

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.2403006

基于网络药理学和实验验证探讨陈皮在异功散治疗慢性病贫血中的作用机制

胡 洁^{1,2}, 郑 秦¹, 姜一陵¹, 步金洋¹, 吴志豪¹, 石 岭¹, 张瑞峰¹, 罗梅宏¹

1. 上海中医药大学附属宝山医院血液科(上海 201900); 2. 上海市嘉定区华亭镇社区卫生服务中心中医科(上海 201816)

【摘要】 目的 为探讨陈皮在异功散治疗慢性病贫血(ACD)中的作用,通过网络药理学分析异功散中陈皮与四君子汤活性成分治疗 ACD 的不同作用靶点及信号通路,并进行动物实验明确陈皮活性成分在异功散治疗 ACD 中的作用机制。**方法** ①网络药理学研究:基于中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、本草组鉴数据库(HERB)、草药成分目录平台(HIT)获取异功散方的组分,符合口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18,或经瑞士生物信息研究所药代动力学(SwissADME)数据库筛选,符合吸收、分布、代谢和排泄标准的为最终获取的异功散活性成分。通过 TCMSP、化合物靶点预测(SwissTarget Prediction)数据库获得活性成分的作用靶点。再通过人类基因综合数据库(Genecards)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、疾病相关基因与突变位点数据库(DisGeNET)获取 ACD 的疾病靶点。借助韦恩(Venny)2.1 在线平台获得药物靶点和疾病靶点的交集,运用蛋白互作关系数据库平台(String)和 Cytoscape v3.9.1 软件构建蛋白质网络,通过 Cytoscape 中 MCC 算法筛选前 30 位的核心靶点,核心靶点经京都基因与基因组百科全书(KEGG)进行信号通路富集分析。最终通过 Cytoscape 构建“异功散活性成分-ACD-靶点”网络和“核心靶点-信号通路”网络。②分子对接验证:比较陈皮区别于异功散方中其他活性成分的作用靶点,进行分子对接验证。③动物实验验证:建立 ACD 小鼠模型,进行药物干预,干预 1 周后检测比较各组白细胞(WBC)、血红蛋白(Hb)、红细胞(RBC)、血清铁蛋白(SF)、血清铁(SI)水平,苏木精-伊红(HE)染色脾组织观察病理学变化,蛋白免疫印迹(Western blot)法检测脾组织中磷酸化丝裂原活化蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶(p-MEK/MEK)、磷酸化细胞外信号调节激酶(1/2)/细胞外信号调节激酶(1/2)[p-ERK(1/2)/ERK(1/2)]、磷酸化逆转录病毒癌蛋白网状内皮增生病毒癌基因同源物 A/逆转录病毒癌蛋白网状内皮增生病毒癌基因同源物 A(p-P65/P65)蛋白表达,验证陈皮活性成分对 ACD 的治疗作用及机制。**结果** ①网络药理学分析结果显示,异功散活性成分为 135 种,作用于 1 006 个靶点,ACD 疾病靶点 1 474 个,与异功散活性成分共同靶点为 235 个,计算筛选前 30 位核心靶点,构建得到“异功散活性成分-ACD-核心靶点”网络和“核心靶点-信号通路”网络,发现陈皮的活性成分柚皮素及其作用靶点丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)及其作用的丝裂原活化蛋白激酶-细胞外信号调节激酶(1/2)-核因子-κB[MEK-ERK(1/2)-NF-κB]通路可能在异功散治疗 ACD 中发挥重要作用。②动物实验结果表明,与模型组比较,柚皮素组小鼠的外周血 WBC、SF 明显降低($P<0.05$),Hb、RBC、SI 明显升高($P<0.05$);Western blot 检测显示,柚皮素组脾组织 p-MEK/MEK、p-ERK(1/2)/ERK(1/2)、p-P65/P65 表达均明显下降($P<0.05$);HE 染色结果提示,柚皮素组脾组织坏死区域、中性粒细胞浸润明显减少。**结论** 在异功散方中,陈皮的有效成分柚皮素通过减少 MAPK3 蛋白活化来下调 MEK-ERK(1/2)-NF-κB 通路,降低 ACD 小鼠炎症状态,恢复 RBC 稳态,调节铁代谢,改善贫血。

【关键词】 慢性病贫血;异功散;陈皮;柚皮素;网络药理学;中药研究

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774271, 81804021, 82104778);上海市卫健委“十四五”中医特色专科和中医急诊能力提升孵化项目(ZYTSZK2-14);上海市宝山区医学重点学(专)科建设项目(BSZK-2023-Z01);上海市中医药(临床类)重点学科(传统学科类)项目(shzyydxk-2024208);上海市宝山区科委医学卫生项目(21-E-23);上海市嘉定区名老中医(流派)工作室建设项目(2021MLZYLPZGS-04)

[作者简介] 胡洁,女,硕士研究生,主要从事中西医结合治疗血液疾病的临床与研究工作

[通信作者] 罗梅宏,教授,博士研究生导师;

E-mail: lmh021009@163.com

Study on mechanism of Chenpi in treatment of anemia of chronic disease with Yigong Powder based on network pharmacology and experimental validation

HU Jie^{1,2}, ZHENG Qin¹, JIANG Yiling¹, BU Jinyang¹, WU Zhihao¹, SHI Ling¹, ZHANG Ruifeng¹, LUO Meihong¹

1. Department of Hematology, Baoshan Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201900, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Jiading Huating Town Community Health Service Center, Shanghai 201816, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which Chenpi (*Citri Reticulatae Pericarpium*) contributes to Yigong Powder's treatment of anemia of chronic disease (ACD), this study analyzes the different targets and signaling pathways of Chenpi and other active components of Sijunzi Tang in Yigong Powder using network pharmacology, and validates the role of Chenpi's active compounds in ACD treatment through animal experiments. **Methods** ① Network pharmacology: Active components of Yigong Powder were obtained from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP), HERB, and HIT databases, based on oral bioavailability (OB) $\geq 30\%$ and drug-likeness (DL) ≥ 0.18 , or by screening for absorption, distribution, metabolism, and excretion standards through the SwissADME database. The targets of the active components were obtained through the TCMSP and the SwissTargetPrediction database. The disease targets ACD were then identified using the human gene database (GeneCards), the online mendelian inheritance in man (OMIM) database, and the disease-centric interaction database among diseases and various associated genes (DisGeNET). Intersection targets were identified using the Venny 2.1 platform. Protein interaction networks were constructed using the STRING database and Cytoscape v3.9.1 software. The top 30 core targets were screened using the MCC algorithm, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the core targets was performed. Cytoscape was used to construct a "Yigong Powder active component-ACD-target" network and a "core target-signaling pathway" network. ② Molecular docking validation: The distinct targets of Chenpi, compared to other active components in Yigong Powder, were validated through molecular docking analysis. ③ An ACD mouse model was prepared and treated with drug interventions. After one week of intervention, the levels of white blood cells (WBC), hemoglobin (Hb), red blood cells (RBC), serum ferritin (SF), and serum iron (SI) were measured and compared across groups. Histopathological changes in spleen tissue were observed using hematoxylin and eosin (HE) staining. Western blot analysis was performed to detect the expression of phosphorylated MEK (p-MEK)/MEK, phosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1/2 (p-ERK1/2)/ERK1/2, and phosphorylated P65 (p-P65)/P65 in spleen tissue, to verify the therapeutic effects and mechanisms of Chenpi's active components in the treatment of ACD. **Results** ① Network pharmacology analysis revealed 135 active components in Yigong Powder, acting on 1,006 targets. There were 1,474 disease targets of ACD, with 235 common targets between the active components of Yigong Powder and ACD. The top 30 core targets were identified and used to construct the "Yigong Powder active component-ACD-core target" network and the "core target-signaling pathway" network. It was found that the active component of Chenpi, naringenin, and its target, mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), may play a crucial role in the treatment of ACD through the MEK-ERK1/2-NF- κ B signaling pathway. ② Animal experiment results showed that, compared to the mice in model group, the naringenin-treated group mice showed significantly lower levels of WBC and SF ($P < 0.05$), and significantly higher levels of Hb, RBC, and SI ($P < 0.05$) in peripheral blood. Western blot analysis showed a significant decrease in the expression of p-MEK/MEK, p-ERK (1/2)/ERK (1/2), and p-P65/P65 proteins in spleen tissue ($P < 0.05$). HE staining indicated a significant reduction in necrotic areas and neutrophil infiltration in spleen tissue. **Conclusion** In Yigong Powder, the active component of Chenpi, naringenin, reduces the activation of MAPK3 protein to downregulate the MEK-ERK1/2-NF- κ B pathway, leading to a reduction in inflammation in ACD mice, correction of RBC homeostasis, regulation of iron metabolism, and improvement of anemia.

