

[文章编号] 1007-7669(2024)04-0296-08

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.04.11

基于 NF- κ B 信号通路探讨蒙药七味清肝散抗肝纤维化作用的研究

张春艳, 赵晓璐, 高晓阳, 马月宏

(内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010110)

[关键词] 七味清肝散; NF- κ B; 肝纤维化; 肝星状细胞

[摘要] 目的 探讨蒙药七味清肝散(QGS-7)经NF- κ B信号通路发挥抗肝纤维化作用。方法 体内实验取60只雄性Wistar大鼠随机分为空白组, 四氯化碳(CCl₄)模型组, QGS-7低、中、高剂量(135、270、405 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组。空白组每日灌胃0.5% CMC-Na溶液, 模型组和QGS-7组大鼠灌胃50% CCl₄花生油溶液造肝纤维模型, 每周2次, 同时各给药组每日予相应剂量的QGS-7灌胃8周。取材后采用HE和Masson染色法观察肝组织病理学改变。q-PCR法和Western blot法检测纤维化标志物 α -平滑肌动蛋白(α -SMA)、胶原蛋白I(collagen I)和NF- κ B信号通路相关因子的mRNA和蛋白表达量。体外实验中大鼠灌胃给予QGS-7 1350 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 7 d后取血制备含药血清, 将HSC-T6细胞分为空白组, 脂多糖(LPS)模型组, QGS-7含药血清低、中、高浓度组。Annexin V-FITC和PI双染法检测细胞凋亡情况; q-PCR法和Western blot法检测 α -SMA、collagen I及NF- κ B信号通路相关因子的mRNA和蛋白表达量。结果 体内实验中, 与空白组相比, CCl₄模型组组织中成纤维细胞增多, 细胞排列混乱, 胶原沉积明显, QGS-7各剂量组均有不同程度改善。与空白组相比, CCl₄模型组肝组织中 α -SMA、collagen I、NF- κ Bp65蛋白和mRNA表达量显著增加($P < 0.05$), TLR4、p-TAK1、p-IKK α /IKK α 、p-IKK β /IKK β 、p-NF- κ Bp65/NF- κ Bp65蛋白和mRNA表达量显著增加($P < 0.05$); 与模型组相比, QGS-7各剂量组上述因子的蛋白和mRNA表达量均显著降低($P < 0.05$)。体外实验中, 空白组和LPS模型组凋亡率均较低, 与模型组相比, QGS-7含药血清各浓度组凋亡率显著增加($P < 0.01$), α -SMA、collagen I和NF- κ B信号通路相关因子的mRNA和蛋白表达量与体内实验表达趋势一致。结论 QGS-7具有良好的抗肝纤维化作用, 作用机制可能与下调NF- κ B信号通路的关键靶点有关。

[中图分类号] R575.2; R975.5

[文献标志码] A

Study on anti-hepatic fibrosis effect of Mongolian medicine Qiwei Qinggan powder based on NF- κ B signaling pathway

ZHANG Chun-yan, ZHAO Xiao-lu, GAO Xiao-yang, MA Yue-hong

(School of Basic Medicine, Inner Mongolian Medical University, Hohhot INNER MONGOLIAN 010080, China)

[KEY WORDS] Qiwei Qinggan powder; NF-kappa B; hepatic fibrosis; hepatic stellate cells

[ABSTRACT] AIM To investigate the anti-hepatic fibrosis effect of Qiwei Qinggan powder (QGS-7) through NF- κ B signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. METHODS *In vivo* experiment, sixty male Wistar rats were randomly divided into 5

[收稿日期] 2022-06-14 [接受日期] 2023-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金(81960759, 81560706); 内蒙古自治区自然科学基金(2019MS08010, 2014MS0841); 内蒙古自治区草原英才培养计划; 内蒙古医科大学致远人才项目(ZY0201012); 内蒙古人才开发基金(22056); 内蒙古医科大学重点项目(YKD2022ZD019); 内蒙古医科大学蒙药抗肝纤维化作用研究科技创新团队

[作者简介] 张春艳, 女, 硕士, 主要从事中蒙药抗肝纤维化研究, E-mail: 1273832195@qq.com

[责任作者] 马月宏, E-mail: myh19982002@sina.com

groups: blank group, CCl₄ model group, QGS-7 low, medium, high dose groups. The blank group was gavaged with 0.5% CMC-Na solution daily, and the model group and each dose groups were gavaged with 50% CCl₄ peanut oil solution twice a week, while each dose groups were gavaged with corresponding dose of QGS-7 (135, 270, 405 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) for 8 weeks. The histopathological changes of liver were observed by HE and Masson staining. q-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of fibrosis markers of alpha smooth muscle actin (α-SMA), collagen I and NF-κB signaling pathway-related factors. *In vitro* experiment, rats were gavage with QGS-7 1350 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, and blood was taken after 7 d to prepare drug-containing serum, which was classified into the blank group, the LPS model group, and the QGS-7 drug-containing serum low-, medium- and high-concentration groups using HSC-T6 cells. Detection of apoptosis by double staining with Annexin V-FITC and PI. The mRNA and protein expression of α-SMA, collagen I and NF-κB signaling pathway-related factors were detected by q-PCR and Western blot. **RESULTS** *In vivo* experiment, HE and Masson results showed that fibroblasts were increased of the tissues in the CCl₄ model group, with disorganized cell arrangement and significant collagen deposition compared with the blank group. Compared with the blank group, α-SMA, collagen I and NF-κBp65 protein and mRNA expressions of the liver tissues were significantly increased in the CCl₄ model group ($P < 0.05$), and TLR4, p-TAK1, p-IKKα/IKKα, p-IKKβ/IKKβ, p-NF-κBp65/NF-κBp65 protein and mRNA expression were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the protein and mRNA expression of the above factors were significantly decreased in each dose group of QGS-7 ($P < 0.05$). *In vitro* experiments, the apoptosis rate was lower in both the blank group and the LPS model group. Compared with the model group, the apoptosis rate was significantly increased in each concentration of the QGS-7-containing serum group ($P < 0.01$), and the mRNA and protein expression of the α-SMA, collagen I, and the NF-κB signalling pathway related to factors were consistent with the trend *in vivo* experimental expression. **CONCLUSION** QGS-7 has good anti-fibrotic effects, and the mechanism may through down-regulation of key targets of NF-κB signaling pathway to exert anti-fibrotic effects.

