DOI:10.16016/j.2097-0927.202111049

丹参酮ⅡA治疗自身免疫性肝炎的网络分析及实验验证

郝健亨[1],李振城[1],孙薇丽[2] 030619 山西 晋中,山西中医药大学基础医学院中西医结合基础实验室[1];030619 山西 晋中,晋中市中医院风湿免疫科[2]

[摘要] **目的** 基于网络药理学方法分析丹参酮ⅡA(tanshinoneⅡA,TanⅡA)治疗自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis,AIH)的潜在靶点与通路之间关系,并通过实验验证TanⅡA治疗AIH的作用机制。**方法** 依托多个数据库检索筛选TanⅡA以及AIH的相关靶点基因,取药物和疾病的交集基因,借助String平台构建PPI网络,并对交集基因进行GO和KEGG通路富集分析。随后选择富集基因数最多信号通路通过动物实验进行验证,将小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组和TanⅡA治疗组,每组6只;建模完成后检测各组小鼠血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)的水平,并利用Western blot与qRT-PCR检测各组小鼠肝组织中PI3K、AKT和NF-κB蛋白及mRNA的表达。**结果** 从TanⅡA中筛选得出有效作用靶点208个,收集到AIH的靶点基因7 128个。两者得到174个交集基因靶点。KEGG通路分析指出多条信号通路参与AIH的发病,其中PI3K-AKT信号通路可能在TanⅡA治疗AIH中起重要作用。动物实验结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST水平均显著升高($P<0.05$),肝组织中PI3K、AKT mRNA和蛋白表达均显著降低($P<0.05$),NF-κB mRNA和蛋白表达均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,TanⅡA治疗组小鼠血清ALT、AST水平有不同程度减低($P<0.05$),肝组织中PI3K、AKT mRNA和蛋白表达均显著升高($P<0.05$),NF-κB mRNA水平和蛋白表达均显著降低($P<0.05$)。**结论** TanⅡA中包含许多可能直接靶向AIH相关信号通路的有效基因靶点,其中TanⅡA可能通过调节PI3K-AKT信号通路改善AIH小鼠肝脏炎症反应。

[关键词] 网络药理学;丹参酮ⅡA;自身免疫性肝炎;PI3K-AKT信号通路
[中图法分类号] R318.04;R285.5;R575.1 [文献标志码] A

Network analysis and experimental verification of tanshinone ⅡA in treatment of autoimmune hepatitis

HAO Jianheng[1], LI Zhencheng[1], SUN Weili[2] [1]Laboratory of Basic Integrative Chinese and Western Medicine, School of Basic Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi Province, 030619; [2]Department of Rheumatology and Immunology, Jinzhong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi Province, 030619, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze the relationship between potential targets and signaling pathways of tanshinone ⅡA (TanⅡA) in the treatment of autoimmune hepatitis (AIH) based on network pharmacological analysis, and verify the mechanism of TanⅡA on AIH by animal experiments. **Methods** The relevant gene targets of TanⅡA and AIH were searched and screened through multiple databases, and the intersection genes between the drug and the disease were selected. Protein-protein interaction (PPI) network was subsequently constructed with the help of String platform, and the intersection genes were enriched and analyzed by Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis. Then, the signaling pathway with the highest number of enriched genes was

[通信作者] 孙薇丽, E-mail:504499077@qq.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

verified through animal experiments. Eighteen C57BL/6 mice were equally and randomly divided into normal, model and Tan ⅡA treatment groups. The contents of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected, and the protein and mRNA expression levels of PI3K, AKT and NF-κB were measured by Western blotting and qRT-PCR respectively. **Results** There were 208 effective targets screened out from Tan ⅡA, and 7 128 target genes from AIH. A total of 174 intersection gene targets were obtained. KEGG pathway analysis indicated that multiple signaling pathways were involved in the pathogenesis of AIH, among which PI3K-AKT signaling pathway played an important role in Tan ⅡA treatment of AIH. In animal experiments, the model group had significantly higher contents of ALT and AST ($P<0.05$), reduced mRNA and protein levels of PI3K and AKT ($P<0.05$) and elevated mRNA and protein levels of NF-κB ($P<0.05$) than the control group. While, Tan ⅡA treatment resulted in decreased contents of ALT and AST ($P<0.05$), increased PI3K and AKT levels ($P<0.05$) and decreased NF-κB level ($P<0.05$) when compared with the model mice. **Conclusion** Tan ⅡA contains many effective genes that may directly target AIH-related signaling pathways, among which Tan ⅡA may ameliorate liver inflammation in AIH mice by regulating PI3K-AKT signaling pathway.

