DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20240927.003
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20240927.1051.006

鸡血藤提取物通过PI3K/AKT通路对缺铁性贫血大鼠的药效和作用机制研究

侯 岚[1,2,3,4],李保生[5],韦宝敏[5],黄艳新[5],黎 飚[2,3],方晓燕[2,3],黄永毅[2,3],王金花[2,3],罗凯杰[1,2,3],杨彩艳[1,2,3]✉

(1.右江民族医学院 生物医药与大健康现代产业学院,广西 百色 533000;2.广西壮族自治区中药体内药物化学数据库建设与应用工程研究中心,广西 百色 533000;3.广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室,广西 百色 533000;4.南昌健康职业技术学院 基础医学部,江西 南昌 330000;5.右江民族医学院附属医院,广西 百色 533000)

[摘要] **目的**:探讨鸡血藤提取物对缺铁性贫血(Iron Deficiency Anemia,IDA)大鼠的作用效果及其作用机制。**方法**:采用低铁饮食结合剪尾放血的方法构建IDA大鼠模型。通过检测外周血象、血清铁(SI)、总铁结合力(TIBC)、转铁蛋白饱和度(TSAT)、血清铁蛋白(SF)含量,以及观察肝脏和肾脏组织的形态学变化,评估肝脏中的氧化应激标志物和铁调素(Hepcidin)含量,从而评价鸡血藤提取物的药效。进一步利用网络药理学方法筛选潜在的药效靶点和关键信号通路,并通过逆转录-实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)对肝脏中关键信号通路中的重要药效靶点进行验证,以揭示其作用机制。**结果**:鸡血藤提取物可显著改善IDA大鼠的红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度(HGB)、红细胞比容(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)和平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)等外周血象指标,减缓血清铁和转铁蛋白饱和度的下降速率($P<0.05$),修复肾脏和肝脏组织的损伤,提高肝脏组织中铁调素(Hepcidin)的含量($P<0.01$)及抗氧化能力。在分子水平上,鸡血藤提取物上调了*PI3K*和*AKT* mRNA的表达,以及PI3K、p-PI3K、AKT和p-AKT蛋白的水平。**结论**:鸡血藤提取物能够促进IDA大鼠外周血象恢复,调节血清铁代谢水平,修复肝肾组织损伤,并提高肝脏铁调素含量及抗氧化能力。这些改善效果可能通过激活肝脏组织中PI3K/AKT信号通路实现。

[关键词] 鸡血藤提取物;缺铁性贫血大鼠;药效;作用机制;PI3K/AKT信号通路
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2025)13-0970-09

Efficacy and mechanism of *Spatholobus suberectus* extract on iron deficiency anemia rats *via* PI3K/AKT pathway

HOU Lan[1,2,3,4], LI Baosheng[5], WEI Baomin[5], HUANG Yanxin[5], LI Biao[2,3], FANG Xiaoyan[2,3], HUANG Yongyi[2,3], WANG Jinhua[2,3], LUO Kaijie[1,2,3], YANG Caiyan[1,2,3]✉

(1. *Modern Industrial College of Biomedicine and Great Health, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise* 533000, *China*; 2. *Guangxi Database Construction and Application Engineering Research Center for Intracorporal Pharmacochemistry of TCM, Baise* 533000, *China*; 3. *Key Laboratory of Characteristic Ethnic Medicine Research in the Youjiang River Basin of Guangxi Universities, Baise* 533000, *China*; 4. *Department of Basic Medical Sciences, Nanchang Health Vocational and Technical College, Nanchang* 330000, *China*; 5. *The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise* 533000, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Key Research and Development Program of Guangxi* (*GUIKEAB*1850004), *the* 2021 *Annual Research Projects of Youjiang Medical University for Nationalities* (*yy*2021*sk*018) *and Scientific Research and Technology Development Pplan of Baise* (*BAIKE*20211803-1)

[*Author*]: *HOU Lan, E-mail*: 740465007@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *YANG Caiyan, Ph.D., Associate Professor, Master Superviser, E-mail*: *yangcaiyan@ymun.edu.cn*.