肝纤维化 (hepatic fibrosis) 是慢性肝损伤引起肝脏的病理性改变, 促使细胞外基质 (ECM) 大量积累^[1,2]。大量炎症因子的释放, 使肝星状细胞 (HSC) 由静止状态变为激活的状态, 使其转化为肌成纤维细胞 (MFB), 促进纤维组织的增生, MFB 可以促进 I 型胶原和 III 型胶原的增加^[3]。

复方七味清肝散 (QGS-7), 又名额力根-7, 由蓝盆花、红花、香青兰、人工牛黄、瞿麦、石膏和五灵脂七味药材组成^[4], 具有清肝热的作用^[5]。蒙医临床数据显示, 该方可用于治疗黄疸、肝区疼痛等, 在慢性肝病治疗中使用频率明显高于其他方剂^[6]。不足的是, QGS-7 仅有临床使用经验, 其抗肝纤维化适应证并不明确, 作用机制研究仍有待完善。核因子 (NF) - κB 信号通路是一条常见的信号通路, 主要参与细胞周期、增殖分化、凋亡等过程^[7]。在经典途径中, 胞浆中 NF-κB 与 IκB 连接在一起形成复合物, 使得对应的配体与 TLR4 或 T 淋巴细胞结合激活 IKKα 和 IKKβ, IKKβ 磷酸化后促进 IκBα 与 p65/p50 分离, p65/p50 进入细胞核内进行靶向转录^[8,9]。在肝损伤、肝纤维化和肝癌中, NF-κB 是炎症和细胞死亡的主要调节因子^[10,11]。课题组前期网络药理学及转录组学研究结果发现, NF-κB 通路是与药物抗肝损伤及肝保护作用相

关性较强的信号通路^[12]。本研究基于 NF-κB 信号通路探讨药物抗肝纤维化的作用机制。

材料与方法

药品、试剂与仪器 本研究所用蓝盆花 (批号:171219)、红花 (批号:171103)、香青兰 (批号:171109)、人工牛黄 (批号:171030)、瞿麦 (批号:170910)、石膏 (批号:171217)、五灵脂 (批号:171215) 均购自内蒙古天盛蒙中医有限责任公司, 并由内蒙古医科大学蒙药学院蒙药炮制实验中心鉴定为真品。HE 染色液、Masson 三色染色试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; α-SMA、collagen I、IκB 激酶 α (IκBα)、IκB 激酶 β (IκBβ)、磷酸化 IκBα (p-IκBα)、磷酸化 IκBβ (p-IκBβ)、NF-κBp65、磷酸化 NF-κBp65 (p-NF-κB p65)、磷酸化生长因子 β 激活激酶 1 (p-TAK1)、Toll 样受体 4 (TLR4) 均购自北京博奥森生物技术有限公司。CLx800 酶标仪 (美国 Biotek), CT15RE 高速离心机 (日本 Hitachi), DYY-6C 型电泳槽、DYY-6C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司), 7500 Fast 型荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific), SM2010R 型切片机 (德国 Leica) 等。

实验动物和细胞系 选用清洁级雄性 Wistar 大鼠 100 只, 体重 200 g, 购自内蒙古医科大学实验动物研究中心, 许可证号 SCXK (蒙) 2015-0001, 室温 20~23 °C, 湿度 50%~52%, 动物实验经内蒙古医科大学医学伦理委员会批准 (伦理审查编号 YKD2015153)。

体外实验选用大鼠肝星状细胞系 (HSC-T6), 购自北京北纳科技有限公司。

体内实验

1 动物分组、制模与处理 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为空白组, 四氯化碳 (CCl₄) 模型组, QGS-7 低、中、高剂量 (135、270、405 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) 组, 用药剂量参考人和动物间接体表面积折算的等效剂量换算^[13]。CCl₄ 模型组和 QGS-7 组灌胃给予 50% CCl₄ 花生油溶液 (2 mL · kg⁻¹) 造肝纤维化模型^[14], 每周 2 次; 空白组给予 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 灌胃。造模的同时, QGS-7 低、中、高剂量组分别灌胃给予 QGS-7 135、270、405 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 空白组和模型组给予 0.5% CMC-Na 灌胃, 持续 8 周。最后一次灌胃 12 h 前禁食不禁水, 灌胃后 1~2 h 内用 10% 水合氯醛溶液 (3 mL · kg⁻¹) 麻醉, 腹主动脉采血, 静置 20 min, 1 006.2 × g 离心 15 min, 得到血清。摘取肝脏, 一部分放入 4% 多聚甲醛溶液固定, 用于石蜡包埋和病理学检测; 其余分装在冻存管, 置入 -80 °C 冰箱长期保存, 用于后续 qPCR 和 Western blot 实验。

2 组织病理学观察 取组织切片, 在 70 °C 下烤片 50~60 min, 用二甲苯 I 和二甲苯 II 进行脱蜡; 用无水乙醇、90% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇依次处理 5 min, ddH₂O 冲洗; 染核 2~3 min, PBS 冲洗 1 min; 分化 20 s, PBS 冲洗 10 min, 进行 HE 染色和 Masson 三色染色, 显微镜下拍照, 采用 Image J 计算胶原含量。