[**Key words**] network pharmacology; tanshinone ⅡA; autoimmune hepatitis; PI3K-AKT signaling pathway

Corresponding author: SUN Weili, E-mail: 504499077@qq.com

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis,AIH)是一种由肝细胞免疫介导的炎症疾病,其特征是肝实质进行性破坏和慢性纤维化,如果治疗不及时,后期会导致肝硬化,肝衰竭甚至死亡[1]。该病多发于欧美发达国家的女性当中,其发病率和流行率在当前世界范围内正在不断增加[2]。目前,AIH 的确切病因及发病机制尚不完全明确,皮质类固醇和细胞抑制药物为主的传统治疗手段导致的高复发率等副作用,让 AIH 的诊断和治疗仍面临巨大挑战[2-3]。丹参酮ⅡA(tanshinone ⅡA,Tan ⅡA)是从中药丹参提取的主要亲脂性化合物之一,具有多种药理作用。它主要通过抗炎、抗氧化、抗凋亡等作用来保护肝细胞,还能够通过抑制部分炎症信号通路,减轻肝脏的损伤[4],对多种肝脏疾病都表现出积极的治疗效果。

近些年来生物信息学和药理学的飞速发展,推动了新兴的网络药理学形成。它基于“疾病-基因-靶标-药物”相互作用网络,通过研究药物成分,然后预测靶标,分析途径,进而对疾病进行实验验证。它全面系统地阐述了药物对疾病网络的干预和影响,揭示“多靶点,多成分”对疾病的作用机制。因此,本研究将网络药理学与实验验证相结合,构建一个完整的系统网络来对 Tan ⅡA 治疗 AIH 的作用机制进行探讨,为临床上应用 Tan ⅡA 治疗 AIH 提供依据。

1 材料与方法

1.1 Tan ⅡA 靶点的收集

通过 Tcmsp 中药系统药理数据库(http://tcmspw.com/tcmsp.php),Genecards 数据库(https://www.genecards.org/),Stitch 数据库(http://stitch.embl.de/),Swiss Target Prediction 数据库(http://swisstargetprediction.ch/)进行检索,收集 Tan ⅡA 中所包含的靶点,并将这些靶点信息通过 Uniprot 网站(http://www.uniprot.org/)进行标准化转换,得到目标基因名称。

1.2 AIH 的基因检索

利用 Omim 数据库(https://www.omim.org/),GeneCards 数据库(https://www.genecards.org/)和 DisGeNET 数据库(http://www.disgenet.org/),选取“autoimmune hepatitis”为关键词进行检索,将 3 个数据库中符合疾病的基因汇总,去除其中的重复靶点,筛选得到最终 AIH 的相关靶点基因。

1.3 AIH 和 Tan ⅡA 交集基因的收集以及 PPI 网络构建

绘制 Venn 图,将 Tan ⅡA 与 AIH 的相关靶点基因进行比对,取交集部分为 Tan ⅡA 治疗 AIH 的靶点基因。将收集的交集基因靶点信息输入到 String 线上数据库(https://String-db.org/),选择物种为“Homo sapiens”,最高置信度设置为 0.9,隐藏 PPI 网络中游离的靶标基因,导出 tsv 相关信息文件,运用 Cytoscape 3.7.2 软件将文件转化为 PPI 网络图。

1.4 KEGG 通路和 GO 富集分析

将最终选出的 Tan ⅡA 治疗 AIH 的共有基因靶点,结合 R 语言,进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通

路富集和基因本体论(Gene Ontology,GO)富集分析。将校正 P 值≤0.05 的项目进行筛选,根据富集基因的校正 P 值来排序,选取排名在前的相关信号通路,使用 R 3.6.3 软件,安装利用相关 R 包,绘制柱状图和气泡图。

1.5 实验动物及主要试剂

1.5.1 实验动物 鼠龄 9~10 周的雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 18 只,体质量为(20±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证编号为 SCXK(京)2016-0006。将小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组和 TanⅡA 治疗组,每组 6 只。小鼠常规饲养,摄食自由,饲养环境适宜。

1.5.2 主要实验试剂 TanⅡA、ConA(索莱宝有限公司,中国北京);谷丙转氨酶测试盒、谷草转氨酶测试盒(建城生物研究所,中国南京);PI3K、AKT 和 NF-κB 抗体(博士德生物有限公司,中国武汉);引物序列见表 1。

表 1 引物序列与产物长度

引物名称	引物(5′→3′)	产物长度/bp
PI3K	上游:GCTTAACACAGAAGAAACCGTGA	71
	下游:TACACAGGAGCTCGGTTCCA	
AKT	上游:ACTCATTCCAGACCCACGAC	176
	下游:CCGGTACACCACGTTCTTCT	
NF-κB	上游:TCCCCCCAGAGACCTCATAGT	135
	下游:TGGAAATTCCTGATCCCGAC	
β-actin	上游:CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游:TTTAATGTCACGCACGATTTC	

1.6 实验方法

1.6.1 AIH 小鼠的模型建立及分组处理 正常组常规饲养;模型组常规饲养 1 周后,按 15 mg/kg 剂量给予尾静脉注射 Con A;TanⅡA 治疗组按照 30 mg/kg 剂量先腹腔预防性注射 TanⅡA,1 周后按 15 mg/kg 剂量给予尾静脉注射 Con A。各组小鼠于造模 8 h 后,先通过眶内取血收集各组小鼠静脉血并制备血清,后处死全部小鼠,取出肝脏组织,经液氮速冻后迅速转移至-80 ℃冰箱以保存备用。

