

基于 PI3K/Akt 信号通路探讨和枢消积方对肝纤维化大鼠的影响

干佳岑¹，彭孟云²，蒲清荣³，王晓栋²，汪静^{2*}

(1. 西南医科大学中西医结合学院, 四川泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院肝胆病科, 四川泸州 646000; 3. 西南医科大学附属中医医院药剂科, 四川泸州 646000)

摘要: 目的 探究和枢消积方对肝纤维化大鼠的影响。方法 40只大鼠随机分为模型组, 和枢消积方低、中、高剂量组(1.625、3.25、6.5 g/kg), 秋水仙碱组(0.12 mg/kg), 每组8只, 腹腔注射40%四氯化碳6周建立肝纤维化模型, 同时给予相应药物干预6周; 另取8只大鼠作为正常组, 予以生理盐水(1 mL/100 g)干预6周。给药结束后, 检测肝功能及肝脏组织病理学变化, 免疫组化法检测肝组织 α -SMA蛋白表达, Western blot法检测肝组织Collagen I、Collagen III蛋白表达。利用网络药理学预测和枢消积方防治肝纤维化相关靶点及信号通路, 并通过ELISA、RT-qPCR、Western blot法对相关靶点和信号通路进行验证。结果 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织胶原沉积, 汇管区炎症细胞浸润, 血清ALT、AST、TBIL、ALP水平升高($P<0.01$), 肝组织 α -SMA、Collagen I、Collagen III蛋白水平表达升高($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组肝组织炎症及胶原沉积均改善, 血清ALT、AST、TBIL、ALP水平降低($P<0.01$), 和枢消积方高剂量组和秋水仙碱组肝组织 α -SMA、Collagen I、Collagen III蛋白表达降低($P<0.05$)。网络药理学显示, 和枢消积方防治肝纤维化核心靶点主要为Akt1、TP53、VEGFA、IL-1 β , 可通过调控PI3K/Akt、TNF- α 、IL-17等通路发挥改善肝纤维化作用。与正常组比较, 模型组大鼠肝组织PI3K、Akt mRNA表达, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平和p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt1蛋白表达升高($P<0.01$); 与模型组比较, 和枢消积方高剂量组和秋水仙碱组肝组织PI3K、Akt mRNA表达降低($P<0.05$, $P<0.01$), 各给药组肝组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平和p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt1蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 和枢消积方可减轻肝纤维化大鼠肝脏炎症反应, 从而发挥改善肝纤维化作用, 其机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路相关。

关键词: 和枢消积方; 肝纤维化; PI3K/Akt信号通路; 炎症; 和调理论

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)07-2400-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.047

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是由病毒性肝炎、饮酒、非酒精性脂肪性肝炎等多种原因所导致慢性肝病过程中的肝组织损伤过度修复反应^[1], 当损伤因素持续存在时, 肝脏产生慢性炎症, 导致异常的伤口愈合反应, 当肝细胞损伤超过肝再生能力时, 会加剧HF并进展为肝硬化, 甚至转变为肝癌^[2-3], 故及时控制肝脏炎症、改善肝纤维化对降低肝硬化和肝癌的发病率具有重要意义。

和枢消积方是传承全国名中医孙同郊教授“和调”学术思想和“枢机”理论, 由四川省名中医汪静教授研制的纯中药复方制剂(国家发明专利号ZL. 200810147774.1), 具有清热利湿、调和肝脾、固本消积之功。课题组前期研究发现, 和枢消积方可改善二甲基亚硝胺诱导肝损伤小鼠肝功能, 减轻肝细胞坏死程度, 具有良好的抗炎保肝作用; 可抑制HepG2细胞增殖, 诱导HepG2细胞凋亡^[4-6]。基于

“肝炎-肝纤维化-肝癌轴”理论^[7], 推测和枢消积方可能通过抑制肝脏炎症反应从而改善HF, 但其具体作用机制尚不明确。因此, 本研究探究和枢消积方对四氯化碳诱导大鼠HF的防治作用, 利用网络药理学预测该方防治HF的靶点及潜在通路, 并通过动物实验进行验证, 以期为其防治本病提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠, 体质量(200±10)g, 由西南医科大学实验动物中心提供。动物实验通过西南医科大学动物福利伦理委员会审核(伦理号swmu20230086)。

1.2 药物 和枢消积方组方药材(柴胡6 g、酒黄芩4.5 g、黄芪5 g、炙甘草1.5 g、连翘5 g、麸炒白术3 g、白芍5 g、茜草0.5 g、麦芽1 g、肉桂0.5 g、海螵蛸2 g、醋鳖甲1 g、鸡内金1 g、冰片0.05 g、薄荷脑0.05 g)均由西南医科大学附属中医医院提供, 经西南医科大学附属中

收稿日期: 2024-03-13

基金项目: 国家中医临床研究基地建设单位项目(国中医药科技函[2018]131号); 四川省科技厅重点研发计划项目(2022YFS0619); 四川省中医药管理局项目(2021MS140, 2022CP3628); 泸州市科技局项目(2022-JYJ-142)