[基金项目] 广西重点研发计划(桂科AB1850004);右江民族医学院2021年度校级科研课题(yy2021sk018);百色市科学研究与技术开发计划(百科20211803-1)

[作者简介] 侯岚,E-mail:740465007@qq.com。
[通讯作者] 杨彩艳,博士,副教授,硕士生导师,E-mail:yangcaiyan@ymun.edu.cn。

[收稿日期] 2024-06-15 [修回日期] 2024-09-12 网络出版时间:2024-09-27 15:09:30

Received: 2024-06-15 *Revised*: 2024-09-12 *JHMU*, 2025;31(13):970-978

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the efficacy and mechanism of *Spatholobus suberectus* (*S.suberectus*) extract on iron deficiency anemia (IDA) rats. **Methods**: A low iron diet combined with cutting the tail and bleeding was used to construct an IDA rat model. The efficacy of *S. suberectus* extract was evaluated by measuring peripheral blood count, serum iron, total iron binding capacity, transferrin saturation, and serum ferritin levels, observing morphological changes in liver and kidney tissues, and assessing the levels of oxidative stress markers and hepcidin in the liver. Furthermore, network pharmacology methods were used to screen potential pharmacodynamic targets and key signaling pathways, and the important pharmacodynamic targets in key signaling pathways in the liver were verified by reverse transcription-real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot to reveal their mechanism of action. **Results**: *S. suberectus* extract significantly improved peripheral blood count indices such as red blood cell count, hemoglobin concentration, hematocrit, and mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, and mean corpuscular hemoglobin concentration, and slowed down the decreasing rate of serum iron and transferrin saturation in IDA rats ($P<0.05$), repaired the damage of kidney and liver tissues, and increasing the content of hepcidin ($P<0.01$) and antioxidant capacity in liver tissues. At the molecular level, *S. suberectus* extract upregulated the expression of *PI3K* and *AKT* mRNA, as well as the levels of PI3K, p-PI3K, AKT and p-AKT proteins. **Conclusion**: *S. suberectus* extract can promote the recovery of peripheral blood count, regulate serum iron metabolism level, repair liver and kidney tissue damage, and increase hepcidin content and antioxidant capacity in IDA rats. These improvements may be achieved by activating the PI3K/AKT signaling pathway in liver tissues.

[Key words] *Spatholobus suberectus* extract; Iron deficiency anemia rats; Efficacy; Mechanism; PI3K/AKT signaling pathway

铁缺乏现象目前在全球范围内普遍存在[1],而缺铁性贫血(Iron deficiency anemia, IDA)作为铁缺乏的主要临床表现,其发病率呈现逐年上升的趋势。研究表明,IDA不仅增加了孕产妇及新生儿的死亡风险,影响儿童和青少年的生长发育,还会损害成年人的免疫系统功能,并可能诱发多种并发症,严重降低了患者的生活质量[2,3]。目前,西医主要采取铁剂治疗等策略,这些治疗虽然在改善IDA患者血清铁水平和外周血细胞计数等生化指标方面疗效显著,但常导致呕吐、便血和持续性剧烈胃痛等不良反应[4,5]。相较之下,中医注重辨证施治,常采用多成分、多靶点的中药治疗。虽然中药在改善铁代谢水平方面的效果可能不及单体铁剂,但在缓解临床症状和恢复脏器功能方面具有优势,且耐药性低、副作用小,因而在临床中的应用日益广泛[6]。其中,具有滋补肝肾、益气养血功效的药材在治疗IDA中尤为常用。

鸡血藤为豆科植物密花豆(*Spatholobus suberectus*, *S. suberectus*)的干燥藤茎,性温,味苦而微甘,归肝、肾二经,具有活血补血、调经止痛、舒筋通络等功效[7]。药理学研究表明,黄酮类化合物是鸡血藤的主要活性成分,多为中小极性化合物[8],这些成分已被证实具有改善造血功能[9]、抗氧化[10]、抗炎[11]、抗肿瘤[12]、抗糖尿病[13]、抗病毒[14]、抗血栓形成[15]等作用。然而,目前关于鸡血藤对IDA的药效及作用机制尚缺乏深入的研究。

