

基于网络药理学与代谢组学探究草苁蓉纳拉昔治疗肝纤维化的作用机制

党鑫生¹, 徐晓敏¹, 马 伟², 刘树民^{1*}

1. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 整合网络药理学与代谢组学, 探究草苁蓉纳拉昔抗肝纤维化的作用机制。 **方法** 通过网络药理学预测草苁蓉纳拉昔干预肝纤维化的潜在作用靶点与通路; SD 大鼠随机分为对照组、模型组、水飞蓟素 (50 mg·kg⁻¹) 组和草苁蓉纳拉昔高、中、低剂量 (270、135、68 mg·kg⁻¹) 组, 采用四氯化碳 (CCl₄) 诱导肝纤维化大鼠模型, 造模完成后, 连续 ig 给药 4 周, 试剂盒法检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、透明质酸 (HA)、层黏连蛋白 (LN)、碱性磷酸酶 (ALP)、白蛋白 (ALB)、羟脯氨酸 (HYP) 水平和肝脏肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平; 苏木精-伊红 (HE) 染色检测大鼠肝脏病理变化; 利用 UPLC/Q-TOF-MS 技术对血清和肝脏代谢轮廓进行分析; 最后整合网络药理学与代谢组学结果, 构建“代谢物-酶-基因”网络, 筛选核心调控靶点。通过 Western blotting 验证关键蛋白己糖激酶 II (HKII)、缺氧诱导因子-1 α (HIF1 α)、蛋白激酶 B (Akt)、p-Akt、磷脂酰肌醇激酶 (PI3K)、p-PI3K 表达。 **结果** 网络药理表明草苁蓉纳拉昔抗肝纤维化核心靶点包括 GAPDH、EGFR、GSK3B、MAPK1、HRAS, 可能通过 HIF-1 信号通路发挥作用; 药效学表明草苁蓉纳拉昔剂量相关性地减缓肝脏病理损伤, 与模型组比较, 水飞蓟素与草苁蓉纳拉昔均可显著降低肝纤维化大鼠血清 AST、ALT、HA、LN、ALP 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 升高 ALB 水平 ($P < 0.01$); 显著降低肝脏中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平 ($P < 0.01$), 显著降低肝脏中 MDA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著升高 SOD 水平 ($P < 0.01$); 水飞蓟素组及草苁蓉纳拉昔高、中剂量组 GSH-Px 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。代谢组学共鉴定出 33 个潜在生物标志物, 涉及糖酵解、糖异生代谢、醚脂代谢以及谷胱甘肽代谢等代谢途径; 联合分析进一步表明草苁蓉纳拉昔主要通过调控糖酵解与糖异生代谢途径维持稳态。Western blotting 显示, 草苁蓉纳拉昔可显著下调肝纤维化模型升高的 p-Akt、p-PI3K、HIF-1 α 及 HKII 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** 草苁蓉纳拉昔可以调控糖酵解与糖异生等关键代谢通路, 发挥多靶点、多途径的抗肝纤维化作用。

关键词: 草苁蓉; 草苁蓉纳拉昔; 肝纤维化; 代谢组学; 网络药理学; 整合分析

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)08-2659-16

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.08.004

Exploring mechanism of *Boschniakia rossica* boschnaloside in treatment of hepatic fibrosis based on network pharmacology and metabolomics

DANG Xinsheng¹, XU Xiaomin¹, MA Wei², LIU Shumin¹

1. College of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. School of Pharmacy, Heilongjiang Chinese Medicine University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To integrate network pharmacology and metabolomics to investigate the mechanism of action of *Boschniakia rossica* boschnaloside (from *B. rossica*) against hepatic fibrosis (HF). **Methods** Network pharmacology was used to predict potential targets and pathways involved in *B. rossica* boschnaloside's intervention in liver fibrosis. SD rats were randomly divided into control, model, silymarin (50 mg·kg⁻¹), and three *B. rossica* boschnaloside groups (high, medium, low doses: 270, 135, 68 mg·kg⁻¹). A carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis rat model was established. After modeling, animals received intragastric administration for four consecutive weeks. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), alkaline phosphatase (ALP), albumin (ALB), and hydroxyproline (HYP), as well as hepatic tumor necrosis factor (TNF)-

收稿日期: 2026-03-24

基金项目: 2024 年度黑龙江省重点研发计划项目 (2024ZXDXB62)

作者简介: 党鑫生, 男, 硕士研究生, 从事中药药性理论及功效药效成分研究。E-mail: dxs221b@163.com

*通信作者: 刘树民, 男, 博士, 教授, 从事中药药性理论及功效药效成分研究。E-mail: keji-liu@163.com

α , interleukin (IL)-6, IL-1 β , superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to evaluate pathological changes in the liver. Serum and liver metabolic profiles were analyzed using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS). Finally, integrating results from network pharmacology and metabolomics, a “metabolite-enzyme-gene” network was constructed to identify core regulatory targets. Western blotting was used to validate the expression of key proteins including hexokinase II (HKII), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1A), protein kinase B (Akt), phosphorylated Akt (p-Akt), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), and phosphorylated PI3K (p-PI3K). **Results** Network pharmacology analysis revealed that the core targets of *B. rossica* boschnalloside in anti-hepatic fibrosis include GAPDH, EGFR, GSK3B, MAPK1, and HRAS, suggesting its potential involvement via the HIF-1 signaling pathway. Pharmacological studies showed that *B. rossica* boschnalloside dose-dependently alleviated liver pathological damage. Compared with the model group, both silymarin and *B. rossica* boschnalloside significantly reduced serum levels of AST, ALT, HA, LN, and ALP ($P < 0.05, 0.01$) and increased ALB levels ($P < 0.01$). They also significantly decreased TNF- α , IL-6, and IL-1 β , and MDA levels in the liver ($P < 0.01$), while increasing SOD levels ($P < 0.01$). The GSH-Px levels in the silymarin group and high- and medium-dose *B. rossica* boschnalloside groups were significantly elevated ($P < 0.05, 0.01$). Metabolomics identified 33 potential biomarkers associated with glycolysis, gluconeogenesis, ether lipid metabolism, and glutathione metabolism. Integrated analysis further indicated that *B. rossica* boschnalloside primarily regulates homeostasis by modulating glycolysis and gluconeogenesis pathways. Western blotting demonstrated that *B. rossica* boschnalloside significantly downregulated the upregulated expressions of p-Akt, p-PI3K, HIF-1 α , and HKII proteins in the liver fibrosis model ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *B. rossica* boschnalloside exerts anti hepatic fibrosis effects through multi target and multi pathway mechanisms, notably by regulating key metabolic pathways such as glycolysis and gluconeogenesis.

Key words: *Boschniakia rossica* (Cham. & Schltdl.) B. Fedtsch.; *Boschniakia rossica* boschnalloside; hepatic fibrosis; metabolomics; network pharmacology; integrative analysis

肝纤维化是由慢性肝炎、乙醇滥用或其他疾病引起的。在我国是常见的疾病，严重影响人们的健康。包括中国在内的世界各国尚未批准任何用于肝纤维化治疗的药物^[1]。目前研究表明，其发病机制主要涉及炎症反应、氧化还原反应失衡以及代谢重编程等。肝脏受损后，机体首先表现为免疫细胞的积聚和炎症反应的激活。炎症不仅加速了病理进程，还在一定程度上参与了组织修复。白细胞介素-6 (IL-6) 可刺激肝星状细胞 (HSC) 的增殖，并可诱导产生多种急性期蛋白，通过促进基质变性或与其黏附受体相互作用而促使细胞外基质 (ECM) 沉积^[2]。此外有研究表明肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 通过增强库普弗氏细胞活性和 HSC 促纤维化效应，加速病情进展^[3]。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在血管新生中起着关键作用，在低氧状态下，HIF-1 α 能上调血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达，从而促进血管新生和肝纤维化的发展^[4]。代谢重编程是指细胞通过改变代谢模式促进细胞存活和生长的机制，这一过程包括糖酵解、谷氨酰胺代谢和脂质代谢等关键代谢途径的调整^[5]。研究表明，在肝损伤过程中，活化的 HSC 能量代谢方式会转变为糖酵解途径，从而推动肝纤维化的不断进展^[6]。然而目前缺少有效的临床治疗药物，因此深入探索

肝纤维化的发病机制及发掘潜在的治疗靶点具有重要的临床意义。

中医药具有多途径、多靶点的特点，在治疗肝纤维化中显示出一定优势。其除了具有保护肝细胞的作用外，还具有预防肝纤维化的直接作用，这为肝纤维化的防治提供了新思路。草苈蓉 *Boschniakia rossica* (Cham. & Schltdl.) B. Fedtsch. 为列当科草苈蓉属植物，其味甘咸、酸，性温，具补肾壮阳、润肠通便及止血之效^[7]。草苈蓉的药用价值在唐代著作《新修本草》中已有所记载^[8]，在中医临床上，草苈蓉被广泛用于治疗肾虚阳萎、腰关节冷痛及便秘等症，更加充分展现了其丰富的药用价值^[9]。《素问·脏气法时论》^[10]记载：“肝苦急，急食甘以缓之……酸泄之”；“肝为将军之官，其志怒，其气急，急则自伤，反为所苦，故宜食甘以缓之，则急可平，柔能制刚也”，酸涩之品多收敛之行，可疏泄气机，起到滋肝阴、养肝血的作用，因此，近年来草苈蓉保肝的药理作用越来越受关注。对草苈蓉的深入研究表明^[11]，草苈蓉纳拉昔和草苈蓉昔 B 是草苈蓉主要活性成分，这些成分在生物医学领域展现出了令人瞩目的药理作用，特别是在抗肝损伤、增强免疫力、抗炎、抗疲劳等方面功效显著^[12-14]。

相关研究发现，草苈蓉昔 B 可通过恢复细胞

色素 P4502E1 (CYP2E1) 功能、抑制炎症反应以及抗氧化能力缓解四氯化碳 (CCl₄) 所致的小鼠肝损伤^[15]。且研究显示^[16], 草苈蓉可以通过抑制 HSC 的活化和转化生长因子-β1 的释放, 进而回调由 CCl₄ 诱导的肝纤维化进程, 但对于其主要产生该药理作用的活性成分药效物质基础不明。基于中药的多成分、多靶点协同增效的特点, 本研究通过网络药理学手段, 深入探究草苈蓉纳拉昔治疗肝纤维化的药效及作用机制, 并采用病理分析、血清指标检测的方法对其治疗效果进行验证。同时, 整合网络药理学技术与非靶向血清-组织代谢组学技术, 从整体与微观结合的角度揭示草苈蓉纳拉昔治疗肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

