

茵胆平肝胶囊治疗肝内胆汁淤积症的药效作用研究

曹舒心^{1,2,3,4}, 黄 丰¹, 吴 方^{2,3,4,5*}, 何蓉蓉^{1,2,3,4,5*}

(1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 暨南大学, 广东省疾病易感性及中医药研发工程技术研究中心/中医药国际化研究粤港澳高校联合实验室, 广东 广州 510632; 3. 暨南大学药学院, 广东省中药药效物质基础及创新药物研究重点实验室, 广东 广州 510632; 4. 暨南大学, 教育部中药与创新药物研究国际合作联合实验室, 广东 广州 510632; 5. 广东省第二人民医院心脏重症科, 广东 广州 510317)

摘要: 本研究旨在通过动物实验探究茵胆平肝胶囊 (Yindan Pinggan capsules, YDPG) 对肝内胆汁淤积症 (intrahepatic cholestasis, IHC) 的治疗效果, 结合网络药理学和分子对接技术挖掘其潜在作用机制并验证。首先通过动物实验评估 YDPG 对 α -萘基异硫氰酸酯 (α -naphthylisothiocyanate, ANIT) 诱导的小鼠 IHC 模型的治疗效果, 包括肝功能检测、血常规检测和肝脏病理分析。进一步采用网络药理学工具预测 YDPG 的有效成分、核心靶点和信号通路, 再以分子对接技术辅助验证 YDPG 中关键活性成分与核心靶点的结合活性, 最后采用蛋白免疫印迹法对关键靶标进行验证。发现 YDPG 能显著改善 IHC 小鼠的肝功能异常和肝细胞损伤, 网络药理学分析结果显示 YDPG 中 94 个药物活性成分关联到 396 个 IHC 的疾病治疗靶点, 并且显著富集于磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-AKT) 信号通路、脂质代谢和胆汁分泌等通路, 分子对接结果显示 YDPG 关键活性组分与 PI3K-AKT 通路核心靶点均有较好的结合活性, 进一步的蛋白免疫印迹法验证了 YDPG 能够降低肝组织中 PI3K-AKT 通路核心靶点 PI3K、AKT 蛋白的磷酸化水平。上述结果提示, YDPG 可能通过调控 PI3K-AKT 信号通路缓解氧化应激和炎症反应等生物过程, 从而改善 IHC 小鼠的肝损伤, 发挥对 IHC 的治疗作用。本实验已获暨南大学动物实验伦理委员会批准 (伦理审批号: IACUC-20241011-09)。

关键词: 茵胆平肝胶囊; 肝内胆汁淤积症; 网络药理学; PI3K-AKT 信号通路; 清热利湿; 炎症反应
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0417-10

Pharmacological effects of Yindan Pinggan capsules in treating intrahepatic cholestasis

CAO Shu-xin^{1,2,3,4}, HUANG Feng¹, WU Fang^{2,3,4,5*}, HE Rong-rong^{1,2,3,4,5*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center for Disease Susceptibility and Development of Traditional Chinese Medicine/Guangdong-Hong Kong-Macao Joint Laboratory for Internationalization of Traditional Chinese Medicine Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory for Research on the Pharmacological Basis of Traditional Chinese Medicine and Innovative Drugs, School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 4. Ministry of Education International Cooperation Joint Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Innovative Drugs, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 5. Department of Critical Care Medicine, Guangdong Provincial Second People's Hospital, Guangzhou 510317, China)

Abstract: This study aimed to investigate the therapeutic effect of Yindan Pinggan capsules (YDPG) on

收稿日期: 2024-11-11; 修回日期: 2024-12-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (T2341004); 广东省第二人民医院“托举工程”专项基金项目 (TJGC-2022014).

*通讯作者 E-mail: hbwufang@126.com; rongronghe@jnu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1117

intrahepatic cholestasis (IHC) through animal experiments, while utilizing network pharmacology and molecular docking techniques to explore its potential mechanisms. Initially, the therapeutic effect of YDPG on an α -naphthylisothiocyanate (ANIT)-induced IHC mouse model was assessed through liver function tests, routine blood tests, and liver pathology analysis. Subsequently, network pharmacology tools were employed to predict the active components, core targets, and signaling pathways of YDPG. Molecular docking technology was employed to verify the binding activity of key active components of YDPG with core targets, followed by protein immunoblotting to validate the key targets. Results showed that YDPG significantly improved liver function abnormalities and hepatocyte damage in IHC mice. Network pharmacology analysis revealed that 94 active components in YDPG were associated with 396 targets for the treatment of IHC, and were significantly enriched in pathways such as the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (AKT) signaling pathway, lipid metabolism, and bile secretion. Molecular docking results showed good binding activity between key active components of YDPG and core targets of the PI3K-AKT signaling pathway. Further protein immunoblotting confirmed that YDPG could reduce the phosphorylation levels of PI3K and AKT proteins, core targets of the PI3K-AKT pathway in liver tissue. These findings suggest that YDPG may alleviate biological processes such as oxidative stress and inflammatory responses by regulating the PI3K-AKT signaling pathway, thereby improving liver damage in IHC mice and exerting a therapeutic effect on IHC. This experiment has been approved by the Animal Experiment Ethics Committee of Jinan University (ethical approval number: IACUC-20241011-09).

Key words: Yindan Pinggan capsules; intrahepatic cholestasis; network pharmacology; PI3K-AKT signaling pathway; clearing heat and promoting dampness; inflammatory response

胆汁淤积症是指胆汁合成缺陷、排泄异常,以及肝内外胆管中胆汁流动的机械性或功能性障碍,继而使得胆汁成分入血所致的临床症状,主要表现为黄疸、瘙痒和疲劳^[1]。胆汁淤积患者体内疏水性胆汁盐和其他胆汁成分在肝细胞和胆汁毛细血管中长期积累,诱导炎症因子的激活、坏死、凋亡和纤维化^[2]。胆汁淤积根据发生部位可分为肝内胆汁淤积 (intrahepatic cholestasis, IHC) 和肝外胆汁淤积。IHC 的病因主要包括自身免疫性疾病、激素因素以及环境影响,如自身免疫性胆管炎^[3]、受孕^[4]、药物^[5]和酒精^[6]等。在中医学中,胆汁淤积属于黄疸范畴,中医浊毒理论认为,浊毒伏肝是肝内胆汁淤积型黄疸的重要病因,浊毒之邪泛指体内一切秽浊之邪,凡风寒暑湿燥火,酒毒、药毒及疫毒久聚不散,与体内痰湿、瘀血、气郁不解均可化浊,浊聚成毒,而成浊毒^[7]。肝为人体中最重要的解毒器官,如浊毒之邪长居体内,其最易蓄积肝内^[8],造成肝脏功能失调及肝损伤。