在本研究中,为避免高温对黄酮类化合物结构的潜在破坏,并且根据鸡血藤中黄酮类化合物的中小极性特征,我们结合临床煎煮技术与民间药酒养生传统,使用不同比例的醇-水混合溶剂提取鸡血藤,并通过减压低温浓缩获得鸡血藤提取物。随后,通过构建IDA大鼠模型,分析外周血象、血清铁代谢水平、肝肾组织形态学变化等指标,综合评估鸡血藤提取物的药效。同时,通过网络药理学、逆转录-实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹法(WB)探究其作用机制,以期为鸡血藤的深入研究和开发提供科学实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级雌性SD大鼠60只,体重范围(240±25)g,由长沙天勤生物技术有限公司提供,生产许可证编号为:SCXK(湘)2019-0014。所有动物实验均已获得右江民族医学院实验动物伦理委员会的审查批准,相应的伦理审查编号为:2019030105。

干燥鸡血藤药材购自百色市正阳药店,样品编号为No.2021-09-10,目前存放于广西壮族自治区中药体内药物化学数据库建设与应用工程研究中心。硫酸亚铁片(山西力玖药业有限公司),血清铁(SI)、总铁结合力(TIBC)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒(南京建成生物科技研究所),血清铁蛋白(SF)和铁调素(Hepcidin)试剂盒(泉州市九邦生物科技有限公

司),总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司),反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),RT-qPCR试剂盒(美国Bimake生物科技有限公司),引物通过生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。快速凝胶制备试剂盒、SDS-PAGE电泳液(北京兰杰柯科技有限公司),PI3K抗体、AKT抗体、p-PI3K抗体、p-AKT抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司)。

表1　引物序列

Tab 1　Primer sequences

名称	序列(5′～3′)	扩增长度(bp)
PI3K	上游:CTGTGCCTTCTGCCTTACGGTTG	83
	下游:GCAATCGTCGTGGCGTCCTTC	
AKT	上游:TCCCCACTCAACAACTTCTCA	137
	下游:TCCTCAGGCGTTTCCACAT	
Hepcidin	上游:CTGCCTGTCTCCTGCTTCTCC	81
	下游:GAGCCGTAGTCTGTCTCGTCTG	
β-actin	上游:TGTCACCAACTGGGACGATA	165
	下游:GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	

1.2　方法

1.2.1　低铁饲料制备与药物提取　低铁饲料的组成为玉米淀粉54%、奶粉40%、豆油5%、食盐1%(低铁饲料和正常饲料铁含量分别为11和235 mg/kg,测定方法参考GB/T 5009.90-2016食品中铁的火焰原子吸收光谱法)[16]。1.5 kg干燥鸡血藤依次使用乙醇-水(9∶1,5∶5;V/V)浸提(室温,3次,3 d/次),药渣再用沸水提取2次(0.5 h/次)[17],所有提取液合并减压浓缩至1 500 mL。

1.2.2　动物分组与样本采集　将适应性饲养一周的SD大鼠,随机分为6组:正常组、模型组、硫酸亚铁组、鸡血藤提取物低剂量组、鸡血藤提取物中剂量组、鸡血藤提取物高剂量组。其中硫酸亚铁剂量为27 mg/kg,鸡血藤提取物剂量分别为2.25 g、4.50 g和9.00 g生药/kg。正常组饲喂标准饲料,其他各组饲喂低铁饲料,并在实验期间每周进行两次剪尾放血,每次0.5 mL/只。模型组每日灌胃1 mL蒸馏水,而各治疗组每日灌胃1 mL相应药物的水溶液。所有大鼠在为期4周的连续给药后,腹腔注射20%乌拉坦溶液(4 mL/kg)进行麻醉,通过腹主动脉取血;部分肝肾组织于10%中性福尔马林溶液中固定,用于H&E染色;剩余肝脏组织则存放于－80 ℃冰箱中,用于后续分析。

1.2.3　药效研究　采用全自动血液分析仪对外周血常规指标进行定量分析。通过比色法测定血清中SI、TIBC、MDA、T-SOD、GSH以及T-AOC的含量,并据此计算TSAT(SI/TIBC)的值。利用ELISA法测定血清中铁蛋白和肝脏中铁调素的含量。采用H&E染色法对肝脏和肾脏组织进行形态学观察,以评估组织结构的变化。此外,通过RT-qPCR技术检测肝脏中*Hepcidin* mRNA表达水平。

