

# 基于网络药理学和实验验证探讨健脾养肝汤治疗自身免疫性肝炎的作用机制<sup>△</sup>

于盈盈\*, 杨润萌, 张亚, 包一珺, 吕文良, 朱丹<sup>#</sup>(中国中医科学院广安门医院感染疾病科, 北京 100053)

中图分类号 R96;R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2025)06-0679-08

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2025.06.008



**摘要** 目的:通过网络药理学和分子对接技术,探讨健脾养肝汤治疗自身免疫性肝炎(AIH)的分子机制,并进行实验验证。方法:(1)利用网络药理学获得健脾养肝汤治疗 AIH 的药物活性成分、潜在药理靶点以及作用途径,通过分子对接验证其结合能。(2)构建 AIH 小鼠模型,将 BALB/c 小鼠随机分为空白组、模型组、泼尼松龙组、和健脾养肝汤组共 4 组。观察相应药物治疗后各组小鼠肝功能和肝脏组织病理变化情况,记录小鼠的一般情况,并采用分子生物学技术验证网络药理学预测的关键靶点和作用途径。结果:(1)网络药理学研究结果显示,健脾养肝汤治疗 AIH 的潜在活性成分为槲皮素、山柰酚和  $\beta$ -谷甾醇。主要核心靶点为肿瘤坏死因子(TNF)、肿瘤蛋白 p53、肉瘤病毒蛋白 SRC、信号转导及转录激活因子 3(STAT3)和前列腺素内过氧化物合酶 2,主要靶蛋白富集于磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B(PI3K-Akt)等多条信号通路。(2)实验研究结果显示,健脾养肝汤可以改善 AIH 小鼠丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶和直接胆红素水平,减轻肝脏组织的炎症细胞浸润,降低炎症因子 TNF- $\alpha$  水平,调控 AIH 小鼠肝脏组织的酪氨酸激酶信号转导子(JAK)2/STAT3 和 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达。结论:健脾养肝汤可以改善 AIH 小鼠的肝功能和炎症因子表达,减轻组织炎症损伤,其保护作用机制可能与靶向调控 JAK/STAT 和 PI3K/Akt 信号通路有关。  
**关键词** 健脾养肝汤;自身免疫性肝炎;网络药理学;作用机制;实验验证

## Mechanism of Jianpi Yanggan Decoction in the Treatment of Autoimmune Hepatitis Based on Network Pharmacology and Experimental Validation<sup>△</sup>

YU Yingying, YANG Runmeng, ZHANG Ya, BAO Yijun, LYU Wenliang, ZHU Dan (Dept. of Infectious Diseases, Guang'anmen Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To probe into the mechanism of Jianpi Yanggan decoction in treatment of autoimmune hepatitis (AIH) based on network pharmacology and molecular docking, and to conduct experimental validation. **METHODS:** (1) Network pharmacology was used to obtain active components, potential pharmacological targets and function pathways of Jianpi Yanggan decoction in the treatment of AIH, and molecular docking was used to validate its binding energy. (2) AIH mice model was constructed, BALB/c mice were randomly divided into four groups, namely blank group, model group, prednisolone group and Jianpi Yanggan decoction group. The liver function and liver tissue pathological changes of mice in each group were observed after treated with corresponding drugs, the general conditions of mice were recorded, molecular biological techniques were used to validate the key targets and function pathways predicted by network pharmacology. **RESULTS:** (1) Network pharmacological research indicated that the potential active components of Jianpi Yanggan decoction in the treatment of AIH were quercetin, kaempferol and  $\beta$ -sitosterol. The core targets were tumor necrosis factor (TNF), oncoprotein-p53, SRC, signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3) and PTGS2, the main target protein were enriched in multiple signaling pathways phosphatidylinositol 3 kinase-protein kinase B (PI3K-Akt). (2) Experimental study indicated that Jianpi Yanggan decoction can improve the alanine aminotransferase, aspartate transaminase and direct bilirubin levels in AIH mice, relieve the inflammatory infiltration of liver tissue, reduce inflammatory factor TNF- $\alpha$  levels, regulate and control the protein expression of JAK2/STAT3 and PI3K/Akt signaling pathways in liver tissue of AIH mice. **CONCLUSIONS:** Jianpi Yanggan decoction can improve the liver function and inflammatory factor expression of AIH mice, relieve inflammatory injury, the mechanism of its protective effect may be related to the targeted regulation of JAK/STAT and PI3K/Akt signaling pathways.

**KEYWORDS** Jianpi Yanggan decoction; Autoimmune hepatitis; Network pharmacology; Mechanism; Experimental validation

<sup>△</sup> 基金项目:中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(No. CI2021A00809);2021 年岐黄学者支持项目

\* 博士。研究方向:中医药治疗肝病、风湿免疫性疾病。E-mail:1654258787@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:副主任医师,博士。研究方向:慢性肝病、脾胃病研究。E-mail:zhudan526@163.com

自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH) 是由免疫反应介导的肝脏炎症损伤疾病,近年来其发病率和患病人群逐渐增加,在我国的检出率也呈上升趋势<sup>[1-2]</sup>。该病早期起病多隐匿,部分患者无明显临床症状,发现时甚至已经出现了肝硬化,预后较差<sup>[3]</sup>。治疗上以免疫抑制治疗为主,但是存在生化应答欠佳、减药或停药后病情易复发等问题<sup>[4]</sup>。针对 AIH 的中医辨证论治体系和指南尚未建立,因对其病因病机的认识不同,证型分类标准难以统一。近年来,中医药对 AIH 的病因病机认识已日趋丰富,研究结果显示了中医药在免疫调节、抗纤维化和改善 AIH 预后方面的优势<sup>[5-6]</sup>。因此,深入挖掘和总结中医药治疗 AIH 的经验对于临床实际应用具有重要意义。

岐黄学者吕文良教授几十年来不断总结历代诸家之言,又经证广泛验证,在慢性肝病防治方面积累了丰富的经验。健脾养肝汤是吕文良教授经临床反复验证和不断优化后的用于治疗 AIH 的经验基础方,该方能改善患者疲劳乏力症状,恢复患者脾胃纳食功能,还具有保肝降酶、辅助撤减激素的疗效。因此,本研究借助现代网络药理学和分子对接技术对健脾养肝汤治疗 AIH 的过程展开研究,探索其潜在的作用机制,并尝试开展动物实验进行验证,以期为中西医结合治疗 AIH 提供思路和研究证据。

