

## 基于网络药理学对水蛭与熊胆联用与肝胆相关疾病作用关系的研究

高琛<sup>1</sup>, 郭雨师<sup>2,3</sup>, 郭馨怡<sup>1</sup>, 张灵芝<sup>1</sup>, 杨国华<sup>4</sup>, 杨玉升<sup>4</sup>, 马涛<sup>2\*</sup>, 孙华<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 消化健康全国重点实验室, 北京 100050; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 3. 包头市昆都仑区医院, 内蒙古 包头 014010; 4. 云南世纪华宝医药产业开发有限公司, 云南 楚雄 675000)

**摘要:** 为了探究水蛭与熊胆联合作用于肝胆疾病的可能作用和分子机制, 本研究首先利用网络药理学方法筛选水蛭和熊胆成分及其靶点和肝胆疾病的相关靶基因, 将筛选出的关键基因进行交互作用网络和GO、KEGG富集分析, 然后利用油酸钠诱导的HepG2细胞脂质沉积模型和DL-乙硫氨酸诱导的小鼠脂肪肝模型, 在体内外对水蛭熊胆单独处理及联合作用降低肝脂的活性进行评价, 并采用Western blot法检测网络药理学提示的关键通路相关蛋白的表达。网络药理学分析结果显示, 水蛭、熊胆有效成分与肝胆相关疾病有295个交集靶点, 涉及200多条信号通路, 其中包括与糖脂代谢密切相关的PI3K/Akt信号通路、磷脂酶D信号通路等。体外验证实验结果显示, 水蛭与熊胆单独及联合应用均可显著抑制油酸钠诱导的人肝细胞内脂质沉积, 能够降低细胞培养上清TG水平, 抑制肝细胞内脂质含量, Nile red染色共聚焦显微镜观察结果表明, 水蛭与熊胆联合应用降低肝细胞内脂质沉积的活性相对单独用药更佳。在体内小鼠脂肪肝模型中, 水蛭与熊胆联合应用能够更好地降低升高的脏器指数、血脂和肝脂水平, 降低血清肝损伤生物标志物含量。本实验所用动物及相关处置符合动物福利的要求, 实验开展前经过中国医学科学院药物研究所实验动物管理和使用委员会(IACUC)的审查批准。Western blot实验结果显示, 水蛭与熊胆联合应用能够显著上调p-PI3K、p-Akt蛋白的表达水平, 增加p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt比值, 与网络药理学预测结果一致。水蛭熊胆联合应用有治疗脂肪性肝病的良好潜能, 激活PI3K/Akt通路可能是其降低肝细胞脂质沉积的重要机制之一。

**关键词:** 水蛭; 熊胆; 网络药理学; 脂质沉积; HepG2细胞

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)01-0105-12

## Network pharmacology-based mechanism of combined leech and bear bile on hepatobiliary diseases

GAO Chen<sup>1</sup>, GUO Yu-shi<sup>2,3</sup>, GUO Xin-yi<sup>1</sup>, ZHANG Ling-zhi<sup>1</sup>, YANG Guo-hua<sup>4</sup>, YANG Yu-sheng<sup>4</sup>, MA Tao<sup>2\*</sup>, SUN Hua<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, National Key Laboratory of Digestive Health, Beijing 100050, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 3. Baotou Kundulun District Hospital, Baotou 014010, China; 4. Yunnan Century Huabao Pharmaceutical Industry Development Co., Ltd., Chuxiong 675000, China)

**Abstract:** In order to explore the possible role and molecular mechanism of the combined action of leech and bear bile in liver and gallbladder diseases, this study first used network pharmacology methods to screen the

收稿日期: 2024-07-14; 修回日期: 2024-11-05.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(协同创新重点实验室项目)(2023-I2M-2-009).

\*通讯作者 Tel: 86-10-53912129, E-mail: 201701033@bucm.edu.cn;

Tel: 86-10-50927122, E-mail: sunhua@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0662

components and targets of leech and bear bile, as well as the related target genes of liver and gallbladder diseases. The selected key genes were subjected to interaction network and GO/KEGG enrichment analysis. Then, using sodium oleate induced HepG2 cell lipid deposition model and *DL*-ethionine induced mouse fatty liver model, the activity of leech and bear bile alone and in combination in reducing liver fat was evaluated *in vitro* and *in vivo*, and the expression of key pathway related proteins suggested by network pharmacology was detected by Western blot. The results of network pharmacology analysis showed that the active ingredients of leech and bear bile have 295 intersecting targets with liver and gallbladder related diseases, involving more than 200 signaling pathways, including the PI3K/Akt signaling pathway and phospholipase D signaling pathway closely related to glucose and lipid metabolism. The results of *in vitro* validation experiments showed that both leech and bear bile, alone and in combination, can significantly inhibit the lipid deposition induced by sodium oleate in human liver cells, reduce the triacylglycerol level in cell culture supernatant, and inhibit the lipid content in liver cells. The observation results of Nile red staining confocal microscopy showed that the combination of leech and bear bile had better activity in reducing lipid deposition in liver cells compared to using them alone. In a mouse fatty liver model, the combination of leech and bear bile can better reduce elevated organ indices, blood lipids, and liver lipid levels, as well as lower the levels of serum liver injury biomarkers. The animals used in this experiment and related disposal meet the requirements of animal welfare. Before the experiment, it was reviewed and approved by IACUC, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. The Western blot experiment results showed that the combination of leech and bear bile can significantly upregulate the expression levels of p-PI3K and p-Akt proteins, and increase the p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt ratios, which is consistent with the predicted results of network pharmacology. The combination of leech and bear bile has great potential for treating fatty liver disease, and activating the PI3K/Akt pathway may be one of the important mechanisms for reducing lipid deposition in liver cells.

**Key words:** leech; bear bile; network pharmacology; lipid deposition; HepG2 cell

近年来,患有肝胆疾病的人数逐年升高。在过去的一年中,有200多万人因肝胆疾病死亡,占全球死亡人口的4%。其死亡主要归结于肝硬化和肝细胞癌的并发症,肝硬化的出现与病毒性肝炎、酒精和非酒精性脂肪性肝病等疾病息息相关<sup>[1]</sup>。同时,有超过2 000万人受到胆石症的影响<sup>[2]</sup>。肝脏是人体内负责分解、降解毒素的器官,能够合成激素和胆汁等,肝脏通过胆道系统与胆囊建立连接,胆囊主要负责胆汁的分泌、浓缩与储存。当人体摄入食物后,胆囊收缩将胆汁排入十二指肠,协助脂肪的消化与分解。中医讲,肝主疏泄,为将军之官<sup>[3]</sup>,如同将军,有勇有谋。肝与胆互为表里,胆附于肝。当肝脏出现炎症反应时,可蔓延至胆囊,引发胆囊炎。同时,胆囊炎也可逆行感染导致肝脏炎症;肝脏分泌胆汁成分异常可导致胆囊结石形成,较大的胆囊结石可阻塞胆管,影响胆汁排泄,进而损伤肝脏。肝胆疾病总是相依相伴。

水蛭是动物源中药的代表,能活血化瘀。最早见于《神农本草经》,1963年被列入《中华人民共和国药典》<sup>[4]</sup>。近年来,人们重新重视起对水蛭的应用,一些研究表明,水蛭能够发挥化瘀作用,促进血液循环<sup>[5]</sup>从而缓解疼痛并促进伤口愈合<sup>[6]</sup>,能够有效治疗膝关节关节炎<sup>[7]</sup>。同时,水蛭可通过代谢调节、保护足细胞、减轻炎症、抑制异常血管生成及抗肾纤维化发挥肾保