1.2.4　机制研究

1.2.4.1　网络药理学筛选潜在药效靶点及通路　首先从TCMSP和DrugBank数据库中筛选出鸡血藤中具有潜在药效的成分,筛选标准为口服生物利用度(OB)≥30%和药物相似性(DL)≥0.18。随后,通过DisGeNET、GeneCards和OMIM-Gene数据库,搜集与贫血疾病相关的靶点信息。进一步地,利用OmicShare数据库挖掘鸡血藤治疗贫血的潜在药效靶点。为深入理解这些靶点间的相互作用,本研究采用STRING数据库和Cytoscape软件,构建了靶点间的相互作用网络。最后,利用KEGG数据库,对筛选出的潜在药效靶点进行通路分析[17]。结合文献资料,识别出与鸡血藤治疗贫血相关的潜在重要信号通路。

1.2.4.2　潜在重要信号通路关键靶点的验证　使用Trizol试剂法提取大鼠肝脏组织中的总RNA,并使用紫外分光光度计检测其浓度和纯度。经反转录试剂盒将总RNA反转录为cDNA,再采用RT-qPCR方法对PI3K和AKT基因的mRNA表达水平进行定量分析,以*β-actin*作为内参基因。通过$2^{-\triangle\triangle Ct}$方法计算目标基因的相对表达量,具体引物序列详见表1。

另取50 mg大鼠肝脏组织,加入由RIPA裂解液、磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂按比例48∶1∶1混合的裂解缓冲液中,进行组织裂解和蛋白提取。利

用BCA蛋白定量试剂盒对提取的总蛋白进行定量分析。将不同浓度的蛋白样本通过10% 的SDS-PAGE凝胶进行电泳分离,并转移到PVDF膜上。在25 ℃条件下使用快速封闭液对膜进行20 min的封闭处理。之后将膜在4 ℃下与特异性一抗PI3K(1∶1 500)、p-PI3K(1∶2 000)、AKT(1∶2 500)、p-AKT(1∶2 000)、GAPDH(1∶10 000)孵育过夜。次日将膜在室温下与二抗(1∶10 000)孵育1 h。使用ECL化学发光试剂进行显影,并通过ImageJ软件对免疫印迹条带的灰度值进行定量分析。

1.3 统计学处理

运用Graphpad Prism 8.0软件分析数据,所有数据均采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 药效研究结果

2.1.1 对外周血象的影响 与正常组相比,模型组的红细胞计数(red blood cell,RBC)、血红蛋白(hemoglobin, HGB)、红细胞比积(hematocrit,HCT)、平均红细胞体积(mean corpuscular volume,MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin,MCH)和平均红细胞血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration,MCHC)均明显降低($P<0.05$);硫酸亚铁处理能够使这些指标向正常组水平靠拢;在鸡血藤提取物低剂量组中,RBC、HCT和MCH的值虽高于模型组但低于正常组,与模型组相比存在显著性差异($P<0.05$);鸡血藤提取物中剂量组的RBC、HGB和HCT值介于正常组和模型组之间,与模型组相比差异极为显著($P<0.01$);鸡血藤提取物高剂量组的RBC、HCT和MCV值均高于模型组但低于正常组,与模型组相比具有显著性差异($P<0.05$)。中等剂量组的RBC、HGB和HCT值相较于硫酸亚铁组更接近正常组水平,但两组间的差异在统计学上无显著性意义($P>0.05$)。见表2。

