

[文章编号] 1007-7669(2024)01-0062-08

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.01.12

## 桑椹抗肝纤维化作用的网络药理学分析和实验验证

乔靖怡<sup>a,b</sup>, 李汉伟<sup>b</sup>, 陈金香<sup>b</sup>, 王 灿<sup>c</sup>, 宋亚刚<sup>b</sup>, 狄培琰<sup>c</sup>, 朱平生<sup>d</sup>, 张思森<sup>a</sup>, 苗明三<sup>b</sup>

(河南中医药大学 a. 第五临床医学院 / 郑州人民医院, b. 中医药科学院, c. 药学院, d. 中医学院, 河南 郑州 450046)

[关键词] 桑椹; 炎症; 免疫; 肝纤维化; 网络药理学; 四氯化碳

[摘要] 目的 利用网络药理学方法研究桑椹抗肝纤维化的主要活性成分、靶点和通路, 分析其抗肝纤维化作用机制, 并通过动物实验验证。方法 从中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 中获取桑椹的主要活性成分及相对应的作用靶点; 在 OMIM 数据库和 GeneCards 数据库中进行与炎症相关的疾病靶点预测, 得到炎症相关基因靶点; 使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建桑椹与炎症相关疾病的成分-靶点-通路网络图; 使用 String 数据库及 Cytoscape 3.7.2 软件构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络, 并进行基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。将 50 只昆明种小鼠随机分为正常组, 模型组和桑椹总黄酮低、中、高剂量 (75、150、300 mg·kg<sup>-1</sup>) 组。采用四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型, 给予桑椹总黄酮干预, 检测小鼠血清生化指标和炎症指标, 观察肝组织病理学变化, 免疫组化法检测肝组织中基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 的蛋白表达。结果 桑椹抗炎有关的主要活性成分有花青素、槲皮素、桑色素和 β-胡萝卜素, 抗炎的潜在靶点有 80 个, PPI 网络主要包括白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)、蛋白激酶 B (AKT) 1、白蛋白 (ALB)、血管内皮生长因子 (VEGFA)、MMP9 等核心靶点。涉及到的通路主要有流体剪切应力与动脉粥样硬化、癌症通路、脂质与动脉粥样硬化和 Janus 激酶 (JAK)-信号传导及转录激活蛋白 (STAT) 通路等。动物实验结果显示, 与正常组相比, 模型组小鼠血清中丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平及肝组织中炎症指标 IL-6、TNF-α 含量以及 MMP9 蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 桑椹总黄酮各剂量组血清中 ALT、AST 水平显著降低, 肝组织中 IL-6 和 TNF-α 含量及 MMP9 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 肝损伤的病变程度减轻。结论 桑椹通过花青素、槲皮素等活性成分作用于 IL-6、TNF-α、MMP9 等靶点发挥抗肝纤维化作用, 主要与磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) / AKT、JAK-STAT 等信号通路有关, 其保肝机制可能与减轻炎症反应、下调 MMP9 蛋白表达有关。

[中图分类号] R975.5

[文献标志码] A

## Network pharmacological analysis and experimental verification for anti-liver fibrosis effects of *Mori fructus*

QIAO Jing-yi<sup>a,b</sup>, LI Han-wei<sup>b</sup>, CHEN Jin-xiang<sup>b</sup>, WANG Can<sup>c</sup>, SONG Ya-gang<sup>b</sup>, DI Pei-yan<sup>c</sup>, ZHU Ping-sheng<sup>d</sup>, ZHANG Si-sen<sup>a</sup>, MIAO Ming-san<sup>b</sup>

(a. The Fifth Clinical Medical College/Zhenzhou People's Hospital, b. Academy of Chinese Medical Sciences, c. Department of

[收稿日期] 2022-01-06 [接受日期] 2023-04-06

[基金项目] 国家国际合作基地 [国科外函 (2016) 65 号]; 河南省博士后科研资助项目 (284330); 河南省高校重点科研项目 (21A360022, 22B360008)

[作者简介] 乔靖怡, 女, 高级实验师, 博士, 主要从事中药药理及毒理学研究, E-mail: qiaojingyi618@126.com。张思森, 男, 主任医师, 博士生导师, 博士, 主要从事急诊危重症医学的研究, E-mail: 2362176700@qq.com

[责任作者] 张思森

Medicine, d. College of Traditional Chinese Medicine, He-nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou HE-NAN 450046, China)

[KEY WORDS] *Mori fructus*; inflammatory; immunity; liver fibrosis; network pharmacology; carbon tetrachloride

