

基于巨噬细胞M2极化研究芪甲柔肝方及其关键效应成分 抗肝纤维化的分子机制

文莉¹, 冯全生¹, 姜岑¹, 李白雪¹, 王东¹, 李继科³, 李霞¹, 万飞^{2*}, 郑燕凤^{2*}

(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137; 2. 重庆医药高等专科学校中医学院, 重庆 401331;
3. 成都市公共卫生临床医疗中心, 成都 610061)

[摘要] 目的: 基于巨噬细胞M2极化调控探究芪甲柔肝方及其关键效应成分抗纤维化的分子机制和作用靶点, 为肝纤维化新药研发提供依据和借鉴。方法: 40%四氯化碳(CCl₄)皮下注射构建肝纤维化大鼠模型, 芪甲柔肝方颗粒剂灌胃治疗, 马松染色法检测肝组织胶原纤维容积, 免疫组织化学法检测肝组织纤维化标志物I型胶原(Collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)水平, 流式细胞术检测肝组织内M2巨噬细胞比例, 免疫荧光双染法检测M2巨噬细胞表型CD163、CD206水平, 蛋白免疫印迹法检测细胞因子转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生生长因子B(PDGFB)、白细胞介素(IL)-10水平和通路调控分子磷酸化(p)-JAK1、p-信号转导及转录激活蛋白6(STAT6)水平, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测JAK1、STAT6、精氨酸酶1(Arg1)、Fizz1相对表达水平; 基于血清药理学理论, 采用液质联用技术和韦恩分析获取芪甲柔肝方的药物活性成分; 采用分子对接和分子动力学模拟技术分析关键效应成分和靶点; IL-4诱导RAW264.7巨噬细胞M2极化, 活性成分体外培养巨噬细胞, 蛋白免疫印迹法检测通路调控分析表达水平, 体外验证作用靶点。结果: 与空白组比较, 芪甲柔肝方治疗可明显减少纤维化标志物 α -SMA、Collagen I和胶原纤维含量($P < 0.05$), 降低M2巨噬细胞比例及相关细胞因子IL-10、TGF- β 、PDGFB水平($P < 0.05$), 上调M2极化调控因子p-JAK1、p-STAT6水平($P < 0.05$); 从芪甲柔肝方、含药血清、空白血清中共检测到1214个化合物, 经韦恩分析获得29个药物成分, 包括15个入血原型成分和14个药物代谢成分; 分子对接显示, 甘草次酸、小檗碱与JAK1的亲合力较强, 结合自由能分别为 $-9.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal} \approx 4.184 \text{ J}$)和 $-9.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$; 分子动力学模拟显示, JAK1-甘草次酸和JAK1-小檗碱复合体系在100 ns内模拟轨迹稳定, 结合自由能分别为 $(-25.18 \pm 0.81) \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $(-27.39 \pm 0.85) \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 模拟前后构象基本一致, 蛋白重叠度高, JAK1-甘草次酸形成的氢键数目在0~5个, 多数时间可维持在2~3个; 甘草次酸、小檗碱体外干预可明显降低p-JAK1、p-STAT6水平($P < 0.05$)。结论: 芪甲柔肝方可抑制M2巨噬细胞极化改善肝纤维化, 甘草次酸和小檗碱是该方调控M2极化的关键效应成分, 其可靶向结合JAK1, 进而调控JAK1/STAT6信号通路, 抑制巨噬细胞M2极化以改善肝纤维化, 为进一步处方优化、临床应用及新药研发提供依据, 并为单体抗肝纤维化研究提供借鉴。

[关键词] 芪甲柔肝方; 肝纤维化; 巨噬细胞M2极化; 甘草次酸; 小檗碱

[中图分类号] R575; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)14-0155-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251012

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20250826.1001.001>

[网络出版日期] 2025-08-26 12:39:42 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Investigating Molecular Mechanisms of Qijia Rougan Prescription and Its Key Effect or Ingredients Against Hepatic Fibrosis Based on Macrophage M2 Polarization

WEN Li¹, FENG Quansheng¹, JIANG Cen¹, LI Baixue¹, WANG Dong¹, LI Jike,
LI Xia¹, WAN Fei^{2*}, ZHENG Yanfeng^{2*}

(1. College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China. 2. College of TCM, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing

[收稿日期] 2025-06-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82104569)

[第一作者] 文莉, 博士, 副教授, 从事中西医结合防治感染病研究, E-mail: wenlicn@163.com

[通信作者] * 万飞, 教授, 从事脊柱疾病研究, E-mail: 286582141@qq.com;

* 郑燕凤, 博士, 主治医师, 从事肝胆病研究, E-mail: zhengyf2020@163.com

401331, China; 3. Public Health Clinic Center of Chengdu, Chengdu 610061, China)

[Abstract] Objective: Based on the regulation of macrophage M2 polarization, this study aims to explore the molecular mechanism and action targets of the Qijia Rougan prescription and its key effector ingredients in anti-fibrosis, thereby providing a basis and reference for the development of new drugs for hepatic fibrosis. **Methods:** A rat model of hepatic fibrosis was established by subcutaneous injection of 40%CCl₄, followed by oral administration of Qijia Rougan granules. The volume of collagen fibers was detected using Masson staining, the fibrosis markers Collagen I and α -SMA were detected using immunohistochemistry, the proportion of M2 macrophages was detected by flow cytometry. The expression levels of M2 macrophage phenotype markers CD163 and CD206 were detected using immunofluorescence double staining. Western blot was used to detect the levels of the transforming growth factor- β (TGF- β), platelet derived growth factor subunit B (PDGFB), interleukin-10 (IL-10), phosphorylated Janus kinase 1 (p-JAK1), and phosphorylated signal transducer and activator of transcription 6 (p-STAT6). Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the relative expression levels of JAK1, STAT6, Arginase 1 (Arg1), and Fizz1. Based on the theory of serum pharmacology, liquid chromatography-mass spectrometry and WENN analysis were used to obtain the active ingredients of Qijia Rougan prescription. Molecular docking and molecular dynamics simulation were performed to analyze the effector ingredients and their targets. The identified effector ingredients were interfered with IL-4-induced M2 polarization of RAW264.7 macrophage *in vitro* to validate the targets. **Results:** Qijia Rougan prescription significantly reduced the content of fibrosis markers α -SMA and Collagen I, as well as collagen fiber content ($P<0.05$). It decreased the proportion of M2 macrophages and the levels of related cytokines IL-10, TGF- β and PDGFB, and up-regulated the levels of p-JAK1 and p-STAT6 ($P<0.05$). A total of 1 214 compounds were identified from Qijia Rougan prescription, medicated serum and blank serum, and 29 ingredients were finalized by Venn analysis, including 15 blood-entry prototypes and 14 drug metabolites. Molecular docking showed that enoxolone and berberine bound more strongly to JAK1, with binding free energies of $-9.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal}\approx 4.184 \text{ J}$) and $-9.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. Molecular dynamics simulations showed that JAK1-enoxolone and JAK1-berberine exhibited stable simulation trajectories within 100 ns, with essentially identical conformations and high protein overlap before and after simulation. Their binding free energies were $-25.18 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $-27.39 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. The number of hydrogen bonds formed between JAK1 and enoxolone ranges from 0 to 5, and most of the time can be maintained at 2-3. *In vitro* intervention with enoxolone or berberine significantly reduced p-JAK1 and p-STAT6 levels ($P<0.05$). **Conclusion:** Qijia Rougan prescription inhibits M2 macrophage polarization in hepatic fibrosis. Enoxolone and berberine are the key effector ingredients of Qijia Rougan prescription to inhibit macrophage M2 polarization through targeting JAK1 and modulating the JAK1/STAT6 signaling pathway, thereby ameliorating hepatic fibrosis. This study provides a basis for prescription optimization, clinical application and new drug development, as well as a reference for monolithic anti-hepatic fibrosis research.