3 q-PCR 法检测 α -SMA、collagen I、NF- κ Bp65 mRNA 表达水平 取肝脏组织 100 mg, 常规加入 Trizol 裂解液 1 mL 裂解充分后, 加氯仿 200 μ L, 剧烈震荡 30 s, 在 4 °C 离心机中 12 000 × g 离心 10 min, 取上层水相加入异丙醇 500 μ L, 震荡后静置 10 min 4 °C 离心, 清洗底部 RNA 沉淀, 加入 DEPC 水溶解, 得到总 RNA。然后根据反转录及荧光定量试剂盒说明书相关方法, 将总 RNA 反转录为 cDNA, 随后以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。引物由上海生工生物科技有限公司合成, NF- κ Bp65: (F) CCCTGAGAAAGAAACACAAGGT, (R) ATGAAGGTGGATGATGGCTAAG; collagen I: (F) TGTTGGTCTGCTGGCAAGAATG, (R) GTCACCTTGTTCCGCTGTCTCAC; α -SMA: (F) CATCCACGAAACCACCTA, (R) GGGCAGGAATGATTTGGA。

4 Western blot 法检测 α -SMA、collagen I 和 NF- κ B 通路相关因子蛋白表达水平 各组肝脏组织 20 mg 剪碎, 加入 RIPA 和 PMSF 混合液 200 μ L, 4 °C 14 000 × g 离心 5 min, 取上清加入相同体积的 5 × 蛋白上样缓冲液煮沸至变性, 通过电泳转膜后孵育 α -SMA、collagen I、TLR4、p-TAK1、IKK α 、p-IKK α 、IKK β 、p-IKK β 、NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65 等一抗过夜, 次日孵育二抗后显影。

体外实验

1 含药血清制备 将 40 只 Wistar 大鼠分为空白组和 QGS-7 组, 空白组灌胃给予 0.5% CMC-Na, QGS-7 组灌胃给予 1 350 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 7 d 后麻醉腹主动脉取血。取血时使用负压血样采集器, 静置 10~20 min, 离心, 将上清液 56 °C 灭活, 0.22 μ m 滤膜过滤, -80 °C 保存。

2 细胞分组和给药 取 3~4 代 HSC-T6 细胞进行复苏, 待细胞生长状态良好时, 收集对数生长期细胞, 按每孔 1 × 10⁵ 个细胞接种于 6 板孔中, 随机分为空白组, 脂多糖 (LPS) 模型组, QGS-7 含药血清低、中、高浓度 (10%、15%、20% 含药血清) 组。除空白组外, 贴壁后均加入 100 ng · mL⁻¹ 的 LPS 诱导 24 h, 再加入上述相应浓度的含药血清孵育细胞 12 h。

3 细胞凋亡 采用流式细胞术检测 HSC-T6 细胞的凋亡率。消化细胞后在 4 °C 离心机中离心 5 min, 条件为 1 598.4 × g, 分别加入 AnnexinV-FITC 5 μ L 和 PI 染色液 10 μ L, 加入 AnnexinV-FITC 结合液 195 μ L, 在暗处孵育每隔 5 min 轻轻震荡, 20 min 后进行流式检测。

4 Western blot 法和 q-PCR 法检测 α -SMA、collagen I、NF- κ Bp65 相关通路蛋白及 mRNA 表达水平 取 HSC-T6 细胞 (3.75 × 10⁸), 具体操作步骤同体内实验。

统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件及 Graphpad prism 软件, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间比较采用单因素方差分析及 *t* 检验。P < 0.05 为有显著差异。

结 果

体内实验

1 肝组织病理学观察 空白组大鼠肝细胞处于正常状态, 细胞排列整齐。CCl₄ 模型组肝组织成纤维细胞增多、坏死增加, 出现大量炎性细胞, 排列混乱; 与模型组对比, QGS-7 低、中、高剂量组肝组织中细胞坏死减少, 细胞排列有所恢复, 炎症浸润减少, 见图 1。Masson 染色显示, 与空白组相比, CCl₄ 模型组肝组织出现结缔组织病变、肝细胞索支架塌陷, 胶原含量

显著增加 ($P < 0.01$); 与 CCl_4 模型组相比, QGS-7 低、中、高剂量组肝组织胶原沉积变少 ($P < 0.05$), 成纤维细胞减少, 肝组织趋于正常, 见图 2、图 3。

2 肝组织中 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、*NF- κB p65* mRNA 表达 与空白组比较, CCl_4 模型组肝组织中 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、*NF- κB p65* mRNA 表达量显著增高 ($P < 0.01$)。与 CCl_4 模型组比较, QGS-7 低剂量组 *collagen I* mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.05$), QGS-7 中剂量组 $\alpha\text{-SMA}$ 、*NF- κB p65* mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$), 高剂量组 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、*NF- κB p65* mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$), 见图 4。

3 肝组织中 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、TLR4、p-TAK1、IKK α 、p-IKK α 、IKK β 、p-IKK β 、NF- κB p65、p-NF- κB p65 蛋白表达 与空白组相比, CCl_4 模型组肝组织中 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、TLR4、p-TAK1、p-IKK α /IKK α 、p-IKK β /IKK β 、p-NF- κB p65/NF- κB p65 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比, QGS-7 中、高剂量组 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、TLR4、p-TAK1、p-IKK α /IKK α 、p-IKK β /IKK β 、p-NF- κB p65/NF- κB p65 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 5。

体外实验

1 HSC-T6 细胞凋亡率 空白组的凋亡率为 (6.8 ± 1.3)%, LPS 模型组凋亡率为 (5.5 ± 1.5)%。与 LPS 模型组相比, QGS-7 含药血清低、中、高浓度组凋亡率显著增加, 分别为 (9.6 ± 1.6)%、(20.7 ± 1.9)% 和 (23.4 ± 2.7)%, 见图 6。

2 HSC-T6 细胞中 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、*NF- κB p65* mRNA 表达 与空白组比较, LPS 模型组 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、

