

# 基于网络药理学和动物实验探讨柠檬苦素抗肝纤维化的作用机制

肖玉洪<sup>1,2</sup>, 安祯祥<sup>1,3\*</sup>, 王芳<sup>1,3</sup>, 王锦雯<sup>1</sup>, 邵霞<sup>1</sup>, 袁颖<sup>1</sup>(1. 贵州中医药大学第一临床医学院, 贵阳 550001; 2. 达州市达川区中医院, 四川 达州 635000; 3. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550001)

**摘要:** 目的 通过网络药理学方法探讨柠檬苦素治疗肝纤维化的作用机制, 并运用分子对接和动物实验进行验证。方法 首先, 利用 SwissTargetPrediction、GeneCards 和 DisGeNet 等数据库筛选柠檬苦素和肝纤维化的靶点, 并运用微生信网站获得柠檬苦素与肝纤维化的共同靶点。然后运用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建共同靶点的蛋白质相互作用网络, 并利用 CytoNCA 插件筛选核心靶点; 使用 Metascape 数据库对共同靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析, 以预测其可能的作用机制。最后运用 AutoDock Vina 软件对柠檬苦素与核心靶蛋白进行分子对接验证, 并将网络药理学预测结果进行动物实验验证。**结果** 预测结果表明柠檬苦素可能作用于 AKT1、VEGFA、HIF1A 等 86 个靶点, 参与激素应答、蛋白磷酸化、血管生成等生物过程和 PI3K/AKT 通路、HIF-1 通路、VEGF 通路等与肝纤维化相关的信号通路。蛋白质相互作用分析结果显示核心靶点包括 AKT1、VEGFA、HIF1A、PIK3CA 等 11 个靶点。分子对接结果表明柠檬苦素与 AKT1、VEGFA、HIF1A 3 个核心靶蛋白具有较强的结合活性和稳定的结合构象。动物实验显示, 与模型组比较, 柠檬苦素高剂量 (high-dose group of limonin, LH) 组、柠檬苦素低剂量 (low-dose group of limonin, LL) 组中血清透明质酸 (hyaluronidase, HA)、层黏连蛋白 (laminin, LN) 含量 (LL 组中 LN 除外) 均下降 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 肝组织炎症和纤维化程度均减轻; Western blotting 和实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测显示 LH、LL 组肝组织中 AKT、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白和 mRNA 表达水平 (LL 组中 VEGF 除外) 均下调 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论 柠檬苦素主要作用于 AKT1、VEGFA、HIF1A 等核心靶点来干预肝纤维化血管新生, 其机制可能与其抑制 AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路有关。

**关键词:** 网络药理学; 分子对接; 柠檬苦素; 肝纤维化; 血管新生

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)04-0460-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223848

引用本文: 肖玉洪, 安祯祥, 王芳, 等. 基于网络药理学和动物实验探讨柠檬苦素抗肝纤维化的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(4): 460-468.

## Explore the Mechanism of Limonin Against Hepatic Fibrosis Based on Network Pharmacology and Animal Experiments

XIAO Yuhong<sup>1,2</sup>, AN Zhenxiang<sup>1,3\*</sup>, WANG Fang<sup>1,3</sup>, WANG Jinwen<sup>1</sup>, SHAO Xia<sup>1</sup>, YUAN Ying<sup>1</sup>(1. The First Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China; 2. Dazhou City, Dachuan District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dazhou 635000, China; 3. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the mechanism of limonin treating in hepatic fibrosis through network pharmacology, and validate its mechanism by molecular docking and animal experiments. **METHODS** Firstly, the targets of limonin and hepatic fibrosis were screened from the SwissTargetPrediction, GeneCards and DisGeNet database, etc. Meanwhile, the common targets of limonin and hepatic fibrosis were obtained from the bioinformatics website. The protein-protein interaction network of common target was constructed by using STRING database and Cytoscape software, and the CytoNCA plug-in was used to screen core targets. And then the enrichment analysis of GO and KEGG on the common target was performed by Metascape database. Thereby, the possible mechanism of limonin against hepatic fibrosis were predicted. Finally, the AutoDock Vina was used for molecular docking verification, and the prediction results of network pharmacology were verified by animal experiments. **RESULTS** The prediction results indicated that limonin might act on 86 targets including AKT1, VEGFA and HIF1A, and participated in biological processes including hormone response, protein phosphorylation, angiogenesis, and PI3K-Akt pathway, HIF-1 pathway, VEGF pathway and other signaling pathways related to hepatic fibrosis. The results of protein-protein interaction network topology analysis showed that the 11 core targets including AKT1, VEGFA, HIF1A and PIK3CA, etc. Molecular docking results showed that

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160893, 81760865); 国家中医药管理局第五批全国中医临床优秀人才研修项目 (国中医药人教函 [2022] 1 号); 贵州中医药大学中医脾胃病科技创新人才团队建设 (贵中医 TD[2022]005 号)

作者简介: 肖玉洪, 男, 硕士生 E-mail: paulhsiao2021@163.com \*通信作者: 安祯祥, 男, 博士, 主任医师, 教授, 博导 E-mail: 407206115@qq.com

limonin had strong affinity and relatively stable binding conformation with the core targets. In the animal experiments, compared with the model group, hyaluronidase(HA) and laminin(LN) in rat serume in high-dose group of limonin(LH) and low-dose group of limonin(LL)(except for LN in LL group) were declined( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ), and the degree of inflammation and hepatic fibrosis were relieved to different degrees in liver tissue of the LH group and LL group; Western blotting and qPCR detection showed that protein and mRNA expression levels of AKT, HIF-1 $\alpha$  and VEGF(except for VEGF in LL group) was down-regulated in the LH group and LL group( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). **CONCLUSION** Limonin may acts on AKT1, VEGFA, HIF1A and other core targets to treat hepatic fibrosis angiogenesis, which may be related to the inhibition of AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway.