[Keywords] Qijia Rougan prescription; hepatic fibrosis; macrophage M2 polarization; enoxolone; berberine

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化、肝癌进展的关键病理阶段,以细胞外基质(ECM)过度沉积为特征。据统计,全球约有15亿慢性肝病患者,其中肝纤维化发病率占15%~20%^[1-2],且呈逐年增加,严重威胁生命健康。基于肝纤维化的全球大流行趋势和动态可逆性,肝纤维化治疗将有利于减少肝硬化和肝癌的发病率,一旦发展为失代偿性肝硬化,肝移植则成为最后治疗手段。因此,肝纤维化是逆转慢性肝病向肝硬化甚至肝癌转化的关键时期^[3]。目前肝纤维化仍以控制病因(如针对肝炎病毒的高效抗病毒药物)为主要治疗方法,针对改善/逆转肝纤维化,尚无疗效明确的生物制剂或化学药物可供临床应用^[4]。因此,深入挖掘肝纤维化潜在治疗药物具有重要临床价值。

大量研究表明中医药能有效逆转肝纤维化,改善肝硬化患者临床结局,具有显著的抗纤维化潜力,深入开展中医药抗肝纤维化相关研究,有望为

这一难治性疾病带来新的突破^[5-6]。芪甲柔肝方是基于“主客交”理论,由《瘟疫论》经典方剂三甲散化裁而来,结合肝纤维化正虚络阻共性病机,原方去滋腻之白芍,加入黄芪、当归益气养血通脉;恐瘧虫等峻猛破血之势,改用桃仁、红花以逐瘀通络,去蝉蜕、僵蚕,加三棱、莪术,以行气活血,消积软坚;鳖甲引药入肝络,软坚散结,缓急通络,全方共奏益气养血扶正,化瘀散结通络之效。现代药理研究也发现,方中黄芪、当归、桃仁、红花、鳖甲等药及其有效成分均具有抗肝纤维化的作用^[7]。前期经临床多中心随机对照研究证实芪甲柔肝方治疗肝纤维化疗效确切,治疗组肝纤维化评分、肝脏硬度、透明质酸和IV型胶原含量等改善效果明显优于空白组;患者临床症状及中医证候评分得到显著改善,安全性指标均在正常范围^[8]。前期实验研究显示芪甲柔肝方高剂量组治疗大鼠肝纤维化效果优于中、低剂量组^[7,9-10],且该治疗剂量已在本方相关基础研究中得

到进一步应用与验证,无明显不良反应^[11-12]。前期实验研究还显示,该方可显著改善肝纤维化大鼠肝脏Ⅲ型前胶原、Ⅳ型前胶原等ECM的沉积^[7],为基于ECM沉积调控研究该方抗肝纤维化机制奠定基础。巨噬细胞M2极化对肝纤维化起关键调控作用,巨噬细胞M2极化可减少促纤维化因子表达,抑制ECM生成^[13],而蛋白酪氨酸激酶1(JAK1)/信号传导转录激活因子6(STAT6)是调控巨噬细胞M2极化的关键信号通路^[14],通路关键因子JAK1和STAT6可调节巨噬细胞向M2型极化和相关细胞因子白细胞介素(IL)-10、转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生生长因子B(PDGFB)等的表达^[15]。本研究以“巨噬细胞M2极化调控”影响ECM沉积为切入点,通过体内外实验和计算机模拟技术探索芪甲柔肝方及其关键效应成分抗肝纤维化的分子机制,阐释扶正通络法治疗肝纤维化的科学内涵,为抗肝纤维化新药研发提供依据,研究步骤见增强出版附加材料。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠购自成都达硕实验动物有限公司,实验动物质量合格证号No.51203500024207,实验动物生产合格证号SCXK(川)2020-030。大鼠饲养于成都中医药大学基础医学院科创中心动物房,保持24 h通风换气,室温20~24℃,空气湿度50%~60%,光照模拟正常昼夜循环,予大鼠维持饲料喂养,25 g/只/d,自由饮水,大鼠适应性喂养1周。

1.2 伦理 本研究符合实验动物福利的基本要求,经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(备案编号2021-66)。

1.3 细胞 RAW264.7巨噬细胞系由成都中医药大学基础医学院王栋教授团队馈赠。10%胎牛血清+90%DMEM高糖培养常规培养细胞,1~2 d换液1次,当细胞生长至70%密度时进行传代,吸出旧培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2遍,加入无血清培养基2 mL,轻轻吹下细胞,1 000 r·min⁻¹(离心半径10 cm)离心3 min,去上清,完全培养基1 mL重悬细胞,1:4比例接种至新的100 mm细胞培养皿中,另加入完全培养基4 mL,置37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

1.4 药物与试剂 芪甲柔肝方颗粒剂由黄芪、当归、鳖甲、红花、桃仁、三棱、莪术、甘草组成,由四川新绿色药业科技发展有限公司于四川省中医院免煎药房代制成中药配方颗粒。复方鳖甲软肝片(内

蒙古福瑞医疗科技股份有限公司,批号C0120109,规格0.51 g/片,36片/盒),甘草次酸(成都普思生物科技股份有限公司,批号PS010486,纯度99%),小檗碱、四氯化碳(CCl₄)(上海易恩化学技术有限公司,批号分别为RH427602、RH286938,纯度均≥99%);戊巴比妥钠、二甲苯(中国医药集团有限公司,批号分别为69020100、10023418);多聚甲醛、柠檬酸抗原修复液、马松(Masson)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1101、G1202、G1006);乙二胺四乙酸(EDTA,北京中杉金桥生物技术有限公司,批号ZLI-9069);甲酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号F112034);DMEM高糖培养基(美国Gibco公司,批号C11995500BT);优级胎牛血清(新西兰NEWZERUM公司,批号FBS-E500);重组IL-4(美国PeproTech公司,批号214-14);二甲基亚砷(德国BioFroxx公司,批号1084ML500);磷酸化(p)-JAK1抗体(美国Affinity Biosciences公司,批号AF2012);Collagen I、羊抗兔IgG H&L、TGF- β ₁、PDGFB、IL-10、STAT6(phospho Y641)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab270993、ab6721、ab215715、ab178409、ab9969、ab263947); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)XP[®] mAb(美国Cell Signaling公司,批号D4K9N);RELM alpha抗体(美国GeneTex公司,批号GTX00822);EMR1抗体(PE)、CD163抗体(FITC)(英国Biorbyt公司,批号分别为orb486108、orb464188);CD206抗体(CY5)(美国CST公司,批号24595),PerCP/Cyanine5.5 CD45抗体(美国Biolegend公司,批号B329570);FastPure[®] Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2、HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR、Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别为RC112-01、R323-01、Q712-02);广谱磷酸酶抑制剂混合物、蛋白酶抑制剂、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、Tris-glycine-SDS电泳缓冲液、Tris-glycine-SDS转膜缓冲液、特超敏增强化学发光法(ECL)化学发光即用型底物、细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂、0.25%胰蛋白酶、山羊血清、内源性过氧化物酶阻断液(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为AR1183、AR1179、AR1112、AR0138、AR1146-10、AR1152-10、AR119、AR1160、PYG0067、AR0009、AR1108)。