## 1 资料与方法

### 1.1 健脾养肝汤活性成分及药理靶点筛选

借助中药系统药理学数据库与分析平台 (<https://tcm-spe.com/>),检索健脾养肝汤组方中的全部药效成分和靶点,获取黄芪、白芍、柴胡、炒白术、防风、郁金、茯苓、法半夏、防己、炙甘草的全部化学成分。根据口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$ 、类药性 (DL)  $\geq 0.18$  的 2 个 ADME 属性值进行活性成分初步筛选。对于未收录的芒硝、山楂和生地黄,通过查阅文献、中药整合药理学研究平台 (<http://www.tcmip.cn/>) 和化学专业数据库 (<http://www.organchem.csdb.cn/>) 获取其活性成分。将活性成分通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取 Canonical Smile,然后上传到 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>),获取全名、缩写及 UniProt ID (<https://www.uniprot.org/>),保留 Probability > 0 的靶点,并删除重复靶点,获得活性成分集合以及潜在药理靶点集合。

### 1.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建和拓扑分析

检索 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>),得到“自身免疫性肝炎”的相关靶点。利用 Venny 2.1 软件将健脾养肝汤靶点集合与 AIH 疾病靶点进行交集,取得的交集靶点集合即为健脾养肝汤治疗 AIH 的潜在药理靶点。将获取的交集靶点上传至 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>),物种限定为人,综合评分  $\geq 0.4$  分,得到 PPI 网络,去掉游离节点,通过 Cytoscape 3.8.0 软件根据网络拓扑学参数进行可视化分析,并根据节点度值 (Degree) 绘制柱状图,获得核心靶点。

### 1.3 构建健脾养肝汤活性成分-AIH 药理靶点网络图

采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建健脾养肝汤活性成分-AIH 药理靶点网络图。

### 1.4 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

将健脾养肝汤治疗 AIH 的靶点录入 David 平台 ([\[david.ncifcrf.gov/\]\(http://david.ncifcrf.gov/\)\),将结果可视化。其中,GO 功能富集分析包括描述靶点的细胞组分、分子功能及参与的生物过程;KEGG 富集分析为代谢通路。](https://</a></p></div><div data-bbox=)

## 1.5 分子对接

基于以上研究结果,取靶点数目排序居前 3 位的活性成分作为配体,PPI 网络中节点 Degree 值排序居前 5 位的靶点作为受体,分别进行分子对接。在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获取靶点的蛋白结构,运用 PubChem CID 下载活性成分的三维结构,导入 PyMOL 2.1.1 和 AutoDock Vina 1.5.7 软件进行分子结构处理和分子对接。

## 1.6 实验材料

1.6.1 实验动物:SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,体重为 18~22 g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物许可证号为 SCXK (京)2021-0006。饲养于中国中医科学院广安门医院实验动物中心,恒温恒湿,房间 12 h 光照 12 h 黑暗循环,饮食水完全自由。通过中国中医科学院广安门医院伦理委员会的伦理审查 (伦理批号:2ACUC-GAMY-2022-07-02)。

1.6.2 仪器:D3024R 型台式高速冷冻离心机 [大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司];Chemray 800 型全自动生化分析仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司);JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司);NIKON DS-U3 型成像系统 (日本 Nikon 公司);DG-300C 型电泳仪 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。

1.6.3 药品与试剂:健脾养肝汤颗粒剂 (药物组成为生黄芪 30 g,白芍 20 g,柴胡 9 g,生地黄 15 g,炒白术 12 g,焦山楂 20 g,防风 6 g,郁金 15 g,芒硝 3 g,茯苓 20 g,法半夏 9 g,防己 6 g,炙甘草 6 g),由中国中医科学院广安门医院中药房提供。按照人-小鼠体表面积换算等效剂量,配制成浓度为 2.59 g/mL 的中药溶液。醋酸泼尼松龙片 (天津信宜津津药业有限公司,国药准字 H31020771,批号为 504220410,规格为 5 mg),以纯水配制成浓度为 0.6 mg/mL 的溶液,泼尼松龙给药量参考 AIH 诊断和治疗指南及文献<sup>[7-8]</sup>。刀豆蛋白 A (Con A, 美国 sigma 公司,货号 C2010) 以 0.9% 氯化钠溶液配制成浓度为 1.25 mg/mL 的溶液。

4% 多聚甲醛固定液 (武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 G1101);苏木素-伊红 (HE) 高清恒染试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 G1076);Phospho-PI3 Kinase p85 Antibody (货号 4228),Phospho-Akt mAb (货号 4060),Phospho-Jak2 Antibody (货号 3771),Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb (货号 4691),Jak2 mAb (货号 3230) 均购自美国 CST 公司;Phospho-Stat3 Antibody (货号 YP0250),PI3 kinase p85 $\alpha$  Antibody (货号 YT6156),Stat3 Polyclonal Antibody (货号 YT4443),GAPDH Monoclonal Antibody (货号 YM3029) 均购自美国 Immunoway 公司;Mouse TNF- $\alpha$  Capture Bead A10, 13X (货号 740837),LEGENDplex™ Buffer Set B (货号 740373),LEGENDplex™ Mouse B cell Panel Standard (货号 740831),LEGENDplex™ Mouse B cell Panel Detection Antibodies (货号 740830) 均购自美国 Biolegend 公司。

## 1.7 造模和给药

将小鼠随机分为空白组、模型组、泼尼松龙组和健脾养肝

汤组,空白组小鼠 16 只,其余三组各 24 只。采用尾静脉注射 Con A 诱导慢性免疫性肝损伤的造模方法<sup>[9]</sup>。模型组、泼尼松龙组和健脾养肝汤组小鼠均经尾静脉注射 Con A (剂量为 12.5 mg/kg,注射体积为 0.1 mL/10 g),空白组小鼠尾静脉注射等体积 0.9%氯化钠溶液,1 周 1 次,连续 6 周。空白组和模型组小鼠首次尾静脉注射后当日开始给予纯水灌胃,泼尼松龙组小鼠给予泼尼松龙溶液 0.12 mg/kg 灌胃,健脾养肝汤组小鼠给予健脾养肝汤溶液 0.518 7 g/kg 灌胃,给药均 1 日 1 次,连续 6 周。

### 1.8 观察指标

(1)记录动物一般情况,包括精神状态、饮食水和排泄情况、活动情况及体重变化等。(2)禁食水 12 h,麻醉后摘眼球取血(存活状态),离心后留取血清,采用自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和直接胆红素(DBIL)水平。(3)采血结束后,立即采用颈椎脱臼法处死小鼠,酒精消毒后剖开小鼠腹腔,取出小鼠肝脏。使用 4%多聚甲醛固定肝脏组织,采用 HE 染色法观察肝脏组织病理情况。(4)采用流式荧光法检测全血血浆炎症细胞因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平。(5)采用蛋白质印迹法检测肝组织酪氨酸激酶信号转导子(JAK)2、信号转导及转录激活因子 3(STAT3)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)及其磷酸化蛋白表达。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件处理数据,Graphpad Pism 9.5 软件作图。计量资料符合正态分布的采用  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

