

## 基于网络药理学与实验验证肝积方抗肝纤维化的作用机制

邓 情<sup>1,2</sup>, 余一帆<sup>1,2</sup>, 严 倩<sup>2,3</sup>, 麦慧琳<sup>1,2</sup>, 林恒琛<sup>1,2</sup>, 曾楚凝<sup>1,2</sup>, 熊 雨<sup>3,4\*</sup>, 王雄文<sup>3,4\*</sup>

1. 广州中医药大学 第一临床医学院, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学 岭南医学研究中心, 广东 广州 510405

3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

4. 广州中医药大学第一附属医院重庆医院, 重庆 400700

**摘要:** **目的** 运用网络药理学及动物实验研究肝积方 (GJR) 抗肝纤维化 (LF) 的机制。 **方法** 构建 LF 模型, 通过苏木素-伊红 (HE)、Masson 染色观察肝脏病理情况; 蛋白免疫印迹法 (Western blotting) 检测肝组织中  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、I 型胶原蛋白 alpha 1 链 (Colla1)、转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 的蛋白表达水平; 采用碱水解法检测肝组织中羟脯氨酸 (HYP) 水平; 采用微板法检测小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 的活性水平。基于中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 和 Swiss Target Prediction 网站筛选 GJR 活性成分作用靶点, 结合 GeneCards 数据库 LF 靶点, 两者取交集获得共同靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络筛选核心靶点, 进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 并通过分子对接预测关键靶点与 GJR 活性成分结合情况。肝组织原位末端标记法 (TUNEL) 染色检测肝细胞凋亡情况; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测肝组织中半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase3)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (BCL2)、促凋亡蛋白 (Bax) 表达水平。体外实验通过 TGF- $\beta$  诱导 LX-2 细胞活化, 加入 GJR 含药血清 (10%、15%、20%) 干预后进行 qRT-PCR、Western blotting 实验观察  $\alpha$ -SMA、Colla1、组织金属蛋白酶抑制因子-1 (TIMP1) 的 mRNA 和蛋白表达变化, 通过流式细胞术观察 LX-2 细胞凋亡情况。 **结果** 体内实验显示, GJR 可减轻肝损伤及胶原沉积, 降低 HYP、ALT、AST 水平, 下调  $\alpha$ -SMA、Colla1、TGF- $\beta$  表达, 减少肝细胞凋亡并调控 Caspase3、BCL2、Bax 表达; 网络药理学筛选出 625 个共同靶点, 核心靶点与凋亡相关, 富集于磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 等通路, 关键成分与核心靶点结合良好; 体外实验显示, GJR 含药血清可下调  $\alpha$ -SMA、Colla1、Timp mRNA 及蛋白表达水平, 促进 LX-2 细胞凋亡。 **结论** 网络药理学及实验验证 GJR 具有抗 LF 作用, 其机制可能是通过 Caspase3/Bcl-2/Bax 信号通路抑制肝细胞凋亡并促进 LX-2 细胞凋亡有关。

**关键词:** 肝积方; 肝纤维化; 细胞凋亡; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)05-1606-15

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.05.012

## Investigating mechanism of Ganji Recipe against hepatic fibrosis based on network pharmacology and experiments

DENG Qing<sup>1,2</sup>, YU Yifan<sup>1,2</sup>, YAN Qian<sup>2,3</sup>, MAI Huilin<sup>1,2</sup>, LIN Hengchen<sup>1,2</sup>, ZENG Chuning<sup>1,2</sup>, XIONG Yu<sup>3,4</sup>, WANG Xiongwen<sup>3,4</sup>

1. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

4. Chongqing Hospital of the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Chongqing 400700, China

收稿日期: 2025-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82474591, 82274605); 重庆市科卫联合中医药青年项目 (2026ZYQN011); 重庆市中医药创新团队 (渝卫办白头 (2024) 570)

作者简介: 邓 情, 博士研究生, 从事中西医结合临床防治肿瘤研究。E-mail: 20232120157@stu.gzucm.edu.cn

\*通信作者: 王雄文, 博士, 主任医师, 从事中西医结合临床防治肿瘤研究。E-mail: awen681029@163.com

熊 雨, 博士后, 从事中西医结合临床防治肿瘤研究。E-mail: xiongyu@cqbbzyy.com

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of Ganji Recipe (GJR) antiliver fibrosis (LF) using network pharmacology and experimental validation. **Methods** The LF model was established. Liver pathology was observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Protein expression levels of  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), collagen type I alpha 1 chain (Col1a1), and TGF- $\beta$  in liver tissue were detected by Western blotting. Hydroxyproline (HYP) content in liver tissue was measured by alkaline hydrolysis. Serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined using microplate assays. Potential targets of active components in GJR were screened from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and SwissTargetPrediction. LF-related targets were obtained from the GeneCards database. The intersection of these targets was used to identify common targets. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed to screen core targets, followed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Molecular docking was performed to predict the binding activity between key targets and major active components of GJR. Hepatocyte apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. mRNA levels of *Caspase3*, *BCL2*, and *Bax* in liver tissue were measured by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). For *in vitro* experiments, LX-2 cells were activated by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and then treated with GJR containing serum (10%, 15%, 20%). mRNA and protein expression of  $\alpha$ -SMA, Col1a1, and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) were examined by qRT-PCR and Western blotting. Apoptosis of LX-2 cells was analyzed by flow cytometry. **Results** *In vivo* experiments showed that GJR can alleviate liver injury and collagen deposition, reduce levels of HYP, ALT, and AST, downregulate the expression of  $\alpha$ -SMA, Col1a1, and TGF- $\beta$ , decrease hepatocyte apoptosis, and regulate the expression of *Caspase3*, *BCL2*, and *Bax*. Network pharmacology identified 625 common targets, with core targets related to apoptosis enriched in pathways such as PI3K-Akt. The key components bound well with the core targets. *In vitro* experiments showed that GJR-containing serum downregulated the mRNA and protein expression of  $\alpha$ -SMA, Col1a1, and TIMP1, promoting the apoptosis of LX-2 cell. **Conclusion** Network pharmacology and experimental verification demonstrate that GJR exerts anti-LF effects, which may be related to promoting aHSC apoptosis and inhibiting hepatocyte apoptosis via the Caspase3/Bcl-2/Bax signaling pathway.

**Key words:** Ganji Recipe; liver fibrosis; cell apoptosis; network pharmacology; molecular docking

肝纤维化 (LF) 是肝脏在慢性损伤刺激下发生的病理性修复过程<sup>[1]</sup>, 其核心病理特征为肝星状细胞 (HSCs) 持续激活, 驱动细胞外基质 (ECM) 过度沉积, 最终导致肝组织结构重塑与功能减退<sup>[2]</sup>。在损伤初期, 肝细胞凋亡释放损伤相关分子模式 (DAMPs), 激活肝内固有免疫细胞, 诱导促炎细胞因子大量产生, 导致炎症微环境持续存在。HSCs 可直接感知上述炎症信号并发生激活<sup>[1, 3]</sup>, 在此基础上, 转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、血小板衍生生长因子 (PDGF) 等经典促纤维化因子通过与 HSCs 表面受体结合, 驱动其由静息型向肌成纤维样细胞表型转化。激活后的 HSCs 高表达  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA), 并大量合成 I 型、III 型胶原等 ECM 成分<sup>[4]</sup>。与此同时, HSCs 通过抑制基质金属蛋白酶 (MMPs) 活性、上调基质金属蛋白酶组织抑制因子 (TIMPs) 表达, 导致 ECM 降解受阻、异常沉积, 最终形成 LF<sup>[5-6]</sup>。值得注意的是, LF 病理过程具有高度隐匿性, 患者往往在进入中晚期阶段后才被临床确诊。晚期 LF 若未得到及时有效干预, 可沿“LF-肝硬化-肝细胞癌”持续主动进展<sup>[1]</sup>, 预后不良且死亡率高。这一疾病负担在全球范围内, 尤其是中国人群中尤

为突出。中国最大规模的健康体检数据库横断面研究显示 2017 至 2022 年间约有 2.85% 的成年人被诊断为晚期纤维化<sup>[7]</sup>。然而, 目前尚无明确批准用于治疗 LF 的临床药物<sup>[8-9]</sup>, 尽管吡非尼酮、尼达尼布等抗纤维化药物在肺纤维化领域已获批应用, 但其在 LF 中的疗效与安全性尚未得到充分的循证验证<sup>[10-11]</sup>。西医抗 LF 治疗仍然主要以控制病因为主, 包括针对病毒性肝炎的抗病毒治疗、针对酒精性肝病的戒酒干预及针对非酒精性脂肪性肝病的代谢调控等。虽然能在一定程度上延缓 LF 进程, 但对于已经形成的纤维化病变, 其逆转能力十分有限, 且长期用药的安全性与依从性亦存在诸多临床现实问题。因此, 开发兼具科学依据与临床可行性的新型干预策略, 是当前肝病领域亟待解决的重要科学命题。长期临床实践及研究表明, 中医药在 LF 的防治领域展现出独特优势<sup>[12]</sup>。基于整体观念与辨证论治理念, 多途径、多层次、多靶点治疗 LF, 中医药在改善临床症状、遏制 LF 进展甚至逆转 LF 方面具有显著的疗效<sup>[13]</sup>。肝积方 (GJR) 是国医大师周岱翰教授学术继承人王雄文教授在其指导下基于疏肝祛湿化痰法立论的保肝传承方, 在临床中