茵胆平肝胶囊 (Yindan Pinggan capsules, YDPG) 是福建名医黄归元老先生的临床经验方,由茵陈、龙胆、黄芩、猪胆粉、栀子、炒白芍、当归、甘草组成。该方配伍相宜,组方精炼,有突出的清热利湿功效,主要用于肝胆湿热所致的胁痛、口苦、尿黄、身目发黄等黄疸体征^[9]。YDPG 在临床上主要用于治疗乙型肝炎^[10]、病毒性肝炎^[11]、酒精性肝病^[12]、胆囊炎^[13]等肝胆系统疾病。此外, YDPG 也用于联合其他药物治疗酒精性肝纤维化^[14]、慢性胆囊炎^[15]、慢性乙型肝炎肝内胆汁淤

积^[16]、酒精性肝病^[17]等,临床研究结果表明 YDPG 具有显著的治疗效果,尤其在抗炎、缓解黄疸症状、利胆保肝方面。

本研究通过 IHC 动物模型的药效实验结合网络药理学、分子对接技术,探讨 YDPG 治疗 IHC 的药效作用及潜在机制,为其临床应用提供依据。

材料与方法

实验动物 实验用 5 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,购于南方医科大学实验动物中心,实验动物许可证编号: SCXK (粤) 2021-0041。饲养温度为 25 ± 2 °C,相对湿度为 $50\% \pm 5\%$, 12 h 明暗交替环境,标准饲料和水喂养。小鼠适应性喂养 1 周后进行实验。实验方案及程序均符合动物使用和护理的伦理原则,并已获暨南大学动物实验伦理委员会批准 (伦理审批号: IACUC-20241011-09)。

药物与试剂 茵胆平肝胶囊,批号 2205046,漳州片仔癀药业有限公司生产; α -萘基异硫氰酸酯 (ANIT, 纯度: GC $\geq 98\%$, 上海麦克林, N814658-5g); 水飞蓟素 (silymarin, Sigma 公司, 货号 S0292); 总胆汁酸 (total bile acids, TBA, 南京建成生物工程研究所, E003-2-1); 谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (BC1555, BC1565) 购自北京索莱宝科技有限公司; $5\times$ loading buffer (FD002)、 β -actin 抗体 (FD0060)、ECL 显色试剂盒 (FD8020) 购自杭州弗德生物科技有限公司;

羊抗兔二抗 (L3012)、羊抗鼠二抗 (L3032) 购自 SAB 公司; 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 抗体 (Abcam 公司, Ab191606); p-PI3K (4228S)、蛋白激酶 B (AKT) (4691S)、p-AKT (4060S) 购自 Cell Signaling Technology 公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA, S0131S) 检测试剂盒、RIPA 裂解液 (P0013B) 购自上海碧云天生物科技有限公司; 4% 多聚甲醛 (Biosharp 公司, BL539A); BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司, SLZ60212); 总胆红素 (total bilirubin, TBIL, 江苏酶免实业有限公司, MM-43776M); 反转录试剂盒和 SYBR Green Mix (货号 AQ141-01) 购自北京全式金生物技术有限公司。

仪器 电子天平 (德国 Sartorius 公司, BS224S); 高速低温离心机 (德国 Sigma 公司, 3K15); 多功能酶标仪 (美国 Labsystem 公司, Mk-3); 石蜡切片机 (德国 Leica 公司, RM2255); 恒温金属浴 (上海一恒科技有限公司, TU-100C); 全自动样品快速研磨仪 (上海净信科技有限公司, JXFSTPRP-24); 电泳仪 (北京六一生物技术有限公司, DYY-6C); 扫描显微镜 (德国 Precipoint 公司, Precipoint M8); 化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司, Tanon 5200)。

IHC 小鼠模型的建立、分组及给药 本次实验采用 SPF 级 5 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 30 只, 随机分为对照组、模型组、YDPG 低剂量组 (YDPG-L)、YDPG 高剂量组 (YDPG-H)、阳性药组 (水飞蓟素, Sily), 每组 6 只。低剂量组给予临床 2 倍剂量 YDPG ($0.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 高剂量组给予临床 4 倍剂量 YDPG ($1.56 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 药物采用 0.5% CMC-Na 溶解, 现配现用。对照组及模型组给予同体积的 0.5% CMC-Na 溶剂, 阳性对照组 Sily 剂量为 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [18]。本实验连续给药 7 天, 在第 8 天给药 5 h 后, 对照组灌胃给予橄榄油, 其余 4 组灌胃 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ANIT 橄榄油溶液进行造模, 第 9 天正常给药, 第 10 天取材。

血清生化指标检测 实验结束采用异氟烷麻醉小鼠后取血, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 获得血清并将其保存在 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中供后续分析。

肝脏组织相关检测 取 10 mg 的肝脏组织, 按重量 (g): 体积 (mL) 为 1:9 的比例加入 0.9% 生理盐水, 冰水浴匀浆破碎, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 取上清

供后续 MDA 和 TBA 检测。

组织病理学观察 取小鼠肝组织一部分置于 4% 多聚甲醛中固定, 脱水、石蜡包埋、切片后进行 H&E 染色, 扫片机拍照观察各组小鼠肝脏组织病理变化。每组 3 个样本, 每个样本随机选取 5 个视野, 以视野中环死区域评分作半定量分析并计算其均值, 用于评估肝组织损伤程度。

qRT-PCR 检测 称取小鼠肝脏组织约 20 mg 进行裂解, 按照试剂盒的方法提取小鼠肝脏组织样本中总 RNA, 定量并检测样品 RNA 浓度。将提取的 RNA 按照逆转录试剂盒步骤逆转录成 cDNA, 使用实时定量 PCR 系统 (qRT-PCR) 进行扩增, 以 β -actin 作为内参基因对各基因进行归一化处理, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。qRT-PCR 引物如下表 1。

Western blot 检测 称取小鼠肝脏组织约 30 mg, 用 RIPA 强效裂解液提取总蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。与上样缓冲液混合、蛋白变性, $30 \mu\text{g}$ 蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 湿法转膜 60 min。抗体配制比例如下: p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 兔单克隆抗体 (1:1 000) 和 β -actin 鼠单克隆抗体 (1:5 000)。用 Image J 软件对图像进行分析, 结果以目的蛋白与内参蛋白 β -actin 的光密度比值表示。