**KEYWORDS:** network pharmacology; molecular docking; limonin; hepatic fibrosis; angiogenesis

肝纤维化是由于肝内细胞外基质过度沉积和(或)降解减少导致的病理过程,是所有慢性肝病向肝硬化进展的必经阶段<sup>[1]</sup>。研究表明,肝纤维化经有效治疗后是可以阻止甚至逆转的<sup>[2]</sup>。目前尚无批准治疗肝纤维化的化学药物。近年来研究发现,中药及中药单体能改善肝纤维化水平,如姜黄素片、复方鳖甲软肝片在临床研究中均取得良好的治疗效果<sup>[3-4]</sup>。由于中药具有低毒性、多靶点及多途径等优势,目前已成为肝病研究的热点。

柠檬苦素又名黄柏内酯、吴茱萸内酯,是存在于芸香科和楝科植物中的一种三萜类化合物,也是中药黄连、黄柏的主要活性成分之一<sup>[5-6]</sup>,具有护肝、抗氧化应激、抗炎等多种药理活性<sup>[7]</sup>。已有文献报道,柠檬苦素通过抑制炎症、氧化应激和减少脂质积累来缓解非酒精性脂肪肝病<sup>[8]</sup>,还可通过抑制 TGF- $\beta$ 1/smad 信号通路来减轻小鼠肺纤维化<sup>[9]</sup>。故推测柠檬苦素对肝纤维化有潜在的治疗价值,但其分子机制尚不明确。网络药理学是融合系统生物学、分子药理学和基因组学等多个学科,从系统和整体角度上研究药物作用于机体的核心靶点及其分子机制。本研究运用网络药理学方法预测柠檬苦素抗肝纤维化的核心靶点及其分子机制,并运用分子对接和动物实验方法进行验证,为下一步深入研究柠檬苦素抗肝纤维化的作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

柠檬苦素(南京春秋生物工程有限公司,批号:NMKS20210812;纯度:99.58%);秋水仙碱片(西双版纳版纳药业有限责任公司,批号:201202;国药准字 H53021369);层黏连蛋白(laminin, LN)ELISA 试剂盒、透明质酸(hyaluronidase, HA)ELISA 试剂盒均购自 Bioswamp 公司,货号分别为 RA20606/20211010, RA20032/20211010;一步法荧光定量反转录 PCR 试剂盒(Vazyme 公司,

批号:7E220E8);HRP 标记的羊抗兔及羊抗鼠 IgG 抗体(二抗)均购自康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 20330, 30324;AKT 一抗(Proteintech 公司,批号为 10021367);VEGF 一抗、HIF-1 $\alpha$  一抗均购自北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 BJ11307117, AF01217172;GAPDH 一抗(英国 Abcam 公司,批号:GR3316865-11)。

EPS-300 电泳仪(上海天能科技有限公司);QuantStudio 1 型实时荧光定量仪(Applied Biosystems 公司);Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System 蛋白电泳槽和 Mini Trans-Blot 蛋白转印系统均购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 动物

SD 大鼠 42 只(SPF 级,♂),体质量 180~220 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司[动物生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001],于贵州中医药大学实验动物中心饲养及实验,实验期间大鼠自由饮水摄食。本实验由贵州中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号:20210008)。

### 1.3 柠檬苦素和肝纤维化靶点的预测

通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得柠檬苦素(CAS:1180-71-8)的 sdf 2D 结构式,然后将其导入 SwissTarget-Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)和 SuperPred 数据库(<http://prediction.charite.de/>)中进行反向钓靶,之后将靶蛋白在 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)中进行名称规范化并转换为基因简称,最后合并 2 个数据库并去重后获得柠檬苦素靶点。同时以“Liver fibrosis”和“hepatic fibrosis”为检索词,在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)中进行检索,其中 GeneCards 数据中以“Relevance score” $\geq 2$  倍中位数及 DisGeNet 数据中以“score” $\geq 0.3$  为条件

筛选靶点，同样将所有靶点进行规范化及去重后获得肝纤维化靶点。

#### 1.4 蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建和核心靶点的筛选

利用微生信网站 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 将柠檬苦素和肝纤维化靶点取交集并绘制 Venn 图，得到柠檬苦素抗肝纤维化的潜在靶点。将上述靶点提交至 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 中进行分析，物种限定为人，互作得分  $>0.4$ ，获得 PPI 网络。将其 TSV 文件导入 Cytoscape 软件中进行可视化。最后利用软件中 CytoNCA 插件进行拓扑分析，以同时大于中介中心性 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC)、度中心性 (degree centrality, DC)、特征向量中心性 (eigenvector centrality, EC)、网络中心性 (network centrality, NC) 和局部平均连通性 (local average connectivity, LAC) 6 个参数的中位数为筛选条件并进行 2 次筛选<sup>[10]</sup>。前面 6 个参数值意味着节点在网络中的重要性，所以筛选出的靶点为柠檬苦素抗肝纤维化的核心靶点。

#### 1.5 GO 功能注释与 KEGG 通路富集分析

Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>) 是一个具有强大功能的基因及蛋白质功能注释及分析数据库，已广泛应用 GO 功能注释与 KEGG 通路富集分析中，具有数据更新快和覆盖面广等特点。将交集靶点导入 Metascape 数据库中，物种限定为“Homo sapiens”，设定阈值  $P < 0.01$ ，进行 GO 功能注释分析和 KEGG 通路富集分析，探究柠檬苦素干预肝纤维化的作用机制。

#### 1.6 分子对接验证

通过 PubChem 数据库下载柠檬苦素 sdf 2D 结构式，并通过 Chem3D 软件进行能量最低化处理作为配体。在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中下载核心靶蛋白的 3D 结构，并经去除水分子、配体后作为受体。之后利用 AutoDockTools 1.5.6、AutoDock Vina 1.1.2、PyMOL 2.4.0 及 Discovery Studio 2019 软件将配体和受体进行分子结构处理、分子对接及可视化操作。然后依据分子对接评分 affinity 判断其结合活性，一般认为结合能越低，其结合的构象越稳定。其中  $\leq -17.79 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  认为配体与受体之间有一定的结合

活性， $\leq -20.93 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  表明结合活性较好， $\leq -29.30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  表明结合活性比较强烈<sup>[11]</sup>。