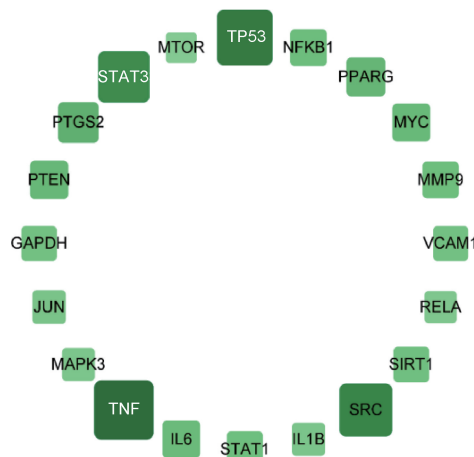
### 2.1 活性成分及潜在靶点筛选结果

筛选出标准的活性成分共 213 种,其中黄芪 21 种,山楂 15 种,白芍 10 种,白术 7 种,茯苓 15 种,柴胡 14 种,防风

19 种,郁金 3 种,生地黄 8 种,防己 2 种,芒硝 1 种,半夏 11 种,甘草 87 种。删除重复值后,共获得潜在药理靶点 851 个。

### 2.2 疾病相关靶点预测

获得健脾养肝汤靶点 851 个、AIH 靶点 5 743 个。通过 Venny 软件取交集获得 621 个共同靶点。将得到的交集靶点提交至 STRING 数据库构建 PPI 网络,利用 Cytoscape 软件对结果进行可视化,见图 1。结果得出,TNF、肿瘤蛋白 p53(TP53)、肉瘤病毒蛋白 SRC(SRC)、信号转导及转录激活因子 3(STAT3)和前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)为 Degree 值排序居前 5 位的核心靶点。



节点代表蛋白质,颜色越深、节点越大,表示 Degree 值越高。

图 1 PPI 网络(combined score  $\geq 0.4$ )的共同靶点

### 2.3 健脾养肝汤活性成分-AIH 药理靶点的网络构建图

对主要活性成分与对应靶点进行网络构建,见图 2。经 Cytoscape 软件网络拓扑参数计算,Degree 值排序居前 3 位的活性成分分别为槲皮素(quercetin)、山柰酚(kaempferol)和 $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol),与多个靶点具有相互作用,可能是健脾养肝汤治疗 AIH 的重要潜在药效成分,见表 1。

表 1 Degree 值排序居前 10 位的活性成分

排序	活性成分	Degree 值	紧密中心性	介数中心性
1	槲皮素(quercetin)	461	0.438 244 854	0.056 617 399
2	山柰酚(kaempferol)	202	0.379 455 910	0.005 563 054
3	$\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol)	132	0.371 783 088	0.001 662 330
4	14-乙酰基-12-千里光酰基-2E,8E,10E-蒲公英三醇(①)	91	0.392 337 536	0.013 258 970
5	12-山梗酰基-2E,8E,10E-蒲公英三醇(②)	90	0.392 337 536	0.010 856 528
6	苯甲酰芍药苷(benzoyl paeoniflorin)	89	0.391 577 928	0.009 342 635
7	茯苓酸 B(poricic acid B)	87	0.390 067 502	0.007 832 477
8	③	86	0.390 067 502	0.007 428 946
9	7,9(11)-去氢厚朴酸[7,9(11)-dehydropachymic acid]	86	0.390 444 015	0.009 725 362
10	厚朴酸(pachymic acid)	84	0.389 316 651	0.008 215 907

注:①14-acetyl-12-seneciyl-2E,8E,10E-atractylentriol;②12-seneciyl-2E,8E,10E-atractylentriol;③(2R)-2-[ (5R,10S,13R,14R,16R,17R)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[ a ]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid。