取得良好的疗效。基于此,本研究拟通过网络药理学及分子对接、细胞与动物实验系统验证 GJR 对 LF 的治疗作用,并深入探讨其抗 LF 的分子机制,以期为中医药防治 LF 提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

GJR 由柴胡、白芍、党参、茯苓、白术、旱莲草、女贞子、黄芩、半枝莲、肿节风、八月札、莪术组成,所有中药材均统一采购于广州中医药大学第一附属医院,并经过广州中医药大学第一附属医院廖小红副主任中药师验证合格。将上述药材加 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min,武火煮沸后转文火煎煮 30 min,滤取药液。药渣再加适量水,同法煎煮 30 min,滤过。合并 2 次滤液,作为汤药母液,4 °C 保存。利用超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)法,共识别出母液包含黄芩素、芍药苷、柴胡皂苷 A、茯苓酸、党参碱、山姜素等 150 种化合物成分,其中,黄芩素、芍药苷、柴胡皂苷 A 质量分数分别为 0.86%、0.10%、0.03%。水飞蓟宾(质量分数 $\geq$ 98%,天津天士力圣特制药有限公司,批号 550702018)。试剂包括逆转录试剂盒、RNA 提取试剂、SYBR Green 实时荧光定量 PCR 预混液(Accurate Biotechnology 公司,批号 A7A2358、A7A0883、A7A1078);蛋白酶抑制剂(美国 TargetMol 公司,批号 P25070301124);RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(Beyotime Biotechnology 公司,批号 P0013B、A381B251103);彩色预染蛋白 marker(雅酶生物公司,批号 029824010);SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 $\times$ ,弗德生物科技有限公司,批号 20250712);ECL 发光液(Biosharp 公司;批号 27126112AZ); $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、I 型胶原蛋白 alpha 1 链(Coll1a1)抗体、羊抗兔二抗(HUABIO 公司;批号 H641065007、H641469057、H641407031、H641608002);组织金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP1)抗体(优品生物科技有限公司,批号 250808);细胞凋亡检测试剂盒(武汉 Elabscienc 公司,批号 WS05BVPF67655);橄榄油、CCl<sub>4</sub>(上海麦克林生化科技有限公司,批号 O689849、C805325);羟脯氨酸(HYP)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20250909、20250924、20250925);原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(武汉赛维尔生物有限公司,批号 MPC2410028)。

### 1.2 仪器

Vios iDx 165 恒温培养箱、Varioskan LUX 多功能酶标仪、QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);5430 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);EPHC 400 Western blotting 设备(广州道一科学技术有限公司);N60 超微量分光光度计(德国 IMPLLEN 公司);ChemiDoc MP 全能型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);FACSCalibur-2 流式细胞仪(美国 BD 公司);JT-12X 脱水机、JB-L6 包埋机(武汉俊杰电子有限公司);HistoCore AUTOCUT 病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);KD-F 组织摊片机(科迪仪器设备有限公司);Giotto 染色机(意大利 Diapath 公司)。

### 1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 25 只,6 周龄(体质量 18~20 g),购于浙江维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证 SCXK(浙)2021-0006;SPF 级雄性 SD 大鼠 46 只(体质量 280~300 g),购于广东维通利华有限公司,生产许可证 SCXK(粤)2022-0063。小鼠、大鼠饲养于 SPF 级实验动物房,室温维持在(20 $\pm$ 2)°C,相对湿度为(40 $\pm$ 5)%,采用 12 h 光/暗循环模式。实验遵循 3R 原则(替代、减少、优化),并严格遵守动物伦理和动物福利标准,方案通过广州中医药大学伦理委员会批准(20250417004、20240716001)。

### 1.4 细胞

肝星状细胞 LX-2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。培养条件为 10%胎牛血清+90% DMEM 高糖,气相:空气,95%;CO<sub>2</sub>:5%,温度:37 °C。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学及分子对接

**2.1.1 药物靶点及疾病靶点** 以中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)为主要来源,筛选口服给药生物利用度(OB) $\geq$ 30%且类药性(DL) $\geq$ 0.18 的肝积方药物活性成分。采用 Swiss Target Prediction 平台(<http://swisstargetprediction.ch>)预测活性成分靶点,阈值设定为概率值 $\geq$ 0.1,去除重复项后得到 GJR 的潜在药物靶点。以“liver fibrosis”为关键词,在 GeneCards 基因数据库(<https://www.genecards.org>)中检索 LF 的疾病靶点,筛选 Relevance score $\geq$ 5 的疾病潜在靶点。运用 Venny 在线工具(<https://bioinfopg.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)将筛选后的活性成分靶点与疾病的潜在靶点取交集并绘制韦恩图。

**2.1.2 药物-活性成分-靶点网络** 以药物、活性成分、交集靶点为节点, 药物与活性成分、活性成分与交集靶点之间的作用关系为边, 利用 Cytoscape 3.10.2 软件构建“药物-活性成分-靶点”网络关系图。拓扑属性采用 Network Analyzer 插件计算, 重点分析各节点的度 (degree) 值以筛选关键活性成分。

**2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI)** 将交集靶点基因导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 物种设定为智人, 综合置信度设为 0.900, 构建 PPI 网络。将网络文件导入 Cytoscape 3.10.2, 利用 Cytoscape 计算各节点的 Degree、介数中心性 (Betweenness)、接近中心性 (Closeness) 值, 取 3 项参数值均靠前的前 47 个靶点作为核心靶点, 并以节点大小与颜色深浅映射度值进行可视化。

**2.1.4 基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析** 采用 R 语言 (4.3.1) 中 ClusterProfiler 软件包对交集靶点进行 GO 及 KEGG 通路富集分析, 筛选校正后  $P < 0.05$  的显著富集条目, 并以条形图对 GO 各功能分类及 KEGG 通路富集结果进行可视化展示。

**2.1.5 分子对接** 以核心靶点蛋白为受体, 核心活性成分为配体, 进行分子对接验证。受体三维结构通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取, 配体蛋白结构通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 获取。使用 AutoDockTools-1.5.6 软件, 定义好配体与受体, 去氢加水, 设置大小适合的盒子中心后进行对接, 最后选择结合能低于  $-20.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  的复合物构象并通过 PyMOL 2.4.0 进行可视化呈现。

## 2.2 动物分组与给药

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 25 只 (6 周龄), 饲养 3 d 后, 采用随机数字表法分成 5 组: 对照组、模型组及 GJR 低、高剂量 ( $22.23$ 、 $44.46 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组和水飞蓟宾组 (阳性药, 参考文献报道<sup>[4]</sup>用量  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 每组 5 只。模型组、GJR 低剂量组、GJR 高剂量组、水飞蓟宾组 ip 20%  $\text{CCl}_4$  ( $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每周 2 次), 对照组 ip 等体积橄榄油, 持续 8 周, 构建 LF 小鼠模型<sup>[5]</sup>。自注射  $\text{CCl}_4$  第 4 周起, GJR 低、高剂量组 ig 相应剂量 GJR (根据人与小鼠体表面积换算法, 人与小鼠换算比例为  $1 : 9.1$ <sup>[6]</sup>, 以  $70 \text{ kg}$  成人用药剂量为基准, 得出小鼠等效剂量为  $22.23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 作为 GJR 低剂量组的给药剂量, 在此基础上, 按倍比关系得出高剂量组  $44.46 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 水飞蓟宾组 ig 水飞蓟宾

$100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 对照组、模型组均 ig 纯水, 每日 1 次, 连续 4 周。第 8 周末干预后 (前一晚禁食不禁水 12 h), 称体质量, 麻醉, 眼球取血, 分离肝脏并称质量, 计算肝脏指数, 组织样本放置  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

肝脏指数 = 肝脏质量 / 体质量

## 2.3 苏木精-伊红 (HE) 与 Masson 染色

取出经 4% 多聚甲醛固定的肝脏组织, 常规脱水、包埋、切片后, 分别进行 HE 染色及 Masson 染色。染色完成后经梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片。于光学显微镜下观察各组肝组织病理形态学改变, 采集图像并进行分析。

## 2.4 肝组织 HYP 测量

取适量肝脏组织, 剪碎后加入水解液, 置水浴中裂解消化; 调节各管 pH 值至  $6.0 \sim 6.8$ , 按 HYP 检测试剂盒说明书操作后充分混匀后于  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴反应 15 min, 冷却至室温。以  $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液于  $550 \text{ nm}$  波长处测定吸光度 ( $A$ ) 值。计算各组织中 HYP 水平。

$$\text{HYP 质量分数} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{水相}} / W_{\text{组织}}$$

## 2.5 肝功能指标检测

眼球取血法采集小鼠全血, 室温静置 2 h,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 15 min, 吸取上层血清。按 ALT、AST 检测试剂盒说明书操作, 充分混匀后室温静置 15 min。于  $505 \text{ nm}$  波长处测定各孔  $A$  值, 依据标准曲线计算各组血清中 ALT、AST 水平。