[ABSTRACT] AIM To explore the main active components, targets and pathways of anti-liver fibrosis of *Mori fructus* by network pharmacology and animal experiment, and to explore its potential mechanism of *Mori fructus* against liver fibrosis. METHODS The main active components and corresponding targets of *Mori fructus* were obtained from the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and the target information was converted into target gene by Uniprot database. The targets of inflammatory disease were predicted in OMIM database and GeneCards database, and the targets of inflammatory genes were obtained. The network diagram of component-target-pathway was constructed using Cytoscape 3.7.2 software. Protein protein interaction (PPI) network was constructed using the String database and Cytoscape 3.7.2 software, and Gene Ontology (GO) biological process analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. Fifty Kunming mice were randomly divided into six groups, including normal group, model group and low, medium and high dose of total flavonoids from *Mori fructus* (75, 150, 300 mg · kg<sup>-1</sup>) groups. The liver fibrosis model of mice was induced by carbon tetrachloride, and the serum biochemical indexes and predicted inflammatory indexes were detected. The histopathological changes of liver were observed, and the expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) protein in liver tissue was detected by immunohistochemical method. RESULTS The main anti-inflammation components of *Mori fructus* include cyanin, quercetin, morin and β-carotene. There were 80 potential anti-inflammatory targets, and the PPI network mainly includes interleukin (IL) -6, tumor necrosis factor (TNF), protein kinase B (AKT) 1, albumin (ALB), vascular endothelial growth factor (VEGFA) and MMP9 and other core targets. The pathways involved mainly include fluid shear stress and atherosclerosis, pathways in cancer, lipid and atherosclerosis, Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT), etc. Animal experimental results showed that compared with the normal group, the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum, the contents of IL-6 and TNF-α in liver tissue as well as the expression of MMP9 protein in the model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the levels of ALT and AST in serum, the contents of IL-6 and TNF-α and the protein expression of MMP9 protein in liver tissue were decreased ( $P < 0.05$ ) and the degree of liver injury was alleviated in different doses of total flavonoids from *Mori fructus*. CONCLUSION *Mori fructus* has anti-liver fibrosis effects on IL-6, TNF-α, MMP9 and other targets through active components such as anthocyanin and quercetin, which are mainly related to phosphoinositide 3 kinase (PI3K) /AKT, JAK-STAT, and other signaling pathways. Its mechanism of liver protection may be related to the reduction of inflammatory reaction and the down-regulation of the protein expression of MMP9.

炎症是机体对外界刺激的防御反应, 是一种常见的病理反应。研究表明, 炎症的发生发展可引起临床上大部分疾病, 如肝病、肺炎、炎症性肠病、糖尿病、心脑血管疾病、癌症及抑郁症等<sup>[1-5]</sup>。肝纤维化是多种原因引起的肝脏损伤和炎症后组织修复过程中的代偿反应, 是细胞外基质 (ECM) 过度异常沉积引起的肝脏疾病<sup>[6, 7]</sup>。肝纤维化是多种慢性肝病如肝炎发展至肝硬化甚至肝癌的主要病因。研究发现, 早期的肝纤维化是可以逆转的<sup>[8]</sup>, 因此研究预防和治疗肝纤维化的药物已成为医学界关注的重要课题。中药具有多成分、多靶点和多途径的特征, 在防治肝损伤方面有其独特的优势, 桑椹 (*Mori fructus*) 含有多种活性成

分, 如白藜芦醇、黄酮类、多糖类及生物碱等, 其中黄酮类化合物是其主要的有效成分。本研究利用中药网络药理学的方法, 筛选桑椹抗炎的活性成分和潜在作用靶点及其信号通路, 并以肝纤维化小鼠模型为研究对象, 探讨桑椹总黄酮对小鼠肝纤维化的保护作用及机制, 为其临床应用提供参考依据。

#### 材料与方法

**桑椹活性成分的获取及靶点筛选** 应用中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 查找桑椹中的化学成分。以口服生物利用度 (OB) 和类药性 (DL) 评价化合物的活性, 将  $OB \geq$

30% 和  $DL \geq 0.18$  作为筛选标准, 获得桑椹的活性成分。在 TCMSp 数据库中检索桑椹活性成分所对应的靶蛋白, 再将得到的靶蛋白导入到 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中, 找到每个靶蛋白所对应的靶基因。查找时限定物种为“人”(homo sapiens) 和“已验证”(reviewed)。将得到的靶基因合并后得到桑椹活性成分的靶基因。

**炎症疾病靶点筛选** 分别在 OMIM (<https://www.omim.org>) 和 GeneCards (<https://www.genecards.org>) 数据库中以“inflammation”为关键词进行检索, 得到炎症疾病相关靶点。将桑椹的活性成分所对应的作用靶点和炎症所对应的疾病靶点制作韦恩图取交集, 获得桑椹抗炎的潜在作用靶点。

**桑椹活性成分 - 抗炎靶点网络构建** 将得到的桑椹活性成分和炎症相关靶基因导入 Cytoscape 3.7.2 软件 (<http://www.cytoscape.org/>), 构建桑椹活性成分 - 抗炎靶点网络图。

**蛋白 - 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建** 将获得的桑椹抗炎潜在作用靶点导入 String 数据库 (<https://string-db.org>) 得到靶点之间的相互作用信息, 下载结果为 tsv 格式后, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件绘制潜在靶点的 PPI 关系。利用 excel 表格计算靶点的度 (degree) 值, 将靶点按度值从大到小排列取前十个基因作为核心基因, 重复上述操作利用 String 数据库和 Cytoscape 3.7.2 软件构建核心靶点 PPI 网络。String 数据库的限定条件选择“multiple proteins”和“homo sapiens”。

**桑椹抗炎靶点功能和通路富集分析** 把桑椹抗炎的作用靶点导入 Metascape 数据库, 选择物种为“homo sapiens”和“custom analysis”进行基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。条件均为  $P < 0.01$ , 最小计数为 3, 富集因子  $> 1.5$ 。GO 功能富集分析包括生物学过程 (BP)、细胞组成 (CC) 和分子功能 (MF) 3 个部分。