Keywords: anemia of chronic disease; Yigong Powder; *Citri Reticulatae Pericarpium*; naringenin; network pharmacology; traditional Chinese herbal medicine research

慢性病贫血(anemia of chronic disease, ACD)又称为炎症性贫血,是一种因功能性铁缺乏导致的铁失利用性贫血,表现为血清铁(SI)降低,血清铁蛋白(SF)正常或升高,是疾病预后不良重要影响因素^[1]。ACD多继发于感染、炎症、自身免疫性疾病等^[2]。随着研究的深入,发现引起ACD的疾病谱正不断扩大,例如心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病、肺动脉高压、肥胖,甚至炎症衰老(前炎症过程)均可导致ACD的发病^[3]。ACD的发病率约占老年贫血的40%^[4],其会增加心脑血管疾病、肾脏病、肺血管疾病等基础疾病的死亡风险,而提升血红蛋白(Hb)含量10 g/L及以上,可以降低患者41%~64%的死亡风险^[5],因此,治疗ACD显著改善患者预后。

针对ACD的治疗关键是治疗原发病,然而自身免疫系统疾患、恶性肿瘤等疾患往往无法根治,因此,目前ACD治疗效果不尽如人意^[6-7]。最近新兴疗法不断涌出,包括针对铁代谢调控通路^[8],缺氧诱导通路^[9-10]或免疫细胞信号级联^[11]的疗法,然而新兴治疗的临床验证正在进行中,上市的新药较少,且价格昂贵^[12]。

中医将ACD归属于“萎黄”“黄病”“血虚证”等范畴。“脾为后天之本,气血生化之源”,中医理论认为机体的造血功能离不开脾的化生功能。脾胃所化生的水谷精微是化生血液的最基本物质。铁作为造血所必需的精微物质之一,需通过脾的运化作用才能得以吸收,并分布于造血器官加以利用。异功散记载于《小儿药证直诀》,是运脾法代表方剂,功用为补气健脾、行气化滞。此方由四君子汤(人参、白术、茯苓、甘草)加陈皮而成,《名医方论》认为“参、术、苓、草,甘温益胃,有健运之功,具冲和之德”,加陈皮意在行气化滞、醒脾助运,具有补而不滞、补中有行的特点。前期随机双盲临床试验^[13]证明,异功散可以提升ACD患者Hb含量10~15 g/L,缓解患者乏力、纳差等症状。前期研究证明,异功散通过降低炎症因子的表达,可下调铁代谢的信号通路,降低铁调素,释放储存铁,提升外周可利用铁的含量,提升Hb含量^[14-15]。

中药组方成分复杂,各成分之间存在相互影响,难以明确具体作用机制。异功散是四君子汤加陈皮组合

而成,而陈皮是方中发挥“运脾”作用的关键药物。前期研究^[16]表明,陈皮单味药抑制促炎性细胞因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达,陈皮单味药较四君子汤可更明显提升小鼠 Hb、血清 SI 含量,降低血清 SF 水平及肝脏组织内促炎性细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、 γ 干扰素(IFN- γ)表达。故我们推测异功散中陈皮可能是通过抑制炎症因子过表达,改善铁代谢,从而治疗 ACD。为探讨陈皮在异功散治疗 ACD 中的作用,本研究通过网络药理学分析异功散中陈皮与四君子汤活性成分治疗 ACD 的不同作用靶点及信号通路,并进行动物实验验证,以明确陈皮活性成分在异功散治疗 ACD 中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 30 只,8 周龄,体质量 18~20 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0004。动物使用合格证号:20220004014395。实验动物饲养于上海中医药大学实验动物中心,温度 24~26 °C,湿度 45%~65%,12 h 自动循环熄灯,日常自由饮水进食。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批准号:PZSHUTCM2301040005)。

1.1.2 药物与试剂 柚皮素(批号:N01HS199507),上海源叶生物科技有限公司,使用时以质量浓度不超过 1 g/L 的二甲基亚砜[DMSO(批号:829R031),北京索莱宝科技有限公司]溶液溶解^[17]。

内毒素(LPS,批号:L3012-5MG),美国 Sigma 公司;酵母聚糖 A(Zymosan A,批号:Z4250-5G),美国 Sigma 公司;小鼠铁蛋白酶联免疫吸附法试剂盒(批号:E-90F),以色列 ICL 公司;铁/总铁结合力检测试剂盒(批号:P803-I7504-01),美国 Pointe Science 公司;二辛可酸(BCA)测定试剂盒(批号:PICPI23223),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;质量浓度 300 g/L 的丙烯酰胺(29:1,批号:ST003)、1.0 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl, pH=8.8)电泳缓冲液(批号:ST788)、1.0 mol/L Tris-HCl(pH=6.8)电泳缓冲液(批号:ST768)、质量浓度 100 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS,批号:ST628)、过硫酸铵(批号:ST005)、四甲基乙二胺(TEMED,批号:ST728)、吐温-20(批号:ST825),上海碧云天生物科技有限公司;4×蛋白上样缓冲液(批号:P1015)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号:P1010),北京索莱宝科技有限公司;蛋白预染标记(批号:SM1811),加拿大 Fermentas 公司;硝酸纤维素膜(NC 膜,批号:HATF00010)、发光液(批号:WBKLS0100),美国 Millipore 公司;羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(批号:AB-2301)、羊抗鼠 HRP 标

记二抗(批号:ZB-2305),北京中杉金桥生物技术有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(批号:60009-1-AP),美国 Proteintech 公司;丝裂原活化蛋白激酶(MEK)抗体(批号:#4694)、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(p-MEK)抗体(批号:#9154)、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)抗体(批号:#4695)、磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(p-ERK1/2)抗体(批号:#4370),德国 CST 公司;逆转录病毒癌蛋白网状内皮增生病毒癌基因同源物 A(P65)抗体(批号:ab16502)、磷酸化逆转录病毒癌蛋白网状内皮增生病毒癌基因同源物 A(p-P65)抗体(批号:ab76302),英国 Abcam 公司。

1.1.3 主要仪器 Centrifuge 低温高速离心机(型号:5417R),德国 Eppendorf 公司;摇床(型号:TS-3D),海门其林贝尔仪器制造有限公司;酶标仪(型号:MK3),芬兰 Thermo Labsystems 酶标仪公司;电子天平(型号:MS205DU),瑞士 Mettler Toledo 公司;纯水器(型号:Milli-Q),美国 Millipore 公司;制冰机(型号:SIM-F140AY65-PC)、立式蒸汽压力灭菌柜(型号:MLS-3781L),日本 Panasonic 公司;微型离心机(型号:LX-600),上海精宏实验设备公司;电热恒温水槽(型号:XMTE-8112),海门其林贝尔仪器制造有限公司;电泳仪(型号:mini protean 3 cell),美国 Bio-Rad 公司;超灵敏化学成像仪(型号:Tanon-5200),上海天能生命科学有限公司。