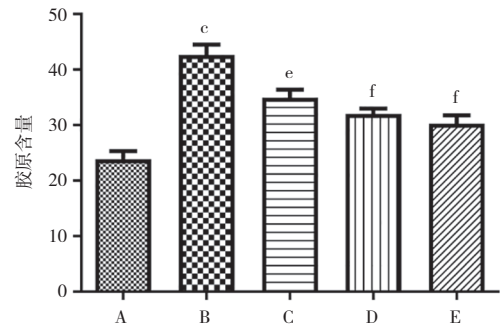


图 3 各组大鼠肝组织中胶原含量 ($n=3, \bar{x} \pm s$) A: 空白组, B: 四氯化碳 (CCl_4) 模型组, C: 七味清肝散 (QGS-7) 低剂量组, D: QGS-7 中剂量组, E: QGS-7 高剂量组。经单因素方差分析: 与空白组比较, $^{\#}P < 0.01$; 与 CCl_4 模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#}P < 0.01$

NF- κB p65 mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, QGS-7 含药血清高浓度组 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、*NF- κB p65* mRNA 表达量显著下降 ($P < 0.05$), QGS-7 含药血清低浓度组 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I* 显著下降 ($P < 0.05$), QGS-7 含药血清中浓度组 *NF- κB p65* mRNA 表达量显著下降 ($P < 0.05$), 见图 7。

3 HSC-T6 细胞中 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、TLR4、p-TAK1、IKK α 、p-IKK α 、IKK β 、p-IKK β 、NF- κB p65、p-NF- κB p65 蛋白表达 与空白组比较, LPS 模型组 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、TLR4、p-TAK1、p-IKK α /IKK α 、p-IKK β /IKK β 、p-NF- κB p65/NF- κB p65 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与 LPS 模型组相比, QGS-7 含药血清中、高浓度组的 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、TLR4、p-TAK1、p-IKK α /IKK α 、p-IKK β /IKK β 、p-NF- κB p65/NF- κB p65 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$); QGS-7 含药血清低浓度组 $\alpha\text{-SMA}$ 、*collagen I*、p-IKK β /IKK β 、p-NF- κB p65/NF- κB p65 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$), 见图 8。

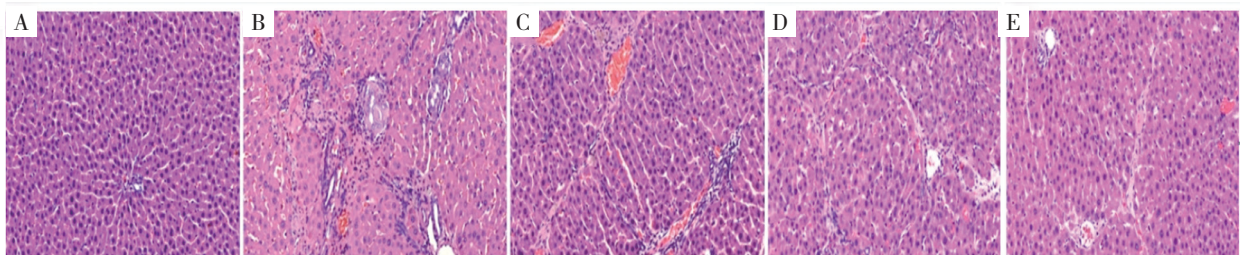


图 1 肝组织 HE 染色 ($\times 200, n=3$) A: 空白组, B: 四氯化碳 (CCl_4) 模型组, C: 七味清肝散 (QGS-7) 低剂量组, D: QGS-7 中剂量组, E: QGS-7 高剂量组

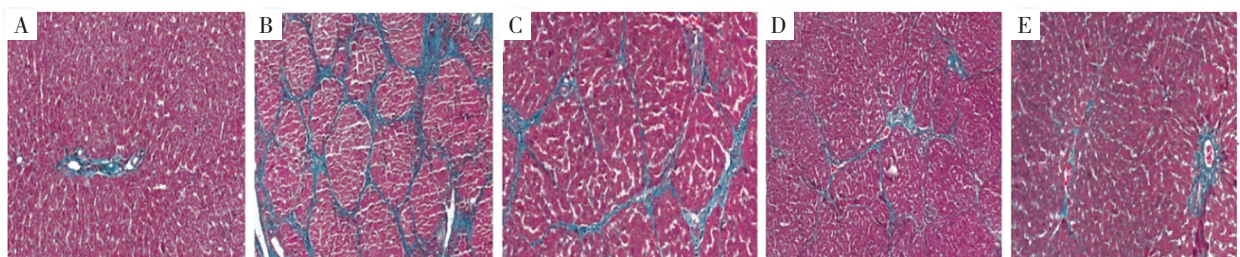


图 2 肝组织 Masson 染色 ($\times 200, n=3$) A: 空白组, B: 四氯化碳 (CCl_4) 模型组, C: 七味清肝散 (QGS-7) 低剂量组, D: QGS-7 中剂量组, E: QGS-7 高剂量组

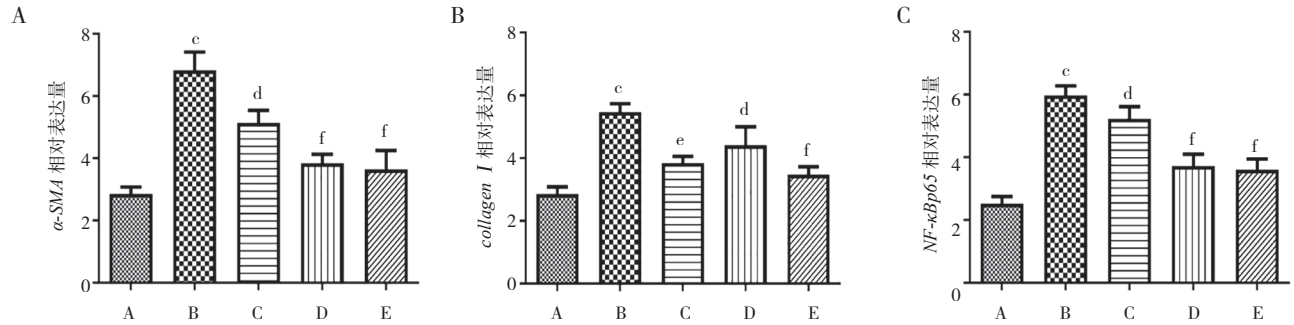


图 4 各组肝组织中 α -SMA (A)、collagen I (B)、NF- κ Bp65 (C) mRNA 表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$) A: 空白组, B: 四氯化碳 (CCl₄) 模型组, C: 七味清肝散 (QGS-7) 低剂量组, D: QGS-7 中剂量组, E: QGS-7 高剂量组。经单因素方差方法: 与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与 CCl₄ 模型组比较, ^d $P > 0.05$, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$