YDPG 活性成分的筛选与靶点预测 通过中药系统药理学数据库分析平台 TCMSP (<https://tcmispw.com/tcmisp.php>) 和中医药整合药理学研究平台 TCMIP (<http://www.tcmip.cn/>) 获取 YDPG 茵陈、龙胆、黄芩、猪胆粉、栀子、白芍 (炒)、当归、甘草 8 味中药所含有的化合物, 对获得的化合物进行 ADME 筛选 [吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism)、排泄 (extraction)], 并根据口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 [19] 标准进一步筛选, 以确定活性化合物。使用 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库预测筛选后活性化合物可能的作用靶点, 通过文献调研, 进一步确认具有明确生物学功能的药效活性成分及其靶点信息。

IHC 相关靶点筛选 临床中引起肝内胆汁淤积的原因有胆道肿瘤、胆结石或者胆管炎症等。通过使用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM

Table 1 The primer sequences for real-time quantitative PCR (qRT-PCR)

Gene	Species		Sequene (5'-3')
<i>Il-1β</i>	Mouse	Forward primer	TGGACCTTCCAGGATGAGGACA
		Reverse primer	GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG
<i>Tnf-α</i>	Mouse	Forward primer	GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
		Reverse primer	GCCATAGAAGTATGAGAGGGAG
β -Actin	Mouse	Forward primer	GGCTGTATTCCCTCCATCG
		Reverse primer	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

数据库 (<http://www.omim.org>)、TTD 数据库 (<http://bidd.nus.edu.sg/group/ejttd/>) 筛选“cholestatic jaundice” (胆汁淤积)、“biliary tract tumor” (胆道肿瘤)、“gallstone” (胆结石)、“cholangitis” (胆管炎症)、“obstructive jaundice” (梗阻黄疸) 疾病的靶点, 合并重复靶点后, 得到与 IHC 相关的靶基因。

“中药-活性成分-共同靶点”网络及共同靶点蛋白互作 (PPI) 网络构建 利用微生信 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 平台将 IHC 疾病相关靶点基因与 YDPG 药物靶点基因取交集, 并绘制韦恩图, 获得 YDPG 治疗 IHC 的潜在作用靶点。将已收集到的 YDPG 主要成分以及治疗 IHC 的靶点数据导入 Cytoscape 3.10.1 软件, 构建“中药-活性成分-共同靶点”网络。在 STRING 蛋白互作网络分析数据库 (<https://string-db.org>) 输入交集靶点, 生物种类选为“Homo sapiens”, 构建 PPI 网络模型。同时利用 Cytoscape 3.10.1 软件对蛋白质-蛋白质相互作用网络图进行可视化处理, 再运用其 Network analyzer 功能对蛋白互作网络进行拓扑分析, 得到共同靶点的 degree 值相关信息。

交集靶点富集分析 将共同靶点输入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO 功能注释及 KEGG 通路富集分析, 同时以 $P < 0.05$ 、count = 2 为筛选标准, 分别导出生物过程 (biological processes, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular functions, MF) 及 KEGG 通路富集分析相关数据。利用微生信平台构建 BP、CC、MF 前 10 位条形图, 并对 GO 和 KEGG 通路富集结果进行展示。

分子对接验证 将筛选得到的关键成分及核心靶点利用 AutoDockTools-1.5.7 进行分子对接。药物小分子配体 3D 结构在 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载, 靶点蛋白的晶体结构形式在 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库下载, 蛋白结构的去配体、去水等修饰由 PyMOL 3.0.3 软件完成。

统计学方法 本实验涉及的所有数据均采用平均数 \pm 标准差形式表示。采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

1 YDPG 对 IHC 小鼠的治疗作用

1.1 YDPG 对 IHC 小鼠体重和肝肾功能的影响 给药期间各组小鼠体重均无显著性差异 (图 1A); 与空白对照组相比, IHC 模型组小鼠肝脏及肾脏指数均显著升高, 提示 ANIT 对小鼠肝肾的损伤作用, 而 YDPG 高

剂量组可显著改善这种异常变化 (图 1B、C)。此外, 模型组小鼠血清中 AST、ALT、TBA、TBIL 和肝脏 MDA、TBA 水平均显著上升, 进一步说明 ANIT 诱导小鼠肝细胞功能损伤; 与模型组比较, YDPG 高剂量组能有效降低 IHC 小鼠血清 ALT、AST、TBA、TBIL 和肝脏 MDA、TBA 水平 (图 1D~I)。表明 YDPG 能有效改善 IHC 小鼠的肝功能异常并减轻肝肾损伤程度。

1.2 YDPG 改善 IHC 小鼠血常规指标 血常规检查是评估血液健康状况的重要手段, 由于胆汁淤积可能影响维生素 B12 和叶酸的吸收, 因此 IHC 患者可能出现贫血, 表现为血红蛋白和红细胞数目降低, 且在胆汁淤积的情况下, 胆汁酸等物质可能刺激免疫系统, 导致中性粒细胞增多^[20]。本研究发现, IHC 小鼠与空白对照组相比, 中性粒细胞 (neutrophils, NEU) 数目及比例过高, 血红蛋白 (hemoglobin, HGB) 和红细胞 (red blood cell, RBC) 数目降低, YDPG 高剂量组能有效降低 IHC 小鼠血清中性粒细胞数目及比例, 升高血红蛋白和红细胞数目。表明 YDPG 能恢复 IHC 小鼠因胆汁淤积引起的血液异常指标 (图 2)。

1.3 YDPG 改善 IHC 小鼠肝胆组织病理状态 IHC 小鼠肝脏呈现出点状坏死样, 胆囊明显肿大且颜色呈墨绿色, 肝组织 H&E 染色显示肝细胞少许灶性坏死和炎症, 轻度界面炎, 毛细胆管、肝细胞、胆小管均有淤胆。高剂量 YDPG 能有效改善 IHC 小鼠肝细胞炎症、胆小管胆汁淤积等症状 (图 3)。

1.4 YDPG 对 IHC 小鼠肝组织炎症水平的影响 与空白对照组小鼠相比, 模型组小鼠肝脏组织中 *Il-1 β* 和 *Tnf- α* 基因相对表达水平升高; 与模型组比较, 高剂量 YDPG 可显著降低小鼠 *Il-1 β* 和 *Tnf- α* 基因相对表达水平 (图 4)。表明高剂量 YDPG 能有效降低 IHC 小鼠肝脏炎症因子的 mRNA 表达水平。

