

苗药马蹄金通过调控 SRC/PI3K/Akt 信号通路改善对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤

晏乾达¹, 唐文超¹, 杜兴艳¹, 申 亲¹, 肖媛媛^{2*}

1. 贵州中医药大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州中医药大学 养生康复学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 探讨苗药马蹄金对对乙酰氨基酚 (APAP) 诱导的药物性肝损伤 (DILI) 的保护作用及分子机制。方法 采用网络药理学筛选马蹄金的主要成分及抗 DILI 潜在靶点, 预测核心调控通路; 通过分子对接验证关键成分与核心靶点的结合稳定性; 将 42 只小鼠随机分为 7 组 ($n=6$): 对照组, 模型组, *N*-乙酰半胱氨酸 (NAC, 阳性药, $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 马蹄金醇提物 (DREE) 低、中、高剂量 (生药 8.2 、 16.3 、 $32.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, DREE 单给药 (仅给予 $32.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ DREE, 不造模) 组, ig 给药 7 d 后, 除对照组和 DREE 单给药组外, 其余组 ip APAP 诱导 DILI, 24 h 后取材。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) 水平和肝组织超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 水平; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理形态变化; Western blotting 检测 SRC/磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 通路相关蛋白 (SRC、p-PI3K-p85、PI3K-p85、p-Akt、Akt) 的表达。结果 网络药理学筛选出 DREE 的 45 个成分及 163 个抗 DILI 潜在靶点, PI3K-Akt 通路为核心通路, Akt1、肿瘤坏死因子 (TNF)、SRC 为关键靶点; 分子对接显示, DREE 中 β -谷甾醇、乌苏酸与 SRC 的结合能最低 (分别为 -55.1 、 $-51.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), 结合稳定性最优。动物实验显示, 与模型组相比, DREE 中、高剂量组血清 ALT、AST 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肝组织 SOD、CAT、GSH 活性升高, MDA 含量降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肝组织坏死及炎症浸润明显改善; Western blotting 证实, DREE 高剂量组可显著抑制肝组织 SRC 蛋白表达及 PI3K、Akt 的磷酸化水平 ($P < 0.05$)。DREE 单给药组各项指标与对照组比较无显著差异 ($P > 0.05$), 提示实验剂量 DREE 无明显肝毒性。结论 DREE 对 APAP 诱导的 DILI 具有显著保护作用, 其机制可能与抑制 SRC/PI3K/Akt 信号通路激活、缓解氧化应激损伤有关。

关键词: 马蹄金; 药物性肝损伤; 对乙酰氨基酚; SRC/PI3K/Akt 信号通路; 网络药理学; 动物实验

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)08-2699-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.08.007

Miao medicine *Dichondra repens* ameliorates acetaminophen-induced mouse liver injury by regulating SRC/PI3K/Akt signaling pathway

YAN Qianda¹, TANG Wenchao¹, DU Xingyan¹, SHEN Qin¹, XIAO Yuanyuan²

1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. School of Health Preservation and Rehabilitation, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and molecular mechanism of *Dichondra repens*, a Miao ethnic medicine, against acetaminophen (APAP)-induced drug-induced liver injury (DILI). **Methods** Network pharmacology was used to screen the main components of *D. repens* and potential targets against drug-induced liver injury (DILI), and to predict the core regulatory signaling pathways. Molecular docking was performed to verify the binding stability between key components and core targets. An acetaminophen (APAP)-induced mouse model of DILI was established. A total of 42 mice were randomly divided into seven groups ($n=6$): control group, model group, *N*-acetylcysteine (NAC) (positive drug, $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, *D. repens* ethanol extract (DREE) low, medium, and high dose (crude drug 8.2 , 16.3 , $32.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups, and DREE single administration group (only given $32.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ DREE without modeling). After 7 days of ig administration, except for the control group and DREE single administration group, the

收稿日期: 2026-03-03

基金项目: 贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目 [贵中医大创合字 (2024) 13 号]

作者简介: 晏乾达, 男, 研究方向为中药药理学。E-mail: 3416347681@qq.com

*通信作者: 肖媛媛, 女, 博士研究生, 讲师, 研究方向为中药药理学。E-mail: yuanyuanxiao1991@163.com

remaining groups were induced with DILI by ip APAP, and samples were taken after 24 h. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured, as well as the levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) in liver tissue. Pathomorphological changes in the liver were observed by hematoxylin-eosin (HE), and the expression of proteins related to the SRC/PI3K/Akt signaling pathway (SRC, p-PI3K-p85, PI3K-p85, p-Akt, Akt) was verified by Western blotting. **Results** Network pharmacology screening identified 45 components of DREE and 163 potential targets involved in its anti-DILI effect. The PI3K-Akt signaling pathway was identified as the core pathway, with Akt1, TNF, and SRC being the key targets. Molecular docking results showed that β -sitosterol and ursolic acid from DREE had the lowest binding energies with SRC (-55.1 and -51.5 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively), indicating the optimal binding stability. Animal experiment results demonstrated that compared with the model group, the serum levels of ALT and AST in DREE medium and high dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$ and 0.01), the activities of SOD, CAT, and GSH in liver tissues were increased, and the MDA content was decreased ($P < 0.05$ and 0.01). Meanwhile, hepatic necrosis and inflammatory infiltration were significantly improved in DREE-treated groups. Western blotting analysis confirmed that the high-dose DREE group could significantly inhibit the expression of SRC protein and the phosphorylation levels of PI3K and Akt in liver tissues ($P < 0.05$). No significant differences were observed in all indicators between the DREE negative control group and the normal group ($P > 0.05$), suggesting that DREE at the experimental dose exerted no obvious hepatotoxicity. **Conclusion** *D. repens* exerts a significant protective effect against APAP-induced DILI. Its mechanism may be related to the inhibition of SRC/PI3K/Akt signaling pathway activation and the alleviation of oxidative stress injury. **Key words:** *Dichondra repens* Forst.; drug-induced liver injury; acetaminophen; SRC/PI3K/Akt signaling pathway; network pharmacology; animal experiment

药物性肝损伤 (DILI) 是各类药物的常见不良反应之一。近年来, 随着新药不断涌现、非处方药种类和规模的扩大, DILI 的增多给社会医疗带来了较大负担^[1]。由于缺少多中心、大样本前瞻性研究, DILI 在普通人群中的真实发生率难以确认, 我国估算的 DILI 年发生率至少为 23.80/10.00 万人, 呈逐年上升趋势^[2]。DILI 的发病机制非常复杂, 涉及药物相关因素、非遗传因素和遗传因素, 目前最常见的分类方法是根据病因的不同将 DILI 分为固有型肝损伤和特异质型肝损伤 2 大类^[3]。特异质型肝损伤只影响极少个体, 与适应性免疫反应相关, 难以预测。因此, DILI 的研究主要聚焦于固有型肝损伤^[4]。对乙酰氨基酚 (APAP) 是最常见引起固有型肝损伤的药物, 且其肝毒性机制已经得到广泛研究^[5], 其核心机制涉及氧化应激和炎症反应的激活, 目前临床上治疗 DILI 的药物种类较少, 且治疗效果有限^[6]。因此, 探索更安全 and 有效的药物治疗 DILI 是重要研究方向。