作者简介: 干佳岑(1998—), 女, 硕士生, 研究方向为中医药防治慢性肝病。Tel: 18708116897, E-mail: 1033131261@qq.com

*通信作者: 汪静(1968—), 女, 硕士, 主任中医师, 研究方向为中医药防治慢性肝病。Tel: 13882726162, E-mail: lywj68@126.com

医医院制剂室主任蒲清荣鉴定为正品。采取传统煎药法制成质量浓度为 6.5 g/mL 的溶液, 即高剂量组, 稀释后得到相应中、低剂量, 4 ℃保存。秋水仙碱(货号 IC-7670)购自北京索莱宝科技有限公司, 将其溶于生理盐水中, 制成质量浓度为 0.03 mg/mL 的溶液。

1.3 试剂 HE 染色试剂盒、改良 Masson 三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 货号 G1120、G1346); SP 免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号 pv-9000); GOT、GPT、TBIL、ALP、 γ -GGT(南京建成生物工程研究所, 货号 C010-2-1、C009-2-1、C019-1-1、A059-2-2、C017-2-1); α -SMA、Collagen I、Collagen III、PI3K、p-PI3K(英国 Abcam 公司, 货号 ab138492、ab6308、ab7778、ab74136、ab182651); Akt1、p-Akt、GAPDH(美国 Santa 公司, 货号 SC-5298、SC-514032、SC-47724); TNF α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 检测试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司, 货号 SEA133Ra、SAE563Ra、SEA079Ra)。

1.4 仪器 超低温冰箱(美国 Thermo 公司); 倒置拍照显微镜(日本 Nikon 公司); 自动酶标仪(美国 Bioteck Synergy 公司); 石蜡切片机(德国 Leica 公司); 实时荧光定量 PCR 仪(武汉生命科技股份有限公司); 高速低温离心机(美国 Sigma 公司); PCR 扩增仪、凝胶扫描成像系统、荧光化学发光图像分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 48 只大鼠适应性喂养 1 周后, 随机数字表法分为正常组, 模型组, 和枢消积方低、中、高剂量组, 秋水仙碱组。正常组大鼠腹腔注射生理盐水 2 mL/kg, 其余各组腹腔注射 40% 四氯化碳橄榄油溶液(初次 3 mL/kg, 第 2 次开始每次 2 mL/kg)诱导肝纤维化, 每 3 d 1 次, 共 6 周。从造模第 2 天起灌胃给药, 正常组及模型组灌胃给予生理盐水(1 mL/100 g), 和枢消积方低、中、高剂量组分别灌胃给予 1.625、3.25、6.5 g/kg 和枢消积方(给药剂量参照《实验动物学》中人与大鼠剂量换算法进行计算), 秋水仙碱组灌胃给予 0.12 mg/kg 秋水仙碱, 每天 1 次, 连续 6 周。6 周后, 随机取模型组大鼠 2 只行 HE 染色及 Masson 染色, 评估造模是否成功。

2.2 取材 造模成功、给药结束后, 大鼠禁食不禁水过夜, 腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠(1 mL/100 g)进行麻醉, 取腹主动脉血及肝组织, 于-80 ℃冰箱保存。

2.3 肝功能检测 采用试剂盒检测大鼠血清 ALT、AST、TBIL、ALP、 γ -GGT 活性, 严格按照试剂盒说明书操作。

2.4 病理学观察 取大鼠肝组织, 行 HE 染色及 Masson 染色检测炎症及肝组织纤维化程度。

2.5 免疫组化法观察大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达 大鼠肝组织蜡块包埋, 切片, 脱蜡至水, 抗原修复, 加一抗、二抗孵育, 滴加 DAB 显色液, 复染细胞核, 常规脱水透明, 于显微镜下观察。

2.6 Western blot 法检测大鼠肝组织 Collagen I、Collagen

III 蛋白表达 取大鼠肝组织约 50 mg, 加入 RIPA 裂解, 提取蛋白并测定浓度, 电泳、转膜后置于 5% BSA 溶液中室温封闭 1 h, 加入相应一抗(1:1000), 4 ℃摇床孵育过夜, 次日 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加二抗(1:5000)室温摇床孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 滴加适量显影液, 在 Bio-Rad GelDocXR 仪器上进行信号检测, 以 GAPDH 为内参, 通过 Image J 软件分析条带灰度值。

2.7 网络药理学分析

2.7.1 和枢消积方与 HF 蛋白互作网络(PPI)构建 从中药系统药理学数据库与分析平台(<https://old.tcmsp-e.com/>)、SymMaP(<http://www.symmap.org/>)数据库中检索获得和枢消积方中各味药的成分信息, 从中药系统药理学数据库与分析平台获得各成分的靶标信息; 从 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库中搜索肝纤维化相关基因, 获得肝纤维化疾病靶标基因。对和枢消积方多成分靶基因和肝纤维化疾病靶基因进行基因去重, 绘制韦恩图, 获得两者共有基因, 并在 STRING(<https://cn.string-db.org/>)数据库构建 PPI 分析。

