

· 肝胆系统疾病研究 ·

## 芪甲柔肝方通过 miRNA-mRNA 网络改善肝纤维化的作用机制

汪玉梅<sup>1</sup>, 吴佩杰<sup>1</sup>, 纪少秀<sup>2</sup>, 于瀚<sup>1</sup>, 左小红<sup>3,4\*</sup>, 陈小凤<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137; 2. 银川市中医医院, 银川 750001;  
3. 成都中医药大学银海眼科医院, 成都 610084; 4. 成都中医药大学眼科学院, 成都 610075)

**[摘要]** 目的: 基于 miRNA-mRNA 调控网络及代谢-信号通路交互作用, 探讨芪甲柔肝方通过氨基酸/脂肪酸代谢重编程与磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)通路改善肝纤维化的作用机制。方法: 将 SD 大鼠, 随机分为 4 组, 正常组, 模型组, 芪甲柔肝方低、高剂量组(7.0、28 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 每组 8 只。采用四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导肝纤维化模型。从第 9 周开始给予药物干预 7 周。末次给药后苏木素-伊红(HE)染色、天狼猩红(PSR)染色检测肝脏病理变化; 全自动生化仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆汁酸(TBA)、白蛋白(ALB)、总胆固醇(TC)等血清生化指标; 高通量 miRNA 测序技术检测肝纤维化过程中差异表达的 miRNAs(DemiRs); 构建 miRNA-mRNA 互作网络, 鉴定网络关键基因并对其进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)验证 DemiRs 的表达水平。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏组织肝小叶坏死, 胶原沉积, 纤维化显著增加; 血清中 ALT、AST、ALP、TBA 的含量显著升高( $P < 0.01$ ), 而血清中 ALB 和 TC 的含量显著下降( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 芪甲柔肝方组大鼠肝脏组织肝小叶坏死减少, 胶原沉积减少, 纤维化降低; 血清中 ALT、AST、ALP、TBA 的含量显著降低( $P < 0.01$ ), 而血清中 ALB 和 TC 的含量显著升高( $P < 0.01$ )。另外 miRNA-seq 联合 RNA-seq 数据分析鉴定出 31 个关键的 DemiRs(6 个上调, 25 个下调)及 498 个靶基因, rno-miRNA-376b-3p 等 4 个 DemiRs 的变化趋势与测序结果一致( $R^2=0.93$ )。功能注释结果发现前 20 个上调的关键靶基因富集于氨基酸和脂肪酸代谢, 而前 20 个下调的关键靶基因显著关联 PI3K/Akt 信号通路及癌症进展。结论: 芪甲柔肝方通过重构 miRNA-mRNA 网络, 激活代谢重编程并抑制 PI3K/Akt 信号通路, 为中药复方多靶点抗肝纤维化提供理论依据。

**[关键词]** 芪甲柔肝方; 肝纤维化; miRNA-mRNA 调控网络; 代谢重编程; 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路

[中图分类号] R289;R259;R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)14-0084-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251901

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20250828.0956.001>

[网络出版日期] 2025-08-28 15:06:18 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



## Qijia Rougan Decoction Ameliorates Liver Fibrosis Through miRNA-mRNA Network

WANG Yumei<sup>1</sup>, WU Peijie<sup>1</sup>, JI Shaoxiu<sup>2</sup>, YU Han<sup>1</sup>, ZUO Xiaohong<sup>3,4\*</sup>, CHEN Xiaofeng<sup>1\*</sup>

(1. School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Chengdu 611137, China; 2. Yinchuan Hospital of TCM, Yinchuan 750001, China;  
3. Ineye Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610084, China;  
4. Eye School of Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism by which Qijia Rougan decoction ameliorates liver fibrosis through amino acid/fatty acid metabolic reprogramming and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway, based on the miRNA-mRNA regulatory network and the interaction between metabolism and signaling pathways. **Methods:** Sprague-

[收稿日期] 2025-06-10

[基金项目] “天府峨眉计划”青年科技人才项目(川峨眉第2272号);四川省青年基金项目(2025ZNSFSC1826);成都中医药大学基础医学院传承创新发展科研基金项目(JCZD2403);成都中医药大学院校联合创新基金项目(LH202402054)

[第一作者] 汪玉梅, 博士, 讲师, 从事中医药抗炎药物研究, E-mail: yumeiwang@cdutcm.edu.cn

[通信作者] \* 左小红, 硕士, 讲师, 从事中医皮肤病临床及基础研究, E-mail: 20122050@cdutcm.edu.cn;