#### 1.7 动物实验验证

**1.7.1 分组、造模、灌胃** 42 只大鼠随机分成正常组、模型组、秋水仙碱组 ( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )<sup>[12]</sup>、柠檬苦素低剂量组 ( $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、柠檬苦素高剂量组 ( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )<sup>[9]</sup>，正常组和模型组各 9 只大鼠，其余每组各 8 只。除正常组外其余各组用 50%  $\text{CCl}_4$  橄榄油混合溶液腹腔注射造模，剂量为  $1.5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，正常组予等量的橄榄油腹腔注射，每周 2 次，造模共计 8 周<sup>[13]</sup>。造模结束后，从正常组和模型组中各抽取 1 只大鼠处死，将肝脏行 HE 染色并根据肝纤维化 Scheuer 评分系统来评估模型是否制备成功<sup>[14]</sup>。从第 9 周开始，各给药组予相应的药物灌胃，模型组与正常组予等量的蒸馏水灌胃，每天 1 次，灌胃共计 4 周。

**1.7.2 标本采集** 大鼠末次灌胃后，禁食 12 h，3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，然后腹主动脉采血，离心后收集上层血清， $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存用于 ELISA 检测。取血完成后处死各组大鼠，将部分肝脏以 4% 多聚甲醛固定，用于 HE 及 Masson 染色；剩余部分立即冻存在  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱，用于 Western blotting 和 PCR 检测。

**1.7.3 血清 ELISA 检测** 采用 ELISA 法检测血清中 HA、LN 的水平，具体实验步骤参照试剂盒说明书。

**1.7.4 肝组织病理学观察** 取“1.7.2”项下甲醛固定的肝脏，每组随机取 3 个，行石蜡包埋、切片后行 HE 及 Masson 染色，镜下观察肝组织的形态并采集图像。

**1.7.5 Western blotting 检测肝组织 AKT、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白相对表达水平** 每组随机取 3 个样本，并称取肝组织质量。将肝组织剪碎后在裂解缓冲液中提取蛋白质，计算各样本蛋白含量。然后用 10% 的 SDS-PAGE 灌胶、上样、电泳，分离目的蛋白，并将其转膜到 PVDF 膜上。膜在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下用抗体孵育过夜，然后与 HRP 偶联的二抗孵育。洗涤后，在暗室中利用胶片及 ECL 化学发光液分别进行曝光定影。采用 Gel-Pro analyzer4 图像分析软件测定各条带的灰度值，以 GAPDH 为内参。

**1.7.6 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠肝组织内 AKT、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 的表达** 每组随机

取3个样本，Trizol法提取总RNA，测定RNA纯度和浓度。使用一步法逆转录实时荧光定量PCR试剂盒进行逆转录为cDNA和PCR扩增。反应条件：55℃逆转录5min，95℃预变性5min，95℃变性10s，60℃退火30s，共45个循环。以GAPDH为内参基因， $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达水平。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成，引物序列见表1。

表1 PCR引物序列  
Tab.1 Primers sequence of PCR

引物	引物序列	长度/bp
AKT	上游5'-TGTTTGTGGGCTCCTGAAT-3'	135
	下游5'-GGCATCTATGGGTCTGTGG-3'	
HIF-1 $\alpha$	上游5'-ACTATGTCGCTTTCTTGG-3'	195
	下游5'-GTTTCTGCTGCCTTGTAT-3'	
VEGF	上游5'-CCTGGCTTTACTGCTGTACCT-3'	61
	下游5'-GCTGGTAGACTCCATGAAC-3'	
GAPDH	上游5'-CAAGTTCACGGCACAG-3'	138
	下游5'-CCAGTAGACTCCACGACAT-3'	

1.7.7 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素

方差分析，两两比较选择LSD检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 柠檬苦素抗肝纤维化靶点的筛选

通过PubChem数据库获得柠檬苦素sdf格式的2D结构式，然后将其导入SwissTargetPrediction和SuperPred数据库中获得柠檬苦素靶点189个。同时经DisGeNET和GeneCards数据库筛选共得到肝纤维化靶点1979个。最后将药物与疾病的基因Symbol导入微生信网站中取交集，获得柠檬苦素抗肝纤维化潜在靶点86个，见图1。

### 2.2 PPI网络的构建与核心靶点的筛选

将潜在靶点导入STRING数据库，得到PPI网络，该网络包含86个节点、628条边、平均度值为14.6。将TSV文件导入Cytoscape软件中可视化并进行拓扑分析，见图1B。图中节点越大、颜色越深表示该节点越重要。然后利用CytoNCA插件分析PPI网络中BC、CC和DC等6个参数，并进行2次筛选，筛选条件见图2。最

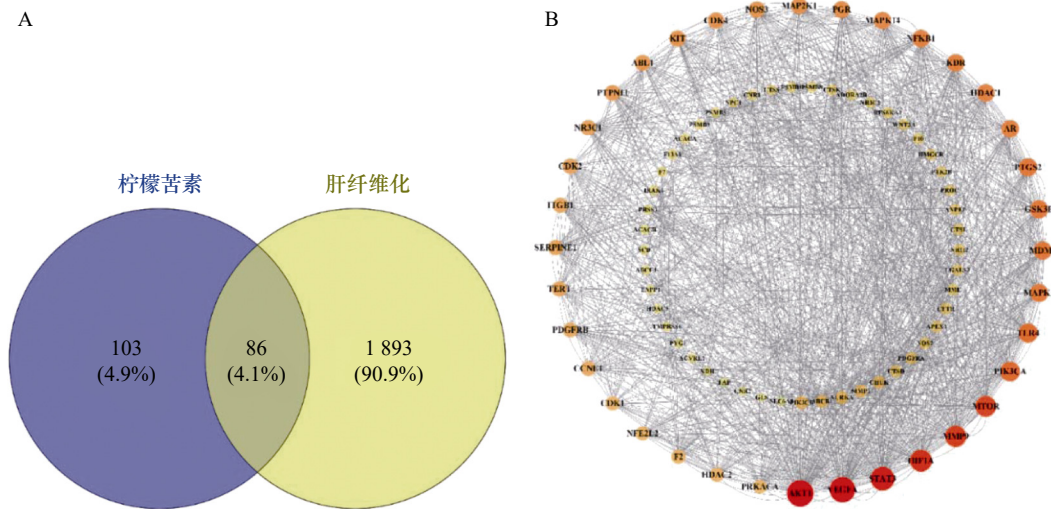


图1 柠檬苦素抗肝纤维化潜在靶点的VENN图(A)和PPI网络图(B)