1.2 异功散治疗 ACD 的网络药理学分析

1.2.1 异功散治疗 ACD 疾病靶点筛选 在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、本草组鉴数据库(HERB, <http://herb.ac.cn/>)、草药成分目录平台(HIT, <http://www.badd-cao.net:2345/>)中分别检索异功散的组成药物(人参、白术、茯苓、陈皮、甘草)的成分,以口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18 为条件,或经瑞士生物信息研究所药代动力学(SwissADME)数据库(<http://www.swissadme.ch/>)筛选,符合吸收、分布、代谢和排泄标准的化合物为最终得到的异功散中各种中药的活性成分,通过 TCMSP 及化合物靶点预测数据库(Swisstarget prediction, <http://www.swisstargetprediction.ch/>)筛选预测各化合物对应的作用靶点,通过通用蛋白质数据库(UniProtKB, <https://www.uniprot.org/>)和有机小分子生物活性数据库(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)剔除上述靶点中的非人源靶点和重复靶点,得到异功散活性成分-作用靶点数据集。在人类基因综合数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org>)、疾病相关基因与突变位点数据库(DisGeNET, <https://www.disgenet.org/>)中分别检索“anemia of chronic

disease”(慢性病贫血)和“anemia of inflammation”(炎症性贫血)搜索靶点,筛选 relevance score ≥ 2 倍中位数的数据,所得即为 ACD 的相关靶点。将异功散作用靶点和 ACD 靶点导入韦恩(Venny)2.1(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>),两者交集即为异功散治疗 ACD 的靶点基因。

1.2.2 构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络及核心靶点筛选 利用蛋白互作关系数据库平台(String, <https://cn.string-db.org/>)构建 PPI 网络关系图。将异功散和 ACD 共同靶点导入数据库,隐藏无关联的靶点,设置相互作用评分阈值为 0.9,其余参数为默认值,得到 PPI 关系图。将 PPI 导入 Cytoscape v3.9.1 软件,选择 APP 中 CytoHubba 的 MCC 算法,选择前 30 位的核心靶点。

1.2.3 京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析 将“1.2.2”步骤筛选到的 30 个核心靶点基因上传至注释、可视化和集成发现(DAVID)数据库(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>),选择“OFFICIAL_GENE_SYMBOL”标识、“HOMO”种属进行 KEGG 信号通路富集分析。分析结果通过“微生信”在线绘图工具(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制气泡图使结果更直观。

1.2.4 构建药物-疾病-靶点网络和靶点-信号通路网络 将异功散活性成分、核心靶点、KEGG 信号通路输入 Cytoscape v3.9.1 软件,构建“异功散活性成分-ACD-核心靶点”“核心靶点-信号通路”网络,用以展示中药活性成分、核心靶点和信号通路间的相互作用关系。

1.3 陈皮活性成分与作用靶点分子对接验证 将陈皮作用靶点、四君子汤作用靶点和“1.2.2”中获得的核心靶点导入 Venny2.1,得到陈皮在治疗 ACD 过程中区别于四君子汤的特异靶点,并通过“异功散活性成分-ACD-核心靶点”网络图找到该靶点对应的活性成分,在 PubChem 数据库搜索并下载活性成分的化合物 3D 结构式,在 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)搜索靶点蛋白,选择“Homo sapiens”,在结果中选择下载合适的 3D 结构。通过 Pymol、AutoDock Vina 软件,去除下载的蛋白质上的水分子和配体,保存为 pdb 格式,作为对接受体。通过 OpenBabelGUI 软件,将化合物信息转化为 mol2 格式,作为对接配体。将处理后的靶点和药物活性分子通过 AutodockVina 软件进行分子对接,观察各组对接结果的结合能大小,结合能越小表示分子之间相和度越高。

1.4 动物实验验证

1.4.1 分组与造模 小鼠适应性喂养 3 d 后,随机取 10 只为空白组,正常饲养,其余 20 只进行造模,根据文献复制模型^[18-19]。第 1 天,造模小鼠腹腔注射 LPS(给药浓度:0.5 g/L;给药体积:10 mL/kg 体质量),正常饲养小鼠

腹腔注射等量氯化钠溶液(9 g/L)。第 7 天,造模小鼠腹腔注射 Zymosan A(给药浓度:32 g/L,给药体积:10 mL/kg 体质量),正常饲养小鼠腹腔注射等量氯化钠溶液(9 g/L)。

1.4.2 干预 第 12 天开始药物干预,将造模小鼠随机分为模型组和柚皮素组,每组 10 只。空白组及模型组,灌胃纯水(0.2 mL/只,连续 1 周);柚皮素组灌胃柚皮素(给药浓度:4 g/L;给药体积:10 mL/kg 体质量;连续 1 周)。按陈皮中柚皮素含量 0.8%,人与小鼠等效用药剂量比值 0.002 6 计算,每人每日服用异功散含 20 g 陈皮,则小鼠用量为 $20 \text{ g} \times 0.002 6 \times 0.8\% = 41.6 \text{ mg/kg}$ 。连续给药 1 周后,以戊巴比妥钠溶液(30 g/L),1 mL/只,腹腔注射,进行麻醉。麻醉后经眶后静脉丛采集全血。分离脾脏,按实验要求处理和贮存标本。

1.4.3 自动细胞计数仪检测血常规 通过眼眶后静脉丛采集全血,取 200 μL 全血置于乙二胺四乙酸(EDTA)管中,混匀抗凝,送至复旦大学实验动物部生化血液平台,使用自动血细胞计数器检测血常规。

1.4.4 比色法检测 SI 含量 取 96 孔板,分别标记空白孔、标准孔及样本孔,均设 2 个复孔;所有孔中加入 100 μL 铁缓冲液;分别将 20 μL 去离子水、标准品和样品加入相应的孔中,混匀;酶标仪调 0,波长 560 nm,测定每个孔的光密度(OD)值,并将结果保存并记录为 A1;取下 96 孔板,向每个孔中加入 2 μL 铁显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 10 min;再次读取 560 nm 波长下各孔的 OD 值,记为 A2。SI 含量计算公式: $\text{SI} = (\text{A2 样品} - \text{A1 样品}) / (\text{A2 标准} - \text{A1 标准}) \times 500$ 。

1.4.5 ELISA 法检测 SF 含量 根据 ICL 小鼠铁蛋白试剂盒说明书进行检测。试剂盒平衡至室温,用样本稀释液将需要检测的样本稀释 50 倍。用标准品稀释液将标准品稀释至 2 g/L,倍比稀释 7 个浓度,并设置空白孔。所有的孔都设置 2 复孔,在包备好的 96 孔板对应孔中加入 100 μL 标准品和稀释后的样品,覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 环境,孵育 60 min。吸出孔中的反应液,用洗涤液洗板 3 次,最后洗涤完后在干净的滤纸上吸干。加入 100 μL HRP/孔,覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 环境,孵育 10 min。洗板 3 次。每孔加入 100 μL 底物工作液 TMB,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min。每孔加入 100 μL 终止液,终止反应。酶标仪调至 450 nm 波长,检测各孔 OD 值。根据标准曲线计算各样本的 SF 浓度,以 ng/L 表示。