中草药对 DILI 具有良好的疗效^[7]。苗药马蹄金 *Dichondra repens* Forst. 为旋花科马蹄金属植物, 主产于四川、贵州等地, 是苗族常用植物药, 全草入药, 苗药名为“窝比除溜”^[8], 有抗炎、抗氧化和保护肝脏的作用^[9]。目前主流中药化学成分数据库对马蹄金的收录尚不全面, 为了研究马蹄金的药效物质基础, 本研究通过文献挖掘收集马蹄金成分, 借

助网络药理学综合方法, 预测马蹄金治疗 DILI 的关键靶点与通路, 并利用 APAP 诱导的小鼠 DILI 模型, 重点验证其对预测出的 SRC/磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 通路的影响, 为马蹄金在 DILI 防治中的应用提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 8 周龄昆明小鼠, 体质量 22~25 g, 购于长沙市天勤生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2024-0021, 小鼠自由采食和饮水, 饲养于室温 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 45%~55%、每天 12 h 昼夜循环环境中, 适应性喂养 7 d。本研究得到了贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会的批准 (批准文号 20240112)。

1.2 药物及主要试剂

马蹄金于 2025 年 5 月采集于贵州省贵阳市, 经贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定为旋花科马蹄金属植物马蹄金 *Dichondra repens* Forst. 的全草。马蹄金醇提物 (DREE) 的制备: 将全草常规加工粉碎, 用 8 倍质量 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 回收乙醇至无醇味后得到稠状浸膏, 采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色法^[9]测得黄酮质量分数为 3.89%。该提取物冷藏保存, 临用时以 0.9% 氯化钠溶液稀释至所需浓度。

APAP (MCE 公司, 批号 HY-66005); *N*-乙酰

半胱氨酸 (NAC) (Solarbio 公司, 批号 8460); 谷胱甘肽 (GSH)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 A006-2-1、A007-1-1、A001-3-2、A003-1-2); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 C009-2-1、C010-2-1); BCA 试剂盒 (Solarbio 公司, 批号 PC0020); c-SRC、PI3K-p85、p-Akt、 β -actin 抗体 (三鹰公司, 批号 00190975、10052244、10042157、23021924); Akt 抗体 (STARTER 公司, 批号 RMC0415010); p-PI3K-p85 抗体 (Affinity 公司, 批号 AF3241)。

1.3 主要仪器

DYCZ-24DN 垂直电泳槽 (北京六一仪器厂); CeBlot™ L1 快速湿转仪 (金斯瑞生物科技股份有限公司); SH-523 化学发光成像系统 (杭州申花科技有限公司); Multiskan FC 型酶标仪 (Thermo scientific 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 马蹄金成分靶点筛选 通过文献挖掘^[10-12]收集马蹄金成分, 采用化源网 (<https://www.chemsrc.com>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 收集马蹄金的靶点, 纳入 Probability>0 的靶点。

2.1.2 DILI 相关靶点筛选 以 “Drug Induced Liver Injury” 为检索词, 从 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 中收集相关靶点, 筛选条件 Relevance score $\geq$ 0.5。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建和分析 利用在线工具 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>) 绘制韦恩图, 筛选马蹄金抗 DILI 的潜在作用靶点。将其上传到 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 进行 PPI 分析。物种选择 “Homo sapiens”, 导出 TSV 格式后导入 CytoScape3.10.1 进行 Degree 的计算, Degree 越大, 表示该节点在所构建的网络中越重要。根据 Degree 大小绘制排序图。

2.1.4 构建“药物-成分-靶点”网络 将马蹄金的主要成分及交集靶点导入 Cytoscape 软件, 根据中药、疾病、化学成分和相应靶标之间的关系, 构建 “药物-成分-靶点” 网络, 并进行可视化分析。

2.1.5 基因本体论 (GO) 功能与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 借助 Metascape 数据库对交集靶点进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析。其中 GO 功能富集分析包括生物过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF); KEGG 通路富集分析可预测马蹄金治疗 DILI 的机制。本研究选择排名前 10 位的 GO 条目和前 20 位的 KEGG 通路进行可视化展示。

2.1.6 分子对接 为进一步分析马蹄金主要成分与核心靶点对应蛋白结合亲和力的强弱, 筛选马蹄金主要成分作为小分子配体, CytoScape3.10.1 筛选出的核心靶点作为蛋白受体。在 PubChem 数据库下载马蹄金主要成分的 3D 结构。在 RCSB PDB 数据库选择分辨率较高的核心靶点蛋白三维晶体结构下载, 通过 PyMOL 软件对蛋白晶体结构进行去水、去配体操作, 并以 PDB 格式保存, 通过 AutoDock 将蛋白晶体设置为大分子, 以 “pdbqt” 文件格式导出保存。利用 AutoVina 进行分子对接, 计算马蹄金主要成分与核心靶点的结合能, 利用 Discovery Studio 2019 Client 软件进行可视化展示。

2.2 动物实验

2.2.1 分组、模型制备及给药 将 42 只小鼠适应性饲养 7 d 后, 随机分为 7 组 ($n=6$): 对照组, 模型组, NAC (阳性药, 200 mg·kg⁻¹) 组, DREE 低、中、高剂量 (生药 8.2、16.3、32.5 g·kg⁻¹) 组, DREE 单给药 (仅给予 32.5 g·kg⁻¹ DREE, 不造模, 旨在评估该剂量下药物本身对肝脏的潜在影响) 组, 各给药组均 ig 给予相应药物, 剂量选择依据先前文献报道^[13]的有效剂量范围及前期预试验结果, 对照组和模型组 ig 给予等体积 0.9%氯化钠溶液。给药 7 d, 第 7 天给药 2 h 后, 对照组和单给药组小鼠 ip 0.9%氯化钠溶液, 其余组小鼠 ip 250 mg·kg⁻¹ APAP (溶于 0.9%氯化钠溶液) 诱导 DILI^[14]。造模后小鼠禁食不禁水, 24 h 后经 1%戊巴比妥钠麻醉后, 取出眼球收集血液样品, 立即于冰台上迅速取肝脏。记录小鼠体质量、肝脏质量, 计算肝脏指数, 采集新鲜肝脏图片。

肝脏指数 = 肝脏质量/体质量

2.2.2 血液生化分析 将血液样品在室温下储存 30 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 提取血清, 用 ALT、AST 检测试剂盒进行生化分析, 酶标仪对结果定量分析。