Fig.1 VENN diagram(A) and PPI network diagram(B) of potential targets of limonin against hepatic fibrosis

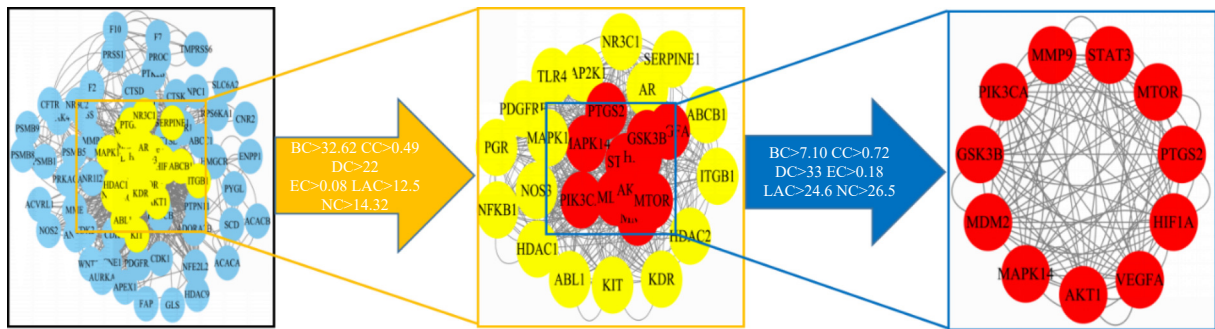


图2 核心基因拓扑分析流程图

Fig.2 Flow chart of core genes topological analysis

后筛选出 AKT1、VEGFA、HIF1A 等 11 个靶点可能是柠檬苦素抗肝纤维化的核心靶点。

### 2.3 GO 功能富集分析

GO 富集分析从生物学过程 (biological processes, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞成分 3 个方面进行分析。GO 富集结果表明, BP 主要包括激素应答、蛋白磷酸化、血管生成等 1 143 个条目; 细胞成分主要包括膜筏、细胞外基质、内溶酶体腔等 80 个条目; MF 主要包括蛋白激酶活性、蛋白激酶结合、内肽酶活性等 95 个条目。在 BP、细胞成分、MF 富集结果中各选 *P* 值排序前 10 个条目, 利用微生信网站绘制气泡图, 见图 3。GO 分析显示血管生成是显著性 BP, 提示血管生成可能是柠檬苦素抗肝纤维化的重要机制。

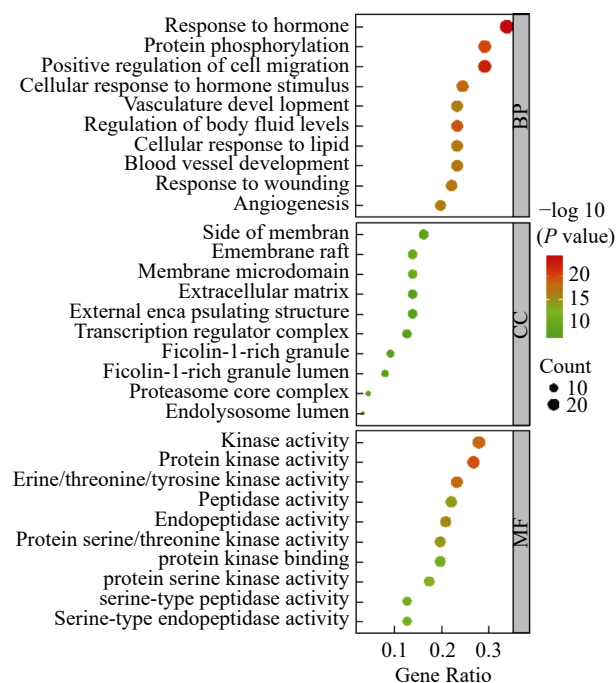


图 3 GO 功能富集分析的气泡图

Fig. 3 Bubble diagram of GO functional enrichment analysis

### 2.4 KEGG 通路富集分析

KEGG 富集结果显示, 潜在靶点共富集 154 条信号通路, 选择 *P* 值排序前 20 条信号通路利用微生信网站进行可视化, 见图 4。其中 PI3K/AKT 通路、HIF-1 通路、VEGF 通路与肝纤维化最为相关。故结合 GO 分析结果, 推测柠檬苦素可能通过 PI3K/AKT 通路作用于 HIF-1/VEGF 通路来干预肝纤维化血管新生。

### 2.5 分子对接分析

在 11 个核心靶点中选择前 3 个靶点 AKT1

(PDBID: 4gv1)、VEGFA(PDBID: 6zbr)、HIF1A (PDBID: 5jwp) 与柠檬苦素进行分子对接。柠檬苦素与 3 个核心靶点对接分数分别为 -41.44, -33.07, -37.67 kJ·mol<sup>-1</sup>。然后利用 PyMOL 和 Discovery Studio 软件将结果进行可视化, 见图 5。所有对接分数均 < -29.30 kJ·mol<sup>-1</sup>, 柠檬苦素与核心靶蛋白的氨基酸残基亲和力强烈, 主要通过强氢键、Pi-Pi 键和范德华力等相结合。分子对接结果表明柠檬苦素与 AKT1、VEGFA、HIF1A 3 个核心靶蛋白具有较强的结合活性和稳定的结合构象。