1.4.6 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测相关蛋白表达 提取小鼠脾组织蛋白,测定蛋白浓度。选用体积分数 10% 分离胶,蛋白上样,电泳后转膜。将膜置于质量浓度 50 g/L 的脱脂奶粉(检测磷酸化蛋白用牛血清白蛋白)室温封闭 1 h。加入一抗(GAPDH 1:5 000, MEK 1:1 000, p-MEK 1:1 000, ERK1/2 1:1 000, p-ERK1/2 1:

2 000、P65 1:1 000、p-P65 1:1 000), 4 °C 孵育过夜。然后用含吐温-20 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液 (TBST) 洗涤 3 次, 加入二抗, 与膜 37 °C 孵育 1 h。再次用 TBST 洗膜 3 次。配制增强型化学发光试剂 (ECL), A 液和 B 液等量混匀, 加在膜的正面暗室避光 5 min。弃去显色液, 用纸小心吸取显色液, 在上面盖上一层平整的透明纸。将其放入成像系统中进行扫描。使用 ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.4.7 苏木精-伊红 (HE) 染色法观察组织形态学改变 取脾组织, 氯化钠溶液 (9 g/L) 冲洗后置于多聚甲醛 (40 g/L) 固定 24 h。用体积分数为 75% 乙醇处理, 石蜡包埋、切片、HE 染色、脱水、封片, 在光学显微镜下观察脾组织病理结构变化。

1.5 统计学方法 实验数据采用 SPSS 22.0 软件处理与分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 符合正态分布, 采用单因素方差分析; 不符合正态分布, 采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学结果

2.1.1 异功散活性成分对应作用靶点及 ACD 疾病相关靶点交集 通过 TCMS、HERB、HIT 数据库共筛选出异功散活性成分 135 个, 其中人参的活性成分为 29 个, 白术的活性成分为 9 个, 茯苓的活性成分为 14 个, 陈皮的活性成分为 10 个, 甘草的活性成分为 79 个, 共 141 个, 其中 1 个为人参、甘草共有, 1 个为甘草、陈皮共有, 4 个为茯苓、白术共有。135 种活性成分共对应 1 006 个靶点基因。在 GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库中, 最终得到 1 474 个 ACD 靶点基因。通过 Venny2.1 绘图, 得到异功散和 ACD 靶点交集基因共 235 个。见图 1。

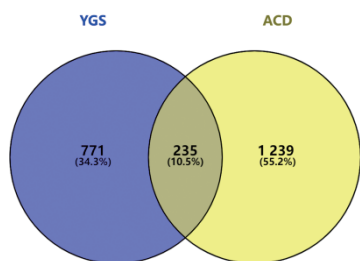


图 1 异功散 (YGS) 和慢性病贫血 (ACD) 相关靶点交集韦恩图

2.1.2 PPI 网络及“药物-疾病-靶点”网络构建 通过 STRING 数据库构建靶点蛋白 PPI 网络, 该 PPI 网络共有 291 个节点、1 279 条边。将图导入 Cytoscape 进一步分析, 得到该 291 个节点中前 30 位的核心靶点 (Hubnode), 这 30 个靶点可能在异功散治疗 ACD 的过程中起到关键作用。借助 Cytoscape 软件绘制“异功散活性成分-ACD-核心靶点”网络图。见图 2 至图 5。

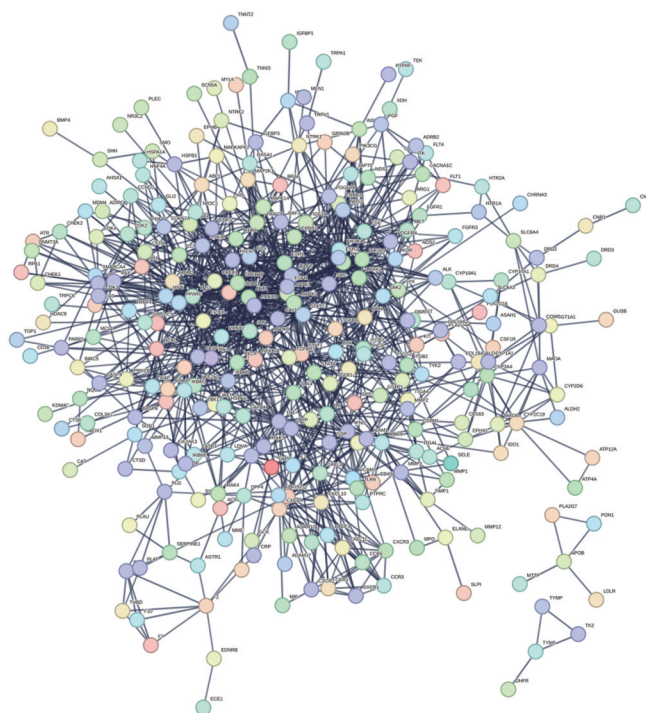


图 2 异功散治疗慢性病贫血 (ACD) 的蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络图

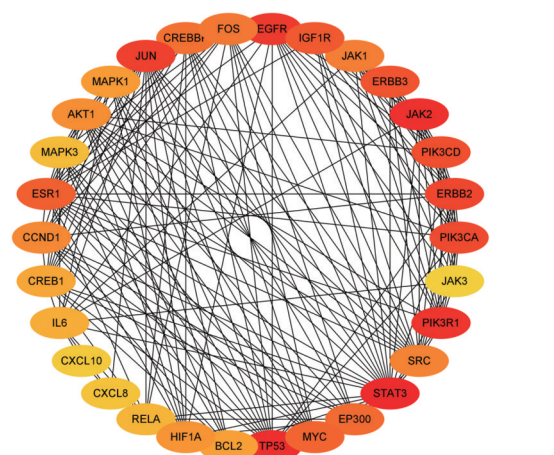


图 3 异功散治疗慢性病贫血 (ACD) 前 30 位核心靶点网络图

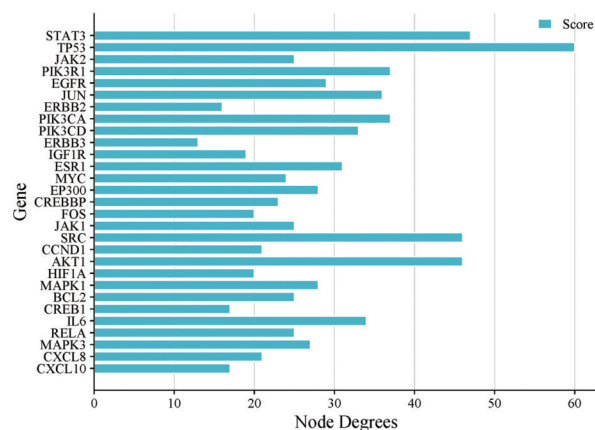
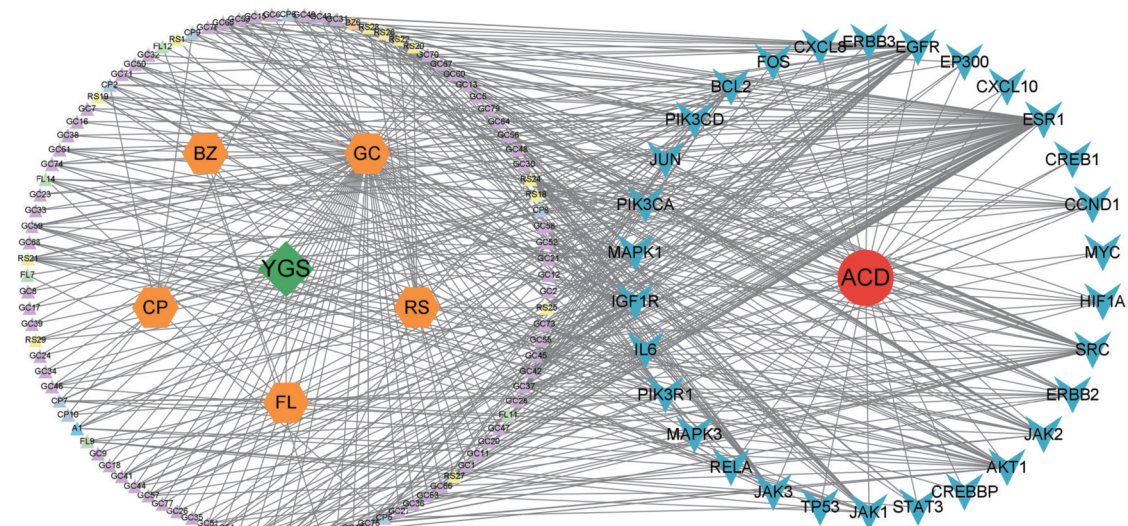