1.6.2 肝组织病理学检测 取部分小鼠肝组织,OCT 包埋后用冰冻切片机切片,片厚为 5 μm,泡入丙酮约 20 min 进行固定,最后进行常规苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察各实验组小鼠肝脏病理学改变。

1.6.3 血清学指标检测 麻醉小鼠后,采用眼球取血的方法,每只小鼠取血 1 mL 左右,室温条件下静置 30 min 后分离血清根据试剂盒说明书进行检测,通过酶标仪测定各实验组小鼠血清中谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)和谷丙转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)水平。

1.6.4 肝组织荧光定量 PCR 技术检测 取各实验组小鼠肝组织各 50 mg,提取总 RNA。根据反转录试剂盒说明书要求,将相关试剂与 10 μL 总 RNA 均匀混合,进行反转录。反应条件:37 ℃×15 min,1 个循环;85 ℃×5 s,1 个循环。然后用 Real-time PCR 试剂盒相关试剂与 2 μL 反转录产物混合均匀,进行 PCR 扩增,反应条件为:95 ℃×30 s,1 次循环;95 ℃×5 s,60 ℃×34 s,40 个循环。最后根据 Real-time PCR 原始检测结果,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 相对定量公式计算并分析所得 PCR 结果。

1.6.5 Western blot 检测肝组织蛋白水平 先提取肝组织总蛋白,并测定总蛋白浓度。后配 10%胶后加入蛋白样品 15 μL 跑电泳,用湿转法转运蛋白至 PVDF 膜,2 h 后封闭,加一抗 4 ℃孵育过夜;第 2 天 TBST 洗膜,羊抗兔 IgG-HRP 二抗(浓度 1∶500)摇床孵育 1 h;TBST 洗膜 3×10 min 后滴加显影剂进行扫描显影,利用 ImageJ 软件分析结果。

1.7 统计学分析

实验数据连续性资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 GraphPad Prism 8 统计软件分析处理数据,两样本均数比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 TanⅡA 和 AIH 靶点信息的收集

基于 Tcmsp 数据库收集到 TanⅡA 中所包含的靶点 37 个,Genecards 数据库收集到 134 个,Stitchi 数据库收集到 8 个,Swiss Target Prediction 数据库收集到 47 个,通过 Uniprot 信息匹配并去除重复成分后,最终预测 TanⅡA 有效作用靶点为 208 个;将 Omim、Genecards 和 DisGeNET 3 个数据库中检索到的 AIH 疾病相关基因汇总并去重,共收集到 AIH 的相关基因 7 128 个。

2.2 TanⅡA 和 AIH 共同靶点基因的收集

通过在线 Venn 图设计网站(http://bioinfogp.cnb.Csic.es/tools/venny/)对 TanⅡA 和 AIH 共同靶点基因分析制图,共得到 174 个交集基因靶点(图 1)。将交集基因靶点输入在 String 数据库,把生成的含有节点信息的 TSV 文件通过 Cytoscape 软件构建靶点的 PPI 网络,其中包括节点 149 个,边线 755 条(在 String 数据库中设置最高置信度为 0.9,并隐藏无关联的节点,所以 25 个交集靶标基因未参与网络构建)。图中线条的粗细代表综合得分(combined scoer),线条越粗颜色越深(颜色由浅蓝到深红逐步加深),表示靶点间

的相互作用越紧密。节点的大小代表自由度,节点越大颜色越深,表示其在网络中的作用越重要,见图 2。

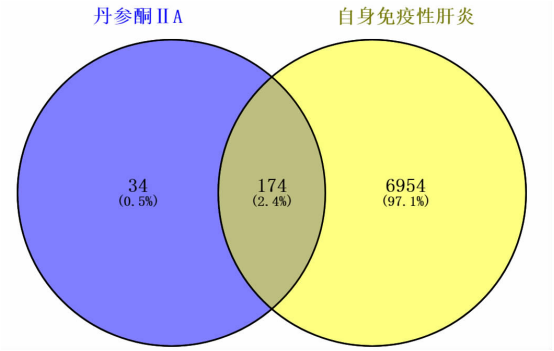


图 1 TanⅡA 和 AIH 共同靶点 Venn 图

2.3 GO 富集分析结果

将药物疾病共有靶点进行 GO 的生物过程(biological process,BP)、细胞组分(cell component,CC)和分子功能(molecular function,MF)富集分析,引用 String 数据库,将校正 $P \leqslant 0.05$ 的项目进行筛选,总共富集到 2 559 条生物过程,174 项分子功能相关,97 项细胞组成相关。使用 R 3.6.3 软件,进行条形图和气泡图绘制(图 3)。分析结果显示,TanⅡA-AIH 基因参与的生物学过程变化主要包括活性氧代谢过程、对氧化应激的反应、对脂多糖的反应等;这些靶点发生在膜筏、小窝、质膜筏等细胞组分间;同时这些靶点与类固醇激素受体活性、DNA 结合转录激活因子活性等分子功能关系密切。