水飞蓟素 (上海源叶生物科技有限公司, 质量分数 ≥ 98%, CAS 号 751-03-1, 批号 B20553); 草苈蓉纳拉昔 (四川维克奇生物科技有限公司, 质量分数 ≥ 97%, CAS 号 751-03-1, 批号 WKQ-0025606); 甲醇 (Dikma 科技公司, 货号 50102); 亮氨酸脑啡肽 (Sigma-Aldrich 公司, 货号 L9133); 4%多聚甲醛组织固定液 (上海碧云天生物技术有限公司); 谷氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH-Px)、白蛋白 (ALB) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号分别为 C010-2-1、C009-2-1、A059-2-2、A001-3-2、A00301、A006-2-1、A028-2-1); TNF-α、IL-6、IL-1β、透明质酸 (HA)、黏连蛋白 (LN)、羟脯氨酸 (HYP) 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 货号分别为 ml037361、ml106838、ml037361、ml895677、ml868874、ml092985); 抗体: β-actin (货号 GB15003)、己糖激酶抗体 (HK) II (货号 GB11866)、缺氧诱导因子-1α (HIF1A) (货号 BS-20399R)、蛋白激酶 B (Akt, 货号 GB11689)、p-Akt (货号 GB150002)、HRP-山羊抗兔 (货号 GB23303), RIPA 裂解液 (货号 G2002-100ML)、50×Cocktail 蛋白酶抑制剂 (货号 G2006-250UL)、磷酸化蛋白酶抑制剂 (货号 G2007-1ML)、BCA 蛋白定量检测试剂盒 (货号 G2026)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (货号 G2020-25ML)、蛋白 Marker (货号 G2083-250UL)、超敏 ECL 化学发光试剂盒 (货号 G2026)、电泳缓冲液 (货号 G2081-1L)、TBS 缓冲液 (货号

G0001-2L)、5×蛋白还原型上样缓冲液 (货号 G2075-100ML)、苯甲基磺酰氟 (PMSF, 100 mmol·L⁻¹) (货号 G2008-1ML)、ECL 化学发光试剂盒 (货号 G2014-50ML)、PVDF 膜 0.45 μm (货号 WGPVDF45)、转膜缓冲液 (货号 G2057-1L)、脱脂奶粉 (货号 GC310001-100g), 均购自 Servicebio 公司; 磷脂酰肌醇激酶 (PI3K, CST 公司, 货号 4257); p-PI3K (CST 公司, 货号 17366)。

1.2 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供, 该中心持有生产许可证号 SCXK (黑) 2023-007。本实验已获得黑龙江中医药大学伦理委员会的批准, 批准编号为 DXLL2024040310。

1.3 实验仪器

TDZ5-WS 离心机 (湘仪实验室仪器开发有限公司); Eclipse Ci-L 正置白光拍照显微镜 (日本 Nikon 公司); ELx800 酶标仪 (BioTek 公司); 超高液相色谱-飞行时间串联质谱仪 (美国 Waters 公司); KDC-160HR 高速冷冻离心机 (科大创新有限公司); 超纯水系统 (Milli-Q 公司); KZ-III-FP 研磨仪、SMV-4500B 涡旋混匀仪、MS-150 磁力搅拌器、KZ-III-FP 研磨仪、SMV-4500B 涡旋混匀仪、MS-150 磁力搅拌器、DS-3D100 脱色摇床 (钟摆型)、SVE-2 垂直电泳仪、SVT-2 转印电泳仪、SPW-6S 电泳电源、G9055-4 抗体孵育盒 (Servicebio 公司)。

1.4 实验所用数据库及软件

通用蛋白质数据库 UniProt (<https://www.uniprot.org/>); 有机小分子生物活性数据库 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); 在线人类孟德尔遗传数据库 OMIM (<https://omim.org/>); 蛋白质互作平台 STRING V 11.0 (<https://string-db.org/>); 生物学信息注释数据库 DAVID V 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>); 网络拓扑属性分析软件 Cytoscape 3.7.2 (<http://cytoscape.org/>); GSEA 数据库 (<https://www.gsea-msigdb.org/>); MetaboAnalyst6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>); 在线数据库 Human Metabolome Database (HMDB, <http://www.hmdb.ca/>); 京都基因与基因组百科全书 (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/ligand.html>); Progenesis QI (Waters, USA); EZinfo 2.0 软件

(MarkerLynx1.4 工作站中软件); Cytoscape 软件 (Version3.9.0)。MetaboAnalyst6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>); Cytoscape 软件 (Version3.9.0); Image J 软件。

2 方法

2.1 基于网络药理学探究草苁蓉纳拉苷防治肝纤维化的作用机制

运用借助 PubChem 数据库查询草苁蓉纳拉苷对应的 SMILES 号, 并使用 SwissTargetPrediction 数据库进行靶点的预测; 运用 GeneCards、OMIM 等疾病相关数据库, 以“hepatic fibrosis”为检索词检索疾病相关的靶点; 并将疾病靶点与成分靶点取交集得到共同靶点即为草苁蓉纳拉苷治疗肝纤维化的相关靶点, 并利用 venny 2.1 在线平台绘制 Venn 图。将上述得到的关键靶点信息导入 STRING 数据库, 获得潜在靶点之间的相互联系。利用 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化分析, 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络 (PPI) 网络。采用 R 语言中 ClusterProfiler 程序包对共有的靶标进行基因本体 (GO) 分类富集分析以及 KEGG 通路富集分析。

2.2 分组造模及给药

在适应期 1 周后, 48 只大鼠被随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为对照组、模型组、水飞蓟素 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和草苁蓉纳拉苷高、中、低剂量 (270 、 135 、 $68 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 模型组及各给药组大鼠首次按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 40% CCl_4 橄榄油溶液, 随后每周 2 次按 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 继续注射, 连续 8 周^[17]。造模完成后, ig 给药, 模型组和对照组 ig 给予等量的 0.9% 氯化钠溶液。所有组别每天给药 1 次, 连续 4 周。末次给药后, 禁食不禁水 12 h, 次日使用 3% 戊巴比妥钠对大鼠进行 ip 麻醉, 随后采集腹主动脉血液并取肝组织样本。

2.3 样品的收集与处理

室温自然凝血 1 h, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心 15 min 分离血清, 用于生化指标及代谢组学的检测; 采血完毕后, 剥离大鼠肝脏组织, 一部分 10% 多聚甲醛固定后备用, 一部分冻于 -80°C 备用, 用于后续指标检测。

2.4 大鼠肝脏组织病理学苏木精-伊红 (HE) 染色检测

取各组大鼠肝脏组织, 经固定后, 常规石蜡包埋, $4 \mu\text{m}$ 切片, 常规用二甲苯脱蜡, 经各级乙醇处理至水洗, 然后染色、固定。

2.5 大鼠血清 ALT、AST、HA、LN、ALP、ALB、HYP 水平的检测

血清分离后, 取 $50 \mu\text{L}$, 采用全自动生化分析仪测定 ALT、AST、HA、LN、ALP、ALB、HYP 含量。

2.6 大鼠肝脏 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、SOD、MDA、GSH-Px 水平的检测

肝脏组织在室温下解冻, 精密称定 0.1 g 肝脏组织切成碎片, 按 1:9 的比例加入预冷的 0.9% 氯化钠溶液, 放置匀浆机中匀浆 2 min, 并以 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清采用 ELISA 进行 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、SOD、MDA、GSH-Px 指标的检测。

2.7 统计学处理

所有数据均使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。对于多组间的比较, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。根据方差齐性检验的结果选择不同的事后检验方法: 若方差齐性, 则采用 LSD 法进行多重比较; 若方差不齐, 则采用 Dunnett's T3 法进行多重比较。对于计数资料, 采用卡方检验或非参数检验进行分析。

2.8 基于代谢组学技术探究草苁蓉纳拉苷防治肝纤维化的作用机制

2.8.1 样品收集与处理 血清样品的制备: 将对照组、模型组、草苁蓉纳拉苷高剂量组的血清样品解冻并在室温下平衡。取预冷的甲醇-乙腈 (2:1) 溶液 $300 \mu\text{L}$ 加到 $100 \mu\text{L}$ 的样品中沉淀蛋白, 涡旋混合 1 min。冰水浴超声 10 min 后放置 -20°C 的冰箱 30 min, 取出 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心 10 min 后, 分离上清液, 取 $200 \mu\text{L}$ 即得待测样品溶液。供试品溶液各取 $10 \mu\text{L}$ 混匀即得 QC 样本。所有待检测样本过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 准备上机检测。

组织样品的制备: 将对照组、模型组、草苁蓉纳拉苷高剂量组的肝脏组织加入 9 倍体积冰冷的甲醇, 在冰水浴中研磨 3 min, 冰水浴超声 15 min 后, 4°C 、 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 取上清 $200 \mu\text{L}$ 进样, 进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.8.2 UPLC-MS 分析条件 Waters XEVO G2 XS 色谱柱: Waters Acquity SDS LCT Premier Waters Acquity AutoSampler, 进样量 $2 \mu\text{L}$, 柱温 40°C , 样品温度 4.0°C , 具体条件见表 1、2。

2.8.3 数据分析 对 UPLC-Q-TOF-MS 生成的原始数据进行预处理, 包括峰对齐、匹配、降噪和归一化。利用 ProgenesisQI 软件和 EZinfo2.0 软件 (集成在 MarkerLynx1.4 工作站中) 对大鼠血清和肝脏样

表 1 UPLC 条件

Table 1 UPLC Conditions

t/min	体积流量/ (mL·min ⁻¹)	A (0.05%甲酸- 乙腈)/%	B (0.05%甲 酸-H ₂ O)/%
0	0.400	2.0	98.0
15.00	0.400	100.0	0.0
17.00	0.400	100.0	0.0
18.00	0.400	2.0	98.0
20.00	0.400	2.0	98.0

表 2 MS 条件

Table 2 MS conditions

参数	ESI ⁺	ESI ⁻
分析器	W Mode	W Mode
毛细管电压/V	1 300	1 500.0
锥孔电压/V	40	70.0
脱溶剂气温度/°C	350	350.0
源温度/°C	110	110.0
锥孔气体积流量/(L·h ⁻¹)	20	20.0
脱溶剂气体积流量/ (L·h ⁻¹)	750	750.0
离子能量/V	35	34.0
相对分子质量	100~1 500	100~1 500

本的数据进行分析。首先,采用主成分分析(PCA)进行无监督统计分析;随后,使用有监督的偏小二乘法-判别分析(PLS-DA)对样本进行分组分析,并生成相应的得分图。为了避免 PLS-DA 模型出现过拟合现象,使用 SIMCA-P 12.0 软件进行默认的交叉验证,并通过 200 次随机排列测试来进一步评估模型的稳定性。通过得分图(Scores plot)可以直观地展示各组之间的分离程度,从而判断不同组别大鼠血清和肝脏样本的代谢轨迹相似性及其聚类情况。