## 2.6 Western blotting 法

提取总蛋白, 采用 BCA 法定量蛋白浓度, 各样品稀释至相同浓度后加入  $5 \times$  Loading Buffer,  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 min。蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离 ( $80 \text{ V}$ , 90 min), 湿转法至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。PVDF 膜分别与  $\alpha$ -SMA、Col1a1、TIMP-1、TGF- $\beta$  一抗 ( $1 : 2000$ )  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育,  $1 \times$  TBST 洗涤 3 次 (每次 10 min) 后, 与相应二抗 ( $1 : 50000$ ) 孵育 1 h, 再洗涤 3 次。ECL 发光液显影后采集图像, Image J 软件分析目的条带灰度值, 以  $\beta$ -actin 为内参进行归一化处理, 并进行统计学分析。

## 2.7 肝组织 TUNEL 染色

取肝脏组织石蜡切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后, 按 TUNEL 检测试剂盒说明书操作: 以不含 DNase 的蛋白酶 K 溶液室温孵育 30 min 进行组织通透, 随后滴加 TUNEL 工作液置湿盒中  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  避光孵育 1 h 以标记断裂 DNA 末端, 含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片。于荧光显微镜下观察各组肝

组织细胞凋亡情况并采集图像。

### 2.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

采用 Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。按逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA, -20 °C 保存备用。采用 SYBR

Green I 荧光定量 PCR 法检测目的基因 mRNA 表达水平, 反应程序如下: 95 °C 预变性 30 s (1 个循环); 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火延伸 30 s (40 个循环)。以  $\beta$ -actin 为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各目的基因的相对表达量。具体序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

物种	基因	上游 (5'→3')	下游 (5'→3')
Human	$\alpha$ -SMA	AAATGAACGTTTCCGCTGCC	TACATAGTGGTGCCCCCTGA
Human	Colla1	CCTGGTGATGCTGGTGCTAA	ACATTACCAATGGGGCCAGG
Human	TIMP1	CATCCTGTTGTTGCTGTGGC	AACTTGGCCCTGATGACGAG
Human	$\beta$ -actin	ATTGCCGACAGGATGCAGAA	CGGACTCGTCATACTCCTGC
Mouse	Caspase3	AGCTGGACTGCGGTATTGAG	CGCGTACAGTTTCAGCATGG
Mouse	BCL2	GCCTTCTTTGAGTTCGGTGG	CTGAGCAGCGTCTTCAGAGA
Mouse	Bax	GATCGAGCAGAGAGGATGGC	GTAGAAAAGGGCAACCACCC
Mouse	$\beta$ -actin	CTACCTCATGAAGATCCTGACC	CACAGCTTCTTTGATGTCAC

### 2.9 GJR 含药血清制备

SPF 级大鼠随机均分为含药血清组和空白血清组, 含药血清组 ig GJR (等效剂量 22.23 g·kg<sup>-1</sup>), 空白血清组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 每日 2 次, 连续 3 d 后采集腹主动脉血, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液, 56 °C 恒温水浴灭活 30 min 并滤过除菌备用。

### 2.10 细胞分组及给药

将 LX-2 细胞按照每孔 2×10<sup>5</sup> 个的密度接种于 6 孔板中, 随机分为对照组、TGF- $\beta$  组及 GJR 低、中、高浓度 (10%、15%、20%) 含药血清组。细胞贴壁后饥饿 12 h, 除对照组外, 各组均以 10 ng·mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$  因子刺激, 诱导 LX-2 细胞活化。活化成功后, GJR 各组分别加入相应比例含药血清, 对照组与 TGF- $\beta$  组则以 20% 空白血清处理。干预 24 h 后进行 qRT-PCR 实验检测  $\alpha$ -SMA、Colla1、TIMP1 的 mRNA 表达水平, 干预 48 h 后进行 Western blotting 实验检测  $\alpha$ -SMA、Colla1、TIMP1 的蛋白表达水平。

### 2.11 细胞凋亡

按照上述分组, 干预 24 h 后, 消化收集各组细胞, 离心, 弃上清, 取沉淀。预冷的 PBS 洗涤细胞沉淀 1 次, 随后加入 100  $\mu$ L 1× Binding Buffer 重悬, 依次加入 5  $\mu$ L AnnexinV-FITC、PI 抗体, 轻柔吹打混匀, 室温避光孵育 15 min, 上机前每管再加入 400  $\mu$ L 1× Binding Buffer, 流式细胞仪检测并收集数据, 利用 FLOWJO 软件分析细胞凋亡率。

### 2.12 数据分析

使用 GradPrism 10.0 进行数据分析, 计量资料

以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间均数的比较, 满足正态分布, 且方差齐时采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA); 方差不齐时采用 Welch's ANOVA tests, 多重比较采用 WDunnett's T3 法; 若多组独立的实验数据不符合正态分布, 那么就采用非参数 Kruskal-Wails H 检验进行比较。

## 3 结果

### 3.1 GJR 对 CCL<sub>4</sub> 诱导的 LF 小鼠肝脏组织病理学的影响

肝脏 HE 染色 (图 1) 显示, 与对照组相比, 模型组肝小叶结构紊乱, 肝细胞肿胀, 胞质疏松, 颜色淡染, 周围纤维组织增生, 大量的炎症细胞浸润, 部分可见坏死; 与模型组相比, GJR 低、高剂量组和水飞蓟宾组中肝细胞形态相对正常, 水肿变性明显减轻, 其中, GJR 低剂量组门管区附近组织增生, 可见少量的炎症细胞浸润; GJR 高剂量组未见明显增生, 少量的炎症细胞浸润, 偶见坏死; 水飞蓟宾组肝细胞边界清晰, 未见增生, 伴有少量炎症细胞。Masson 染色结果 (图 1) 显示, 对照组肝小叶结构完整, 未见明显蓝色胶原纤维沉积; 模型组肝小叶结构遭到破坏, 肝静脉与汇管区周围可见广泛而致密的蓝色胶原纤维沉积, Masson 染色阳性面积显著增加; GJR 低、高剂量组和水飞蓟宾组蓝色胶原纤维沉积逐渐减少, 其中, GJR 高剂量组、水飞蓟宾组最显著, Masson 染色阳性面积明显下降。HE 染色和 Masson 染色结果说明 GJR 能够改善 LF 小鼠模型肝细胞损伤以及减少 LF 程度。

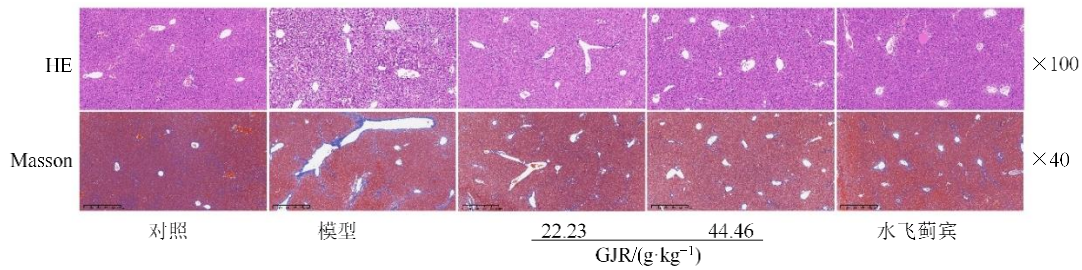


图 1 HE、Masson 染色观察 GJR 对小鼠 LF 组织病理形态的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 1 Effects of GJR on histopathological morphology of liver fibrosis tissues in mice observed by HE and Masson staining ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

### 3.2 GJR 对 CCL<sub>4</sub> 诱导的 LF 小鼠体质量、肝脏指数的影响

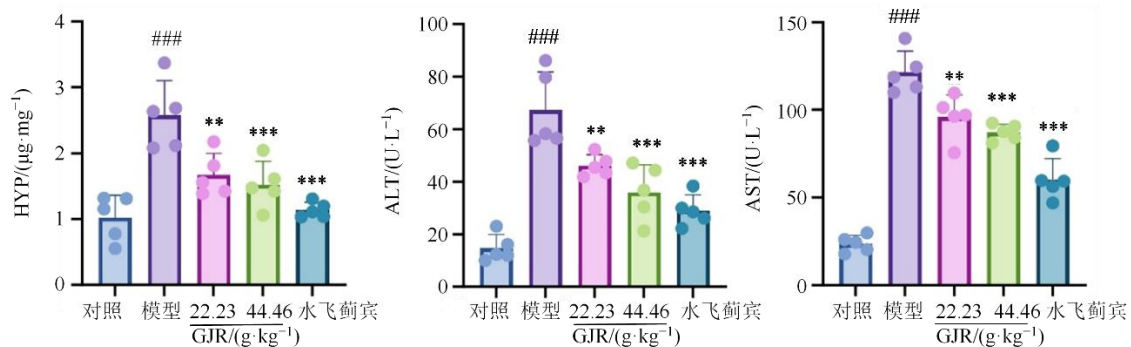
如表 2 所示,与对照组相比,模型组小鼠的体质量下降,GJR 低、高剂量组、水飞蓟宾组的体质量稍上升,但差异无统计学意义。与对照组相比,模型组肝脏指数下降 ( $P<0.001$ ),与模型组相比,GJR 低、高剂量组、水飞蓟宾组肝脏指数呈上升趋势 ( $P<0.01, 0.001$ ),说明 GJR 能够有效减轻肝脏硬化程度,维持肝脏正常体积。