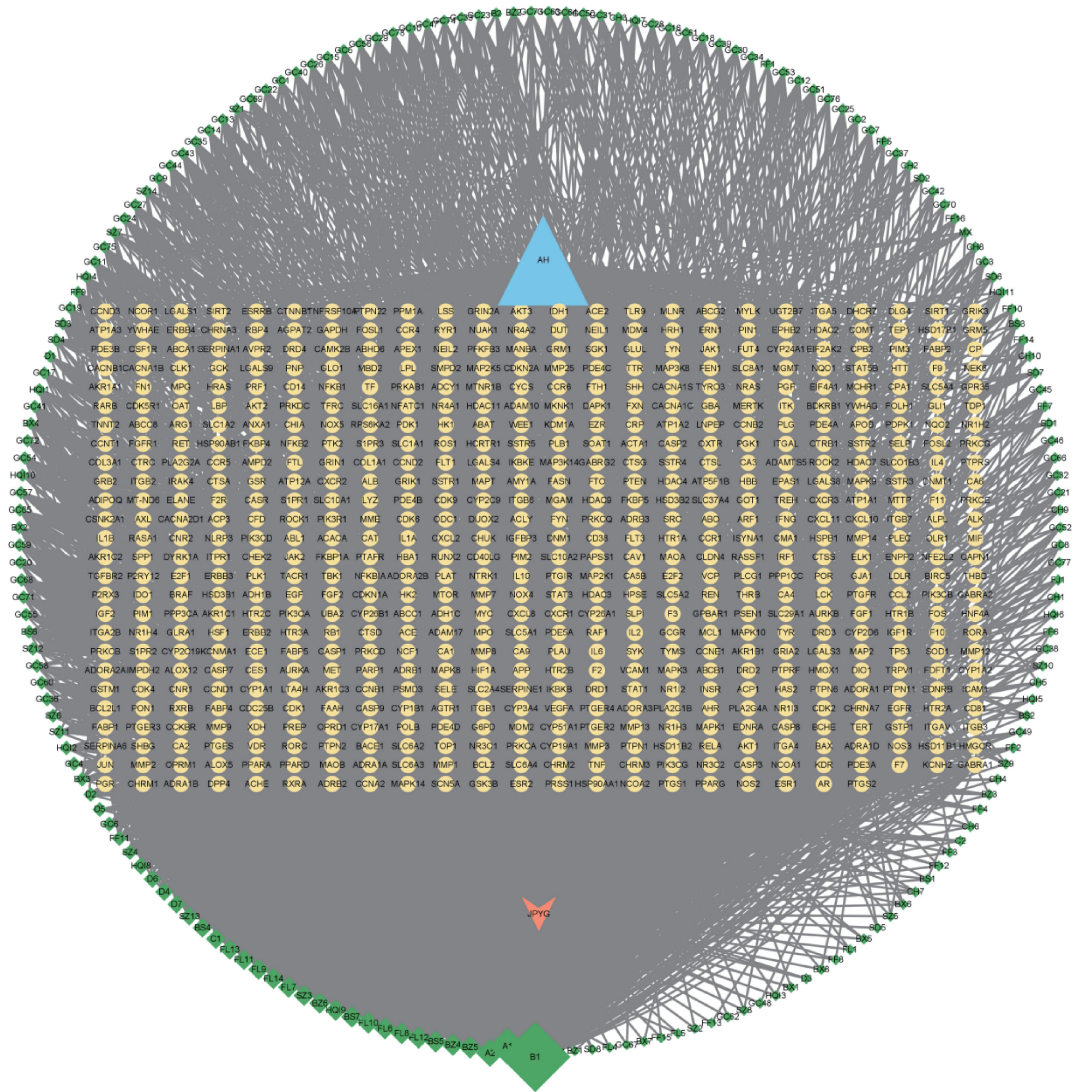
### 2.4 GO 和 KEGG 富集分析

取 GO 富集分析中 P 值排序居前 10 位的条目、KEGG 富集分析中 P 值排序居前 20 位的通路进行可视化分析,见图 3。健脾养肝汤 GO 生物过程涉及对外源性刺激的反应、蛋白质磷酸化及炎症反应等;GO 分子功能分析主要富集于蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、相同蛋白质结合、酶结合及蛋白激酶活性等,GO 细胞组分主要涉及等离子体膜、质膜的组成

部分、膜筏等。KEGG 分析结果显示,健脾养肝汤参与治疗 AIH 的主要通路为 PI3K-Akt 信号通路、丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号通路、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路、钙离子(Calcium)信号通路和大鼠肉瘤(Ras)信号通路等通路。

### 2.5 分子对接

利用 AutoDock vina 1.5.7 软件,对 PPI 网络中 degree 值排序居前 5 位的靶点与健脾养肝汤中预测靶点较多的 3 个活性



黄色圆形表示交集靶点;蓝色三角形表示疾病;绿色四边形为药物成分;橙色V形代表健脾养肝汤。

图2 健脾养肝汤活性成分-AIH 药理靶点网络图

成分进行分子对接。结果显示,分子与靶点的最低结合能均< 0 kJ/mol,说明配体与受体均可以自发结合,见表2。为了从分子水平阐明化合物槲皮素、山柰酚、β-谷甾醇与人 TNF、TP53、SRC、STAT3、PTGS2 的作用模式,将化合物分别对接至靶点的活性口袋,见图4。其中,槲皮素与 SRC 蛋白的对接结合能最小,为-35.98 kJ/mol,说明二者具有强烈的结合活性。

## 2.6 小鼠一般情况

(1) 存活情况:空白组小鼠无死亡发生,模型组死亡6只,泼尼松龙组死亡2只,健脾养肝汤组死亡3只。(2) 基本情况:空白组小鼠精神佳,毛发光泽,体重随着时间逐渐增加。其余三组小鼠造模后出现精神萎靡,蜷缩伏卧,体重明显下降,毛发枯泽,部分小鼠死亡,死亡多在造模后2h至2d。相较于模型组,泼尼松龙组和健脾养肝汤组小鼠的一般状态有明显改善,泼尼松龙组小鼠活动明显增多,部分小鼠亢奋躁动。(3) 体重变化情况:空白组小鼠体重逐步稳定增加;模型组和健脾养肝汤组小鼠体重呈缓慢波动增加趋势,每次注射 Con A 后体重下降,至下次注射前体重逐渐恢复;泼尼松龙组小鼠体重

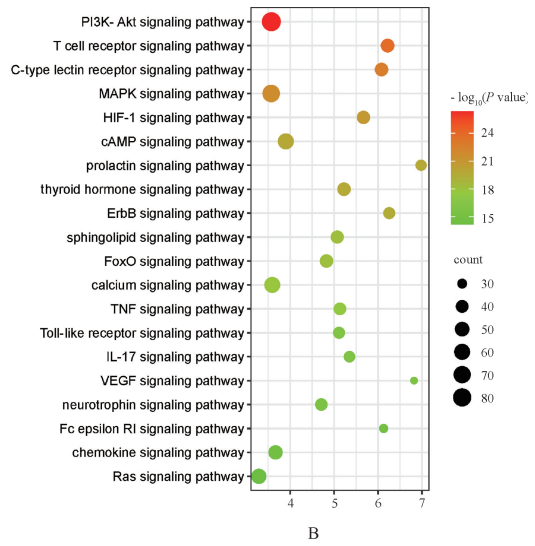
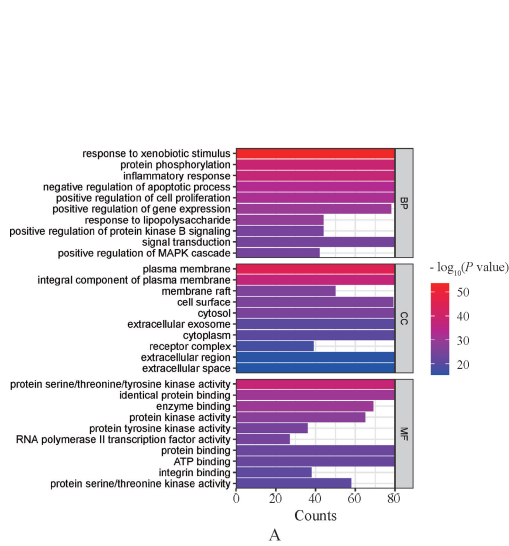
表2 分子对接结果

化合物	蛋白	结合能/(kJ/mol)
槲皮素	TNF	-28.03
	TP53	-26.36
	SRC	-35.98
	STAT3	-34.31
	PTGS2	-31.38
山柰酚	TNF	-25.10
	TP53	-25.52
	SRC	-26.78
	STAT3	-33.47
	PTGS2	-29.29
β-谷甾醇	TNF	-26.78
	TP53	-24.27
	SRC	-23.85
	STAT3	-25.10
	PTGS2	-27.61

低于其余各组,呈交替波动下将和恢复趋势,见图5。

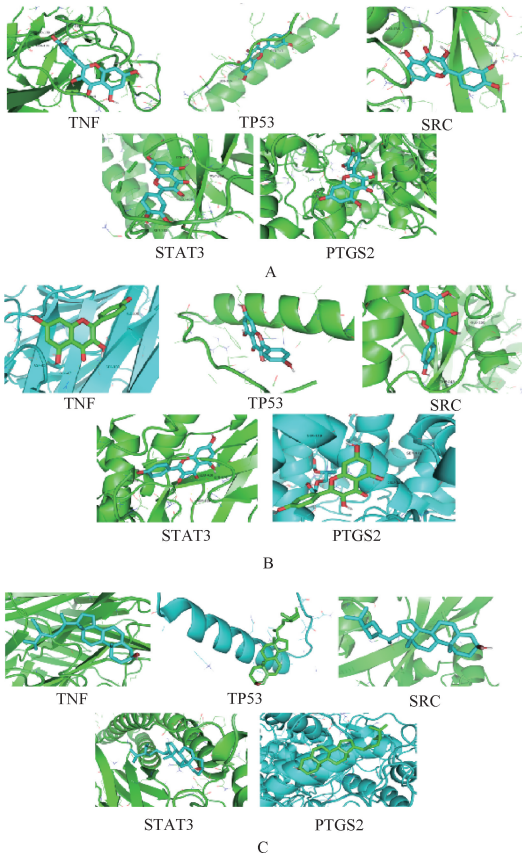
## 2.7 健脾养肝汤对肝功能的影响

给药6周后,与空白组相比,模型组小鼠血清 ALT、AST 和 DBIL 水平明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型