图 4 异功散治疗慢性病贫血 (ACD) 前 30 位核心靶点度值



注:YGS为异功散,RS为人参,BZ为白术,FL为茯苓,GC为甘草,CP为陈皮。

图5 “异功散活性成分-慢性病贫血(ACD)-核心靶点”网络图

2.1.3 KEGG 分析结果 通过 DAVID 数据库对 30 个关键靶点进行 KEGG 信号通路分析,得到显著富集的通路 143 条,包括疾病代谢通路和信号通路,筛选信号通路中 $P<0.01$ 且涉及靶点数 ≥ 10 的条目,筛选得到 18 条相关信号通路,涉及多条肿瘤、炎症相关信号通路。通过 Cytoscape 软件绘制“核心靶点-信号通路”网络图。见图 6、图 7。

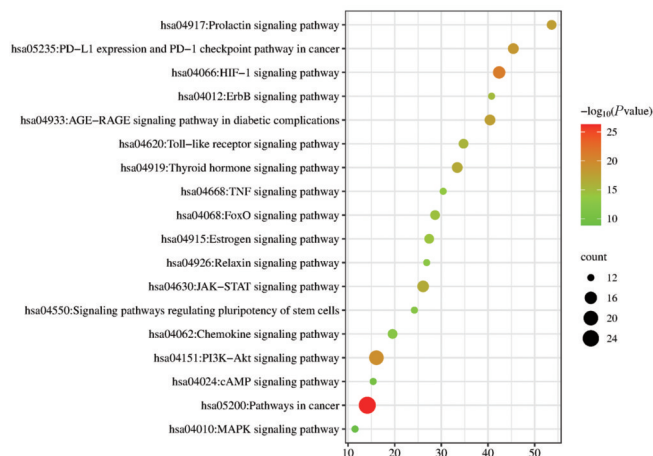


图6 异功散治疗慢性病贫血(ACD)关键靶点京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析

2.2 陈皮活性成分与核心靶点分子对接验证 为找到陈皮在治疗ACD中区别于四君子汤的作用,绘制陈皮靶点、四君子汤靶点和核心靶点三者韦恩图,发现30个核心靶点中,有13个属于四君子汤中活性成分的作用靶点,15个属于四君子汤和陈皮共同作用靶点(图8)。丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3,即ERK1/2)、环磷腺苷反应元件结合蛋白1(CREB1)是属于陈皮活性成分的作用靶点,根据“药物-疾病-靶点”网络图(图5),作用于MAPK3、CREB1的活性成分分别是陈皮中的柚皮素和

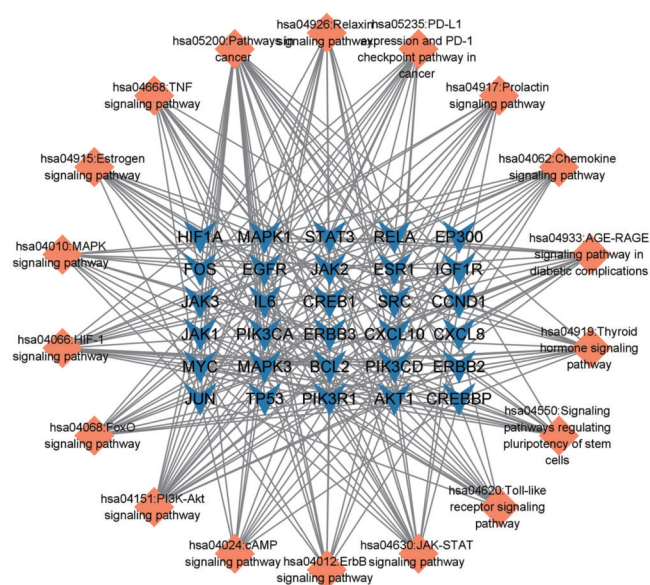


图7 异功散治疗慢性病贫血(ACD)核心靶点-关键通路网络图

川陈皮素(nobiletin)。而从KEGG信号通路富集结果发现,最终18条信号通路中,MAPK3出现在其中17条信号通路中,6条信号通路中涉及CREB1,且MAPK3多为CREB1的上游信号,故以柚皮素为对接配体,MAPK3为对接受体,通过计算机模拟,进行分子对接,计算自由结合能,预测活性成分和靶点的亲和力。结果发现,柚皮素以5个氢键与MAPK3受体的苏氨酸(THR-347)、精氨酸(ARG-94)紧密结合,键长分别为2.4、3.1、2.4、2.9以及3.1,自由结合能-8.2 kcal/mol(图9)。

2.3 动物实验验证结果

2.3.1 柚皮素对ACD模型小鼠血液学指标的影响 结果显示,与空白组比较,模型组小鼠WBC、SF明显升高($P<0.05$),Hb、RBC、SI明显降低($P<0.05$),提示造模成

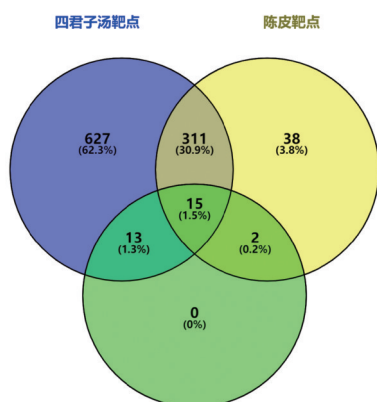


图8 陈皮、四君子汤靶点和核心靶点(hubnode)交集韦恩图

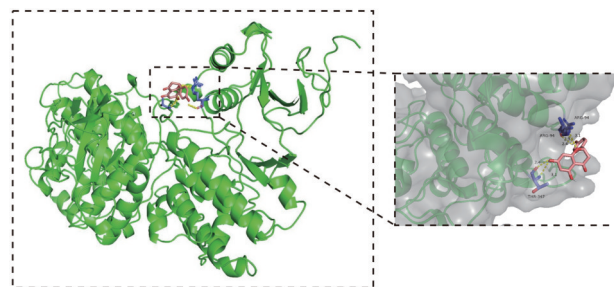
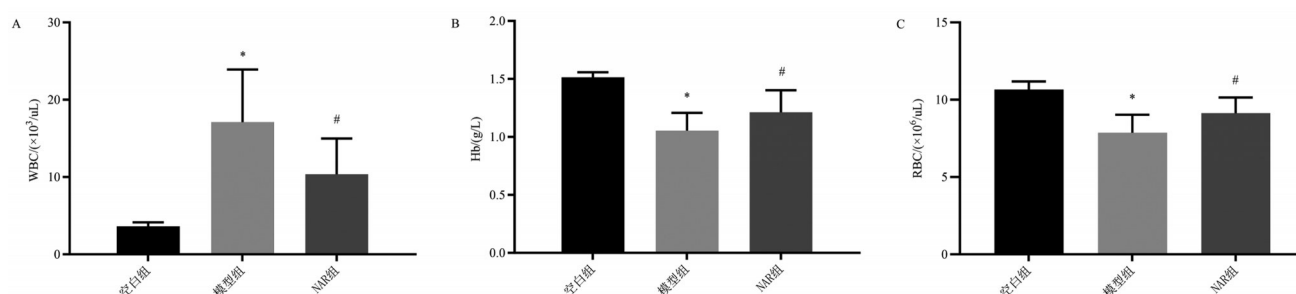