2 网络药理学研究结果

2.1 目标预测与 YDPG 和 IHC 之间的交集分析 为了进一步探究 YDPG 治疗 IHC 的作用靶点, 本研究采用网络药理学方法预测 YDPG 的有效成分、核心靶点和信号通路。最终确定了 94 个活性成分, 通过 Swiss Target Prediction 数据库进行筛选并去重整合后得到 396 个 YDPG 的药物靶点。使用 GeneCards、OMIM、TTD 数据库, 获得 3 192 个疾病靶点。将药物、疾病靶点输入微生信平台绘制韦恩图, 最终获得 182 个共同靶点。将共同靶点导入 Cytoscape 3.10.1 中, 删除无交集成分, 绘制出“中药活性成分-疾病-共同靶点”网络图 (图 5)。

2.2 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析 对 182 个共同靶点进行 GO 和 KEGG 分析, 发现 YDPG 改善 IHC

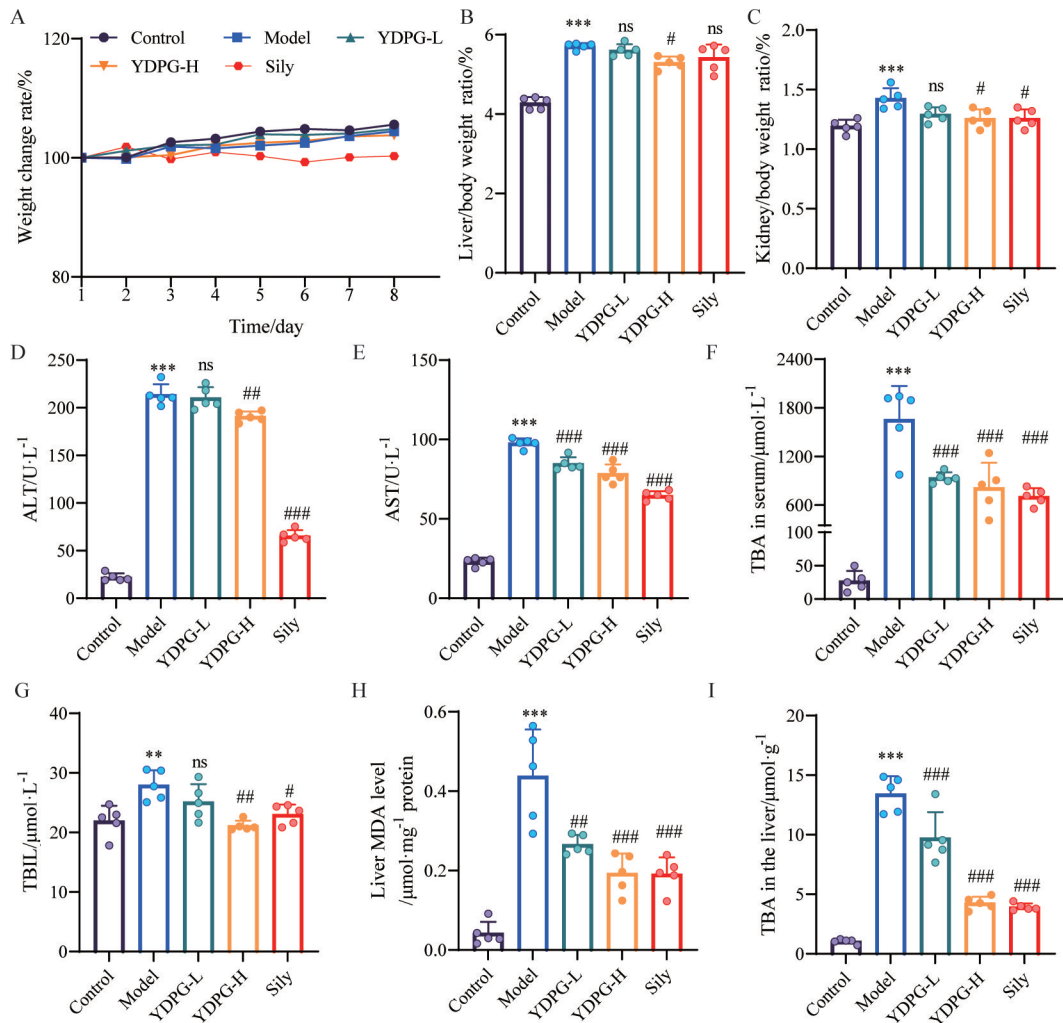


Figure 1 The impact of Yindan Pinggan capsules (YDPG) on body weight, liver function and kidney function in intrahepatic cholestasis (IHC) mice. A: Weight change rate; B: Liver/body weight ratio; C: Kidney/body weight ratio; D: Alanine aminotransferase (ALT) level in serum; E: Aspartate aminotransferase (AST) level in serum; F: Total bile acids (TBA) level in serum; G: Total bilirubin (TBIL) level in serum; H: Malondialdehyde (MDA) level in liver; I: TBA level in liver. Model: Induction of model by gavage with 100 mg·kg⁻¹ α -naphthylisothiocyanate (ANIT) in olive oil solution; YDPG-L: 0.78 g·kg⁻¹; YDPG-H: 1.56 mg·kg⁻¹. $n = 5, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group. ns: Not significant

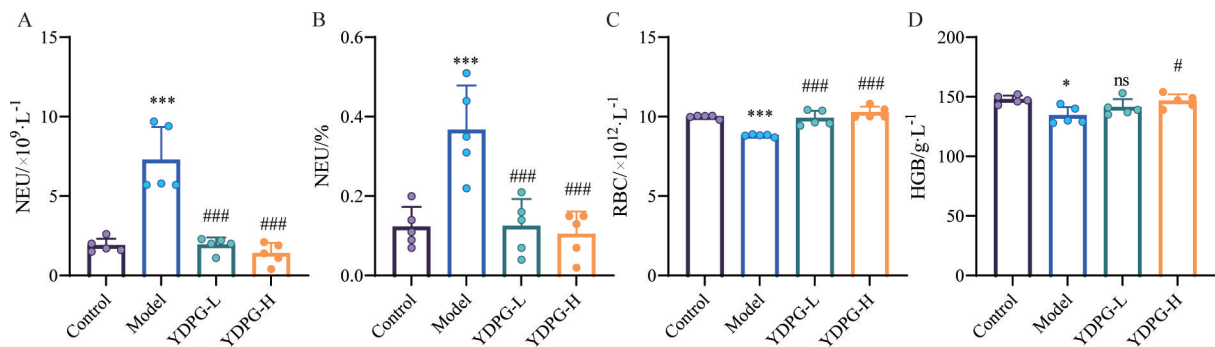


Figure 2 YDPG improves blood routine indicators in IHC mice. A: Number of neutrophils (NEU); B: Proportion of NEU; C: Red blood cell (RBC) count; D: Hemoglobin (HGB) count. $n = 5, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs model group

