



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.02.09

文章编号: 2095-1264(2025)02-0211-10

## 基于网络药理学及实验验证分析二至丸 抗肝纤维化的作用机制<sup>\*</sup>

钟晓宇<sup>1</sup>, 李 懿<sup>2,3</sup>, 陈星梅<sup>1</sup>, 刘琴文<sup>2,3</sup>, 樊奇灵<sup>2,3</sup>, 官道刚<sup>2,3</sup>, 罗柳婷<sup>1</sup>, 艾美雪<sup>1</sup>, 朱志博<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南方医科大学中西医结合医院, 广东 广州, 510315; <sup>2</sup>南方医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 广东 广州, 510515; <sup>3</sup>南方医科大学广东省单细胞技术与应用重点实验室, 广东 广州, 510515)

**摘要: 目的** 基于网络药理学及实验分析验证二至丸(EZP)治疗肝纤维化的核心功能成分群(CFCG)及潜在通路。**方法** 通过TCMSP数据库和相关文献搜集二至丸的化学成分,使用PreADMET、Similarity Ensemble Approach和SwissTargetPrediction等网站筛选其潜在活性成分并预测靶点。通过GeneCards、DisGeNET及STRING等网站搜集肝纤维化的致病基因并构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,通过Cytoscape 3.9.1构建肝纤维化的权重基因网络。通过建立新的模型来构建功能效应空间(FES),计算成分累积贡献率得到CFCG,最后进行GO和KEGG通路富集分析。体外培养人肝星状细胞LX-2,设置空白组(不加TGF- $\beta$ 1)、对照组(20 ng·mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1)和化合物组(0、6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>),CCK-8实验检测化合物对细胞活力的影响,qPCR实验检测化合物对LX-2细胞中I型胶原A1(COL1A1)表达的影响,Western blotting验证潜在治疗机制。**结果** 分析得到的CFCG共包含22个化合物,根据成分累积贡献率排名,选取前8个化合物进行CCK-8实验,在一定浓度内均无细胞毒性;qPCR结果显示,与TGF- $\beta$ 1相比,原儿茶酸、槲皮素、木犀草苷和木犀草素均能明显抑制COL1A1的表达。GO和KEGG分析及Western blotting验证发现,上述4种成分对PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、HIF1- $\alpha$ 的表达均有抑制作用。**结论** 原儿茶酸、咖啡酸、槲皮素、木犀草苷、木犀草素等是二至丸发挥抗肝纤维化作用的核心成分,其作用机制可能与调控PI3K-AKT、HIF1- $\alpha$ 等信号通路有关。

**关键词:** 肝纤维化; 二至丸; 网络药理学; 核心功能成分群; 机制

**中图分类号:** R96 **文献标识码:** A

## Network pharmacology and experimental validation analysis of the anti-liver fibrosis mechanisms of Erzhi Pill<sup>\*</sup>

ZHONG Xiaoyu<sup>1</sup>, LI Yi<sup>2,3</sup>, CHEN Xingmei<sup>1</sup>, LIU Qinwen<sup>2,3</sup>, FAN Qiling<sup>2,3</sup>, GUAN Daogang<sup>2,3</sup>, LUO Liuting<sup>1</sup>,

AI Meixue<sup>1</sup>, ZHU Zhibo<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Southern Medical University Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guangzhou, 510315, Guangdong, China; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, 510515, Guangdong, China; <sup>3</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Single Cell Technology and Application, Southern Medical University, Guangzhou, 510515, Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To verify the core functional component group (CFCG) and potential pathways of Erzhi Pill (EZP) in treating liver fibrosis based on network pharmacology and experimental analysis. **Methods** All chemical components of EZP were collected from TCMSP database and literature. The PreADMET, Similarity Ensemble Approach and SwissTargetPrediction were used to filter potential active components and predict targets. GeneCards, DisGeNET and STRING

<sup>\*</sup>基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515010412,2022A1515010121)。

作者简介:钟晓宇,女,硕士研究生,研究方向为临床药学。

<sup>\*</sup>通信作者:朱志博,男,研究员,研究方向为临床药学。

were used to collect pathogenic genes and construct protein-protein interactions (PPI) networks, and weighted gene networks were constructed by Cytoscape 3.9.1. A new model was built to construct the functional effect space (FES), and cumulative contribution rate (CCR) of components was then calculated to obtain CFCCG, and finally GO and KEGG pathway enrichment analyses were performed. The in vitro cultured human hepatic stellate cells (LX-2) cells were divided into the blank group (no TGF- $\beta$ 1 stimulation), the control group (20 ng·mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1 stimulation) and the compound groups (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>). CCK-8 assay was performed to detect the effects of the compounds on the viability of the cells, and qPCR assay was used to detect the effects of compounds on the expression of collagen type IA1 (COL1A1) in LX-2, and Western blotting assay to verify the potential therapeutic mechanism. **Results** The CFCCG of EZP contains a total of 22 compounds. According to their CCR ranking, the top eight compounds were selected for CCK-8 assay, and all of them were not cytotoxic within the tested concentration. The qPCR results showed that protocatechuic acid, quercetin, cynaroside, and luteolin significantly inhibited COL1A1 expression compared with TGF- $\beta$ 1-stimulated cells. GO and KEGG analysis and Western blotting validation revealed that these four compounds inhibited the expressions of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, and HIF1- $\alpha$ . **Conclusion** Protocatechuic acid, caffeic acid, quercetin, cynaroside and luteolin are the core components of EZP to exert anti-hepatic fibrosis effects, and its mechanism may be related to the regulation on PI3K-AKT and HIF1- $\alpha$  signaling pathways.

**Keywords:** Liver fibrosis; Erzhi Pill; Network pharmacology; Core functional component group; Mechanisms

## 0 前言

肝纤维化的形成是一个复杂的动态过程,其特点是细胞外基质的过度积累,若不及时干预,可进一步发展为肝硬化甚至肝癌<sup>[1]</sup>。目前尚无有效的抗肝纤维化药物获批上市,大部分药物仍在临床试验中。中药方剂用于治疗肝纤维化已有数千年历史,由于其多成分、多靶点、多通路的作用特点,在治疗肝纤维化方面具有独特的优势。二至丸(Erzhi Pill, EZP)是治疗肝病的经典中药方剂之一,其用于治疗肝病的记载可追溯到明代吴旻的《扶寿精方》<sup>[2]</sup>。本方由女贞子和墨旱莲按 1:1 的比例组成,可预防和治疗多种慢性肝病,如慢性肝炎、代谢紊乱性脂肪肝、药物性肝损伤及肝纤维化等<sup>[3]</sup>。现代药理学研究表明,二至丸具有抗氧化、抑制肝纤维化及降低各种转氨酶的作用,保肝抗肝纤维化作用确切。目前对二至丸药理作用机制的研究尚不深入,二至丸抗纤维化的核心功能成分群及其作用机制仍不清楚,采用传统方法难以揭示其成分、靶点与疾病之间的联系。近年来,网络药理学越来越多地应用于中药方剂的研究<sup>[4]</sup>。为了阐明二至丸治疗肝纤维化的核心功能成分群和作用机制,本研究构建了一个新的网络药理学模型,筛选二至丸的核心功能成分群,进一步通过 GO 和 KEGG 通路富集分析预测二至丸抗肝纤维化的潜在机制,并通过实验验证核心功能成分群的效果,检验所建立的模型的可靠性,从分子水平上揭示二至丸治疗肝纤维化的作用机制,为其优化和二次开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 细胞、药品与试剂