\* 陈小凤, 博士, 副教授, 从事中医药抗肝纤维化研究, E-mail: xiaofengchen@cdutcm.edu.cn

Dawley (SD) rats were randomized into four groups ( $n=8$ ): control, model, and low-dose and high-dose ( $7.0, 28.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , respectively) Qijia Rougan decoction. Liver fibrosis was induced by subcutaneous injection of carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ). From week 9, drug intervention was implemented for 7 weeks. After the final administration, the pathological changes in the liver were evaluated through hematoxylin-eosin (HE) and picrosirius red (PSR) staining. An automated biochemical analyzer was used to measure the serum levels of biochemical indicators, including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bile acid (TBA), albumin (ALB), and cholesterol (TC). High-throughput miRNA sequencing was performed to identify differentially expressed miRNAs (DemiRs) during liver fibrosis. A miRNA-mRNA interaction network was constructed to identify key targets, which were then subjected to GO and KEGG enrichment analyses. The expression levels of selected DemiRs were validated by Real-time PCR. **Results:** Compared with the control group, the model group showed marked hepatic lobular necrosis, increased collagen deposition, significant fibrosis, elevated serum levels of ALT, AST, ALP, and TBA ( $P<0.01$ ), and declined levels of ALB and TC ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, Qijia Rougan decoction treatment reduced hepatic necrosis, collagen accumulation, and fibrosis, lowered the serum levels of ALT, AST, ALP, and TBA ( $P<0.01$ ), and raised the levels of ALB and TC ( $P<0.01$ ). Integrated miRNA-seq and RNA-seq analysis identified 31 DemiRs (6 upregulated and 25 downregulated) and 498 targets. The expression trends of four selected DemiRs, including rno-miRNA-376b-3p, were consistent with sequencing results ( $R^2=0.93$ ). Functional annotation revealed that top 20 upregulated targets were enriched in amino acid and fatty acid metabolism, while top 20 downregulated targets were significantly associated with the PI3K/Akt signaling pathway and cancer progression. **Conclusion:** Qijia Rougan decoction alleviates liver fibrosis by reconstructing the miRNA-mRNA regulatory network, promoting metabolic reprogramming, and inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway. These findings provide mechanism evidence supporting the multi-targeted antifibrotic effects of traditional Chinese medicine compound formulas.

**[Keywords]** Qijia Rougan decoction; liver fibrosis; miRNA-mRNA regulatory network; metabolic reprogramming; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway

肝纤维化是慢性肝病进展的核心病理过程,以肝星状细胞(HSC)异常活化及细胞外基质的过度沉积为特征,最终可导致肝硬化甚至肝癌<sup>[1]</sup>。其病因包括病毒性肝炎、酒精性肝病、胆汁淤积等<sup>[2-3]</sup>。临床表现为乏力、腹胀、肝区隐痛等非特异性症状,目前的治疗策略以病因控制及抗纤维化为核心,但尚缺乏特异性逆转肝纤维化的药物<sup>[4-5]</sup>。因此探讨其分子机制对开发新疗法至关重要。

微小RNA(miRNA)作为短链非编码RNA,通过特异性靶向mRNA,使其降解或抑制其翻译,参与肝纤维化的调控<sup>[6]</sup>。研究证实,miRNA可调控肝细胞凋亡、HSC及炎症反应,参与肝纤维化的发生和发展<sup>[7-9]</sup>。例如,miR-101通过抑制转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )信号传导,减少细胞因子释放和肝细胞凋亡,从而阻止肝纤维化的发展<sup>[10]</sup>。而miR-155缺失可缓解酒精性肝纤维化<sup>[11]</sup>。核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)可通过直接结合miR-23a-3p启动子抑制其转录<sup>[12]</sup>,提示NF- $\kappa$ B抑制蛋白(I $\kappa$ B)激酶(IKK)/NF- $\kappa$ B/miR-23a-3p信号轴可能为关键干预靶点。这些发现提示miRNA具有肝纤维化治疗靶点的潜力,但其在中药复方抗纤维化中的作用仍需深入解析。

中医药在肝纤维化的防治中具有多靶点调控优势<sup>[13]</sup>。冯全生教授继承全国名中医张之文教授的学术观点,融合个人临床实践,提出“气血荣通失

调”是肝纤维化发生发展的关键病机,肝主疏泄,司周身气机,以维持升降出入有序,气血流通不滞,体现肝性易通;肝主藏血,以血为自养,血足则柔,血虚则强,肝藏血以自养是保持其体阴性柔的基础,展现肝用需荣。伴随肝纤维化发生发展,肝性肝用失常,气血荣通失调,治疗当气血并治,荣通并调。

芪甲柔肝方是在《温疫论》三甲散的基础上加减而成,方中黄芪、鳖甲、土鳖虫等药物协同作用,契合肝纤维化“虚瘀交错,气血荣通失常”的病理特点,具益气活血、通络散结之效,体现了荣通并治思想的治疗理念,且临床研究证实该方抗肝纤维化疗效确切<sup>[14-15]</sup>。已有研究发现,该方通过抑制TGF- $\beta$ /蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路、调节肠道菌群-肠屏障等有效抑制肝纤维化<sup>[16-20]</sup>。然而,该方是否通过miRNA-mRNA网络多维度调控肝纤维化尚未明确。