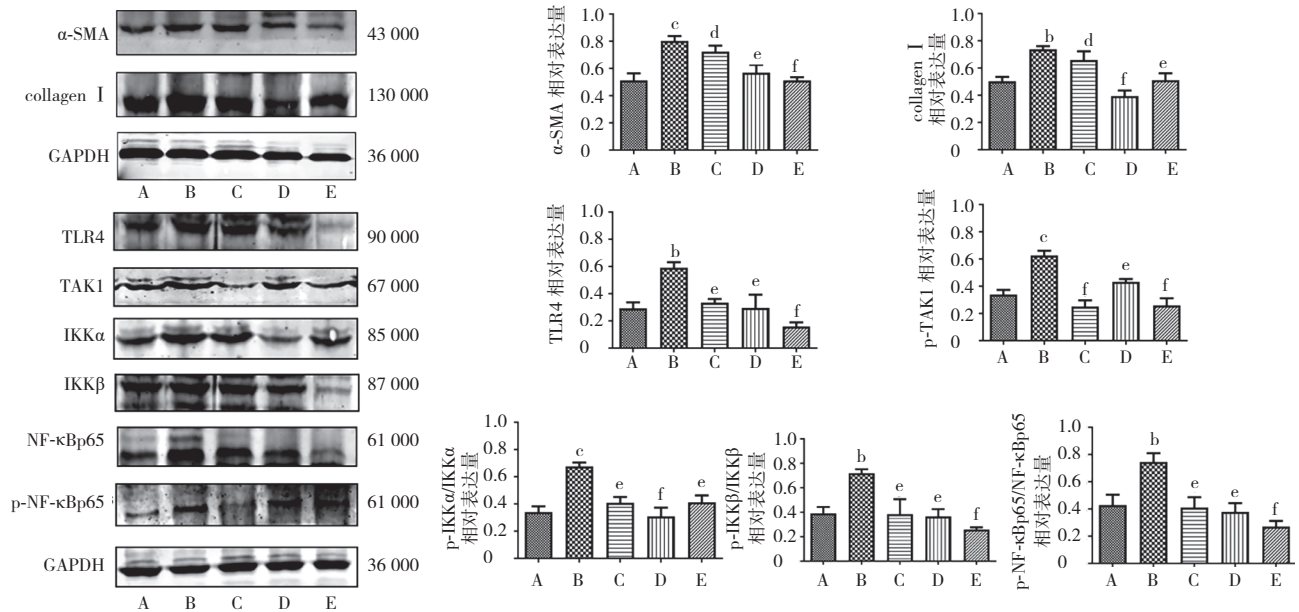


图 5 各组肝组织 α -SMA、collagen I、TLR4、p-TAK1、IKK α 、p-IKK α 、IKK β 、p-IKK β 、NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65 蛋白表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$) A: 空白组, B: 四氯化碳 (CCl₄) 模型组, C: 七味清肝散 (QGS-7) 低剂量组, D: QGS-7 中剂量组, E: QGS-7 高剂量组。经单因素方差方法: 与空白组比较, ^b $P < 0.05$, ^a $P < 0.01$; 与 CCl₄ 模型组比较, ^d $P > 0.05$, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$

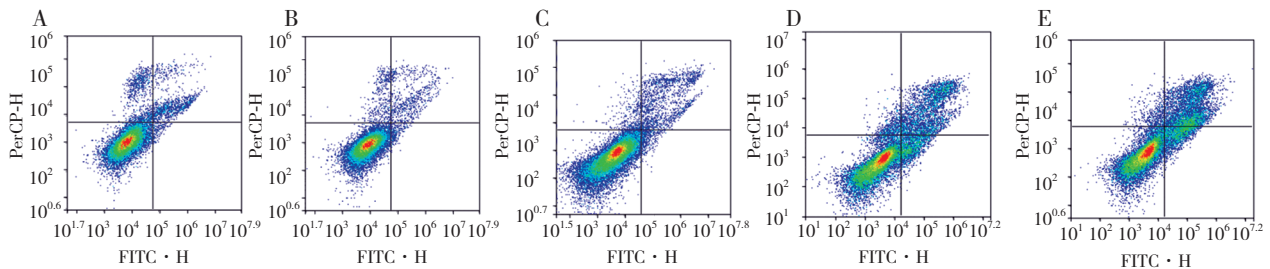


图 6 各组 HSC-T6 细胞凋亡情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$) A: 空白组, B: 脂多糖 (LPS) 模型组, C: 七味清肝散 (QGS-7) 含药血清低浓度组, D: QGS-7 含药血清中浓度组, E: QGS-7 含药血清高浓度组

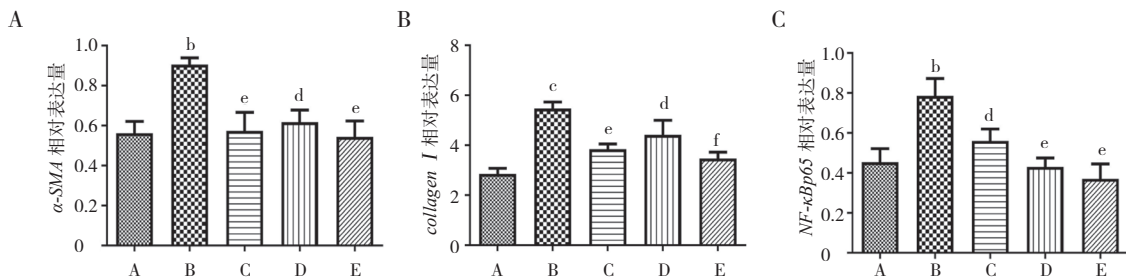


图 7 各组 HSC-T6 细胞中 α -SMA、collagen I、NF- κ Bp65 mRNA 表达量 ($n=3, \bar{x} \pm s$) A: 空白组, B: 脂多糖 (LPS) 模型组, C: QGS-7 含药血清低浓度组, D: QGS-7 含药血清中浓度组, E: QGS-7 含药血清高浓度组。经单因素方差方法: 与空白组比较, ^b $P < 0.05$, ^a $P < 0.01$; 与 CCl₄ 模型组比较, ^d $P > 0.05$, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$