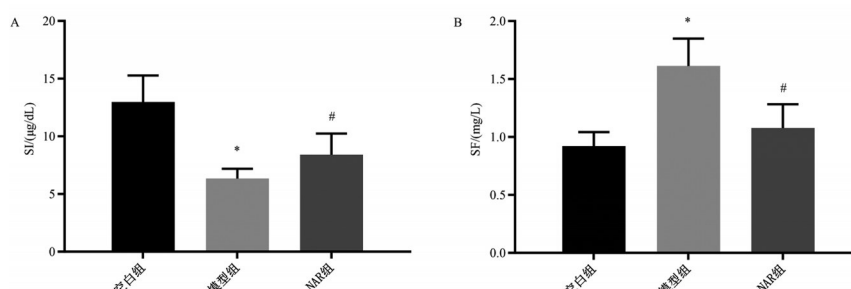
图9 柚皮素与丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)分子对接结果

功。经柚皮素干预后与模型组比,柚皮素组小鼠WBC、SF明显降低($P<0.05$),Hb、RBC、SI明显升高($P<0.05$),提示贫血和铁代谢得到改善。见图10、图11。



注:A为各组白细胞(WBC)水平,B为各组血红蛋白(Hb)水平,C为各组红细胞(RBC)水平,NAR为柚皮素。与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;n=10, $\bar{x}\pm s$ 。

图10 各组小鼠外周血WBC、Hb、RBC水平比较



注:A为各组血清铁(SI)水平,B为各组血清铁蛋白(SF)水平,NAR为柚皮素。与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;n=10, $\bar{x}\pm s$ 。

图11 各组小鼠外周血铁代谢水平比较

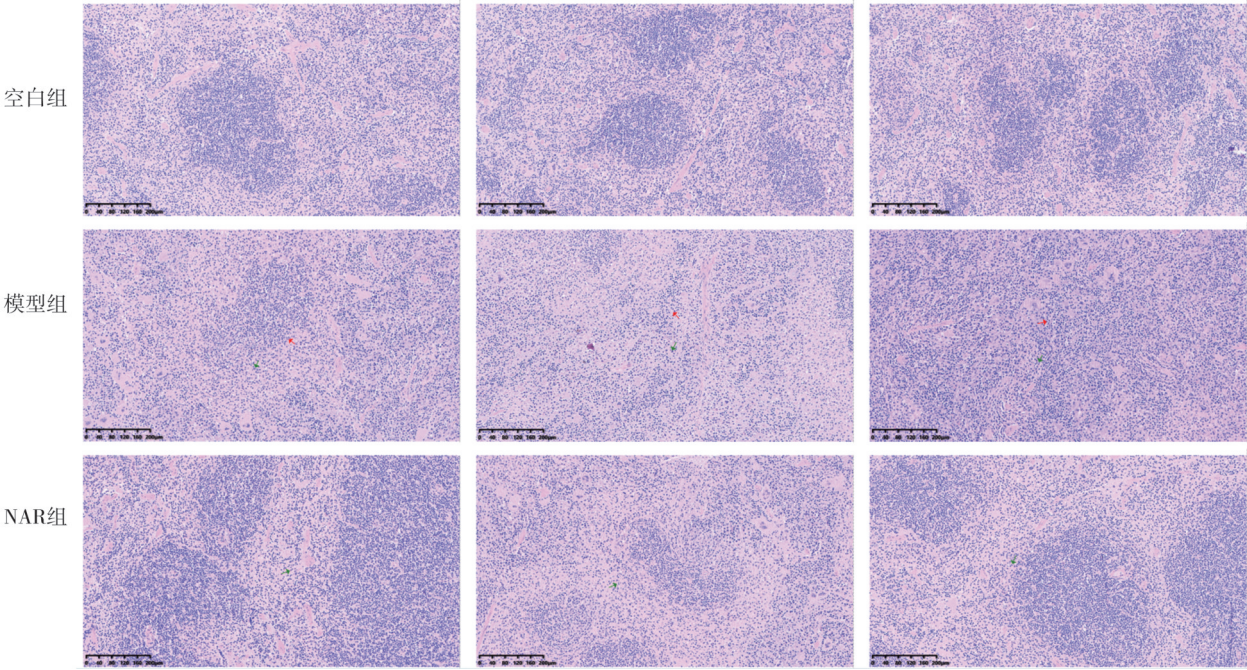
2.3.2 柚皮素对ACD模型小鼠脾组织形态结构的影响 HE染色显示,空白组小鼠脾组织细胞形态结构基本正常,未见明显病变。模型组小鼠脾组织白髓结构不明显,白髓红髓均可见较多的坏死区,坏死区与正常脾组织界线清晰(红色箭头所示),周围有中性粒细胞弥散性浸润(绿色箭头所示)。柚皮素组小鼠脾组织白髓红髓见局部坏死区,坏死区与正常脾组织界线清晰,周围有少量中性粒细胞浸润(绿色箭头所示)。见图12。

2.3.3 柚皮素对ACD模型小鼠脾组织MEK-ERK(1/2)-NF- κ B通路相关蛋白表达的影响 单因素方差分析显示,与空白组比较,模型组内p-MEK/MEK、p-ERK(1/2)/ERK(1/2)、p-P65/P65均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,柚皮素组内p-MEK/MEK、p-ERK(1/2)/ERK(1/2)、