表2 鸡血藤提取物对大鼠外周血象的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of *S. suberectus* extract on peripheral blood count in IDA rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	RBC [(×10^{12})个/L]	HGB (g/L)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)
正常组	8.94±0.22	16.13±0.21	47.60±2.52	57.10±1.15	18.60±0.89	32.07±0.25
模型组	6.21±0.31$^{\#\#}$	11.50±0.30$^{\#\#}$	33.87±3.28$^{\#\#}$	50.33±1.75$^{\#}$	16.03±1.32$^{\#}$	30.07±0.86$^{\#\#}$
硫酸亚铁组	7.69±0.46**	14.23±0.74**	44.90±1.54**	56.87±1.29*	18.53±0.45*	31.43±0.51*
鸡血藤提取物低剂量组	7.91±0.20**	12.63±1.19	44.33±1.7*	55.03±1.29	18.23±0.65*	30.67±0.21
鸡血藤提取物中剂量组	8.32±0.27**	14.80±0.72**	48.37±3.29**	52.80±1.06	17.43±0.42	30.87±0.49
鸡血藤提取物高剂量组	7.34±0.27**	12.90±0.89	45.63±4.91**	56.27±4.09*	17.63±0.21	30.67±0.35
F	28.52	14.82	8.70	5.03	4.94	5.91

注:与正常组相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

2.1.2 对血清中铁代谢水平的影响 与正常组相比,模型组的SI含量和TSAT均显著下降($P<0.01$),而TIBC则显著升高($P<0.01$),但SF含量的统计学差异不显著($P>0.05$),具体数据见表3;在各治疗组中,SI和TSAT的值均位于正常组和模型组之间;与模型组相比,低剂量组和中剂量组的SI含量以及低剂量组的TSAT值在统计学上均无显著差异。然而,高剂量组的SI含量以及中剂量组和高剂量组的TSAT值均显著升高($P<0.05$)。除低剂量组外,高剂量组和硫酸亚铁组的TIBC值均介于正常组和模型组之间,且与模型组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$或$P<0.01$);所有剂量组以及硫酸亚铁组的TIBC值均位于正常组和模型组之间,但仅高剂量组和硫酸亚铁组与模型组相比在统计学上显示出显著差异($P<0.05$)。硫酸亚铁组的SI、TIBC和TSAT值更接近于正常组,与高剂量组之间的统计学差异不显著($P>0.05$)。

2.1.3 对肾组织受损的修复作用 在正常组大鼠的肾脏组织中,肾小球、肾小囊和肾小管的排列均整齐规则,未观察到明显的病理性变化,肾小球结构清晰,形态完整(图1);与正常组相比,模型组大鼠的肾脏组织表现出显著的病理变化:肾小球体积增大,肾小球内细胞出现大量增生,肾小囊腔扩大,肾小管形态异常;与模型组相比,硫酸亚铁组以及鸡血藤提取物各剂量组的大鼠肾脏组织病理学改变呈现不同程度的改善,特别是在鸡血藤提取物高剂量组中,观察到的肾脏损伤减轻更为显著。

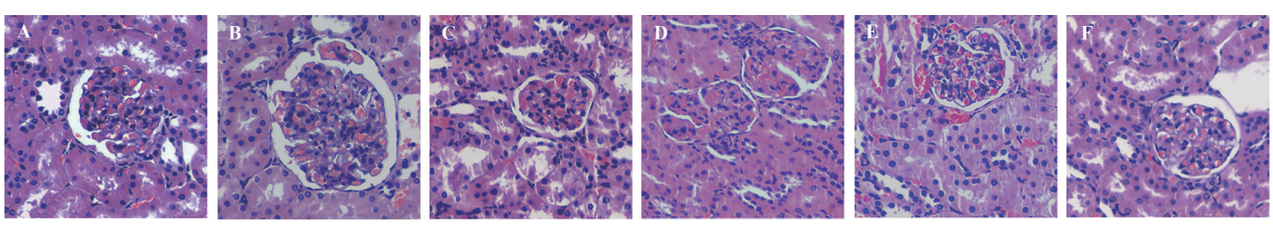
2.1.4 对肝组织受损的修复作用 在正常组大鼠的肝脏组织中,肝小叶的肝索围绕中央静脉呈放射状排列,肝细胞形态保持正常,肝小叶结构清晰,肝

表3　鸡血藤提取物对大鼠铁代谢的调节作用（$\bar{x}\pm s$）

Tab 3　Regulation of *S. suberectus* extract on the iron metabolism in rats（$\bar{x}\pm s$）