1.5 仪器 JB-P5型组织包埋机、JB-L5型冻台(武

汉俊杰电子有限公司), Donatello型全自动组织脱水机(意大利DIAPATH Donatello公司), RM2016型病理切片机(德国徕卡公司), KD-P型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司), HS6型病理扫面成像系统(Leica & Sdptop), FACSVerse™ FlowCytomete型流式细胞仪(美国BD公司), UltiMate 3000 RS型色谱仪、Q Exactive型质谱仪(赛默飞世尔科技公司), SpectraMax型酶标仪(美国Molecular Devices公司), ScanDrop2型微量核酸蛋白测定仪(德国Analytikjena公司), Applied Biosystems MiniAmp型热循环仪(美国Thermo Fisher Scientific MiniAmp公司)、CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司)、EPS600型电泳仪、6100Multi型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司), JT-MNSZC4型四块胶转印槽、JT-MNSZC2型二块胶垂直电泳槽(浚腾), HR1200-II A2-E型智净生物安全柜(青岛海尔生物医疗股份有限公司), HF90型二氧化碳培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司), XD-202型倒置生物显微镜(南京江南永新光学有限公司)。

2 方法

2.1 肝纤维化造模与给药 大鼠随机分组, 空白组10只, 模型组15只, 鳖甲软肝片组15只, 芪甲柔肝方组15只。依据文献[16-18], 综合考虑肝纤维化大鼠造模的成模率、存活率、死亡率、实验周期等因素, 本实验采用40%CCl₄, 2 mL·kg⁻¹, 大鼠颈部皮下注射, 每周2次, 共12周, 第13周开始每周注射1次以维持模型, 空白组给予等量生理盐水注射。肝纤维化成模标准: 肉眼观察可见肝脏形态大小改变, 颜色变浅, 表面粗糙无光泽, 质地变硬且易碎裂, 边缘不规则, 严重的可见肝脏皱缩, 体积缩小, 表面凹凸不平且有大量颗粒状突起; Masson染色可见肝组织中央静脉区和汇管区大量胶原纤维增生(蓝色), 纤维条索相互连接呈网状, 形成纤维间隔, 肝小叶结构被分割破坏, 假小叶形成。

鳖甲软肝片组和芪甲柔肝方组第13周起每天灌胃给药1次, 共6周, 空白组和模型组予等量生理盐水灌胃。前期通过对比芪甲柔肝方高、中、低剂量对肝纤维化模型大鼠的治疗效果, 结果均显示高剂量芪甲柔肝方的抗肝纤维化疗效最优^[7,9-10], 该治疗剂量已在本方相关实验研究中得到进一步应用与验证^[11-12], 其疗效显著且无明显不良反应, 因此本实验中采用芪甲柔肝方高剂量给药。芪甲柔肝颗

粒(黄芪、当归、鳖甲、红花、桃仁、三棱、莪术、甘草)和复方鳖甲软肝片的给药量依据《药理与中药药理实验》第3版中不同动物等效剂量折算系数进行换算, 计算公式: 200 g大鼠给药剂量=换算系数(0.018)×成人用药剂量(生药165 g), 具体给药浓度为芪甲柔肝颗粒14.85 g·kg⁻¹、复方鳖甲软肝片0.55 g·kg⁻¹, 中药颗粒用纯水充分溶解, 大鼠每100 g灌胃0.01 mL·g⁻¹, 1次/d。

2.2 芪甲柔肝方含药血清制备 大鼠随机均分为空白血清组(20只)和含药血清组(20只), 常规饲养大鼠至体质量约300 g, 予芪甲柔肝颗粒灌胃, 14.85 g·kg⁻¹, 2次/d, 间隔12 h, 空白组给予等量生理盐水灌胃, 连续灌胃3 d后采集腹主动脉血样^[19-20], 3 500 r·min⁻¹(离心半径14 cm, 下同)离心10 min, 取上清液, 56 °C恒温水浴灭活30 min并过滤除菌。

2.3 肝组织 Masson 染色 石蜡切片脱蜡至水, 2.5%重铬酸钾媒染剂浸染过夜, Weigert铁苏木素染液浸染1 min, 分化液分化5 s, 丽春红酸性品红浸染6 min, 1%磷钼酸溶液浸染1 min, 沥干, 2.5%苯胺蓝溶液浸染30 s, 1%冰乙酸漂洗分化1 min, 依次放入95%乙醇3 s, 无水乙醇 I 10 s, 无水乙醇 II 10 s, 无水乙醇 III 5 min, 二甲苯 I 2 min, 二甲苯 II 2 min, 二甲苯 III 2 min, 晾干封片。

2.4 免疫组织化学分析 石蜡切片脱蜡至水, EDTA修复液/柠檬酸进行微波抗原修复, 0.3%过氧化氢封闭30 min, 一抗(Collagen I 1: 500、 α -SMA 1: 200)4 °C孵育过夜, 二抗(羊抗兔IgG H&L 1: 1 000)室温孵育1 h, 二氨基联苯胺(DAB)显色, 木素溶液浸染10 s, 自来水冲洗至返蓝, 晾干封片。

2.5 流式细胞术检测 M2 巨噬细胞比例 胶原酶2 mL消化肝组织, 37 °C恒温震荡孵育30 min, 使组织完全解离, 70 μ m细胞滤网过滤, 1 000 r·min⁻¹离心5 min收集细胞, 调整细胞浓度至1×10⁷个/mL, 依次加入CD45、F4/80、CD163(1: 200, 1: 100, 1: 100)流式抗体, 室温避光孵育30 min, PBS洗2次, 去上清, 转移至流式上样管中, 避光, 置冰上, 上机检测, 数据使用FlowJo 10.6.2软件进行分析。

2.6 肝组织双荧光双染检测 M2 巨噬细胞表型 石蜡切片60 °C烘1 h, 二甲苯脱蜡, 乙醇梯度水化, PBS洗3次×5 min; 柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)热修复15 min, 冷却后PBS洗涤3次; 5%牛血清白蛋白(BSA)封闭1 h, 滴加第一抗CD206工作液(1: 400), 4 °C孵育过夜, PBS浸洗3次, 滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(比例)孵育30 min, PBS

浸洗3次,滴加CD206一抗(1:400)对应CY5染色工作液孵育10 min, PBS浸洗3次, 抗体洗脱;加入3%BSA封闭30 min, 滴加一抗CD163工作液(1:50), 4 °C孵育过夜, PBS浸洗3次, 滴加HRP标记二抗(比例)孵育30 min, PBS浸洗3次, 滴加一抗对应CY3染色工作液(比例)孵育10 min, PBS浸洗3次, 抗体洗脱;4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染细胞核5 min, 抗淬灭封片;共聚焦显微镜分析双阳性细胞荧光。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织相关蛋白 肝组织匀浆处理, 加入SDS裂解液980 μL+蛋白酶抑制剂10 μL+磷酸酶抑制剂10 μL混合物冰上裂解30 min, 12 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径)取上清液, ScanDrop2检测蛋白浓度, 加入适量裂解液和SDS-PAGE上样缓冲液调整质量浓度至10 μg·L⁻¹, 沸水煮10 min。取5 μL蛋白上样, 80 V电泳40 min, 120 V电泳50~60 min, 400 mA转膜20~30 min, 脱脂奶粉溶液室温封闭2 h(磷酸化蛋白用BSA溶液封闭), TBST洗3次, 一抗(TGF-β、PDGFB、IL-10、p-JAK1、p-STAT6)稀释比例1:1 000, 4 °C孵育过夜, TBST洗膜3次, 二抗室温孵育1 h, 配置显影液, 使用化学发光成像系统进行显影, 以β-肌动蛋白(β-actin)为内参, 使用Tanon Image软件分析蛋白质条带的灰度值。