本研究基于高通量测序技术,系统解析芪甲柔肝方对四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导肝纤维化大鼠miRNA-mRNA互作网络的调控作用,探讨其通过激活代谢重编程并抑制磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号通路的抗肝纤维化机制,为中药复方“多成分-多靶点”治疗提供新证据。

## 1 材料

**1.1 动物** 7周龄SPF级雄性SD大鼠36只,体质量约180g,购自成都达硕实验动物有限公司,生产

合格证号 SCXK[川]2020-028,大鼠饲养于成都中医药大学动物中心,恒温(22±2) °C、12 h昼夜循环环境,相对湿度40%~60%。

**1.2 伦理** 实验方案经成都中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号2021-17)。

**1.3 药物与试剂** 芪甲柔肝方由黄芪(批号25030031)、桃仁(批号25040205)、丹参(批号25040461)、红花(批号25060292)、鳖甲(批号25020145)、三棱(批号25040177)、莪术(批号25050086)、土鳖虫(批号25060291)、当归(批号25070135)、甘草(批号25020016)按30、18、18、18、15、15、15、12、9、6 g配伍而成,由四川新绿色药业科技发展有限公司经提取、浓缩后制备成免煎颗粒剂。将芪甲柔肝方颗粒剂配成0.2 g·mL<sup>-1</sup>的药液,放置4 °C冰箱冷藏备用。CCl<sub>4</sub>(上海易恩化学技术有限公司,货号RH290173);橄榄油(上海易恩化学技术有限公司,货号RH251637);苏木素-伊红(HE)染液套装、天狼猩红(PSR)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G1076、G1078);RNA提取试剂(美国Invitrogen公司,货号15596018CN);逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本TaKaRa公司,货号分别为638313、639676)。

**1.4 仪器** TP1020/CM1950型病理切片(上海徕卡仪器有限公司);KD-P型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);BS-240VET型全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技有限公司);UVP iBox Scientia型成像系统(日本尼康公司);ABI7500型Real-time PCR仪(美国Thermo公司)。

## 2 方法

**2.1 实验动物分组与药物干预** 将7周龄雄性SD大鼠36只,经过1周适应性喂养后,随机分为正常组(Control组, n=8)和造模组(28只)。Control组进行皮下注射橄榄油(3 mL·kg<sup>-1</sup>, 2次/周),造模组采用大鼠皮下注射50%CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液(3 mL·kg<sup>-1</sup>, 2次/周)。造模8周后随机选取Control组及造模组各2只大鼠验证肝纤维化造模成功<sup>[17]</sup>,将剩余大鼠随机分为模型组(Model组, n=8)、芪甲柔肝方高剂量组(QJ-H组, n=8)、芪甲柔肝方低剂量组(QJ-L组, n=8)。根据临床和文献调研,芪甲柔肝方剂量给药以60 kg体质量为标准,按人与鼠体表面积换算公式计算给药剂量<sup>[16]</sup>。于第9周开始灌胃治疗:QJ-L组、QJ-H组分别进行7 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>和28 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的芪甲柔肝方灌胃处理,Model组与

Control组则进行等体积生理盐水灌胃处理,持续7周。

**2.2 组织病理与血清生化检测** 将肝脏样本固定于4%多聚甲醛中,石蜡包埋,切成5 μm的薄片。采用HE染色检查肝脏结构,并用PSR染色评估肝纤维化。使用全自动生化分析仪测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆汁酸(TBA)、白蛋白(ALB)和总胆固醇(TC)的浓度。

**2.3 miRNA-seq文库构建和分析** miRNA-seq文库由诺禾致源(北京)科技有限公司制备并分析。简而言之,使用TRIzol试剂从样本中提取RNA。采用Bioanalyzer2100检测RNA的完整性和总量。建库起始的RNA为2 μg总RNA。使用DNA高灵敏度芯片在AgilentBioanalyzer2100系统上评估文库质量。使用Novaseq6000平台进行测序。使用自定义perl和python脚本对fastq格式的原始数据进行过滤、比对和组装,获得miRNA的表达谱数据用于下游分析。原始数据录入美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库,可使用登录号PRJNA891917访问。此外,还使用了相关的mRNA表达数据(登录号PRJNA826993)<sup>[21]</sup>。使用DESeq2 R软件包(1.24.0)对miRNA和mRNA数据进行差异表达分析,以|差异倍数(FC)|≥1.5和P<0.05为阈值,获得差异表达miRNA和mRNA。使用miRWalk(v3)预测miRNA的靶基因,并对miRNA的预测靶基因利用Clusterprofiler R包进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析,以评估基因富集程度。使用Cytoscape(v3.10.2)分析并可视化miRNA-靶基因相互作用网络。

**2.4 Real-time PCR检测miRNA表达水平** 使用Mir-X miRNA第一链合成试剂盒,以从肝脏中分离的3 μg RNA为模版合成cDNA。Real-time PCR采用TB Green Advantage Real-time PCR Premix进行。PCR反应条件设定为95 °C预变性10 s,95 °C变性5 s,60 °C退火与延伸20 s,40个循环。每个样本重复检测3次,结果采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>方法计算,并根据同一样本中U6 snRNA的表达水平定量分析相应miRNA的表达,引物由苏州泓迅生物科技股份有限公司合成,引物序列见表1。