组别	SI（μmol/L）	TIBC（μmol）	TSAT（%）	SF（ng/mL）
正常组	54.24±1.60	90.95±16.53	59.65±3.05	15.97±2.67
模型组	26.33±7.11$^{\#\#}$	244.00±15.27$^{\#\#}$	9.74±2.73$^{\#\#}$	14.38±3.31
硫酸亚铁组	47.16±5.24**	112.40±19.83**	46.02±2.42**	15.64±2.50
鸡血藤提取物低剂量组	29.56±8.32	251.30±22.67	10.87±5.61	17.03±2.05
鸡血藤提取物中剂量组	32.82±5.91	214.10±44.64	20.10±3.02*	16.60±2.09
鸡血藤提取物高剂量组	44.91±4.77*	151.40±28.99*	33.25±2.26**	16.76±3.28
F	10.79	20.02	106.60	0.39

注：与正常组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

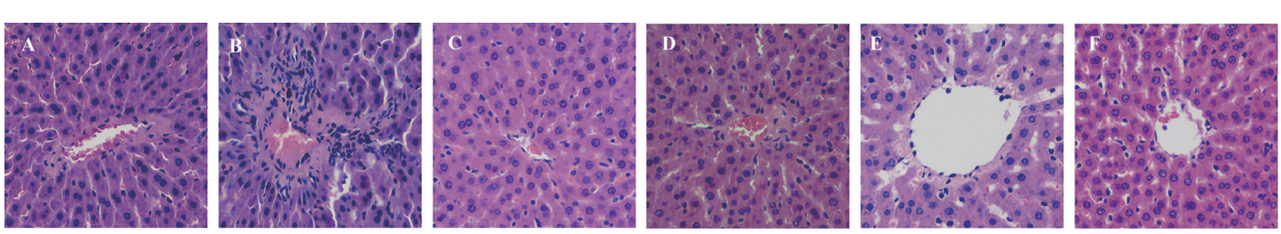


A：正常组；B：模型组；C：硫酸亚铁组；D：鸡血藤提取物低剂量组；E：鸡血藤提取物中剂量组；F：鸡血藤提取物高剂量组

图1　各组大鼠肾组织H&E染色结果（×400）

Fig 1　H&E staining results of rat kidney tissues in each group（×400）

细胞排列有序（图2）；与正常组相比，模型组大鼠肝脏组织观察到显著的病理变化：肝小叶的肝索排列紊乱，中央静脉出现扩张充血，近中央静脉区域的肝细胞排列无序、形态不规则且存在大面积点状坏死；与模型组相比，硫酸亚铁组及鸡血藤提取物各剂量组的大鼠肝脏组织病理学改变均显示出明显的改善，特别是在鸡血藤提取物高剂量组中，肝小叶的肝索排列紊乱和细胞坏死等现象的改善更为显著。



A：正常组；B：模型组；C：硫酸亚铁组；D：鸡血藤提取物低剂量组；E：鸡血藤提取物中剂量组；F：鸡血藤提取物高剂量组

图2　各组大鼠肝组织H&E染色结果（×400）

Fig 2　H&E staining results of rat liver tissues in each group（×400）

2.1.5　对肝脏中铁调素（Hepcidin）的调节　与正常组相比，模型组大鼠肝脏中Hepcidin蛋白含量及其mRNA表达水平显著降低（$P<0.01$）。见表4。在各治疗组中，除低剂量组外，其余治疗组的Hepcidin含量和mRNA表达水平均介于正常组和模型组之间。特别是中剂量组和高剂量组与模型组相比，其Hepcidin含量和mRNA表达水平差异具有统计学意义（$P<0.05$）。值得注意的是，高剂量组的*Hepcidin* mRNA含量相较于硫酸亚铁组更接近于正常组水平，尽管两组间在统计学上差异不显著（$P>0.05$），但这仍提示高剂量鸡血藤提取物可能对Hepcidin表达具有一定的正向调节作用。