2.8.4 差异代谢物的鉴定 根据 S-plot 图中所显示的潜在生物标志物在组间的变动趋势,采用变量重要性投影值(VIP) > 1、 $P < 0.05$ 以及倍数变化(FC) > 1.2 作为筛选标准,以识别潜在的特征性生物标志物。

2.8.5 代谢通路的分析 将已经鉴定出的差异代谢物通过人类代谢组数据库(HMDB)、KEGG 和 MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 等代谢通路数据库对相关的代谢通路进行富集分析与网络构建,提供差异代谢标志物生理病理状态的更多生物学信息,寻找与研究疾病相关的差异代谢物及代谢途径。

2.8.6 网络药理学与代谢组学整合分析 通过 Cytoscape 软件中 Metscape 插件对血清、组织差异代谢物与肝纤维化的治疗蛋白进行联合通路分析。获得与草苈蓉纳拉昔治疗疾病相关的差异代谢物和基因的“化合物-反应-酶-基因网络图”,通过对网络图进行拓扑分析,得到的差异代谢物、靶点蛋白及之间的互作关系信息的网络图。

2.9 Western blotting 分析靶点蛋白表达水平

将预冷的裂解液加入肝脏组织中,裂解后 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。使用 BCA 试剂盒检测样品的蛋白质浓度,确定蛋白上样量,采用 10%~12% SDS-PAGE 分离蛋白,转膜结束后,转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂奶粉室温振荡封闭 1 h。用 TBST 将膜上残留奶粉洗净。接着与一抗(β -actin、HKII、HIF1A、Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K)一起孵育过夜,与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温下孵育 60 min 后,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。滴加混合好的 ECL 发光液,与化学发光仪成像系统中曝光成像。用 Image J 软件分析条带灰度值。

3 结果

3.1 草苈蓉纳拉昔防治肝纤维化的关键靶标

经数据库检索发现,疾病涉及靶点为 2 053 个,成分相关靶点为 484 个,将二者取交集映射后得到关键靶点 295 个,绘制 Venn 图,见图 1。

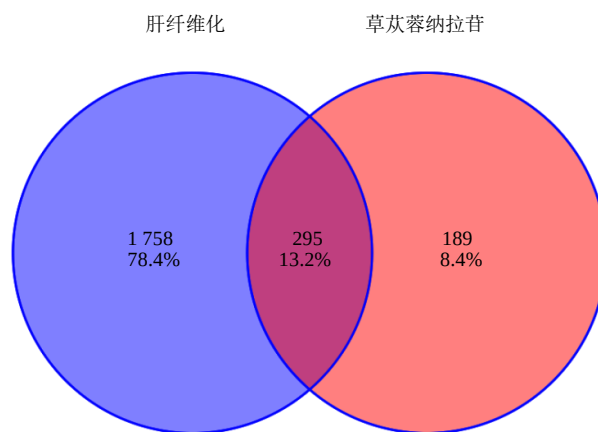


图 1 草苈蓉纳拉昔-肝纤维化 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of “*B. rossica* boschnalioside-HF”

选取关键靶点信息导入 STRING 数据库,获得潜在靶点之间的相互联系。利用 Cytoscape 3.7.2 软件对 STRING 数据库的 PPI 作用分析结果进行可视化分析,构建 PPI 图,得到 29 个节点和 386 条边,见图 2。核心靶点包括 GAPDH、EGFR、GSK3B、

MAPK1、HRAS。

取关键靶点进行 GO、KEGG 富集分析，通过 GO 富集分析，以 $P < 0.05$ 为筛选条件，得生物过程 (BP)、分子功能 (MF)、细胞组分 (CC) 富集

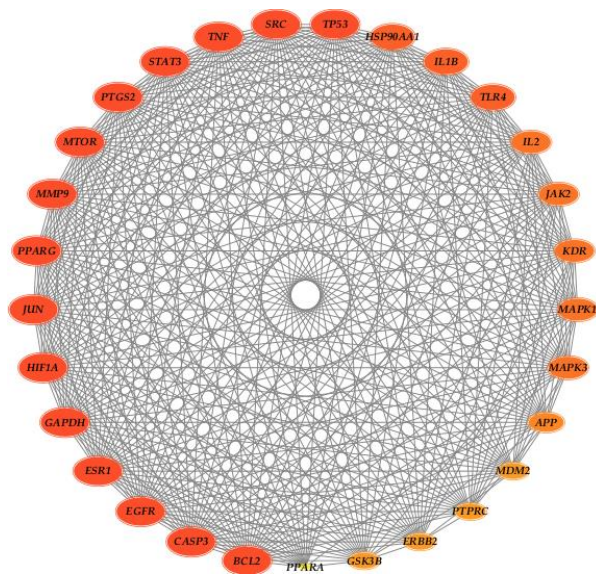


图 2 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram

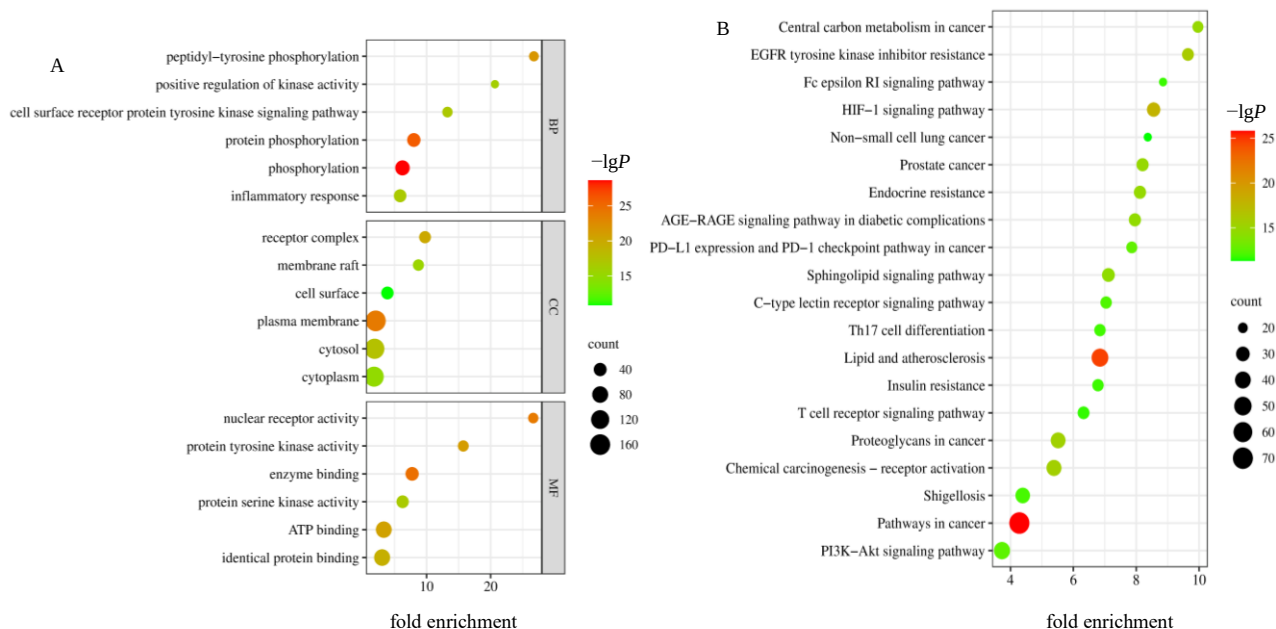


图 3 GO (A)、KEGG (B) 富集分析图

Fig. 3 GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis diagrams

HA、LN、ALP 活性显著升高 ($P < 0.01$), ALB 活性显著降低 ($P < 0.01$), 提示肝纤维化模型复制成功; 相较于模型组, 水飞蓟素与草苈蓉纳拉昔均可显著降低肝纤维化大鼠血清 AST、ALT、HA、LN、ALP 水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 升高 ALB 水平

条目分别为 912、215、109 条, 根据 P 值大小选取排名前 18 的绘制成气泡图, 见图 3-A; 利用 KEGG 将关键靶蛋白映射到通路上, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 富集通路分析得到 183 条通路。以 fold enrichment 和 P 值为指标, 选择 count 排列前 20 个富集分析绘制气泡图, 见图 3-B。KEGG 通路注释分析显示 HIF-1 信号通路较为显著。

3.2 大鼠肝脏组织病理学观察

HE 染色结果见图 4, 对照组大鼠肝组织结构清晰、排列整齐、肝细胞圆润饱满; 模型组大鼠肝脏组织中可见多量静脉周围肝细胞坏死, 细胞核固缩、溶解, 嗜酸性增强, 结构不清, 周围伴有淋巴细胞、粒细胞浸润, 并伴有出血, 可见较多细胞水肿, 细胞肿胀, 胞质疏松淡染; 水飞蓟素及草苈蓉纳拉昔各剂量均能缓解病理损伤程度, 其中以水飞蓟素组最优, 高剂量组次之, 且呈现剂量相关性。

3.3 草苈蓉纳拉昔对大鼠血清 ALT、AST、HA、LN、ALP、ALB、HYP 水平的影响

与对照组相比, 模型组大鼠血清 ALT、AST、

($P < 0.01$), 且草苈蓉纳拉昔作用呈现剂量相关性, 见表 3。

3.4 草苈蓉纳拉昔对肝纤维化大鼠肝脏中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、SOD、MDA、GSH-Px 水平的影响

与对照组相比, 模型组大鼠肝脏中 TNF- α 、IL-

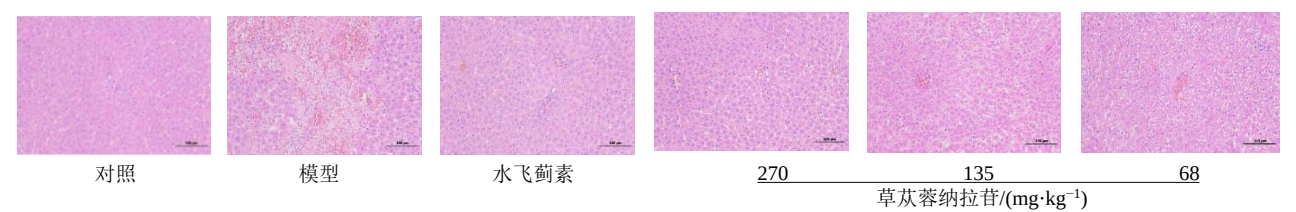


图 4 草苳蓉纳拉昔对肝纤维化模型大鼠肝脏组织病理学的影响 (×200)

Fig. 4 Effect of *B. rossica boschnalioside* on liver pathology in HF model rats (×200)

表 3 草苳蓉纳拉昔对肝纤维化模型大鼠血清 ALT、AST、HA、LN、ALP、ALB 水平的影响 (x̄ ± s, n=6)

Table 3 Effects of *B. rossica boschnalioside* on serum ALT, AST, HA, LN, ALP, and ALB levels in HF model rats (x̄ ± s, n=6)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	HA/ (μg·L ⁻¹)	LN/ (μg·L ⁻¹)	ALP/ (μg·L ⁻¹)	ALB/ (μg·L ⁻¹)
对照	—	137.50±12.50	162.11±6.26	60.23±10.56	29.68±5.25	32.55±8.23	520.11±50.25
模型	—	182.13±15.25 ^{##}	202.55±20.11 ^{##}	120.11±17.86 [#]	43.56±9.74 ^{##}	60.10±10.37 ^{##}	350.25±42.11 ^{##}
水飞蓟素	50	152.12±8.45 ^{**}	178.32±7.53 ^{**}	70.21±9.26 ^{**}	30.21±6.76 ^{**}	34.11±6.54 ^{**}	425.11±42.32 ^{**}
草苳蓉纳拉昔	270	155.53±7.45 ^{**}	180.11±6.47 ^{**}	75.56±10.23 ^{**}	32.25±5.23 [*]	38.22±8.55 ^{**}	418.02±41.95 ^{**}
	135	160.21±11.21 ^{**}	185.21±8.23 ^{**}	80.34±10.21 ^{**}	35.25±7.28	40.57±9.25 ^{**}	405.11±17.96 [*]
	68	162.23±12.11 ^{**}	190.11±9.12 [*]	85.47±11.12 ^{**}	37.13±8.33	42.33±7.33 ^{**}	385.22±63.34

与对照组比较: [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01。

[#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group.