**靶点 - 通路网络构建** 将中药桑椹的活性成分和炎症对应的靶点、通路和靶点的相互关系信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 得到桑椹靶点 - 通路网络图。

#### 抗肝纤维化动物实验验证

1 实验动物 SPF 级雄性昆明种小鼠 50 只, 体重 18~22 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 生产许可证号为 SCXK (鲁) 20190003, 实验动物使用许可证号为 SYXK (豫) 2020-0004。饲养于温度 ( $22 \pm 2$ ) °C, 明暗周期 12 h/12 h 环境中, 自由饮水和摄食。

2 药物、试剂与仪器 取干燥桑椹粗粉乙醇回流提

取后洗脱, 收集洗脱液, 真空干燥得桑椹总黄酮含量以芦丁计 ( $> 50.0\%$ )。药液的配置: 称取一定量桑椹总黄酮粉末, 加蒸馏水配制成浓度为  $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  药液备用。四氯化碳 ( $\text{CCl}_4$ , BW021001) 购于天津市恒兴化学试剂有限公司; 橄榄油购于天津市富宇精细化工有限公司; 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 试剂盒, 均购于南京建成生物工程研究所; 白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  酶联免疫分析试剂盒购自苏州卡尔文生物科技有限公司。数字病理切片扫描系统 KF-PRO-005 (宁波江丰生物信息技术有限公司), Cytation3 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司)。

3 分组、造模及给药 将小鼠随机分为正常组, 模型组, 桑椹总黄酮低、中、高剂量 ( $75$ 、 $150$ 、 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组, 每组 10 只。除正常组外, 其余组小鼠均采用腹腔注射  $\text{CCl}_4$  法制肝纤维化模型。第 1 周造模采用  $40\% \text{ CCl}_4$  橄榄油腹腔注射  $2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 第 2 周采用  $20\% \text{ CCl}_4$  橄榄油腹腔注射  $2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 第 3 周采用  $20\% \text{ CCl}_4$  橄榄油腹腔注射  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 均每周 2 次。在造模的同时对应灌胃给予各组药物, 每日 1 次, 连续给药 3 周。

4 标本采集及指标检测 造模 12 h 后处理动物, 称量小鼠体重, 摘眼球取血,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$   $1\ 400 \times g$  离心 15 min 后取血清, 摘取肝脏。取肝右叶按质量体积比 1:9 加生理盐水制成 10% 的肝匀浆,  $1\ 400 \times g$  离心 10 min, 取上清液备用。微板法检测 ALT、AST 水平。ELISA 法检测肝组织 IL-6、TNF- $\alpha$  含量。取肝组织固定于 10% 甲醛溶液中, 常规石蜡包埋切片后, HE 和 Masson 染色观察和评价小鼠肝脏组织病变程度。免疫组织化学染色法检测基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 蛋白表达, 羊抗小鼠 MMP9 一抗  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜, 生物素标记二抗室温孵育 50 min, DAB 显色后复染细胞核, 脱水封片。显微镜下观察并拍片, 采用 Image-Pro 软件分析肝组织中 MMP9 蛋白阳性表达的平均吸光度。

5 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为有显著差异。

## 结 果

**桑椹活性成分的获取及靶点筛选** 通过 TCMSp 平台筛选得到符合条件的桑椹活性成分共 6 种, 同时查找每种成分对应的靶点共得到 165 个相关靶点, 在 Uniprot 数据库中转换靶点名称为基因名称, 删去其中 11 个无对应基因的靶点及 3 个重复靶点后, 得

到 151 个有对应基因的靶点和 4 种主要活性成分, 见表 1。

表 1 桑椹主要活性成分基本信息表

活性成分	编号	OB/%	DL
cyanin (花青素)	MOL006209	47.42	0.76
quercetin (槲皮素)	MOL000098	46.43	0.28
morin (桑色素)	MOL000737	46.23	0.27
beta-carotene (β-胡萝卜素)	MOL002773	37.18	0.58

**桑椹活性成分 - 炎症疾病靶点网络** 利用 OMIM 和 GenCards 数据库将筛选的桑椹活性成分靶点与炎症相关疾病靶点进行对照得到 1 189 个疾病靶点, 与桑椹活性成分对应的 151 个靶点取交集, 得到 80 个桑椹活性成分抗炎的潜在靶点, 绘制韦恩图, 见图 1。

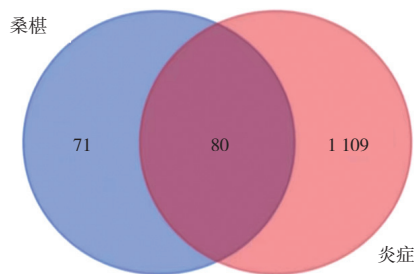


图 1 桑椹活性成分靶点 - 炎症疾病靶点韦恩图

**PPI 网络** 选取度值排名前 10 的靶点作为核心靶点并构建桑椹抗炎活性成分核心靶点 PPI 网络, 见图 2。构建结果发现, IL-6、TNF、蛋白激酶 B (AKT) 1、白蛋白 (ALB)、血管内皮生长因子 (VEGFA)、趋化因子 CXCL8、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、MMP9、CCL2、IL-1β 分别与 72、69、68、66、65、62、