护作用,从而治疗糖尿病肾病<sup>[8]</sup>。Han等<sup>[9]</sup>发现水蛭素可以降低血糖水平和糖化血红蛋白。另外,也有少部分研究指出水蛭可降低高脂血症大鼠的总胆固醇(total cholesterol, TC)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C)水平<sup>[10]</sup>,发挥降血脂、降肝脂作用。熊胆是棕熊、黑熊的干燥胆汁,自古以来,熊胆一直是传统名贵中药,能够清热、明目、平肝<sup>[11]</sup>。现代医学认为,熊胆具有明显的降脂<sup>[12]</sup>、抗炎<sup>[13,14]</sup>、抗凋亡作用,其在治疗肝胆疾病、心血管疾病<sup>[15]</sup>甚至神经系统疾病<sup>[16]</sup>方面均取得一定进展。水蛭与熊胆联合用药的研究较少。Liu<sup>[17]</sup>发现水蛭熊胆散可通过抑制氧化应激和炎症反应对脑缺血再灌注的大鼠发挥脑保护作用。张雪等研究发现复方水蛭散对心绞痛<sup>[18]</sup>和高脂血症<sup>[19]</sup>有一定疗效。但这些研究均不深入,并且目前尚无水蛭与熊胆联合用药对于肝胆相关疾病的作用及机制研究。

本研究以水蛭和熊胆为研究对象,通过网络药理学并结合体内外实验探讨水蛭熊胆联合治疗肝胆相关疾病的可能性及初步机制,为水蛭与熊胆联用的进一步研发提供数据参考。

## 材料与方 法

水蛭与熊胆主要活性成分及靶点的预测与筛选 通过检索文献<sup>[20-26]</sup>,并运用HERB数据库(<http://herb.ac.cn/>)、

SymMap 数据库 (<http://www.symmap.org/>) 和 HIT 数据库 (<http://www.badd-cao.net:2345/>) 以 “shui zhi”、“xiong dan” 为检索词, 获取水蛭和熊胆潜在化学成分。并通过 Pub Chem 数据库获得水蛭和熊胆潜在成分的相关信息, 包括 PubChem ID、分子式、分子量、Canonical SMILES。利用 Swiss Target Prediction 平台对水蛭与熊胆成分进行作用靶点预测, 设定  $\text{probabilit} > 0$ , 整理去重。

**肝胆相关疾病靶点的收集** 以肝胆相关疾病为检索词<sup>[27]</sup>, 见表 1, 检索 GeneCards 疾病数据库中与肝胆相关疾病的潜在靶点, 将上述靶点整理并去重。

**Table 1** Hepatobiliary related diseases

Item	Name of disease
1	Abnormality of the liver
2	Acute liver failure
3	Chemical and drug induced liver injury
4	Cholestatic liver disease
5	Copper accumulation in liver
6	Cystic liver disease
7	Decreased carnitine level in liver
8	Decreased liver function
9	Decreased mitochondrial complex III activity in liver tissue
10	Depletion of mitochondrial DNA in liver
11	Fatal liver failure in infancy
12	Fatty liver
13	Non-alcoholic fatty liver disease
14	Inflammatory response in alcoholic liver disease
15	Ischemic injury of the liver
16	Liver abscess
17	Liver cirrhosis
18	Liver diseases
19	Liver failure
20	Liver fibrogenesis
21	Liver injury
22	Liver related disease
23	Abnormality of the gallbladder
24	Cystic fibrosis gallbladder
25	Gallbladder dysfunction
26	Chronic cholecystitis
27	Cholelithiasis
28	Cholestatic hepatitis

**水蛭与熊胆主要活性成分-靶点-肝胆疾病网络构建** 采用 Venny 平台, 筛选出水蛭、熊胆与肝胆疾病的共同靶点, 并将数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件得到“成分-靶点-疾病”网络图。

**构建蛋白相互作用网络** 为了探索水蛭、熊胆与肝胆疾病交集靶点间的联系, 将交集靶点上传到 STRING 数据库, 生物种类设定为 “Homo sapiens”, “highest confidence” 设为 0.9, 得到蛋白间相互作用关系并导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 通过 network analyzer 处理, 以 degree 值前 50 名的靶点构建 PPI 网络。

**GO 与 KEGG 富集分析** 将水蛭、熊胆与肝胆疾病的共同靶标输入 Metascape 数据库, 将物种设置为

“H. sapiens”,  $P$  value cutoff 为 0.01, 进行 GO 及 KEGG 富集分析。分别探究水蛭与熊胆联合作用于肝胆疾病的生物学过程与生物学通路, 并借助微生信平台进行可视化处理。

**药品与试剂** 水蛭冻干粉、熊胆粉均由云南世纪华宝医药产业开发有限公司提供; MTT 购自 BioFroxx 公司; 胰蛋白酶-EDTA 消化液、DMEM 高糖培养基、PBS 磷酸盐缓冲液、油红 O 均购自北京索莱宝生物科技有限公司; Nile red 染料、ECL 化学发光超敏显色试剂盒均购自翌圣生物科技股份有限公司; 油酸购自 Sigma 公司; DMSO 购自 Amresco 公司; 新生牛血清购自浙江天杭生物公司; 异丙醇购自北京化工厂; 甘油三酯 (triacylglycerol, TG) 测试盒购自南京建成生物工程研究所; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 测试盒购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; DL-乙硫氨酸、非诺贝特均购自北京百灵威科技有限公司; 多聚甲醛购自国药集团化学试剂有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (phospho-phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K) 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 磷酸化蛋白激酶 B (phospho-protein kinase B, p-Akt)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体购自 Cell Signaling Technology 有限公司。

**细胞培养和处理** HepG2 细胞为本实验室传代保存。准备含 10% 灭活新生牛血清、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素和  $100 \text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素的 DMEM 高糖培养基, 并将培养环境的温度严格控制在  $37^\circ\text{C}$ , 同时保持 5% 二氧化碳浓度。取对数生长期的细胞进行实验。

**油酸钠诱导 HepG2 细胞脂质沉积模型的建立** 在 96 孔板中以每毫升  $8\times 10^4$  个接种 HepG2 细胞, 24 h 后加入含有不同浓度梯度的油酸钠 (sodium oleate, OL) ( $90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 培养液, 每个组别设 3 个以上平行孔。作用细胞 24 h 后, 每孔加入 MTT, 4 h 后加入 DMSO, 于酶标仪 570 nm 处测定吸光度 ( $A$ ) 值。计算细胞存活率。

操作步骤同“油酸钠诱导 HepG2 细胞脂质沉积模型的建立”, 油酸钠作用细胞 24 h 后每孔加入 PBS 清洗 3 次。加入 4% 多聚甲醛固定细胞 40 min。PBS 清洗 3 次。加入油红 O 染料, 避光染色 1 h。PBS 清洗 3 次。加入  $50 \mu\text{L}$  异丙醇, 震荡 5 min, 于酶标仪 532 nm 处测定  $A$  值。

**药物肝细胞毒性分析** 采用MTT法检测水蛭与熊胆的细胞毒性。操作步骤同“油酸钠诱导HepG2细胞脂质沉积模型的建立”。水蛭冻干粉、熊胆粉均采用蒸馏水配置, 0.22  $\mu\text{m}$  PTFE膜过滤除菌。设置不同待测药物组, 水蛭实验组 (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、熊胆实验组 (0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 及水蛭熊胆联合实验组 (水蛭浓度为0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 熊胆浓度为0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 同时设溶剂对照组, 每个组别设3个以上平行孔。测定A值, 计算细胞存活率。