LX-2 细胞系由 Scott Friedman(美国纽约西奈山医学院)提供。原儿茶酸、槲皮素、咖啡酸、木犀草苷、木犀草素、对羟基苯甲酸、芹菜素、肉桂酸甲酯(均为 HPLC 级标准物质,纯度 $\geq 98\%$ )购自南京狄尔格医药科技有限公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 DMEM(1X)购自赛默飞世尔生化制品(北京)有限公司;CCK-8 试剂盒购自多津多实验室(日本);CoL1A1、ACTIN、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、HIF1- $\alpha$ 、HRP-山羊抗小鼠 IgG(H+L)和 HRP 山羊抗兔 IgG(H+L)等抗体购自 Cell Signaling Technology;青霉素、链霉素购自上海贝奥蒂姆;重组人转化生长因子  $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)购自 PeproTech;BCA 蛋白含量测定试剂盒购自碧云天生物技术公司。

### 1.2 仪器

全波长酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司);常温低速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);细胞计数仪(广州博大博聚科技有限公司);低温高速离心机(德国 Eppendorf);蛋白电泳系统(美国伯乐);超声波细胞破碎仪(美国 Sonics);蛋白质印迹转移系统(美国伯乐);Olympus 照相系统(日本 Olympus);实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 二至丸活性成分筛选及靶点预测** 检索 TCMSp (<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 数据库和相关文献, 搜集二至丸的化学成分。使用 PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>) 进行药代动力学属性预测, 筛选活性成分。通过 Open Babel Toolkit 将化合物转换为 SMILE 格式, 导入 Similarity Ensemble Approach、SwissTargetPrediction 等网站, 预测活性成分的靶基因, 将结果整合并删除重复项, 得到二至丸活性成分的潜在作用靶点。

**2.1.2 肝纤维化疾病靶点筛选** 以“liver fibrosis”为关键词, 在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 DisGeNET (<https://disgenet.com/>) 数据库中检索肝纤维化相关基因, 将两个数据库搜集的基因取交集作为肝纤维化的致病基因集。

**2.1.3 成分-靶点网络的构建** 将活性成分及靶点数据导入 Cytoscape 3.9.1, 使用 Network Analyzer 分析网络的拓扑参数, 进一步获得成分-靶点网络图。

**2.1.4 肝纤维化加权致病基因网络构建** 将 DisGeNET 中搜集的基因所对应的文献报道数进行归一化, 归一化后的值为该基因的文献权重。将 GeneCards 中搜集的基因所对应的相关系数进行归一化, 归一化后的值为该基因与疾病相关性的权重。将文献权重与疾病相关性权重高于中位数的致病基因映射到由 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 构建的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络中, 根据 Degree 参数筛选核心靶点, 并用 Cytoscape 3.9.1 进行可视化。

**2.1.5 功能效应空间 (function effect space, FES) 的构建及有效蛋白的评价** 计算网络中某个节点的重要性可以用来评估该节点在网络中的影响, 是网络分析中的一个关键步骤。因此, 本研究构建了一个新的模型和算法来计算每个节点的重要性, 具体如下:

$$N(v) = \sqrt[3]{\left[ \sum_{v, t \in V} \frac{d(v, t)}{n(n-1)} \right] \times \left[ \sum_i \alpha_{ij} \right] \times \left[ \frac{1}{\max_{s \in V} (d(v, s))} \right]}.$$

其中,  $N$  代表节点的重要性,  $V$  是网络中的节点集合, 节点  $v$  和节点  $t$  都属于  $V$  集合,  $d(v, t)$  是节点  $v$  到节点  $t$  的距离,  $n$  是网络中的节点数。  $\sum_i \alpha_{ij}$  是相邻矩阵第  $i$  行的数据之和。  $d(v, s)$  代表从节点  $v$  到节点  $s$  的距离。

根据上述算法得到的结果, 对网络中各节点的重要性得分进行排序, 并将其定义为  $J$ 。  $J =$

$$[J_1, J_2, J_3, \dots, J_{|V|}] = [N_{(V)_1}, N_{(V)_{s+1}}, N_{(V)_{s+2}}, \dots, N_{(V)_{s+n}}],$$

$$s \in [1, |V|] \text{ and } s + n = |V|. \text{ 对所有节点的重要性得分进行平均, 计算出平均值为 } \bar{J}. \text{ 选择重要性得分高于平均值的节点, 定义为 } R. \text{ FES} \in (R, R > \bar{J}),$$

$$\left( \bar{J} = \frac{J_1 + J_2 + J_3 + \dots + J_{|V|}}{|V|} \right).$$

FES 中的基因被定义为有效蛋白, 是从二至丸成分靶点和致病基因中筛选出来的一组基因。 FES 的构建有利于分析复杂网络和更好地筛选疾病相关的成分和基因。

**2.1.6 核心功能成分群的筛选** 本研究设计了一种新的算法来计算成分累积贡献率 (cumulative contribution rate, CCR), 以优化来自 FES 的潜在活性成分, 这些被选中的成分就是核心功能成分群 (core functional component group, CFCG)。

$$CCR_j = \frac{\text{unique}[S_{\text{COM1}} + S_{\text{COM2}} + S_{\text{COM3}} + \dots + S_{\text{COMj}}]}{S}$$

$$W = \text{COM}_{(CCR_j \leq 90\%)}$$

$$\text{CFCG} = W$$

其中,  $S$  代表 FES 中的所有基因,  $\text{COM}$  是 FES 中基因所对应的成分,  $\text{COM}_j$  代表第  $j$  个成分;  $S_{\text{COM}_j}$  代表 FES 中包含的与第  $j$  个成分对应的基因;  $W$  代表  $CCR < 90\%$  的成分。

**2.1.7 GO 功能和 KEGG 通路富集分析** 使用 R 4.2.2 对二至丸活性成分对应靶点、肝纤维化致病基因和 FES 中的有效蛋白进行 GO 和 KEGG 富集分析。 筛选条件选择  $P < 0.05$ , ggplot2 软件包和 Pathview 用于图形绘制, 并选择排名前 20 的 GO 条目及 KEGG 通路进行展示。