讨 论

肝纤维化目前已经成为公共卫生负担之一, 全球成年人发病率为 0.3%~0.6%, 肝纤维化的预防和治疗成为当代研究的热点^[15]。肝纤维化多由慢性肝损伤引起的, 包括与病毒有关的慢性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、自身免疫性和遗传性肝脏疾病等^[16,17]。慢性肝损伤后会导致大量胶原纤维沉积, 最终表现为 ECM 成分沉积与降解的失衡^[18]。在健康肝脏中, ECM 多由 IV 型和 VI 型胶原蛋白形成。而受伤肝脏中, HSC 是产生 ECM 的主要细胞, HSC 被激活成 MFB, 高表达 α -SMA 并迁移到组织修复部位, 分泌 collagen I 和 collagen III^[19,20]。因此, 抑制 HSC 的活化、减少胶原蛋白沉积是增加 ECM 降解和改善肝纤维化的主要措施。

本研究主要从 NF- κ B 信号通路来研究 QGS-7 抗肝纤维化的可能机制, 采用了 CCl₄ 诱导肝纤维化体内模型和 LPS 诱导 HSC-T6 细胞体外模型, HE 和 Masson 染色结果显示 CCl₄ 诱导后肝脏组织结构被破坏, 甚至出现假小叶, 炎性细胞、成纤维细胞增多, 大量蓝色胶原纤维存在, 大量堆积将正常结构环绕和相互分割开, 提示纤维化的严重程度; 而 QGS-7 各剂量组大鼠肝组织有不同程度的改善, 炎性细胞减少, 胶原纤维覆盖面积缩小, 说明 QGS-7 能明显改

善肝脏病理变化, 减少 ECM 形成, 具有抗肝纤维化作用。促进 HSC 凋亡也是防止肝纤维化的有效策略, 因为凋亡是细胞死亡的主要形式。细胞凋亡参与多种疾病过程如自身免疫疾病和神经退行性疾病等, 其中 NF- κ B 信号通路在调节炎症和 HSC 的凋亡中具有重要作用^[21]。q-PCR 和 Western blot 检测发现, QGS-7 能显著降低纤维化标志物 α -SMA 和 collagen I 的蛋白和 mRNA 表达水平, 提示其具有良好的抗肝纤维化作用。

有文献报道, NF- κ B 信号通路是调节氧化应激、炎症和纤维化的关键信号通路^[21,22]。在经典 NF- κ B 通路中, 当受到 TNF- α 、IL-6、细菌 LPS 等多种外界信号刺激时, NF- κ B 通路被激活, 活化的 NF- κ B 转移至细胞核内, 影响相关靶基因的转录, 调节细胞功能, 故抑制该通路活化能减轻肝脏炎症、抑制纤维增生^[23,24]。本研究结果发现, 与空白组比较, 模型组肝组织或 HSC 细胞中 NF- κ Bp65 mRNA 表达量升高, 而 QGS-7 组 NF- κ Bp65 mRNA 表达量显著低于模型组, 这些结果进一步揭示了 QGS-7 在肝纤维化大鼠模型中起保护作用。TAK1 是细胞炎症通路的重要因子, 在 TLR 信号通路中与 TAB1 相关的 TAK1 被激活, 活化的 TAK1 可以磷酸化下游的 IKK α 和 IKK β , 导致 I κ B α 磷酸化和泛素化, 从而促进 NF- κ Bp65 进入细胞核导致 NF- κ B 信号通路被激活^[25,26]。本研究发现,