**2.5 统计学分析** 数据采用Graphpad Prism8.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行正态性和方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析或Kruskal-Wallis检验,P<0.05为差异具有统

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
U6	上游 TGGAACGCTTCACGAATTTGCG	22
	下游 GGAACGATACAGAGAAGATTAGC	23
rno-miR-376b-3p	上游 TCATAGAGGAACATCCACT	19
rno-miR-134-5p	下游 TGTGACTGGTTGACCAGA	18
rno-miR-409b	上游 AGGGGTTCCACCGAGCAA	17
rno-miR-541-5p	下游 AAGGGATTCTGATGTTGGT	19

计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 芪甲柔肝方对CCl<sub>4</sub>诱导的肝组织损伤的影响

HE染色显示,与Control组比较,Model组大鼠肝脏增加了肝小叶中心坏死、肝细胞凋亡和炎症细胞浸润。然而,这些变化在芪甲柔肝方低、高剂量给药大鼠后均有所缓解,见图1。PSR染色显示,与Control组比较,Model组大鼠肝纤维化增加,表现出纤维组织增生和胶原沉积,但芪甲柔肝方低、高剂量给药大鼠后可改善这些症状,见图2。

通过测定大鼠血清中ALT、AST、ALP、TBA、ALB和TC的浓度来评估芪甲柔肝方对肝功能参数的影响,发现与Control组比较,CCl<sub>4</sub>处理后,Model组血清中的ALT、AST、ALP和TBA浓度显著升高( $P<0.01$ ),ALB和TC浓度显著降低( $P<0.01$ )。与Model组比较,芪甲柔肝方给药后,大鼠血清中的ALT、AST、ALP和TBA浓度显著降低( $P<0.01$ ),ALB和TC浓度显著升高( $P<0.01$ ),见表2。

#### 3.2 芪甲柔肝方对CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化大鼠肝脏中miRNA表达的影响

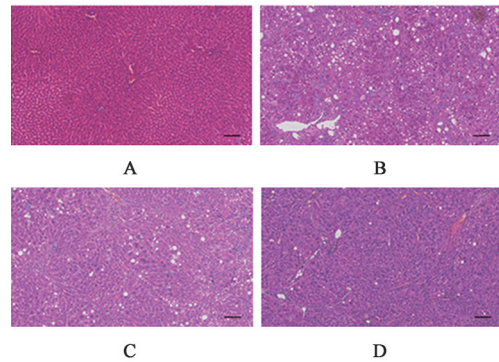
通过miRNA-seq对各组大鼠肝脏的miRNA表达水平进行检测,生物信息学分析显示与Control组比较,Model组有178个DemiRs(113个上调,65个下调)。与Model组比较,QJ-L组发现35个DemiRs(9个上调,26个下调);而与Model组比较,QJ-H组发现69个DemiRs(24个上调,45个下调),见增强出版附加材料。组间比较发现有31个重叠的DemiRs,并且,QJ-H组、QJ-L组都能逆转CCl<sub>4</sub>

表2 芪甲柔肝方对肝纤维化大鼠血清ALT、AST、ALP、TBA、ALB、TC含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of Qijia Rougan decoction on serum ALT, AST, ALP, TBA, ALB, TC concentration in rats with liver fibrosis ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	ALP/U·L <sup>-1</sup>	TBA/μmol·L <sup>-1</sup>	ALB/g·L <sup>-1</sup>	TC/mmol·L <sup>-1</sup>
Control组		66.75±15.92	130.00±13.95	115.00±30.20	4.55±2.20	32.21±0.52	1.40±0.13
Model组		351.20±73.99 <sup>1)</sup>	597.80±101.20 <sup>1)</sup>	496.90±118.80 <sup>1)</sup>	124.10±37.81 <sup>1)</sup>	26.97±2.38 <sup>1)</sup>	0.90±0.08 <sup>1)</sup>
QJ-L组	7	109.70±25.65 <sup>2)</sup>	184.50±29.19 <sup>2)</sup>	169.10±28.01 <sup>2)</sup>	26.30±9.11 <sup>2)</sup>	30.87±0.37 <sup>2)</sup>	1.47±0.20 <sup>2)</sup>
QJ-H组	28	110.60±20.28 <sup>2)</sup>	178.20±22.92 <sup>2)</sup>	147.60±16.20 <sup>2)</sup>	23.51±11.28 <sup>2)</sup>	31.07±0.96 <sup>2)</sup>	1.49±0.18 <sup>2)</sup>

注:与Control组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与Model组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$



注:A. Control组;B. Model组;C. QJ-L组;D. QJ-H组(图2同)

图1 芪甲柔肝方对CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Qijia Rougan decoction on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats (HE,×200)