### 2.2 实验验证

**2.2.1 细胞培养** LX-2 细胞在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  孵箱中培养, 加入  $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素、 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素和  $10\%$  FBS, 用重组人 TGF- $\beta 1$  激活 LX-2 细胞 48 h。

**2.2.2 CCK-8 检测药物对细胞活力的影响** 将约  $1 \times 10^4$  个 LX-2 细胞接种到 96 孔板中, 细胞贴壁后弃旧培养基, 加入含不同浓度 (0、6.25、12.5、25、50、100、 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的原儿茶酸、槲皮素、咖啡酸、木犀草苷、木犀草素、对羟基苯甲酸、芹菜素、肉桂酸甲酯的完全培养基, 每组设 3 个复孔, 孵育 24 h 后弃旧培养基, 避光加入完全培养基与 CCK-8 (9:1), 每孔  $100 \mu\text{L}$ , 置于恒温培养箱中孵育 1 h, 使用酶标仪检测  $450 \text{ nm}$  波长处光密度 (optical density, OD)。

**2.2.3 Western blotting 检测蛋白表达** 使用 RIPA 裂解缓冲液从 LX-2 细胞中提取蛋白质, BCA 蛋白

质分析试剂盒定量。制备聚丙烯酰胺凝胶,电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4 ℃孵育过夜,所用一抗分别为 PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、AKT(1:1 000)、p-AKT(1:2 000)、HIF1- $\alpha$ (1:1 000),TBST 冲洗 3 次,每次 10 min。加入二抗室温孵育 2 h,所用二抗为 HRP-山羊抗小鼠 IgG(H+L)(1:2 000)和 HRP 山羊抗兔 IgG(H+L)(1:2 000),TBST 冲洗 3 次,每次 10 min。最后使用 ECL 发光液进行显影,Bio-Rad ChemiDoc XRS+成像系统进行分析。

**2.2.4 qPCR 检测 COL1A1 mRNA 表达** 用 RNA 提取试剂盒提取 LX-2 细胞总 RNA,经纯度分析和总 RNA 含量计算,逆转录获得 cDNA,-20 ℃保存,qPCR 检测 COL1A1 mRNA 表达。

## 2.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析,数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 二至丸的成分检索和活性成分筛选

从 TCMS 数据库中检索到 182 个化学成分,其中女贞子 125 个,墨旱莲 57 个。以女贞子、墨旱莲和二至丸为关键词检索文献,分别检索到 11、15 和 5 个成分(表 1),然后通过药代动力学属性筛选二至丸的活性成分,最后经过统计确定 100 个潜在活

表 1 从文献中检索的二至丸的化学成分  
Tab. 1 Collection of components of EZP from literature

| 方剂/中药 | 化学成分                                         | 方法           | 浓度/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 参考文献 |
|-------|----------------------------------------------|--------------|--------------------------|------|
| 二至丸   | wedelolactone                                | HPLC         | 1.134 $\pm$ 0.156        | [5]  |
|       | luteolin                                     | HPLC         | 0.303 5 $\pm$ 0.231 5    | [5]  |
|       | oleonuezenide                                | HPLC         | 2.116 5 $\pm$ 0.718 5    | [5]  |
|       | echinacoside                                 | HPLC         | 0.370 $\pm$ 0.090        | [5]  |
|       | oleanolic acid                               | HPLC         | 0.494                    | [5]  |
| 墨旱莲   | apigenin-7-O-glucoside                       | RP-HPLC      | 0.647 $\pm$ 0.478        | [6]  |
|       | luteolin-7-O-glucoside                       | HPLC-Q-HR/MS | 0.379 3 $\pm$ 0.162 9    | [7]  |
|       | quercetin                                    | HPLC-Q-HR/MS | 0.006 0 $\pm$ 0.005 0    | [7]  |
|       | isoquercitrin                                | UPLC         | 1.325 $\pm$ 0.085        | [8]  |
|       | ecliptasaponin A                             | HPLC-Q-HR/MS | 0.107 3 $\pm$ 0.054 1    | [7]  |
|       | echinocystic acid-28-O- $\beta$ -D-glucoside | HPLC         | 17.835 $\pm$ 14.715*     | [9]  |
|       | linarin                                      | HPLC         | 5.402 $\pm$ 4.478        | [6]  |
|       | isochlorogenic acid C                        | HPLC         | 2.060 $\pm$ 0.060        | [8]  |
|       | chlorogenic acid                             | HPLC         | 0.160 $\pm$ 0.040        | [5]  |
|       | isochlorogenic acid B                        | UPLC         | 1.876 5 $\pm$ 1.867 5    | [10] |
|       | isodemethylwedelolactone                     | RP-HPLC      | 0.668 $\pm$ 0.440        | [11] |
|       | caffeic acid                                 | UPLC         | 0.258 $\pm$ 0.256        | [10] |
|       | protocatechuic acid                          | UPLC-ECD     | 0.305 $\pm$ 0.155        | [12] |
|       | cynaroside                                   | UPLC-ECD     | 0.740 $\pm$ 0.620        | [12] |
|       | isochlorogenic acid A                        | UPLC         | 1.395 $\pm$ 0.095        | [8]  |
| 女贞子   | betulin                                      | RP-HPLC      | 0.375 $\pm$ 0.055        | [13] |
|       | oleuropein                                   | HPLC         | 0.429                    | [14] |
|       | verbascoside                                 | HPLC         | 1.547 5 $\pm$ 0.692 5    | [5]  |
|       | rutin                                        | UPLC         | 3.460 $\pm$ 2.490        | [12] |
|       | nuezhenide                                   | HPLC         | 7.520 $\pm$ 4.07         | [15] |
|       | neonuezhenide                                | HPLC         | 0.830 $\pm$ 0.420        | [16] |
|       | ursolic acid                                 | HPLC         | 6.189 $\pm$ 0.547        | [17] |
|       | nuezhenoside G13                             | HPLC         | 1.034 7 $\pm$ 0.601 4    | [18] |
|       | specnuezhenide                               | HPLC         | 8.704 $\pm$ 3.546        | [19] |
|       | ligustroflavone                              | HPLC         | 0.615 5 $\pm$ 0.128 2    | [20] |
|       | nuezhenidic acid                             | HPLC         | 2.391 $\pm$ 1.587        | [5]  |

注:HPLC 为高效液相色谱法;RP-HPLC 为反相高效液相色谱法;HPLC-Q-HR/MS 为高效液相色谱-四极杆-高分辨质谱联用技术;UPLC 为超高效液相色谱法;UPLC-ECD 为超高效液相色谱-电化学检测器联用技术。

Note: HPLC is for high performance liquid chromatography; RP-HPLC is for reverse phase high performance liquid chromatography; HPLC-Q-HR/MS is for high performance liquid chromatography-quadrupole-high resolution mass spectrometry; UPLC is for ultra-performance liquid chromatography; UPLC-ECD is for ultra-performance liquid chromatography-electrochemical detector.