2.7.2 和枢消积方防治 HF 信号通路分析 使用 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库对和枢消积方潜在作用靶点进行 GO 及 KEGG 通路富集分析。

2.8 验证试验

2.8.1 ELISA 法检测大鼠肝组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平 取大鼠肝组织适量, 制备组织匀浆, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平。

2.8.2 RT-qPCR 法检测大鼠肝组织 PI3K、Akt mRNA 表达 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表 1。各组大鼠肝组织使用 TRIzol 法提取 RNA, 试剂盒逆转录成 cDNA, SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒进行 RT-qPCR 检测, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量。

表 1 引物序列

基因	序列	长度/bp
PI3K	正向 5'-CTTGCTCCATTACACCCCTCT-3'	97
	反向 5'-GCCTCTAACCTTCTCCCTCTCCCTC-3'	
Akt	正向 5'-TGTCTCGTGAGCGCGTGTCTT-3'	159
	反向 5'-CCGTTATCTTGATGTGCCCCGTC-3'	
β -actin	正向 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	150
	反向 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	

2.8.3 Western blot 法检测大鼠肝组织 PI3K、p-PI3K、Akt1、p-Akt 蛋白表达 方法同“2.5”项。

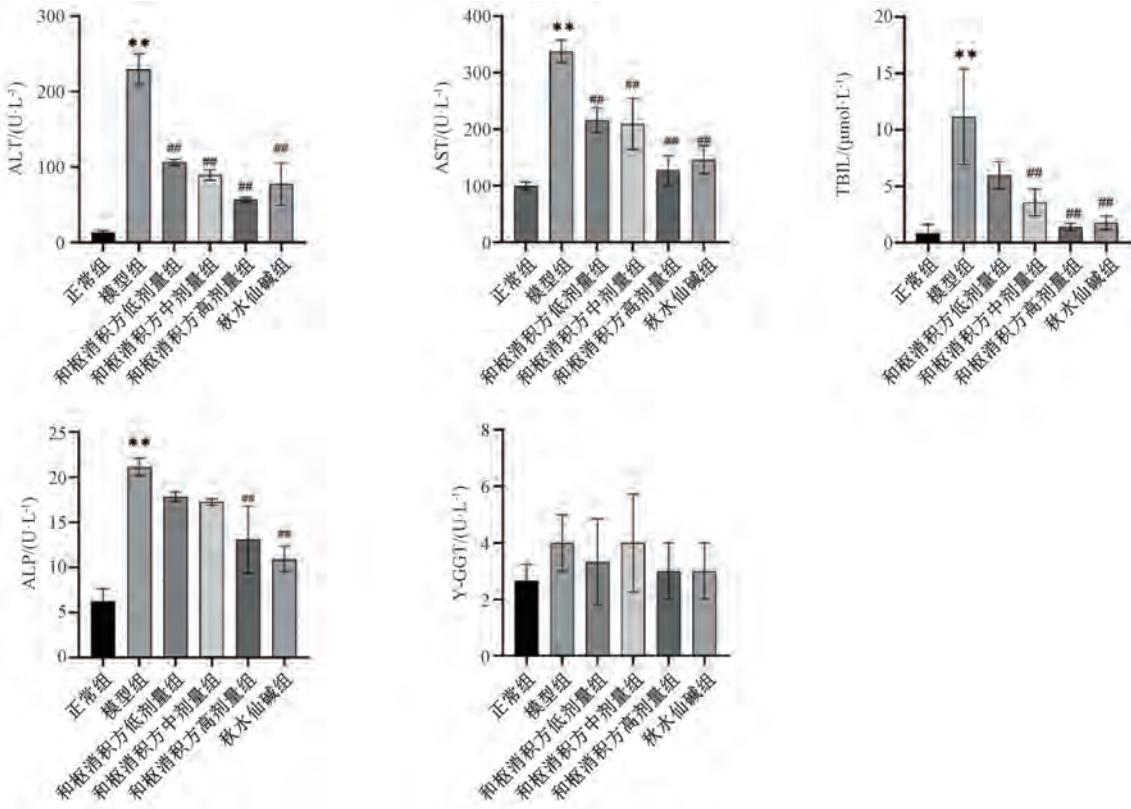
2.9 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行处理, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 和枢消积方对 HF 大鼠肝功能的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清 ALT、AST、TBIL、ALP 水平升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 和枢消积方各剂量组和秋水仙碱组大鼠血清 ALT、AST 水平降低($P < 0.01$), 和枢消积

方中、高剂量组和秋水仙碱组大鼠血清 TBIL 水平降低 ($P<0.01$)，和枢消积方高剂量组和秋水仙碱组大鼠血清

ALP 水平降低 ($P<0.01$)，各组大鼠血清 γ -GGT 活力无明显变化 ($P>0.05$)，见图 1。



注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 1 和枢消积方对 HF 大鼠肝功能的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