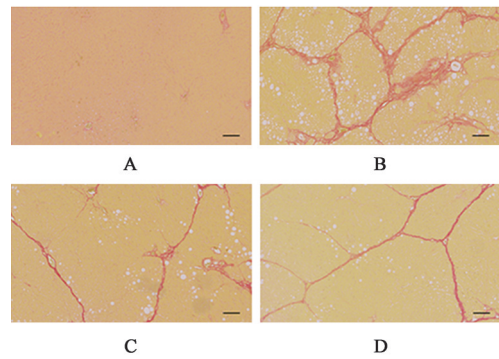


图2 芪甲柔肝方对CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化的影响(PSR,×200)

Fig. 2 Effect of Qijia Rougan decoction on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats (PSR,×200)

诱导所致的31个DemiRs的表达,见增强出版附加材料。随后,对其中的4个DemiRs(rno-miR-376b-3p、rno-miR-134-5p、rno-miR-409b和rno-miR-541-5p)的表达进行了Real-time PCR验证,发现,与RNA-seq结果类似,在经CCl<sub>4</sub>治疗的肝纤维化大鼠肝脏中,这4个miRNA的水平显著高于Control组,而芪甲柔肝方干预后可降低这些miRNA的水平,见表3。

#### 3.3 芪甲柔肝方通过miRNA-mRNA调控网络介导代谢重编程与PI3K/Akt信号通路改善肝纤维化

再分析芪甲柔肝方干预大鼠肝纤维化的RNA-seq数据,发现1173个共有的差异表达mRNA(DemRNAs,535上调,638下调)。基于miRWalk数据库,25个下调的

表3 芪甲柔肝方对肝纤维化大鼠肝脏miRNA的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )  
Table 3 Effect of Qijia Rougan decoction on expression of miRNA in rats liver with liver fibrosis ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	rno-miR- 376-3b	rno-miR- 134-5p	rno-miR- 409b	rno-miR- 541-5p
Control组		1.00±0.54	1.00±0.45	1.00±0.26	1.00±0.49
Model组		25.12±7.90 <sup>1)</sup>	56.68±25.31 <sup>3)</sup>	27.11±10.76 <sup>3)</sup>	116.82±47.39 <sup>3)</sup>
QJ-L组	7.0	3.89±2.87 <sup>3)</sup>	7.89±4.22 <sup>3)</sup>	10.12±9.01 <sup>3)</sup>	32.01±18.36 <sup>3)</sup>
QJ-H组	28.0	2.93±2.03 <sup>2)</sup>	4.18±1.95 <sup>3)</sup>	3.90±2.33 <sup>3)</sup>	12.61±8.23 <sup>3)</sup>

注:与Control组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与Model组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01

DemiRs靶向302个DemRNAs,而6个上调的DemiRs靶向196个DemRNAs。利用Cytoscape构建了芪甲柔肝方干预肝纤维化的miRNA-mRNA调控网络。随后,基于String数据库,分别构建包含302个上调DemRNAs和196个下调DemRNAs的蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)。并基于网络拓扑学性质,分别发现排名前20的关键靶基因。KEGG富集分析显示上调的关键靶基因参与脂肪酸 $\beta$ 氧化和支链氨基酸降解,而下调的关键靶基因参与PI3K/Akt信号通路和癌症进展。见增强出版附加材料。这些结果表明,芪甲柔肝方可通过miRNA-mRNA调控网络介导代谢重编程与PI3K/Akt通路改善肝纤维化,见增强出版附加材料。

#### 4 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病的主要原因,并可能进一步发展为肝硬化和肝癌。中医药具有调节和预防肝纤维化的作用<sup>[21]</sup>。尽管miRNA参与了肝纤维化的进展,但很少有研究评估中医药对这些与肝纤维化相关的miRNA谱的影响。本研究表明,芪甲柔肝方能有效保护大鼠肝脏免受CCl<sub>4</sub>引起的损伤。研究发现,芪甲柔肝方能显著改善CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠血清生化指标、炎症状态和胶原沉积,并改变31个miRNA的表达谱,是芪甲柔肝方抗肝纤维化潜在靶点。并且这些miRNA的靶基因和关键基因涉及脂肪酸代谢和PI3K/Akt信号通路的调节。

中医认为,肝纤维化以“虚瘀交错,气血荣通失常”为主要病理特点。了解这些过程对于逆转或治疗肝纤维化至关重要。研究显示,血府逐瘀汤能够抑制血管生成并保护肝窦内皮细胞功能,从而减轻血瘀证肝纤维化<sup>[22]</sup>。而当归补血汤能够抑制脂质过氧化,抑制基质金属蛋白酶2和9的活性,减轻氧化应激,并抑制纤维化肝脏中的血管生成<sup>[23-24]</sup>。此外,补阳还五汤通过调节核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)和NF- $\kappa$ B信号通路来抑制氧化应激损伤和肝脏炎症过