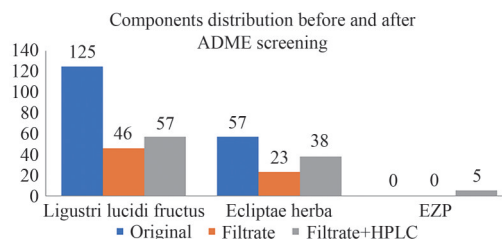
性成分(图1)。

### 3.2 加权致病基因调控网络的构建

在 GeneCards 数据库中检索到 6 167 个致病基因,相关系数高于中位数的基因有 3 087 个;在 DisGeNET 数据库中检索到 1 216 个致病基因,文献报道数高于中位数的基因有 547 个。将两者高于中位数的基因取交集并导入 STRING 网站,选择得分最高的前 200 个基因来构建加权基因调控网络(图 2A), Degree 值排名前 10 的基因分别是 CFTR、RTEL1、TGF- $\beta$  1、NPHP3、TMEM67、RPGRI1L、CC2D2A、TNF、SFT-PC、IFNG。将交集的基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,得到 4 552 个 GO 条目和 205 条信号通路,其中排名前 20 的 GO 条目和信号通路见图 2B、C。

### 3.3 成分-靶点网络的构建

使用 96 个潜在的活性成分和 1 129 个靶点中 Degree 值排名前 49 的靶点来构建成分-靶点(component-target, C-T)网络(图 3)。

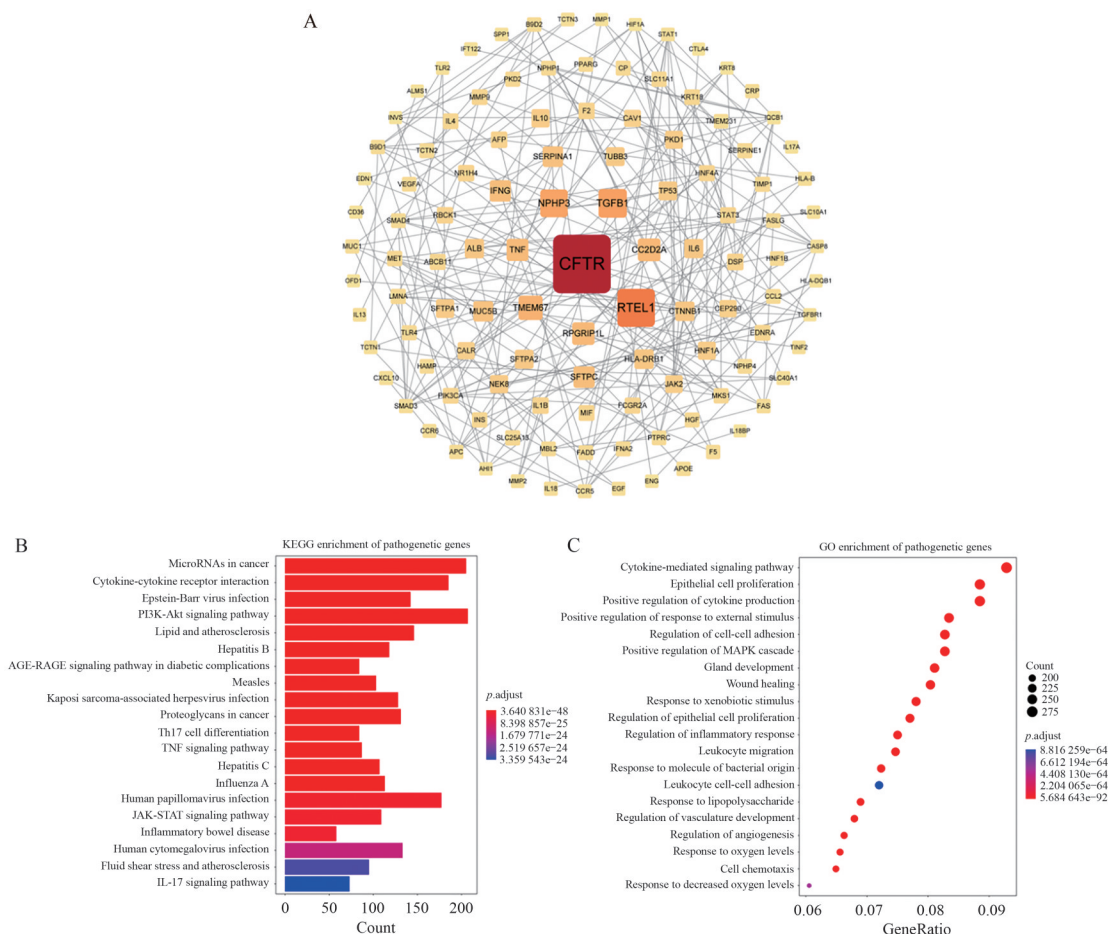


注:Original 表示 TCMSP 数据库中搜集的二至丸成分;Filtrate 表示药代动力学属性筛选后的二至丸的活性成分;Filtrate+HPLC 表示药代动力学属性筛选与文献报道的二至丸成分。ADME 表示吸收、分布、代谢、排泄。

Note: Original represents the components of EZP collected from the TCMSP database; Filtrate represents the active components of EZP after pharmacokinetic properties screening; Filtrate+HPLC represents the components after pharmacokinetic property screening combined with HPLC-reported components of EZP from the literature. ADME represents absorption, distribution, metabolism and excretion.