6、IL-1β、MDA 水平均显著升高 (*P*<0.01); 相较于模型组, 水飞蓟素组及草苳蓉纳拉昔高、中、低剂量组大鼠肝脏中 TNF-α、IL-6、IL-1β、MDA 水平均显著降低 (*P*<0.01), 其中以阳性对照组效果最优, 高剂量组次之, 且草苳蓉纳拉昔作用呈现剂量相关性。

与对照组相比, 模型组大鼠肝脏 SOD、GSH-Px 水平显著降低 (*P*<0.01); 相较于模型组, 水飞蓟素组及草苳蓉纳拉昔高、中、低剂量组肝脏中 SOD 水平显著升高 (*P*<0.01); 水飞蓟素组及草苳蓉纳拉昔高、中剂量组 GSH-Px 水平显著升高 (*P*<0.05、0.01), 见表 4。

表 4 草苳蓉纳拉昔对肝纤维化大鼠肝脏中 TNF-α、IL-6、IL-1β、SOD、MDA、GSH-Px 水平的影响 (x̄ ± s, n=6)

Table 4 Effects of *B. rossica boschnalioside* on TNF-α, IL-6, IL-1β, SOD, MDA, and GSH-Px levels in liver of HF rats (x̄ ± s, n=6)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·g ⁻¹)	IL-6/(pg·g ⁻¹)	IL-1β/(pg·g ⁻¹)	SOD/(U·g ⁻¹)	MDA/(U·g ⁻¹)	GSH-Px/(nmol·g ⁻¹)
对照	—	398.11±40.52	200.23±20.56	6.21±2.05	12.11±4.20	211.11±22.23	0.25±0.05
模型	—	842.11±92.11 ^{##}	382.11±42.23 ^{##}	18.59±4.62 ^{##}	5.05±1.22 ^{##}	398.22±31.23 ^{##}	0.13±0.02 ^{##}
水飞蓟素	50	402.11±62.11 ^{**}	220.23±22.23 ^{**}	7.21±2.67 ^{**}	6.35±1.56 ^{**}	352.11±29.16 ^{**}	0.21±0.02 ^{**}
草苳蓉纳拉昔	270	473.24±72.25 ^{**}	240.04±24.12 ^{**}	8.55±3.12 ^{**}	7.33±2.11 ^{**}	301.11±25.74 ^{**}	0.20±0.03 ^{**}
	135	596.11±69.25 ^{**}	267.13±31.23 ^{**}	10.25±3.78 ^{**}	8.17±2.06 [*]	283.16±27.38 ^{**}	0.18±0.04 [*]
	68	625.15±77.92 ^{**}	278.33±35.21 ^{**}	11.57±6.26 ^{**}	9.02±3.16 [*]	251.16±24.64 ^{**}	0.16±0.04

与对照组比较: ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01。

^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group.

3.5 草苳蓉纳拉昔对肝纤维化大鼠血清、肝脏代谢的影响

通过对 UPLC-TOF-MS 产生的数据进行分析, 应用非监督性正交偏最小二乘判别分析法对 PCA 进行处理, 以此表现肝纤维化大鼠血清、肝脏样本代谢轮廓的状态, 见图 5。结果显示在血 (A、B)

及肝脏 (C、D) 样本中对照组与模型组均明显分开, 表明两组之间存在显著性差异, 反映出本研究建立模型的可靠性较高; 对照组、模型组与草苳蓉纳拉昔给药组同时比较可发现, 无论是在血清中还是在肝脏样本中 3 组均呈现出各自聚类且草苳蓉纳拉昔组存在向对照组回调的趋势, 说明草苳蓉纳拉昔可

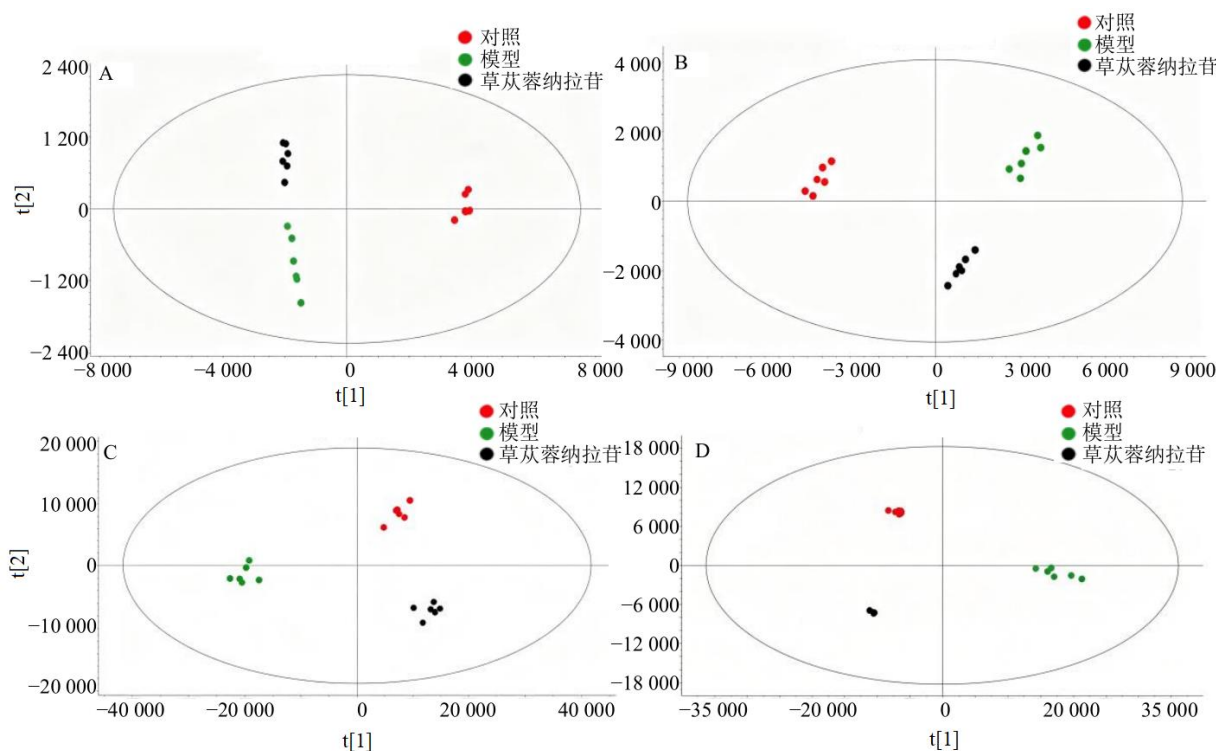


图 5 血清正、负离子模式下 (A、B) 和肝脏正、负离子模式下 (C、D) 对照组、模型组、草苳蓉纳拉昔组 PCA 图
Fig. 5 PCA plots of control group, model group, and *B. rossica* boschnalioside group in serum positive and negative ion modes (A and B) and liver positive and negative ion modes (C and D)

改善模型组大鼠血清及肝脏样本代谢的偏离。为了进一步验证血清及肝脏样本中对照组与模型组各样本的分离情况，并最大限度地提高组间分离效果，采用 OPLS-DA 方法进行监督，该监督方法建立的模型具有较高的解释率和预测率。如图 6 所示，OPLS-DA 显著提高了数据的分离和聚集能力，2 组样本的体内代谢谱呈现出各自聚类，位于散点评分的 3 个不同区域，各组代谢轨迹相似性好，重叠少，彼此相距较远，表明肝纤维化大鼠血清及肝脏内发生了显著的生物学变化。OPLS-DA 模型的稳定性和预测能力应通过交叉验证 (CV) 和替代实验进行评估。得分图模型进行 100 次随机置换检验，任何 1 次随机排列产生的 R^2 、 Q^2 均小于模型组的 R^2 、 Q^2 ，表明建立的模型可靠，未发生过度拟合，模型具有良好的预测能力，见图 7。观察 S-plot 图可知，大多数代谢产物离子在原点周围聚集，偏离原点的离子占少数，这些偏离圆点的离子说明两组之间存在差异，见图 8。

3.6 大鼠血清及肝脏内源性潜在生物标志物

通过对大鼠血清及肝脏中代谢产物变化的预测，筛选出符合 $VIP > 1$, $\text{fold change} > 1.2$ 或 < 0.8 及 $q\text{-value} > 0.5$ 的代谢产物。在血清代谢中筛选

出 13 个共同的潜在生物标志物，肝脏中筛选出 20 个差异标志物。经过离子强度的比较发现，草苳蓉纳拉昔可上调肝纤维化大鼠血清中 9 个生物标志物以及肝脏中 10 个潜在生物标志物，下调肝纤维化大鼠血清中 4 个生物标志物以及肝脏中 10 个潜在生物标志物 ($P < 0.05$, 0.01)，见表 5、6。

3.7 血清、肝脏中潜在生物标志物的通路分析

对筛选出的生物标志物进行富集分析，以确定其在大鼠血清及肝脏代谢中的标志作用，并通过通路分析来识别相关的代谢途径。设定潜在代谢通路的阈值为大于 0.10，分析结果显示血清生物标志物共涉及 7 条代谢通路，其中 $P < 0.05$ 且影响值 > 0 的关键代谢途径主要包括醚脂代谢、生物素代谢、 α -亚麻酸代谢和甘油磷脂代谢等；肝脏生物标志物涉及 13 条代谢通路，其中， $P < 0.05$ 且影响值 > 0 的关键代谢途径主要包括谷胱甘肽代谢、鞘脂代谢以及牛磺酸和亚牛磺酸代谢等，见图 9。