2.8 Real-time PCR检测肝组织相关基因 肝组织匀浆处理, 根据MiPure Cell/Tissue miRNA Kit中的步骤说明提取总RNA, ScanDrop2超微量核酸蛋白测定仪检测RNA浓度, 根据RNA浓度和逆转录试剂说明书, 计算所需样本体积, 配置逆转录体系, 42 °C恒温孵育2 min, 设置MiniAmp热循环仪37 °C, 15 min, 85 °C, 5 s进行逆转录, 获得cDNA, 稀释3倍后用于扩增反应;扩增条件:95°C预变性30 s;40个循环:95°C 10 s, 60°C 30 s, 95°C 15 s;60°C延伸60 s;95°C终延伸15 s;4°C保温。以β-肌动蛋白(β-actin)为内参, 空白组为对照, 采用2^{-ΔΔC_t}法计算相对表达量, 引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 引物序列见表1。

2.9 液质联用分析中药活性成分 中药颗粒、含药血清、空白血清分别经甲醇处理后提取上清液用作分析。液相色谱, 样品, 流动相0.1%甲酸溶液(A)-甲醇(B), 线性梯度洗脱(0~5 min, 2%B; 5~10 min, 2%~20%B, 10~15 min, 20%~50%B, 15~20 min, 50%~80%B; 20~27 min, 80%~95%B; 27~30 min, 95%~98%B)。流速0.3 mL·min⁻¹, 进样体积5 μL。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
JAK1	上游 CTGGTGAGATGGTGCCATTACT	22
	下游 GCTTCACCTCCGTCTTCTTGA	21
STAT6	上游 ATCAGCACCTTGGAGAGCATC	21
	下游 TCCCTTACTCGGTGTGAAG	20
β-actin	上游 AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT	23
	下游 ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	20
Arg1	上游 TCTGCCAAAGACATCGTGTACAT	23
	下游 CGACATCAAAGCTCAGGTGAATC	23
Fizz1	上游 CCTCCACTGTAACGAAGACTCTC	23
	下游 CTCCCAAGATCCACAGGCAAAG	22

质谱分析采用电喷雾电离源(ESI)离子化方式, Full mass/dd-MS²模式进行正负离子切换扫描, 扫描范围m/z 100~150, 离子源电压3.2 kV, 毛细管温度300 °C, 碰撞气为高纯氩气, 碰撞能30, 鞘气和辅助气为高纯氮气。CD3.3(Thermo Fisher)对数据进行处理, 利用mzCloud数据库进行检索匹配。

2.10 分子对接预测效应成分 从蛋白质数据库(PDB)下载靶点蛋白3D结构, 在PyMOL 2.5软件中移除配体、非蛋白分子和水分子, 在AutoDock Vina软件中进行加氢、加电荷和修复残基。从PubChem数据库下载活性成分分子3D结构, 在AutoDock Vina中进行加氢和能量最小化。利用AutoDock Vina软件的半柔性分子对接计算功能^[21], 预测活性成分与靶点之间的结合亲和力, 通过输出的结合自由能数据判断亲和力大小。

2.11 分子动力学模拟分析成分-靶点结合稳定性 使用AMBER18软件进行分子动力学模拟^[22], 分3步完成, 能量优化、系统平衡、动力学模拟。能量优化采用2 500步的最陡下降法和2 500步的共轭梯度法。恒温300 K下进行500 ps的等温等体和等温等压模拟, 从而实现系统平衡。复合体系在周期边界条件下进行100 ns的等温等压模拟, 碰撞频率为2 ps⁻¹, 体系压强为1 atm, 积分步长为2 fs, 每10 ps保存1次轨迹数据。MM/GBSA法计算结合自由能, 采用95~100 ns模拟轨迹用作计算, 计算公式见增强出版附加材料。

2.12 巨噬细胞M2极化模型诱导 取对数生长期细胞接种于6孔板, 分为空白组和模型组, M2模型组加入IL-4 20 μg·L⁻¹诱导巨噬细胞M2极化, 培养24 h, 收集细胞样本进行表型检测, 若M2巨噬细胞特异性表型表达水平显著升高则表明IL-4可成功

诱导巨噬细胞向M2极化。

2.13 CCK-8检测甘草次酸、小檗碱对细胞活力的影响 选择对数生长期的RAW264.7细胞接种于96孔板中,分为7组,每组设6个复孔,0~100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度梯度的甘草次酸和小檗碱培养细胞24 h,每孔加入CCK-8试剂10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h,酶标仪检测吸光度A。

2.14 细胞实验分组与给药 取对数生长期细胞接种于6孔板中,分为空白组、模型组、甘草次酸组、小檗碱组,除空白组外均加入20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-4诱导巨噬细胞向M2极化,甘草次酸组、小檗碱组分别加入对应成分培养24 h,收集细胞样本用于后续检测。

2.15 统计学分析 采用GraphPad prism 9.0软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据不符合正态分布,采用非参数检验,多个独立样本比较采用Kruskal-Wallis H (Dunn)检验,两组独立样本比较采用Mann-Whitney检验。数据符合正态分布且方差

齐,采用Bonferroni检验,方差不齐,采用Dunnett's T_3 检验,两组样本采用 t 检验。

3 结果

3.1 芪甲柔肝方改善大鼠肝脏纤维化程度

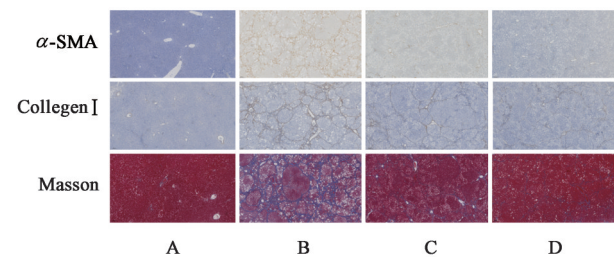
Masson染色显示,与空白组比较,模型组胶原纤维含量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,鳖甲软肝片组和芪甲柔肝方组胶原纤维含量明显降低($P<0.05$);与鳖甲软肝片组比较,芪甲柔肝方组胶原纤维含量明显降低($P<0.05$)。免疫组化结果显示,与空白组比较,模型组Collagen I、 α -SMA含量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,鳖甲软肝片组Collagen I含量明显降低($P<0.05$), α -SMA含量一定程度降低,但差异无统计学意义,芪甲柔肝方组Collagen I、 α -SMA含量明显降低($P<0.05$);与鳖甲软肝片组比较,芪甲柔肝方组Collagen I含量明显降低($P<0.05$)。芪甲柔肝方对大鼠肝纤维化标志物的影响见表2、图1。