**药物作用后肝细胞脂质沉积检测** 操作步骤同“油酸钠诱导HepG2细胞脂质沉积模型的建立”, 设置不同组别, 包括溶剂对照组、油酸钠组 (OL, 140  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、非诺贝特阳性药物对照组 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、水蛭实验组 (SZ, 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、熊胆实验组 (XD, 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 及水蛭熊胆联合实验组 (SZ+XD, 水蛭浓度为0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 熊胆浓度为0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 作用细胞24 h, 4%多聚甲醛固定后, 油红O染色, 于酶标仪532 nm处测定A值。

**TG含量检测** 在6孔板中以每毫升 $1.2\times 10^5$ 个接种HepG2细胞, 每孔2 mL。培养24 h后, 分为溶剂对照组、油酸钠140  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、非诺贝特10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、水蛭0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、熊胆0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和水蛭0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 联合熊胆0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组, 各组加入相应药物及油酸钠, 溶剂对照组加入等体积的DMSO, 继续作用细胞24 h, 收取细胞培养液。根据试剂盒说明书, 用酶标仪在特定波长下测定TG含量。

**共聚焦显微镜脂滴观察** 重复“药物作用后肝细胞脂质沉积检测”操作, 药物作用细胞24 h, 用PBS清洗后, 加入4%多聚甲醛固定20 min, PBS清洗, 加入Nile red工作液 (0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。染色8 min后, 加入透化液 (1:1 000稀释) 作用10 min, 然后加入DAPI (1:500稀释) 染色5 min, 弃去DAPI染液, PBS清洗, 激光共聚焦细胞成像系统TCS SP8X观察并拍照。

**Western blot法检测相关蛋白表达** 设置溶剂对照组、油酸钠组 (140  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 及水蛭熊胆联合实验组 (水蛭浓度为0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 熊胆浓度为0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。PBS润洗细胞2次, 用细胞刷刮下细胞收集于1.5 mL EP管中, 加入RIPA裂解缓冲液, 振荡裂解, 设置离心机条件为4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min。吸取上清液至1.5 mL EP管。加入上样缓冲液煮沸变性。使用10%分离胶凝胶电泳分离上述蛋白样本。恒定电流330 mA转膜90 min, 5%脱脂奶粉封闭条带2 h, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜, 室温孵育二抗2 h。化学发光系统显影条带, 通过GelPro32进行灰度值分析。

**实验动物及饲养条件** 无特定病原体级 (SPF) 雄性ICR小鼠 (18~22 g), 由北京华阜康生物科技股份

有限公司提供, 动物许可证号: SCKX (京) 2024-0003。动物饲养于中国医学科学院药物研究所GLP动物实验中心。室温22~24  $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度40%~60%。最小换气次数为每小时20次, 间隔12 h开灯光照。动物饲养于聚丙烯小鼠群养笼中, 每笼4~5只。所有动物均由培训合格的人员进行饲养管理, 整个饲养过程中保持动物饮食和活动自由。本实验所用动物及相关处置符合动物福利的要求, 实验开展前经过中国医学科学院药物研究所实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 的审查批准。

**动物分组及给药** ICR小鼠适应性喂养后, 随机分为6组, 每组10只, 分别为空白对照组、DL-乙硫氨酸模型组 (300  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、非诺贝特阳性药组 (30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、水蛭组 (60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、熊胆组 (200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 及水蛭熊胆联合组 (60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  + 200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。DL-乙硫氨酸采用2% Tween 80水溶液配置成混悬液; 非诺贝特采用0.5% CMC-Na配置成混悬液; 其余药物均溶于蒸馏水。除空白对照组和DL-乙硫氨酸模型组外, 各给药组于第1日上午口服相应药物, 每日1次, 连续5次。从第3天开始, 除空白对照组外, 给予药物1 h前, DL-乙硫氨酸模型组及受试药物组口服DL-乙硫氨酸300  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 每日1次, 连续3次。空白对照组口服同体积水。给药灌胃体积均为10  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。末次给药后, 取材前6 h禁食不禁水, 将小鼠摘眼球取血, 随即处死, 取肝脏、脾脏称重, 肝脏放入-80  $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

**肝脏、脾脏系数计算** 按照下列公式计算肝脏、脾脏系数。肝脏/脾脏系数 (%) = 脏器湿重/小鼠体质量 $\times$ 100%。

**血清ALT、AST、TG指标的检测** 取血, 室温放置2 h, 3 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min, 分离得到小鼠血清, 应用全自动生化仪 (mindray BS-200) 测定各组小鼠血清中ALT、AST水平, 采用商品化试剂盒检测TG含量。

**肝脏TG指标检测** 用电子天平称取肝组织, 按1:9比例加入0.9%生理盐水, 组织研磨仪匀浆, 4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min, 收集上清于1.5 mL离心管中。取10%肝组织匀浆, 根据试剂盒说明书检测肝组织匀浆TG含量。应用BCA蛋白定量试剂盒测定各样品蛋白含量对结果进行校正。

**统计学分析** 用GraphPad Prism 8进行单因素方差分析以确定组间差异显著性。数据以平均值 $\pm$ 标准误差展示, 当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

## 结果

### 1 水蛭、熊胆成分与靶点筛选

分别从文献检索、HERB数据库、SymMap数据库

和 HIT 数据库检索获得水蛭和熊胆的主要成分, 整合并去重后通过 Swiss Target Prediction 预测上述成分靶标, 保留有相应靶标的成分, 获取水蛭的 43 种有效成分 (表 2) 及靶标 1 505 个, 熊胆的 23 种有效成分 (表 3) 及靶标 936 个, 去重后, 水蛭的有效靶标为 600 个, 熊胆的有效靶标为 440 个。

**Table 2** The active ingredients of leech (SZ)

Item	Component name	PubChem ID	Mol. wt.
SZ1	Putrescine	1045	88.15
SZ2	Glycerol	753	92.09
SZ3	2-Piperidone	12665	99.13
SZ4	Hexanal	6184	100.16
SZ5	Histamine	774	111.15
SZ6	Uracil	1174	112.09
SZ7	Proline	145742	115.13
SZ8	Valine	6287	117.15
SZ9	Succinic acid	1110	118.09
SZ10	Nicotinic acid	938	123.11
SZ11	L-Isoleucine	6306	131.17
SZ12	Adenine	190	135.13
SZ13	Hypoxanthine	135398638	136.11
SZ14	Spermidine	1102	145.25
SZ15	Acetylcholine	187	146.21
SZ16	Glutamic acid	33032	147.13
SZ17	Xanthine	1188	152.11
SZ18	Camphor	2537	152.23
SZ19	Dopamine	681	153.18
SZ20	Menthol	1254	156.26
SZ21	Tryptamine	1150	160.22
SZ22	Phenylalanine	6140	165.19
SZ23	Methyl(2E,8Z-decadien-4,6-diynoate	6443002	174.2
SZ24	Citrulline	9750	175.19
SZ25	Serotonin	5202	176.21
SZ26	Tyrosine	6057	181.19
SZ27	Spermine	1103	202.34
SZ28	Genipinic acid	12310086	242.22
SZ29	Lipase	1369	299.3
SZ30	Capsaicin	1548943	305.4
SZ31	Hirudinoidine A	101844805	310.4
SZ32	Crocetin	5281232	328.4
SZ33	Ecdysone	19212	464.6
SZ34	Leucine	6106	131.17
SZ35	Indole-3-carboxaldehyde	10256	145.16
SZ36	Lysine	5962	146.19
SZ37	Methionine	6137	149.21
SZ38	Histidine	6274	155.15
SZ39	Tryptophan	6305	204.22
SZ40	Diacetazotol	6751	309.4
SZ41	1,3-Dimethyl-6-methylsulfinyl-thieno[3,2-g]pteridine-2,4-dione	101844805	310.4
SZ42	CPA inhibitor	44374998	313.3
SZ43	ELI	9549220	320.4

