除剂的逆转录试剂盒将逆转录为

表1 引物序列

Table 1. Primer sequences

引物	长度 (bp)	序列 (5' -3')
β-actin	21	正向: GGATTCCTATGTGGGCGACGA
	20	反向: GCGTACAGGGATAGCACAGC
α-SMA	20	正向: CCTATCCCCGGGACTAAGAC
	20	反向: CCATCACCCCTGATGTCTG
COL1A1	20	正向: AAGCTGGAAAACCTGGTCTGT
	20	反向: AGCACCATCATTCCACGAG
COL4A2	20	正向: GGACAGACGAGACAACAGCA
	20	反向: GAGCTGGCATAACATTGGCG

cDNA。引物序列如表 1 所示，利用 SYBR qPCR 检测基因扩增量，PCR 循环过程为：95 ℃ 1 min、95 ℃ 20 s、60 ℃ 45 s、95 ℃ 1 min。以 β-actin 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算肝组织中 α-SMA、COL1A1 和 IV 型胶原 α2 (recombinant collagetype IV alpha 2, COL4A2) 的 mRNA 水平。

⑦ Western Blot 法检测肝组织中 α-SMA 和 COL1A1 蛋白水平。称取 30 mg 冻存的肝脏组织，按 1 : 9 加入裂解液，混匀后在 4 ℃ 条件下 $12\ 074.4 \times g$ 离心 10 min，分离得到肝组织总蛋白上清液；加入上样缓冲液，金属浴加热得到蛋白样品；蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至聚偏二氟乙烯膜，加入含 5% 脱脂奶粉的 TBST (含吐温 20 的 Tris 缓冲盐水) 封闭 2 h，一抗 (稀释比例 1 : 1 000) 置于 4 ℃ 冰箱过夜孵育，洗净后用二抗 (稀释比例 1 : 5 000) 室温孵育 1 h，加入 ECL 化学发光试剂显影，

采用 ImageJ 图像软件进行灰度值分析。

1.5 统计学分析

用 SPSS 22.0 进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组比较应采用方差分析，组间两两比较采用独立样本 *t* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 核心靶点预测结果

从数据库获得并汇总去重的苍术素、白术内酯 I、II 和 III 潜在靶点共 91 个；肝纤维化相关靶点共 9 295 个，两者的交集靶点 74 个。韦恩图见图 1A，药物-成分-靶点-疾病网络图见图 1B。

经 dgree 值筛选出茅苍术治疗肝纤维化核心靶点 70 个，PPI 核心靶点网络图见图 1C，颜色越深、形状越大，其 dgree 值则越大。dgree 值排名前 20 的关键靶点信息见表 2，IL-1β、PPARG、MAPK1、PARP1 等为排名靠前的靶点。