表 2 GJR 对 LF 小鼠体质量、肝脏指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 2 Effects of GJR on body weight and organ index in liver fibrosis mice ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g	肝脏指数/(mg·g <sup>-1</sup> )
对照	—	24.80±0.400	0.056±0.003
模型	—	24.60±1.077	0.035±0.003###
GJR	22.23	24.68±0.879	0.041±0.002**
	44.46	24.98±0.939	0.043±0.005***
水飞蓟宾	0.10	24.94±1.549	0.048±0.003***

与对照组比较:### $P<0.001$ ;与模型组比较:\*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ 。

### $P<0.001$  vs control group; \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$  vs model group.



与对照组比较:### $P<0.001$ ;与模型组比较:\*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ 。

### $P<0.001$  vs control group; \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$  vs model group.

图 2 GJR 对肝组织 HYP 及肝功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 2 Effects of GJR on HYP in liver tissues and liver function ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

### 3.3 GJR 对 CCL<sub>4</sub> 诱导的 LF 小鼠肝脏组织 HYP 含量及血清 ALT、AST 水平的影响

HYP 属于胶原蛋白所特有的一种氨基酸,已成为衡量胶原组织代谢的重要指标,能比较客观地反映 LF 程度。小鼠肝脏组织 HYP 检测如图 2 所示,与对照组相比,模型组肝脏组织 HYP 含量增加 ( $P<0.05$ ),GJR 低、高剂量组和水飞蓟宾组 HYP 含量逐渐减少 ( $P<0.01, 0.001$ ),说明 GJR 能够减轻肝脏组织纤维化。肝功能检测如图 2 所示,与对照组相比,模型组 ALT、AST 水平上升 ( $P<0.01$ ),ALT 轻度上升,AST 比 ALT 上升明显,可能由于肝脏功能减退和血流动力学改变,AST 的清除半衰期长于 ALT 导致这一结果;GJR 低、高剂量组和水飞蓟宾组的 ALT、AST 表达水平逐渐下降 ( $P<0.01, 0.001$ ) 在一定程度上说明 GJR 能够保护肝功能。

### 3.4 GJR 对 CCL<sub>4</sub> 诱导的 LF 小鼠肝脏组织 $\alpha$ -SMA、Colla1、TGF- $\beta$ 蛋白表达的影响

Western blotting 实验结果(图 3)显示,与对照组相比,模型组中  $\alpha$ -SMA、Colla1、TGF- $\beta$  蛋白表达水平上调,说明 LF 动物模型构建成功 ( $P<0.05$ );

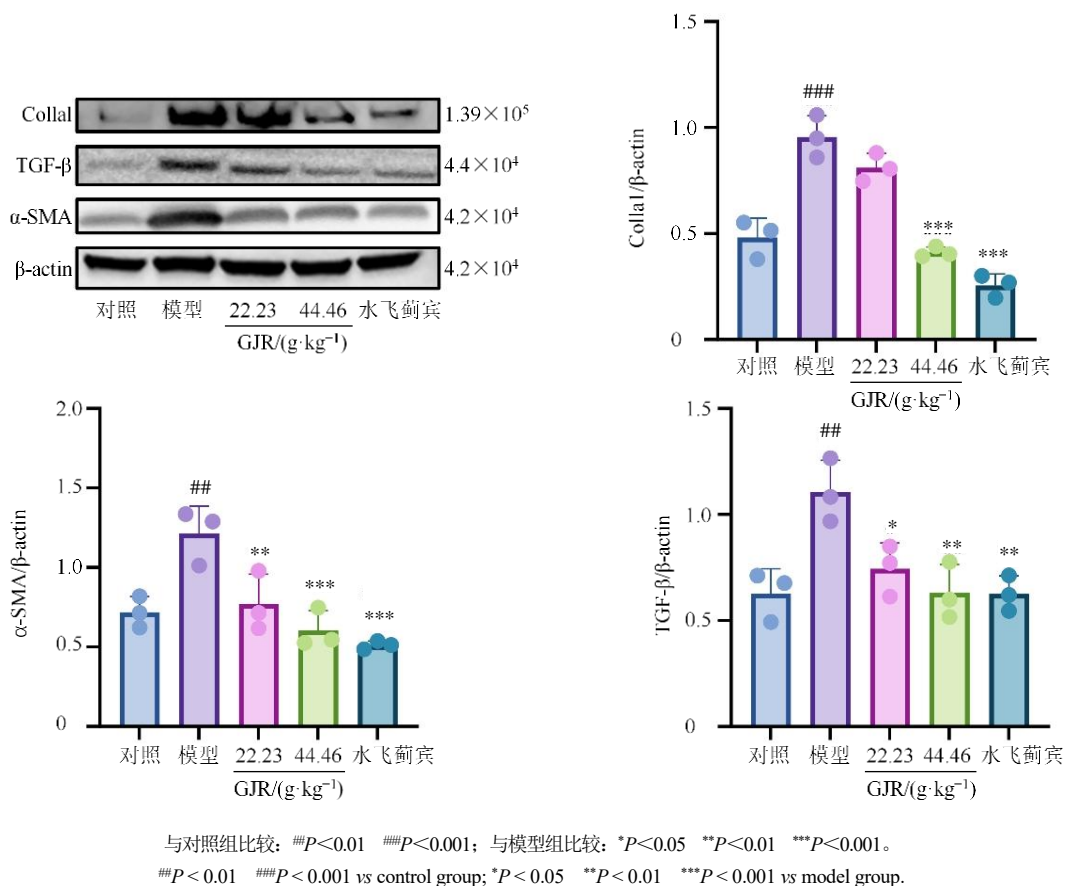


图 3 小鼠 LF 组织 Colla1、α-SMA、TGF-β 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Comparison of protein expression levels of Colla1, α-SMA, and TGF-β in liver fibrosis tissues of mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

与模型组相比，低、高剂量 GJR 和水飞蓟宾组 α-SMA、Colla1、TGF-β 蛋白表达水平逐渐下调，说明 LF 程度逐渐减轻，HSCs 活化受到抑制 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。

### 3.5 GJR 治疗 LF 的网络药理学分析及分子对接结果

**3.5.1 核心靶点筛选与药物-成分-靶点** 利用 TCMSMP 和 Swiss Target Prediction 数据库获得 148 个 GJR 活性成分对应的 1 198 个靶点，并从 Gene Cards 数据库获得 4 001 个疾病靶点。最后将两者取交集，确定 GJR 与 LF 共同的 625 个靶点 (图 4)。将活性成分与其作用 LF 的 625 个靶点通过 Cytoscape 3.7.2 软件绘制“GJR-化合物-疾病靶点”网络关系图，共获得 773 个节点和 3 115 条边。连线表示 GJR 方中不同药物有效活性成分与潜在 LF 作用靶点之间的相互作用关系，菱形代表潜在作用靶点，圆形活性成分，三角形为共有成分 (图 5)。将共同靶点导入 STRING 数据库，构建 PPI 网络，得到 556 个节点，2 516 条边，再将结果导入 Cytoscape3.7.2 软件通过 CytoNCA 插件进行拓扑分

析，根据基因的中介中心性 (BC)、紧密中心性 (CC)、度中心性 (DC) 的中位值评分进行两次筛选，最终得到 46 个核心靶点，包括 *Bcl2*、*Caspase3* 等凋亡蛋白基因 (图 6)。

### 3.5.2 GO 和 KEGG 富集分析及分子对接结果

GO 富集分析以  $P < 0.05$  为筛选条件，将  $P$  值由小到大排序，选择分别在生物过程 (BP)、细胞组成 (CC)、分子功能 (MF) 中排名前 10 的结果进行展示。如图 7-A 所示，GO 富集主要集中在 BP，对外