62、62、62、60 个靶点存在相互作用关系, 是桑椹抗炎的核心靶点。

**GO 功能和 KEGG 通路富集分析** KEGG 通路富集分析共得到 223 个信号通路, 显著富集的通路主要有癌症通路、脂质与动脉粥样硬化通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化通路、前列腺癌通路、Janus 激酶 (JAK) - 信号传导及转录激活蛋白 (STAT) 信号通路、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路等, 提示桑椹的活性成分主要通过上述途径起到抗炎作用, 取 P 值前 20 的通路用富集气泡图做可视化分析, 见图 3。GO 功能富集分析得到 GO 条目共 5 449 个, 其中 BC 相关条目 4 581 个, CC 相关条目 342 个, MF 相关条目 526 个。将 P 值由小到大排序, 按 P 值排序分别筛选排名前 5 的条目, 制作 GO 富集柱状图, 主要涉及的生物过程为基因表达的正向调节、对药物的反应、炎症反应等, 涉及的细胞组分为细胞外空间、细胞外域、大分子复合物、细胞表面、小腔等, 涉及的分子功能为酶结合、同种蛋白质结合、细胞因子活性等, 见图 4。

**靶点 - 通路网络构建** 桑椹靶点 - 通路网络见图 5, 共有 67 个节点 (57 个靶点、10 个相关通路) 和 179 条边, 主要通路有脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化、癌症通路、前列腺癌、疟疾、类风湿性关节炎、松弛素信号通路、细胞衰老、铂类药物性和 JAK-STAT 通路。