图 1 数据库和文献中搜集的二至丸的成分

Fig. 1 Number of components in EZP collected from databases and literature

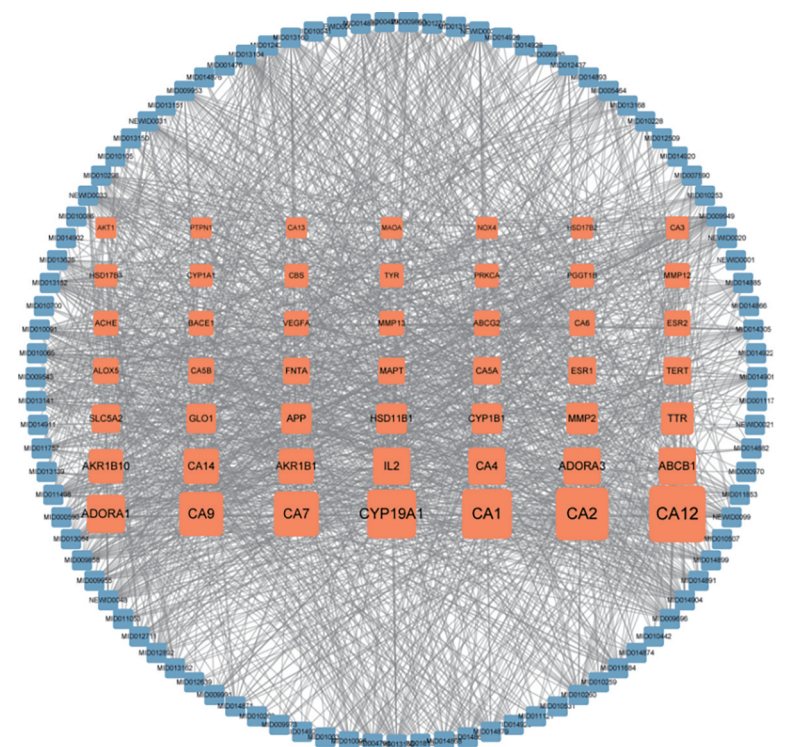


注:(A)致病基因的 PPI 网络;(B)致病基因 KEGG 通路富集分析;(C)致病基因 GO 生物学过程富集分析。

Note: (A)PPI network of pathogenic Genes; (B) KEGG enrichment analysis of pathogenic genes; (C) GO enrichment analysis of pathogenic genes.

图 2 致病基因的权重网络及功能分析

Fig. 2 Weight network and functional analysis of pathogenic genes



注:蓝色部分表示 96 个潜在活性成分;橙色部分表示按 Degree 值排序前 49 的靶点。

Note: The blue part represents 96 potential active components; The orange part represents the top 49 targets screened by degree value.

图 3 成分-靶点网络图

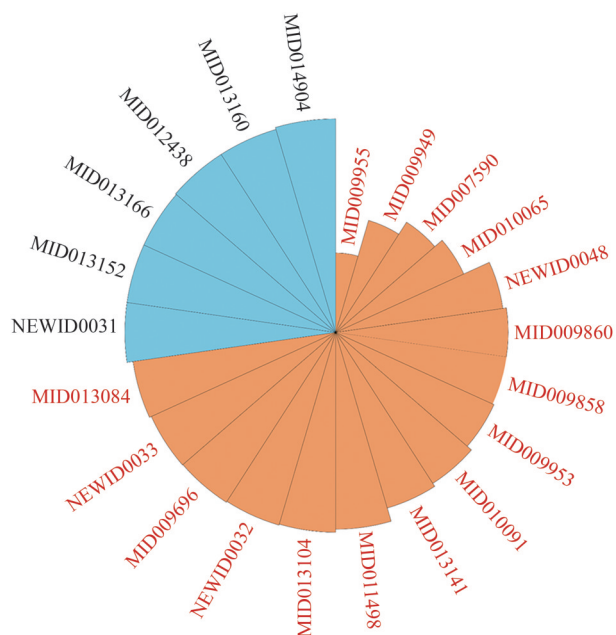
Fig. 3 Component-target network

### 3.4 基于 FES 的有效蛋白筛选及验证

将肝纤维化致病基因与二至丸成分靶点取交集,将其定义为未筛选的有效靶点(unfiltered effective target, UET),FES 中的靶点定义为有效蛋白。首先,对有效蛋白进行 KEGG 及 GO 富集分析。在 KEGG 分析中,有效蛋白富集的通路在二至丸成分靶点和肝纤维化致病基因富集的通路的覆盖率分别达 83.82% 和 71.22%;在 GO 分析中,有效蛋白富集的 GO 条目在二至丸成分靶点和肝纤维化致病基因富集的 GO 条目中覆盖率分别达到 76.06% 和 65.64%。进一步分析有效蛋白在 UETs 的 KEGG、GO 分析所得通路数量及条目中的比例。有效蛋白的 KEGG 富集通路为 179 条,GO 富集分析得到 2 563 项条目;UETs 的 KEGG 富集通路为 204 条,GO 富集分析得到 3 462 项条目。有效蛋白的 KEGG 富集通路占 UETs 富集通路的 87.75%,GO 富集条目占 UETs 富集条目的 74.03%。

### 3.5 CFCE 的筛选及机制推测

通过计算 CCR 筛选出含 22 个化合物的 CFCE (图 4)。其中,前 16 个成分可以覆盖 90% 的有效蛋白。同时,对 CFCE 进行 KEGG 富集分析,得到 156



注:MID 和 NEWID 代表活性成分,橙色部分代表 CCR 达 90% 的成分。

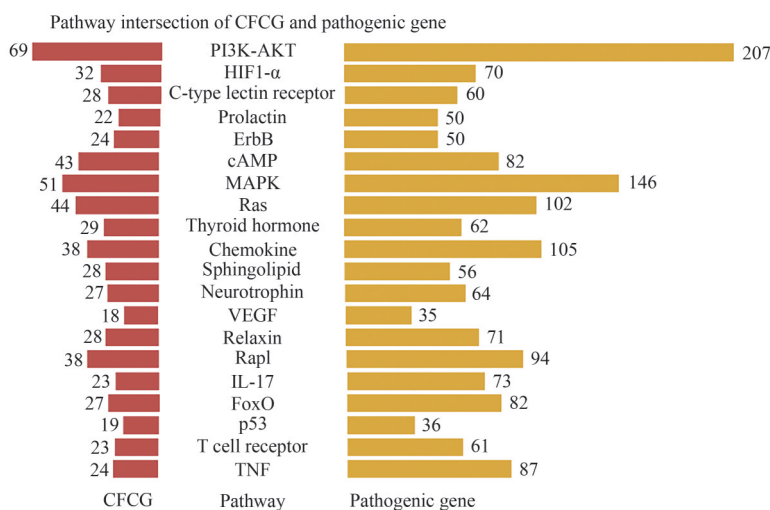
Note: MID and NEWID represent active components, the orange part represents the components with the cumulative contribution ratio of 90%.