程,从而预防糖尿病肝损伤小鼠模型中的肝纤维化<sup>[25]</sup>。以上研究表明,通过气血并治,荣通并调的治法可有效地抑制肝纤维化。芪甲柔肝方立足于这一思想,重用黄芪补气生血,配合丹参、当归、红花、桃仁、土鳖虫活血祛瘀,三棱、莪术破气行血,鳖甲软坚散结,甘草调和诸药,共同破解“气血通融失调”的病机。现代药理研究表明,黄芪被广泛用于治疗纤维化相关疾病,并可能通过调节炎症信号通路显著抑制肝纤维化<sup>[26]</sup>。据报道,黄芪的主要活性成分,包括黄芪苷(AS)和黄芪黄酮(AF),能够调节氧化应激、炎症反应和胶原形成,从而改善肝纤维化<sup>[27-28]</sup>。研究也显示芪甲柔肝方能够改善CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化。

miRNA介导一系列肝脏疾病过程,例如急性肝毒性、病毒性肝炎、肝纤维化、酒精性肝病和肝癌<sup>[29]</sup>。本研究使用miRNA-seq分析评估了芪甲柔肝方对肝纤维化大鼠miRNA谱的影响。在已确定可能受芪甲柔肝方调控的31个miRNA中,有几个此前已在肝纤维化或肝细胞癌(HCC)细胞中进行研究,而大多数尚未被分析。例如,研究发现,miR-146b-5p通过调节同源域相互作用蛋白激酶1(HIPK1)来促进肝纤维化的发展<sup>[30]</sup>。此外,miR-122-5p被确定为乙型病毒性肝炎(HBV)相关肝纤维化的可能生物标志物<sup>[31]</sup>,并且发现miR-122-5p过表达可抑制HSC的活化,而这种活化在肝纤维化的发展中具有重要意义<sup>[32]</sup>。研究发现miR-431水平与HCC呈负相关<sup>[33]</sup>。此外,研究发现HCC患者血清外泌体中miR-370-3p水平降低,而miR-370-3p可抑制HCC发展<sup>[34-35]</sup>。miR-127-5p可通过NF- $\kappa$ B通路阻止HCC细胞生长<sup>[36]</sup>。对其他miRNA的分析表明,miR-132-3p通过转录因子SOX-4抑制HCC细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭<sup>[37]</sup>;miR-379-5p通过调节黏着斑激酶(FAK)/Akt信号抑制肝癌细胞侵袭和转移<sup>[38]</sup>;miR-378a-5p通过血管内皮生长因子(VEGF)通路抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[39]</sup>。相反,miR-382-5p则通过激活PI3K/Akt信号通路促进肝癌细胞生长<sup>[40]</sup>。总之,这些发现表明芪甲柔肝方调控的某些miRNA具有抑癌作用,而另一些则具有促癌作用。然而,这些研究大多涉及肝癌细胞,每种miRNA的具体作用取决于miRNA及其靶标。需要对啮齿动物进行更多研究及进行临床前试验,以确定这些miRNA在肝纤维化中的作用和作用机制。

细胞色素P450酶是许多药物代谢所必需的,这些酶在许多药物和其他化学物质的代谢及解毒过程

中发挥着重要作用<sup>[41]</sup>。本研究鉴定出的前20个上调关键基因中,有两个基因编码重要的P450酶,即大鼠细胞色素P450 3A18(Cyp3a18)和 大鼠细胞色素P450 3A62(Cyp3a62),表明芪甲柔肝方能够调控药物代谢。芪甲柔肝方还增强了几种醛脱氢酶基因的表达,包括醛脱氢酶3家族成员A2(Aldh3a2)、Aldh6a1、Aldh8a1和Aldh9a1,这些酶能够催化各种有毒的生物源醛和外来化合物醛氧化成相应的酸。此外,羟基酸氧化酶2基因羟基酸氧化酶2(Hao2)编码一种具有2-羟基酸氧化酶活性的酶,位于过氧化物酶体中,已被发现能催化羟基脂肪酸氧化为酮酸和过氧化氢,并在肝细胞癌中发挥抑癌作用<sup>[42]</sup>。本研究发 现,在前20个上调的枢纽基因中,Hao2是受影响最大的基因。对前20个下调的关键基因的分析发现,CD44是中心枢纽基因,编码一种细胞黏附分子,有助于肿瘤进展和转移。CD44的表达与肝纤维化水平相关,抑制CD44的表达可有效减轻肝纤维化<sup>[43-44]</sup>。因此,芪甲柔肝方可能通过调节CD44来保护肝脏免受损伤。芪甲柔肝方还调节细胞外基质组织[I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(Col1a)]、细胞增殖[微小染色体维持蛋白(Mcm)2、Mcm6]和成纤维细胞因子表达[血小板衍生生长因子B链(Pdgfb)、血小板衍生生长因子受体 $\beta$ (Pdgfrb)]及转录因子SOX-9的基因表达。芪甲柔肝方还与关键基因NIMA相关激酶2(Nek2)<sup>[45]</sup>、杆状病毒IAP重复序列包含蛋白5(Birc5)<sup>[46]</sup>和动粒蛋白Spc24(Spc24)<sup>[47]</sup>的显著下调相关,这些基因被认定为HCC患者预后不良的生物标志物。综上所述,这些研究结果表明芪甲柔肝方通过多种途径保护肝脏。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis in NAFLD/NASH: From pathophysiology towards diagnostic and therapeutic strategies[J]. *Mol Aspects Med*, 2024, 95: 101231.
- [2] MAN S, DENG Y, 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.
- [3] AN T, LIU L, LI X. Factors associated with the influence of liver fibrosis should be fully considered[J]. *Gastroenterology*, 2024, 166(3): 540-541.
- [4] SCHUPPAN D, ASHFAQ-KHAN M, YANG A T, et al. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies[J]. *Matrix Biol*, 2018, 68-69: 435-451.
- [5] ROCKEY D C, FRIEDMAN S L. Fibrosis regression after eradication of hepatitis C virus: From bench to bedside[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(5): 1502-1520.