3.8 构建“代谢物-酶-基因”网络图

MetaboAnalyst 5.0 在线分析对 13 个血清、20 个肝脏差异代谢物和 295 个靶点蛋白进行分析，结果显示代谢物和靶点蛋白共作用于 3 个代谢通

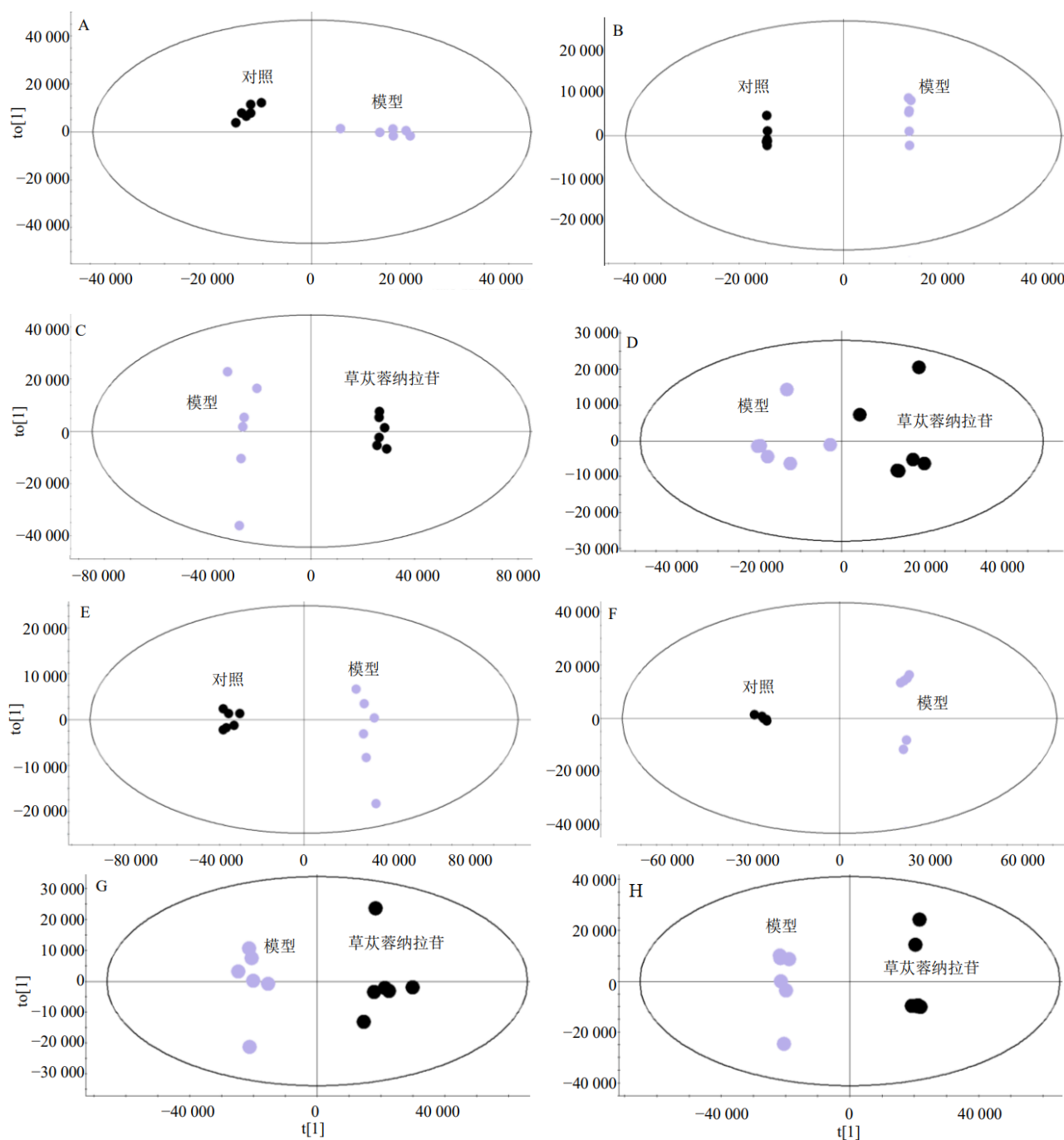


图 6 血清正(A、B)、负(C、D)离子模式下和肝脏正(E、F)、负离子模式下(G、H)的 OPLS-DA

Fig. 6 OPLS-DA in serum positive (A and B) and negative (C and D) ion modes and liver positive (E and F) and negative ion (G and H) modes

路：糖酵解与糖异生、嘌呤代谢、尿素循环以及精氨酸、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺的代谢，见图 10，红色六边形、灰色钻石、绿色圆形矩形和蓝色圆圈分别代表差异代谢物、反应、蛋白质和核心基因。结合过往研究显示，糖酵解与糖异生更为重要。

3.9 草苈蓉纳拉昔对 PI3K、Akt、HKII、HIF1A 蛋白表达的影响

结果见图 11，与对照组相比，肝纤维化模型组大鼠肝组织中 p-Akt、p-PI3K 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.01$)，HIF1A、HKII 蛋白水平显著升高 ($P < 0.01$)；相较于模型组，水飞蓟素组及草苈蓉纳拉昔

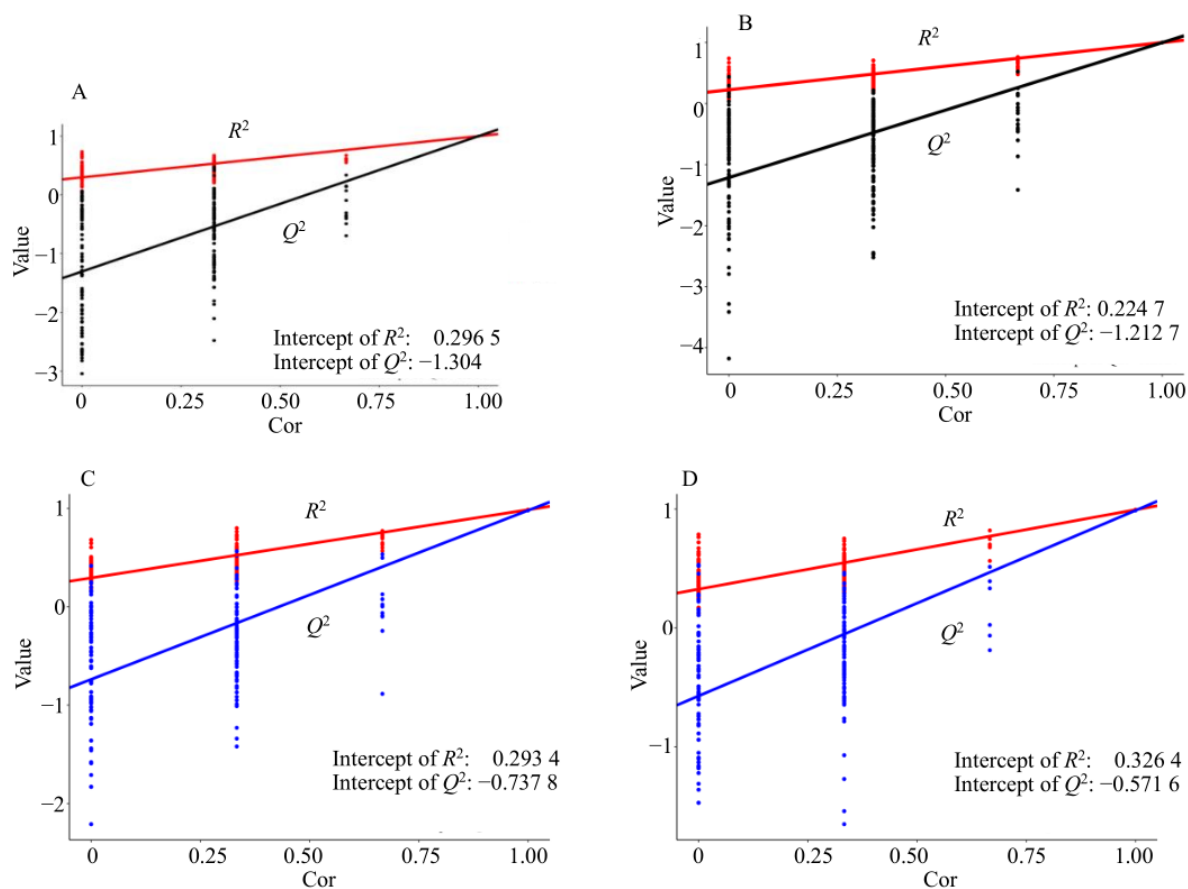


图 7 血清正、负离子模式下 (A、B) 和肝脏正、负离子模式下 (C、D) 质控图

Fig. 7 QC plots in serum positive and negative ion modes (A and B) and liver positive and negative ion modes (C and D)

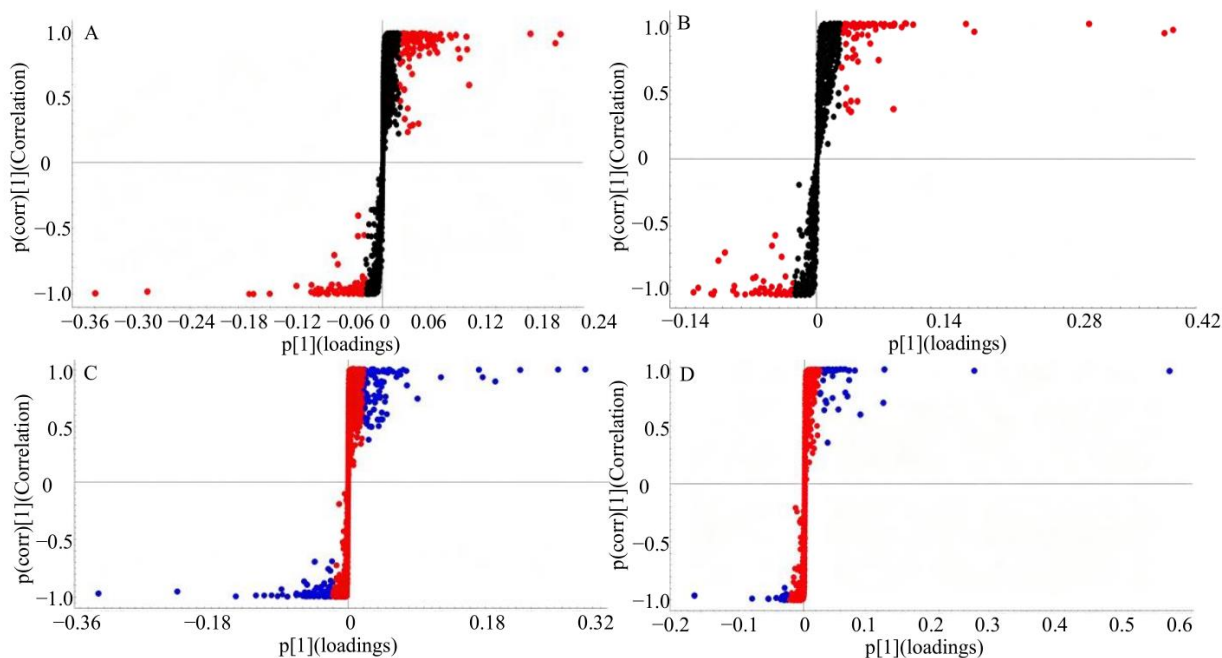


图 8 血清正、负离子模式下 (A、B) 和肝正、负离子模式下 (C、D) S-plot 图

Fig. 8 S-plot plots in serum positive and negative ion modes (A and B) and liver positive and negative ion modes (C and D)