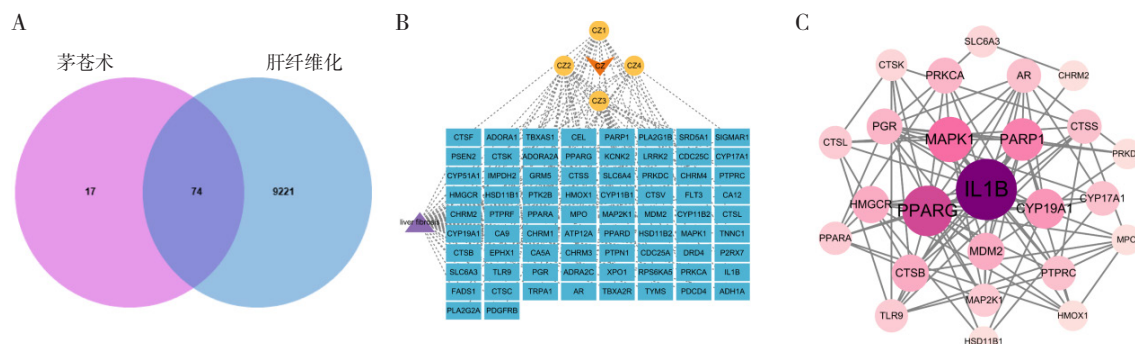


图1 靶点交集的选择以及网络图的构建

Figure 1. Selection of target inter section and construction of network diagram

注：A.交集靶点韦恩图；B.“药物-成分-靶点-疾病”网络图；C.PPI核心靶点网络图。

表2 核心靶点信息

Table 2. Information of core targets

UniProt ID	靶点	dgree值
P01584	白细胞介素-1β (interleukin-1 beta, IL-1β)	31
P37231	过氧化物酶体增殖物激活受体γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARG)	23
P28482	有丝分裂原活化蛋白激酶1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)	19
P09874	聚[ADP-核糖]聚合酶1 (poly [ADP-ribose] polymerase 1, PARP1)	17
P11511	细胞色素P450家族19亚族A成员1 (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1, CYP19A1)	15
Q00987	E3泛素蛋白连接酶 Mdm2 (E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2, MDM2)	13
P04035	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA reductas, HMGCR)	13
P07858	组织蛋白酶 B (cathepsin B, CTSB)	13
P17252	蛋白激酶C α型 (protein kinase C alpha type, PRKCA)	12
P06401	孕激素受体 (progesterone receptor, PGR)	12
P10275	雄激素受体 (androgen receptor, AR)	11
P05093	细胞色素P450家族17亚族A成员1 (cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1, CYP17A1)	11
P25774	组织蛋白酶S (cathepsin S, CTSS)	11
P08575	受体型酪氨酸蛋白磷酸酶C (receptor-typtetyrosine-protein phosphatase C, PTPRC)	11

表3 分子对接结果

Table 3. Molecular docking results

活性成分	PDB ID	关键靶点	结合能 (kcal/mol)	
苍术素 (atractylodin)	1HIB	IL-1 β	-4.9	
	1FM9	PPARG	-5.7	
	1PME	MAPK1	-6.2	
	2RCW	PARP1	-6.4	
	3S79	CYP19A1	-5.7	
	2GV2	MDM2	-4.8	
	1DQ8	HMGCR	-5.9	
	1CSB	CTSB	-5.0	
	4DNL	PRKCA	-5.1	
	2OVH	PGR	-6.4	
	白术内酯 I (atractylenolide I)	1HIB	IL-1 β	-6.4
		1FM9	PPARG	-8.1
		1PME	MAPK1	-8.6
		2RCW	PARP1	-8.8
3S79		CYP19A1	-8.8	
2GV2		MDM2	-6.7	
1DQ8		HMGCR	-6.8	
1CSB		CTSB	-7.4	
4DNL		PRKCA	-7.6	
2OVH		PGR	-8.6	
白术内酯 II (atractylenolide II)		1HIB	IL-1 β	-6.6
		1FM9	PPARG	-7.2
		1PME	MAPK1	-7.7
		2RCW	PARP1	-8.6
	3S79	CYP19A1	-7.4	
	2GV2	MDM2	-6.6	
	1DQ8	HMGCR	-7.1	
	1CSB	CTSB	-7.0	
	4DNL	PRKCA	-6.7	
	2OVH	PGR	-8.3	
	白术内酯 III (atractylenolide III)	1HIB	IL-1 β	-6.2
		1FM9	PPARG	-7.1
		1PME	MAPK1	-7.6
		2RCW	PARP1	-8.4
3S79		CYP19A1	-8.0	
2GV2		MDM2	-6.7	
1DQ8		HMGCR	-7.0	
1CSB		CTSB	-7.5	
4DNL		PRKCA	-6.6	
2OVH		PGR	-7.7	