3.2 和枢消积方对 HF 大鼠肝组织病理学的影响 正常组大鼠肝组织肝细胞排列规则，肝小叶结构完好；与正常组比较，模型组大鼠肝细胞排列杂乱，肝小叶结构被破坏，炎性细胞浸润，胶原沉积增多 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠肝组织肝小叶结构改善，炎性细胞浸润减少，胶原沉积减少 ($P<0.01$)，以和枢消积方高剂量组和秋水仙碱组更明显，见图 2~3。

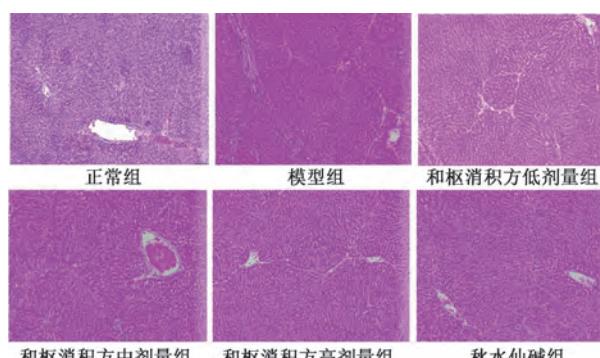


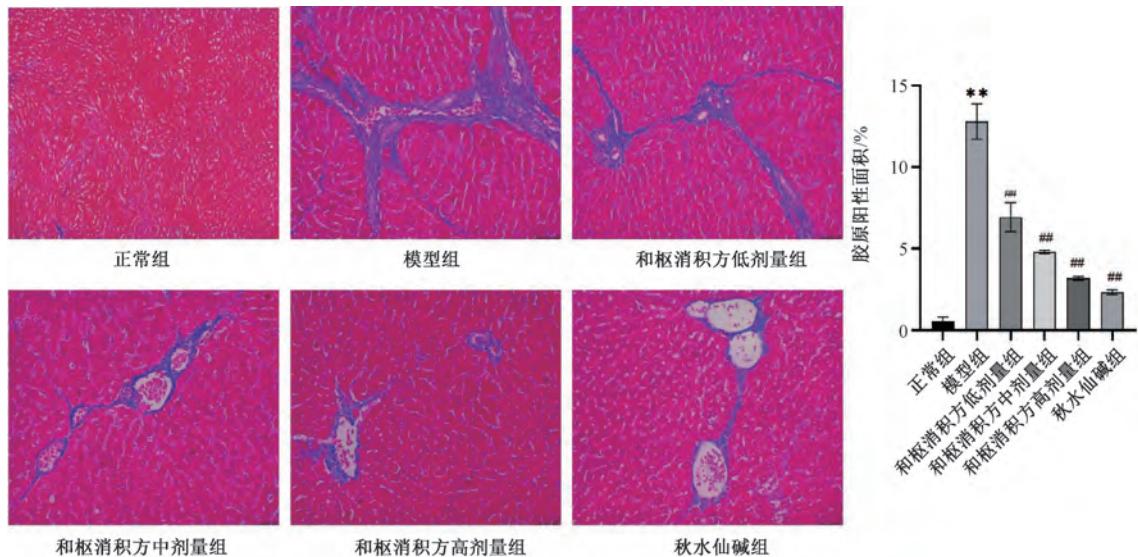
图 2 各组大鼠肝组织 HE 染色 ($\times 100$)

3.3 和枢消积方对 HF 大鼠肝组织 α -SMA、Collagen I、Collagen III 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组大鼠肝组织 α -SMA、Collagen I、Collagen III 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，

与模型组比较，和枢消积方各剂量组及秋水仙碱组 α -SMA 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，和枢消积方高剂量组及秋水仙碱组 Collagen I、Collagen III 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，见图 4~5。