主要影响PI3K-AKT信号通路、脂质代谢和胆汁分泌等途径,提示其可能通过抗炎、抗氧化、免疫调节和代谢调节等途径改善IHC(图6)。

2.3 潜在有效成分和核心靶点筛选 将182个共同靶点输入STRING数据库,构建PPI网络,并将相互作用信息导入Cytoscape 3.10.1软件中,对PPI网络图进行

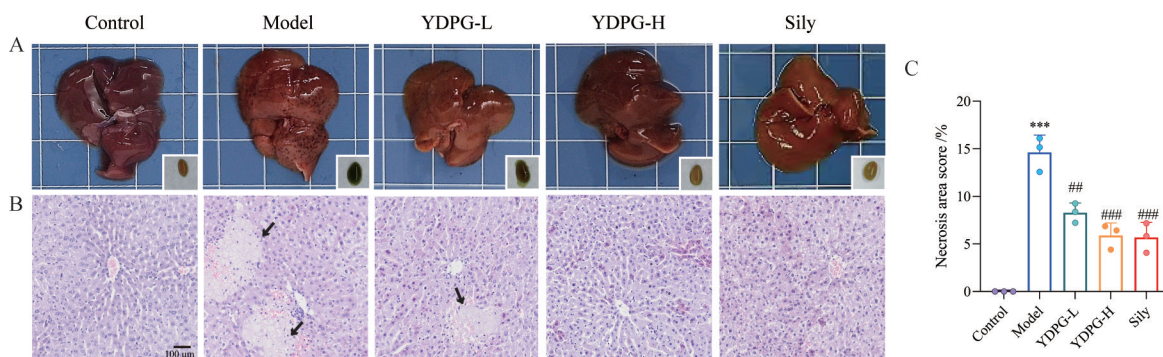


Figure 3 YDPG improves the pathological state of hepatobiliary tissues in IHC mice. A: Morphology of mouse liver and gallbladder tissue; B: H&E staining results of mouse liver. Areas of severe liver necrosis and hyperplastic bile duct cytoderm were marked by arrows. Scale bars, 100 μ m; C: Quantitative analysis of hepatocyte necrosis in hematoxylin and eosin (H&E)-staining of mice in each group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group

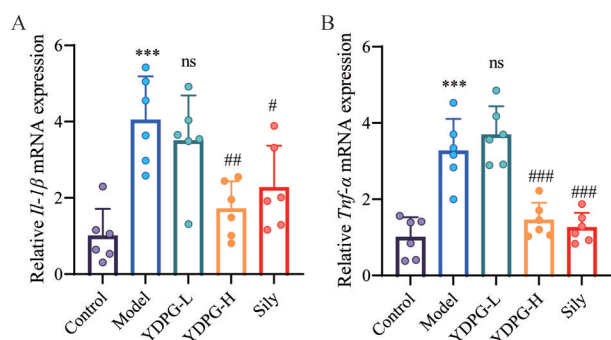


Figure 4 The impact of YDPG on the inflammatory level of liver tissue in IHC mice. A: Relative *Il-1β* mRNA expression; B: Relative *Tnf-α* mRNA expression. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group

可视化后选择前30个目标靶点用微生信在线平台作图, 结果表明其核心靶点是SRC、HSP90AA1、PIK3CA、

PIK3R1、AKT1、ESR1、PRKCA等(图7)。

3 分子对接结果

为了更全面地探讨YDPG中潜在活性成分对于重要信号通路PI3K-AKT的影响, 选择排名靠前的潜在活性成分异鼠李素(茵陈)、刺槐素(黄芩)、龙胆根素(龙胆)、去甲氧基茵陈色原酮(茵陈)、槲皮素(茵陈、栀子、当归)、圣草酚(黄芩)、豆甾醇(栀子、当归)与PI3K-AKT信号通路中关键靶蛋白AKT1进行分子对接研究。一般结合能 $< 0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 可自发结合, 结合能 $< -7.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 提示有强烈的结合活性^[21]。分子对接结果显示, 豆甾醇(stigmasterol)、去甲氧基茵陈色原酮(demethoxycapillarisin)、异鼠李素(isorhamnetin)、槲皮素(querctetin)均与关键靶蛋白AKT1的结合活性较强(图8)。

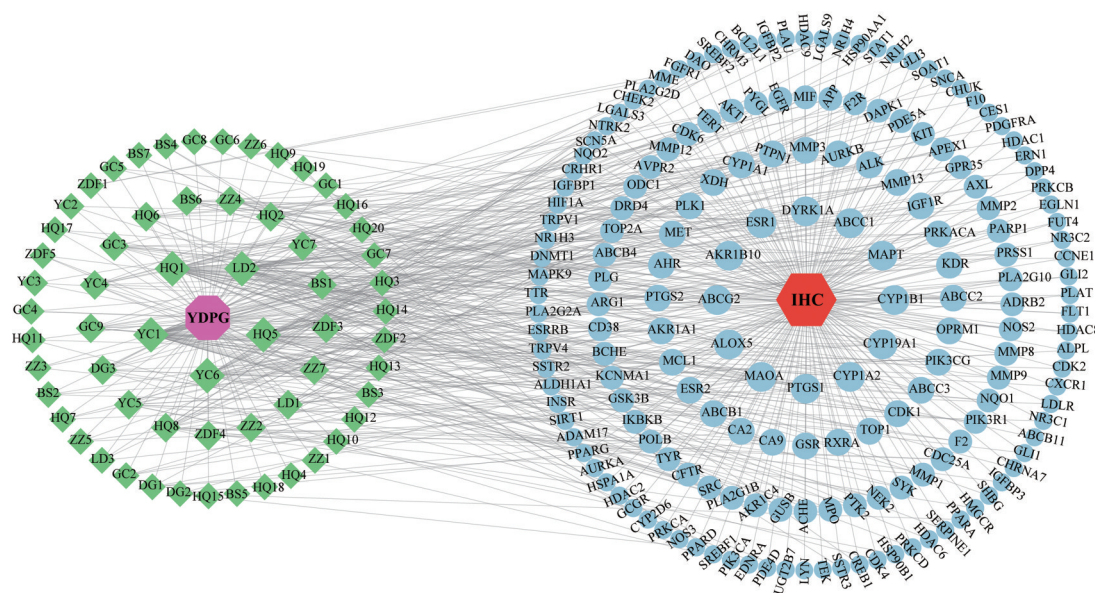


Figure 5 Network diagram of "drug-component-target-disease". The purple octagon represents YDPG, green rhombuses represent medicinal ingredients, blue circles represent co-matching points, and red hexagons represent diseases