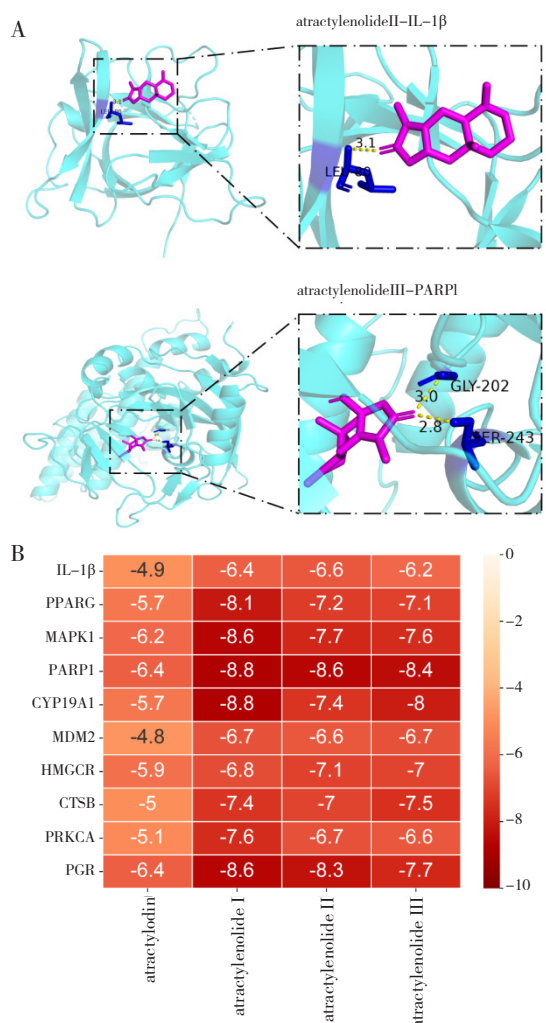


图3 分子对接示例及分子对接结果热图

Figure 3. Molecular docking example and molecular docking results heat map

注：A.有效成分与核心蛋白对接结果示意图；B.有效成分与核心蛋白对接结果热图。

2.4 动物实验结果

2.4.1 茅苍术对肝纤维化小鼠相关免疫器官的影响

造模两周后，相较于假手术组，模型组肝脏指数、脾脏指数均明显升高，胸腺指数明显降低 ($P < 0.05$)；相较于模型组，茅苍术给药组均明显下调肝脏指数、脾脏指数，上调胸腺指数 ($P < 0.05$)。具体见图 4。

2.4.2 茅苍术对纤维化小鼠肝脏病理状况的影响

如图 5A 和图 5B 所示，与假手术组比较，胆管结扎模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，茅苍术给药组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著降低 (P

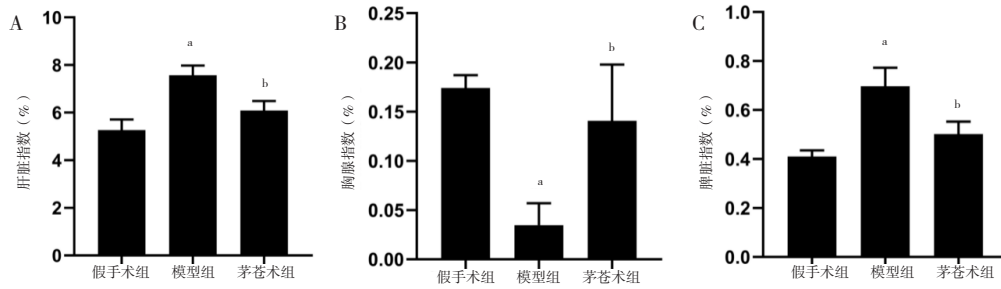


图4 茅苍术缓解肝纤维化小鼠脏器指数的异常变化 (n=10)

Figure 4. Atractylodes lancea alleviated the abnormal changes of organ index in mice with liver fibrosis (n=10)

注: A. 肝脏指数; B. 胸腺指数; C. 脾脏指数; 与假手术组比较, ^aP<0.05; 与模型组比较, ^bP<0.05。

< 0.01)。结果表明给与茅苍术后对胆管结扎诱导的小鼠肝损伤有保护作用。

如图 5C 所示, 假手术组肝脏表面光滑红润有弹性; 与假手术组相比, 模型组肝脏体积变大, 表面粗糙, 弹性较差; 而茅苍术给药组肝脏颜色、光泽和质地均有明显改善。

图 5D 中 HE 染色结果显示, 假手术组肝细胞形态正常, 肝小叶结构完整, 门静脉周围无炎症细胞浸润, 无纤维间隔; 与假手术组相比, 模型组可见肝小叶结构紊乱, 肝细胞变性坏死, 出