表 5 大鼠血清样本中潜在生物标志物的信息

Table 5 Information on potential biomarkers in rat serum samples

编号	HMDB 号	分子式	代谢物英文名称	代谢物中文名称	模型 vs 对照	草苈蓉纳拉甘 vs 模型
1	10382	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	lysoPC(16 : 0)	溶血磷脂酰胆碱	↓ ^{##}	↑ ^{**}
2	07954	C ₄₅ H ₈₆ NO ₈ P	PC[15 : 0/22 : 2(13Z, 16Z)]	磷脂酰胆碱	↓ [#]	↑ [*]
3	09776	C ₄₇ H ₉₀ NO ₇ P	PE[24 : 1(15Z)/P-18 : 1(11Z)]	磷脂酰乙醇胺	↓ [#]	↑ [*]
4	08046	C ₄₆ H ₈₆ NO ₈ P	PC[18 : 0/20 : 3(5Z, 8Z, 11Z)]	磷脂酰胆碱	↓ ^{##}	↑ [*]
5	0000289	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	uric acid	尿酸	↑ [#]	↓ [*]
6	0000182	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	L-lysine	赖氨酸	↑ [#]	↓ [*]
7	0001388	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	alpha-linolenic acid	α-亚麻酸	↓ ^{##}	↑ ^{**}
8	0007858	C ₃₇ H ₇₁ O ₈ P	PA[16 : 0/18 : 1(11Z)]	磷脂醇	↓ ^{##}	↑ ^{**}
9	0010404	C ₃₀ H ₅₀ NO ₇ P	lysoPC[22 : 6(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)/0 : 0]	溶血磷脂酰胆碱	↑ [#]	↓ [*]
10	12107	C ₄₇ H ₉₃ N ₂ O ₆ P	SM[d18 : 1/24 : 1(15Z)]	鞘磷脂	↑ ^{##}	↓ [*]
11	0012108	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	lysoPC(17 : 0/0 : 0)	溶血磷脂酰胆碱	↓ ^{##}	↑ ^{**}
12	0010384	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	lysoPC(18 : 0/0 : 0)	溶血磷脂酰胆碱	↓ [#]	↑ ^{**}
13	0011148	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	PC[18 : 1(9Z)e/2 : 0]	磷脂酰胆碱	↓ [#]	↑ ^{**}

↓-下降; ↑-上升; 与对照组比较: [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01。↓-decrease; ↑-increase; [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group.

表 6 大鼠肝脏样本中潜在生物标志物的信息

Table 6 Information on potential biomarkers in rat liver samples

编号	HMDB 号	分子式	代谢物英文名称	代谢物中文名称	模型 vs 对照	草苈蓉纳拉甘 vs 模型
1	0000125	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	glutathione	谷胱甘肽	↑ [#]	↓ [*]
2	0000269	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	sphinganine	鞘氨醇	↑ [#]	↓ [*]
3	0000036	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	taurocholic acid	牛黄胆酸	↓ ^{##}	↑ [*]
4	0000985	C ₈ H ₁₇ NOS ₂	dihydrolipoamide	二氢硫辛酰胺	↓ [#]	↑ [*]
5	0003337	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	oxidized glutathione	氧化谷胱甘肽	↓ [#]	↑ [*]
6	0000313	C ₁₈ H ₂₂ O ₃	16β-hydroxyestrone	16β-羟基雌酮	↑ [#]	↓ [*]
7	0010404	C ₃₀ H ₅₀ NO ₇ P	lysoPC[22 : 6(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)]	溶血磷脂酰胆碱	↑ [#]	↓ [*]
8	0000252	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	sphingosine	鞘氨醇	↑ ^{##}	↓ [#]
9	0004185	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₄	5-hydroxyindoleacetyl glycine	5-羟基吲哚乙酰甘氨酸	↓ ^{##}	↑ [*]
10	0010381	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	lysoPC(15 : 0)	溶血磷脂酰胆碱	↑ [#]	↓ [*]
11	10382	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	lysoPC(16 : 0)	溶血磷脂酰胆碱	↓ [#]	↑ [*]
12	0001220	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	prostaglandin E ₂	前列腺素 E ₂	↑ [#]	↓ [*]
13	0010383	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	lysoPC[16 : 1(9Z)/0 : 0]	溶血磷脂酰胆碱	↓ ^{##}	↑ ^{**}
14	0010381	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	lysoPC(15 : 0/0 : 0)	溶血磷脂酰胆碱	↓ ^{##}	↑ ^{**}
15	0012108	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	lysoPC(17 : 0/0 : 0)	溶血磷脂酰胆碱	↓ ^{##}	↑ ^{**}
16	0000929	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	L-tryptophan	L-色氨酸	↑ ^{##}	↓ ^{**}
17	0003337	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	oxidized glutathione	氧化谷胱甘肽	↓ ^{##}	↑ ^{**}
18	0000220	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	palmitic acid	棕榈酸	↑ [#]	↓ [*]
19	0000167	C ₄ H ₉ NO ₃	L-threonine	L-苏氨酸	↓ ^{##}	↑ ^{**}
20	0000929	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	L-tryptophan	左色氨酸	↑ [#]	↓ [*]

↓-下降; ↑-上升; 与对照组比较: [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01。↓-decrease; ↑-increase; [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group.

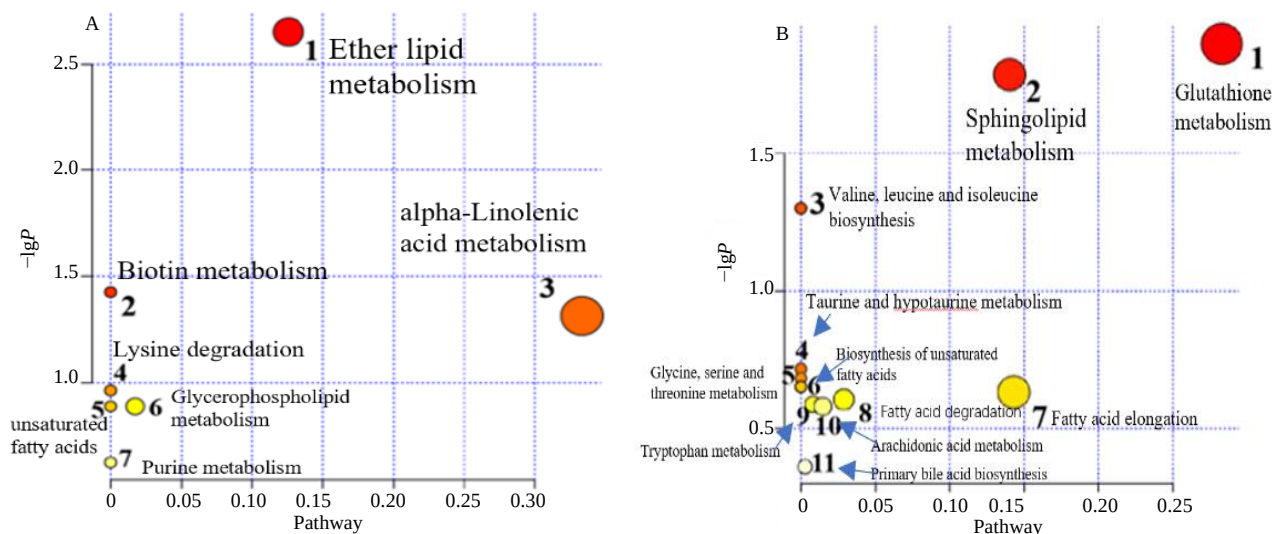
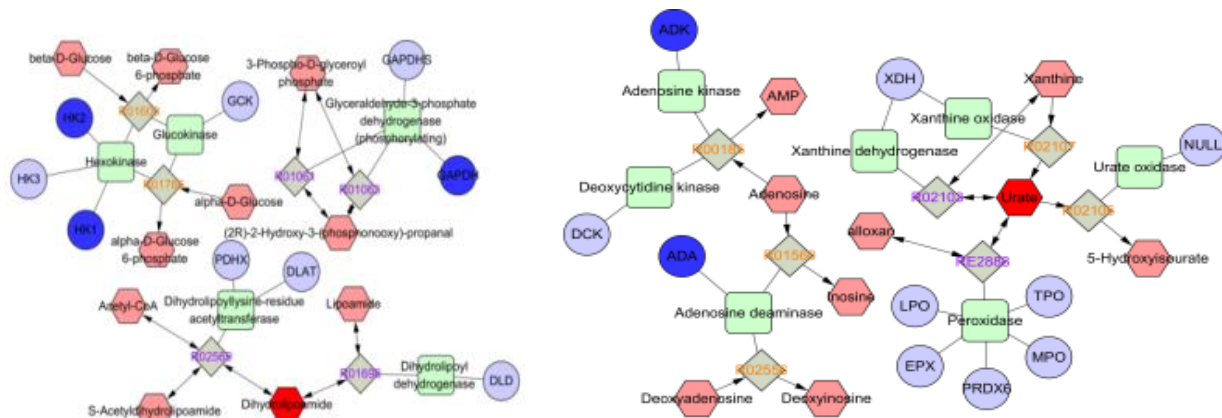