A. GO 功能富集分析; B. KEGG 通路富集分析, 图中气泡的大小代表富集到该通路的靶点数目, 气泡颜色代表显著性, 颜色越红,  $P$  值越小。

图 3 GO、KEGG 富集分析图



A. 槲皮素与 TNF、TP53、SRC、STAT3、PTGS2; B. 山柰酚与 TNF、TP53、SRC、STAT3、PTGS2; C.  $\beta$ -谷甾醇与 TNF、TP53、SRC、STAT3、PTGS2。

图 4 活性成分与靶蛋白分子对接图

组相比, 泼尼松龙组和健脾养肝汤组小鼠 ALT、AST 和 DBIL 水平降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

## 2.8 健脾养肝汤对肝脏组织形态的影响

给药 6 周后, 空白组小鼠肝脏形态正常, 质地软, 色泽正

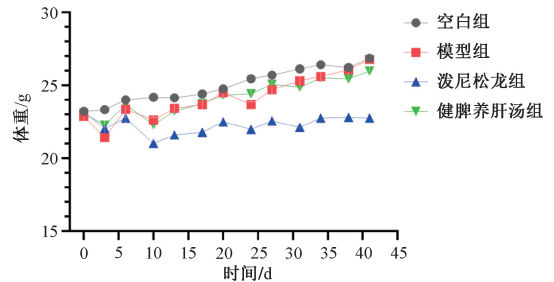


图 5 各组小鼠体重随时间变化趋势

表 3 各组小鼠血清 ALT、AST 和 DBIL 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	DBIL/(\(\mu\text{mol/L}\))
空白组	29.98 $\pm$ 1.63	92.35 $\pm$ 13.67	6.76 $\pm$ 0.69
模型组	40.58 $\pm$ 4.50*	122.40 $\pm$ 7.78*	10.21 $\pm$ 2.19*
泼尼松龙组	31.40 $\pm$ 4.47 $\Delta$	101.10 $\pm$ 7.39 $\Delta$	7.42 $\pm$ 1.28 $\Delta$
健脾养肝汤组	29.18 $\pm$ 3.67 $\Delta\Delta$	97.28 $\pm$ 7.39 $\Delta$	7.30 $\pm$ 1.31 $\Delta$

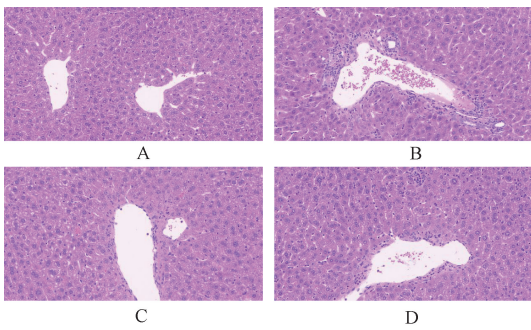
注: 与空白组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

常。模型组小鼠肝脏体积明显增大, 色泽呈暗红色, 触感较膨胀质韧。泼尼松龙组、健脾养肝汤组小鼠肝脏体积均较模型组缩小, 其中泼尼松龙组小鼠肝脏质地过软易烂, 健脾养肝汤组小鼠色泽稍暗红, 质地较模型组软。

病理显示: 空白组小鼠肝小叶结构正常, 肝索呈放射状整齐排列, 汇管区结构清晰, 未见明显炎症细胞浸润。模型组小鼠肝细胞排列紊乱, 汇管区不规则扩大、瘀血, 肝细胞肿胀变性, 可见明显炎症细胞浸润。与模型组相比, 泼尼松龙组、健脾养肝汤组小鼠汇管区炎症细胞均明显减少, 其中泼尼松龙组小鼠炎症细胞浸润少于健脾养肝汤组, 可见少量脂肪变性和广泛肝细胞肿胀变性, 见图 6。

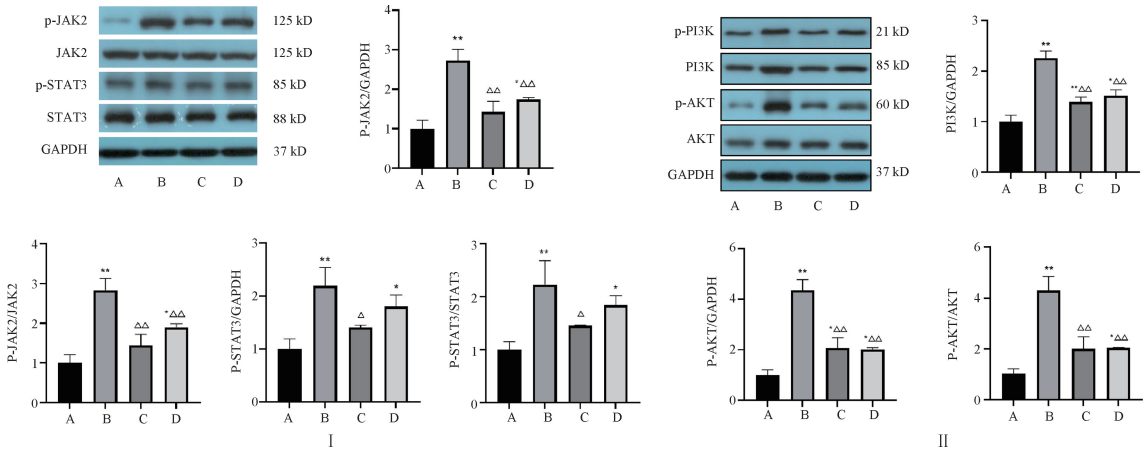
## 2.9 健脾养肝汤对血浆 TNF- $\alpha$ 水平的影响

给药 6 周后, 空白组、模型组、泼尼松龙组及健脾养肝汤组小鼠血浆 TNF- $\alpha$  水平分别为 (3.62 $\pm$ 1.42)、(7.78 $\pm$ 1.11)、(4.25 $\pm$ 1.75) 及 (3.96 $\pm$ 1.64)  $\mu\text{g/mL}$ 。与空白组相比, 模型组小鼠血浆 TNF- $\alpha$  水平明显升高, 差异有统计学意义 ( $P <$



A. 空白组; B. 模型组; C. 泼尼松龙组; D. 健脾养肝汤组。

图 6 各组小鼠肝脏 HE 染色病理图 (200×)