现炎症细胞浸润, 有明显 4 条纤维间隔; 与模型组相比, 茅苍术给药组肝小叶排列尚齐整, 炎症细胞浸润明显减少, 有 1 条纤维间隔。Masson 及天狼星红染色结果显示, 与假手术组相比, 模型纤维组织增生明显; 茅苍术给药组纤维组织增生显著减少。图 5E 为 Ishak 评分系统对肝纤维化分期统计结果, 图 5F 和图 5G 分别为 Masson 和天狼星红染色胶原纤维面积的统计结果, 该结果与染色结果一致, 提示茅苍术可有效改善纤维化小鼠的肝脏病理损伤和胶原沉积。

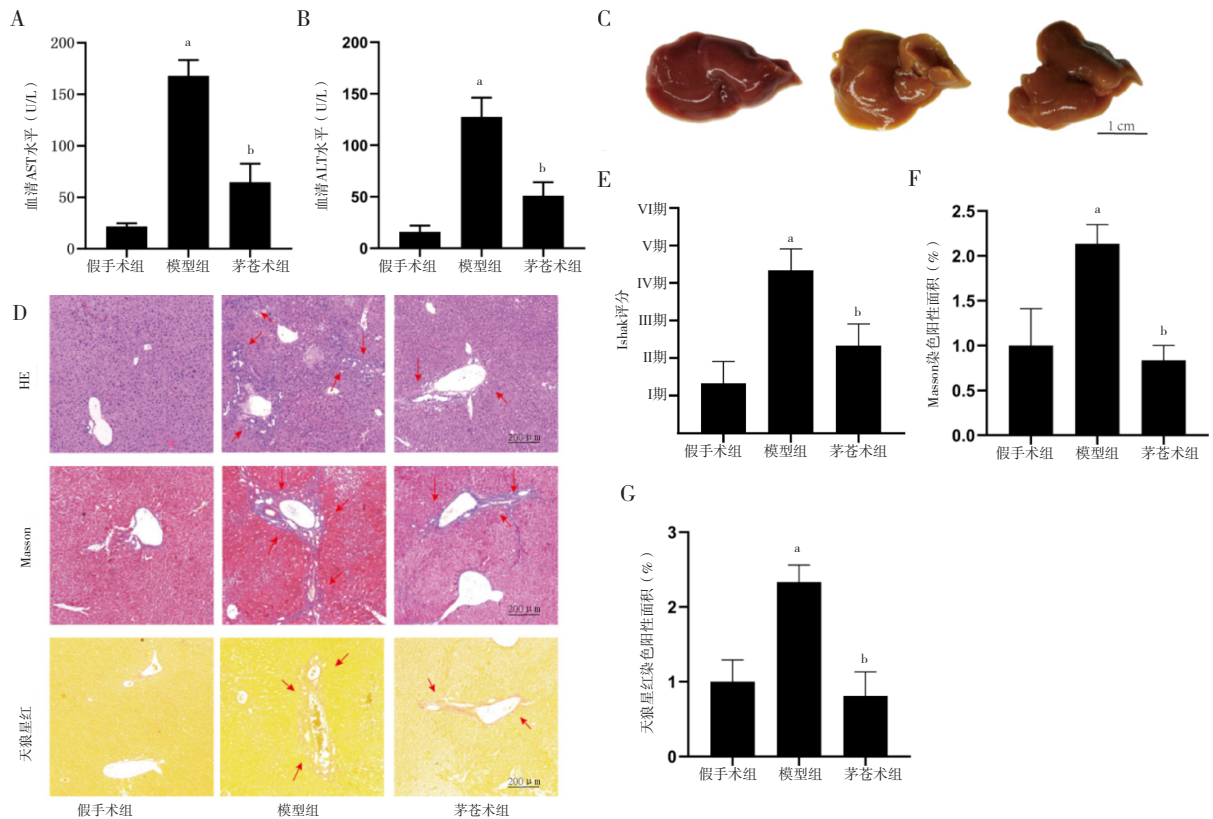


图5 茅苍术减轻胆管结扎小鼠肝脏病理损伤 (n=10)

Figure 5. Atractylodes lancea reduced liver pathological damage in mice with bile duct ligation (n=10)

注: A.血清中AST活性; B.血清中ALT活性; C.小鼠肝脏形态; D.肝组织HE、Masson、天狼星红染色图; E.Ishak评分系统对肝纤维化分期统计结果; F.肝组织Masson染色阳性面积量化统计结果; G.天狼星红染色阳性面积量化统计结果; 与假手术组比较, ^aP<0.01; 与模型组比较, ^bP<0.01。