图 9 血清 (A)、肝脏 (B) 代谢通路分析图

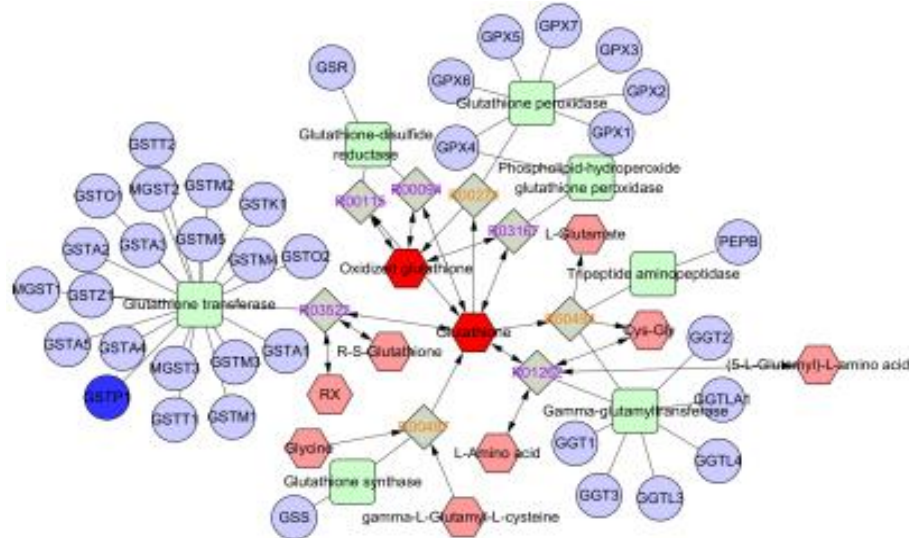
Fig. 9 Metabolic pathway analysis diagram of serum (A) and liver (B)

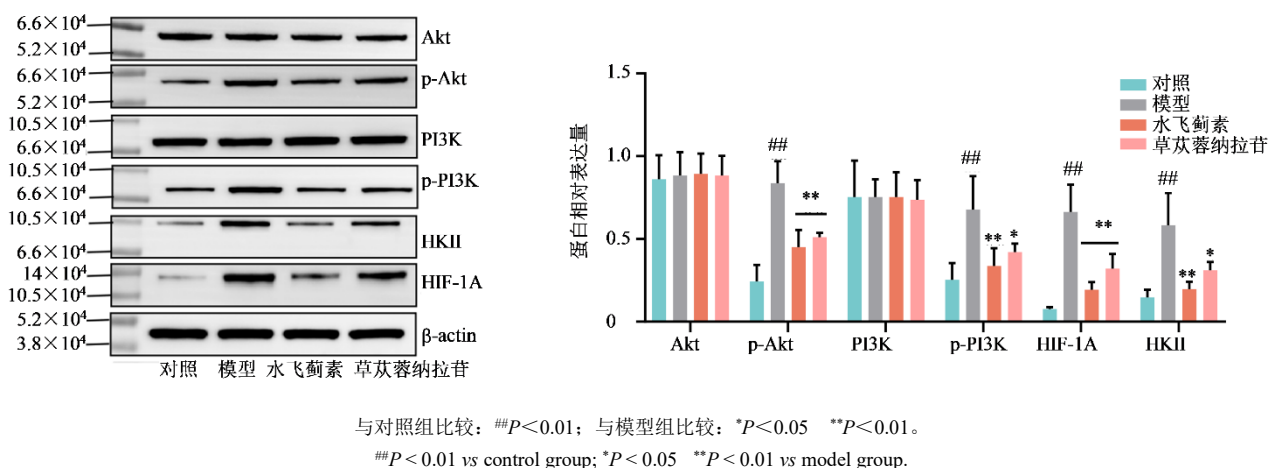
糖酵解与糖异生

嘌呤代谢



尿素循环以及精氨酸、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺的代谢



图 11 草苋蓉纳拉昔对 PI3K、Akt、HKII、HIF1A 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 11 Effect of *B. rossica boschnalioside* on expression of PI3K, Akt, HKII, and HIF1A proteins ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

高剂量组大鼠肝组织中 p-Akt、p-PI3K 磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，HIF1A、HKII 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，提示草苋蓉纳拉昔通过降低 p-PI3K、p-Akt、HKII、HIF1A 蛋白表达进而达到疾病的防治作用。

4 讨论

本研究整合网络药理学、代谢组学，系统探讨了草苋蓉纳拉昔抗肝纤维化的作用机制。通过网络药理学挖掘到 295 个草苋蓉纳拉昔防治肝纤维化的靶点，PPI 网络分析显示核心靶点包括：GAPDH、EGFR、GSK3B、MAPK1、HRAS，KEGG 通路注释分析显示 HIF-1 signaling pathway 信号通路最为显著。相关研究显示^[18]，HIF-1 α 是 HIF1 的调节亚基，HIF1 通过调节参与维持氧稳态的基因，作为响应缺氧应激的关键转录因子发挥作用。研究表明^[9]，HIF-1 α 在肝纤维化组织和活化 HSC 中显著增加，敲低 HIF-1 α 表达抑制 HSC 的增殖和激活。本研究结果表明，肝纤维化模型大鼠肝组织中 HIF-1 α 蛋白表达显著升高，草苋蓉纳拉昔可显著回调肝纤维化模型大鼠肝组织中 HIF-1 α 蛋白表达异常。进一步证实，草苋蓉纳拉昔可通过 HIF-1 signaling pathway 调控肝纤维化进程。

动物实验表明，草苋蓉纳拉昔可剂量相关性地降低血清 ALT、AST、HA、LN、ALP 及肝组织 HYP 水平，提升 ALB 含量，说明其具有显著的肝保护与抗纤维化作用。ALT 和 AST 是反映肝细胞损伤的经典指标，其升高与肝细胞坏死及线粒体损伤密切相关^[20-21]。HA 是一种由间充质细胞产生的糖胺聚

糖，其水平的变化可以作为评估肝纤维化和肝损伤的一个指标，LN 作为 ECM 成分，其水平升高反映了肝窦毛细血管化和纤维化进程，二者是评估肝纤维化的 2 种主要血清标志物^[22-23]。HYP 是一种特异性存在于胶原蛋白中的氨基酸，其含量变化可以直接反映肝脏中胶原蛋白的量及其纤维化的程度^[24-26]。肝脏受损时肝细胞完整性受到破坏，肝脏损伤会干扰体内 ALB 的合成、运输和释放过程，进而导致血液中 ALB 水平的下降^[27]。草苋蓉纳拉昔干预后上述指标显著改善，表明其能够有效减轻肝细胞损伤、抑制 ECM 积累，延缓肝纤维化进展。

持续的炎症和氧化应激失衡是肝纤维化的主要驱动力^[28]。为了进一步探究草苋蓉纳拉昔治疗肝纤维化的机制，检测了肝组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平以及氧化应激指标 SOD、MDA、GSH-Px 水平。MDA 为典型的脂质过氧化反应的代谢产物，其含量可反映组织细胞氧化损伤程度，SOD 可清除自由基，抑制脂质过氧化反应^[29-30]，相关研究发现^[31]，肝纤维化进程中还原型谷胱甘肽及 GSH-Px 活力下降，还原型谷胱甘肽及 GSH-Px 和 SOD 可反应机体抗氧化能力，且 GSH-Px 可保护细胞膜，增强机体抗氧化能力^[32]。本研究结果显示，草苋蓉纳拉昔干预后可显著回调上述指标，进而调节炎症及氧化应激稳态，使其趋于正常水平，表明其可通过抑制炎症反应、增强抗氧化能力来减轻肝损伤和纤维化进程，以此达到疾病的治疗作用。

代谢组学分析进一步揭示了草苋蓉纳拉昔对

肝纤维化大鼠体内代谢紊乱的调节作用,血清与肝脏代谢分析显示,模型组与对照组代谢图谱显著分离,草苈蓉纳拉昔干预后可明显回调代谢轨迹,提示其能够系统性改善肝纤维化相关的代谢异常。共鉴定出血清差异代谢物 13 个,肝脏差异代谢物 20 个,血清代谢通路主要涉及醚脂代谢、生物素代谢、 α -亚麻酸代谢、赖氨酸降解、不饱和脂肪酸的生物合成等代谢通路;肝脏组织代谢通路主要涉及谷胱甘肽代谢、鞘脂代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、牛磺酸和次牛磺酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等代谢通路。醚脂代谢参与了如炎症、生殖和血压调节等生理过程,与炎症反应密切相关^[33]。脂肪酸代谢失调,如脂肪酸合成和分解之间的不平衡,可能导致有毒脂质物质的积累,从而引起肝细胞应激、炎症和死亡。鞘脂代谢异常可影响线粒体功能及氧化应激,参与纤维化进程^[34]。生物素是正常细胞功能、生长和发育中必需的微量营养素,它参与脂肪合成、氨基酸代谢和糖异生等代谢过程^[35]。谷胱甘肽代谢是机体抗氧化防御的核心通路,其异常直接反映氧化应激状态^[31-32]。上述代谢通路的紊乱与回归进一步印证了草苈蓉纳拉昔调节炎症与氧化应激稳态的作用。为深入验证其在氧化应激层面的调控机制,检测了 PI3K、Akt 的蛋白表达情况。PI3K 与 Akt 均是促进细胞生存和维持细胞正常功能关键的信息分子,并且一道构成细胞对外应激反应过程中的促进细胞生长、抑制细胞凋亡和维持细胞重要功能的信号转导链^[36]。当 PI3K 被激活后,它能够识别并催化磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP2)转化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP3),PIP3 作为第二信使,能够与 Akt 的 PH 结构域特异性结合,磷酸化 Akt。磷酸化的 Akt 激活包括 mTOR 在内的多种下游靶蛋白。mTOR 作为 Akt 的下游效应分子之一,可以抑制 HSC 的活化与增殖,从而减少细胞外基质(ECM)的过度沉积,缓解肝纤维化过程^[37-38]。结果显示,草苈蓉纳拉昔可显著下调 p-PI3K、p-Akt 的磷酸化水平,进而调节机体的氧化应激水平,以此达到疾病的防治目的。

为进一步明确草苈蓉纳拉昔调控肝纤维化的核心代谢通路,本研究将网络药理学预测的靶点与代谢组学鉴定的差异代谢物进行整合分析。结果显示,差异代谢物与潜在靶点共同富集于糖酵解与糖异生代谢通路。该通路是机体能量代谢的核心环节,其稳态失衡可导致氧化应激加剧、能量代谢紊

乱,进而促进肝星状细胞活化及肝纤维化进展^[39]。结合前述代谢组学中谷胱甘肽代谢、生物素代谢等相关通路的改变,可以推测草苈蓉纳拉昔可能通过干预糖酵解与糖异生代谢稳态,从能量代谢和氧化还原平衡 2 个层面协同发挥抗纤维化作用。