2.2.3 肝脏氧化应激水平检测 将肝组织切碎并

使用冰上的匀浆缓冲液匀浆 30 min, 制备肝组织匀浆, 分别使用 GSH、CAT、SOD、MDA 试剂盒检测 GSH、CAT、SOD、MDA 水平。

2.2.4 肝脏病理变化观察 将肝组织固定在 4%多聚甲醛中, 石蜡包埋, 切成 4 μm 薄片, 然后用苏木精-伊红 (HE) 染色。采用光学显微镜观察并评估样品的形态学特征。

2.2.5 Western blotting 实验 将肝组织切碎并使用冰上的匀浆缓冲液匀浆 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液, 使用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。根据不同相对分子质量的蛋白, 使用不同百分比的 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质, 转移到聚偏二氟乙烯膜上, 并用高效封闭液封闭 10 min。相应的一抗 (SRC、p-PI3K-p85、PI3K-p85、p-Akt、Akt 和 β -actin) 进行过夜孵育。 β -actin 用作内部对照。使用 TBST 冲洗膜 3 次, 与二抗孵育 1.5 h, 并使用 ECL 检测系统进行可视化。使用 Image J 凝胶

分析软件定量。

2.3 统计分析

使用 SPSS (IBM SPSS Statistics 27.0.1) 软件对实验数据进行统计学分析, Origin Pro 2024b 软件用于图表绘制。所有数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间样本比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 网络药理学与分子对接

3.1.1 靶点筛选与交集分析 通过文献挖掘收集到马蹄金的 45 个成分, 经 Swiss Target Prediction (Probability>0)、化源网及 PubChem 数据库预测, 合并去重后获得 429 个成分相关靶点。以 “Drug Induced Liver Injury” 为检索词, 在 GeneCards 数据库中筛选 Relevance score ≥ 0.5 的 DILI 相关靶点, 取前 1 000 个高相关性靶点纳入分析。利用 Venny 2.1.0 工具进行靶点交集分析, 最终得到 163 个马蹄金抗 DILI 的潜在作用靶点 (图 1-A)。

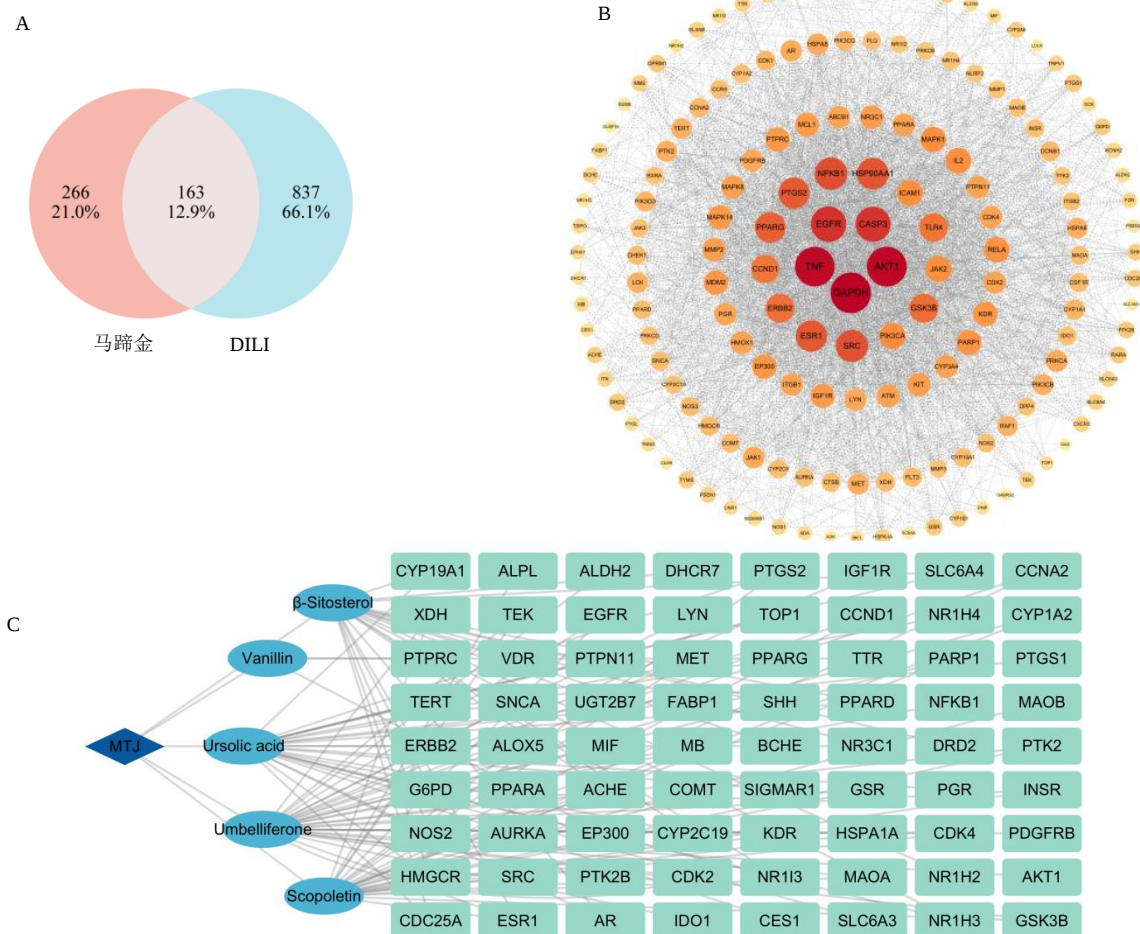


图 1 马蹄金治疗 DILI 交集靶点韦恩图 (A)、PPI 网络 (B)、药物-成分-靶点网络 (C)

Fig. 1 Venn diagram of intersecting targets for DILI treated with *D. repens* (A), PPI network (B), and drug-component-target network (C)

3.1.2 PPI 网络与核心靶点筛选 将 163 个交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络, 导入 Cytoscape 3.10.1 计算 Degree 值, 筛选出 Akt1、TNF、SRC、GAPDH、EGFR、CASP3 为核心靶点 (Degree 值排名前 6), 其中 SRC、Akt1 与 DILI 的炎症调控及氧化应激密切相关 (图 1-B)。

3.1.3 “药物-成分-靶点”网络构建 基于成分的活性与靶点关联性, 筛选出马蹄金的 5 个主要活性成分: β -谷甾醇 (β -sitosterol)、香荚兰醛 (vanillin)、乌苏酸 (ursolic acid)、东莨菪素 (scopoletin)、伞形花内酯 (umbelliferone), 其对应的 DILI 相关靶点共 72 个。构建的“马蹄金-成分-靶点”网络包含 1 个药物节点、5 个成分节点