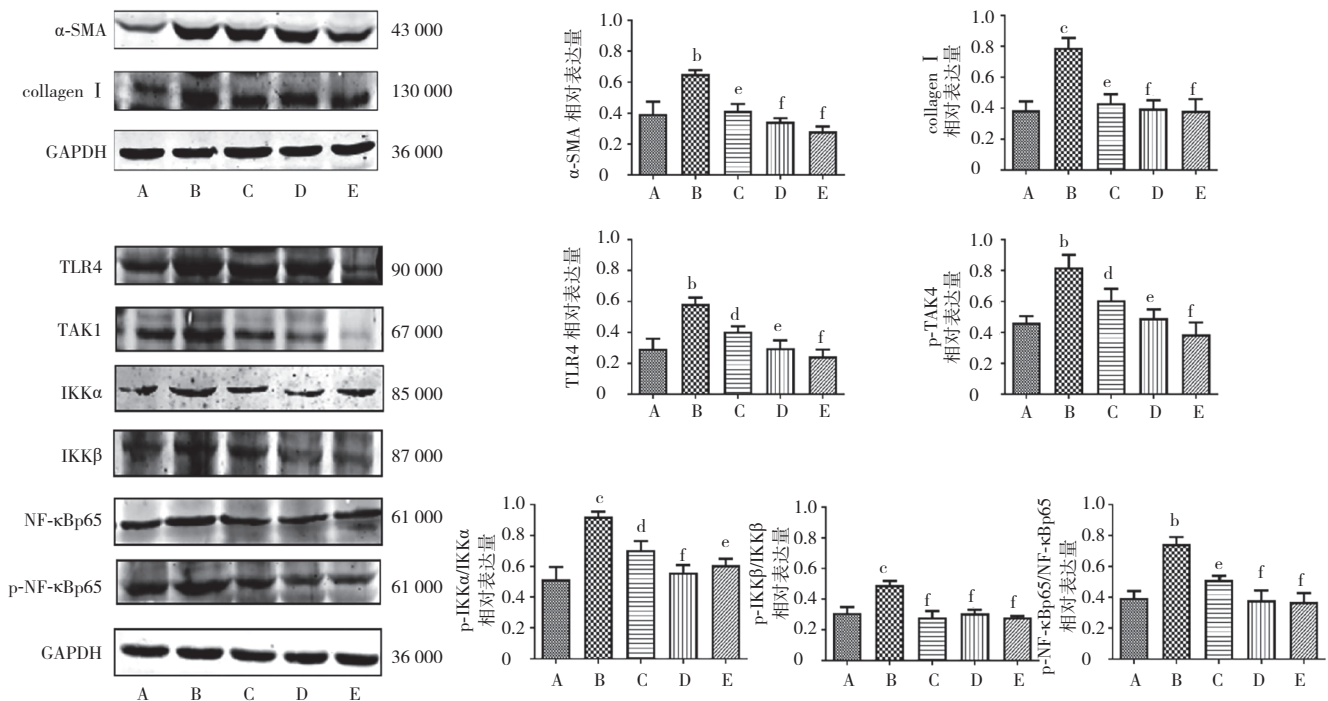


图 8 各组 HSC-T6 细胞中 α -SMA、collagen I、TLR4、p-TAK1、IKK α 、p-IKK α 、IKK β 、p-IKK β 、NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65 蛋白表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$) A: 空白组, B: 脂多糖 (LPS) 模型组, C: 七味清肝散 (QGS-7) 含药血清低浓度组, D: QGS-7 含药血清中浓度组, E: QGS-7 含药血清高浓度组。经单因素方差方法: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 LPS 模型组比较, # $P > 0.05$, # $P < 0.05$, # $P < 0.01$

模型组肝组织或 HSC 细胞中 TLR4、p-TAK1、p-IKK α /IKK α 、p-IKK β /IKK β 、p-NF- κ Bp65/NF- κ Bp65 蛋白表达量显著低于空白组, QGS-7 组 α -SMA、collagen I、TLR4、p-TAK1、p-IKK α /IKK α 、p-IKK β /IKK β 、p-NF- κ Bp65/NF- κ Bp65 蛋白表达量同模型组比较均显著下降, 说明 QGS-7 可以下调 NF- κ B 信号通路上的关键因子, 进而抑制肝纤维化进程。

综上所述, QGS-7 具有良好的抗肝纤维化作用, 作用机制可能与下调 NF- κ B 信号通路的关键靶点有关。

[参考文献]

- [1] YANG Y, LIU X, CHEN H, *et al.* HPS protects the liver against steatosis, cell death, inflammation and fibrosis in mice with steatohepatitis [J]. *FEBS J*, 2022, 289 (17) : 5279–5307.
- [2] GANGIREDDY VGR, PILKERTON C, XIANG J, *et al.* Hepatic fibrosis and steatosis in metabolic syndrome [J]. *J Obes Metab Syndr*, 2022, 31 (1) : 61–69.
- [3] TASNIM S, HAZAM R, DAVE D, *et al.* Reversible decerebrate posture in hepatic encephalopathy: case report and literature review [J]. *Cureus*, 2022, 14 (2) : e21960.
- [4] 图雅, 席琳图雅. 蒙成药额力根—7 味散显微鉴别 [J]. *时珍国医国药*, 1999, 10 (6) : 444.
- [5] 颜羽昕, 张春艳, 高晓阳, 等. 蒙药额力根-7 对肝纤维化的改善作用及机制研究 [J]. *中国药房*, 2021, 32 (23) : 2832–2838. YAN YX, ZHANG CY, GAO XY, *et al.* The improvement effect and mechanism of Mongolian medicine Eriligen-7 on liver fibrosis [J]. *China Pharm*, 2021, 32 (23) : 2832–2838.
- [6] 马月宏, 段申, 金蓉, 等. 蒙药额力根-7 抗大鼠肝纤维化作用研究 [J]. *内蒙古大学学报: 自然科学版*, 2016, 47 (5) : 526–532. MA YH, DUAN S, JIN R, *et al.* Study on the anti-hepatic fibrosis effect of Mongolian medicine Erligen-7 [J]. *J Inner Mongolia Univ: Nat Sci Edit*, 2016, 47 (5) : 526–532.
- [7] POMA P. NF- κ B and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (23) : 9181.
- [8] WANG S, LU M, WANG W, *et al.* Macrophage polarization modulated by NF- κ B in polylactide membranes-treated peritendinous adhesion [J]. *Small*, 2022, 18 (13) : e2104112.
- [9] YU H, LIN L, ZHANG Z, *et al.* Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5 (1) : 209.
- [10] WANG Q, OU Y, HU G, *et al.* Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the NLRP3/NF- κ B pathway in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177 (8) : 1806–1821.
- [11] ZHOU Q, TIAN W, JIANG Z, *et al.* A positive feedback loop of AKR1C3-mediated activation of NF- κ B and STAT3 facilitates proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2021, 81 (5) : 1361–1374.
- [12] 张春艳, 颜羽昕, 高晓阳, 等. 蒙药七味清肝散抗肝纤维化的作用机制: 基于 uhplc-Tof-Ms 和网络药理学方法 [J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41 (8) : 1131–1141. ZHANG CY, YAN YX, GAO XY, *et al.* Anti-hepatic fibrosis mechanism of Mongolian medicine Qiwei Qinggan Powder: Based on uhplc-Tof-Ms and network pharmacology methods [J]. *J Southern Med Univ*, 2021, 41 (8) : 1131–1141.
- [13] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 第四版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [14] 戴鸿志, 安祯祥, 黄丹, 等. 黄芪甲苷对肝纤维化模型大鼠的改善作用机制研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39 (10) : 1268–1274. DAI HZ, AN ZX, HUANG D, *et al.* Study on mechanism of improvement effects of Astragaloside IV on hepatic fibrosis model rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39 (10) : 1268–1274.
- [15] SONG Z, LIU X, ZHANG W, *et al.* Ruxolitinib suppresses liver fibrosis progression and accelerates fibrosis reversal via selectively targeting Janus kinase 1/2 [J]. *J Transl Med*, 2022, 20 (1) : 157.
- [16] MOON AM, SINGAL AG, TAPPER EB. Contemporary epidemiology of chronic liver disease and cirrhosis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020, 18 (12) : 2650–2666.
- [17] XIA SW, WANG ZM, SUN SM, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and protein degradation in chronic liver disease [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161 : 105218.
- [18] FOGLIA B, NOVO E, PROTOPAPA F, *et al.* Hypoxia-inducible factors and liver fibrosis [J]. *Cells*, 2021, 10 (7) : 1764.
- [19] NULALI J, ZHAN M, ZHANG K, *et al.* Osteoglycin: an ECM factor regulating fibrosis and tumorigenesis [J]. *Biomolecules*, 2022, 12 (11) : 1674.
- [20] CAI X, WANG J, WANG J, *et al.* Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: new insights into therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155 : 104720.
- [21] WILLIAMS LM, GILMORE TD. Looking down on NF- κ B [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40 (15) : e00104–20.
- [22] LI R, GUO Y, ZHANG Y, *et al.* Salidroside ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the TLR4/NF- κ B and MAPK Signaling Pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (5) : 1103.
- [23] LI Q, TAN Y, CHEN S, *et al.* Irisin alleviates LPS-induced liver injury and inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome and NF- κ B signaling [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41 (3) : 294–303.
- [24] HUANG YQ, TANG YX, QIU BH, *et al.* Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) induced lipid metabolism disorder in liver via activating the LXR/SREBP-1c/PPAR α / γ and NF- κ B signaling pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 165:113119.
- [25] LI M, ZHANG M, ZHANG ZL, *et al.* Induction of apoptosis by berberine in hepatocellular carcinoma HepG2 cells via downregulation of NF- κ B [J]. *Oncol Res*, 2017, 25 (2) : 233–239.