表2 芪甲柔肝方对大鼠肝纤维化标志物和胶原纤维含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Qijia Rougan prescription on content of hepatic fibrosis markers and collagen fibers of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	Collagen I	α -SMA	胶原容积分数
空白组	8		0.004 291 \pm 0.002 699 ¹⁾	0.002 512 \pm 0.001 075 ¹⁾	0.821 400 \pm 0.526 400 ¹⁾
模型组	13		0.025 920 \pm 0.008 583	0.033 290 \pm 0.025 180	9.712 000 \pm 3.244 000
鳖甲软肝片组	14		0.015 840 \pm 0.006 560 ¹⁾	0.017 410 \pm 0.017 590	5.422 000 \pm 2.188 000 ¹⁾
芪甲柔肝方组	14	10 mL \cdot kg ⁻¹	0.009 321 \pm 0.003 750 ^{1,2)}	0.010 180 \pm 0.015 100 ¹⁾	3.183 000 \pm 0.960 900 ^{1,2)}

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$;与鳖甲软肝片组比较²⁾ $P<0.05$



注:A.空白组;B.模型组;C.鳖甲软肝片组;D.芪甲柔肝方组(图2、图3同)

图1 芪甲柔肝方对大鼠肝纤维化标志物 α -SMA、Collagen I含量的影响(IHC, Masson, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Qijia Rougan prescription on hepatic fibrosis marker α -SMA, Collagen I of liver tissues of rats (IHC, Masson, $\times 200$)

3.2 芪甲柔肝方减少肝组织M2巨噬细胞比例和相关因子 流式细胞分析结果显示,与空白组比较,模型组M2巨噬细胞比例明显升高($P<0.05$);与模型组比较,鳖甲软肝片组和芪甲柔肝方组M2巨噬细胞比例明显减少($P<0.05$);芪甲柔肝方组与鳖甲

软肝片组比较差异无统计学意义。M2巨噬细胞相关因子检测结果显示,与空白组比较,模型组IL-10、TGF- β 、PDGFB水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,鳖甲软肝片组PDGFB水平明显降低($P<0.05$),TGF- β 、IL-10有一定程度降低,但差异无统计学意义,芪甲柔肝方组IL-10、TGF- β 、PDGFB水平明显降低($P<0.05$);与鳖甲软肝片组比较,芪甲柔肝方组IL-10水平明显降低($P<0.05$)。见表3及增强出版附加材料。

3.3 芪甲柔肝方对肝组织JAK1、p-JAK1、p-STAT6

水平的影响 巨噬细胞M2极化关键调控通路JAK1/STAT6的分子检测结果显示,与空白组比较,模型组JAK1、p-JAK1、p-STAT6水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,鳖甲软肝片组和芪甲柔肝方组JAK1、p-JAK1、p-STAT6水平明显升高($P<0.05$);与鳖甲软肝片组比较,芪甲柔肝方组差异无统计学意义;STAT6在各组间比较差异均无统计学意义。见表4、图2、图3。

表3 芪甲柔肝方对大鼠M2巨噬细胞比例及其相关细胞因子水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Qijia Rougan prescription on proportion of M2 macrophages and related cytokine levels of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量	M2比例/%	IL-10/ β -actin	TGF- β / β -actin	PDGFB/ β -actin
空白组		3.063 \pm 1.429 ¹⁾	0.250 \pm 0.106 ¹⁾	0.414 \pm 0.125 ¹⁾	0.360 \pm 0.105 ¹⁾
模型组		37.140 \pm 9.551 ¹⁾	1.332 \pm 0.538	0.887 \pm 0.338	0.965 \pm 0.220
鳖甲软肝片组		28.670 \pm 24.030	0.796 \pm 0.176	0.724 \pm 0.207	0.598 \pm 0.186 ¹⁾
芪甲柔肝方组	10 mL·kg ⁻¹	19.780 \pm 5.134 ¹⁾	0.357 \pm 0.233 ¹⁾	0.443 \pm 0.221 ¹⁾	0.429 \pm 0.145 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P<0.05(表4-表5、表7-表8同)

表4 芪甲柔肝方对大鼠巨噬细胞M2极化关键调控通路JAK1/STAT6相关分子表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Qijia Rougan prescription on expression levels of related molecules of JAK1/STAT6, key regulatory pathways for macrophage M2 polarization of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量	JAK1	STAT6	p-JAK1/ β -actin	p-STAT6/ β -actin
空白组		1.005 \pm 0.112 ¹⁾	1.014 \pm 0.178	1.725 \pm 1.047 ¹⁾	2.024 \pm 1.239 ¹⁾
模型组		0.285 \pm 0.105	1.066 \pm 0.277	0.516 \pm 0.160	0.465 \pm 0.148
鳖甲软肝片组		0.535 \pm 0.196 ¹⁾	1.079 \pm 0.290	1.100 \pm 0.405 ¹⁾	1.303 \pm 0.508 ¹⁾
芪甲柔肝方组	10 mL·kg ⁻¹	0.729 \pm 0.254 ¹⁾	1.206 \pm 0.317	1.220 \pm 0.461 ¹⁾	1.525 \pm 0.368 ¹⁾

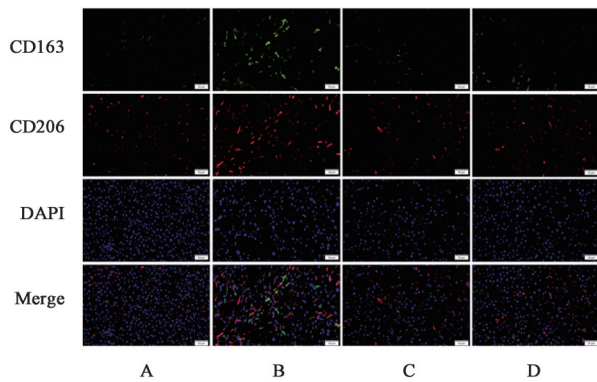


图2 芪甲柔肝方对大鼠肝组织M2巨噬细胞的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Qijia Rougan prescription on M2 macrophages in liver tissue of rats (immunofluorescence, $\times 200$)

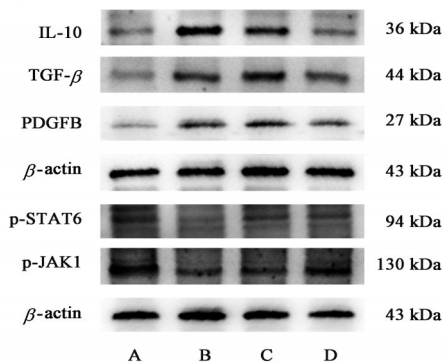


图3 各组大鼠肝组织M2巨噬细胞相关细胞因子电泳

Fig. 3 Electrophoresis of M2 macrophage-related cytokines in rat liver tissue of each group

3.4 芪甲柔肝方药物成分检测 共匹配到1 214个化合物,芪甲柔肝方颗粒781个,含药血清218个,空白血清215个,经Venny 2.1分析后获得20个入血

原型成分和48个药物代谢成分,排除mzCloud Best Match评分<90的成分,最终获得29个活性成分,其中15个为入血原型成分,14个为药物代谢成分。见增强出版附加材料。

3.5 芪甲柔肝方药物成分与JAK1、STAT6蛋白的亲合力 将29个芪甲柔肝方药物成分分别与JAK1、STAT6对接,结果显示,有22个成分与JAK1的结合自由能 ≤ -5 kcal·mol⁻¹ (1 cal \approx 4.184 J),有25个成分与STAT6的结合自由能 ≤ -5 kcal·mol⁻¹,其中甘草次酸、小檗碱与JAK1的结合亲和力最强,结合自由能分别为-9.6 kcal·mol⁻¹和-9.1 kcal·mol⁻¹,初步结合模型通过PyMOL软件进行可视化。见增强出版附加材料。