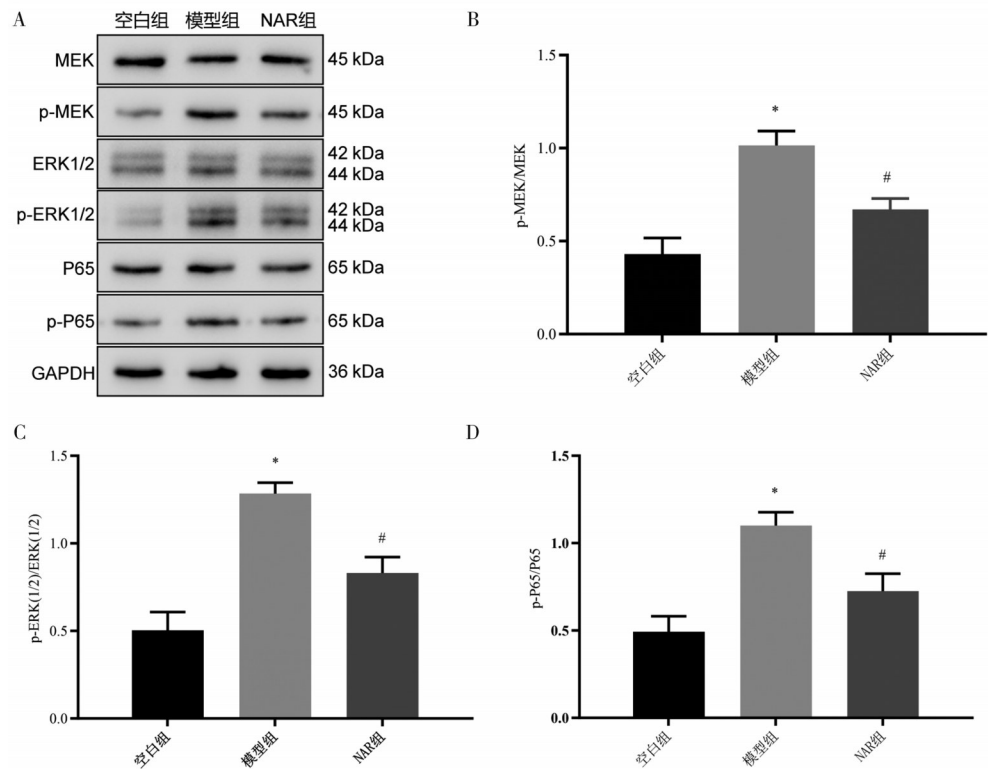
p-P65/P65均明显降低($P<0.05$)。见图13。

3 讨论

《灵枢·决气》云:“中焦受气取汁变化而赤,是谓血。”古人对血的认识,认为血来源于饮食,通过脾的运化功能,生成精微,而水谷精微又可化生营气,营气生成血液。“生血”的关键是脾的运化功能,《康熙字典》谓“天地阴阳运行,自有而无,自无而有,万物生息,则为化。又泛言改易,亦曰变化”,又“能生非类曰化”,因此化可以表述为物质的生成、消散、转化等。由此可见,脾气健运,才能使得运化功能旺盛,才能保证将水谷转化为精微,再输布全身,化生为血液。异功散是“运脾法”的代表方剂。异功散全方,人参为君,《中华人民共和国药典(2020年版):一部》^[20]记载其“甘、微苦、微温,



注:NAR为柚皮素。红色箭头代表坏死区与正常脾组织界线,绿色箭头代表中性粒细胞浸润。
图 12 柚皮素对各组小鼠脾组织形态结构的影响(苏木精-伊红染色,×100)



注:A为各组磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(p-MEK)、丝裂原活化蛋白激酶(MEK)、磷酸化细胞外信号调节激酶1/2[p-ERK(1/2)]、细胞外信号调节激酶1/2[ERK(1/2)]、磷酸化逆转录病毒癌蛋白网状内皮增生病毒癌基因同源物A(p-P65)、逆转录病毒癌蛋白网状内皮增生病毒癌基因同源物A(P65)及糖酵解磷酸酶脱氢酶(GAPDH)的蛋白电泳条带图;B为各组p-MEK/MEK表达比较图;C为各组p-ERK(1/2)/ERK(1/2)表达比较图;NAR为柚皮素;D为各组p-P65/P65表达比较图。与空白组比较,* $P<0.05$,与模型组比较,# $P<0.05$;n=3, $\bar{x}\pm s$ 。

图 13 各组小鼠脾组织 MEK 通路相关蛋白电泳表达

归肺、脾、心、肾经,具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智之功”。臣以白术“苦、甘、温,归脾、胃经,具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎之

功”;茯苓“甘、淡、平,归心、肺、脾、肾经,具有利水渗湿、健脾、宁心之功”。甘草为使,“甘、平,归心、肺、脾、胃经,具有补脾和胃、益气复脉之功”。佐以味苦、辛、

温的陈皮,以奏理气健脾、燥湿化痰、行气化滞之功。陈皮虽为佐药,却是“运脾”的关键,使全方补而不滞、补中有行。

脾脏是机体最大的免疫器官,占全身淋巴组织总重量的 25%,含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心,也是铁代谢和 RBC 代谢的重要场所。脾的运化功能是脾生血的前提和基础。现代医学研究^[21]通过化疗药物顺铂注射大鼠体内造模使得大鼠全血细胞减少,形成“脾虚大鼠”,结果发现大鼠的脾组织上清液及匀浆可以增加贫血大鼠的血细胞,其中以正常脾组织上清液静脉注射效果为佳,初步肯定人体脾脏具有分泌造血调控因子的功能,证实中医脾脏与人体脾脏同名同器。中医脾主生血,可能与脾脏所分泌的造血调控因子——“脾生血诱导素”有关^[21]。因此,脾脏是“中焦受气取汁”的重要器官。本研究发现柚皮素提升 ACD 小鼠 Hb 和 SI 水平,降低血清 SF,提示柚皮素是陈皮的有效活性成分,可调节 ACD 铁代谢,提高 Hb 水平;柚皮素可以降低 ACD 小鼠外周血 WBC 水平,减少脾组织骨髓坏死和中性粒细胞浸润,修复脾组织坏死的红髓,提示柚皮素通过减轻 ACD 的炎症反应,改善铁代谢,进而维持 RBC 稳态。

促炎性细胞因子 IL-6 被认为是 ACD 铁代谢紊乱的关键介质之一,IL-6 可通过 STAT3 信号通路驱动铁调素的表达^[12, 22]。铁调素是肝细胞调控铁代谢的关键蛋白^[23],炎症刺激铁调素升高,使铁在单核巨噬细胞中过度蓄积,无法参与循环利用而导致 SI 水平降低。另外,IL-1 β ^[24]、IFN- γ ^[25]、 α 干扰素(IFN- α)^[26]还能直接抑制红系祖细胞增殖,增强髓系祖细胞增殖和巨噬细胞系分化,减少 Hb 的生成。因此,促炎性细胞因子过表达是引起铁代谢紊乱、破坏 RBC 生成稳态,导致 ACD 发生的重要源头。目前已证实异功散可通过多种途径抑制炎症^[27],包括直接抑制 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等多种炎症因子的产生;通过抑制自由基的产生和提高抗氧化剂的活性起到抗氧化作用;调控炎症相关信号通路,如 NF- κ B 和 MAPK 等。本次研究采用网络药理学分析,发现陈皮中活性成分柚皮素所作用的 MAPK3 可能是陈皮区别于四君子汤的特异性靶点,其作用机制可能与调控 MEK-ERK(1/2)-NF- κ B 信号通路有关。分子对接结果亦显示,柚皮素与 MAPK3 有较稳定的结合活性。

柚皮素是柚皮苷的苷元,是中药陈皮的主要成分之一。柚皮素具有降低急性和慢性炎症反应的作用,研究表明其抗炎作用有治疗炎症相关疾病的潜能,如肿瘤、肝炎、纤维化、代谢性疾病等^[28-31]。柚皮素对炎症因子的转录调节主要涉及 MAPK、NF- κ B 信号通路,MAPK 信号通路的激活也可以引起 NF- κ B 表达的升高。ERK(1/2)是一条经典的 MAPK 信号传导通路,MAPK3

(即 ERK1),正是该信号通路中的关键靶点之一。MEK-ERK(1/2)途径作为 NF- κ B 的上游信号,在外界因素刺激下,ERK1/2 被激活发生磷酸化,p-ERK(1/2)可以使 NF- κ B 二聚体解体并发生磷酸化,而后从细胞质转入细胞核,释放多种促炎性细胞因子,而被释放的促炎性细胞因子又可以进一步激活 NF- κ B,使得炎症反应被放大。柚皮素通过抑制 ERK(1/2)的磷酸化,中断 MAPK 的三级酶促级联反应激活途径^[32]。已有研究^[33-34]证实,柚皮素可以通过直接抑制 NF- κ B 的活化,降低 NF- κ B 依赖性促炎性细胞因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等)的表达,避免其进一步激活 NF- κ B。我们此次的研究同样证明了柚皮素这一作用机制。柚皮素可以明显降低 ACD 模型组小鼠脾组织中 p-MEK/MEK、p-ERK(1/2)/ERK(1/2)、p-P65/P65 的表达,提示柚皮素可能通过下调 MEK-ERK(1/2)-NF- κ B 信号通路减少炎症因子表达。