- [6] SHANG R, LEE S, SENAVIRATHNE G, et al. MicroRNAs in action: Biogenesis, function and regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(12): 816-833.
- [7] LATIEF U, TUNG G K, PER T S, et al. Micro RNAs as emerging therapeutic targets in liver diseases[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2022, 23(6): 369-383.
- [8] ZHAO Z, LIN C Y, CHENG K. SiRNA- and miRNA-based therapeutics for liver fibrosis[J]. *Transl Res*, 2019, 214: 17-29.
- [9] WANG X, HE Y, MACKOWIAK B, et al. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases [J]. *Gut*, 2021, 70(4): 784-795.
- [10] TU X, ZHANG H, ZHANG J, et al. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF $\beta$  signalling pathway[J]. *J Pathol*, 2014, 234(1): 46-59.
- [11] BALA S, CSAK T, SAHA B, et al. The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(6): 1378-1387.
- [12] JOHN K, HADEM J, KRECH T, et al. MicroRNAs play a role in spontaneous recovery from acute liver failure[J]. *Hepatology*, 2014, 60(4): 1346-1355.
- [13] ZHOU J, LIANG Y, LIN X M, et al. Acupuncture in treating hepatic fibrosis: A review with recommendation for future studies [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2012, 9(4): 452-458.
- [14] 李白雪, 王鑫, 刘悸斌, 等. 基于“主客交”理论的芪甲柔肝方联合恩替卡韦对气虚络阻证慢性乙型肝炎肝纤维化的分期疗效 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(9): 180-188.
- [15] LI B X, WANG X, LIU J B, et al. Efficacy of Qijia Rougan decoction combined with entecavir in stage treatment of chronic hepatitis B liver fibrosis with Qi deficiency and blood stasis syndrome: A study based on the theory of "Zhu Ke Jiao"[J]. 2026, 32(9): 180-188.
- [15] 苏悦, 彭杨芷, 刘雨樵, 等. 基于 miR-23a-3p 的扶正通络法抗肝纤维化的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(7): 3962-3966.
- [16] SU Y, PENG Y Z, LIU Y Q, et al. Mechanism of anti-liver fibrosis by reinforcing the healthy Qi and promoting blood circulation method based on miR-23a-3p[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(7): 3962-3966.
- [16] CHEN X F, WANG Y, JI S, et al. Hepatoprotective efficacy and interventional mechanism of Qijia Rougan decoction in liver fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 911250.
- [17] CHEN X, SUN X, JI S, et al. TMT-based proteomics analysis identifies the interventional mechanisms of Qijia Rougan decoction in improving hepatic fibrosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117334.
- [18] LI X, XU X, TAO S, et al. Gut microbes combined with metabolomics reveal the protective effects of Qijia Rougan decoction against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1347120.
- [19] 刘进, 许欣怡, 刘悸斌, 等. 芪甲柔肝方及其拆方调控 VEGF/SRF/c-FOS 通路与改善肝纤维化大鼠肝窦毛细血管化的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(20): 5528-5538.
- [19] LIU J, XU X Y, LIU J B, et al. Mechanism of Qijia Rougan decoction and its disassembled formulas on regulation of VEGF/SRF/c-FOS pathway and improvement of hepatic sinusoidal