## 2 肝胆相关疾病靶点筛选

检索 GeneCards 疾病数据库, 获得肝胆疾病相关靶点为 177 162 个。合并去重后获得 22 622 个肝胆相关疾病靶点。

**Table 3** The active ingredients of bear bile (XD)

Item	Component name	PubChem ID	Mol. wt.
XD1	Acetylcholine	187	146.21
XD2	Chenodeoxycholic acid	10133	392.6
XD3	Cherianoine	5315819	235.24
XD4	Cholic acid	221493	408.6
XD5	Choline	305	104.17
XD6	Deoxycholic acid	222528	392.6
XD7	Deoxycorticosterone	6166	330.5
XD8	Taurochenodeoxycholic acid	387316	499.7
XD9	Taurocholic acid	6675	515.7
XD10	Taurodeoxycholic acid	2733768	499.7
XD11	Tauroursodeoxycholic acid	9848818	499.7
XD12	Taxachitriene A	124511123	636.7
XD13	Ursodeoxycholic acid	31401	392.6
XD14	Ursolic acid	64945	456.7
XD15	Quercetin	5280343	302.23
XD16	Succinic acid	1110	118.09
XD17	Caffeic acid	689043	180.16
XD18	Aspartic acid	5960	133.1
XD19	Threonine	6288	119.12
XD20	Glutamic acid	33032	147.13
XD21	Taurolithocholic acid	439763	483.7
XD22	Bilirubin	5280352	584.7
XD23	Biliverdin	5280353	582.6

## 3 成分-靶点-疾病网络构建

将水蛭、熊胆与肝胆疾病靶点输入 Venny 2.1.0 平台, 三者取得 295 个共同靶点, 即为水蛭、熊胆联合治疗肝胆相关疾病的潜在靶点。将上述潜在靶点汇总, 输入 Cytoscape 建立“成分-靶点-疾病网络”(图 1A)。

## 4 构建交集靶点蛋白相互作用网络

将水蛭、熊胆与肝胆相关疾病的 295 个交集靶点输入 STRING 平台, 将数据导入 Cytoscape 3.9.1 得到 PPI 网络 (图 1B)。图中共有 50 个节点, 931 条边, 其中在 PPI 网络中发挥作用较大的靶点有丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (Akt serine/threonine kinase 1, Akt1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL6)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3, CASP3)、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基  $\alpha$  亚型 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform, PIK3CA) 等。

## 5 GO 与 KEGG 分析

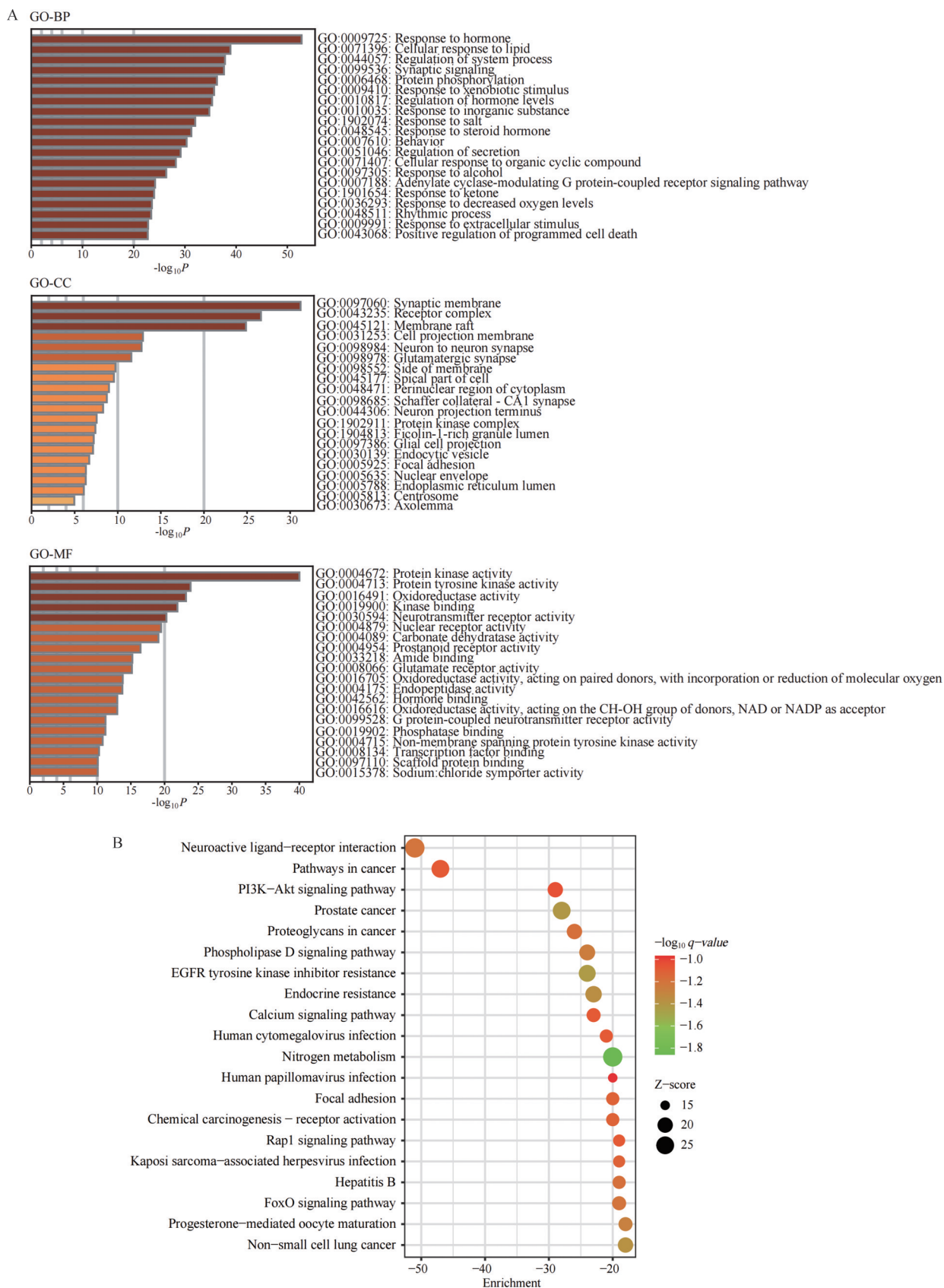
采用 Metascape 数据库对水蛭、熊胆与肝胆相关疾病交集的 295 个靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析。生物过程 (GO-BP) 得到 2 118 条条目, 主要为对激素的反应、细胞对脂质的反应、蛋白磷酸化等; 细胞成分 (GO-CC) 得到 149 条条目, 主要为突触膜、受体复合物、膜筏等; 分子功能 (GO-MF) 得到 313 条条目, 主要



为蛋白激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、氧化还原酶活性等。Metascope 数据库分析后列举出具有代表性的