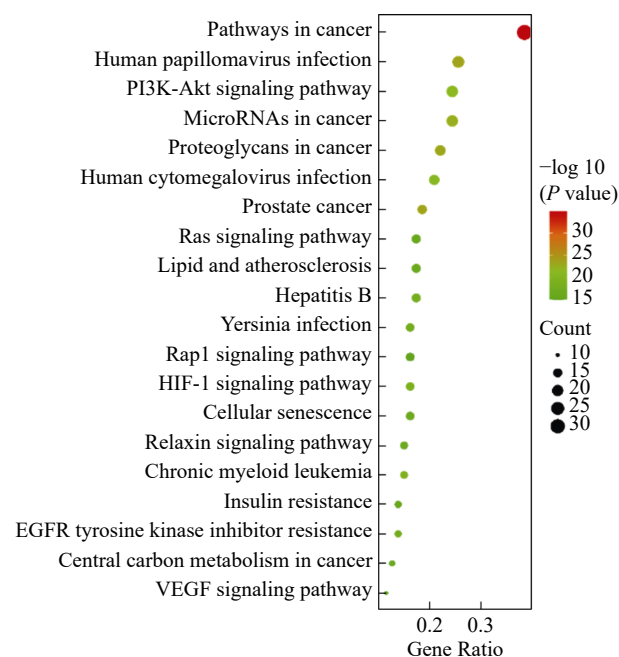


图 4 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 4 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis

### 2.6 动物实验结果

**2.6.1 柠檬苦素对血清纤维化指标 HA、LN 的影响** 与正常组比较, 模型组血清中 HA、LN 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 秋水仙碱组, 柠檬苦素高、低剂量组 HA 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 秋水仙碱组和柠檬苦素高剂量组 LN 含量降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); 柠檬苦素低剂量组中 LN 含量差异没有统计学意义; 与秋水仙碱组比较, 柠檬苦素高剂量组中 HA、LN 含量差异均没有统计学意义。结果见图 6。

**2.6.2 肝组织 HE 染色** 正常组肝组织结构正常, 未见炎细胞浸润及纤维组织增生; 经 CCl<sub>4</sub> 造模后, 模型组大鼠肝组织有大量炎性细胞浸润和纤

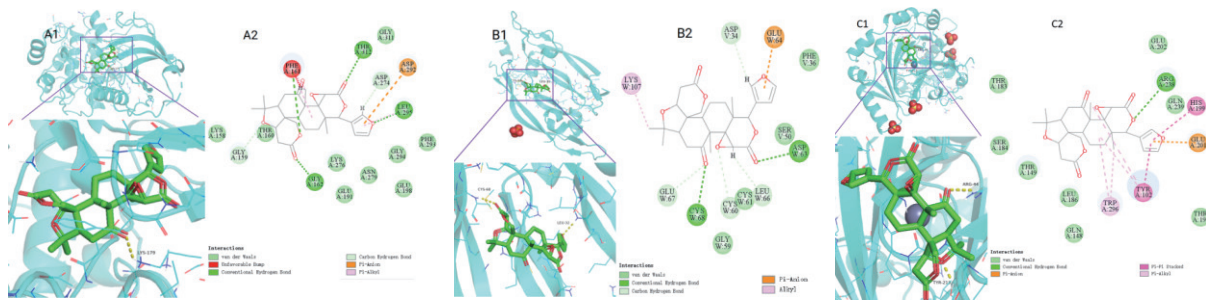


图5 柠檬苦素与核心靶蛋白分子对接示意图

A1, B1, C1 分别为柠檬苦素与 AKT1、VEGFA、HIF1A 的 3D 示意图; A2, B2, C2 分别为柠檬苦素与 AKT1、VEGFA、HIF1A 的 2D 示意图。

Fig. 5 Molecular docking schematic diagrams of limonin and core target protein

A1, B1, C1 were 3D schematic diagrams of limonin and AKT1, VEGFA, HIF1A, respectively; A2, B2, C2 were 2D schematic diagrams of limonin and AKT1, VEGFA, HIF1A, respectively.

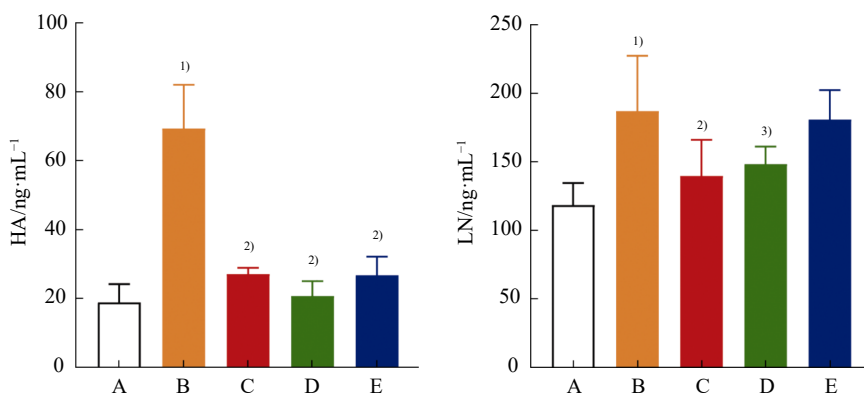


图6 柠檬苦素对血清纤维化指标 HA、LN 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=7\sim 8$ )

A-正常组; B-模型组; C-秋水仙碱组; D-柠檬苦素高剂量组; E-柠檬苦素低剂量组。与正常组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.01$ , <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 6 Effects of limonin on serum fibrosis indicators HA and LN ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=7\sim 8$ )

A-normal group; B-model group; C-colchicine group; D-high dose group of limonin; E-low dose group of limonin. Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ , <sup>3)</sup> $P<0.05$ .

维组织增生, 肝小叶紊乱, 门管区变宽, 散在分布少量坏死肝细胞; 经秋水仙碱及高、低剂量的柠檬苦素干预, 各组肝组织炎症与纤维增生程度均减轻。结果见图 7。

**2.6.3 肝组织 Masson 染色** 正常组仅在汇管区有少许蓝染胶原纤维。经 CCl<sub>4</sub> 造模后, 模型组有大量蓝色染色的胶原纤维沉积, 纤维间隔增大、变宽; 经秋水仙碱及高、低剂量的柠檬苦素干预, 各组蓝染胶原纤维变细, 纤维间隔缩小、变窄。结果见图 8。

**2.6.4 柠檬苦素对肝组织 AKT、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白相对表达的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织 AKT、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白相对表达量显著上调 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 秋水仙碱组, 柠檬苦素高、低剂量组 AKT、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白相对表达量 (柠檬苦素低剂量组中 VEGF 蛋白除外) 均下调 ( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ); 与秋水仙碱组比较, 柠檬苦素高、低剂量组 AKT、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 相对表达量 (柠檬苦素低剂量组中 HIF-1 $\alpha$  蛋白除外) 差异均无统计学意义。结果见图 9。