- capillaryzation in rats with hepatic fibrosis [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2024, 49(20):5528-5538.
- [20] 姜岑, 宋虹霏, 王东, 等. 基于 IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 通路研究芪甲柔肝方抗肝纤维化作用机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(8):4805-4809.
- JIANG C, SONG H F, WANG D, et al. Study on the mechanism of Qijia Rougan prescription in anti-hepatic fibrosis based on IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(8):4805-4809.
- [21] LI H. Advances in anti hepatic fibrotic therapy with traditional Chinese medicine herbal formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251:112442.
- [22] ZHOU Y N, SUN M Y, MU Y P, et al. Xuefuzhuyu decoction inhibition of angiogenesis attenuates liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3):659-666.
- [23] CHEN Y, CHEN Q, LU J, et al. Effects of Danggui Buxue decoction on lipid peroxidation and MMP-2/9 activities of fibrotic liver in rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2009, 15(6):435-441.
- [24] LV J, ZHAO Z, CHEN Y, et al. The Chinese herbal decoction Danggui Buxue tang inhibits angiogenesis in a rat model of liver fibrosis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012:284963.
- [25] ZHANG X, YANG F, ZHANG Y, et al. Modified Buyang Huanwu decoction alleviates diabetic liver injury via inhibiting oxidative stress in db/db mice [J]. *Am J Transl Res*, 2024, 16(1):39-50.
- [26] WEN J, WANG D, WANG J, et al. Astragali Radix contributes to the inhibition of liver fibrosis via high-mobility group box 1-mediated inflammatory signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:5574010.
- [27] DAN L, HAO Y, SONG H, et al. Efficacy and potential mechanisms of the main active ingredients of *Astragalus mongholicus* in animal models of liver fibrosis: A systematic review and Meta-analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 1):117198.
- [28] GONG F, QU R, LI Y, et al. *Astragalus mongholicus*: A review of its anti-fibrosis properties [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:976561.
- [29] DOGHISH A S, ELBALLAL M S, ELAZAZY O, et al. The role of miRNAs in liver diseases: Potential therapeutic and clinical applications [J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 243:154375.
- [30] XIE J, CHENG N, HUANG Z, et al. MiR-146b-5p activation of hepatic stellate cells contributes to the progression of fibrosis by directly targeting HIPK1 [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(2):537.
- [31] WANG T Z, LIN D D, JIN B X, et al. Plasma microRNA: A novel non-invasive biomarker for HBV-associated liver fibrosis staging [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3):1919-1929.
- [32] WU Z, WANG J, FENG J, et al. MicroRNA-122-5p prevents proliferation and promotes apoptosis of hepatic stellate cells by suppressing the cellular-Abelsongene/histone deacetylases 2 pathway [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, doi: 10.1177/09603271221084672.
- [33] PAN L, REN F, RONG M, et al. Correlation between down-expression of miR-431 and clinicopathological significance in HCC tissues [J]. *Clin Transl Oncol*, 2015, 17(7):557-563.
- [34] PENG S, CHEN Y, LI T, et al. Hsa-microRNA-370-3p targeting Snail and Twist1 suppresses IL-8/STAT3-driven hepatocellular carcinoma metastasis [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(12):4120-4134.
- [35] WEI Y, ZHANG Q, AN L, et al. Serum exosomal microRNA-370-3p and microRNA-196a-5p are potential biomarkers for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2022, 60(3):215-225.
- [36] HUAN L, BAO C, CHEN D, et al. MicroRNA-127-5p targets the biliverdin reductase B/nuclear factor-kappaB pathway to suppress cell growth in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(3):258-266.
- [37] HUANG J, LU D, XIANG T, et al. MicroRNA-132-3p regulates cell proliferation, apoptosis, migration and invasion of liver cancer by targeting Sox4 [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(4):3173-3180.
- [38] CHEN J S, LI H S, HUANG J Q, et al. MicroRNA-379-5p inhibits tumor invasion and metastasis by targeting FAK/Akt signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(1):73-83.
- [39] ZOU H, YANG L. MiR-378a-5p improved the prognosis and suppressed the progression of hepatocellular carcinoma by targeting the VEGF pathway [J]. *Transl Cancer Res*, 2020, 9(3):1558-1566.
- [40] LV B, LIU X, ZHU X, et al. MiR-382-5p promotes cell invasion in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN to activate PI3K/Akt signaling pathway [J]. *World J Surg Oncol*, 2022, 20(1):175.
- [41] GUENGERICH F P, WATERMAN M R, EGLI M. Recent structural insights into cytochrome P450 function [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37(8):625-640.
- [42] MATTU S, FORNARI F, QUAGLIATA L, et al. The metabolic gene HAO2 is downregulated in hepatocellular carcinoma and predicts metastasis and poor survival [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(4):891-898.
- [43] UNO K, MIYAJIMA K, TOMA M, et al. CD44 expression in the bile duct epithelium is related to hepatic fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis rats induced by a choline-deficient, methionine-lowered, L-amino acid diet [J]. *J Toxicol Pathol*, 2022, 35(2):149-157.
- [44] OSAWA Y, KAWAI H, TSUNODA T, et al. Cluster of differentiation 44 promotes liver fibrosis and serves as a biomarker in congestive hepatopathy [J]. *Hepatol Commun*, 2021, 5(8):1437-1447.
- [45] LI G, ZHONG Y, SHEN Q, et al. NEK2 serves as a prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2):405-413.
- [46] YE H B, MA B J, MENG G Q, et al. Bioinformatics analysis of BIRC5 in human cancers [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(16):888.
- [47] ZHU P, JIN J, LIAO Y, et al. A novel prognostic biomarker SPC24 up-regulated in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(38):41383-41397.

[责任编辑 周冰冰]