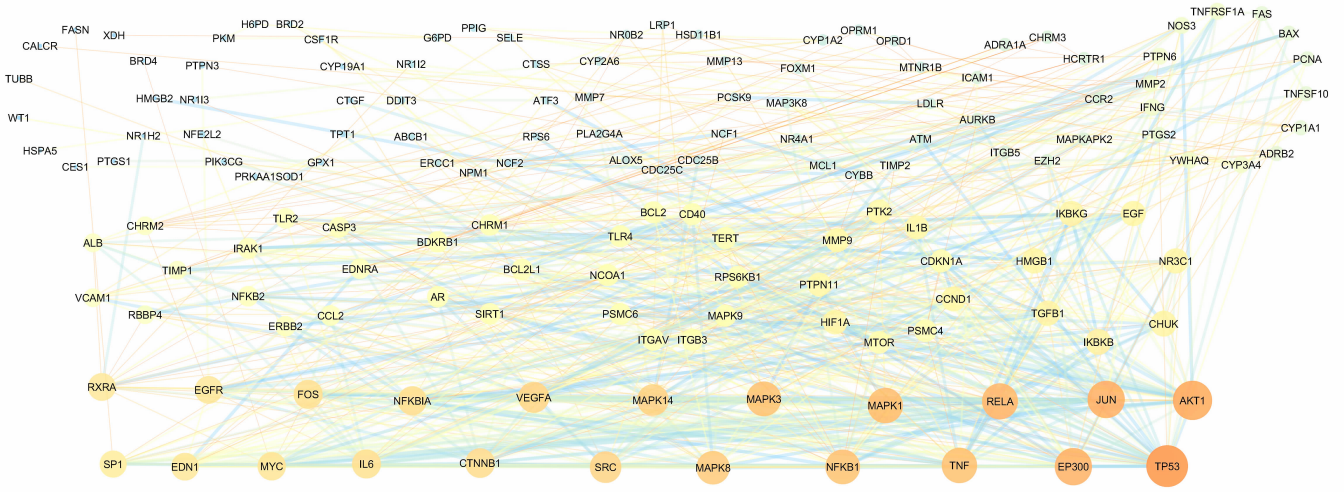
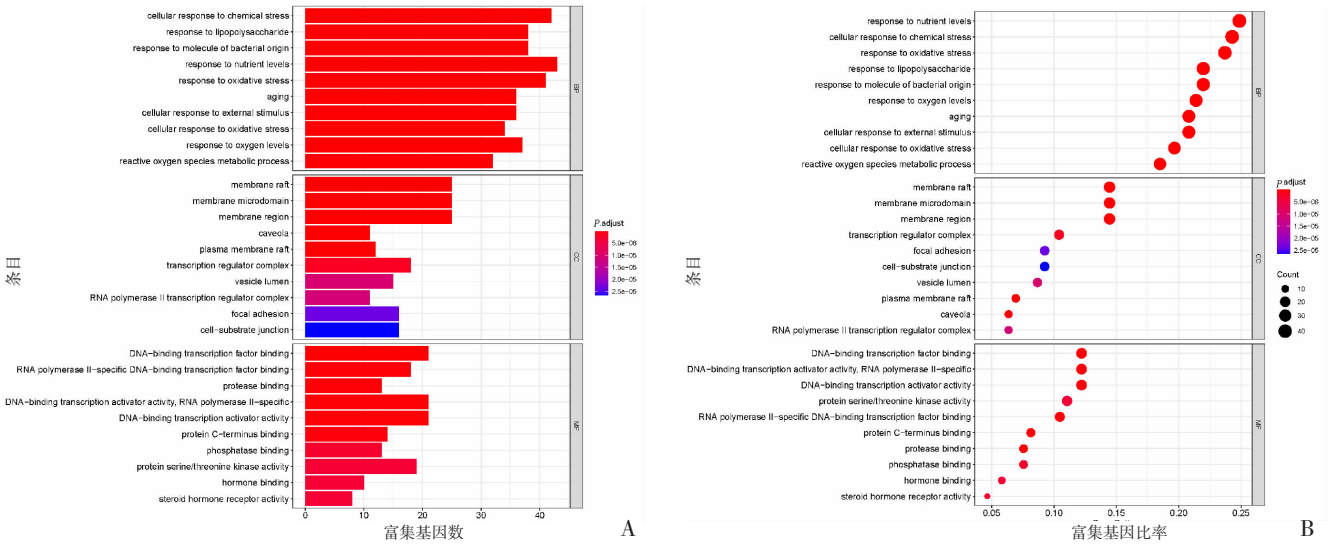