2.1.6　缓解肝脏氧化应激损伤　与正常组相比，模型组大鼠肝脏中的MDA含量显著升高，而T-SOD活性、GSH含量以及T-AOC均显著降低（$P<0.01$），见表5。各治疗组的上述指标均介于正常组和模型组之间，其中MDA含量与模型组相比具有显著性差异（$P<0.05$），而T-AOC的差异则不显著（$P>0.05$）。特别是中剂量组的T-SOD活性以及高剂量组的T-SOD活性和GSH含量，与模型组相比均具有统计学意义（$P<0.01$）。在所有治疗组中，高剂量组的MDA含量、T-SOD活性和GSH含量最接

表4 鸡血藤提取物对大鼠肝脏中铁调素的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Effect of *S. suberectus* extract on Hepcidin in rat liver（$\bar{x}\pm s$）

组别	Hepcidin (ng/mL)	*Hepcidin* mRNA
正常组	30.56±2.07	2.73±0.14
模型组	19.52±2.61$^{\#\#}$	0.30±0.17$^{\#\#}$
硫酸亚铁组	27.49±2.2*	1.56±0.70*
鸡血藤提取物低剂量组	19.01±3.56	0.68±0.27
鸡血藤提取物中剂量组	26.88±0.84*	1.49±0.50*
鸡血藤提取物高剂量组	27.46±1.36*	2.46±0.43**
F	12.99	15.75

注：与正常组相比，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

近正常组水平，然而与硫酸亚铁组相比，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.2 机制研究结果

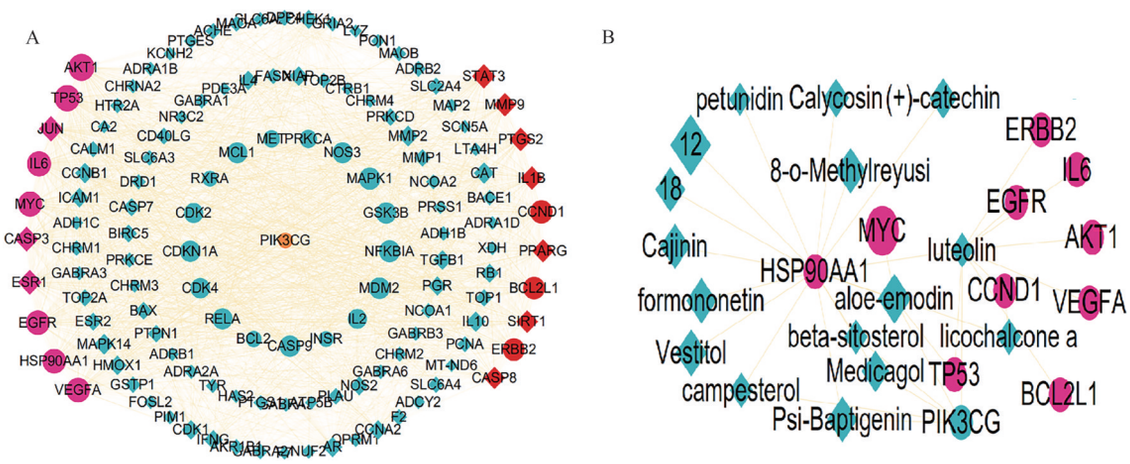
2.2.1 上调肝组织中 *PI3K* 和 *AKT* mRNA 的表达 运用网络药理学方法，筛选出24种潜在的药效成分（口服生物利用度OB≥30%且药物相似性DL≥0.18），并识别出142个药效成分对应的药效靶点，以及99个潜在的抗贫血药效靶点。通过KEGG通路分析，发现PI3K/AKT、AGE-RAGE、内分泌耐药（Endocrine resistance）、雌激素（Estrogen）等多条信号通路中均包含PI3K/AKT子通路。进一步利用靶点-靶点关系网络（图3A）分析，发现AKT1为连接度最高的潜在药效靶点。同时，成分-靶点关系网络（图3B）揭示了与AKT1密切相关的木犀草素（luteolin）也与PIK3CG靶点有关联。因此，我们选择与信号通路密切相关的关键分子PI3K和AKT进行RT-qPCR实验验证。结果显示，与正常组相比，模型组大鼠肝脏中*PI3K*、*AKT* mRNA的相对表

表5 大鼠肝脏氧化应激标志物的变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 5 Changes in oxidative stress markers in the rat liver（$\bar{x}\pm s$）