综上所述,本研究探索发现“运脾法”代表方异功散“运脾”的物质基础之一是陈皮的活性成分柚皮素;证明了柚皮素可能是通过下调 MEK-ERK(1/2)-NF- κ B 通路而减轻炎症反应,改善铁代谢,促进 RBC 稳态恢复,提升 Hb。此外,本次网络药理分析发现的陈皮另一活性成分川陈皮素所作用的靶点 CREB1 可能是异功散治疗 ACD 的另一个机制,仍待实验验证。本研究运用现代科研手段部分剖析“运脾法”的代表方异功散治疗 ACD 的作用机制,阐释了“运脾”可能的作用机制,为中医理论提供了科学依据。

参考文献:

- [1] LANSER L, FUCHS D, KURZ K, et al. Physiology and inflammation driven pathophysiology of iron homeostasis-mechanistic insights into anemia of inflammation and its treatment [J]. *Nutrients*, 2021, 13 (11): 3732.
- [2] ZHANG X, HUANG J X, TANG M, et al. A comprehensive analysis of the association between anemia and systemic inflammation in older patients with cancer[J]. *Support Care Cancer*, 2023, 32(1): 39.
- [3] GANZ T. Anemia of inflammation [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381 (12): 1148-1157.
- [4] KRISHNAMURTHY S, KUMAR B, THANGAVELU S. Clinical and hematological evaluation of geriatric anemia [J]. *J Family Med Prim Care*, 2022, 11(6): 3028-3033.
- [5] RANDI M L, BERTOZZI I, SANTAROSSA C, et al. Prevalence and causes of anemia in hospitalized patients: Impact on diseases outcome [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(4): 950.
- [6] CERCAMONDI C I, STOFFEL N U, MORETTI D, et al. Iron homeostasis during anemia of inflammation: a prospective study of patients with tuberculosis [J]. *Blood*, 2021, 138(15): 1293-1303.
- [7] MARQUES O, WEISS G, MUCKENTHALER M U. The role of iron in chronic inflammatory diseases: from mechanisms to treatment options in anemia of inflammation [J]. *Blood*, 2022, 140(19): 2011-

- 2023.
- [8] GINZBURG Y Z. Hepcidin-ferroportin axis in health and disease[J]. Vitam Horm, 2019, 110: 17-45.
- [9] CHEN N, HAO C, LIU B C, et al. Roxadustat treatment for anemia in patients undergoing long-term Dialysis[J]. N Engl J Med, 2019, 381(11): 1011-1022.
- [10] SHINOZAKI Y, FUKUI K, KOBAYASHI H, et al. JTZ-951 (enarodustat), a hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor, improves iron utilization and anemia of inflammation; Comparative study against recombinant erythropoietin in rat[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 898: 173990.
- [11] SHU W, PANG Z, XU C, et al. Anti-TNF- α monoclonal antibody therapy improves anemia through downregulating hepatocyte hepcidin expression in inflammatory bowel disease [J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 4038619.
- [12] CAPPELLINI M D, SCARAMELLINI N, MOTTA I. Iron status in chronic inflammatory disease: therapeutic implications[J]. Pol Arch Intern Med, 2023, 133(2): 16430.
- [13] 薛城, 郑秦, 季玉婷, 等. 异功散联合常规西药治疗慢性病贫血(脾气虚证)的随机、双盲、安慰剂对照临床研究[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(S1): 81-85.
- [14] 郑秦, 姜一陵, 季玉婷, 等. 异功散对小鼠慢性病贫血的治疗作用[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(6): 421-427.
- [15] ZHENG Q, GUAN Y, XIA L, et al. Effect of Yi Gong San Decoction on iron homeostasis in a mouse model of acute inflammation[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 2696480.
- [16] 石岭, 季玉婷, 郑秦, 等. 基于运脾法拆方研究异功散治疗慢性病贫血的机制[J/OL]. 北京中医药大学学报, 2024[2024-08-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3574.R.20240820.1112.002.html>.
- [17] USACHEVA T, GAMOV G, BYCHKOVA A, et al. Binding of quercetin and curcumin to human serum albumin in aqueous dimethyl sulfoxide and in aqueous ethanol[J]. J Therm Anal Calorim, 2022, 147(9): 5511-5518.
- [18] LASOCKI S, MILLOT S, ANDRIEU V, et al. Phlebotomies or erythropoietin injections allow mobilization of iron stores in a mouse model mimicking intensive care anemia[J]. Crit Care Med, 2008, 36(8): 2388-2394.
- [19] RIVERA S, GANZ T. Animal models of anemia of inflammation[J]. Semin Hematol, 2009, 46(4): 351-357.
- [20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版):一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [21] 王学文, 胡剑北, 王秀. 脾主生血的形体医理学实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(2): 282-285.
- [22] CUI F, SUN J, MI H, et al. Chronic intermittent hypobaric hypoxia improves iron metabolism disorders via the IL-6/JAK2/STAT3 and Epo/STAT5/ERFE signaling pathways in metabolic syndrome rats[J]. J Trace Elem Med Biol, 2023, 79: 127259.
- [23] JIA J, ZHANG Y, ZHANG H, et al. Hepcidin expression levels involve efficacy of pegylated interferon- α treatment in hepatitis B-infected liver[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 107: 108641.
- [24] CAIADO F, PIETRAS E M, MANZ M G. Inflammation as a regulator of hematopoietic stem cell function in disease, aging, and clonal selection[J]. J Exp Med, 2021, 218(7): e20201541.
- [25] FLOREZ M A, MATATALL K A, ORTINAU L, et al. IFN- γ stimulation induces hematopoietic stem cell homing and niche relocation[J]. Blood, 2019, 134(Suppl 1): 3726.
- [26] RYAN J D, ALTAMURA S, DEVITT E, et al. Pegylated interferon- α induced hypoferrremia is associated with the immediate response to treatment in hepatitis C[J]. Hepatology, 2012, 56(2): 492-500.
- [27] 夏黎, 罗梅宏. 异功散抗炎机制研究进展[J]. 山东中医杂志, 2023, 42(8): 898-904.
- [28] CHEN L, XIA S, WANG S, et al. Naringenin is a potential immunomodulator for inhibiting liver fibrosis by inhibiting the cGAS-STING pathway[J]. J Clin Transl Hepatol, 2023, 11(1): 26-37.
- [29] ZARAGOZÁ C, VILLAESCUSA L, MONSERRAT J, et al. Potential therapeutic anti-inflammatory and immunomodulatory effects of dihydroflavones, flavones, and flavonols[J]. Molecules, 2020, 25(4): 1017.
- [30] PALLOTTINI V, SEGATTO M, ACCONCIA F, et al. Mechanism underlying naringenin hypocholesterolemic effects: involvement of estrogen receptor α subtype[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24):15809.
- [31] ZHAO Y, TAN H, ZHANG J, et al. Developing liver-targeted naringenin nanoparticles for breast cancer endocrine therapy by promoting estrogen metabolism[J]. J Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 122.
- [32] YU D H, MA C H, YUE Z Q, et al. Protective effect of naringenin against lipopolysaccharide-induced injury in normal human bronchial epithelium via suppression of MAPK signaling[J]. Inflammation, 2015, 38(1): 195-204.
- [33] BUSSMANN A J C, BORGHI S M, ZANINELLI T H, et al. The citrus flavanone naringenin attenuates zymosan-induced mouse joint inflammation: induction of Nrf2 expression in recruited CD45⁺ hematopoietic cells[J]. Inflammopharmacology, 2019, 27(6): 1229-1242.
- [34] KATAOKA H, SAEKI A, HASEBE A, et al. Naringenin suppresses Toll-like receptor 2-mediated inflammatory responses through inhibition of receptor clustering on lipid rafts[J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(2): 963-972.

编辑:季春来

收稿日期:2024-03-04