图 2 TanⅡA 和 AIH 共同靶点基因 PPI 网络图



A:GO 富集分析条形图;B:GO 富集分析气泡图

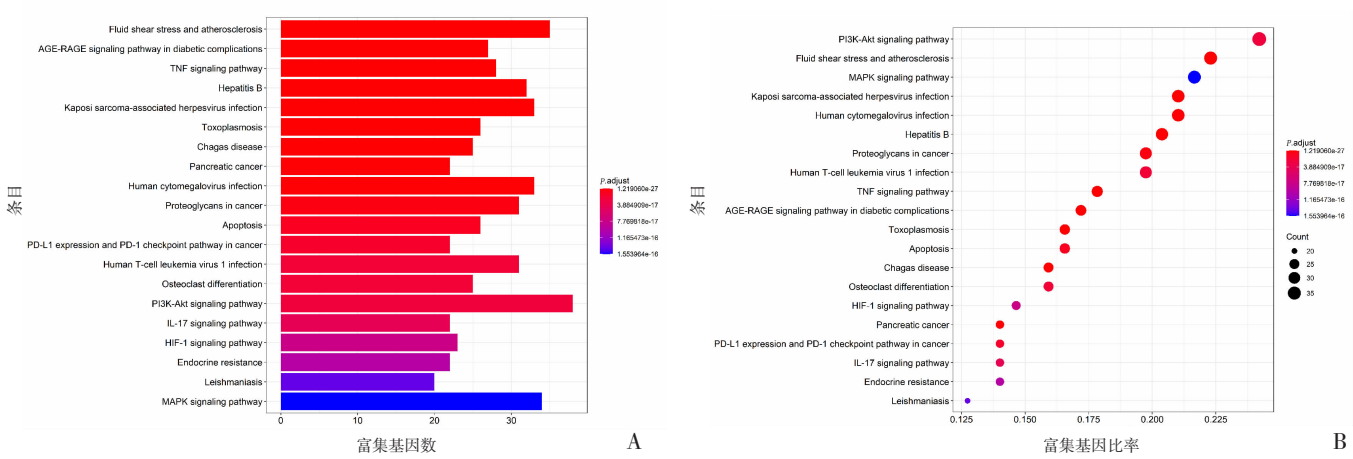
图 3 GO 富集分析结果

2.4　KEGG 通路富集分析结果

将 Tan Ⅱ A 和 AIH 共同靶点基因进行 KEGG 通路富集分析,引用 String 数据库,将校正 $P \leqslant 0.05$ 的项目进行筛选,总共富集到 157 条信号通路。使用 R 3.6.3,安装并引用 clusterProfiler 包后,进行条形图和气泡图绘制(图 4)。图中气泡的颜色从蓝到红反映 P 值逐步减小,其显著性越强。气泡从小到大表示富集到的基因数目逐步增加。分析结果表明这些靶点主要涉及的信号通路有肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、磷脂酰肌醇三激酶-蛋白激酶 B(PI3K-AKT)信号通路、IL-17 信号通路、细胞凋亡和缺氧诱导因子 1 信号通路等,同时与恰加斯病(Chagas disease)、乙型肝炎等疾病信号密切相关。反映出 Tan Ⅱ A 通过多途径,多靶点治疗 AIH 的作用特点。

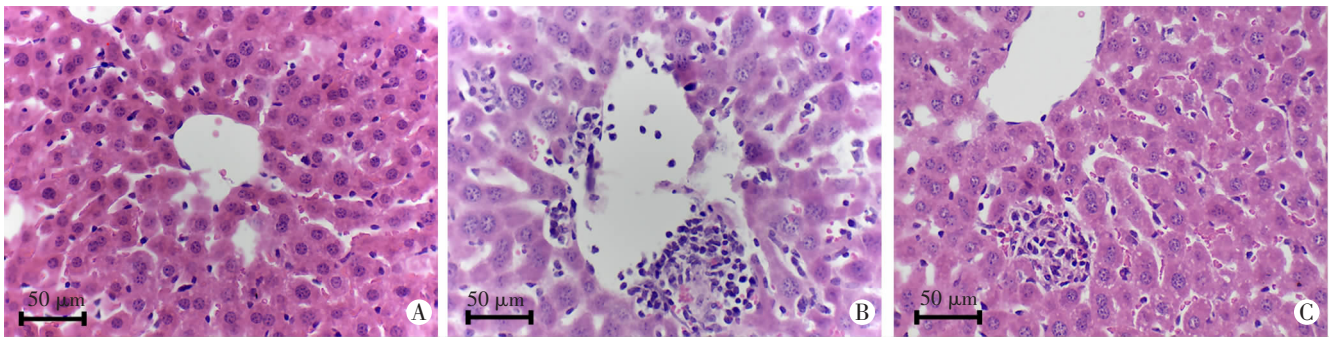
2.5　小鼠肝脏组织 HE 染色

正常组小鼠肝小叶结构清晰,汇管区无炎症浸润;模型组小鼠出现炎症细胞浸润,肝细胞大量坏死,血管充血和扩张以及肝窦结构紊乱;与模型组比较,Tan Ⅱ A 治疗组显示出不同程度的肝损伤减轻和炎细胞浸润减少(图 5)。



A:KEGG 分析条形图;B:KEGG 分析气泡图

图 4　KEGG 信号通路分析结果



A:正常组;B:模型组;C:Tan Ⅱ A 治疗组

图 5　HE 染色观察小鼠肝组织病理学变化

2.6　小鼠血清 ALT、AST 的含量变化

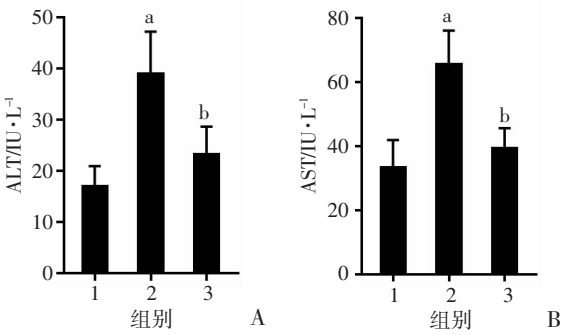
与正常组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST 水平均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,Tan Ⅱ A 治疗组小鼠血清 ALT、AST 水平均显示出不同程度减低($P<0.05$,图 6)。