2.4.3 茅苍术对胆管结扎小鼠肝纤维化的影响

如图 6A~C 所示, qRT-PCR 结果表明, 与假手术组比较, 模型组小鼠肝组织 α -SMA、COL1A1 和 COL4A2 的 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 茅苍术给药组小鼠肝组织 α -SMA、COL1A1 和 COL4A2 的

mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。

如图 6D~F 所示, Western Blot 结果表明, 与假手术组比较, 模型组小鼠肝组织 α -SMA 和 COL1A1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 茅苍术给药组肝组织 α -SMA 和 COL1A1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。

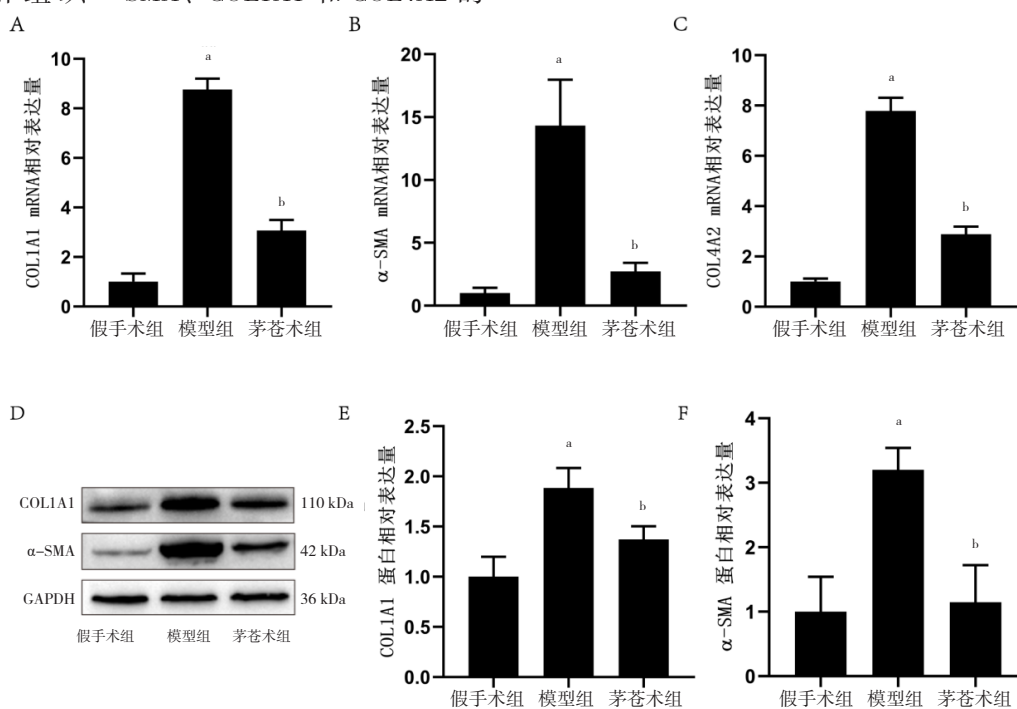


图6 茅苍术改善胆管结扎小鼠肝纤维化

Figure 6. Attractylodes lancea improved liver fibrosis in mice with bile duct ligation

注: A. COL1A1 mRNA表达; B. α -SMA mRNA表达; C. COL4A2 mRNA表达; D. COL1A1和 α -SMA的蛋白条带图; E. COL1A1蛋白表达; F. α -SMA蛋白表达; 与假手术组比较, $^aP < 0.05$; 与模型组比较: $^bP < 0.05$ 。

3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病的病理基础, 是肝脏细胞发生炎症进而发生的创伤修复反应, 纤维组织过度沉积的过程^[19-20]。胆管结扎是较经典的肝纤维化手术模型, 具有时间短、操作简便、肝损伤明显等特点^[21]。本研究通过胆总管结扎术成功构建小鼠肝纤维化模型。通过肝脏病理切片观察发现, 术后小鼠肝细胞大量坏死, 肝小叶结构紊乱, 汇管区静脉和中央静脉周围均可见大量胶原纤维生成。脏器指数是反映动物机能生长状态的重要指标, 对体内肝脏病理状态及肝纤维化的发展状态具有重要的参考意义。在胆管结扎肝纤维化小鼠中, 因胆管阻塞, 流入肝脏的血流受阻, 会导致肝脏体积增大, 且血流受阻也会影响流向脾脏的血流进而引起脾肿大^[22-23], 故本课题组将