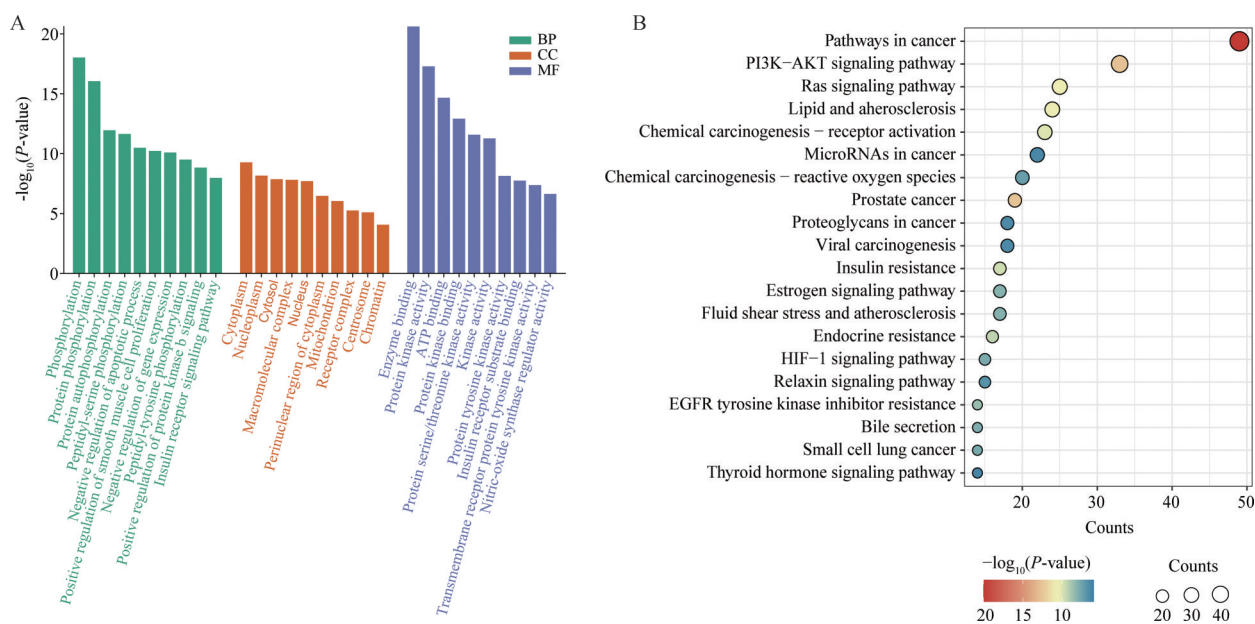


Figure 6 GO functional enrichment analysis and KEGG pathway analysis. A: GO analysis of YDPG capsules for treatment of IHC; B: KEGG analysis of YDPG capsules for treatment of IHC

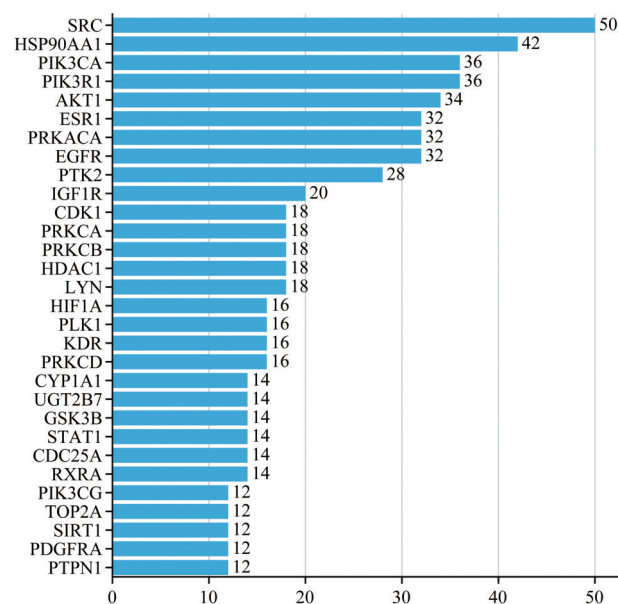


Figure 7 Core targets based on PPI topology analysis (top 30)

4 YDPG 对 IHC 小鼠肝组织中 PI3K-AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

网络药理学结果表明, PI3K-AKT 通路可能是 YDPG 抗 IHC 的核心靶标, 因此进一步采用 Western blot 检测 ANIT 干预后 IHC 小鼠肝组织中 PI3K-AKT 通路相关蛋白的表达。结果表明, IHC 小鼠 PI3K 和 AKT 蛋白的磷酸化水平均显著升高, 与空白对照组比较, YDPG 各剂量组均能显著降低 PI3K 和 AKT 蛋白的磷酸化水平 (图 9)。提示 YDPG 可能通过抑制 PI3K-AKT 信号通路的激活进而发挥抗 IHC 作用。

讨论

肝内胆胆汁淤积是一种由肝内和全身胆汁酸蓄积引起的肝毒性的临床综合征。胆汁淤积的发病机制主要涉及炎症、胆汁酸转运蛋白的失调和氧化应激^[22]。目前熊去氧胆酸是大多数胆汁淤积性肝病的基本治疗方法, 但对于约三分之一的原发性胆管炎患者及所有原发性硬化性胆管炎患者而言, 该治疗方式可能带来疾病进展的风险。胆汁药和胆汁酸合成抑制剂可能会增加对原发性胆汁性胆管炎和原发性硬化性胆管炎患者治疗的反应率^[23]。中医药在治疗 IHC 方面具有独特的优势。中医认为, 胆汁淤积多与肝气郁滞、湿热内蕴有关, 治当以清热利湿为法^[24], 因此调理胆汁淤积以疏肝解郁、清热利湿为主要方法。YDPG 组方精妙、疗效确切, 临床上已证实它具有清热利湿、退黄保肝的显著效果^[25], 但其药效物质基础及作用机制尚未完全阐明。

基于此, 本研究建立了 ANIT 诱导的小鼠 IHC 模型, 以评估 YDPG 对于 IHC 疾病的治疗效果。结果发现 YDPG 改善了小鼠 ANIT 模型的肝功能和组织病理状况, 降低了血清中的 AST、ALT、TBA 和 TBIL 水平, 表明其可能通过恢复肝细胞功能来缓解肝内胆胆汁淤积。此外, 肝脏病理学结果也证实了 YDPG 能够显著减轻 IHC 小鼠的肝细胞损伤、坏死及炎症浸润。