2.7　小鼠肝组织 mRNA 和蛋白的表达变化

qRT-PCR 检测结果显示:与正常组比较,模型组小鼠肝组织 PI3K 和 AKT mRNA 水平降低($P<0.05$),NF-κB 水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,Tan Ⅱ A 治疗组小鼠肝组织 PI3K、AKT mRNA 水平显著升高,NF-κB

mRNA 水平降低显著($P<0.05$,图 7A)。

Western blot 检测结果显示:与正常组比较,模型组小鼠肝组织 PI3K 和 AKT 蛋白水平显著降低,NF-κB(p65)蛋白水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,TanⅡA 治疗组小鼠肝组织 PI3K 和 AKT 蛋白水平显著升高,NF-κB(p65)蛋白水平显著降低($P<0.05$,图 7B、C)。



1:正常组;2:模型组;3:TanⅡA 治疗组;a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

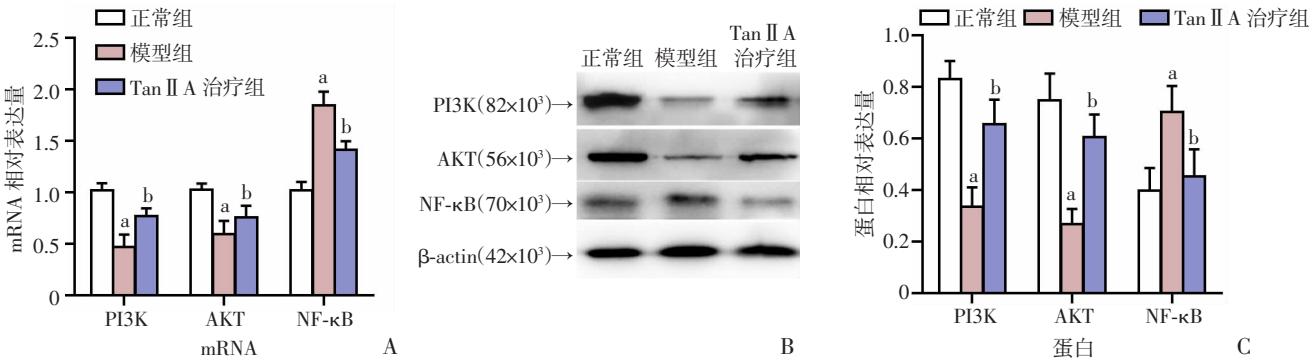
图 6 小鼠血清 ALT、AST 的含量变化

3 讨论

AIH 是由自身免疫反应介导的慢性进行性肝脏实质炎症,与 T 淋巴细胞的增殖活化密切相关。其特征表现为界面性肝炎、高 ALT、AST 和免疫球蛋白 G(IgG)水平以及自身抗体的存在[5]。该病主要影响女性,常见于在欧美发达国家,当前中国国内关于 AIH 的相关研究也明显增多[2]。AIH 的确切发病机制目前仍不清楚,但是遗传易感性,分子模拟机制等因素诱导自身免疫平衡状态的破坏,进而导致的肝脏损伤被认为与该病的发生、发展密切相关[1-2]。AIH 的治疗原则主要是抑制异常的自身免疫反应,临床上以类固醇疗法为主,但是长时间用药也会产生骨质疏松症、糖尿病等副作用[3]。因此,今后研究新的药物并优化改良 AIH 的治疗策略是十分有必要的。

丹参是一种传统中药,具有促进血液循环、祛瘀消肿等作用,并且可以通过抗氧化作用和改善微循环来保护肝脏,用于多种肝脏疾病的预防和治疗[6]。TanⅡA 是从丹参的根部提取的主要亲脂性成分之一,具有多种药理作用,例如抗炎、抗氧化和抗血小板凝聚等作用。有研究表明 TanⅡA 可诱导肝星状细胞凋亡,从而减少肝纤维化的水平[4]。此外,TanⅡA 还可以通过抑制 Kupffer 细胞中 NF-κB 信号传导,降低 TNF-α、IL-6 等促炎细胞因子的释放,减轻了肝炎的发生,有效保护肝脏[7]。网络药理学是一种结合系统网络分析和药理学的新颖方法,可以在短时间内以高通量的方式系统了解药物对疾病的影响,了解药物与疾病之间的相互作用机制。本实验首先采用网络药理学的方法筛选其成分,从 TanⅡA 中筛选得出有效作用靶点 208 个,收集到 AIH 有关的靶点基因 7 128 个,两者共得到 174 个交集基因靶点。GO 富集分析结果显示,TanⅡA-AIH 基因主要参与活性氧代谢、对氧化应激的反应等生物学过程;KEGG 通路分析提示多条信号通路参与 AIH 的发病,其中 PI3K-AKT 信号通路可能在 TanⅡA 治疗 AIH 中起重要作用。这些分析结果初步阐释了 TanⅡA 治疗 AIH 的可能作用机制,为后期进一步的实验研究提供了基础。