及 72 个靶点节点, 直观呈现成分与靶点的相互作用关系 (图 1-C), 其中 β -谷甾醇、乌苏酸对应的靶点数量最多, 提示其可能为马蹄金发挥保肝作用的核心成分。

3.1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 GO 功能富集分析显示, 163 个交集靶点主要富集于 3 类过程, BP: 细胞对含氮化合物的反应、对外源物质刺激的反应、细胞对脂质的反应; CC: 脂筏、膜微区、IA 类磷脂酰肌醇 3-激酶复合物; MF: 组蛋白 H3Y41 激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性 (图 2-A)。KEGG 通路富集分析显示, 核心通路包括 PI3K-Akt、NF- κ B、IL-17 等炎症相关通路, 以及细胞凋亡、脂质代谢相关通路 (图 2-B)。

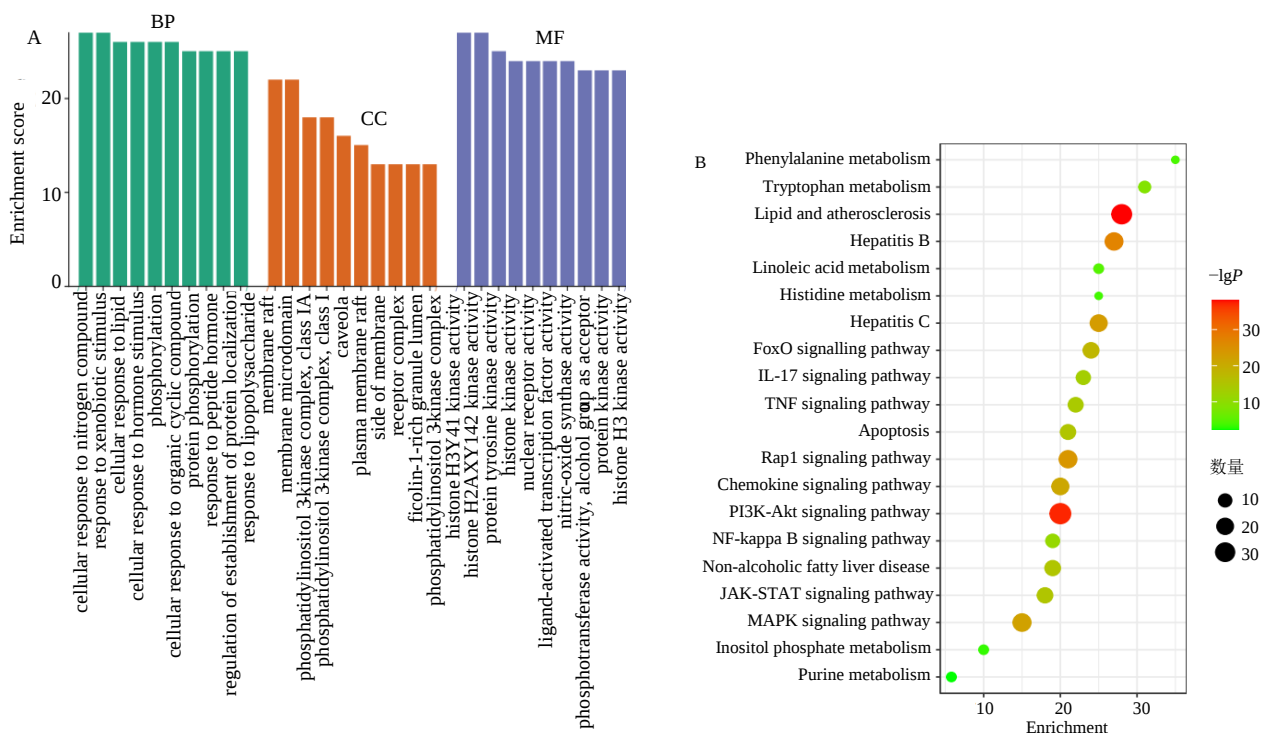


图 2 马蹄金治疗 DILI 的 GO 富集 (A) 与 KEGG 通路 (B) 分析

Fig. 2 GO enrichment (A) and KEGG pathway (B) analysis of DILI treated with *D. repens*

3.1.5 分子对接验证 选取 Cytoscape 3.10.1 9 种算法筛选的 10 个核心靶点 (图 3), 与 5 个主要成分进行分子对接。 β -谷甾醇与 SRC ($-55.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)、TNF ($-42.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)、Akt1 ($-36.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) 的结合能最低, 乌苏酸与 SRC ($-51.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)、TNF ($-42.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) 的结合稳定性次之 (表 1); 选取结合稳定性最优的 β -谷甾醇与 SRC、Akt1、TNF 进行可视化, 显示 β -谷甾醇与靶点蛋白的活性口袋稳定结合 (图 4)。

3.2 DREE 对 APAP 诱导 DILI 小鼠的保护作用

3.2.1 血清生化指标 (ALT、AST) 变化 与对照组相比, 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平显著升高 ($P < 0.01$), 提示 DILI 模型构建成功; 与模型组相比, DREE 低、中、高剂量组血清 ALT 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 中、高剂量组血清 AST 水平显著降低 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性; NAC 组 ALT、AST 水平亦显著降低 ($P < 0.01$)。DREE 单给药组 (仅给予高剂量 DREE) 的 ALT、AST 水

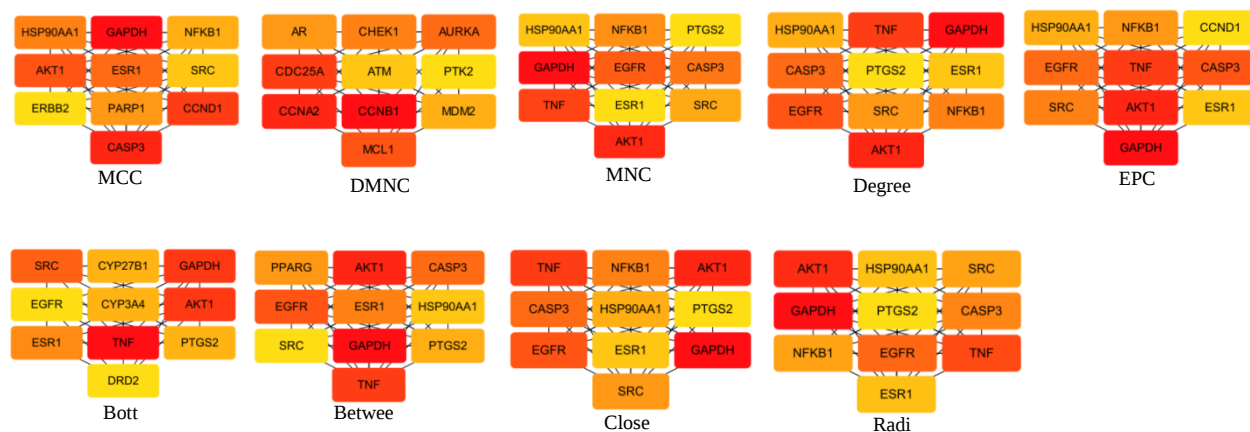


图 3 算法筛选核心靶点

Fig. 3 Algorithm screening of core targets

表 1 马蹄金主要成分与核心靶点的对接结合能

Table 1 Docking binding energy of main components of *D. repens* with core targets