3.6 JAK1-甘草次酸和JAK1-小檗碱复合体系的结合稳定性分析 分子动力学(MD)模拟显示,两复合体系模拟前期即可达到收敛,JAK1持续处于低柔性稳定状态,未发生解离。JAK1-甘草次酸和JAK1-小檗碱结合自由能分别为(-25.18 \pm 0.81) kcal·mol⁻¹、(-27.39 \pm 0.85) kcal·mol⁻¹,以范德华能和静电能为主要贡献能。氢键是小分子和蛋白结合过程中最强的非共价作用力之一,监测结果显示,JAK1-Enoxolone形成的氢键数目在0~5个内,多数时间可维持在2~3个,氢键是JAK1-甘草次酸动态稳定结合的重要作用力。经PyMOL软件可视化显示,JAK1-甘草次酸和JAK1-小檗碱复合物模拟前后构象基本一致,蛋白重叠度高,JAK1-甘草次酸结合位点位于由氨基酸VAL-23、LEU-15、LEU-93、LEU-144、SER-97、GLU-100、LYS-99、ARG-141、

GLU-17构成的口袋中, JAK1-小檗碱结合位点位于由氨基酸 LYS-22、LYS-42、ASP-155、ARG-141、LEU-158、GLY-157、ASP-55、PHE-20构成的口袋中。见增强出版附加材料。

3.7 IL-4 诱导可成功构建 M2 巨噬细胞模型 通过加入 IL-4(20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 细胞因子诱导 RAW264.7 巨噬

细胞 M2 极化, Real-time PCR 和 Western blot 结果显示, 与空白组比较, M2 模型组细胞的标志物 Arg1、Fizz1 和相关细胞因子 IL-10、TGF- β 、PDGFB 表达水平明显升高 ($P<0.05$), 证实 IL-4 可成功诱导 RAW264.7 巨噬细胞向 M2 型极化, 构建 M2 型巨噬细胞模型。见表 5。

表 5 IL-4 诱导对 RNW264.7 巨噬细胞 M2 表型和相关细胞因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of IL-4 induction on RNW264.7 macrophage phenotype and mRNA expression of related cytokines ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Arg1	Fizz1	IL-10	TGF- β	PDGFB
空白组		1.004 \pm 0.109 ¹⁾	1.009 \pm 0.154 ¹⁾	0.408 \pm 0.073 ¹⁾	0.265 \pm 0.056 ¹⁾	0.735 \pm 0.121 ¹⁾
M2 模型组	20	92.950 \pm 6.094	2.739 \pm 0.649	0.866 \pm 0.084	0.707 \pm 0.117	1.941 \pm 0.216

3.8 甘草次酸和小檗碱可降低 M2 巨噬细胞活力

CCK-8 检测结果显示, 与空白组比较, 10~60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草次酸对细胞活力影响无统计学意义, 80~100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草次酸可使细胞活力明显降低 ($P<0.05$); 与空白组比较, 10~20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱对细胞活力无显著影响, 40~100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱可使 M2 巨噬细胞活力明显降低 ($P<0.05$)。因此, 本研究采用 60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草次酸和 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱进行后续实验。见表 6。

表 6 不同浓度甘草次酸和小檗碱对 M2 型巨噬细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of gradient concentrations of enoxolone and berberine on macrophage viability ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	甘草次酸	小檗碱
空白组		100.00 \pm 15.90	100.00 \pm 14.19
给药组	20	89.11 \pm 12.01	92.18 \pm 12.05
	40	70.87 \pm 19.20	32.15 \pm 12.25 ¹⁾
	60	74.40 \pm 21.91	15.02 \pm 4.08 ¹⁾
	80	43.46 \pm 11.38 ¹⁾	6.30 \pm 1.57 ¹⁾
	100	14.64 \pm 6.88 ¹⁾	2.40 \pm 0.64 ¹⁾

注: 与 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较¹⁾ $P<0.05$

3.9 甘草次酸和小檗碱下调巨噬细胞 M2 极化关键调控因子 p-JAK1、p-STAT6 水平 Western blot 检测结果显示, 与空白组比较, 模型组 p-JAK1、p-STAT6 蛋白水平明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 甘草次酸组和小檗碱组 p-JAK1、p-STAT6 蛋白水平明显降低 ($P<0.05$)。见表 7、表 8、图 4。

4 讨论

团队长期从事中医肝病研究, 基于首届全国名中医、著名温病专家张之文教授临床经验, 结合肝纤维化正虚络阻共性病机, 以扶正通络为基本治法, 创制了芪甲柔肝方用于肝纤维化治疗。方中黄芪、

表 7 甘草次酸下调巨噬细胞 M2 极化通路分子 p-JAK1、p-STAT6 水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

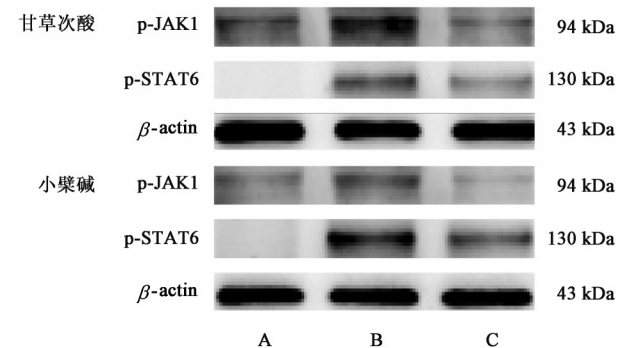
Table 7 Enoxolone down-regulates levels of macrophage M2 polarization pathway molecules p-JAK1 and p-STAT6 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	p-JAK1/ β -actin	p-STAT6/ β -actin
空白组		0.211 \pm 0.047 ¹⁾	0.005 \pm 0.004 ¹⁾
M2 模型组		0.985 \pm 0.201	0.838 \pm 0.163
甘草次酸组	60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.261 \pm 0.109 ¹⁾	0.320 \pm 0.094 ¹⁾

表 8 小檗碱下调巨噬细胞 M2 极化通路分子 p-JAK1、p-STAT6 水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Berberine down-regulates levels of macrophage M2 polarization pathway molecules p-JAK1, p-STAT6 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	p-JAK1/ β -actin	p-STAT6/ β -actin
空白组		0.290 \pm 0.066 ¹⁾	0.007 \pm 0.003 ¹⁾
M2 模型组		0.724 \pm 0.118	1.053 \pm 0.123
小檗碱组	20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.191 \pm 0.110	0.442 \pm 0.021 ¹⁾



注: A. 空白组; B. M2 模型组; C. 给药组

图 4 甘草次酸和小檗碱分别下调 p-JAK1 和 p-STAT6 的蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-JAK1 and p-STAT6 regulated by Enoxolone and Berberine, respectively

当归益气养血通络; 鳖甲滋阴散结, 搜剔通络; 桃仁、红花活血化痰通络; 三棱、莪术行气破血, 缓急

通路。前期随机对照试验(RCT)临床研究已证实该方抗肝纤维化的有效性^[8],实验研究也证实该方可显著改善肝纤维化大鼠肝组织ECM沉积^[7,11],其具体分子机制和效应成分值得深入探索。