Con A 是一种促进细胞分化的植物凝集素,主要通过激活 T 细胞的有丝分裂原,活化 T 淋巴细胞而诱发急性免疫性肝损伤,它通过模拟人类急性 AIH 的病理生理过程,被广泛用于研究 AIH 的致病机制[8]。因此本实验通过小鼠尾静脉注射 Con A,建立了 AIH 模型,并通过多个实验对网络药理学筛选的信号通路的



A:PI3K、AKT 和 NF-κB mRNA 的相对表达水平;B:PI3K、AKT 和 NF-κB 蛋白的表达;C:PI3K、AKT 和 NF-κB 蛋白的表达水平
a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图 7 小鼠肝组织 mRNA 及蛋白的表达变化

进行验证[9]。ALT 和 AST 都是肝细胞损害的标志,会在肝细胞死亡后释放到血液中,帮助判断肝损伤程度。本实验结果显示,注射 Con A 后,模型组的 ALT 和 AST 水平明显升高,光学显微镜下观察模型组小鼠肝组织,可见肝细胞坏死肿胀,并伴有大量淋巴细胞浸润及多处片状坏死区域,均提示该模型的成功建立。PI3K-AKT 信号转导通路的机制靶点可促进细胞生长、增殖、分化和侵袭,在抗凋亡、免疫调节中也起关键作用。有多项研究表明,黄芪甲苷、郁金散、丹酚酸等药物对 CCl 4 诱导的肝硬化具有保护作用,其机制可能与抑制 PI3K-AKT 信号通路有密切关系[10-12]。PI3K 能够上调抗炎细胞因子,抑制促炎细胞因子的表达,抑制肝细胞的炎症反应,抑制肝星状细胞的增殖和侵袭。PI3K 激活后会进一步激活 AKT,导致其磷酸化并从细胞质转移到细胞膜,引起一系列与细胞凋亡相关的细胞因子变化。同时下游途径的 NF-κB 也被激活,促进炎症因子的大量产生,进一步加重了炎症反应。因此,本研究造模后,模型组小鼠肝组织 PI3K、AKT mRNA 和蛋白水平显著降低,NF-κB mRNA 和蛋白水平升高明显。目前,有越来越多的研究证明了丹参酮会通过影响 PI3K-AKT 对多种免疫性疾病和肝脏炎性病证有很好的治疗效果。在许多肝脏疾病中,氧化应激相关的炎症和细胞凋亡是重要的致病成分,最终会导致急性肝功能衰竭。曹慧敏等[13]发现,Tan Ⅱ A 可能通过调控 PI3K-AKT 信号通路促进自噬,对氧化低密度脂蛋白诱导的 EA. Hy926 细胞氧化应激损伤起到保护作用,帮助动脉粥样硬化的治愈。同样的,姜黄素治疗会抑制 PI3K-AKT 信号的传导和细胞凋亡,减轻 LPS 诱导的肝损伤[14]。GONG 等[15]研究结果证实,大黄蛰虫丸可以通过灭活 PI3K-AKT 通路在动物模型中发挥抗纤维化作用,从而保护大鼠免受肝损伤。此外,Tan Ⅱ A 可能通过调节 PI3K-AKT-mTOR 信号通路提高高脂血症大鼠肝脏自噬水平,有效降低肝脏脂质沉积,并且通过激活 PI3K-AKT 信号通路可以抑制受压脊髓组织中的细胞凋亡,帮助缓解脊髓压迫大鼠模型的脊髓损伤[16-17]。本实验结果显示,相比于模型组,治疗组小鼠肝组织 PI3K、AKT 蛋白和 mRNA 表达升高,炎症激活因子 NF-κB 蛋白和 mRNA 表达下降,Tan Ⅱ A 可能通过上调 PI3K、AKT,抑制 NF-κB 的激活进而保护肝脏。

目前为止,Tan Ⅱ A 的研究多集中在自身免疫性脑脊髓炎或者类风湿关节炎等免疫性疾病中,Tan Ⅱ A 对 AIH 治疗作用的相关研究很少。本研究基于网络药理学方法分析了 Tan Ⅱ A 治疗 AIH 的潜在靶点与通路之间关系,并通过动物实验验证 Tan Ⅱ A 可能通过调节 PI3K-AKT 信号通路改善 AIH 小鼠肝脏炎症反应,对于今后进一步研究 AIH 的发病机制具有重要的意义。但是 Tan Ⅱ A 对 AIH 的治疗机制极为复杂,由于时间及技术有限,部分实验结果未在人体组织上验证,未来我们将补充完成人体相关实验,从而体现实验上的一致性,更加深入了解 Tan Ⅱ A 对 AIH 患者的临床疗效及其预后影响。

综上所述,Tan Ⅱ A 可能通过影响 PI3K-AKT 信号通路进而调节炎症反应减轻 Con A 诱导的小鼠急性肝损伤。网络药理学与基础研究方法的有效结合也将为 AIH 发病机制相关的研究提供坚实的基础,促进中西医结合治疗 AIH 的进步。

参考文献:

[1] PAPE S, SCHRAMM C, GEVERS T J. Clinical management of autoimmune hepatitis[J]. United Eur Gastroent, 2019, 7(9): 1156-1163. DOI: 10.1177/2050640619 872408.