图 4 二至丸核心功能成分群及其 CCR

Fig. 4 CFCE of EZP and its cumulative contribution ratio

条通路,可以覆盖 76.10% 的致病基因富集通路。进一步将 CFCG 与致病基因富集通路取交集,得到 137 条通路,富集基因数排名前 20 的通路见图 5。根据

富集基因数及通路研究进展,选择 PI3K-AKT 和 HIF1- $\alpha$  信号通路进行进一步研究,同时构建 PI3K-AKT、HIF1- $\alpha$  综合通路图(图 6)。

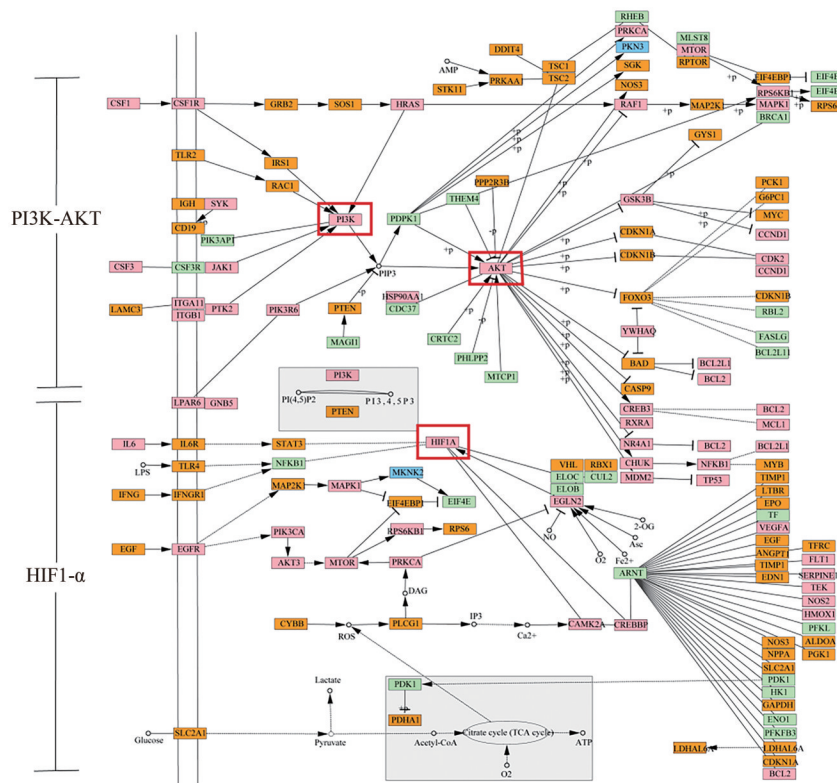


注:红色部分表示 CFCG 靶点在前 20 条通路上富集的基因数,黄色部分表示致病基因在前 20 条通路上富集的基因数。

Note: The red section represents number of genes enriched in the top 20 pathways for CFCG targets. The yellow section represents the number of genes enriched in the top 20 pathways for disease-associated genes

图 5 CFCG 与致病基因富集通路交集

Fig. 5 Pathway intersection of CFCG and pathogenic gene



### 3.6 CFCG 的细胞实验验证

为了验证本研究构建的模型,选取 CCR 排名前 8 的化合物,包括原儿茶酸、槲皮素、咖啡酸、木犀草苷、木犀草素、对羟基苯甲酸、芹菜素和肉桂酸甲酯,进行进一步实验。CCK-8 结果表明,与对照组相比,原儿茶酸、槲皮素、咖啡酸、木犀草苷、木犀草素、对羟基苯甲酸、芹菜素和肉桂酸甲酯作用于 LX-2 细胞 24 h 后,在一定浓度范围内均对细胞无明显毒性(图 7)。为了避免单体化合物本身对细胞产生影响,选择原儿茶酸(50、100、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、槲皮素(50、100、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、咖啡酸(50、100、200

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、木犀草苷(50、100、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、木犀草素(6.25、12.5、25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )进行后续实验。q-PCR 结果显示,与 TGF- $\beta$ 1 相比,原儿茶酸、槲皮素、咖啡酸、木犀草苷和木犀草素在一定浓度范围均能明显抑制肝纤维化标志基因 COL1A1 的表达(图 8)。Western blotting 结果显示,原儿茶酸、槲皮素、木犀草苷和木犀草素可不同程度地下调 PI3K、AKT、HIF1- $\alpha$  及其磷酸化蛋白的表达(图 9),提示包括原儿茶酸、槲皮素、木犀草苷、木犀草素等在内的 CFCG 的抗肝纤维化的作用机制可能与调控 PI3K-AKT、HIF1- $\alpha$  等信号通路有关。