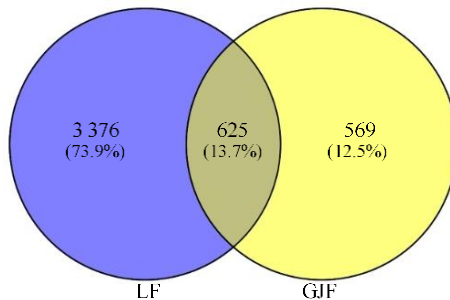


图 4 GJR 与 LF 的 Venn 图

Fig. 4 Venn diagram of GJR and LF

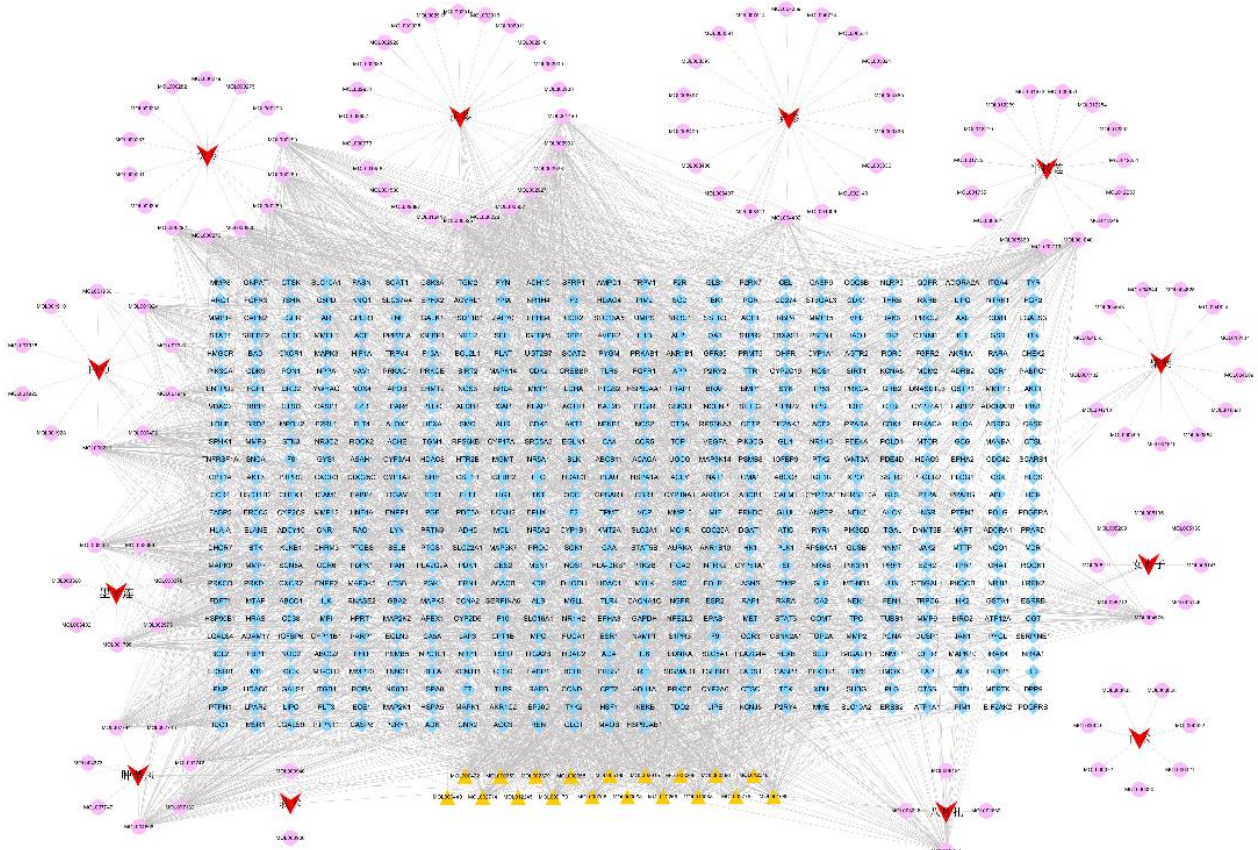


图 5 GJR 与 LF 的药物-成分-靶点

Fig. 5 Drug-component-target of GJR and LF

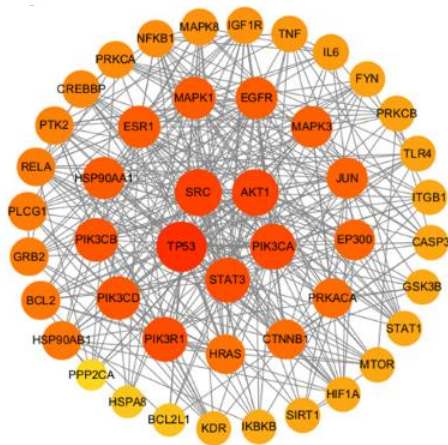


图 6 GJR 与 LF 的核心靶点

Fig. 6 Core targets of GJR and LF

来物刺激、蛋白磷酸酶结合、内肽酶活性最为突出。如图 7-B 所示, KEGG 共富集 326 条通路, 选择前 26 条通路进行可视化, 包括 PI3K-Akt、MAPK、Apoptosis 信号通路等。为探究 GJR 关键成分与凋亡相关核心靶点蛋白的相关性, 将上述 148 个活性

成分通过 Degree 值进行排序, 选取大于中位数的活性成分黄芩苷、芍药苷、黄芩素、山姜素、党参碱作为关键活性成分与凋亡相关核心靶点进行分子对接, 结果如图 8 所示, 5 种活性成分与 Bcl2 结合能, 黄芩苷、黄芩素、山姜素与 Caspase3 结合能均 <math>-20.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}</math>, 说明这些成分能够稳定地与 Bcl2、Caspase3 结合。

### 3.6 GJR 对 CCL<sub>4</sub> 诱导的 LF 小鼠肝脏组织凋亡的影响

肝脏组织 TUNEL 染色结果 (图 9) 显示, 与对照组相比, 模型组中 TUNEL 阳性凋亡细胞显著增多, 阳性信号明显增强; 与模型组相比, GJR 组凋亡阳性细胞数量明显减少, 阳性信号强度显著减弱。上述结果提示, GJR 可有效抑制 LF 诱导的肝细胞过度凋亡, 对肝组织具有一定的保护作用。

### 3.7 GJR 对 CCL<sub>4</sub> 诱导的 LF 小鼠肝脏组织凋亡相关指标 mRNA 表达的影响

通过 qRT-PCR 检测各组中 Caspase3、Bax、Bcl2 的 mRNA 表达水平, 结果显示 (图 10), 与对照组

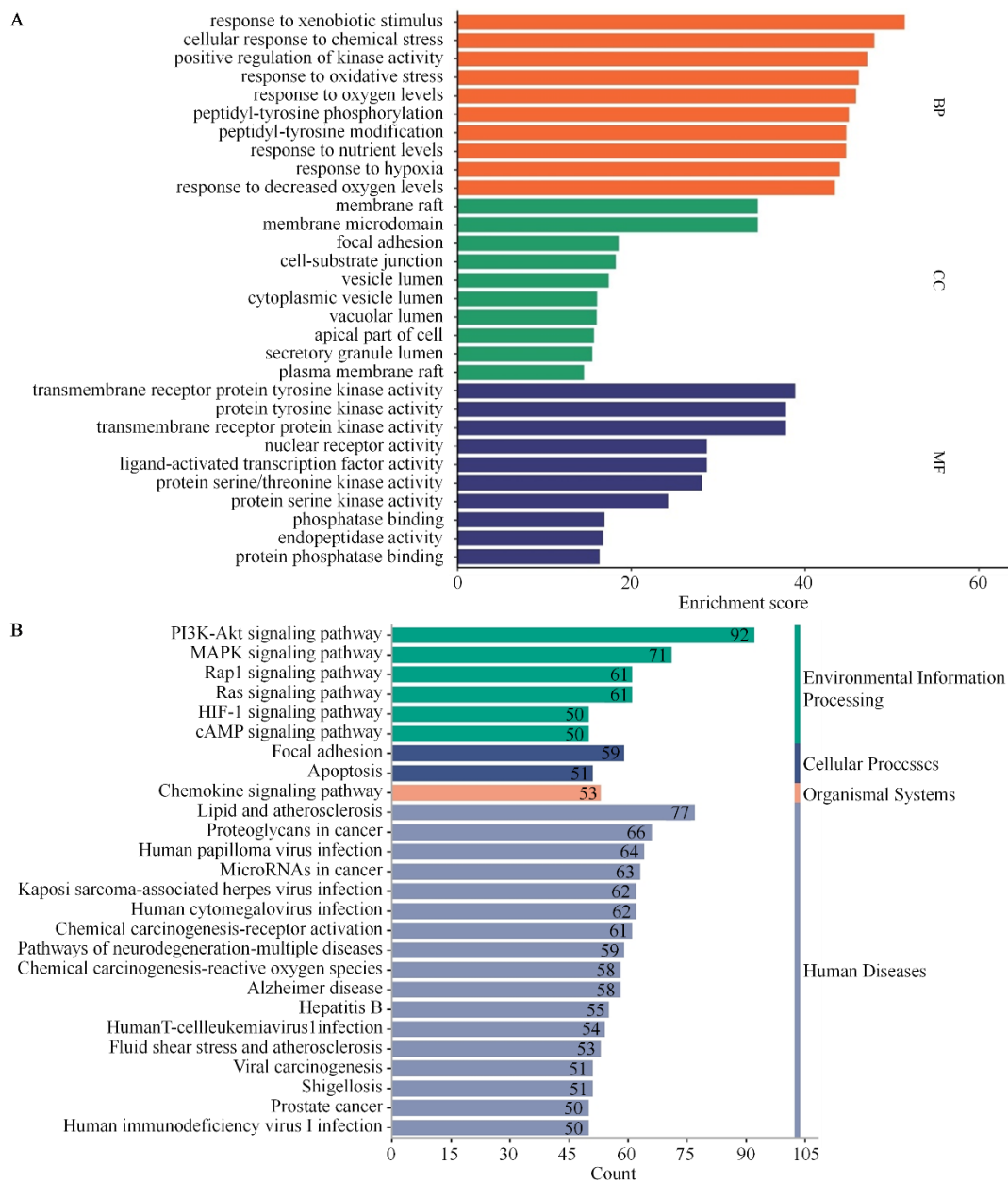


图 7 GO (A) 和 KEGG (B) 富集分析  
Fig. 7 GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis

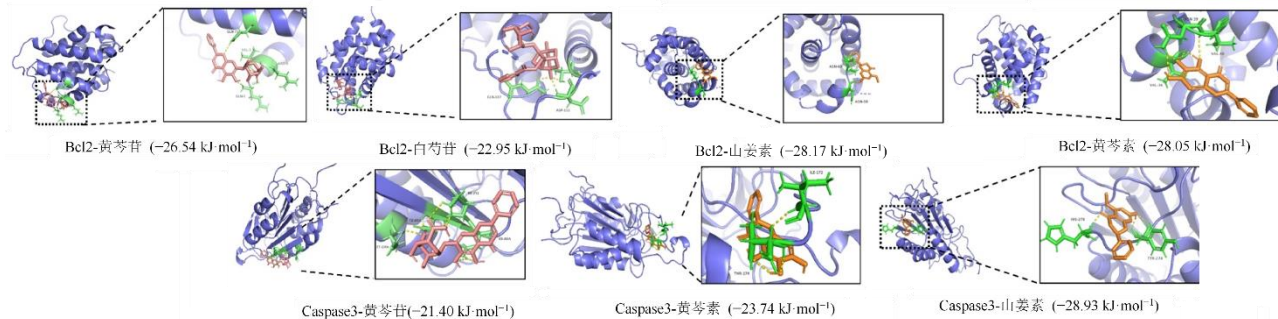
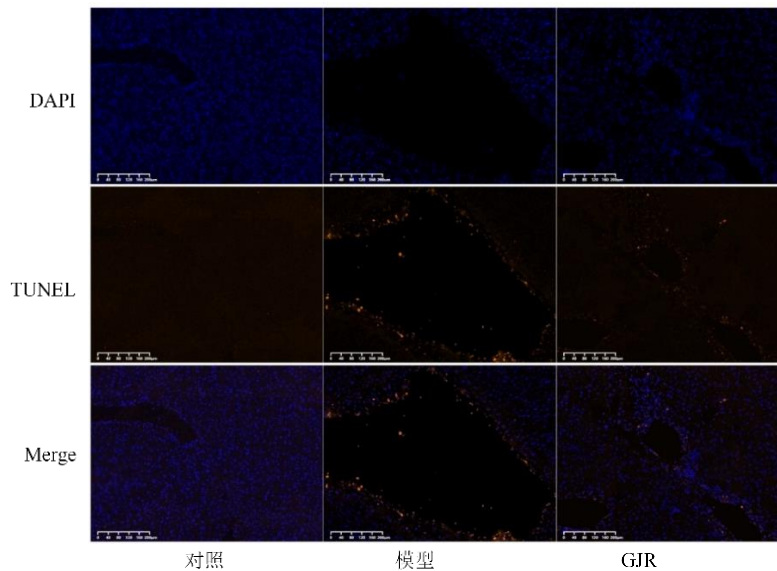
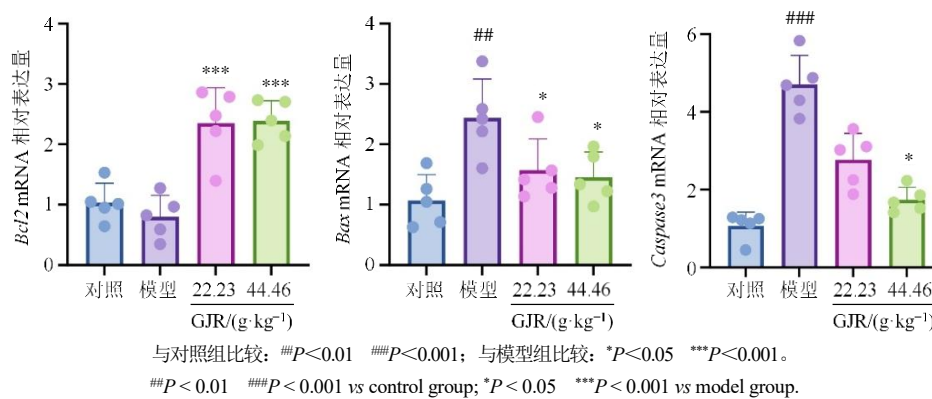


图 8 GJR 与 LF 分子对接结果  
Fig. 8 Molecular docking results of GJR and LF

图 9 小鼠 LF 组织 TUNEL 染色 ( $\times 100$ )Fig. 9 TUNEL staining of liver fibrosis tissues in mice ( $\times 100$ )图 10 LF 组织 *Caspase3*、*Bax*、*Bcl2* 的 mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )Fig. 10 Comparison of mRNA expression levels of *Caspase3*, *Bax* and *Bcl2* in liver fibrosis tissues ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

相比, 模型组中 *Caspase3*、*Bax* 的 mRNA 表达水平明显上升, 而 *Bcl2* 的 mRNA 表达水平呈下降趋势 ( $P < 0.05$ ), 说明模型组中正常肝细胞凋亡增多; 与模型组相比, GJR-L、GJR-H 组中 *Caspase3*、*Bax* 的 mRNA 表达水平下降, *Bcl2* 的 mRNA 表达水平上升, 说明肝细胞凋亡减轻 ( $P < 0.01$ )。

### 3.8 GJR 对活化的 LX-2 细胞纤维化指标 mRNA 及蛋白表达的影响

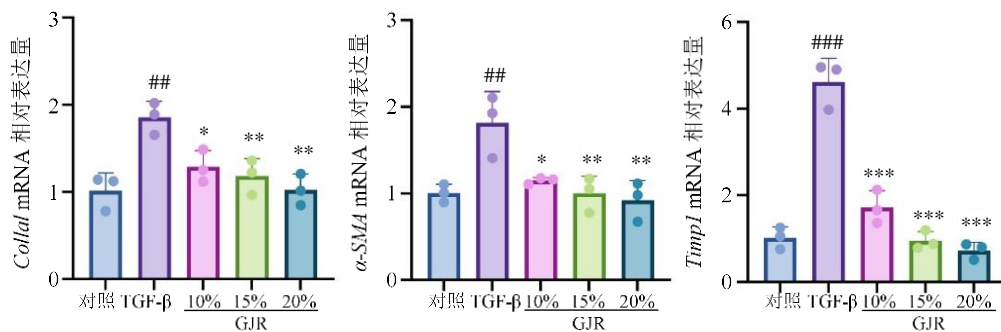
如图 11、图 12 所示, 与对照组相比, TGF- $\beta$  组中  $\alpha$ -SMA、Colla1、Timp1 的 mRNA 及蛋白水平明显上升 ( $P < 0.05$ ), 说明 LX-2 细胞被活化。与 TGF- $\beta$  组相比, GJR 含药血清各组 (10%、15%、20%) 中  $\alpha$ -SMA、Colla1、Timp1 的 mRNA 及蛋白水平下降, 且具有浓度相关性 ( $P < 0.01$ )

### 3.9 GJR 含药血清对活化的 LX-2 细胞凋亡的影响

流式细胞术实验结果如图 13 所示, 与 TGF- $\beta$  组相比, GJR 含药血清干预后 LX-2 细胞凋亡显著上升, 其中 20% GJR 含药血清组最明显, 呈浓度相关性 ( $P < 0.01$ )。

## 4 讨论

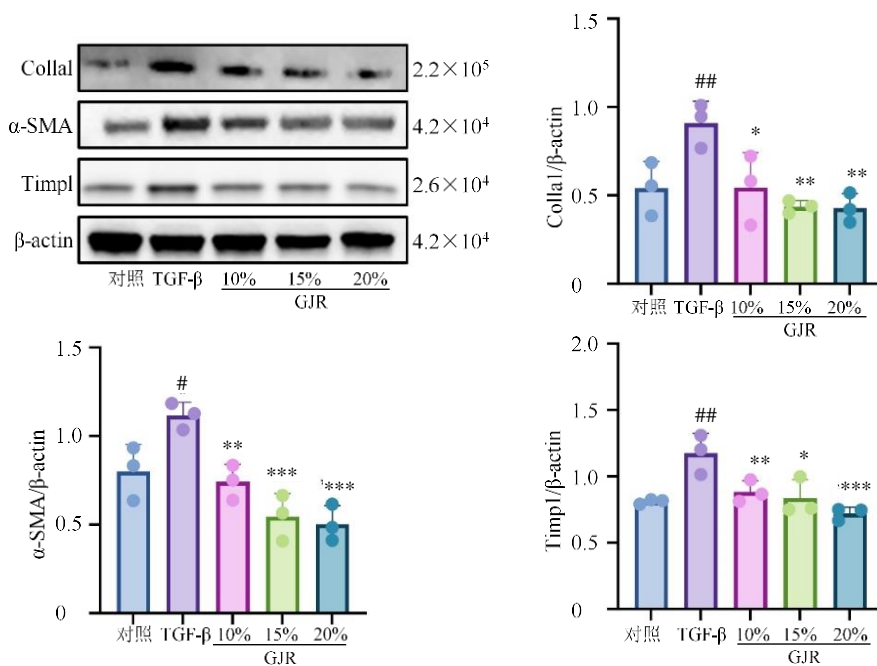
LF 是 LF-肝硬化-肝癌疾病演变过程中唯一可逆的病理阶段<sup>[17-19]</sup>。着眼于 LF 早期干预, 能够有效预防肝癌的发生, 与中医“治未病的”理论精神相契合, 也是中医药在肝病防治领域的重要优势与特色。LF 属于中医的“肝积”范畴, 其核心病机在于“肝气郁滞, 湿阻血瘀”<sup>[20]</sup>。肝主疏泄, 外邪内侵或情志不畅, 阻碍气机, 肝失条达, 气血津液输布失常, 酿生湿、瘀等有形病理之邪, 《金匱要略》曰:



与对照组比较: ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与 TGF-β 组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。  
## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs TGF-β group.