**动物实验验证**

1 肝脏组织病理学变化 HE 染色和 Masson 染色结果显示, 正常组小鼠肝索结构正常, 肝小叶结构完整,

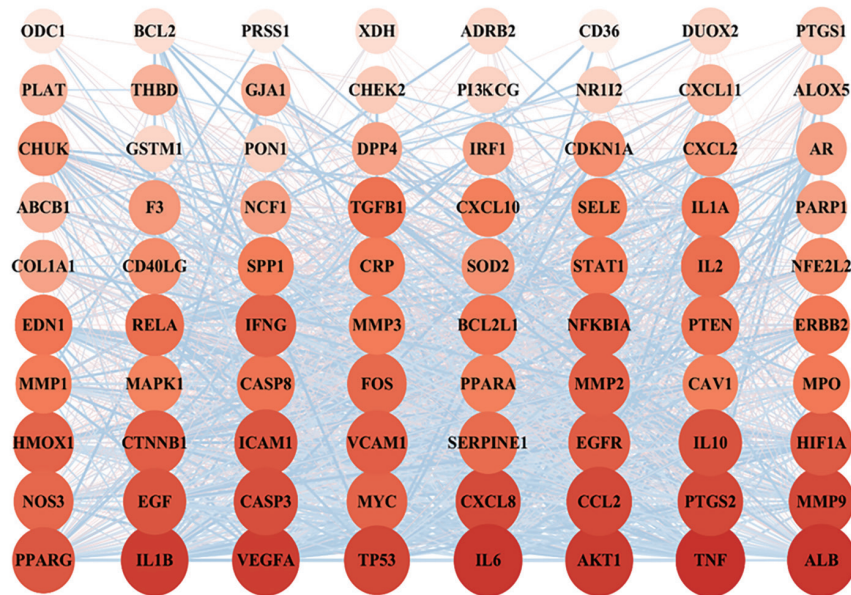


图 2 桑椹活性成分 - 炎症疾病靶点蛋白 - 蛋白相互作用 (PPI) 网络图

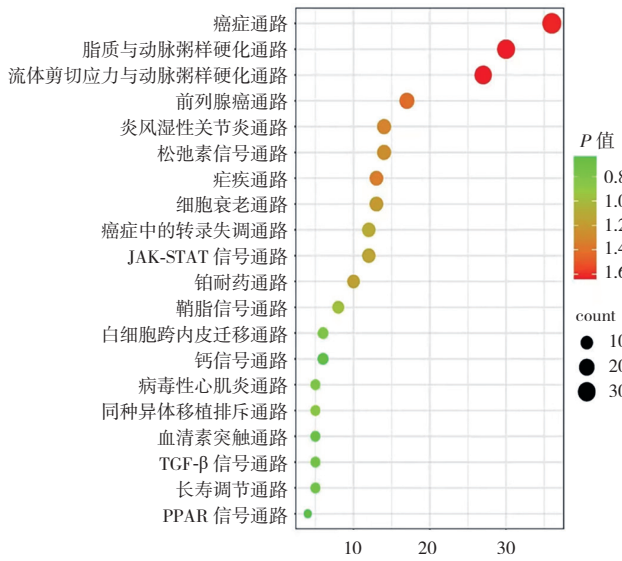


图 3 桑椹抗炎的京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

无纤维组织增生。模型组小鼠肝索排列紊乱, 肝细胞肿胀, 胞质疏松, 出现大量的肝细胞脂肪变性、坏死

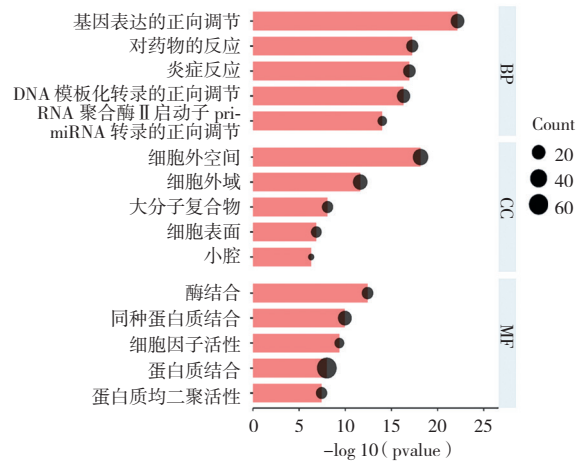


图 4 桑椹抗炎的基因本体 (GO) 功能富集分析

和炎症细胞浸润, 有明显的纤维组织增生和胶原沉积。与模型组相比, 桑椹总黄酮中、高剂量组炎症细胞浸润和肝纤维化程度明显改善, 见图 6。

2 血清 ALT、AST 水平 与正常组相比, 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型

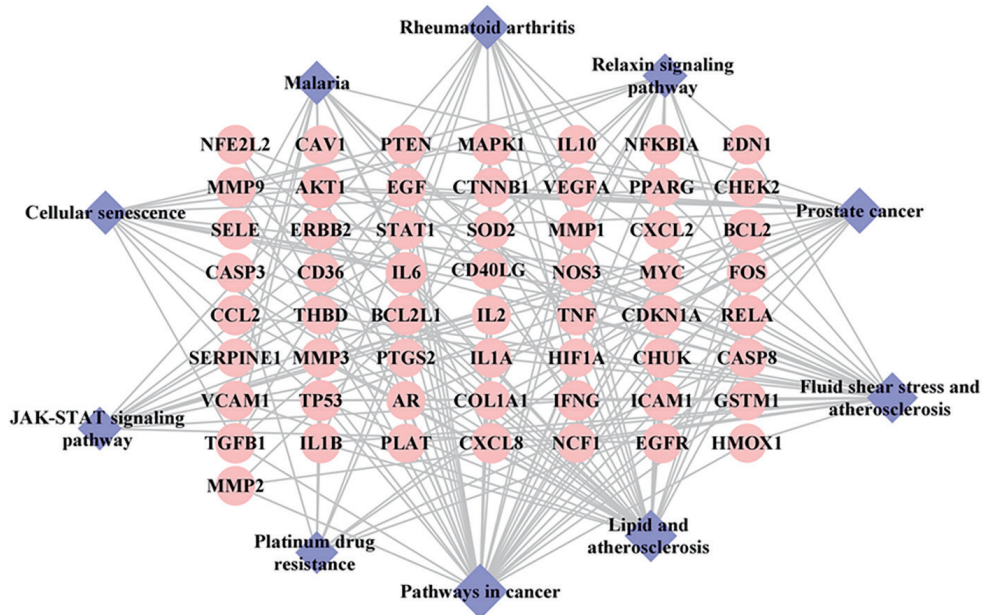


图 5 桑椹靶点 - 通路网络图 红色圆形代表桑椹抗炎的潜在靶点, 蓝色菱形代表相关通路

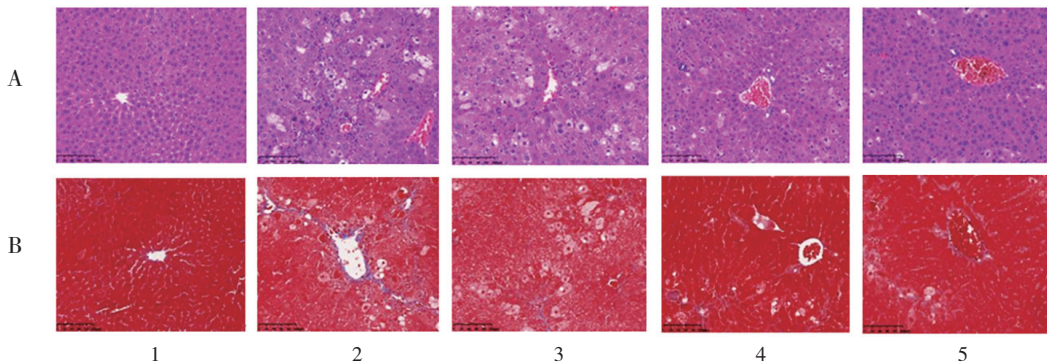


图 6 各组小鼠肝脏组织 HE 染色 (A) 和 Masson 染色 (B) ( $\times 200$ ) 1: 正常组, 2: 模型组, 3: 桑椹总黄酮低剂量组, 4: 桑椹总黄酮中剂量组, 5: 桑椹总黄酮高剂量组

组相比, 桑椹总黄酮中、高剂量组 ALT、AST 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 低剂量组有降低趋势但无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 各组小鼠血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平比较  $n=10, \bar{x} \pm s$

组别	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$
正常	26.45 $\pm$ 8.91	122.74 $\pm$ 11.79
模型	84.11 $\pm$ 26.82 <sup>c</sup>	193.03 $\pm$ 32.68 <sup>c</sup>
桑椹总黄酮低剂量	69.29 $\pm$ 23.68 <sup>d</sup>	169.20 $\pm$ 32.42 <sup>d</sup>
桑椹总黄酮中剂量	61.24 $\pm$ 19.15 <sup>e</sup>	164.47 $\pm$ 26.16 <sup>e</sup>
桑椹总黄酮高剂量	55.30 $\pm$ 23.06 <sup>e</sup>	158.92 $\pm$ 27.11 <sup>e</sup>

经单因素方差分析: 与正常组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>d</sup> $P > 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$

3 肝组织 IL-6、TNF- $\alpha$  含量 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 桑椹总黄酮中、高剂量组小鼠肝脏组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  含量显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 见表 3。

表 3 各组小鼠肝组织白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  含量比较  $n=10, \bar{x} \pm s$