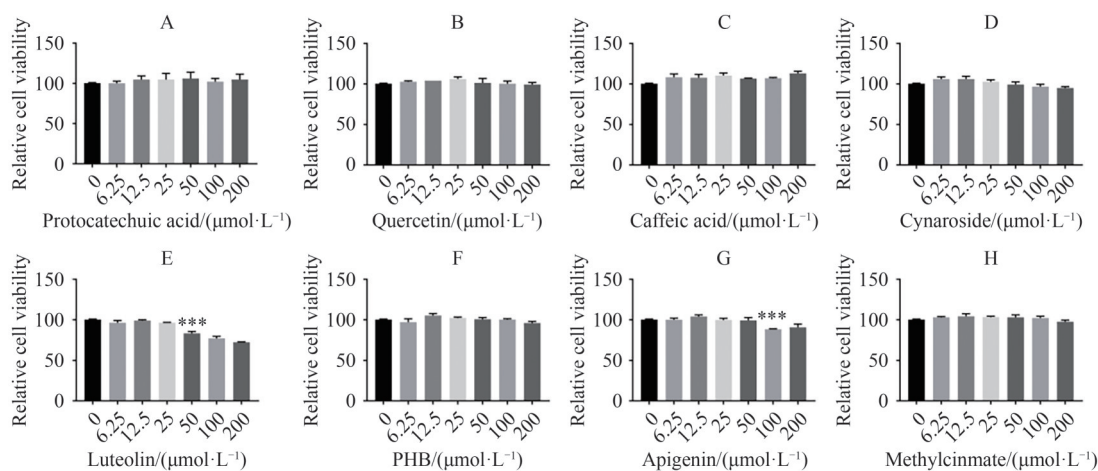


图 7 CCR 排名前 8 的化合物对 LX-2 细胞活力的影响

Fig. 7 Effects of the top 8 compounds in CCR on LX-2 cell viability

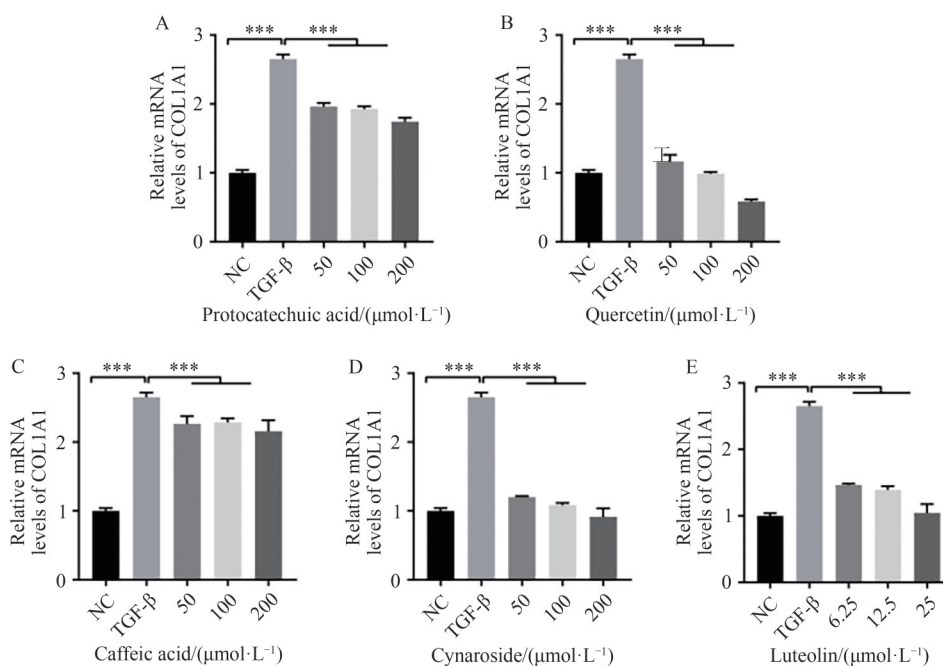


图 8 CCR 排名前 8 的化合物对 LX-2 细胞肝纤维化标志基因 COL1A1 表达的影响

Fig. 8 Effects of the top 8 CCR-ranked compounds on the expression of the liver fibrosis marker gene COL1A1 in LX-2 cells

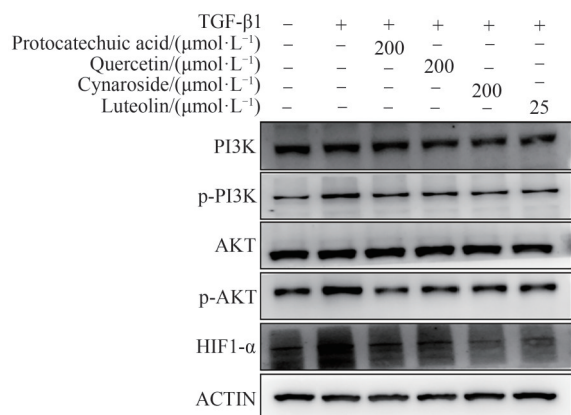


图9 原儿茶酸、槲皮素、木犀草苷、木犀草素对 LX-2 细胞中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、HIF1-α 蛋白表达的影响  
Fig. 9 Effects of protocatechuic acid, quercetin, cynaroside, and luteolin on the protein expression of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, and HIF1-α in LX-2 cells

## 4 讨论

肝纤维化是一种涉及多细胞、多通路的动态复杂病变,目前的生物和化学药物只作用于单一靶点,不仅疗效差,而且副作用大,而中医药因其多成分、多靶点、多通路的作用特点受到广泛关注。二至丸是治疗肝病的经典方剂,现代药理学研究表明其抗肝纤维化作用确切,但二至丸抗肝纤维化的 CFCG 及机制尚不明确。因此,本研究构建了一种新的网络药理学模型,分析得到了二至丸抗肝纤维化的 CFCG,并进一步通过富集分析及细胞实验预测并验证了这些核心功能成分抗肝纤维化的潜在作用机制。

首先,本研究设计了一种新的成分 CCR 计算方法,从所有潜在活性化合物中筛选得到 22 个成分并将其定义为 CFCG,其中贡献率排名前 16 个成分可覆盖 90% 的有效蛋白,体现出模型的可靠性。在筛选得到的 CFCG 中,有一些成分已有文献报道具有抗肝纤维化作用。例如,原儿茶酸具有抗氧化、抗炎和抗凋亡活性,对肝脏具有保护作用<sup>[21]</sup>;还有研究表明,原儿茶酸在体外和体内对化学诱导的肝纤维化有保护作用<sup>[22]</sup>。木犀草素表现出抗肝纤维化效果并已于抗肝纤维化药物的开发<sup>[23]</sup>,现代药理学研究表明,木犀草素能够通过靶向 AKT/mTOR/p70S6K 和 TGFβ/Smad 信号通路发挥抗肝纤维化作用<sup>[24]</sup>。槲皮素具有抗脂肪堆积、抗炎、抗氧化及抑制细胞凋亡和增殖的作用,通过多个靶点和多个途径显著影响肝脏疾病的发展,在抗肝纤维化中具有

良好的药理学活性<sup>[25]</sup>。上述研究结果表明,本研究筛选出的 CFCG 在二至丸抗肝纤维化作用中发挥着关键作用,进一步证实了模型的可靠性。

同时,本研究还进行了通路富集分析,进一步证实了筛选出的 CFCG 的准确性。PI3K-AKT 是所有类型细胞中普遍存在的信号通路,已有研究证实其与肝纤维化存在紧密联系,该通路被激活可刺激肝星状细胞活化,有助于肝纤维化的发展<sup>[26]</sup>。HIF-1α 信号通路在肝纤维化激活、增殖及分化过程中扮演着重要角色,有研究表明肝纤维化动物体内 HIF-1α 表达显著上调,上调幅度与肝纤维化的发生发展呈正相关<sup>[27]</sup>。

为了进一步验证结果的可靠性,本研究选择 CCR 排名前 8 的原儿茶酸、槲皮素、咖啡酸、木犀草苷、木犀草素、对羟基苯甲酸、芹菜素、肉桂酸甲酯进行细胞实验,结果显示这 8 种成分在一定浓度范围内均无明显的细胞毒性。q-PCR 结果显示,原儿茶酸、槲皮素、咖啡酸、木犀草苷和木犀草素均可显著抑制 COL1A1 mRNA 的表达,其中木犀草苷作用效果最明显。Western blotting 结果显示,原儿茶酸、槲皮素、木犀草苷和木犀草素可不同程度地下调 PI3K、AKT、HIF1-α 及其磷酸化蛋白的表达,这也证明了本研究筛选的 CFCG 的有效性和准确性。

综上所述,本研究通过构建新的网络药理学模型筛选出二至丸抗肝纤维化的 CFCG,并对二至丸抗肝纤维化的作用机制进行了分析及验证。包括原儿茶酸、槲皮素、咖啡酸、木犀草苷在内的 22 个化合物的 CFCG 在二至丸抗肝纤维化治疗中发挥了关键作用,可能是通过抑制 PI3K-AKT、HIF1-α 信号通路实现的。这些结果可在一定程度上对方剂进行优化,不仅为二至丸进一步的体内抗肝纤维化研究提供了理论依据,也为中医药治疗肝纤维化提供了新的线索与思路。