丰富术语的靠前集群<sup>[28]</sup> (图 2A)。

KEGG 分析获得 200 条信号通路, 主要为神经活



**Figure 2** Enrichment analysis of GO and KEGG. A: GO enrichment analysis; B: Visualization of path enrichment results (TOP20)

性配体-受体相互作用、PI3K/Akt 信号通路、磷脂酶 D 信号通路和 FoxO 信号通路等。按  $-\log_{10}P$  进行排序, 选取前 20 名进行可视化处理 (图 2B)。

## 6 肝细胞脂质沉积模型的构建

**6.1 不同浓度油酸钠对人肝细胞存活率的影响** 用含有不同梯度浓度油酸钠的培养基作用 HepG2 细胞 24 h, 用 MTT 法检测细胞存活率, 结果如图 3A 所示。与空白对照组相比, 油酸钠浓度为 300 和 480  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 细胞活性显著下降 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 提示 300 和 480  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  油酸钠能显著抑制肝细胞增殖, 对 HepG2 细胞具有毒性。选择无毒性油酸钠浓度用于肝细胞脂质沉积诱导实验。

**6.2 油酸钠最佳诱导浓度的确定** 不同浓度的油酸钠对 HepG2 细胞脂质沉积水平的影响, 结果如图 3B 所示。与空白对照组相比, 当油酸钠浓度为 90、120、150、180、210  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, HepG2 细胞中脂质含量显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。综合分析细胞的状态、毒性及脂质沉积情况, 选择油酸钠 140  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  用于后续受试物活性评价研究。

## 7 水蛭、熊胆单独及联合应用对人肝细胞脂质沉积的影响

将含有水蛭 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、熊胆 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和水蛭 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  联合熊胆 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的培养基作用 HepG2 细胞 24 h, 用 MTT 法检测细胞存活率, 结果如图 3C 所示。与空白对照组相比, 各给药组细胞活性均无明显变化, 说明水蛭 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、熊胆 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和水蛭 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  联合熊胆 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  对肝细胞无明显毒性。

通过油红 O 染色再进行酶标仪分析的方法考察肝细胞内脂质沉积情况, 吸光度值代表脂质含量。如图 3E 所示, 与空白对照组相比, 油酸钠模型组的吸光度值显著上升 ( $P < 0.001$ ), 提示油酸钠引起了明显的肝细胞脂质沉积现象。与油酸钠模型组相比, 水蛭 (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 与熊胆 (0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 单独及联合处理组 (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 均能显著降低油酸钠引起的肝细胞内脂质含量 ( $P < 0.001$ ), 水蛭与熊胆联合处理 (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 效果优于水蛭 (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 与熊胆 (0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 单独处理组, 但组间比较无统计学差异。检测细胞培养上清中 TG 水平, 如图 3D 所示, 油酸钠亦导致细胞培养上清 TG 含量显著升高 ( $P < 0.001$ ), 水蛭与熊胆联合处理 (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 能显著降低细胞培养上清 TG 含量 ( $P < 0.001$ )。

通过 Nile red 染色直接观察肝细胞内脂滴含量, 用红色脂滴的荧光强度、大小和数量来评价, 如图 3F 所示。与空白对照组相比, 油酸钠模型组肝细胞出现荧

光强度增强和脂质堆积, 其余药物处理组细胞内荧光强度减弱、沉积脂滴变小、数量减少, 与上述结果一致。进一步表明水蛭、熊胆及水蛭熊胆联用均能够抑制人肝细胞脂质沉积, 水蛭和熊胆联用效果更佳。

## 8 水蛭、熊胆单独及联合应用对 DL-乙硫氨酸诱导小鼠脂肪肝的影响

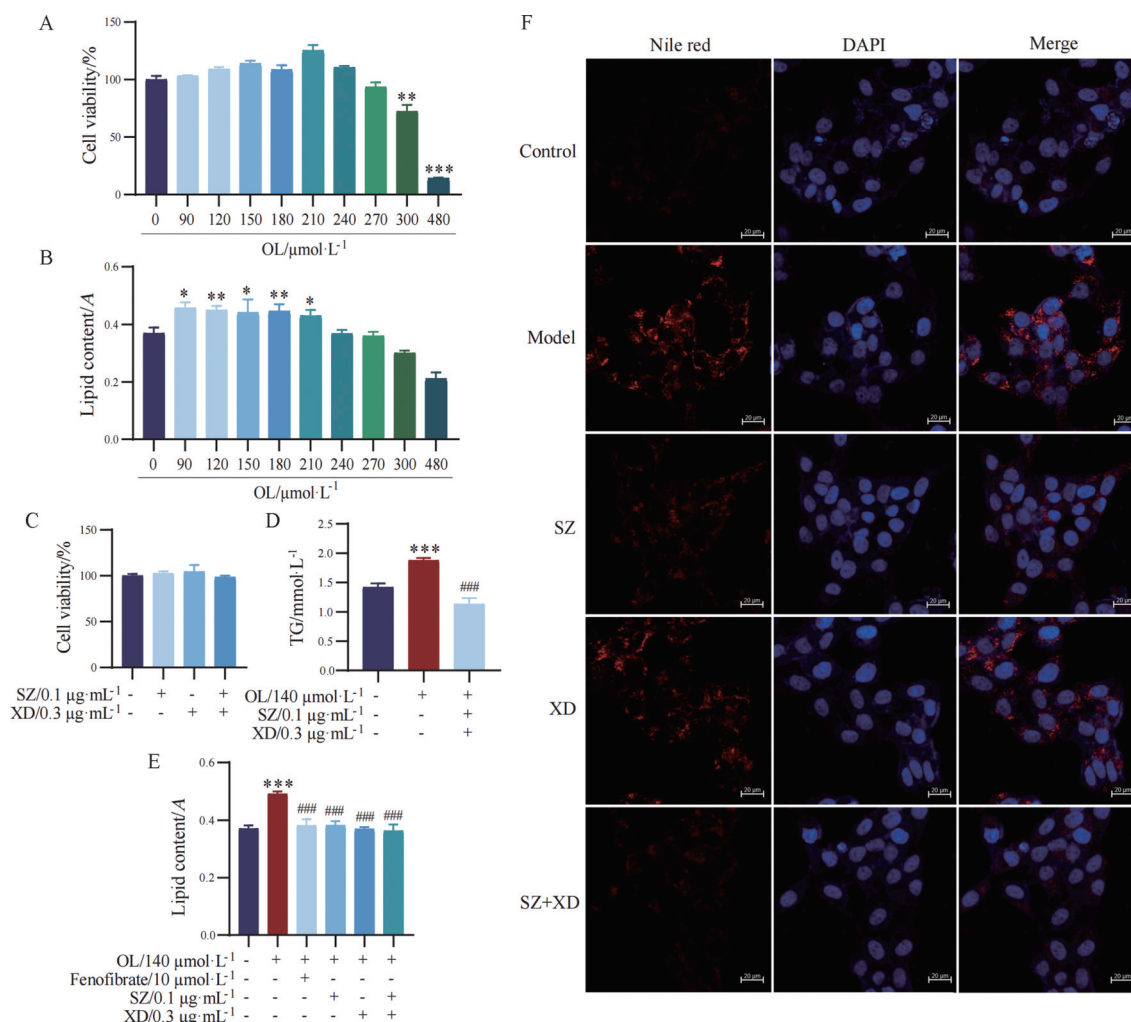
通过给予小鼠 DL-乙硫氨酸建立脂肪肝模型。检测小鼠血清及肝组织相关指标, 结果如图 4 所示。与空白对照组相比, DL-乙硫氨酸模型组的肝脏指数显著升高 ( $P < 0.01$ ), 同时肝脏肉眼可见体积增大, 颜色偏黄, 且血清 ALT ( $P < 0.01$ )、AST ( $P < 0.05$ )、TG ( $P < 0.001$ ) 及肝组织 TG ( $P < 0.01$ ) 水平均显著上升, 提示 DL-乙硫氨酸引起了小鼠肝脏明显的脂质沉积, 表明脂肪肝模型建立成功。与 DL-乙硫氨酸模型组相比, 水蛭 (60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 与熊胆 (200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 单独及联合处理组 (60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ +200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 均能显著降低肝脏指数 ( $P < 0.05$ ) 和脾脏指数 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ), 肝脏形状表现肉眼可见的好转。同时, 水蛭 (60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 与熊胆 (200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 单独及联合处理组 (60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ +200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 均能显著降低血清 ALT、AST、TG 及肝组织 TG 水平 ( $P < 0.05$ )。其中, 相较于水蛭熊胆单独处理组, 水蛭熊胆联合处理组可进一步降低脾脏指数、血清 ALT、AST 和肝组织 TG 水平。表明水蛭、熊胆及水蛭熊胆联用均能够抑制小鼠肝脏脂质沉积, 水蛭和熊胆联用效果更佳, 但组间比较无统计学差异。阳性对照药非诺贝特组 (30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 亦显著降低小鼠血清 TG 水平 ( $P < 0.01$ ), 对肝组织 TG 水平有降低趋势。