I. 各组小鼠 JAK2、STAT3 及其磷酸化蛋白表达; II. 各组小鼠 PI3K、Akt 及其磷酸化蛋白表达; A. 空白组; B. 模型组; C. 泼尼松龙组; D. 健脾养肝汤组; 与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 7 各组小鼠 JAK2、STAT3、PI3K、Akt 及其磷酸化蛋白表达 ( $n = 3$ )

### 3 讨论

吕文良教授认为, AIH 慢性病程辨证多归于肝脾失调, 湿、热、毒、瘀、虚错杂, 整个发病过程以肝脾两脏为中心, 辨证多属肝郁脾虚证型, 兼见湿热蕴结、瘀血阻络。临床多中心回顾性研究结果显示, 肝郁脾虚证型占比更大<sup>[10]</sup>。治法上主以健脾柔肝, 益气化湿解毒, 调和气血。其经验基础方健脾养肝汤以黄芪、白芍为君, 黄芪健脾益气, 白芍柔肝养血, 肝脾气血同调。辅以白术、柴胡健脾疏肝, 生地黄清热养阴, 使肝体濡润不燥, 功能复常。佐以郁金行气活血, 半夏和胃化浊, 茯苓健脾利湿, 防已化血分之湿热, 焦山楂消食散瘀, 防风扶正祛邪, 使邪去络通、肝脾升降有序。芒硝为使, 逐六腑积聚, 炙甘草调和诸药, 又合白芍酸甘化阴养肝。借助网络药理学和分子对接技术分析得出槲皮素、山柰酚和  $\beta$ -谷甾醇为健脾养肝汤治疗 AIH 的主要潜在活性成分, 核心靶点为 TNF、TP53、SRC、STAT3 和 PTGS2 等, 健脾养肝汤治疗 AIH 的主要靶蛋白富集 PI3K-Akt、MAPK 及 cAMP 等多条信号通路。

#### 3.1 健脾养肝汤的主要活性成分

槲皮素能改善肝损伤和组织病理学改变, 抑制炎症细胞因子的释放, 可通过抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)/c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 通路减轻 Con A 诱导的 AIH 细胞凋亡和自噬<sup>[11]</sup>。山柰酚抑制脂多糖诱导的急性肝损伤, 通过抑制肝星状细胞 (HSC) 中 I 型胶原的表达, 降低肝组

织中胶原的密度, 通过丝氨酸/苏氨酸激酶结构域降低 Smad2 和 Smad3 的磷酸化, 减弱  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 的产生, 抑制转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 刺激的 HSC, 可以作为抗肝纤维剂<sup>[12]</sup>。 $\beta$ -谷甾醇具有抗炎、抗肿瘤、肝保护作用<sup>[13]</sup>;  $\beta$ -谷甾醇及其衍生物通过降低 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素 (IL) 6 和 IL-1 $\beta$  水平, 提高多种抗氧化酶活性, 并通过相关途径抑制急性肝损伤<sup>[14]</sup>。

#### 2.10 蛋白质印迹法检测肝脏 p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、p-PI3K、PI3K、p-Akt 及 Akt 蛋白的表达

给药 6 周后, 相较于空白组, 模型组小鼠肝脏的 p-JAK2、p-STAT3、p-Akt 和 PI3K 蛋白表达水平均明显升高, p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 比值升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。相对于模型组, 泼尼松龙组和健脾养肝汤组小鼠肝脏的 p-JAK2、p-Akt、PI3K 蛋白表达水平降低, 泼尼松龙组的 p-STAT3 蛋白表达水平降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 7。

织中胶原的密度, 通过丝氨酸/苏氨酸激酶结构域降低 Smad2 和 Smad3 的磷酸化, 减弱  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 的产生, 抑制转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 刺激的 HSC, 可以作为抗肝纤维剂<sup>[12]</sup>。 $\beta$ -谷甾醇具有抗炎、抗肿瘤、肝保护作用<sup>[13]</sup>;  $\beta$ -谷甾醇及其衍生物通过降低 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素 (IL) 6 和 IL-1 $\beta$  水平, 提高多种抗氧化酶活性, 并通过相关途径抑制急性肝损伤<sup>[14]</sup>。

#### 3.2 健脾养肝汤治疗 AIH 的核心靶点

TNF 是炎症反应的核心细胞因子, 参与多种自身免疫性疾病的发病过程。AIH 患者的 TNF- $\alpha$  水平较健康人群显著升高<sup>[15]</sup>。TNF 诱导许多生物学反应, 如肝细胞凋亡、肝脏炎症和再生以及自身免疫<sup>[16]</sup>。抗 TNF 治疗在慢性炎症和自身免疫性疾病方面已广泛应用。TP53 和 SRC 是人类恶性肿瘤中常见的突变基因, 与肿瘤的发生密切相关<sup>[17-18]</sup>。STAT3 的激活可以在肝纤维化的发病机制中发挥抗炎或促炎作用<sup>[19]</sup>。例如, IL-17 激活 STAT3, 通过 STAT3-IFI16 轴促进 AIH 相关肝损伤的焦亡<sup>[20]</sup>。PTGS2 诱导产生炎症性前列腺素, 是宿主免疫应答的一部分, 对自身免疫性疾病和炎症性疾病产生重要影响<sup>[21]</sup>。

#### 3.3 健脾养肝汤治疗 AIH 的作用途径

PI3K/Akt 信号通路在调控细胞增殖、凋亡、分化等方面起着重要作用。研究发现, PI3K/Akt 具有减少促炎细胞因子释放、抗炎和抗氧化应激作用<sup>[22]</sup>; 还能减轻肝脏细胞的凋亡、自噬<sup>[23]</sup>; 并增加基质金属蛋白酶 (MMP) 表达, 促进细胞外基质

(ECM)降解,达到抗肝纤维化的作用<sup>[24]</sup>。MAPK 是多种过程的关键信号通路,激活并磷酸化下游蛋白<sup>[25]</sup>;参与 HSC 活化,发挥抗氧化、抗炎作用,减轻 CCL<sub>4</sub> 诱导的肝损伤和肝纤维化<sup>[26]</sup>。研究发现,抑制 MAPK 信号传导可以预防 Con A 诱导的 AIH 小鼠肝损伤<sup>[27]</sup>。cAMP 信号通路是环核苷酸信号传导通路的一种,可以抑制 TNF- $\alpha$  和 IL-17 的产生,减轻对肝脏的刺激,抑制 T 细胞中 cAMP 的降解,改善 ConA 诱导的 AIH 小鼠炎症和预后<sup>[28]</sup>。