组别	IL-6/ $pg \cdot mg^{-1}$	TNF- $\alpha$ / $pg \cdot mg^{-1}$
正常	36.02 $\pm$ 7.83	57.13 $\pm$ 5.73
模型	70.58 $\pm$ 18.62 <sup>c</sup>	96.39 $\pm$ 14.54 <sup>c</sup>
桑椹总黄酮低剂量	57.17 $\pm$ 11.89 <sup>d</sup>	88.34 $\pm$ 11.52 <sup>d</sup>
桑椹总黄酮中剂量	53.70 $\pm$ 13.84 <sup>e</sup>	80.70 $\pm$ 12.66 <sup>e</sup>
桑椹总黄酮高剂量	48.93 $\pm$ 11.04 <sup>f</sup>	78.82 $\pm$ 10.27 <sup>f</sup>

经单因素方差分析: 与正常组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>d</sup> $P > 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$

4 肝组织 MMP9 蛋白表达 与空白组比较, 模型组小鼠肝组织 MMP9 蛋白表达水平明显上调 ( $4.46 \pm 1.03$  vs.  $10.92 \pm 1.61$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 桑椹总黄酮低、中、高剂量组小鼠肝组织 MMP9 蛋白表达水平显著下调 ( $6.32 \pm 0.84$ 、 $6.19 \pm 1.52$ 、 $5.60 \pm 0.94$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 7。

## 讨 论

桑椹为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的干燥果穗, 味甘、酸, 性寒, 归心、肝、肾经, 具有滋阴补血、生津润燥的功效。主要用于肝肾阴虚、眩晕耳鸣、心悸失眠、须发早白、津伤口渴等症<sup>[9]</sup>。桑椹自古以来就是临床常用中药, 《本草纲目》中记载有桑椹“捣汁饮, 解酒中毒”之说。现代药理研究表明桑椹具有抗炎、抗氧化、调节免疫、保护肝脏、降血糖、调脂、抗肿瘤、抗抑郁和保护神经等作用, 用于预防和治疗多种疾病, 包括肝炎、肝癌、眼病、糖尿病和高血压等<sup>[10-13]</sup>。文献报道桑椹中的黄酮类成分主要有花青素、芦丁、槲皮素、桑色素、山奈酚和花旗松素等<sup>[14]</sup>。

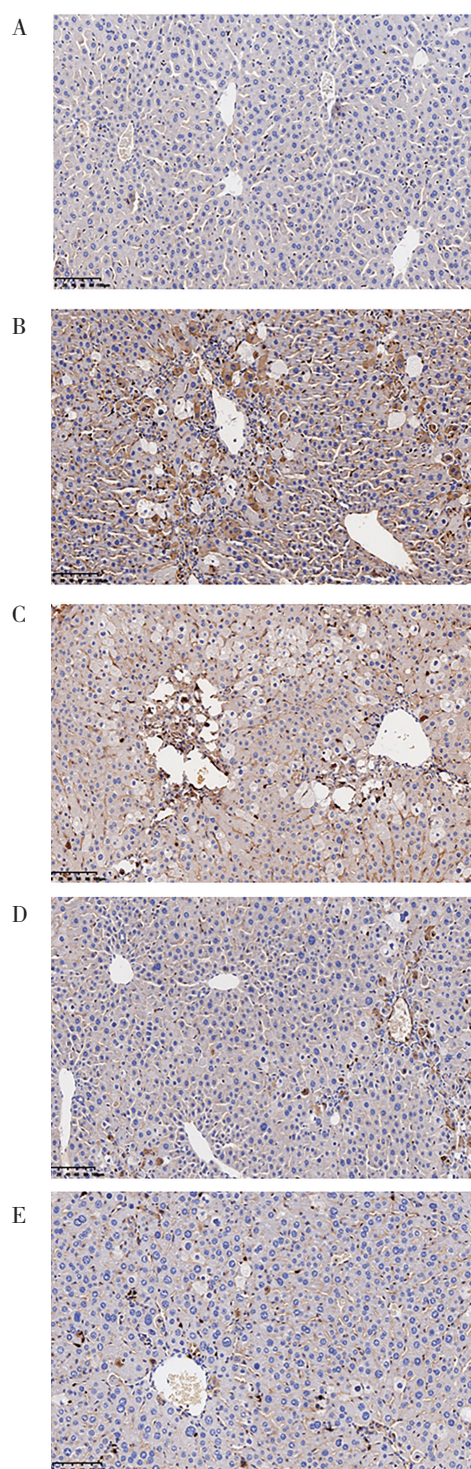


图 7 各组小鼠肝组织基质金属蛋白酶 9 蛋白表达 (免疫组化,  $\times 200$ ) A: 正常组, B: 模型组, C: 桑椹总黄酮低剂量组, D: 桑椹总黄酮中剂量组, E: 桑椹总黄酮高剂量组

本研究筛选得到桑椹抗炎的 4 种活性成分, 分别为花青素、槲皮素、桑色素和  $\beta$ -胡萝卜素。现代研究表明花青素具有抗炎、抑菌、抗氧化和抗癌等作用, 可预防和治疗多种慢性疾病, 如代谢紊乱、癌症、眼病以及心血管疾病<sup>[15]</sup>。槲皮素具有抗炎、抗氧化活性, 可治疗糖尿病/肥胖症和循环功能障碍等多种