## 9 水蛭熊胆联合应用对 PI3K/Akt 信号通路的影响

应用 Western blot 方法对 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达量进行检测, 结果如图 5 所示。与空白对照组相比, 油酸钠组的 p-PI3K 与 p-Akt 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 水蛭熊胆联合处理后 p-PI3K ( $P < 0.05$ ) 与 p-Akt 蛋白表达水平明显上升。提示水蛭熊胆联用可通过调节 PI3K/Akt 通路从而在油酸钠诱导的 HepG2 细胞脂质沉积模型中促进脂质代谢, 该结果与网络药理学预测结果一致。

## 讨论

熊胆和水蛭均为传统中药材, 具有一定的药理作用。熊胆具有清热解毒、清肝明目等功效, 水蛭具有活血化瘀、通络止痛等作用。然而, 关于熊胆水蛭联用的具体背景和相关研究较少。在一些中药配方中, 有将熊胆和水蛭配伍使用, 以期发挥它们的协同作用, 如复方水蛭散中水蛭与熊胆以 4:1 的比例配伍使用, 可显

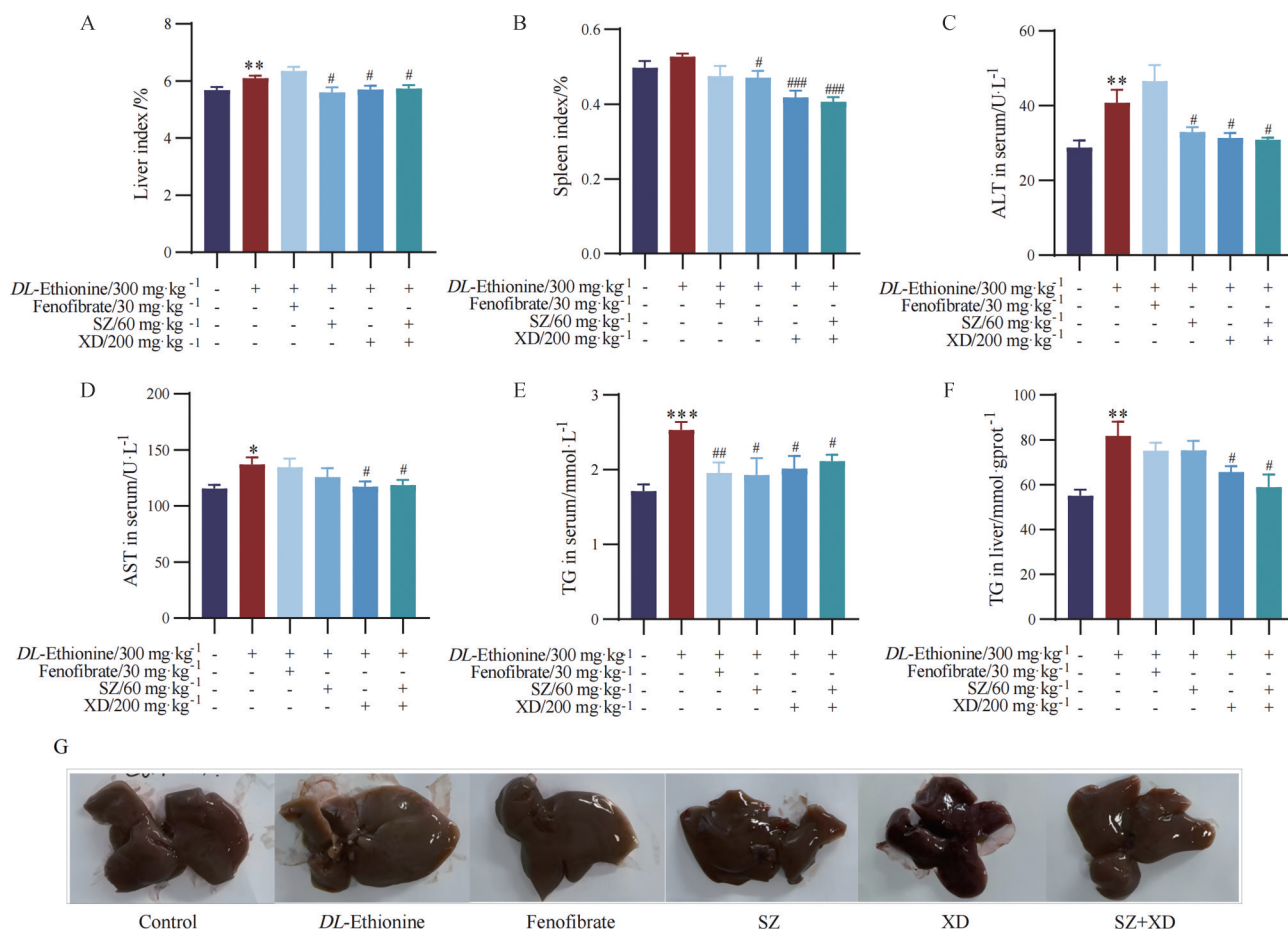


**Figure 3** The effects of XD, SZ, and their combination on lipid deposition in human hepatocytes. A, B: The effect of different concentrations of sodium oleate (OL) on the viability (A) and lipid deposition (B) HepG2 cells; C: The effects of XD, SZ, and their combination on the viability of HepG2 cells; D: The effect of XD combined with SZ on the triacylglycerol (TG) content of HepG2 cells induced by sodium oleate; E: The effect of XD, SZ, and their combination on OL induced lipid deposition in HepG2 cells; F: Confocal microscopy images of lipids in HepG2 cells from different groups. Using Nile red dye to stain lipids in cells, lipids exhibit red fluorescence; staining the nucleus with DAPI dye resulted in blue fluorescence. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . Images were presented at a 50 $\times$  higher magnification.  $n = 3$ , mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs normal control group; ### $P < 0.001$  vs model group