[26] LI Z, WANG J, ZENG Q, *et al.* Long noncoding RNA HOTTIP promotes mouse hepatic stellate cell activation via downregulating

miR-148a [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51 (6): 2814-2828.

[文章编号] 1007-7669(2024)04-0303-08

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.04.12

基于网络药理学探讨天然化合物色胺酮的抗肿瘤药理机制

杨应勇¹, 杨 勇¹, 梁 妍², 宋 辉³, 张晓燕³, 陈岩勤², 周 威²

(1. 贵州神奇药业有限公司 贵州神奇药物研究院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵安新区 561113; 3. 贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵安新区 561113)

[关键词] 色胺酮; 抗肿瘤药, 植物; 网络药理学; 药理作用分子作用机制 (中药)

[摘要] 目的 采用网络药理学方法观察天然化合物色胺酮的抗肿瘤药理机制。方法 通过 ADMETlab 2.0 数据库对色胺酮分子的类药性进行评估, 运用 PharmMapper、Swiss TargetPrediction 数据库预测色胺酮的作用靶点, 借助 OMIM 数据库、DisGeNET 数据库收集肿瘤疾病靶点, 筛选出色胺酮抗肿瘤作用潜在蛋白靶点。利用 STRING 数据库、Cytoscape 3.7 软件依次构建蛋白靶点之间的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络、“化合物-靶点-通路-疾病”网络; 基于 DAVID 数据库进行 GO 功能富集分析、KEGG 通路富集分析。采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接, 分析色胺酮与筛选出的核心靶点蛋白之间的相互作用。借助现有临床肿瘤数据库, 对核心靶点开展基因表达谱交互分析。结果 通过网络药理学研究共获得色胺酮抗肿瘤核心靶点 158 个, GO 功能富集分析的生物过程与炎症反应、蛋白质磷酸化、细胞内信号转导等关联, 细胞组成与胞浆、细胞质、高分子复合物等较为密切, 分子功能与 MAPK 酶活性、ATP 绑定、酶结合等相关。KEGG 通路富集分析表明癌症的途径、PI3K-AKT 信号通路等是色胺酮发挥抗肿瘤作用的主要途径, 涉及核心靶点 AKT1、PI3K、MAPK1、HSP90AA1、JAK2、NFKB1 等。色胺酮与 5 种核心靶点 AKT1、HSP90AA1、PI3K、JAK2、MAPK1 之间有较好的结合活性, 结合能均不超过 $-8.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。色胺酮抗肿瘤核心靶点的基因表达谱交互分析结果显示上述 5 种核心蛋白靶点均在人类肿瘤疾病发生发展中扮演重要作用。结论 色胺酮通过 PI3K-AKT 等信号通路发挥抗肿瘤作用。

[中图分类号] R979

[文献标志码] A

Antitumor pharmacological mechanism of natural compound tryptanthrin based on network pharmacology

YANG Ying-yong¹, YANG Yong¹, LIANG Yan², SONG Hui³, ZHANG Xiao-yan³, CHEN Yan-qin², ZHOU Wei²

(1. Guizhou Shenqi Institute of Pharmaceutical Research, Guizhou Shenqi Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang GUIZHOU 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Gui'an New District GUIZHOU 561113, China; 3. School

[收稿日期] 2022-07-10 [接受日期] 2023-11-14

[基金项目] 贵州省科技支撑计划项目 (黔科合支撑 [2021] 一般 415); 贵州省自然科学基金 (黔科合基础 [2020] 1Y404, 黔科合基础 [2020] 1Y380); 贵州省大学生创新创业训练计划项目 (201510660024); 贵州医科大学教学改革研究项目 (JG2021042)

[作者简介] 杨应勇, 男, 高级工程师, 硕士, 主要从事中药新药的研究, E-mail: yyy0608@126.com。陈岩勤, 女, 副教授, 硕士生导师, 博士, 主要从事感染与免疫的研究, E-mail: 1554728719@qq.com。周 威, 男, 教授, 博士生导师, 博士, 主要从事抗肿瘤药物开发与分析, E-mail: drwzhou@126.com

[责任作者] 陈岩勤, 周 威