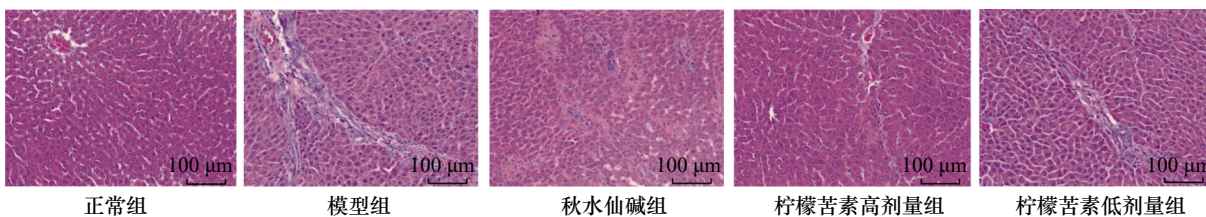


图7 各组大鼠肝脏组织 HE 染色 (200 $\times$ )

Fig. 7 Hepatic HE staining for rats of each group(200 $\times$ )

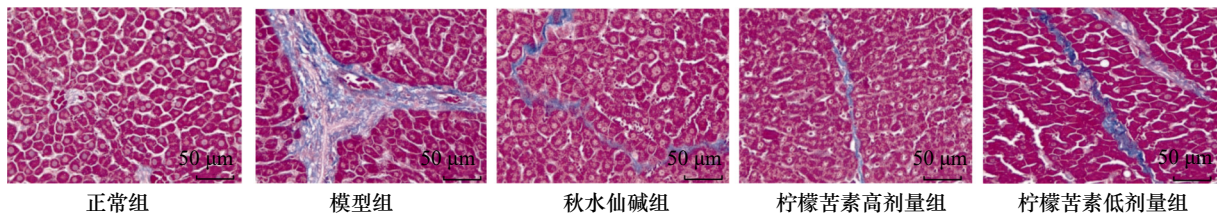


图 8 各组大鼠肝脏组织 Masson 染色 (400×)  
Fig. 8 Hepatic Masson staining for rats of each group(400×)

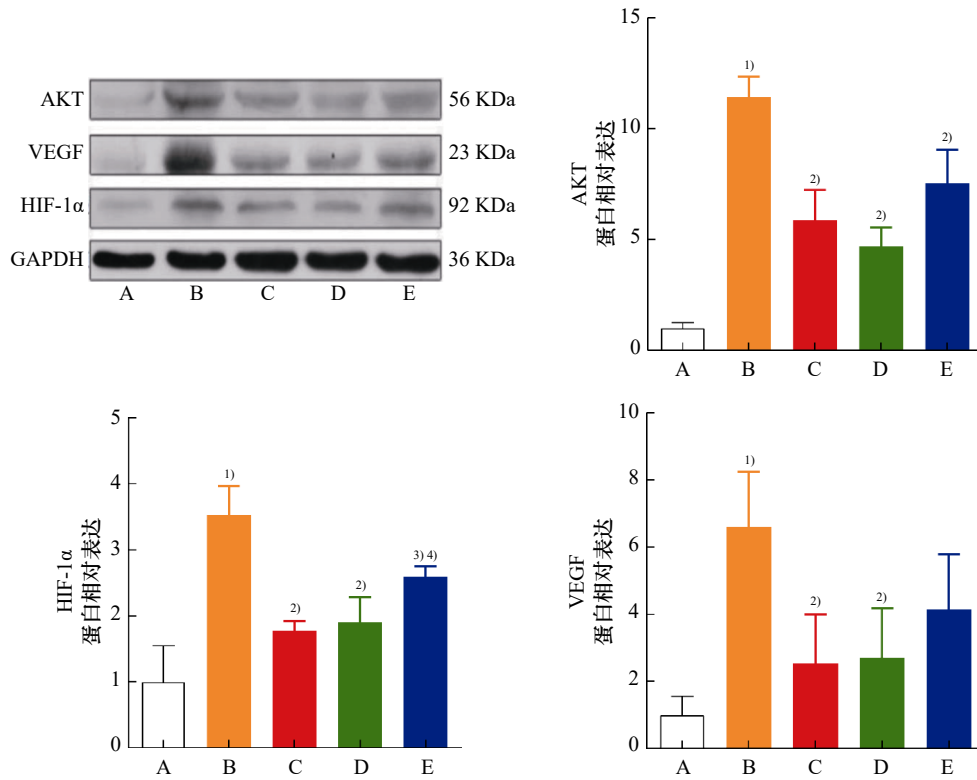


图 9 柠檬苦素对肝纤维化大鼠肝组织 AKT、HIF-1α、VEGF 蛋白相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )  
A-正常组; B-模型组; C-秋水仙碱组; D-柠檬苦素高剂量组; E-柠檬苦素低剂量组。与正常组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.01$ , <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; 与秋水仙碱组比较, <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 9 Effect of limonin on relative expression of AKT, HIF-1α and VEGF proteins of liver tissues in hepatic fibrosis rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )  
A-normal group; B-model group; C-colchicine group; D-high-dose group of limonin; E-low-dose group of limonin; compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ , <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; compared with colchicine group, <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

**2.6.5 柠檬苦素对肝组织 AKT、HIF-1α、VEGF mRNA 相对表达的影响** 与正常组比较, 模型组肝组织 AKT、HIF-1α、VEGF mRNA 表达水平均上调 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 秋水仙碱组, 柠檬苦素高、低剂量组中上述基因 mRNA 表达水平 (柠檬苦素低剂量组中 VEGF mRNA 除外) 均下调 ( $P<0.01$ ); 与秋水仙碱组比较, 柠檬苦素高、低剂量组上述 mRNA 表达水平 (柠檬苦素低剂量组中 VEGF mRNA 除外) 差异均无统计学意义。结果见图 10。