小鼠肝脏指数、胸腺指数与脾脏指数作为检测指标。结果发现与假手术组相比, 模型组胸腺指数明显降低, 肝脏、脾脏指数均明显升高, 这说明造模后小鼠免疫功能紊乱, 肝肿大且有炎症; 与模型组相比, 给与茅苍术后, 胸腺、肝脏、脾脏指数均显著回调, 表明给药后小鼠免疫功能紊乱及炎症的病理状态有所缓解。

当肝脏持续受到损伤时, 肝脏内的肝星状细胞(HSC)会被激活, 表达 α -SMA并合成胶原, 生成过多的细胞外基质, 参与肝纤维化的形成。 α -SMA的表达情况不仅能反映HSCs的活化程度, 还能在一定程度上用于判断病情及预后^[24]。为探明茅苍术醇提物对肝纤维化小鼠HSCs活化的抑制作用, 本课题组通过qRT-PCR、Western Blot法检测HSCs活化的重要指标 α -SMA和胶原的表达水平。结果发现给与茅苍术后, 模型组升高的

α -SMA 和胶原表达水平受到明显抑制,提示茅苍术醇提物可通过抑制 HSC 活化与胶原的生成,进而减轻肝纤维化。

本课题组通过前期研究发现,茅苍术的有效成分具有改善肝损伤、降低肝脏炎症缓解肝纤维化等作用,但具体的作用机制尚不明确。本文在此基础上,首先采用网络药理学及分子对接的方法对茅苍术缓解肝纤维化的关键活性成分和核心靶点进行了预测分析,结果显示茅苍术 4 种关键核心成分与 IL-1 β 、MAPK1、PPARG、PARP1 等核心靶点之间的结合具有稳定的构象。研究发现,PPARG 的信号转导会增加非酒精性脂肪性肝炎肝脏炎症及纤维化解离,加重纤维化的发展^[25]。而 MAPK1 的磷酸化则会增加 COL1A1 的表达,使胶原沉积加剧;抑制 MAPK1 的磷酸化可减轻胶原沉积进而减轻肝纤维化^[26]。而抑制 PARP1 活化则被证实可减轻小鼠脂肪肝中的脂质积累和炎症,使肝纤维化病情好转,提示茅苍术缓解肝纤维化可能与靶向 IL-1 β 、MAPK1 等相关炎症因子有关^[27-28]。中药化学成分复杂、药理作用广泛,具有多靶点、多途径、多层次的特点。运用网络药理学可快速、全面地阐释中药作用机制,发现中药药效物质活性组合,为新药的发现与研究提供新思路。

综上,本研究通过网络药理学、分子对接和动物实验等方法初步证实了茅苍术可有效改善肝纤维化小鼠的肝损伤与纤维化,其作用机制可能与抑制 IL-1 β 、MMP-2 以及 MMP-9 等炎性介质的高表达、调控 PI3K/Akt 信号通路有关。为临床应用茅苍术等燥湿健脾类中药改善肝纤维化提供了一定的理论参考和实验依据。本研究也存在一些局限性:①仅选取 601 mg/kg 单一剂量进行药效验证;②胆管结扎肝纤维化小鼠模型不够全面,肝纤维化造模比较的经典的方法是四氯化碳法,另外还有二甲基亚砷法、硫代乙酰胺法、高脂高糖饮食法等,不同的诱导剂和方法可以建立多种类型的纤维化模型,而本文仅探究了胆汁淤积型肝纤维化模型;③本研究暂未在体内外实验中对 KEGG 通路分析得到相关通路进行验证,未来将继续对其通路机制进行深入探究。