图 11 LX-2 细胞中  $\alpha$ -SMA、Colla1、Timp1 的 mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 11 Comparison of mRNA expression levels of  $\alpha$ -SMA, Colla1 and Timp1 in LX-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



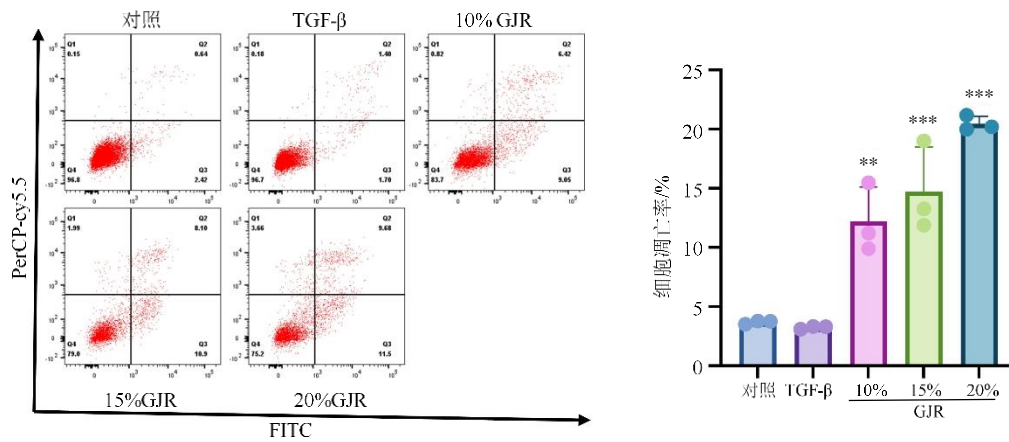
与对照组比较: ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与 TGF-β 组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。  
## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs TGF-β group.

图 12 LX-2 细胞中  $\alpha$ -SMA、Colla1、Timp1 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 12 Comparison of protein expression levels of  $\alpha$ -SMA, Colla1 and Timp1 in LX-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

“毒，邪气蕴结不解之谓。” 湿热、瘀毒胶结，痹阻于肝络，以致肝络癥瘕积聚，最终演变为纤维化。GJR 针对 LF “气郁湿阻血瘀”的病机发挥重要作用，方中柴胡、白芍为君，养肝体、助肝用，疏肝解郁；党参、茯苓、白术健脾益气以扶正固本，为臣药；黄芩、半枝莲、肿节风清热解毒祛湿，同时，黄芩配柴胡疏达少阳之气，八月札、莪术活血祛瘀以消积，共为佐药；旱莲草、女贞子补肝肾之阴，

治疗晚期形质损伤，为使药。诸药合用，疏肝不伤正，祛邪不损阴，共奏抗 LF 之功效。本研究建立体内 LF 模型，给予 GJR 低、高剂量治疗后，小鼠肝脏胶原沉积减少， $\alpha$ -SMA、Colla1 蛋白表达水平降低，抑制 HSCs 活化，纤维化程度明显减轻，且随着药物剂量的增加，肝脏组织在病理方面出现显著改变，细胞形态逐渐恢复，降低 AST、ALT 水平，具有保护肝功能的作用。体内实验证实了 GJR 对



与 TGF-β 组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs TGF-β group.

图 13 GJR 对活化的 LX-2 细胞凋亡影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 13 Effect of GJR on apoptosis of activated LX-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠 LF 具有明确的治疗作用。活化的 LX-2 是产生胶原的核心细胞，因此，HSCs 的激活在 LF 的发展中起着重要作用。上述体内实验结果表明，GJR 可下调 TGF-β 表达，间接提示其能够抑制 HSCs 活化。为进一步明确 GJR 对 HSCs 的直接作用，本研究开展了体外细胞实验加以验证。结果证实，GJR 可显著抑制 HSCs 活化，减少胶原纤维生成并减轻 ECM 沉积，为阐明 GJR 抗 LF 的作用机制提供了可靠的体外证据。

为深入探讨 GJR 治疗 LF 的分子机制，本研究通过网络药理学方法确定 BCL2、Caspase-3 等凋亡相关蛋白为关键靶点，细胞凋亡信号为主要通路。分子对接结果进一步表明，GJR 关键活性成分黄芩苷、芍药苷、黄芩素、山姜素、党参碱与抗凋亡蛋白 Bcl-2 等核心靶点均具有良好的结合活性，为后续实验验证提供了明确方向。

细胞凋亡是机体维持内环境稳态的一种程序性细胞死亡方式。细胞凋亡分为外源性和内源性两种途径。外源性途径由细胞外微环境的扰动触发，此过程涉及细胞表面死亡受体 (DR) 的激活，最终导致细胞凋亡的发生。内源性途径的特征是线粒体外膜通透化，与 Bcl2/Bax/Caspase-3 信号通路密切相关<sup>[21]</sup>。Bax、Bcl2 均属于 Bcl-2 家族蛋白，两者维持着线粒体的完整性和通透性，调节 Caspase-3 活性，从而参与细胞线粒体凋亡<sup>[22-23]</sup>。Bax 正常状态时位于细胞胞浆内，当受到损伤或刺激后，Bax 被激活，移位至线粒体表面，通过直接或间接方式在

线粒体上形成孔道，破坏线粒体膜的完整性，释放出 Cyt-c 等促凋亡因子，进而激活 Caspase3，启动 Caspase 级联反应。Bcl2 蛋白可与 Bax 形成异源二聚体，抑制 Bax 的转位及二聚体化，关闭 PT 孔道，通过阻断 Cyt-c 的释放，抑制下游 Caspase-3 的激活。Caspase-3 以无活性酶原形式存在于细胞质中，其活化依赖于 C 端半胱氨酸残基的催化激活，进而特异性识别并切割天冬氨酸位点的肽键<sup>[24]</sup>。活化后的 Caspase-3 可通过诱导 DNA 片段化、激活聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 及引发核碎裂等途径启动细胞凋亡。近年研究表明，肝脏各类细胞凋亡与 LF 发生发展密切相关<sup>[25]</sup>。细胞凋亡在 LF 中具有双重作用。然而，长期以来，抗 LF 的研究策略多集中于单一维度——或抑制 HSC 的活化，或减轻炎症损伤，鲜有研究从“凋亡平衡”这一系统性视角切入<sup>[26-28]</sup>。在 LF 进程中存在显著的“细胞凋亡双向失衡”现象，一方面，肝实质细胞因持续炎症刺激、氧化应激及毒性损伤而发生过度凋亡，大量肝细胞死亡不仅直接损害肝脏功能，还通过释放损伤相关分子模式 (DAMPs) 激活 Kupffer 细胞，进一步放大炎症级联反应，同时，受损肝细胞会分泌高迁移率蛋白 B1 (HMGB1) 和白细胞介素 (IL) -33 增强 TGF-β 信号传导<sup>[29]</sup>，为 HSC 的活化提供持续驱动力<sup>[30]</sup>；另一方面，活化的 LX-2 细胞获得显著的抗凋亡能力<sup>[31]</sup>，其 Bcl-2 表达上调、凋亡抗原-1 (Fas) /Fas 配体 (FasL) 信号传导受阻，使其得以在炎症微环境中长期存活并持续分泌胶原蛋白及

多种促纤维化细胞因子, 构成 ECM 沉积的物质基础<sup>[32]</sup>。凋亡失衡状态揭示了一个重要的治疗矛盾, 若单纯针对炎症或 HSC 活化进行干预, 而忽视肝细胞本身的凋亡保护, 则肝实质的持续丢失将不断提供新的纤维化驱动信号, 使治疗陷入困境。因此, 理想的抗 LF 策略应当同时实现 2 个目标, 保护肝实质细胞免于过度凋亡, 以及恢复活化 HSC 对凋亡信号的正常敏感性。既往研究表明, 中药可通过调控细胞凋亡过程发挥抗 LF 作用。阿魏酸通过 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 和 P38 MAPK 信号通路降低肝细胞中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 的水平减轻 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝细胞凋亡, 减少肝细胞坏死和炎症细胞浸润<sup>[33]</sup>。当归-白芍药通过抑制肝细胞凋亡治疗 LF<sup>[34]</sup>, 同时白芍总苷上调 Fas/FADD 信号通路促使活化 HSC-LX2 细胞凋亡<sup>[35]</sup>。柴胡皂苷致线粒体外膜通透性增加, 促使细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质中, 从而触发内源性线粒体<sup>[36]</sup>。本研究结合网络药理学结果, 通过 Tunel 染色和 qRT-PCR 进一步研究 GJR 对肝细胞凋亡的影响。结果表明 GJR 能够上调 Bcl2 水平, 抑制 Caspase-3、Bax 表达, 减少 TGF- $\beta$  刺激因子分泌, 从而减少肝细胞的凋亡和 LX-2 细胞的产生。同时, 流式细胞术结果显示 GJR 含药血清可促进 LX-2 细胞凋亡, 提高 LX-2 细胞对凋亡信号的敏感性, 从而促进纤维化消退。