疾病<sup>[16]</sup>。

通过构建的桑椹活性成分 - 炎症疾病靶点和 PPI 网络图分析可知, 桑椹抗炎的主要作用靶点有炎症细胞因子 IL-6、TNF、PTGS2、IL-1 $\beta$ 、AKT1、ALB、VEGFA、CXCL8 等。结合靶点 - 通路网络图分析可知, 桑椹主要通过 JAK-STAT 信号通路和 PPAR 信号通路调控 IL-6、TNF、AKT1、CCL2、MMP9 等靶点发挥抗炎作用。炎症细胞因子如 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  在免疫调节、造血、炎症和肿瘤发生等方面具有广泛的生物学活性。核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 是参与免疫、炎症反应和细胞存活的转录调节因子。研究发现, 在肝损伤的初始阶段, 肝细胞的凋亡和坏死激活 Kupffer 细胞, 随后激活 NF- $\kappa$ B 信号通路, 导致释放大量炎症细胞因子, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$ , 进一步加重炎症反应<sup>[17]</sup>。PTGS2 表达降低可以抑制前列腺素的产生, 发挥抗炎效应。研究表明, 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) /AKT 信号通路参与炎症反应和细胞凋亡, 在减轻肝损伤方面发挥重要作用<sup>[18]</sup>。桑椹的主要活性成分槲皮素可通过抑制 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路和 STAT3 途径保护酒精诱导的肝损伤<sup>[19]</sup>。CXCL8 又称 IL-8, 与受体 CXCR1 或 CXCR2 结合后可对中性粒细胞产生趋化作用, 诱导机体局部及全身炎症反应, 参与炎症性肠病、组织损伤、乙型肝炎与肝癌等多种疾病的发生发展过程<sup>[20]</sup>。CCL2 具有调节炎症的生理作用, CCL2/CCR2 可在肝脏和脂肪细胞中诱导炎症细胞募集, 参与肝脏脂肪变性、炎症和肝纤维化<sup>[21]</sup>。MMPs 在 ECM 重塑中起着重要作用, 研究表明 MMPs 是解决慢性肝脏疾病潜在的治疗靶点, 可在肝纤维化形成过程中增强 ECM 降解<sup>[22]</sup>。此外, 花青素可降低肝脏脂质积聚, 并可对抗氧化应激和肝脏炎症, 阻止非酒精性脂肪肝相关肝损伤的进程, 可能通过减少固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 1c 抑制脂肪生成, 诱导 PPAR 促进脂肪分解活动, 减少抗氧化酶诱导的氧化应激以及通过激活肝细胞 AMPK 通路影响脂质代谢<sup>[23]</sup>。这与桑椹涉及到的脂肪细胞脂解的调节和 PPAR 信号通路是一致的。

肝脏是人体重要的免疫器官, 在面对如细菌、病毒等有害因素时, 肝脏能够产生快速而强大的免疫反应, 当免疫力不足时可引导感染和癌症<sup>[24]</sup>。提示桑椹活性成分的作用靶点和通路主要与炎症和免疫相关, 特别是与肝脏疾病关系密切。中医肝病病机复杂, 在中后期阶段多属本虚标实之证, 标实主要为湿热血瘀之证, 本虚主要为肝肾阴虚之证。桑椹为临床常见的补阴药, 可治疗肝肾阴虚病证, 其滋阴补血的功效

亦针对了肝病的主要病因。

肝纤维化的发病机制复杂, 肝星状细胞是肝纤维化发生发展的核心环节, 它在组织损伤后能活化为肌成纤维细胞, 通过炎症和纤维化分泌 ECM 蛋白, 从而产生纤维瘢痕<sup>[25]</sup>。肝脏中慢性炎症持续损伤肝细胞刺激肝纤维化的发展, 炎症细胞因子激活肝星状细胞, 而肝星状细胞的活化又能分泌炎症趋化因子, 炎症和纤维化细胞之间相互刺激存在正反馈环, 导致纤维化的进展<sup>[26, 27]</sup>。本研究动物实验结果表明, 桑椹总黄酮作为其抗纤维化的主要活性成分能够显著降低肝纤维化模型小鼠肝脏中 IL-6、TNF- $\alpha$  含量, 下调 MMP9 蛋白表达, 提示桑椹抗肝纤维化作用机制与抑制 IL-6、TNF- $\alpha$  过量释放和降低 MMP9 蛋白表达有关。

综上所述, 桑椹通过花青素、槲皮素等活性成分作用于 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP9 等靶点发挥抗肝纤维化作用, 涉及的通路主要有 PI3K/AKT 信号通路、JAK-STAT 信号通路等。桑椹可能通过抗炎、调节免疫等多种途径对肝病等多种疾病进行干预, 动物实验表明其保肝作用机制可能与减轻炎症反应、下调 MMP9 的蛋白表达有关。本研究通过网络药理学和动物实验初步探讨桑椹抗肝纤维化的作用机制, 但后续仍需大量实验进行深入研究和验证, 为药物研发和临床应用提供参考。