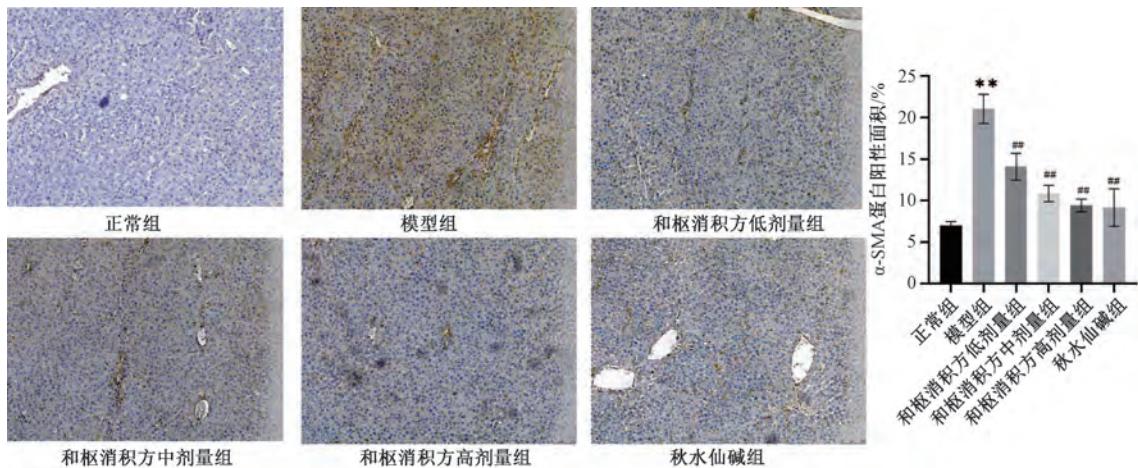
3.4 和枢消积方防治 HF 的靶点及潜在通路 通过中药系统药理学数据库与分析平台、SymMap 数据库筛选，获得和枢消积方对应药物成分 278 种，从 GeneCards 数据库中获得肝纤维化靶点 6 378 个，两者取交集，获得 220 个靶点，见图 6。通过 STRING 数据库构建 PPI 网络，见图 7，其中排名前十的核心靶点分别为 Akt1、TP53、VEGFA、JUN、IL1B、CASP3、EGFR、MAPK3、STAT3、MYC。GO 功能富集分析显示，其生物过程主要富集在脂多糖反应、乙醇反应、缺氧反应等，细胞组成主要富集在腹壁、染色质、细胞外空间等，分子功能主要富集在 RAN 聚合酶合成、酶结合、血红素结合等。KEGG 富集分析显示，和枢消积方防治 HF 的信号通路主要富集在 AGE/RAGE、TNF、PI3K/Akt 等，见图 8。

3.5 和枢消积方对 HF 大鼠肝组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响 与正常组比较，模型组大鼠肝组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠肝组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 9。



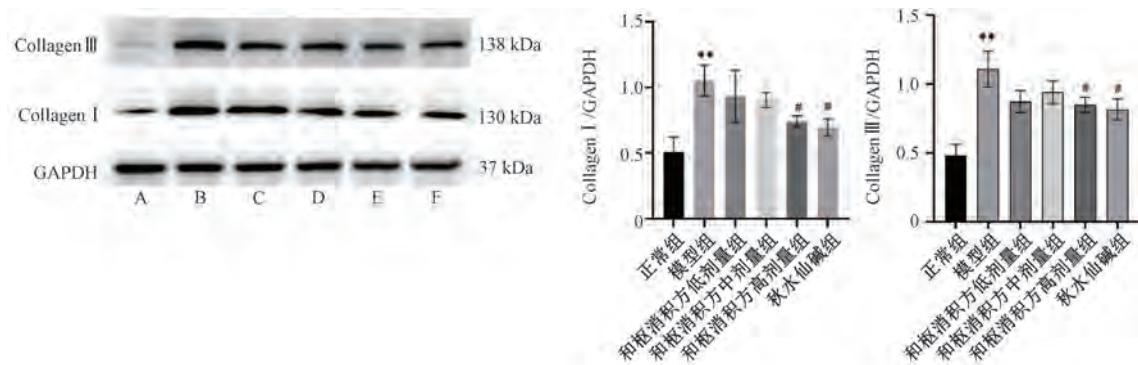
注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠肝组织 Masson 染色及胶原阳性面积比较 ($\times 200$, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)



注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图4 和枢消积方对 HF 大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\times 100$, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)



注: A 为正常组, B 为模型组, C~E 分别为和枢消积方低、中、高剂量组, F 为秋水仙碱组。与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.05$ 。

图5 和枢消积方对 HF 大鼠肝组织 α -SMA、Collagen I、Collagen III 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

3.6 和枢消积方对 HF 大鼠肝组织 PI3K/Akt 信号通路的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织 *PI3K*、*Akt* mRNA 表

达和 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt1 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 和枢消积方高剂量组和秋水仙碱组大鼠肝

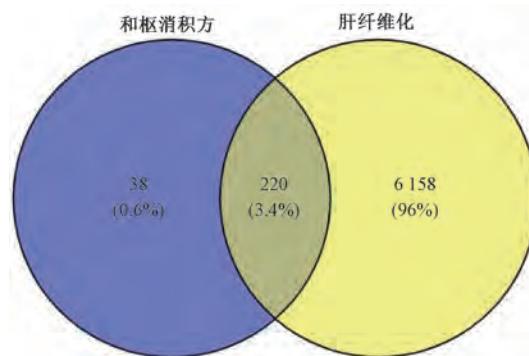


图6 和枢消积方与HF交集靶点

组织 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，各给药组大鼠肝组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt1 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 10~11。