### 3 讨论

中医学并无肝纤维化病名, 现代中医多将其归属于“肝积”“积聚”等范畴<sup>[15]</sup>。肝纤维化多以“湿-热-毒-瘀-虚”为主的动态变化的病理过程, 湿热疫毒之邪贯穿整个疾病始终<sup>[16]</sup>。故清热祛湿法为中医治疗肝纤维化的主要治法之一。黄连、黄柏具有清热燥湿解毒的功效, 且研究发现黄连水提取物可增加肝组织超氧化物歧化酶活性降低氧化应激水平来改善大鼠肝纤维化<sup>[17]</sup>。亦有研究发现柠檬苦素是黄柏在大鼠体内的主要药效物质基础<sup>[18]</sup>。基于黄连、黄柏等清热祛湿中药具

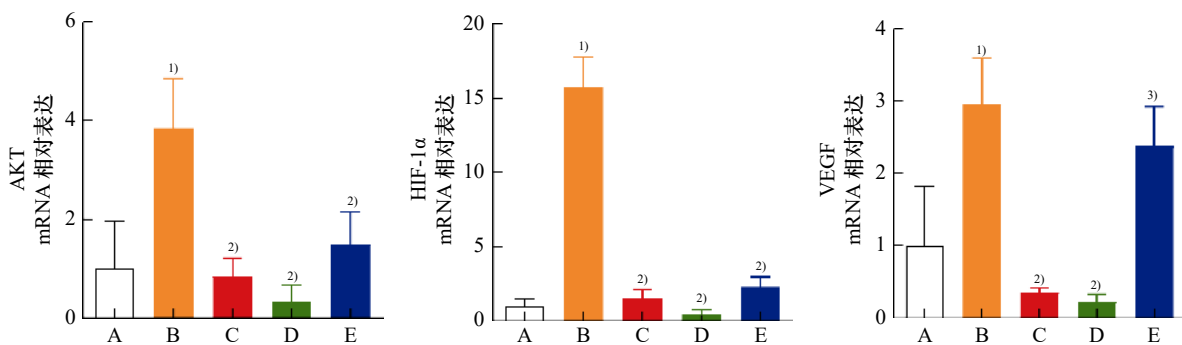


图 10 柠檬苦素对肝组织 AKT、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

A-正常组; B-模型组; C-秋水仙碱组; D-柠檬苦素高剂量组; E-柠檬苦素低剂量组。与正常组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与秋水仙碱组比较, <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 10 Effect of limonin on AKT, VEGF and HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in liver tissues ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

A-normal group; B-model group; C-colchicine group; D-high-dose group of limonin; E-low-dose group of limonin; compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with colchicine group, <sup>3)</sup> $P<0.01$ .

有抗肝纤维化作用, 而作为其主要活性成分的柠檬苦素则表现出良好的保肝、抗肺纤维化作用。故推测柠檬苦素在治疗肝纤维化中有着重要的作用。本研究采用网络药理学方法预测柠檬苦素通过 Akt/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路来干预肝纤维化, 然后用分子对接和动物实验进行验证。

PPI 网络分析发现, AKT1、VEGFA、HIF1A 等 11 个靶点为网络中的核心靶点。GO 及 KEGG 富集分析预测柠檬苦素可通过 PI3K/Akt 通路作用于 HIF-1/VEGF 通路来干预肝纤维化血管新生。蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB/AKT) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 也是 PI3K 蛋白下游关键蛋白, 其活化后磷酸化下游靶蛋白 mTOR 来调控肝星状细胞活化与凋亡、肝窦毛细血管化等<sup>[19]</sup>。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 家族成员有 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C 和 VEGF-D 等, VEGF-A 即通常所说的 VEGF, 是最主要的促血管生成的 VEGF<sup>[20]</sup>。活化的肝星状细胞可以上调 VEGF, 而上调的 VEGF 与其主要受体 VEGFR2 结合, 促进肝窦毛细血管化<sup>[21]</sup>。众所周知, 炎症和缺氧是促进血管新生的 2 个关键因素, 为血管生成提供微环境<sup>[22]</sup>。HIF-1 $\alpha$  在血管新生中起着关键作用, 被称为低氧反应的“总开关”<sup>[23]</sup>。在低氧状态下, HIF-1 $\alpha$  能上调 VEGF、VEGFR 的表达, 从而促进血管新生和肝纤维化的发展<sup>[24]</sup>。由此可见在病理性血管新生过程中, HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路起着非常重要的作用。PI3K/Akt 信号通路可上调下游因子 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达, 进而启动 VEGF 的转录翻译, 发挥促进血管新生的作用<sup>[25]</sup>。因此可通过 AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信

号通路来干预肝纤维化血管新生。

肿瘤的发生发展有着明显的病理性血管新生与重构, 血管新生是肿瘤发生与逆转的关键环节<sup>[26]</sup>。柠檬苦素能抑制 A549 细胞增殖、血管生成、侵袭, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与柠檬苦素抑制 VEGF/VEGFR2 通路而影响肿瘤细胞的增殖和血管生成有关<sup>[27]</sup>。Tang 等<sup>[28]</sup>研究发现, 柠檬苦素通过激活 PI3K/Akt 信号传导来调控细胞静止, 从而减弱肝癌细胞干性。因此, 柠檬苦素可作用于 AKT、VEGF 等蛋白发挥其调控细胞凋亡、细胞周期及抑制血管生成等生物过程。

在本研究中, 分子对接结果表明柠檬苦素与 AKT1、VEGFA、HIF1A 3 个靶蛋白亲和力强烈, 结合构象稳定。在动物实验中, 血清肝纤维化指标 HA、LN 以及 HE、Masson 染色结果表明, CCl<sub>4</sub> 成功地诱发了大鼠的肝纤维化; 经柠檬苦素干预下, 柠檬苦素高、低剂量组炎症与纤维增生程度均减轻, 且与剂量呈正相关。Western blotting 和实时荧光定量 PCR 检测显示, CCl<sub>4</sub> 成功地诱发肝组织 AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路的激活; 经柠檬苦素干预下, 柠檬苦素高、低剂量组中 AKT、VEGF、HIF-1 $\alpha$  (柠檬苦素低剂量组中 VEGF 除外) 的蛋白及 mRNA 相对表达量均降低, 表明 AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路可能被抑制, 且与秋水仙碱组比较无改善作用。本研究表明柠檬苦素可通过 AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路抑制血管新生来改善大鼠肝纤维化水平, 可能与剂量呈正相关。