综上所述, GJR 能够减少肝细胞凋亡, 抑制 LX-2 细胞活化, 促进活化的 LX-2 细胞, 降低细胞外基质 (ECM) 沉积从而多途径抗 LF 作用, 其机制可能与 Bcl2/Bax/Caspase3 信号通路有关。本研究首次证实 GJR 多维度地综合调控发挥抗 LF 效应。且创新地揭示 GJR 精准调控细胞凋亡过程从而改善 LF, 为中医药防治 LF 提供了科学依据, 也为 GJR 的临床推广应用奠定了实验基础。但仍然尚存在一定的局限性, 首先动物样本量较小, 后续 GJR 抗 LF 机制研究实验将进一步扩大样本量; 其次, 本研究初步揭示了 2 类细胞凋亡调控效应的差异性, 但其背后具体的分子机制仍有待系统探究。未来可借助多组学技术, 进一步研究 GJR 在 2 类细胞中引发的分子应答差异, 并通过基因敲除或过表达等遗传学手段对关键分子节点进行功能验证, 为 GJR 的调控机制网络提供更全面的实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Hammerich L, Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(10): 633-646.
- [2] Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis in NAFLD/NASH: From pathophysiology towards diagnostic and therapeutic strategies [J]. *Mol Aspects Med*, 2024, 95: 101231.
- [3] Gandhi C R. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(5): 1104-1105.
- [4] Yan M Y, Cui Y M, Xiang Q. Metabolism of hepatic stellate cells in chronic liver diseases: Emerging molecular and therapeutic interventions [J]. *Theranostics*, 2025, 15(5): 1715-1740.
- [5] Caligiuri A, Gentilini A, Pastore M, et al. Cellular and molecular mechanisms underlying liver fibrosis regression [J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2759.
- [6] Shan L, Wang F L, Zhai D D, et al. Matrix metalloproteinases induce extracellular matrix degradation through various pathways to alleviate hepatic fibrosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114472.
- [7] Man S, Deng Y H, Ma Y, et al. Prevalence of liver steatosis and fibrosis in the general population and various high-risk populations: A nationwide study with 5.7 million adults in China [J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(4): 1025-1040.
- [8] Pei Q Y, Yi Q, Tang L L. Liver fibrosis resolution: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11):9671.
- [9] Zhang Z X, Wang J H, Li H, et al. The role of the interleukin family in liver fibrosis [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1497095.
- [10] Jiang M N, Bu W X, Wang X H, et al. Pulmonary fibrosis: From mechanisms to therapies [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 515.
- [11] Raghu G, Remy-Jardin M, RICHELDI L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. *American J Resp Critical Care Med*, 2022, 205(9): e18-e47.
- [12] 徐列明. 《肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019 年版)》解读 [J]. *上海中医药杂志*, 2020, 54(3): 29-31, 52. Xu L M. Unscrambling of Guideline on the Diagnosis and Treatment of Hepatic Fibrosis with Integrated Chinese and Western Medicine (2019 edition) [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2020, 54(3): 29-31, 52.
- [13] 钟韵畅, 谭宏韬, 曾元桂, 等. 以整体观念为核心的治肝五法辨证论治肝纤维化 [J]. *中华养生保健*, 2024, 42(11): 66-69, 74.

- Zhong Y C, Tan H T, Zeng Y G, et al. Five methods for syndrome differentiating and treating liver fibrosis based on the holism [J]. *Chin Health Care*, 2024, 42(11): 66-69, 74.
- [14] 赵显琼, 吴丽娟, 谭晓, 等. 当归芍药散对四氯化碳致小鼠肝纤维化的治疗作用及机制研究 [J/OL]. *辽宁中医杂志*, 1-13. [2025-11-18]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20250214.1253.058>.
- Zhao X Q, Wu L J, Tan X, et al. Therapeutic effect and mechanism of Danggui Shaoyao San on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice [J/OL]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 1-13 [2025-11-18]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20250214.1253.058>.
- [15] Chen L, Huang Y, Zhang N, et al. Single-cell RNA sequencing reveals reduced intercellular adhesion molecule crosstalk between activated hepatic stellate cells and neutrophils alleviating liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice post menstrual blood-derived mesenchymal stem cell transplantation. *MedComm* (2020). 2024 Jul 22;5(8): e654.
- [16] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-203.
- Xu S Y, Bian R L, Chen X, et al. *Methodology of Pharmacological Experiments* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:202-203.
- [17] Zhang J W, Zhang L, Yang X B, et al. Liver fibrosis as a predictor of liver failure and outcome following ALPPS among patients with primary liver cancer [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 15827.
- [18] Roehlen N, Crouch E, Baumert T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4):875.
- [19] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-166.
- [20] 安振涛, 魏兰福, 黄钰萍, 等. 肝纤维化中医证候规范化与客观化研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(2): 280-280, F0003, F0004.
- An Z T, Wei L F, Huang Y P, et al. Research progress on standardization and objectification of TCM syndromes of liver fibrosis [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2020, 26(2): 280-280, F0003, F0004.
- [21] 吴闵, 安祯祥, 何远利, 等. 龙葵通过 Bcl-2/Bax/Caspase-3 通路对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的治疗作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(2): 117-125.
- Wu M, An Z X, He Y L, et al. Therapeutic effect and mechanism of *Solanum nigrum* on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2026, 32(2): 117-125.
- [22] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541.
- [23] 董雅洁, 高维娟. Bcl-2、Bax、Caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(21): 4828-4830.
- Dong Y J, Gao W J. The role of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in apoptosis and their relationship [J]. *Chin J Gerontol*, 2012, 32(21): 4828-4830.
- [24] 曹赛颖, 龙毅, 杨丽娜. Caspase-3 调控非酒精性脂肪性肝病细胞焦亡和凋亡的研究进展 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2025, 50(6): 1060-1066.
- Cao S Y, Long Y, Yang L N. Research progress in the role of Caspase-3 in regulating pyroptosis and apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Cent South Univ Med Sci*, 2025, 50(6): 1060-1066.
- [25] 牛丽娜, 窦婧, 李栋栋, 等. 细胞凋亡在肝纤维化发生、发展中的作用研究进展 [J]. *肝脏*, 2023, 28(11): 1369-1372.
- Niu L N, Dou J, Li D D, et al. Research progress on the role of apoptosis in the occurrence and development of liver fibrosis [J]. *Chin Hepatol*, 2023, 28(11): 1369-1372.
- [26] Blas-García A, Apostolova N. Novel therapeutic approaches to liver fibrosis based on targeting oxidative stress [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(8): 1567.
- [27] Zhang C Y, Liu S, Yang M. Treatment of liver fibrosis: Past, current, and future [J]. *World J Hepatol*, 2023, 15(6): 755-774.
- [28] Wang D, Tan Q Q, Zheng Q, et al. Tanshinone IIA attenuates hepatic stellate cell activation, oxidative stress, and liver fibrosis by inhibiting YAP signaling [J]. *Eur J Histochem*, 2025, 69(3): 4218.
- [29] McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis [J]. *Immunity*, 2013, 39(2): 357-371.
- [30] Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, et al. TGF- $\beta$  signalling and liver disease [J]. *FEBS J*, 2016, 283(12): 2219-2232.
- [31] Lee Y A, Wallace M C, Friedman S L. Pathobiology of liver fibrosis: A translational success story [J]. *Gut*, 2015, 64(5): 830-841.
- [32] Troeger J S, Mederacke I, Gwak G, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice

- [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(4): 1073-1083.e22.
- [33] Shi Y Y, Shi L, Liu Q, et al. Molecular mechanism and research progress on pharmacology of ferulic acid in liver diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1207999.
- [34] Zhang Z H, Wu G T, Yang J, et al. Integrated network pharmacology, transcriptomics and metabolomics to explore the material basis and mechanism of Danggui-Baishao herb pair for treating hepatic fibrosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337: 118834.
- [35] 范晓旭, 刘双巧, 华娟安, 等. 基于 TGF- $\beta$ /Smad 和 Fas/FADD 信号通路探讨白芍总苷减轻肝纤维化的作用机制 [J]. *天津中医药*, 2025, 42(10): 1285-1294.
- Fan X X, Liu S Q, Hua J A, et al. The mechanism of action of total glycosides of paeony in attenuating liver fibrosis based on TGF- $\beta$ /Smad and Fas/FADD signaling pathways [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2025, 42(10): 1285-1294.
- [36] Shao M Y, Zhang X Q, Sun J M, et al. Saikosaponin b1 attenuates liver fibrosis by blocking STAT3/Gli1 interaction and inducing Gli1 degradation [J]. *Exploration*, 2025, 5(5): 70000.

[责任编辑 齐静雯]