## 参考文献

- [1] FRIEDMAN S L, PINZANI M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future [J]. Hepatology, 2022, 75(2): 473-488. DOI: 10.1002/hep.32285.
- [2] HUANG S J, MU F, LI F, et al. Systematic elucidation of the potential mechanism of erzhi pill against drug-induced liver injury via network pharmacology approach [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 6219432. DOI: 10.1155/2020/6219432.
- [3] HUANG S J, MU F, LI F, et al. A network-based approach to explore the mechanism and bioactive compounds of erzhi pill against metabolic dysfunction-associated fatty liver

- disease [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 7867245. DOI: 10.1155/2020/7867245.
- [4] 黄泽萍, 邓亚胜, 杨瑞, 等. 基于网络药理学、分子对接技术及体外实验验证探讨黄芩汤治疗肝癌的作用机制[J]. 中医药导报, 2024, 30(8): 8-16. DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2024.08.002.
- [5] 孙乐, 张艳雪, 张学兰, 等. 女贞子的不同炮制品配伍对二至丸中 12 种成分含量的影响[J]. 中药材, 2020, 43(1): 56-60. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2020.01.012.
- [6] 马利, 易骏, 吴建国, 等. RP-HPLC 法同时测定不同产地墨旱莲中 6 个主要成分的含量[J]. 福建中医药, 2017, 48(4): 60-62. DOI: 10.13260/j.cnki.jfjtc.011472.
- [7] 李冰, 冯素香, 冯志毅, 等. 基于 HPLC-Q-HR/MS 技术及多成分含量识别的不同产地墨旱莲药材质量评价[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(6): 1329-1333. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.06.015.
- [8] 侯雪峰, 孙帅, 汪刚, 等. UPLC 同时测定墨旱莲药材中 8 种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3982-3987. DOI: 10.4268/cjcm.2016.21.16.
- [9] 赵晶, 夏明辉, 李莉, 等. UPLC-PDA 测定不同产地墨旱莲中的 4 种皂苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 63-66. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030063.
- [10] 曾荟, 邱韵静, 谭梓君, 等. 墨旱莲不同药用部位 UPLC 特征图谱及 5 种成分含量测定研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(9): 111-116. DOI: 10.19879/j.cnki.1005-5304.202111452.
- [11] 原红霞, 赵云丽, 王晓英, 等. 反相高效液相色谱法同时测定墨旱莲中的蟛蜞菊内酯和异去甲基蟛蜞菊内酯[J]. 色谱, 2007, 25(3): 371-373. DOI: 10.3321/j.issn:1000-8713.2007.03.018.
- [12] 淳泽利, 朱娅, 陈荣祥. UPLC-ECD 法同时测定不同产地女贞子中 9 种成分的含量[J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 305-311. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090005.
- [13] 张秋丰, 弓晓杰. 反相高效液相色谱法测定女贞子中桦木醇含量[J]. 大连工业大学学报, 2010, 29(1): 21-23. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1404.2010.01.007.
- [14] 谭乐俊, 王萌, 任晓亮, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的中药水蜜丸制剂二至丸多成分稳定性研究[J]. 中草药, 2016, 47(13): 2260-2268.
- [15] 郭丹, 陈晓辉, 李玫, 等. 反相高效液相色谱法测定女贞子中女贞子苷的含量[J]. 中南药学, 2010, 8(5): 362-364.
- [16] 陶益, 张畅, 李伟东, 等. 对照提取物法测定女贞子饮片中 4 种成分的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(33): 4685-4687.
- [17] 林雄浩, 吴岩斌, 高伟城, 等. 高效液相色谱法同时测定二至丸中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(6): 23-25.
- [18] 陈进芳, 翁育才. 3 种不同炮制方法对女贞子中 7 种化学成分变化的影响[J]. 中国现代中药, 2021, 23(7): 1260-1265. DOI: 10.13313/j.issn.1673-4890.20200618010.
- [19] 吴修红, 孙泽, 杨恩龙, 等. 酒女贞子 HPLC 指纹图谱的建立及多成分含量的测定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 273-277. DOI: 10.16155/j.0254-1793.2016.02.13.
- [20] 张炯怡, 王勇, 宋晓宁, 等. HPLC 法同时测定贵州不同产地女贞子中红景天苷、女贞苷、特女贞苷的含量[J]. 贵州医药, 2017, 41(10): 1038-1040. DOI: 10.3969/j.issn.1000-744X.2017.10.010.
- [21] HABIB S A, SUDDEK G M, ABDEL RAHIM M, et al. The protective effect of protocatechuic acid on hepatotoxicity induced by cisplatin in mice [J]. Life Sci, 2021, 277: 119485. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119485.
- [22] CUI B, YANG Z, WANG S N, et al. The protective role of protocatechuic acid against chemically induced liver fibrosis *in vitro* and *in vivo* [J]. Pharmazie, 2021, 76(5): 232-238. DOI: 10.1691/ph.2021.0909.
- [23] ZHOU Y, WU R, CAI F F, et al. Development of a novel anti-liver fibrosis formula with luteolin, licochalcone A, Aloe-emodin and acacetin by network pharmacology and transcriptomics analysis [J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 1594-1606. DOI: 10.1080/13880209.2021.1999275.
- [24] LI J, LI X X, XU W H, et al. Antifibrotic effects of luteolin on hepatic stellate cells and liver fibrosis by targeting AKT/mTOR/p70S6K and TGFβ/Smad signalling pathways [J]. Liver Int, 2015, 35(4): 1222-1233. DOI: 10.1111/liv.12638.
- [25] ZHAO X T, WANG J, DENG Y, et al. Quercetin as a protective agent for liver diseases: a comprehensive descriptive review of the molecular mechanism [J]. Phytother Res, 2021, 35(9): 4727-4747. DOI: 10.1002/ptr.7104.
- [26] ZHONG L, LIU H L, ZHANG H Q, et al. High starch in diet leads to disruption of hepatic glycogen metabolism and liver fibrosis in largemouth bass (*micropterus salmoides*), which is mediated by the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Front Physiol, 2022, 13: 880513. DOI: 10.3389/fphys.2022.880513.
- [27] CHU Q F, GU X Y, ZHENG Q X, et al. Regulatory mechanism of HIF-1α and its role in liver diseases: a narrative review [J]. Ann Transl Med, 2022, 10(2): 109. DOI: 10.21037/atm-21-4222.

校稿: 李征 于静

本文引用格式: 钟晓宇, 李懿, 陈星梅, 等. 基于网络药理学及实验验证分析二至丸抗肝纤维化的作用机制[J]. 肿瘤药 学, 2025, 15(2): 211-220. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.02.09.

Cite this article as: ZHONG Xiaoyu, LI Yi, CHEN Xingmei, et al. Network pharmacology and experimental validation analysis of the anti-liver fibrosis mechanisms of Erzhi Pill[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2025, 15(2): 211-220. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.02.09.