在明确 YDPG 治疗 IHC 的药效作用基础上, 本研究进一步采用网络药理学方法构建了“中药活性成分-疾病-共同靶点”网络, 筛选得到 6 个 YDPG 治疗 IHC 的重要潜在活性成分, 包括异鼠李素、刺槐素、龙胆根素、槲皮素、豆甾醇、山柰酚。其中, 异鼠李素具有

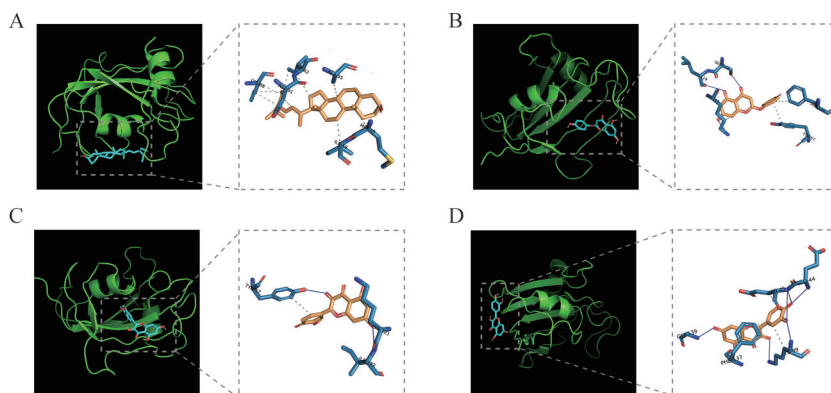


Figure 8 Molecular docking diagram of the main active components with the core target protein AKT1. A: 3D binding conformation of AKT1 and stigmaterol; B: 3D binding conformation of AKT1 and demethoxycapillarisin; C: 3D binding conformation of AKT1 and isorhamnetin; D: 3D binding conformation of AKT1 and quercetin

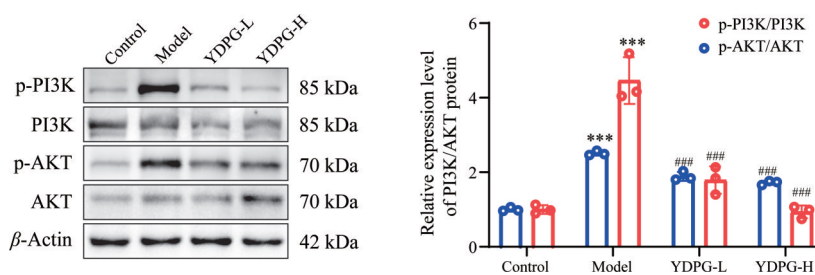


Figure 9 The impact of YDPG on the expression of proteins involved in the PI3K-AKT signaling pathway in liver tissue of IHC mice. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group

显著的抗氧化作用^[26], 刺槐素作为天然黄酮类药物, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用^[27], 龙胆根素可以抗炎、保肝、抗肿瘤、抗氧化等^[28], 槲皮素可降低急性肝损伤中 ALT 和 AST 水平^[29], 豆甾醇可以抑制肝脂肪基因表达^[30], 山柰酚可以抑制炎症反应^[31]。通过 PPI 网络构建及核心靶点分析, 本研究揭示了 SRC、HSP90AA1、PIK3CA、PIK3R1、AKT1、ESR1、PRKCA 等可能是 YDPG 治疗 IHC 的核心靶点。进一步分子对接实验结果表明, YDPG 中的潜在活性成分豆甾醇、去甲氧基茵陈色原酮、异鼠李素、槲皮素与 AKT1 靶点有较高的结合活性, 可能在 YDPG 对 IHC 的治疗中发挥关键作用。KEGG 富集分析结果表明, YDPG 治疗 IHC 的靶点显著富集于 PI3K-AKT、脂质代谢和动脉粥样硬化、胆汁分泌等通路。其中, PI3K-AKT 是生物体中重要的信号通路之一, 参与多种生命活动的调节, 在胆汁酸代谢相关疾病中发挥关键作用, PI3K-AKT 和 MAPK 通路的激活可引起肝内胆汁淤积^[32]。此外, 作为 PI3K-AKT 下游激酶的 GSK-3 β , 参与多种疾病状态的发展, 包括炎症、氧化应激^[33]和纤维化疾病, 能够加剧肝脏炎症和纤维化的发展。这些研究提示, PI3K-AKT 信号通路可能是 YDPG 治疗 IHC 的关键靶点。

基于以上研究结果, 本研究采用蛋白免疫印迹法

确证了 YDPG 对于 IHC 小鼠 PI3K-AKT 信号通路中关键蛋白的显著调控作用。提示 YDPG 可能通过调节 PI3K-AKT 信号通路, 减轻 ANIT 诱导的肝细胞损伤和炎症反应, 进而发挥改善 IHC 的效果。尽管如此, PI3K-AKT 信号通路下游激酶的变化情况及其对肝脏炎症和胆汁淤积进程的潜在影响尚未明确。未来的研究需要进一步深入探讨这些下游激酶的变化, 以及它们如何影响肝脏炎症反应和胆汁淤积的发展, 从而为阐明 YDPG 的作用机制提供更全面的科学依据。

综上所述, YDPG 通过多成分、多靶点、多通路的作用机制, 可能为 IHC 的治疗提供了一种有效的策略。未来的研究可以进一步探索 YDPG 中活性成分的具体作用机制, 以及这些成分如何协同作用于 IHC 的治疗。这些研究有望为 YDPG 的临床应用提供更确切的数据支持。