4 讨论

肝纤维化是慢性肝炎发展为肝硬化甚至肝癌的关键步骤。据流行病学报道显示，我国每年死于肝硬化或肝癌的

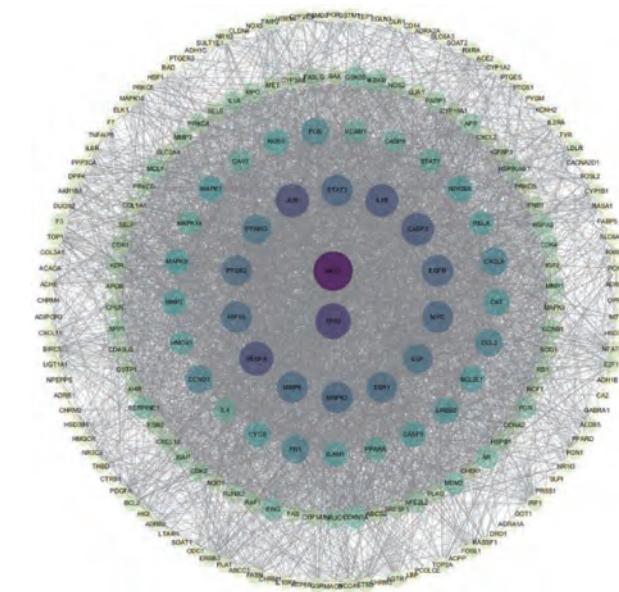


图7 交集靶点 PPI 蛋白互作图

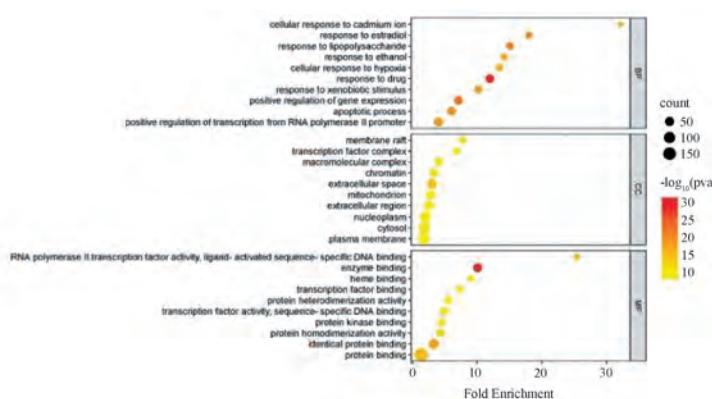
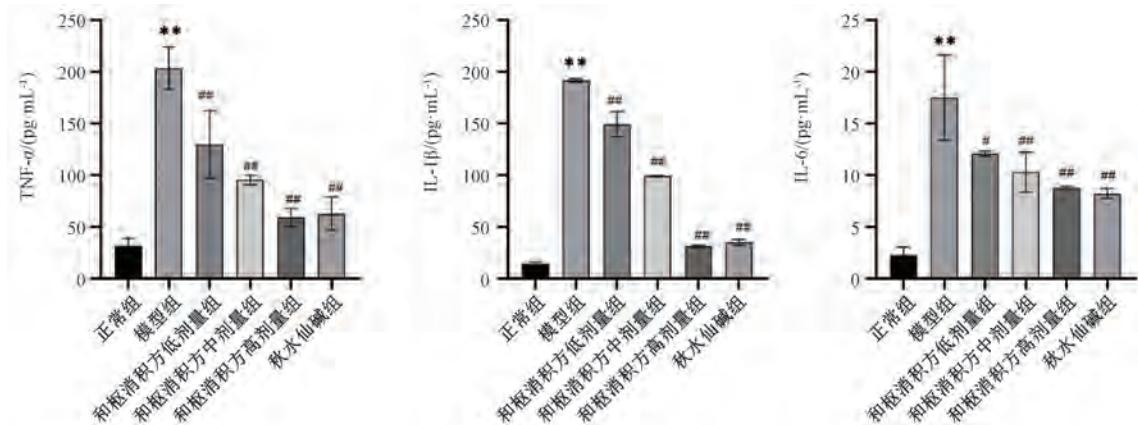