巨噬细胞M2极化参与了多种器官的纤维化过程^[23-25],在慢性乙型肝炎患者中,随着肝纤维化的进展,M2巨噬细胞的浸润显著增加^[26]。M2巨噬细胞通过释放促纤维化因子,可多途径激活肝星状细胞(HSCs),合成分泌大量胶原蛋白,最终导致ECM过度沉积,因此,抑制巨噬细胞M2极化改善ECM沉积是治疗肝纤维化的重要策略之一^[27]。本研究结果显示,肝纤维化大鼠肝组织胶原纤维容积、纤维化标志物含量、M2巨噬细胞比例及相关细胞因子水平IL-10、TGF- β 、PDGFB等均显著升高,芪甲柔肝方治疗可显著改善上述异常,表明芪甲柔肝方可抑制巨噬细胞M2极化,从而改善肝组织ECM沉积。JAK1/STAT6信号通路是调节巨噬细胞M2极化的关键信号通路^[15],体外IL-4与IL-4R α 结合激活JAK1磷酸化,p-JAK1进一步诱导STAT6磷酸化,使其进入细胞核与核受体PPAR γ 结合,从而介导巨噬细胞M2极化^[28-31]。本研究结果表明,芪甲柔肝方对巨噬细胞M2极化的抑制作用与调控p-JAK1、p-STAT6水平有关,因此,通过抑制JAK1、STAT6磷酸化调控巨噬细胞M2极化可能是芪甲柔肝方的重要作用环节。

明确方药关键效应成分及相关作用靶点,对于揭示药效物质基础、优化方药和新药研发具有重要意义。本研究进一步借助血清药理学分析、计算机模拟、细胞实验等方法,明确了芪甲柔肝方的关键效应成分及其作用靶点。本研究筛选出29个芪甲柔肝方药物成分,并分别与JAK1、STAT6对接,发现甘草次酸、小檗碱与JAK1的结合亲和力最强。甘草次酸通常由甘草酸经肠道细菌代谢而来,是甘草的主要代谢产物。现代研究表明,甘草次酸具有抗氧化、抗炎、抗病毒、抗癌等活性,可一定程度上改善肝纤维化^[32-34]。ZHANG等^[35]发现,甘草次酸可通过靶向过氧化物还原酶(PRX)1和PRDX2诱导HSCs凋亡,从而改善肝纤维化。ZONG等^[36]发现,甘草次酸的抗肝纤维化作用与抑制TGF- β ₁/Smad信号通路和HSCs胶原蛋白分泌有关。小檗碱是一种常见的异喹啉生物碱,广泛存在于黄连、黄柏、莪术、姜黄等多种草药中,具有保肝、降脂、抗糖尿病、抗癌等活性。研究已证实小檗碱是一种潜在的抗肝纤维化药物,LI等^[37]发现小檗碱的抗肝纤维化作

用与激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、阻断还原型辅酶II氧化酶4(Nox4)和蛋白激酶B(Akt)的表达有关。EISSA等^[38]发现小檗碱通过抗氧化作用保护肝纤维化大鼠免受活性氧(ROS)诱导的肝细胞凋亡,同时抑制Akt磷酸化诱导HSCs凋亡。YI等^[39]发现小檗碱可诱导亚铁氧化还原,激活ROS介导的HSCs铁死亡,从而减轻肝纤维化。此外,小檗碱的抗肝纤维化作用还与调节脂质代谢和肠道菌群有关^[40]。综上,甘草次酸和小檗碱均是潜在的抗肝纤维化药物,结合本研究发现甘草次酸和小檗碱是芪甲柔肝方的重要活性成分,可与巨噬细胞M2极化关键调控因子JAK1、STAT6相互作用,推测甘草次酸和小檗碱是芪甲柔肝方调控巨噬细胞M2极化的关键效应成分,不仅进一步揭示芪甲柔肝方抗肝纤维化的关键物质基础,并为单体联合应用抗肝纤维化研究提供思路。

JAK1属于酪氨酸激酶家族成员之一,通常由7个同源结构域(JH1~JH7)组成,JH1结构域被称为激酶区,其包含了酪氨酸激酶发挥活性所必需的几个酪氨酸残基,亦是三磷酸腺苷(ATP)活性位点所在结构域,负责底物磷酸化,JAK1抑制剂通常与ATP位点结合抑制JAK1磷酸化激活,从而破坏下游级联反应,阻碍疾病相关基因转录^[41]。本研究通过分子动力学模拟获得了JAK1-甘草次酸和JAK1-小檗碱的稳定模型,且两者结合位点均位于JH1结构域的ATP区域,因此笔者推测甘草次酸、小檗碱通过靶向JAK1的ATP位点抑制其自身磷酸化,使下游转录因子STAT6的磷酸化激活失败,从而阻碍巨噬细胞M2极化。为证实这一推测,本研究进一步使用甘草次酸和小檗碱体外干预IL-4诱导的巨噬细胞M2极化过程,结果显示两者均能显著抑制IL-4诱导引起的JAK1、STAT6磷酸化。基于此,笔者认为甘草次酸和小檗碱是芪甲柔肝方调控巨噬细胞M2极化改善肝纤维化的关键效应成分,其调控主要通过靶向性抑制JAK1/STAT6信号通路实现(见增强出版附加材料)。