作者贡献: 曹舒心负责整体实验研究、数据分析统计和论文撰写; 黄丰和吴方参与实验方案设计指导、论文修改; 何蓉蓉负责指导实验设计、提供研究经费和平台支持。

利益冲突: 所有作者声明无任何利益冲突。

References

- [1] Trivedi M, Bergasa NV. Serum concentrations of substance P in

- cholestasis [J]. *Ann Hepatol*, 2010, 9: 177-180.
- [2] Wang MQ, Zhang KH, Liu FL, et al. Wedelolactone alleviates cholestatic liver injury by regulating FXR-bile acid-NF- κ B/NRF2 axis to reduce bile acid accumulation and its subsequent inflammation and oxidative stress [J]. *Phytomedicine*, 2024, 122: 155124.
- [3] Hassan S, Hertel P. Overview of progressive familial intrahepatic cholestasis [J]. *Clin Liver Dis*, 2022, 26: 371-390.
- [4] Hobson S, Gandhi S, Sobel M. Intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. *CMAJ*, 2022, 194: E1650.
- [5] Vitale G, Mattiaccio A, Conti A, et al. Molecular and clinical links between drug-induced cholestasis and familial intrahepatic cholestasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 5823.
- [6] Ivashkin VT, Maevskaia MV, Kobalava ZD, et al. Open-label study of ademetonine for the treatment of intrahepatic cholestasis associated with alcoholic liver disease [J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2018, 64: 208-219.
- [7] Yang Q, Zhang YF, Cai YR, et al. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease from the perspective of turbid toxin [J]. *Glob Tradit Chin Med (环球中医药)*, 2016, 9: 1303-1305.
- [8] Wang MJ, Huang GH. Professor Huang Guihua's experience in treating intrahepatic cholestasis jaundice based on the theory of turbid toxin [J]. *Guangxi Med J (广西医学)*, 2023, 45: 1769-1772.
- [9] Chen JP. Preparation, Quality Standards, and Pharmacological Studies of Yindan Pinggan Capsules (茵胆平肝胶囊的制备、质量标准及药理研究)[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2003.
- [10] Zhang MX. Clinical observation on the treatment of hepatitis B with Yindan Pinggan capsules [J]. *Chin Foreign Med Res (中外医学研究)*, 2020, 18: 46-48.
- [11] Wang YQ, Wang LT, Wu YQ, et al. Clinical observation of Yindan Pinggan capsules in the treatment of viral hepatitis [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志)*, 1994, (5): 29-30.
- [12] Chang XW, Wang HL. Clinical study of Yindan Pinggan capsules in the treatment of 41 cases of alcohol-induced liver disease with damp-heat syndrome [J]. *Henan Tradit Chin Med (河南中医)*, 2015, 35: 2101-2103.
- [13] Lv LD. Efficacy observation of Yindan Pinggan capsules in the treatment of cholecystitis in 23 cases [J]. *Strait Pharm J (海峡药学)*, 1995, 7: 64.
- [14] Wang L, Zhao P. Efficacy observation of Yindan Pinggan capsules combined with Qinggan Jiuwei powder in the treatment of alcoholic liver fibrosis [J]. *Eval Anal Drug Use Hosp China (中国医院用药评价与分析)*, 2019, 19: 320-324.
- [15] Li S, Lin ZW, Chen L, et al. Clinical observation of Yindan Pinggan capsules combined with Fusan Liao in the treatment of 84 cases of chronic cholecystitis with damp-heat syndrome in liver and gallbladder [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药)*, 2019, 28: 115-117.
- [16] Wei YK, Ma WM. Clinical efficacy observation of simvastatin combined with Yindan Pinggan capsules in the treatment of chronic hepatitis B with intrahepatic cholestasis [J]. *Inner Mong Med J (内蒙古医学杂志)*, 2017, 49: 216-217.
- [17] Zhang YL, Li XG. Clinical study of Yindan Pinggan capsules combined with polyene phosphatidylcholine in the treatment of alcoholic liver disease [J]. *Med Clin (现代药物与临床)*, 2017, 32: 1917-1919.
- [18] Sohail I, Malkani N, Tahir N, et al. Silymarin protects the liver from α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis by modulating the expression of genes involved in bile acid homeostasis [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2022, 68: 208-212.
- [19] Zheng M, Zhao Q, Yuan Y, et al. Exploration of the medication rules and potential mechanisms of traditional Chinese medicine in treating jaundice based on data mining and network pharmacology [J]. *Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med (上海中医药大学学报)*, 2023, 37: 56-65.
- [20] National Clinical Research Center for Infectious Diseases. Expert consensus on the diagnosis and treatment of intrahepatic cholestasis (2021 edition) [J]. *Chin J Clin Infect Dis (中华临床感染病杂志)*, 2021, 14: 401-412.
- [21] Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 4331.
- [22] Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, et al. Change in hepatic antioxidant defense system with liver injury development in rats with a single α -naphthylisothiocyanate intoxication [J]. *Toxicology*, 1999, 139: 265-275.
- [23] Wagner M, Fickert P. Drug therapies for chronic cholestatic liver diseases [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2020, 60: 503-527.
- [24] Sun X, Fang J, Fang N. Chishao (*Paoniae Radix Rubra*) alleviates intra-hepatic cholestasis by modulating NTCP in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1341651.
- [25] Liu CS, Li GD. Advances in the pharmacological effects and clinical applications of Yindan Pinggan Capsules [C]// Proceedings of the First National Conference on Difficult and Severe Hepatic Diseases and the Fourth National Conference on Artificial Liver and Blood Purification (第一届全国疑难重症肝病大会暨第四届全国人工肝及血液净化大会). Zhangzhou: Zhangzhou Pien Tze Huang Pharmaceutical Co., Ltd., 2008: 2.
- [26] Huang J. Protective Effect and Mechanism of Isorhamnetin on Paracetamol-induced Drug Liver Injury in Mice (鼠李糖苷对扑热息痛诱导的小鼠药物性肝损伤的保护作用及其机制研究) [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.
- [27] Bu J, Mahan Y, Zhang Y, et al. RNA sequencing analyses reveal the potential anti-inflammatory mechanisms of acacetin against ODG/R injuries in microglia [J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 3641-3652.
- [28] Ye FQ, Sun YJ, Fan CY, et al. Advances in the study of chemical components, bioactivity, and clinical application of Gentiana [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2023, 54: 6497-6510.
- [29] Qin P, Zhang W, Chen ZY, et al. Protective effect of quercetin on

- acetaminophen-induced acute liver injury in mice [J]. Guangdong Chem Ind (广东化工), 2022, 49: 63-66.
- [30] Feng S, Dai Z, Liu AB, et al. Intake of stigmasterol and β -sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2018, 1863: 1274-1284.
- [31] Song JY, Ren F, Zhang XY, et al. Protective effect of kaempferol intervention on *D*-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure in mice [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2017, 37: 569-574.
- [32] Xiang D, Yang J, Xu Y, et al. Estrogen cholestasis induces gut and liver injury in rats involving in activating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways [J]. Life Sci, 2021, 276: 119367.
- [33] Pecoraro C, Faggion B, Balboni B, et al. GSK3 β as a novel promising target to overcome chemoresistance in pancreatic cancer [J]. Drug Resist Updat, 2021, 58: 100779.