成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)									
	GAPDH	Akt1	ESR1	TNF	EGFR	CASP3	HSP90AA1	SRC	PTGS2	NFKB1
β-谷甾醇	-24.4	-36.1	-35.4	-42.4	-33.6	-30.3	-25.8	-55.1	-38.3	-32.4
香荚兰醛	-18.1	-20.3	-20.5	-22.6	-19.0	-17.4	-14.4	-30.5	-21.8	-20.5
乌苏酸	-26.5	-33.2	-32.5	-42.9	-30.1	-31.7	-29.0	-51.5	-30.7	-32.4
东莨菪素	-16.2	-22.3	-20.6	-25.9	-22.4	-16.4	-16.7	-27.0	-21.0	-18.9
伞形花内酯	-17.3	-18.2	-25.0	-27.9	-25.1	-17.2	-18.2	-32.4	-23.0	-15.9

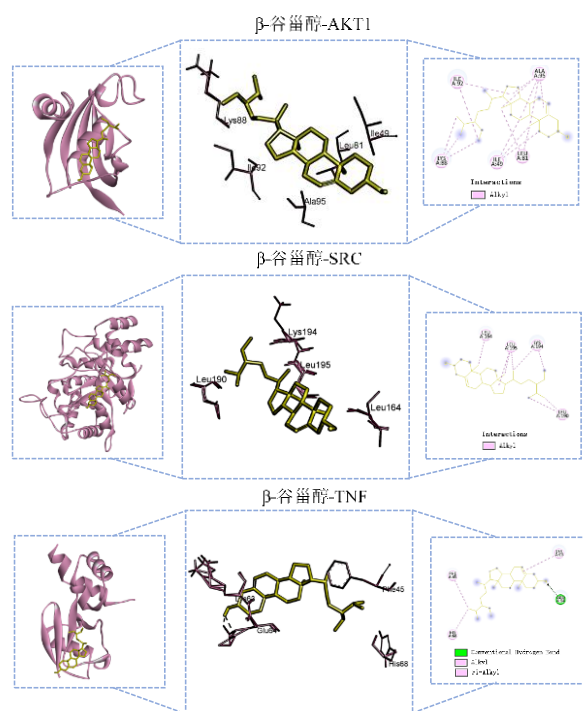


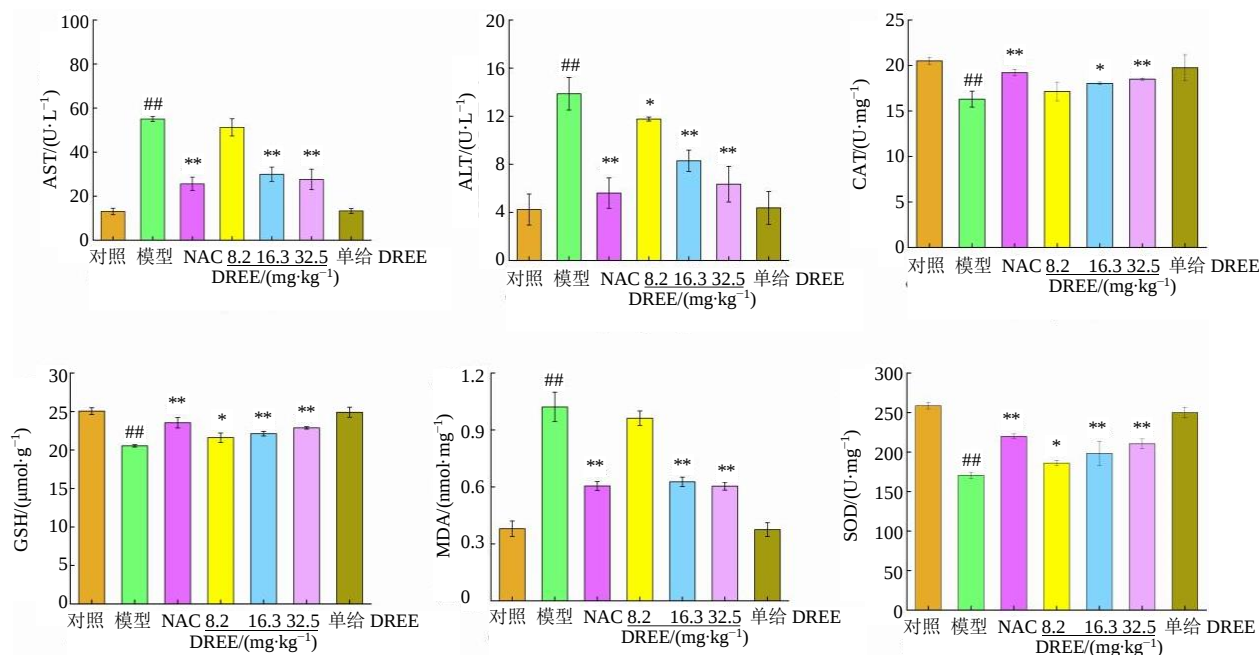
图 4 β-谷甾醇与 Akt1、SRC、TNF 分子对接

Fig. 4 Molecular docking of β-sitosterol with Akt1, SRC, and TNF

平与对照组比较无显著差异 ($P>0.05$), 证实实验剂量下 DREE 本身对肝脏无明显毒性 (图 5)。

3.2.2 肝组织氧化应激指标变化 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织 SOD、CAT、GSH 活性显著降低 ($P<0.01$), MDA 含量显著升高 ($P<0.01$), 提示 APAP 诱导的肝损伤与氧化应激密切相关; 与模型组相比, DREE 中、高剂量组肝组织 SOD、CAT、GSH 活性显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), MDA 含量显著降低 ($P<0.01$)。DREE 单给药组的氧化应激指标与对照组比较无差异 ($P>0.05$), 进一步验证 DREE 的安全性 (图 5)。

3.2.3 肝组织病理形态变化 HE 染色结果显示, 对照组肝细胞排列整齐, 肝小叶结构完整, 无坏死及炎症浸润; 模型组肝细胞大片坏死, 细胞结构模糊, 伴有大量炎症细胞浸润; 与模型组相比, DREE 低剂量组仍可见大面积肝细胞坏死, DREE 中剂量组肝细胞坏死范围缩小, 仅少量炎症细胞浸润, DREE 高剂量组与 NAC 组的肝细胞形态基本恢复正常, 无明显坏死及炎症浸润 (图 6)。



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.