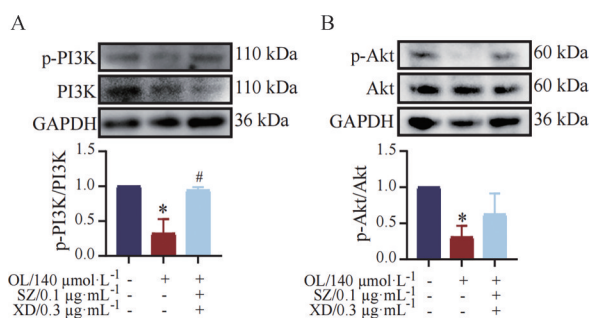
著降低高脂血症小鼠血清TG、TC、LDL-C含量和升高血清高密度脂蛋白含量<sup>[19]</sup>; 同时在脑缺血再灌注大鼠模型中, 水蛭与熊胆配伍使用可显著升高血清超氧化物歧化酶活性、降低丙二醛含量, 抑制氧化应激, 并发挥抗炎活性<sup>[17]</sup>。但这些联用的药效与机制尚需要进一步的研究与验证。

本文通过网络药理学工具得出水蛭熊胆联用有治疗肝胆相关疾病的可能, 富集分析显示相关的作用通路主要包括PI3K/Akt信号通路、神经活性配体-受体相互作用、磷脂酶D信号通路、氮代谢、阿尔茨海默病、脂质与动脉粥样硬化通路等, 其中PI3K/Akt信号通路的 $P$ 值相对更为显著(图2B), 且预测的关键靶点

PIK3CA、Akt1、EGFR等均富集于该通路。已有大量研究表明, PI3K/Akt信号通路在机体代谢方面具有关键作用。PI3K调节亚基内的SH2结构域与磷酸酪氨酸结合并被激活, 这引起PI3K催化亚基的募集和活化, 之后在质膜上PI3K将磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸转化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸<sup>[29]</sup>, PI3K磷酸化并进一步激活下游的Akt。Akt是PI3K的核心介质<sup>[30]</sup>, 参与多种细胞过程, 包括脂质代谢、葡萄糖代谢及细胞迁移等。Akt有3种亚型: PKB $\alpha$ 、PKB $\beta$ 和PKB $\gamma$ 。PKB $\alpha$ 也称为Akt1, 其在多种组织中表达; PKB $\beta$ 大多在胰岛素敏感组织中表达, 较少在其他组织表达; PKB $\gamma$ 对大脑、肺、肾脏、心脏和骨骼肌具有特异性。活化的Akt能发



**Figure 4** Effect of SZ, XD and their combination on organ index, serum liver injury markers, serum lipid and liver lipid levels in DL-ethionine induced fatty liver mice. A: Liver index; B: Spleen index; C: Alanine aminotransferase (ALT) level in serum; D: Aspartate aminotransferase (AST) level in serum; E: TG content in serum; F: TG content in liver; G: Representative picture of the liver. *n* = 10, mean ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs normal control group; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs model group



**Figure 5** Effect of SZ combined with XD on protein expression in HepG2 cells. A: Representative Western blot brands and density analysis of p-PI3K and PI3K; B: Representative Western blot brands and density analysis of p-Akt and Akt. *n* = 3, mean ± SEM. \**P* < 0.05 vs normal control group; #*P* < 0.05 vs model group

挥多种生物学功能, 包括抑制 p27、将 FOXO 定位在细胞质中, 激活 cAMP 反应元件结合蛋白和激活 mTOR 等<sup>[31]</sup>。已有大量研究表明, PI3K/Akt 通路能够作用于肝胆系统和机体大多数组织器官, 参与降脂、改善糖代

谢、调控脂代谢等过程。有研究显示, 增加 HepG2/IRM 细胞内 IR、IRS1、PI3K、Akt、GSK3 和 FoxO1 蛋白的表达可调控葡萄糖代谢<sup>[32]</sup>; 促进 PAQR3 泛素化降解激活 PI3K/Akt 轴, 能够恢复胰岛素信号通路, 从而降低脂质合成并增加葡萄糖利用<sup>[33]</sup>; 上调 GLUT4、PI3K 和 Akt 的水平可改善胰岛素抵抗, 降低血清 TG、TC 和 LDL-C 水平, 降低血糖, 从而发挥抗肥胖和降脂作用<sup>[34]</sup>。

已有研究分别提示了水蛭、熊胆中的部分成分发挥药效活性与 PI3K/Akt 通路有关。水蛭素和色氨酸是水蛭中重要活性成分, 研究显示, 水蛭素可通过激活 WNT/PI3K/Akt 通路调控 HRPE 细胞分化<sup>[35]</sup>, 也可作用于 PI3K/Akt 通路治疗心肌肥厚<sup>[36]</sup>。Xiao 等<sup>[37]</sup>发现在高碳水化合物饮食中添加色氨酸可激活 PI3K/Akt/GLUT2 通路从而增加胰岛素敏感性和调节葡萄糖转运。熊去氧胆酸、牛磺脱氧胆酸是熊胆中的活性成分之一。研究显示, 熊去氧胆酸通过 PI3K/Akt 信号通路

介导谷胱甘肽的产生而发挥抗氧化活性<sup>[38]</sup>; 牛磺脱氧胆酸能够激活致死毒素抑制的 Ras 信号下游 PI3K/Akt 信号通路, 从而减少细胞凋亡<sup>[39]</sup>。结合文献报道及本研究网络药理学分析结果, 提示水蛭与熊胆联用可能通过共同调控 PI3K/Akt 信号通路从而调节细胞糖脂代谢, 发挥肝胆相关疾病的治疗作用。基于此, 本研究进一步建立油酸钠诱导的 HepG2 细胞脂质沉积模型, 通过吸光度值、TG 检测、细胞内脂质可视化及 Western blot 方法等, 同时, 建立 DL-乙硫氨酸诱导的小鼠脂肪肝模型, 通过脏器指数、血清肝损伤标志物、血脂和肝脂水平等, 对水蛭熊胆单独处理以及联合应用的作用、初步作用机制及联合应用的活性优势进行分析和研究。

研究结果显示, 水蛭、熊胆单独作用及联合使用, 均表现出显著的降肝脂活性, 在 Nile red 荧光染色观察中, 水蛭熊胆联合使用效果优于单独作用组。在脂肪肝动物模型中, 水蛭、熊胆单独作用及联合使用均显著降低血脂和肝脂水平, 减少肝损伤标志物, 且水蛭熊胆联合使用效果优于单独作用组。分子生物学研究也验证了水蛭熊胆联合应用能够显著激活油酸钠引起的 PI3K/Akt 通路抑制, PI3K/Akt 通路激活可能是水蛭熊胆联用治疗肝胆疾病, 特别是脂质沉积相关的脂肪性肝病的关键机制之一。

本文基于网络药理学预测和体内外实验及分子生物学实验验证, 考察水蛭熊胆联用治疗肝胆疾病的可能性和可能作用机制, 对水蛭熊胆联合应用治疗疾病具有一定的借鉴价值。深入的药理学和机制研究尚待开展。