### 3.4 健脾养肝汤能改善 ConA 诱导的肝损伤

尾静脉注射 Con A 后,小鼠出现精神萎靡、低体温、体重下降甚至死亡,经泼尼松龙和健脾养肝汤干预后情况有所好转,死亡数量减少。健脾养肝汤组小鼠体重波动增加接近正常组,而泼尼松龙组体重明显低于正常组,且后期出现了活动增加、部分亢奋躁动、易激惹等状态,考虑可能长时间使用糖皮质激素后出现药物相关性神经系统紊乱,低体重可能与异常高代谢相关,小鼠肝脏质地过软易烂,病理显示明显肝细胞变性。一项研究中,经地塞米松[0.5 mg/(kg·d)]治疗 ConA 诱导的小鼠肝损伤也出现了明显体重下降和更为严重的肝细胞变性<sup>[29]</sup>。Con A 的注射剂量、持续时间与诱导的肝脏炎症严重程度呈正相关<sup>[30]</sup>。不同于大剂量单次注射 Con A 诱发的急性肝损伤在数小时内肝酶水平即达到峰值、伴肝细胞大片坏死、大量炎症细胞浸润,反复小剂量注射 Con A 后,病理及血清学主要表现为慢性肝损伤,类似 AIH 慢性疾病过程。本实验为慢性肝损伤模型,模型组小鼠血清 ALT、AST 和 DBIL 水平有所升高,泼尼松龙组、健脾养肝汤组小鼠治疗后与空白组水平相当。模型组小鼠肝脏体积明显增大,质地膨胀较韧,病理显示汇管区明显炎症细胞浸润,经泼尼松龙、健脾养肝汤治疗后肝脏外观和质地均有一定改善,病理炎症细胞也明显减少,其中泼尼松龙组小鼠的炎症改善情况稍优于健脾养肝汤组。

综上,泼尼松龙组小鼠肝脏病理炎症改善优于健脾养肝汤组,但存在脂肪变性、肝脏组织软烂易碎、体重显著降低,亢奋躁动、易激惹等情况;健脾养肝汤小鼠虽肝脏病理炎症改善稍逊于泼尼松龙组,但体重趋于正常组,无明显相关紊乱状态,二者均有各自优势与不足。在临床治疗中,当权衡利弊应用相关药物,尽可能发挥二者优势,避免药品不良反应。

### 3.5 健脾养肝汤降低 TNF- $\alpha$ 水平

TNF 是炎症反应的核心细胞因子,参与多种自身免疫性疾病。基于此,本研究进一步检测了血浆 TNF- $\alpha$  水平,结果显示,模型组小鼠血浆 TNF- $\alpha$  水平明显升高,泼尼松龙组、健脾养肝汤组小鼠治疗后血浆 TNF- $\alpha$  水平均明显降低,证实了健脾养肝汤能改善 Con A 诱导的肝脏炎症损伤。

### 3.6 健脾养肝汤靶向调控 JAK2/STAT3、PI3K/Akt 信号通路,减轻 ConA 诱导的肝损伤

KEGG 分析中,取信号通路相关信息,PI3K/Akt 信号通路的排序居首位,PI3K/Akt 常与多个通路相交互。转录激活子 STAT3 是网络药理学预测的健脾养肝汤治疗 AIH 的另一核心靶点。JAK 是 STAT3 最重要的上游因子。JAK-STAT 信号通路广泛介导细胞增殖、分化、炎症反应和免疫调节,又称为 IL-6 信号通路,可被广泛的激素、细胞因子如 IL、干扰素等激活<sup>[31]</sup>;该通路的持续激活与许多免疫和炎症性疾病密切相关,如多发

性硬化症、肿瘤、类风湿性关节炎、炎症性肠病、系统性红斑狼疮等<sup>[32-33]</sup>。PI3K/Akt 信号通路可作为 JAK/STAT 信号通路的中间环节参与细胞转录调控,基于此,本研究将核心靶点和关键作用途径相结合并进行验证。结果显示,模型组小鼠肝组织 p-JAK2、p-Akt、PI3K、p-STAT3 蛋白表达水平均明显升高,经泼尼松龙和健脾养肝汤治疗后,p-JAK2、p-Akt、PI3K、p-STAT3 蛋白表达水平均明显下降,主要调控磷酸化蛋白为主。提示健脾养肝汤可能通过靶向调控 JAK2/STAT3、PI3K/Akt 信号通路,减轻 Con A 诱导的肝损伤。

综上所述,健脾养肝汤可以改善 AIH 小鼠的肝功能和炎症因子表达,减轻组织炎症细胞浸润,其保护作用机制可能与靶向调控 JAK/STAT 和 PI3K/Akt 信号通路相关。

### 参考文献

- [1] LV T T, LI M, ZENG N, et al. Systematic review and meta-analysis on the incidence and prevalence of autoimmune hepatitis in Asian, European, and American population [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2019, 34(10): 1676-1684.
- [2] LI Y, YAN L, WANG R, et al. Correction to: serum immunoglobulin G levels predict biochemical and histological remission of autoimmune hepatitis type 1: a single-center experience and literature review [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2022, 62(2): 382.
- [3] WANG Q X, YAN L, MA X. Autoimmune hepatitis in the Asia-Pacific area [J]. J Clin Transl Hepatol, 2018, 6(1): 48-56.
- [4] MACK C L, ADAMS D, ASSIS D N, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis in adults and children: 2019 practice guidance and guidelines from the American Association for the Study of Liver Diseases [J]. Hepatology, 2020, 72(2): 671-722.
- [5] 蔡岳. 熊去氧胆酸胶囊联合健脾乐颗粒治疗自身免疫性肝炎对外周血 Beclin1 及 Th1/Th2 平衡指标的影响 [J]. 中国药物经济学, 2023, 18(4): 84-87.
- [6] 郝健亨, 陈浩, 高艳, 等. 柴胡皂苷 d 对自身免疫性肝炎小鼠差异表达基因 CTLA-4、IL-10 和 IL-17 的影响 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(3): 303-309.
- [7] 崔娜娜, 王绮夏, 马雄. 《2019 年美国肝病学会实践指引和指南:成人和儿童自身免疫性肝炎的诊断与治疗》摘译 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(4): 758-763.
- [8] 王梦恒. 护肝布祖热颗粒治疗小鼠免疫性肝损伤作用机制研究 [D]. 武汉:湖北中医药大学, 2022.
- [9] 于盈盈, 孙婷婷, 杨润萌, 等. 基于 Th17/Treg 轴探讨健脾养肝汤治疗自身免疫性肝炎的分子机制 [J]. 长春中医药大学学报, 2024, 40(12): 1330-1334.
- [10] 郝君玉, 陈虹秀, 范文艳, 等. 自身免疫性肝炎中医证型与临床特点的多中心回顾性研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(16): 2228-2232, 2240.
- [11] WU L W, WANG C F, LI J J, et al. Hepatoprotective effect of quercetin via TRAF6/JNK pathway in acute hepatitis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 1137-1146.
- [12] ALKANDAHRI M Y, PAMUNGKAS B T, OKTOBA Z, et al. Hepatoprotective effect of kaempferol: a review of the dietary sources, bioavailability, mechanisms of action, and safety [J]. Adv Pharmacol Pharm Sci, 2023, 2023: 1387665.
- [13] KHAN Z, NATH N, RAUF A, et al. Multifunctional roles and pharmacological potential of  $\beta$ -sitosterol: emerging evidence toward