图8 和枢消积方防治HF靶点GO功能、KEGG通路富集分析

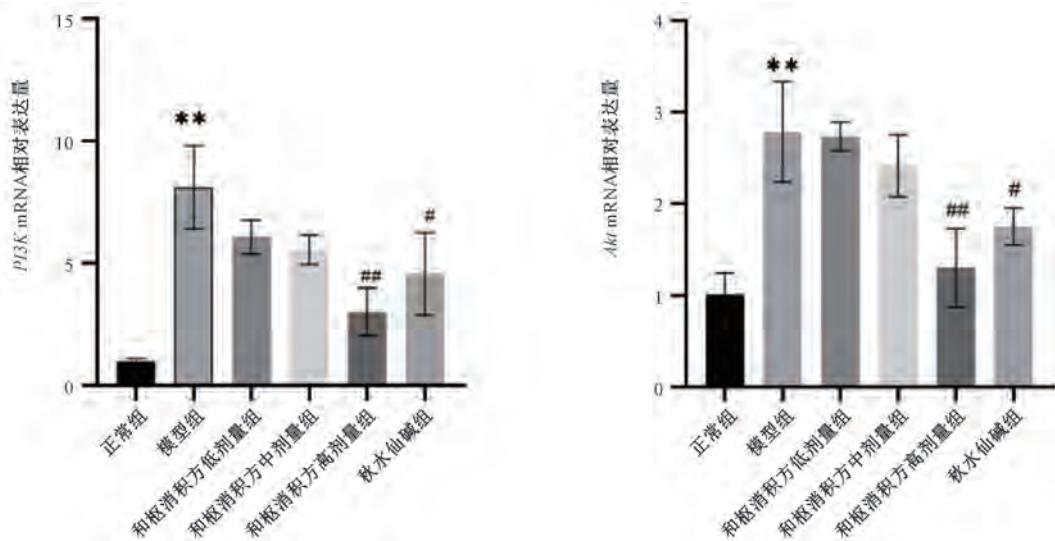


注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图9 和枢消积方对HF大鼠肝组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

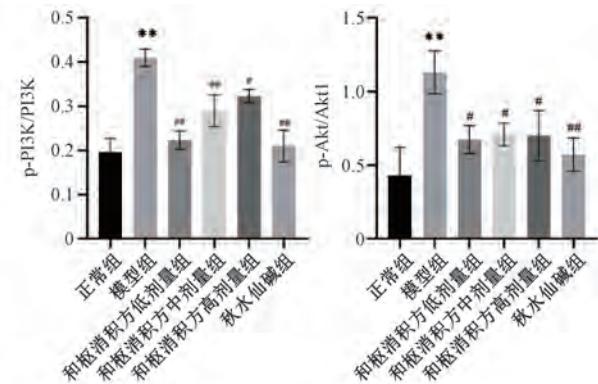
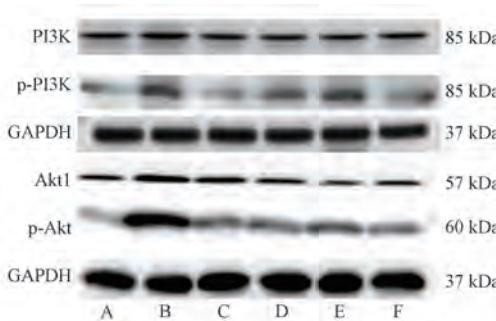
人数约为 38 万^[8]，而 85% 以上原发性肝癌都是在慢性肝炎-肝纤维化或肝硬变过程后形成，故及时控制肝纤维化的进展是预防肝硬化和肝癌发生的重要举措。现代医学尚无

明确用于治疗肝纤维化的药物，而中医在治疗肝纤维化方面具有突出优势。肝纤维化属于祖国医学“积聚”“肝着”范畴，其基本病机为正虚邪实。其中肝脾受损、邪实内结



注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 10 和枢消积方对 HF 大鼠肝组织 PI3K、Akt mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



注: A 为正常组, B 为模型组, C~E 分别为和枢消积方低、中、高剂量组, F 为秋水仙碱组。与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 11 和枢消积方对 HF 大鼠肝组织 PI3K、Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

与肝硬化-肝癌癌前病变相吻合^[9]。和枢消积方由柴胡、酒黄芩、鸡内金、黄芪、生麦芽、茜草等药组成。方中柴胡疏肝理气, 黄芩清泄邪热, 两者共为君药, 调和少阳枢机; 鸡内金善化瘀结, 降胃气, 麦芽行气消食, 疏肝气, 两药共为臣药, 使肝气升发, 胃气通降, 脾气健运; 黄芪、白术、肉桂共同养护先后天, 以抑肝木, 诸药配伍, 共具调和肝脾、固本消积之功。

α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 是肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化的标志, HSC 活化后 α -SMA 蛋白表达增高, 合成包括 Collagen I、Collagen III 在内的细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM)^[10]。本研究结果显示, 和枢消积方干预后肝纤维化大鼠肝脏炎症和肝脏胶原沉积减少, 肝功能指标及 α -SMA、Collagen I、Collagen III 蛋白表达降低, 表明和枢消积方可能通过抑制 HSC 活化, 降低 α -SMA 蛋白表达, 减少肝组织中胶原沉积。为探求和枢消积方防治 HF 作用机制, 通过网