综上,本研究揭示了芪甲柔肝方发挥药效的关键物质基础,明确了该方及其主要效应成分抗肝纤维化的关键信号通路和作用靶点,可为进一步的处方优化、临床应用及抗肝纤维化新药研发提供依据。此外,甘草次酸和小檗碱对JAK1/STAT6的靶向抑制作用可为单体的抗肝纤维化研究提供新思路。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GINÈS P, CASTERA L, LAMMERT F, et al. Population screening for liver fibrosis: Toward early diagnosis and intervention for chronic liver diseases[J]. *Hepatology*, 2022, 75(1):219-228.
- [2] MOON A M, SINGAL A G, TAPPER E B. Contemporary epidemiology of chronic liver disease and cirrhosis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020, 18(12):2650-2666.
- [3] FRIEDMAN S L, PINZANI M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future[J]. *Hepatology*, 2022, 75(2):473-488.
- [4] 中国中西医结合协会肝病分会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南(2023年版)[M]. 北京:中国中西医结合协会, 2023. Sub-committee of Liver Diseases, Chinese Association of Integrative Medicine. Guidelines for integrated Chinese and Western Medicine Diagnosis and Treatment of Liver Fibrosis (2023 Edition) [M]. Beijing: Chinese Association of Integrative Medicine, 2023.
- [5] LI Z, ZHU J, OUYANG H. Research progress of traditional Chinese medicine in improving hepatic fibrosis based on inhibiting pathological angiogenesis [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1303012.
- [6] LI W Q, LIU W H, QIAN D, et al. Traditional Chinese medicine: An important source for discovering candidate agents against hepatic fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 962525.
- [7] 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):5. 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):5.
- [8] 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. LI B X, WANG X, LIU J B, et al. Efficacy of Qijia Rougan decoction combined with entecavir in staged 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]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2026, 32(9):180-188.
- [9] LI G Y, LI B X, SONG H F, et al. The active ingredients and potential mechanism of Qijia Rougan decoction in autophagy and hepatic stellate cell activation modulation in liver fibrogenesis[J]. *J Anal Methods Chem*, 2025, 2025:4646858.
- [10] 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.
- [11] 姜岑, 宋虹霏, 王东, 等. 基于 IKK β /NF- κ 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 β /NF- κ B pathway [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(8):4805-4809.
- [12] 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. LIU J, XU X Y, LIU J B, et al. Mechanism of Qijia Rougan decoction and its disassembled prescriptions on regulation of VEGF/SRF/c-FOS pathway and improvement of hepatic sinusoidal capillarization in rats with hepatic fibrosis [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2024, 49(20):5528-5538.
- [13] WANG C, MA C, GONG L, et al. Macrophage polarization and its role in liver disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 803037.
- [14] JIMÉNEZ-GARCÍA L, HIGUERAS M Á, HERRANZ S, et al. A hispanolone-derived diterpenoid inhibits M2-macrophage polarization *in vitro* via JAK/STAT and attenuates chitin induced inflammation *in vivo* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 154:373-383.
- [15] MA S, LIU M, XU Z, et al. A double feedback loop mediated by microRNA-23a/27a/24-2 regulates M1 versus M2 macrophage polarization and thus regulates cancer progression [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12):13502-13519.
- [16] YANGUAS S C, COGLIATI B, WILLEBRORDS J, et al. Experimental models of liver fibrosis[J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(5):1025-1048.
- [17] 文志萍, 秦冬梅, 曹文江, 等. 四氯化碳皮下注射制备大鼠肝纤维化模型的建立[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(12):2849-2851. WEN Z P, QIN D M, CAO W J, et al. Establishment of the rat liver fibrosis model by subcutaneous injection of CCl₄ [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2011, 22(12):2849-2851.
- [18] 周贤, 刘翼, 夏国栋, 等. 肝纤维化动物模型探讨[J]. *四川动物*, 2010, 29(1):114-115, 119. ZHOU X, LIU Y, XIA G D, et al. Research on the animal model of hepatic fibrosis [J]. *Sichuan J Zool*, 2010, 29(1): 114-115, 119.
- [19] 郭迎超, 梁爽, 周波. 中药含药血清制备的思考与探讨[J]. *云南中医中药杂志*, 2021, 42(9):51-55. GUO Y C, LIANG S, ZHOU B. Thoughts and discussions on the preparation of drug-containing serum of traditional Chinese medicine [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*, 2021, 42(9):51-55.
- [20] 张君涛, 王平, 刘爱峰, 等. 中药含药血清制备方法的研究概述[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(11):4006-4009. ZHANG J T, WANG P, LIU A F, et al. Overview about preparation methods of serum containing Chinese medicine [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2015, 30(11):4006-4009.
- [21] NGUYEN N T, NGUYEN T H, PHAM T, et al. Autodock vina adopts more accurate binding poses but autodock4 forms better binding affinity [J]. *J Chem Inf Model*, 2020, 60(1):

- 204-211.
- [22] SALOMON-FERRER R, CASE D A, WALKER R C. An overview of the Amber biomolecular simulation package[J]. *Wires Comput Mol Sci*, 2013, 3(2):198-210.
- [23] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9):6425-6440.
- [24] SHEN B, LIU X, FAN Y, et al. Macrophages regulate renal fibrosis through modulating TGF- β superfamily signaling[J]. *Inflammation*, 2014, 37(6):2076-2084.
- [25] ZHOU D, YANG K, CHEN L, et al. Macrophage polarization and function: New prospects for fibrotic disease[J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95(10):864-869.
- [26] XI S, ZHENG X, LI X, et al. Activated hepatic stellate cells induce infiltration and formation of CD163⁺ macrophages via CCL2/CCR2 pathway[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8:627927.
- [27] LIU P, LI H, GONG J, et al. Chitooligosaccharides alleviate hepatic fibrosis by regulating the polarization of M1 and M2 macrophages[J]. *Food Funct*, 2022, 13(2):753-768.
- [28] 王璐, 杨瑞, 张莹莹, 等. Kir2. 1 在 LPS 或 IL-4 诱导的巨噬细胞 M1/M2 型极化中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(3):385-393.
- WANG L, YANG R, ZHANG Y Y, et al. Role of Kir2. 1 in M1/M2 polarization of macrophages induced by LPS or IL-4[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(3):385-393.
- [29] 郝瑾, 朱子鑫, 吕小岩, 等. JNK 通路对 M2 巨噬细胞极化及其肿瘤效应的影响[J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(4):1-7.
- HAO J, ZHU Z X, LV X Y, et al. Effects of JNK pathway on polarization and pro-tumor function of M2 macrophage[J]. *Chin J Biotechnol*, 2018, 38(4):1-7.
- [30] 韩洁, 李舜颖, 李倩, 等. IL-4 激活的巨噬细胞通过分泌 CCL18 促进 HeLa 细胞侵袭和迁移[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2017, 38(1):49-55.
- HAN J, LI S Y, LI Q, et al. IL-4 activated macrophages promote HeLa cell migration and invasion by producing CCL18[J]. *J Sun Yat-sen Univ: Med Sci*, 2017, 38(1):49-55.
- [31] HAN X, HU J, ZHAO W, et al. Hexapeptide induces M2 macrophage polarization via the JAK1/STAT6 pathway to promote angiogenesis in bone repair[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 413(1):113064.
- [32] LUO Y H, WANG C, XU W T, et al. 18 β -glycyrrhetic acid has anti-cancer effects via inducing apoptosis and G₂/M cell cycle arrest, and inhibiting migration of A549 lung cancer cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14:5131-5144.
- [33] HUO X, MENG X, ZHANG J, et al. Hepatoprotective effect of different combinations of 18 α - and 18 β -glycyrrhizic acid against CCl₄-induced liver injury in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122:109354.
- [34] BAILLY C, VERGOTEN G. Glycyrrhizin: An alternative drug for the treatment of COVID-19 infection and the associated respiratory syndrome?[J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 214:107618.
- [35] ZHANG Q, LUO P, ZHENG L, et al. 18beta-glycyrrhetic acid induces ROS-mediated apoptosis to ameliorate hepatic fibrosis by targeting PRDX1/2 in activated HSCs[J]. *J Pharm Anal*, 2022, 12(4):570-582.
- [36] ZONG L, QU Y, XU M Y, et al. 18 α -glycyrrhetic acid down-regulates expression of type I and III collagen via TGF- β ₁/Smad signaling pathway in human and rat hepatic stellate cells[J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9(5):370-379.
- [37] LI J, PAN Y, KAN M, et al. Hepatoprotective effects of berberine on liver fibrosis via activation of AMP-activated protein kinase[J]. *Life Sci*, 2014, 98(1):24-30.
- [38] EISSA L A, KENAWY H I, EL-KAREF A, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine attenuate hepatic fibrosis induced by thioacetamide injection in rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 294:91-100.
- [39] YI J, WU S, TAN S, et al. Berberine alleviates liver fibrosis through inducing ferrous redox to activate ROS-mediated hepatic stellate cells ferroptosis[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1):374.
- [40] LIU X, WANG L, TAN S, et al. Therapeutic effects of berberine on liver fibrosis are associated with lipid metabolism and intestinal flora[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:814871.
- [41] SERRA LÓPEZ-MATENCIO J M, MORELL B A, CASTAÑEDA S. JAK-STAT inhibitors for the treatment of immunomediated diseases[J]. *Med Clin (Barc)*, 2019, 152(9):353-360.

[责任编辑 顾雪竹]