图 5 各组小鼠血清 ALT、AST 和肝组织匀浆中 CAT、GSH、MDA、SOD 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Levels of ALT, AST in serum, and CAT, GSH, MDA, SOD in liver homogenate of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

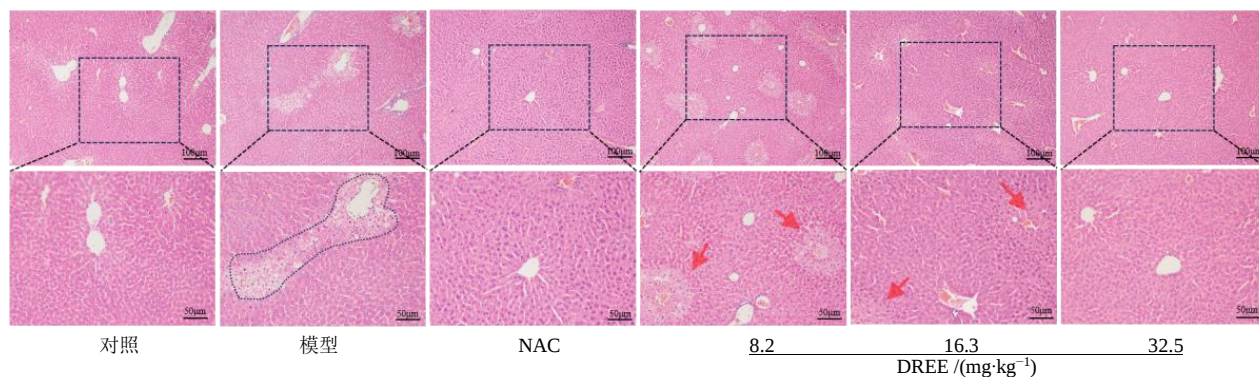


图 6 DREE 对肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响 (HE 染色, $\times 100$, $\times 200$)

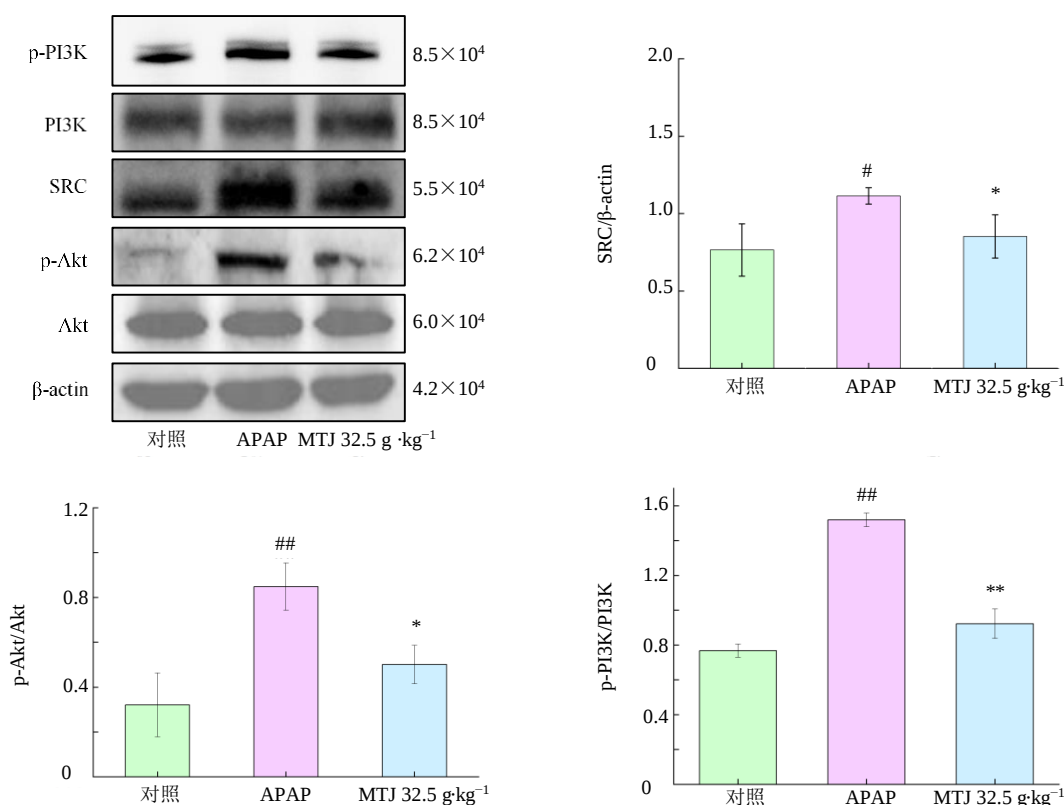
Fig. 6 Pathological changes in liver tissue of mice with liver injury treated with DREE (HE staining, $\times 100$, $\times 200$)

3.2.4 SRC/PI3K/Akt 通路蛋白表达变化 Western blotting 结果显示 (图 7), 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织 SRC 蛋白表达、PI3K-p85 及 Akt 的磷酸化 (p-PI3K-p85、p-Akt) 水平显著升高 ($P < 0.05$), 总 PI3K-p85、总 Akt 表达无显著变化 ($P > 0.05$); 与模型组相比, DREE 高剂量组 SRC 蛋白表达、p-PI3K-p85 及 p-Akt 水平显著降低 ($P < 0.05$, 0.01), 结果提示, DREE 可能通过抑制 SRC 蛋白表达, 进而阻断 PI3K/Akt 通路的过度激活, 发挥保肝作用。

4 讨论

APAP 是一种广泛使用的非处方镇痛和退烧

药, 在治疗剂量下安全有效, 但过量的 APAP 会导致急性肝损伤^[15-17]。APAP 进入肝脏后, 在细胞色素 P4502E1 (cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1; CYP2E1) 的催化下产生高活性有毒的中间代谢物 *N*-乙酰-对-苯醌亚胺 (NAPQI)。正常情况下, NAPQI 在 GSH 作用下还原成无毒的硫醇和半胱氨酸产物。当 APAP 使用过量时, 大量 NAPQI 导致肝细胞死亡, 继而引发强烈的肝脏炎症反应^[18], 进而引起 DILI。有研究表明, 马蹄金对四氯化碳 (CCl₄)、ANIT、*D*-半乳糖胺、硫代乙酰胺、异硫氰酸-1-萘酯致肝毒剂造成的动物急性肝损伤,



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.