- clinical applications[J]. Chem Biol Interact, 2022, 365: 110117.
- [14] YIN Y X, LIU X F, LIU J P, et al. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 28(9): 1525-1533.
- [15] LIANG M, LIWEN Z, YUN Z, et al. Serum levels of IL-33 and correlation with IL-4, IL-17A, and hypergammaglobulinemia in patients with autoimmune hepatitis[J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 7964654.
- [16] TIEGS G, HORST A K. TNF in the liver: targeting a central player in inflammation[J]. Semin Immunopathol, 2022, 44(4): 445-459.
- [17] MAREI H E, ALTHANI A, AFIFI N, et al. p53 signaling in cancer progression and therapy[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 703.
- [18] CANER A, ASIK E, OZPOLAT B. SRC signaling in cancer and tumor microenvironment[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1270: 57-71.
- [19] ZHAO J, QI Y F, YU Y R. STAT3: a key regulator in liver fibrosis[J]. Ann Hepatol, 2021, 21: 100224.
- [20] XU W F, WANG Y N, JIN C Z, et al. IL-17 imbalance promotes the pyroptosis in immune-mediated liver injury through STAT3-IFI16 axis[J]. Immune Netw, 2023, 23(6): e46.
- [21] ANYONA S B, HENGARTNER N W, RABALLAH E, et al. Cyclooxygenase-2 haplotypes influence the longitudinal risk of malaria and severe malarial anemia in Kenyan children from a holoendemic transmission region[J]. J Hum Genet, 2020, 65(2): 99-113.
- [22] DONG L L, DU H L, ZHANG M Y, et al. Anti-inflammatory effect of Rhein on ulcerative colitis via inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and regulating gut microbiota[J]. Phytother Res, 2022, 36(5): 2081-2094.
- [23] YANG J L, PI C C, WANG G H. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 699-707.
- [24] WU X, LUO Y H, WANG S, et al. AKAP12 ameliorates liver injury via targeting PI3K/AKT/PCSK6 pathway[J]. Redox Biol, 2022, 53: 102328.
- [25] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [26] GONG X, SHAN L L, CAO S S, et al. Notoginsenoside R1, an active compound from *Panax notoginseng*, inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis via MAPK signaling pathway[J]. Am J Chin Med, 2022, 50(2): 511-523.
- [27] ZHANG M, LI Q X, ZHOU C S, et al. Demethyleneberberine attenuates concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice through inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 106137.
- [28] SWIERCZEK A, POMIERNY B, WYSKA E, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of selective phosphodiesterase inhibitors in a mouse model of autoimmune hepatitis[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2022, 381(2): 151-163.
- [29] JIANG S L, HU X D, LIU P. Immunomodulation and liver protection of Yinchenhao decoction against concanavalin A-induced chronic liver injury in mice[J]. J Integr Med, 2015, 13(4): 262-268.
- [30] 高丽萍. Th17/Treg 细胞免疫失衡及相关因子在大鼠自身免疫性肝炎模型中的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [31] HU X Y, LI J, FU M R, et al. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 402.
- [32] XIN P, XU X Y, DENG C J, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 106210.
- [33] XUE C, YAO Q F, GU X Y, et al. Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 204.

(收稿日期:2024-06-16 修回日期:2024-12-09)

(上接第 678 页)

- [4] 陈靖明, 吴玉英, 颜明珠, 等. 家庭药师模式对轻型缺血性卒中患者用药依从性健康教育及疾病复发的影响研究[J]. 基层医学论坛, 2024, 28(5): 14-16.
- [5] 高艳玲, 周敏华, 区惠燕. 家庭药师服务模式管理老年高血压患者的药物经济学评价[J]. 中国药物经济学, 2024, 19(4): 24-28.
- [6] 徐慧, 阮伟峰, 马天红, 等. 家庭药师服务模式对稳定期慢性阻塞性肺疾病患者的影响[J]. 中国医药导报, 2023, 20(25): 94-98.
- [7] 姚瑶, 张兆林. 基层家庭药师在家庭医生签约服务工作中的实践与思考[J]. 中国农村卫生, 2024, 16(2): 53-55.
- [8] 中国老年医学学会高血压分会, 北京高血压防治协会, 国家老年疾病临床医学研究中心(中国人民解放军总医院, 首都医科大学宣武医院). 中国老年高血压管理指南 2023[J]. 中华高血压杂志, 2023, 31(6): 508-538.
- [9] 吴晓玲, 赵志刚, 于国超. 家庭药师服务标准与路径专家共识[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(7): 1-6.
- [10] ZHANG Y F, WANG R R, CHEN Q M, et al. Reliability and validity of a modified 8-item Morisky medication adherence scale in patients with chronic pain[J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(8): 9088-9095.
- [11] 吴波, 周学馨. 中国老龄社会治理评估指标体系建构与实证研究[J]. 云南大学学报(社会科学版), 2024, 23(3): 86-97.
- [12] 刘勉纯, 欧慧华, 叶建华. 新型家庭药师服务模式对提高慢病居民药物合理用药认知度和慢病控制情况的效果观察[J]. 中国处方药, 2022, 20(12): 65-67.
- [13] 吕小辉, 何文婷, 柯冰玫, 等. 家庭药师参与家庭医生团队对社区老年性高血压患者药物治疗管理的干预[J]. 临床合理用药, 2023, 16(16): 122-125.
- [14] 王松, 刘海林, 周春巧, 等. 家庭药师服务模式对 PCI 术后冠状动脉粥样硬化性心脏病患者用药依从性及有效性的影响[J]. 中国药业, 2023, 32(15): 25-28.
- [15] 赵玲, 杜祥霞, 高志瑞. 高血压、高脂血症合并糖尿病患者家庭药箱及药师干预治疗分析[J]. 中国医药指南, 2021, 19(19): 41-42, 45.
- [16] 施利波, 朱田柱, 沈美, 等. 药师参与家庭医生团队实施药学服务对高血压治疗的影响[J]. 药学服务与研究, 2021, 21(6): 424-427.
- [17] 伍清芳, 刘可欣, 杨诗雯, 等. 基于 CiteSpace 的国内外家庭药师实践进展[J]. 医药导报, 2024, 43(1): 68-77.
- [18] 孙梦瑶, 邓敏, 周全, 等. 老龄化背景下居家药学服务开展现状及建议[J]. 药学实践与服务, 2023, 41(2): 130-134.

(收稿日期:2024-12-09 修回日期:2025-02-25)