参考文献

- 1 Chuang CJ, Wu YF, Wu KH, et al. Patients with liver cirrhosis as frequent attenders of emergency departments[J]. *Emerg Med Int*, 2020, 2020: 8289275. DOI: [10.1155/2020/8289275](https://doi.org/10.1155/2020/8289275).
- 2 Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151–166. DOI: [10.1038/s41575-020-00372-7](https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7).
- 3 Li H. Advances in anti-hepatic fibrotic therapy with Traditional Chinese Medicine herbal formula[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112442. DOI: [10.1016/j.jep.2019.112442](https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112442).
- 4 吴昊,李梦玲,邱志海.五灵胶囊对慢性乙型肝炎患者(肝郁脾虚证)肝纤维化指标及氧化应激反应的影响[J]. *现代诊断与治疗*, 2023, 34(24): 3664–3666. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/xdzdyz202324011>.
- 5 窦婧,牛丽娜,王晓忠.基于数据挖掘探讨“和法”在肝郁脾虚型肝纤维化治疗中的用药规律[J]. *现代中西医结合杂志*, 2024, 33(3): 384–389, 398. DOI: [10.3969/j.issn.1008-8849.2024.03.017](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-8849.2024.03.017).
- 6 安振涛,魏兰福,黄钰萍,等.肝纤维化中医证候规范化与客观化研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(2): 280–282. DOI: [10.3969/j.issn.1006-3250.2020.02.042](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-3250.2020.02.042).
- 7 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 155–168.
- 8 沙多依,杭永付,宋菲,等.北苍术炮制前后挥发油部位保肝作用比较研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2010, 24(4): 41–43. [Sha DY, Hang YF, Song F, et al. Study on the protecting-liver effect of volatile oil of pre and post processing Cangzhu[J]. *Research and Practice on Chinese Medicines*, 2010, 24(4): 41–43.] DOI: [10.13728/j.1673-6427.2010.04.014](https://doi.org/10.13728/j.1673-6427.2010.04.014).
- 9 靳露露.基于真核有参转录组测序分析技术探讨越鞠保和丸改善肝纤维化小鼠抑郁样行为[D].天津:天津中医药大学,2022. DOI: [10.27368/d.cnki.gtzyy.2022.000288](https://doi.org/10.27368/d.cnki.gtzyy.2022.000288).
- 10 蔡金阳,岳天祥,张月林,等.经典名方越鞠丸的历史沿革与处方考证[J]. *中草药*, 2023, 54(19): 6511–6519. [Cai JY, Yue TX, Zhang YL, et al. Historical evolution and prescription research of the classic prescription Yueju pill[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2023, 54(19): 6511–6519.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.031](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.031).
- 11 Chae HS, Kim YM, Chin YW. Atractylodin inhibits interleukin-6 by blocking NPM-ALK activation and MAPKs in HMC-1[J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1169. DOI: [10.3390/molecules21091169](https://doi.org/10.3390/molecules21091169).