图 7 DREE 对 SRC/PI3K/Akt 通路蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effect of DREE on protein levels of SRC/PI3K/Akt pathway ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

均有一定的保肝降酶作用^[19-21]。对于 DREE 治疗 DILI 暂无报道,作用机制也无阐述,因此,本研究通过网络药理学和分子对接技术预测 DREE 防治 DILI 的关键靶点和信号通路。

ALT、AST 是反映肝实质损害常见的主要指标^[22]。本研究发现,模型组小鼠血清 AST 和 ALT 含量较对照组有明显上升的趋势,推测过量 APAP 能引起肝损伤。孔玉雯^[23]建立肝损伤模型后小鼠血清中 AST 和 ALT 水平显著升高,与本研究结果一致。而经 DREE 干预后,小鼠 AST、ALT 水平明显降低;此外,HE 染色结果显示,DREE 治疗后能明显减轻小鼠的肝脏变性和坏死程度,提示马蹄金可能对 APAP 导致的 DILI 有一定的缓解作用。肝细胞中含有丰富的线粒体,约占肝细胞总体积的 1/5^[24],过量的 APAP 会直接损害线粒体功能,受损的线粒体无法正常进行氧化磷酸化,导致电子从电子传递链中大量泄漏。这些泄漏的电子与线粒体基质中的氧分子反应,生成大量的线粒体活性氧,导致细胞质中活性氧水平急剧升高,最终使细胞陷入严重的氧化应激状态^[25-28]。本研究中 DREE 有效的

减弱了 APAP 导致的氧化应激指标 (SOD、GSH、CAT、MDA) 变化,推测马蹄金可能缓解了 APAP 引起的严重的氧化应激状态。

网络药理学分析获得 DREE 对 DILI 的作用靶点 163 个,其中, PPI 网络分析结果显示, Akt1, TNF 和 SRC 可能是 DREE 治疗 DILI 的核心靶点。此外, GO 富集分析显示 DREE 保护 DILI 的作用主要集中在 IA 类磷脂酰肌醇 3-激酶复合物和蛋白酪氨酸激酶活性等方面, KEGG 通路富集分析显示主要涉及的关键信号途径包括 PI3K-Akt、NF- κ B 等信号通路, PI3K/Akt 信号通路通过募集和激活先天免疫细胞 (如巨噬细胞) 在调节炎症反应中起着至关重要的作用,并与各种肝病的发病机制有关^[29-30]。Lu 等^[31]研究表明活化的 SRC 抑制磷酸酶与张力蛋白同源物 (PTEN) 功能,导致 PI3K/Akt 通路信号传导发生变化。分子对接结果显示 DREE 中主要成分 β -谷甾醇和乌苏酸与 SRC、Akt1 结合能均小于 $-29.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,一般认为结合能越低则结合越强,若配体与受体的结合能小于 $-29.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,则表示配体与受体的结合紧密^[32]。其中 β -谷甾醇与 SRC 的

结合能为 $-55.1\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。Hao 等^[33]研究表明, SRC 激酶抑制剂 SU6656 能抑制 PI3K/Akt 信号通路中的磷酸化成分, 提示 SRC 激酶对 PI3K/Akt 通路有正向调控作用。Zhao^[34]在实验中发现, Wogonin 可以缓解 APAP 诱导的小鼠 p-PI3K 和 p-Akt 上调。在 Western blotting 实验中通过 DREE 高剂量治疗 DILI 降低小鼠肝组织中 SRC 表达、Akt 和 PI3K 的磷酸化水平, 与上述研究结果一致。因此推测 DREE 可能通过调控 SRC/PI3K/Akt 介导的炎症信号通路。发挥对 APAP 致 DILI 小鼠肝组织的保护作用。

本研究亦存在一些局限性。首先, 本研究仅通过网络药理学预测了活性成分, 并未对预测出的 β -谷甾醇、乌苏酸等单体成分进行直接的体内外药效验证。其次, KEGG 富集分析提示了多条潜在通路, 但本研究仅对 SRC/PI3K/Akt 通路进行了实验验证, 其他通路(如 NF- κ B)的作用有待探究。

本研究提示 DREE 对 APAP 诱导的 DILI 具有保护作用, 其作用机制可能与抑制 SRC/PI3K/Akt 通路, 缓解氧化应激及炎症反应, 从而保护肝细胞相关, 为 DREE 在 DILI 防治中的临床应用提供参考。

[作者贡献度声明]

晏乾达: 网络药理学分析, 实验实施、数据处理、文章作图及论文撰写; 杜兴艳、申亲: 网络药理学修改, 动物造模, 实验指导; 唐文超、肖媛媛: 提出思路, 指导关键内容修订及最终稿审定。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 沈弢, 黄昕, 王誉雅, 等. 我国药物性肝损伤流行病学研究现状 [J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(6): 1152-1155.
Shen T, Huang X, Wang Y Y, et al. Current status of epidemiological studies on drug-induced liver injury in China [J]. J Clin Hepatol, 2018, 34(6): 1152-1155.
- [2] Li X Y, Tang J T, Mao Y M. Incidence and risk factors of drug-induced liver injury [J]. Liver Int, 2022, 42(9): 1999-2014.
- [3] Mosedale M, Watkins P B. Drug-induced liver injury: Advances in mechanistic understanding that will inform risk management [J]. Clin Pharma And Therapeutics, 2017, 101(4): 469-480.
- [4] 陈清钰, 江振洲, 张陆勇. 固有型药物性肝损伤中肝实质细胞的适应性反应研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2025, 22(5): 532-538.
Chen Q Y, Jiang Z Z, Zhang L Y. Research progress in adaptive response of hepatocytes in intrinsic drug-induced liver injury [J]. Chin J Pharmacovigil, 2025, 22(5): 532-538.
- [5] Stine J G, Lewis J H. Current and future directions in the treatment and prevention of drug-induced liver injury: A systematic review [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 10(4): 517-536.
- [6] 高正山. 红景天苷对药物性肝损伤的保护作用及机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2024.
Gao Z S. Study on the protective effect and mechanism of salidroside on drug-induced liver injury [D]. Chongqing: Southwest University, 2024.
- [7] 毛竹, 朱继孝, 曾金祥, 等. 短管兔耳草提取物对对乙酰氨基酚诱导小鼠药物性肝损伤的保护作用与机制 [J]. 中成药, 2022, 44(9): 3004-3008.
Mao Z, Zhu J X, Zeng J X, et al. Protective Effect and mechanism of *Lagotis brevifolia* extract against acetaminophen-induced drug-induced liver injury in mice [J]. Chin Patent Med, 2022, 44(9): 3004-3008.
- [8] 龙冬艳, 袁涛忠, 孙玉丽, 等. 苗药马蹄金 (vob bix seix niub) 的应用 [J]. 中国民族医药杂志, 2020, 26(5): 51-53.
Long D Y, Yuan T Z, Sun Y L, et al. Application from “vob bix seix niub” of Miao medicine [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2020, 26(5): 51-53.
- [9] 王志轩, 马丽, 郭海平, 等. Box-Behnken 响应面法优选低共熔溶剂提取马蹄金总黄酮工艺 [J]. 中国药业, 2024, 33(1): 45-49.
Wang Z X, Ma L, Guo H P, et al. Optimization of deep eutectic solvents extraction of total flavonoids from *Dichondra repens* by box-behnken response surface methodology [J]. China Pharm, 2024, 33(1): 45-49.
- [10] 刘玉明, 梁光义, 张建新, 等. 马蹄金化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37(8): 577-579.
Liu Y M, Liang G Y, Zhang J X, et al. Studies on chemical constituents of *Dichondra repens* [J]. Chin Pharm J, 2002, 37(8): 577-579.
- [11] 梁光义, 贺祝英, 周欣, 等. 民族药马蹄金挥发油的研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2002, 24(1): 45-47.
Liang G Y, He Z Y, Zhou X, et al. Study on the volatile oil of the ethnic medicine *Dichondra repens* [J]. J Guiyang Coll Tradit Chin Med, 2002, 24(1): 45-47.
- [12] 刘玉明, 梁光义, 徐必学. 苗族药马蹄金化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(1): 15-17.
Liu Y M, Liang G Y, Xu B X. Studies on the chemical constituents from *Dichondra repens* Forst. [J]. Nat Prod Res Dev, 2003, 15(1): 15-17.
- [13] Yao Q, Wang Y, Dong Z Y, et al. *Dichondra repens* J. R.