**作者贡献:** 高琛负责实验操作、数据处理及文章撰写; 张灵芝负责细胞毒性实验; 郭馨怡负责实验操作指导; 郭雨师、杨国华和杨玉升提供受试物; 马涛和孙华负责文章统筹及修订。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, et al. Global burden of liver disease: 2023 update [J]. *J Hepatol*, 2023, 79: 516-537.
- [2] Lam R, Zakko A, Petrov JC, et al. Gallbladder disorders: a comprehensive review [J]. *Dis Mon*, 2021, 67: 101130.
- [3] Wang YL, Miao HW, Yan X, et al. Treating coronary heart disease in postmenopausal women from the perspective of liver therapy [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med (天津中医药大学学报)*, 2023, 42: 697-700.
- [4] Dong H, Ren JX, Wang JJ, et al. Chinese medicinal leech: ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 7895935.
- [5] Koeppen D, Aurich M, Rampp T. Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review [J]. *Wien Med Wochenschr*, 2014, 164: 95-102.
- [6] Nair H, Ahmad NW, Lee HL, et al. Hirudotherapy in wound healing [J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2022, 21: 425-431.
- [7] Wang H, Zhang J, Chen L. The efficacy and safety of medical leech therapy for osteoarthritis of the knee: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Int J Surg*, 2018, 54: 53-61.
- [8] Tian F, Yi X, Yang F, et al. Research progress on the treatment of diabetic nephropathy with leech and its active ingredients [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15: 1296843.
- [9] Han J, Pang X, Zhang Y, et al. Hirudin protects against kidney damage in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats by inhibiting inflammation via P38 MAPK/NF-kappaB pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3223-3234.
- [10] Wu J K, Yang Q. The effect of traditional Chinese medicine leech on lipid metabolism and liver in hyperlipidemic rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med (中医药杂志)*, 2018, 43: 794-799.
- [11] Cui N, Zhang W, Su F, et al. Metabolomics and lipidomics study unveils the impact of tauroursodeoxycholic acid on hyperlipidemic mice [J]. *Molecules*, 2023, 28: 6352.
- [12] Chen DX, Chu JF, Lin S, et al. Therapeutic effects of different animal bile powders on lipid metabolism disorders and their composition analysis [J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28: 918-923.
- [13] Zhu H, Wang G, Bai Y, et al. Natural bear bile powder suppresses neuroinflammation in lipopolysaccharide-treated mice via regulating TGR5/Akt/NF-kappaB signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 115063.
- [14] Keely SJ, Steer CJ, Lajczak-McGinley NK. Ursodeoxycholic acid: a promising therapeutic target for inflammatory bowel diseases? [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 317: G872-G881.
- [15] Huang F, Mariani N, Pariante CM, et al. From dried bear bile to molecular investigation of differential effects of bile acids in *ex vivo* and *in vitro* models of myocardial dysfunction: relevance for neuroinflammation [J]. *Brain Behav Immun Health*, 2023, 32: 100674.
- [16] Wang L, Bai Y, Tao Y, et al. Bear bile powder alleviates Parkinson's disease-like behavior in mice by inhibiting astrocyte-mediated neuroinflammation [J]. *Chin J Nat Med*, 2023, 21: 710-720.
- [17] Liu JW. Experimental Study on The Neuroprotective Effect of Chaoyi Shuizhi Xiongdan San on Cerebral Ischemia-reperfusion Rats (朝医水蛭熊胆散对脑缺血再灌注大鼠脑保护作用的研究) [D]. Yanji: Yanbian University, 2019.
- [18] Zhang X. Experimental and Clinical Study on the Treatment of Coronary Heart Disease and Angina Pectoris with Compound Leech Powder (复方水蛭散治疗冠心病心绞痛的实验与临床研究) [D]. Yanji: Yanbian University, 2018.

- [19] Zhang T, Li GP. The effect of compound leech powder on blood lipid levels in hyperlipidemia model mice [J]. J Med Yanbian Univ (延边大学医学学报), 2016, 39: 100-102.
- [20] Tong L, Dai SX, Kong DJ, et al. The genome of medicinal leech (*Whitmania pigra*) and comparative genomic study for exploration of bioactive ingredients [J]. BMC Genomics, 2022, 23: 76.
- [21] Jing WG, Fu J, Liu YM, et al. The chemical composition of leeches [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 120-123.
- [22] Li GQ, Li YY, Li T, et al. A study on the chemical composition of leeches [J]. Tianjin Tradit Chin Med (天津中医药), 2018, 35: 703-705.
- [23] Liu XF, Yang YJ, Wu LJ, et al. Research progress and prospects on the pharmacognosy and chemical components of traditional Chinese medicine leeches [J]. Global Tradit Chin Med (环球中医药), 2012, 5: 637-640.
- [24] He WW, An Y, Zhang GM. Prediction of effective ingredients and mechanisms of action of leeches in the treatment of cerebral hemorrhage based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志), 2023, 32: 286-292.
- [25] Wu KL, Wu XH, Dong TW, et al. Research progress on non bile acid components of bear bile (powder) [J]. J Tradit Chin Med (中医药学报), 2011, 39: 90-92.
- [26] Zhong LJ, Yang JL, He YZ, et al. Research progress on the composition, identification, and application of bear bile powder [J]. J Chengdu Univ (成都大学学报), 2021, 40: 335-339.
- [27] Yang JZM, Re ZCD, Li MCW. Network pharmacology analysis of flower anchor therapy for liver and gallbladder related diseases [J]. Asia Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2023, 19: 149-158.
- [28] Jiao WC, Luo H, Tang JY, et al. A study on the mechanism of Shenling Baizhu Powder in treating ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness accumulation syndrome based on characteriomics [J]. World Tradit Chin Med (世界中医药), 2020. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.R.20201026.1607.016.html>.
- [29] Saltiel AR. Insulin signaling in health and disease [J]. J Clin Invest, 2021, 131: e142241.
- [30] Goldbraikh D, Neufeld D, Eid-Mutlak Y, et al. USP1 deubiquitinates Akt to inhibit PI3K-Akt-FoxO signaling in muscle during prolonged starvation [J]. EMBO Rep, 2020, 21: e48791.
- [31] Xie Y, Shi X, Sheng K, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (review) [J]. Mol Med Rep, 2019, 19: 783-791.
- [32] Alaaeldin R, Abdel-Rahman I, Hassan HA, et al. Carpachromene ameliorates insulin resistance in HepG2 cells via modulating IR/IRS1/PI3K/Akt/GSK3/FoxO1 pathway [J]. Molecules, 2021, 26: 7629.
- [33] Xiao H, Sun X, Lin Z, et al. Gentiopicroside targets PAQR3 to activate the PI3K/Akt signaling pathway and ameliorate disordered glucose and lipid metabolism [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 2887-2904.
- [34] Shi M, Lu Y, Wu J, et al. Beneficial effects of theaflavins on metabolic syndrome: from molecular evidence to gut microbiome [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 7595.
- [35] Chu L. Research on The Regulation of HRPE Cell Differentiation Based on WNT/PI3K/Akt Pathway and Growth Factor PEDF Hirudin (基于 WNT/PI3K/Akt 通路和生长因子 PEDF 水蛭素调控 HRPE 细胞分化的研究) [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [36] Liu M, Luo G, Dong L, et al. Network pharmacology and *in vitro* experimental verification reveal the mechanism of the hirudin in suppressing myocardial hypertrophy [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 914518.
- [37] Xiao K, Jia X, Qiang W, et al. Tryptophan supplements in high-carbohydrate diets by improving insulin response and glucose transport through PI3K-Akt-GLUT2 pathways in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. J Nutr Biochem, 2024, 134: 109715.
- [38] Yokoyama K, Tatsumi Y, Hayashi K, et al. Effects of ursodeoxycholic acid and insulin on palmitate-induced ROS production and down-regulation of PI3K/Akt signaling activity [J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40: 2001-2004.
- [39] Schulz F, Just I, Genth H. Prevention of *Clostridium sordellii* lethal toxin-induced apoptotic cell death by tauroursodeoxycholic acid [J]. Biochemistry, 2009, 48: 9002-9010.