[2] SUCHER E, SUCHER R, GRADISTANAC T, *et al*. Autoimmune hepatitis-immunologically triggered liver pathogenesis-diagnostic and therapeutic strategies[J]. J Immunol Res, 2019, 2019: 9437043. DOI: 10.1155/2019/9437043.

[3] DALEKOS G N, KOSKINAS J, PAPATHEODORIDIS G V. Hellenic association for the study of the liver clinical practice guidelines: Autoimmune hepatitis[J]. Ann Gastroenterol, 2019, 32(1): 1-23. DOI: 10.20524/aog.2018.0330.

[4] LIU Y W, HUANG Y T. Inhibitory effect of tanshinone IIA on rat hepatic stellate cells[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e103229. DOI: 10.1371/journal.pone.0103229.

[5] THAN N N, JEFFERY H C, OO Y H. Autoimmune hepatitis: progress from global immunosuppression to personalised regulatory T cell therapy[J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2016, 2016: 7181685. DOI: 10.1155/2016/7181685.

[6] SHI M J, DONG B S, YANG W N, *et al*. Preventive and therapeutic role of Tanshinone ⅡA in hepatology[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108676. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108676.

[7] YUE S Q, HU B, WANG Z P, *et al*. Salvia miltiorrhiza compounds protect the liver from acute injury by regulation of p38 and NFκB signaling in Kupffer cells[J]. Pharm Biol, 2014, 52(10): 1278-1285. DOI: 10.3109/13880209.2014.889720.

[8] WANGH X, LIU M, WENG S Y, *et al*. Immune mechanisms of concanavalin A model of autoimmune hepatitis[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(2): 119-125. DOI: 10.3748/

wjg.v18.i2.119.

[9] 郝健亨, 陈浩, 高艳, 等. 柴胡皂苷 d 对自身免疫性肝炎小鼠差异表达基因 CTLA-4、IL-10 和 IL-17 的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(3): 303-309. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.03.005.
HAO J H, CHEN H, GAO Y, *et al*. Effects of Saikosaponin d on differentially expressed genes CTLA-4, IL-10 and IL-17 in mice with autoimmune hepatitis[J]. J Shanghai Jiaotong Univ Med Sci, 2020, 40(3): 303-309. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.03.005.

[10] WEI R D, LIU H D, CHEN R, *et al*. Astragaloside Ⅳ combating liver cirrhosis through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 393-397. DOI: 10.3892/etm.2018.6966.

[11] WU W, PIAO H Y, WU F S, *et al*. Yu Jin pulvis inhibits carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by blocking the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 5998-6006.

[12] WANG R, SONG F X, LI S N, *et al*. Salvianolic acid A attenuates CCl 4-induced liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR, Bcl-2/Bax and caspase-3/cleaved caspase-3 signaling pathways[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 1889-1900. DOI: 10.2147/DDDT.S194787.

[13] 曹慧敏, 宋囡, 张妮, 等. 丹参酮ⅡA 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控自噬抗内皮细胞氧化应激损伤研究[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(11): 933-939. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2017.11.011.
CAO H M, SONG N, ZHANG N, *et al*. Regulation on autophagy with tanshinone ⅡA for anti-oxidative stress damage of endothelial cells through PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2017, 40(11): 933-939. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2017.11.011.

[14] ZHONG W H, QIAN K J, XIONG J B, *et al*. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced Sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation *via* PI3K/AKT and NF-κB related signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 302-313. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.06.036.

[15] GONG Z H, LIN J Y, ZHENG J, *et al*. Dahuang Zhechong pill attenuates CCl_4-induced rat liver fibrosis *via* the PI3K-Akt signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2): 1431-1440. DOI: 10.1002/jcb.29378.

[16] 高云飞, 杨国元, 贾连群, 等. 丹参酮ⅡA 调控 PI3K/Akt/mTOR 通路对高脂血症大鼠肝脏自噬的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(12): 3051-3054. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2017.12.017.
GAO Y F, YANG G Y, JIA L Q, *et al*. Effect of tanshinone ⅡA on hyperlipidemia rats' liver autophagy through regulating PI3K/Akt/mtor signaling pathway[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35(12): 3051-3054. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2017.12.017.

[17] 刘伟, 赵宝辉, 王建忠, 等. 丹参酮ⅡA 通过 PI3K/AKT 信号通路调节脊髓神经元凋亡的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2019, 39(10): 622-629. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2352.2019.10.005.
LIU W, ZHAO B H, WANG J Z, *et al*. Experimental study on effect of tanshinone ⅡA in spinal cord compression through PI3K/AKT signaling pathway[J]. Chin J Orthop, 2019, 39(10): 622-629. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2352.2019.10.005.

(**收稿**:2021-11-07;**修回**:2022-01-09)

(编辑 王 红)