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] ZHU W, LONNBLOM E, FORSTER M, *et al.* Natural polymorphism of Ym1 regulates pneumonitis through alternative activation of macrophages [ J ]. *Sci Adv*, 2020, 6 ( 43 ) : eaba9337.
- [ 2 ] 苏士成, 宋保亮, 陈玲玲, 等. 线粒体定位 circRNA 调控肝脏免疫代谢性炎症机制 [ J ]. *生命的化学*, 2020, 40 ( 10 ) : 1914-1916.
- [ 3 ] 廖紫琼, 纪秋凤, 周本杰. 炎症性肠病的发病机制及基于肠道菌群的药物研究策略 [ J ]. *世界华人消化杂志*, 2020, 28 ( 22 ) : 1112-1120. LIAO ZQ, JI QF, ZHOU BJ. Strategies for inflammatory bowel disease drug research by targeting gut microbiota [ J ]. *World Chin J Digestol*, 2020, 28 ( 22 ) : 1112-1120.
- [ 4 ] 徐春阳, 李文兰, 杨秀颖, 等. 脂肪代谢障碍与抗炎治疗策略 [ J ]. *中药药理与临床*, 2018, 34 ( 5 ) : 168-172. XU CY, LI WL, YANG XY, *et al.* Adipose metabolic disorder and anti-inflammation therapy strategy [ J ]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2018, 34 ( 5 ) : 168-172.
- [ 5 ] 欧雯雯, 张 燕, 刘帮杉, 等. 抑郁症神经炎症机制的研究进展 [ J ]. *中南大学学报: 医学版*, 2020, 45 ( 11 ) : 1372-1377. OU WW, ZHANG Y, LIU BS, *et al.* Reseach progress in neuroinflammation mechanism in depression [ J ]. *J Cent South*

- Univ (Med Sci), 2020, 45 (11): 1372–1377.
- [6] 王思为, 蓝天, 郑芳, 等. 衢枳壳提取物对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化小鼠肝脏炎症及 NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎性体通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (6): 1474–1479. WANG SW, LAN T, ZHENG F, *et al.* Effect of extract of Quzhou Aurantii Fructus on hepatic inflammation and NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome pathway in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice [J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46 (6): 1474–1479.
- [7] TSUCHIDA T, FRIEDMAN SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14 (7): 397–411.
- [8] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. Cells, 2020, 9 (4): 875.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: Chin Med Sci Technol Press, 2020.
- [10] RAMAN ST, GANESHAN AK, CHEN C, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of flavonoid extracted from mulberry fruit (*Morus alba* L.) [J]. Pharmacogn Mag, 2016, 12 (46): 128–133.
- [11] YAN F, DAI G, ZHENG X. Mulberry anthocyanin extract ameliorates insulin resistance by regulating PI3K/AKT pathway in HepG2 cells and db/db mice [J]. J Nutr Biochem, 2016, 36: 68–80.
- [12] DALMAGRO AP, CAMARGO A, SEVERO RODRIGUES AL, *et al.* Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in the antidepressant-like and neuroprotective effects of *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid [J]. Chem Biol Interact, 2019, 314: 108843.
- [13] CHENG KC, WANG CJ, CHANG YC, *et al.* Mulberry fruits extracts induce apoptosis and autophagy of liver cancer cell and prevent hepatocarcinogenesis *in vivo* [J]. J Food Drug Anal, 2020, 28 (1): 84–93.
- [14] YUAN Q, ZHAO L. The Mulberry (*Morus alba* L.) fruit—a review of characteristic components and health benefits [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65 (48): 10383–10394.
- [15] KHOO HE, AZLAN A, TANG ST, *et al.* Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits [J]. Food Nutr Res, 2017, 61 (1): 1361779.
- [16] D'ANDREA G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications [J]. Fitoterapia, 2015, 106: 256–271.
- [17] ZHENG H, WANG X, ZHANG Y, *et al.* Pien-Tze-Huang ameliorates hepatic fibrosis via suppressing NF- $\kappa$ B pathway and promoting HSC apoptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 244: 111856.
- [18] YANG L, FU WL, ZHU Y, *et al.* T $\beta$ 4 suppresses lincRNA-p21-mediated hepatic apoptosis and fibrosis by inhibiting PI3K-AKT-NF- $\kappa$ B pathway [J]. Gene, 2020, 758: 144946.
- [19] ZHU M, ZHOU X, ZHAO J. Quercetin prevents alcohol-induced liver injury through targeting of PI3K/Akt/nuclear factor- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2017, 14 (6): 6169–6175.
- [20] RUSSO RC, GARCIA CC, TEIXEIRA MM, *et al.* The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2014, 10 (5): 593–619.
- [21] O'CONNOR T, BORSIG L, HEIKENWALDER M. CCL2-CCR2 signaling in disease pathogenesis [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2015, 15 (2): 105–118.
- [22] GEERVLiet E, BANSAL R. Matrix metalloproteinases as potential biomarkers and therapeutic targets in liver diseases [J]. Cells, 2020, 9 (5): 1212.
- [23] VALENTI L, RISO P, MAZZOCCHI A, *et al.* Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013: 145421.
- [24] LI W, CHANG N, LI L. Heterogeneity and function of Kupffer cells in liver injury [J]. Front Immunol, 2022, 13: 940867.
- [25] KOYAMA Y, BRENNER DA. Liver inflammation and fibrosis [J]. J Clin Invest, 2017, 127 (1): 55–64.
- [26] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18 (3): 151–166.
- [27] 李叶, 祁克明, 卢伟, 等. 基于代谢组学和网络药理学分析福建金线莲叶和台湾银线兰叶治疗肝纤维化作用差异 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39 (23): 3092–3102. LI Y, QI KM, LU W, *et al.* Exploring the difference in mechanism of action of *Anoectochilus Roxburghii* leaves and *Anoectochilus Formosanus* leaves in the treatment of liver fibrosis based on integrative metabolomics and network pharmacology [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39 (23): 3092–3102.