尽管本研究整合网络药理学与代谢组学技术,并结合动物实验验证,较为系统地揭示了草苈蓉纳拉昔抗肝纤维化的多靶点、多通路作用机制,但仍存在一定局限性。首先,网络药理学预测的靶点与代谢组学鉴定的差异代谢物之间的关联主要基于相关性分析,缺乏直接的因果验证,后续需借助分子对接、表面等离子体共振或基因编辑等技术进一步明确调控关系;其次,本研究仅采用 CCl₄ 诱导的雄性 SD 大鼠模型进行体内实验,未在 HSC 等体外模型中验证关键信号通路及代谢调控的直接作用;最后,非靶向代谢组学方法难以对关键差异代谢物进行准确定量分析,未来需结合靶向代谢组学策略,以提高结果的准确性和可靠性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- [2] Zhan L, Huang C, Meng X M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α in hepatic fibrosis: A promising therapeutic target [J]. *Biochimie*, 2015, 108: 1-7.
- [3] 于收, 孙延芬, 王佳佳. 参芪益肝汤对乙肝肝纤维化患者治疗前后肝功能及肝纤维化指标的影响及意义 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(8): 2121-2124.
Yu S, Sun Y F, Wang J J. Effects and significance of Shenqi Yigan decoction on liver function and index of hepatic fibrosis in patients with hepatitis B fibrosis before and after treatment [J]. *World Chin Med*, 2019, 14(8): 2121-2124.
- [4] 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.
Xiao Y H, An Z X, Wang F, et al. Explore the mechanism of limonin against hepatic fibrosis based on network pharmacology and animal experiments [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2024, 41(4): 460-468.
- [5] 武士豪, 何钰宏, 李嘉兴, 等. 肝星状细胞的代谢重编程在肝纤维化发展中的研究现状 [J]. *广东医科大学学报*, 2024, 42(5): 518-522, 534.
Wu S H, He Y H, Li J X, et al. Overview of the role of

- metabolic reprogramming of hepatic stellate cells in liver fibrosis [J]. J Guangdong Med Univ, 2024, 42(5): 518-522, 534.
- [6] 吴红雁, 顾亚琴, 周红成, 等. 环黄芪醇对四氯化碳致小鼠肝纤维化及糖酵解的影响 [J]. 中国药房, 2022, 33(14): 1677-1681, 1687.
- Wu H Y, Gu Y Q, Zhou H C, et al. Effects of cycloastragenol on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis and glycolysis in mice [J]. China Pharm, 2022, 33(14): 1677-1681, 1687.
- [7] 金爱花, 朱洁波, 尹学哲, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷 (IGBR) 对 TGF- β 1 诱导的 HepG2 细胞上皮间质转化模型的影响 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(6): 1175-1182.
- Jin A H, Zhu J B, Yin X Z, et al. Effect of iridoid glycosides from *Boschniakia rossica* on epithelial-mesenchymal transition of HepG2 cells induced by transforming growth factor-beta 1 [J]. J Clin Hepatol, 2024, 40(6): 1175-1182.
- [8] 王沁凯. 《新修本草》引用本草文献考略 [J]. 中医文献杂志, 2004, 22(4): 22-24.
- Wang Q K. Textual research on citing herbal literature in *Newly Revised Materia Medica* [J]. J Tradit Chin Med Lit, 2004, 22(4): 22-24.
- [9] 许长青, 许顺贵, 刘春光, 等. 草苈蓉的药理作用研究进展 [J]. 武警医学, 2023, 34(1): 75-78.
- Xu C Q, Xu S G, Liu C G, et al. Research advances in pharmacological effects of cistanche [J]. Med J Chin People's Armed Police Forces, 2023, 34(1): 75-78.
- [10] 黄帝内经 [M]. 刘明武注. 长沙: 中南大学出版社, 2007.
- Huangdi Neijing* [M]. Annotated by Liu Mingwu. Changsha: Central South University Press, 2007.
- [11] 陈民, 田梦飞, 冯昌寅, 等. HPLC 法同时测定草苈蓉中草苈蓉纳拉苷和草苈蓉苷 B [J]. 植物研究, 2021, 41(3): 436-440.
- Chen M, Tian M F, Feng C Y, et al. Simultaneous determination of baschnaloside and rossicaside B in *Boschniakia rossica* by HPLC [J]. Bull Bot Res, 2021, 41(3): 436-440.
- [12] 刘莉园, 张钊, 葛乃嘉, 等. 草苈蓉多糖对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(18): 1479-1485.
- Liu L Y, Zhang Z, Ge N J, et al. Effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on LPS-induced inflammation of RAW264.7 macrophages [J]. Chin Pharm J, 2021, 56(18): 1479-1485.
- [13] 张天. 草苈蓉多糖对脂多糖诱导的小鼠 J774A.1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用 [D]. 延边朝鲜族自治州: 延边大学, 2021.
- Zhang T. Inhibitory effect of *Boschniakia rossica* Polysaccharide on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse J774A.1 macrophages [D]. Yanbian Korean Autonomous Prefecture: Yanbian University, 2021.
- [14] 张航, 王辉, 杨树东. 草苈蓉的本草考证及药理研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(1): 40-42.
- Zhang H, Wang H, Yang S D. Herbalogical study and pharmacological effect of *Boschniakia rossica* [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2016, 32(1): 40-42.
- [15] Quan J S, Piao L, Wang X, et al. Rossicaside B protects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice [J]. Basic Clin Pharma Tox, 2009, 105(6): 380-386.
- [16] Wu C S. Treatment of pig serum-induced rat liver fibrosis with *Boschniakia rossica*, oxymatrine and interferon- α [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(1): 122.
- [17] 张敬博, 陈平平, 于栋华, 等. 黄芩-赤芍药对不同比例配伍抗大鼠肝纤维化模型作用机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 69-77.
- Zhang J B, Chen P P, Yu D H, et al. Mechanism of *Scutellariae Radix-Paeoniae Radix rubra* combination of different proportions against hepatic fibrosis in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(12): 69-77.
- [18] Mesarwi O A, Moya E A, Zhen X, et al. Hepatocyte HIF-1 and intermittent hypoxia independently impact liver fibrosis in murine nonalcoholic fatty liver disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2020, 65(4): 390-402.
- [19] Wang F X, Chen L, Kong D S, et al. Canonical Wnt signaling promotes HSC glycolysis and liver fibrosis through an LDH-A/HIF-1 α transcriptional complex [J]. Hepatology, 2024, 79(3): 606-623.
- [20] Giannini E G. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians [J]. Can Med Assoc J, 2005, 172(3): 367-379.
- [21] Okuda M, Li K, Beard M R, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein [J]. Gastroenterology, 2002, 122(2): 366-375.
- [22] Liu S, Wang X M, Yang G W. Effect of ruanganjiedu decoction inhibit experimental hepatic fibrosis of rats [J]. Afr J Tradit Complementary Altern Med, 2016, 14(1): 242-250.
- [23] 许颖, 罗继娜, 杨柳青, 等. 铁皮石斛多糖基于 Notch 信号通路抗大鼠肝纤维化作用及其超声评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(21): 70-77.
- Xu Y, Luo J N, Yang L Q, et al. Effect of *Dendrobium officinale* polysaccharides in reversing hepatic fibrosis in rats via Notch signaling pathway and ultrasound evaluation [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(21): 70-77.

- 70-77.
- [24] 吴娟, 刘苏杰, 陈平平, 等. 黄芩苷通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路减轻大鼠肝纤维化的作用 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(3): 549-553.
- Wu J, Liu S J, Chen P P, et al. Baicalin alleviates hepatic fibrosis in rats by inhibiting TLR4/MyD88/NF-KB signaling pathway [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(3): 549-553.
- [25] 孙圣楠, 徐雅, 叶飞, 等. 单用西红花或牛黄对 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化程度的影响 [J]. 吉林中医药, 2024, 44(7): 832-837.
- Sun S N, Xu Y, Ye F, et al. Effects of saffron or bezoar alone on the degree of liver fibrosis induced by CCl₄ in rats [J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2024, 44(7): 832-837.
- [26] Kong D S, Zhang Z L, Chen L P, et al. Retraction notice to “Curcumin blunts epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes to alleviate hepatic fibrosis through regulating oxidative stress and autophagy” [J]. Redox Biol, 2025, 84: 103690.
- [27] 梁瑞峰, 宋献美, 葛文静, 等. 大黄素甲醚通过调控 Keap1/Nrf2 信号通路抗大鼠肝纤维化的作用 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(10): 46-51.
- Liang R F, Song X M, Ge W J, et al. Effect of physcion on hepatic fibrosis in rats via regulating Keap1/Nrf2 signaling pathway [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2024, 40(10): 46-51.
- [28] Cheng D, Chai J, Wang H W, et al. Hepatic macrophages: Key players in the development and progression of liver fibrosis [J]. Liver Int, 2021, 41(10): 2279-2294.
- [29] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166.
- [30] Liu J, Guo D Y, Fan Y, et al. Experimental study on the antioxidant activity of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd extracts *in vitro* and *in vivo* [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(7): 11878-11889.
- [31] Pang Q, Jin H, Wang Y, et al. Depletion of serotonin relieves concanavalin A-induced liver fibrosis in mice by inhibiting inflammation, oxidative stress, and TGF- β 1/Smads signaling pathway [J]. Toxicol Lett, 2021, 340: 123-132.
- [32] 钦圣兰, 吴眉, 周扬, 等. 扶正化瘀方对肝纤维化小鼠外周血及肝内淋巴细胞亚群的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(5): 185-189.
- Qin S L, Wu M, Zhou Y, et al. Effects of fuzheng Huayu formula (扶正化瘀方) on peripheral blood and hepatic lymphocyte subsets in mice with liver fibrosis [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2025, 52(5): 185-189.
- [33] Watschinger K, Werner E R. Orphan enzymes in ether lipid metabolism [J]. Biochimie, 2013, 95(1): 59-65.
- [34] Gruevska A, Leslie J, Perpiñán E, et al. Spatial lipidomics reveals sphingolipid metabolism as anti-fibrotic target in the liver [J]. Metabolism, 2025, 168: 156237.
- [35] Cronan J E. Advances in synthesis of biotin and assembly of lipoic acid [J]. Curr Opin Chem Biol, 2018, 47: 60-66.
- [36] 王妍. P13K/Akt 信号转导途径在肝星状细胞凋亡中的作用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2006.
- Wang Y. The role of the P13K/Akt signaling pathway in the apoptosis of hepatic stellate cells [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2006
- [37] Xiu A Y, Ding Q, Li Z, et al. Doxazosin attenuates liver fibrosis by inhibiting autophagy in hepatic stellate cells via activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Drug Des Dev Ther, 2021, 15: 3643-3659.
- [38] Zhang Z L, Shang J, Yang Q Y, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells ameliorate hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway and remodeling choline metabolism [J]. J Nanobiotechnol, 2023, 21(1): 29.
- [39] Wang S M, Zhao Y C, Yang J J, et al. Ginseng polysaccharide attenuates red blood cells oxidative stress injury by regulating red blood cells glycolysis and liver gluconeogenesis [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 300: 115716.

[责任编辑 兰新新]