综上所述, 柠檬苦素主要作用于 AKT1、VEGFA、HIF1A 等核心靶点来干预肝纤维化血管新生, 其机制可能与抑制 AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号

通路有关。本研究通过网络药理学及动物实验对柠檬苦素抗肝纤维化血管新生的分子机制进行初步预测与验证,其具体分子机制还需进一步深入研究。

## REFERENCES

- [1] QIAO M, ZHU Y, ZHAO Y, et al. Study on mechanism of active compounds of celery seed in the treatment of liver fibrosis based on network pharmacology[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2021, 38(3): 257-265.
- [2] ROCKEY D C. Liver fibrosis reversion after suppression of hepatitis B virus[J]. *Clin Liver Dis*, 2016, 20(4): 667-679.
- [3] ZHOU Y K, ZHANG Y M, HAN Y, et al. Clinical research progress of curcumin[J]. *J Bingtuan Med(兵团医学)*, 2016, 47(1): 63-66.
- [4] FAN L Z, WANG X Z. The latest research progress of anti-hepatic fibrosis treatment with traditional Chinese medicine[J]. *Xinjiang J Tradit Chin Med(新疆中医药)*, 2018, 36(1): 147-151.
- [5] WANG X Z, SHEN M T, YAN P J, et al. Research progress on the interaction between alkaloids active components of *Coptis chinensis* and intestinal flora[J]. *China Pharm(中国药房)*, 2021, 32(1): 109-115.
- [6] CHEN F K, LIU X Q. Determination of effective components in traditional Chinese medicine[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 1858.
- [7] YOU W T, WANG S, HE L, et al. Research progress on pharmacological activity of limonin monomer[J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2017, 40(1): 242-246.
- [8] LI Y J, YANG M H, LIN H Y, et al. Limonin alleviates non-alcoholic fatty liver disease by reducing lipid accumulation, suppressing inflammation and oxidative stress[J]. *Front Pharmacol*, 2021(12): 801730.
- [9] WANG X Q, OUYANG Z J, YOU Q, et al. Obaculactone protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016(303): 21-29.
- [10] YAN D, HAN S S. Analysis of the material basis and molecular mechanism of Kang'ai injection in the treatment of hepatocellular carcinoma based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. *Electron J Liver Tumor(肝癌电子杂志)*, 2021, 8(1): 43-52.
- [11] DAN W C, LIU H X, HE Q Y, et al. Based on the network pharmacology and molecular docking method to explore the mechanism of *Dioscorea panthaica* rhizoma in the intervention of coronary heart disease[J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化)*, 2021, 23(6): 1829-1843.
- [12] DING M P, WEI L X, WANG Z W, et al. Effect and mechanism of Biejia Yugan Granules on rats with liver fibrosis[J]. *Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志)*, 2021, 37(10): 1167-1170,1175.
- [13] DAI H Z, AN Z X, HUANG D, et al. Study on mechanism of improvement effects of astragaloside IV on hepatic fibrosis model rats[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2022, 39(10): 1268-1274.
- [14] 中华医学会肝病学会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 肝纤维化诊断及治疗共识(2019年)[J]. *肝脏*, 2019, 24(9): 975-983,996.
- [15] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019年版)[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(11): 1286-1295.
- [16] LEI H W, LEI J, ZHANG S H, et al. Discussion on the etiology and pathogenesis of liver fibrosis from the perspective of "damp-heat epidemic virus" [J]. *Guangming J Chin Med(光明中医)*, 2015, 30(2): 256-258.
- [17] WANG N, FENG Y B, CHEUNG F, et al. A comparative study on the hepatoprotective action of bear bile and *Coptidis Rhizoma* aqueous extract on experimental liver fibrosis in rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012(12): 239.
- [18] KANG L X, XU Z P, LIU Y, et al. Identification of prototype components and their metabolites in rat serum, urine and feces after oral administration of *phellodendri amurensis* cortex aqueous extract by UPLC-orbitrap fusion lumos tribrid-MS[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2021, 27(11): 139-146.
- [19] ZHONG J L, ZHENG L, HE H, et al. Research progress of biological regulatory mechanism related to PI3K/akt signal pathway[J]. *Genom Appl Biol(基因组学与应用生物学)*, 2019, 38(1): 143-147.
- [20] YU Z J, HOU H L, ZHANG X C. Progress in gastric cancer therapy through targeting VEGF/VEGFR pathway[J]. *Chin Clin Oncol(临床肿瘤学杂志)*, 2016, 21(6): 564-568.
- [21] ZHOU N. Regulating VEGF/VEGFR expression in HSC/SEC co-culture system by Shugan Jianpi Huoxue recipe[D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2018.
- [22] CAI J Y, HU M, CHEN Z Y, et al. The roles and mechanisms of hypoxia in liver fibrosis[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 186.
- [23] HASHIMOTO T, SHIBASAKI F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch[J]. *Front Pediatr*, 2015(3): 33.
- [24] CHEN L Y, MA J Z, LIU Y M, et al. Mechanisms of Gexia Zhuyu Decoction on anti-angiogenesis of hepatic fibrosis based on regulation of VEGF mRNA expression mediated by HIF-1 $\alpha$ [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2019, 50(2): 449-456.
- [25] RAJA R, KALE S, THORAT D, et al. Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1 $\alpha$ -mediated VEGF-dependent angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2014, 33(16): 2053-2064.
- [26] FU L, WU S Y, LI M, et al. Research progress on anti-tumor effects by traditional Chinese medicine based on "soothing" or "blockage" regulation of tumor vessels[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2023, 48(19): 5131-5141.
- [27] LI Y, WEN Z, MA F W, et al. Pharmacokinetic study on single and multiple administration of gefitinib emulsion in rats[J]. *China Pharm(中国药房)*, 2020, 31(1): 48-52.
- [28] TANG Z Y, TANG Y T, LI L, et al. Limonin provokes hepatocellular carcinoma cells with stemness entry into cycle via activating PI3K/Akt signaling[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019(117): 109051.

收稿日期: 2022-11-13

(本文责编: 李艳芳)