- 10.3390/molecules21091169.
- 12 Li Q, Tan JX, He Y, et al. Atractylenolide III ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by activating hepatic adiponectin receptor 1-mediated AMPK pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(4): 1594–1611. DOI: [10.7150/ijbs.68873](https://doi.org/10.7150/ijbs.68873).
 - 13 Wang F, Li Z, Chen L, et al. Inhibition of ASCT2 induces hepatic stellate cell senescence with modified proinflammatory secretome through an IL-1 α /NF- κ B feedback pathway to inhibit liver fibrosis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(9): 3618–3638. DOI: [10.1016/j.apsb.2022.03.014](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.03.014).
 - 14 王倩. 苍术化学成分药理作用研究进展 [J]. *生物化工*, 2023, 9(1): 158–162. [Wang Q. Research progress on pharmacological action of chemical components of *Atractylodes lancea*[J]. *Biochemistry*, 2023, 9(1): 158–162.] DOI: [10.3969/j.issn.2096-0387.2023.01.038](https://doi.org/10.3969/j.issn.2096-0387.2023.01.038).
 - 15 曹阳, 戴国梁, 李斐然, 等. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中白术内酯 I、II、III 的浓度及苍术-香附提取物在大鼠体内的药动学研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58(17): 1582–1588. [Cao Y, Dai GL, Li FR, et al. Determination of atractylenolide I, II and III in rat plasma by LC-MS/MS and study on pharmacokinetics of *Atractylodes-Cyperis rhizoma* extract in rats[J]. *Chinese Journal of Pharmacy*, 2023, 58(17): 1582–1588.] DOI: [10.11669/cpj.2023.17.007](https://doi.org/10.11669/cpj.2023.17.007).
 - 16 Xie Z, Lin M, He X, et al. Chemical constitution, pharmacological effects and the underlying mechanism of atractylenolides: a review[J]. *Molecules*, 2023, 28(10): 3987. DOI: [10.3390/molecules28103987](https://doi.org/10.3390/molecules28103987).
 - 17 Qu L, Liu C, Ke C, et al. *Atractylodes lancea* rhizoma attenuates DSS-induced colitis by regulating intestinal flora and metabolites[J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(2): 525–552. DOI: [10.1142/S0192415X22500203](https://doi.org/10.1142/S0192415X22500203).
 - 18 Ke C, Gao J, Tu J, et al. Ganfule capsule alleviates bile duct ligation-induced liver fibrosis in mice by inhibiting glutamine metabolism[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 930785. DOI: [10.3389/fphar.2022.930785](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.930785).
 - 19 Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875. DOI: [10.3390/cells9040875](https://doi.org/10.3390/cells9040875).
 - 20 范松松, 曹学峰, 赵荣楠, 等. 胆汁淤积性肝病纤维化机制研究进展 [J]. *中国现代医生*, 2023, 61(1): 125–128. DOI: [10.3969/j.issn.1673-9701.2023.01.028](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9701.2023.01.028).
 - 21 杨婷. 双环醇改善小鼠胆总管结扎诱导的胆汁淤积性肝损伤 [D]. 天津: 天津医科大学, 2020. DOI: [10.27366/d.cnki.gtyku.2020.001251](https://doi.org/10.27366/d.cnki.gtyku.2020.001251).
 - 22 侯晓荣, 赵靖, 赵佳, 等. 五味子油联合莪术油防治肝纤维化的作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(4): 1059–1067. [Hou XR, Zhao J, Zhao J, et al. Effect and mechanism of *Schisandra chinensis* oil combined with Zedoary Turmeric oil on liver fibrosis[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2022, 53(4): 1059–1067.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.012](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.012).
 - 23 Lin WC, Lin WL. Ameliorative effect of *Ganoderma lucidum* on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(2): 265–270. DOI: [10.3748/wjg.v12.i2.265](https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i2.265).
 - 24 支廷威, 刘昌辉. 京尼平苷酸通过调控法尼醇 X 受体对胆管结扎诱导的胆汁淤积小鼠的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(12): 1606–1613. [Zhi TW, Liu CH. Effect of geniposidic acid on bile duct ligation-induced cholestasis mice through modulation of farnesoid X receptor[J]. *New Traditional Chinese Medicine and Clinical Pharmacology*, 2022, 33(12): 1606–1613.] DOI: [10.19378/j.issn.1003-9783.2022.12.003](https://doi.org/10.19378/j.issn.1003-9783.2022.12.003).
 - 25 Magee N, Zou A, Ghosh P, et al. Disruption of hepatic small heterodimer partner induces dissociation of steatosis and inflammation in experimental nonalcoholic steatohepatitis[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(4): 994–1008. DOI: [10.1074/jbc.RA119.010233](https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010233).
 - 26 刘蓉. 白术内酯 I 调控肝星状细胞自噬及其对肝纤维化的作用机制研究 [D]. 成都: 成都医学院, 2023. DOI: [10.27843/d.cnki.gedyy.2023.000269](https://doi.org/10.27843/d.cnki.gedyy.2023.000269).
 - 27 Huang K, Du M, Tan X, et al. PARP1-mediated PPAR α poly (ADP-ribose)ylation suppresses fatty acid oxidation in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(5): 962–977. DOI: [10.1016/j.jhep.2016.11.020](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.020).
 - 28 Cheng X, Han ZX, Su ZJ, et al. Network pharmacology-based exploration on the intervention of Qinghao Biejia decoction on the inflammation-carcinoma transformation process of chronic liver disease via MAPK and PI3k/AKT pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 9202128. DOI: [10.1155/2022/9202128](https://doi.org/10.1155/2022/9202128).

收稿日期: 2024 年 04 月 08 日 修回日期: 2024 年 08 月 02 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