- Forst. and G. Forst.: A review of its traditional uses, chemistry, pharmacology, toxicology and applications [J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 608199.
- [14] Fan J J, Zhang Q Y, Tian Y G, et al. Ginsenoside Rf protects against acetaminophen-induced liver injury by targeting CCAR2 to activate the SIRT1-FXR signalling pathway [J]. British J Pharmacology, 2026: bph.70406.
- [15] Ohashi N, Kohno T. Analgesic effect of acetaminophen: A review of known and novel mechanisms of action [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 580289.
- [16] Larson A M, Polson J, Fontana R J, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: Results of a United States multicenter, prospective study [J]. Hepatology, 2005, 42(6): 1364-1372.
- [17] Shehab N, Lovegrove M C, Geller A I, et al. US emergency department visits for outpatient adverse drug events, 2013-2014 [J]. Jama, 2016, 316(20): 2115.
- [18] Yoon E, Babar A, Choudhary M, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: A comprehensive update [J]. J Clin Transl Hepatol, 2016, 4(2): 131-42.
- [19] 曲莉莎, 曾万玲, 梁光义. 民族药马蹄金提取物对小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(4): 197-199.
Qu L S, Zeng W L, Liang G Y. Protective effect of ethnic medicine *Dichondra repens* extract on liver injury in mice [J]. Chin Hosp Pharm J, 2003, 23(4): 197-199.
- [20] 周茜, 周俐, 吴维, 等. 黄痘草对小鼠实验性肝损伤的保护作用 [J]. 赣南医学院学报, 2003, 23(5): 491-494.
Zhou X, Zhou L, Wu W, et al. Protective effect of *Taraxacum* on experimental liver injury in mice [J]. J Gannan Med Univ, 2003, 23(5): 491-494.
- [21] 曲莉莎, 曾万玲, 梁光义. 民族药马蹄金提取物对 D-GlaN、TAA、ANIT 所致小鼠化学性肝损伤的药理作用研究 [J]. 中国医药学报, 2003, 18(2): 84-86.
Qu L S, Zeng W L, Liang G Y. Pharmacological research of extracts of national herb Matijin for D-GLaN, TAA and ANIT induced chemical liver lesion of mice [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2003, 18(2): 84-86.
- [22] 覃萍, 张薇, 陈紫莹, 等. 槲皮素对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 广东化工, 2022, 49(12): 63-66.
Qin P, Zhang W, Chen Z Y, et al. Protective effect of quercetin on acute liver injury induced by acetaminophen in mice [J]. Guangdong Chem Ind, 2022, 49(12): 63-66.
- [23] 孔玉雯, 朱金芳, 李丽华. 萝卜硫素对纳米二氧化钛诱导小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中国食品学报, 2025, 25(1): 160-168.
Kong Y W, Zhu J F, Li L H. Protective effect of sulforaphane on nano-titanium dioxide-induced liver injury in mice [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2025, 25(1): 160-168.
- [24] Ayers M, Horslen S P, Gómez A M, et al. Mitochondrial hepatopathy [J]. Clin Liver Dis, 2022, 26(3): 421-438.
- [25] Shi X X, Bai H Y, Zhao M, et al. Treatment of acetaminophen-induced liver injury with exogenous mitochondria in mice [J]. Transl Res, 2018, 196: 31-41.
- [26] Wang Z C, Zhao Y, Sun R M, et al. Circ-CBFB upregulates p66Shc to perturb mitochondrial dynamics in APAP-induced liver injury [J]. Cell Death Dis, 2020, 11: 953.
- [27] Jin M M, Zhang L, Yu H X, et al. Protective effect of whey protein hydrolysates on H₂O₂-induced PC12 cells oxidative stress via a mitochondria-mediated pathway [J]. Food Chem, 2013, 141(2): 847-852.
- [28] 张圣卓. 乳清蛋白水解物通过线粒体自噬缓解对乙酰氨基酚诱导的肝细胞焦亡 [D]. 长春: 吉林大学, 2025.
Zhang S Z. Whey protein hydrolysate alleviates acetaminophen-induced hepatocyte pyroptosis through mitophagy [D]. Changchun: Jilin University, 2025.
- [29] Hawkins P T, Stephens L R. PI3K signaling in inflammation [J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipids, 2015, 1851(6): 882-897.
- [30] Yang Y Q, Jia X T, Qu M Y, et al. Exploring the potential of treating chronic liver disease targeting the PI3K/Akt pathway and polarization mechanism of macrophages [J]. Heliyon, 2023, 9(6): e17116.
- [31] Lu Y L, Yu Q H, Liu J H, et al. Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cascades [J]. J Biol Chem, 2003, 278(41): 40057-40066.
- [32] 于小寒, 刘云涛, 王大伟. 基于网络药理学及分子对接探讨人参皂苷 Rb₃ 缓解心肌肥大治疗 HFpEF 的作用机制 [J]. 中国老年学杂志, 2025, 45(17): 4227-4234.
Yu X H, Liu Y T, Wang D W. To explore the mechanism of ginsenoside Rb₃ in alleviating myocardial hypertrophy and treating HFpEF based on network pharmacology and molecular docking [J]. Chin J Gerontol, 2025, 45(17): 4227-4234.
- [33] Hao X H, Jin Y X, Zhang Y Y, et al. Inhibition of oncogenic src ameliorates silica-induced pulmonary fibrosis via PI3K/Akt pathway [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(1): 774.
- [34] Zhao W, Luo H S, Lin Z L, et al. Wogonin mitigates acetaminophen-induced liver injury in mice through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 332: 118364.