络药理学预测其改善 HF 靶点及潜在通路, 结果显示该方主要通过 PI3K/Akt、TNF- α 、IL-17 等信号通路发挥抗炎、抗肝纤维化、抗肿瘤等作用。

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子是肝纤维化发生发展过程中不可或缺的促炎因子。研究表明, TNF- α 可活化 HSC^[11], 活化的 HSC 会进一步导致炎症因子产生^[12-13], 且活化的 HSC 可分泌 α -SMA、Collagen I、Collagen III 等肝纤维化因子, 最终导致肝脏中 ECM 沉积, 因此抑制 HSC 活化及 ECM 合成是逆转肝纤维化的关键^[14]。PI3K/Akt 信号通路通过参与细胞增殖、存活、粘附、迁移等功能影响 HF 的发生发展^[15], 可诱导机体产生大量的炎症因子及促纤维因子, 导致 HSC 活化与增殖, 促进肝纤维化发生发展^[16-18], 且抑制 HSC 中 PI3K 信号传导可减少 ECM 沉积, 包括 I 型胶原的合成, 并降低促纤维化因子水平^[19]。本研究结果表明, 和枢消积方干预后大鼠肝组织中 PI3K、Akt mRNA 表达降低, TNF α 、IL-1 β 、IL-6 水平和 p-Akt/Akt1、p-PI3K/

PI3K蛋白表达降低,表明和枢消积方可能通过抑制PI3K/Akt信号通路的激活,减轻大鼠肝组织炎症反应,从而抑制HSC活化和胶原合成,发挥改善肝纤维化作用。

综上所述,本研究通过动物实验验证和枢消积方防治HF的作用,对其可能的靶点进行预测分析,并初步验证了部分作用机制,为进一步探讨该方抗炎、抗肝纤维化、抗肿瘤活性提供了重要的科学依据。今后,课题组将围绕“肝炎-肝纤维化-肝癌”轴继续研究和枢消积方作用于肝脏的药理作用,并开展相关基础、临床转化研究。

参考文献:

- [1] 徐列明,刘平,沈锡中,等.肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019年版)[J].中国中西医结合杂志,2019,39(11):1286-1295.
- [2] 王洁,冯驰,董武,等.斑马鱼肝纤维化动物模型研究进展[J].中国实验动物学报,2023,31(4):531-540.
- [3] 李郁茹,赵亚芳,程国良,等.荆防颗粒对CCl₄诱导小鼠肝纤维化的治疗作用及其机制研究[J].中国中药杂志,2022,47(22):6127-6136.
- [4] 张玉蓉,朱晓宁,张秀,等.和枢消积丸对二甲基亚硝胺诱导的小鼠肝损伤的保护作用研究[J].四川中医,2023,41(2):63-66.
- [5] 杨宗林.和枢消积丸调控NS5ATP13正反馈AKT/GSK/mTOR信号通路对人肝癌细胞系HepG2增殖凋亡的影响[D].泸州:西南医科大学,2022.
- [6] 李玲.和枢消积丸通过调节AsTP3正反馈AKT/GSK-3β/mTOR信号通路对人肝癌细胞系增殖及凋亡的影响[D].泸州:西南医科大学,2022.
- [7] Elsharkawy A M, Mann D A. Nuclear factor-kappa B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis [J]. *Hepatology*, 2007, 46(2): 590-597.
- [8] Popping S, Bade D, Boucher C, et al. The global campaign to eliminate HBV and HCV infection: International Viral Hepatitis Elimination Meeting and core indicators for development towards the 2030 elimination goals [J]. *J Virus Erad*, 2019, 5(1): 60-66.
- [9] 王轲,李京涛,常占杰,等.益脾养肝法干预肝硬化-肝癌癌前病变理论探究[J].四川中医,2018,36(6):48-50.
- [10] 张晓萍,赵宏军,陈芝芸.丹参煎液对肝纤维化大鼠肝脏肾素-血管紧张素系统的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2010,18(2):102-105.
- [11] 章圣朋,张超,李丽华,等.基于网络药理学预测荜茇抗肝纤维化作用及验证研究[J].中国中药杂志,2021,45(4):845-854.
- [12] Tacke F, Zimmerman H W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5):1090-1096.
- [13] 李明芳,李曹飞,左东泽,等.肝纤维化的发病机理及相关信号转导机制研究进展[J].中国比较医学杂志,2023,33(8):147-152.
- [14] 李艳,张晓琳,韦园园,等.委陵菜酸调控PI3K/Akt/mTOR通路对肝星状细胞活化增殖的影响[J].中成药,2022,44(6):1965-1969.
- [15] Bai T, Lian L H, Wu Y L, et al. Thymoquinone attenuates liver fibrosis via PI3K and TLR4 signaling pathways in activated hepatic stellate cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(2): 275-281.
- [16] 杨星,王振,李淑娣,等.基于PI3K/Akt信号通路探讨中药活性成分抗肝纤维化的研究现状[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(13):230-240.
- [17] Zeng Z P, Wu Y J, Cao Y R, et al. Slit2-Robo2 signaling modulates the fibrogenic activity and migration of hepatic stellate cells[J]. *Life Sci*, 2018, 203: 39-47.
- [18] Wang S H, Huang Z, Lei Y, et al. Celastrol alleviates autoimmune hepatitis through the PI3K/Akt signaling pathway based on network pharmacology and experiments [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 816350.
- [19] Son G, Hines I N, Lindquist J, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in hepatic stellate cells blocks the progression of hepatic fibrosis [J]. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1512-1523.