组别	MDA (nmol/mgprot)	T-SOD (U/mgprot)	GSH (μmol/gprot)	T-AOC (mmol/g)
正常组	0.15±0.02	466.80±41.24	5.41±1.16	0.10±0.01
模型组	0.35±0.01$^{\#\#}$	217.20±27.81$^{\#\#}$	1.73±0.14$^{\#\#}$	0.05±0.01$^{\#\#}$
硫酸亚铁组	0.24±0.04**	290.80±14.13	2.28±0.49	0.08±0.01
鸡血藤提取物低剂量组	0.25±0.01**	248.00±38.54	2.36±0.32	0.06±0.01
鸡血藤提取物中剂量组	0.23±0.02**	332.10±22.16**	2.74±0.68	0.08±0.01
鸡血藤提取物高剂量组	0.19±0.02**	393.10±20.29**	3.46±0.18*	0.07±0.01
F	27.05	30.95	14.03	8.50

注：与正常组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。



A：为“靶点-靶点-PI3K/AKT信号通路”关系网络，桃红色和红色的节点分别为连接度前10和前11～20的靶点，前20的靶点连接度从上到下依次减小；椭圆形的节点为PI3K/AKT信号通路的靶点。B：为“化合物-连接度前20且为PI3K/AKT信号通路的靶点”关系网络，桃红色的节点连接度前20的靶点，钻石形节点为化合物；12和18化合物的名称分别为（Z）-3-（4-hydroxy-3-methoxy-phenyl）-N-[2-（4-hydroxyphenyl）ethyl]acrylamide和Consume close grain

图3 鸡血藤抗贫血关系网络

Fig 3 Relationship Networks of anti-anemia effect of *S. suberectus*

达量均显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,硫酸亚铁组和鸡血藤提取物高剂量组肝脏中*PI3K*和*AKT* mRNA的相对表达量显著上升($P<0.05$),而鸡血藤提取物低剂量和中剂量组的*PI3K*和*AKT* mRNA相对表达量虽有所上升,但统计学差异不显著($P>0.05$)。见表6。

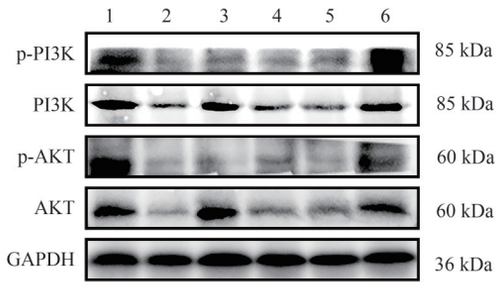
表6　鸡血藤提取物对肝组织*PI3K*和*AKT* mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 6　Effect of *S. suberectus* extract on *PI3K* and *AKT* mRNA expressions in liver tissue($\bar{x}\pm s$)

组别	*PI3K*	*AKT*
正常组	2.69±0.20	1.20±0.16
模型组	0.95±0.44$^{\#\#}$	0.59±0.07$^{\#\#}$
硫酸亚铁组	2.46±0.24**	1.14±0.16**
鸡血藤提取物低剂量组	1.21±0.56	0.73±0.21
鸡血藤提取物中剂量组	1.32±0.28	0.85±0.11
鸡血藤提取物高剂量组	2.09±0.16*	1.02±0.13*
F	13.27	8.11

注:与正常组相比,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

2.2.2　上调肝组织中PI3K、p-PI3K、AKT和p-AKT蛋白的表达　在mRNA层面上确认了PI3K和AKT基因确实受到鸡血藤提取物的调控作用。进一步地,我们在蛋白水平上进行了验证。结果显示:与正常组相比,模型组大鼠肝脏中的PI3K、p-PI3K、AKT和p-AKT蛋白的相对表达量均下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图4及表7。与模型组相比,硫酸亚铁组及鸡血藤提取物各剂量组的上述蛋白相对表达量均呈现不同程度的上升。特别是鸡血藤提取物高剂量组中,各蛋白的相对表达量与硫酸亚铁组中PI3K、AKT蛋白的相对表达量之间的差异具有统计学意义($P<0.05$)。



1:正常组;2:模型组;3:硫酸亚铁组;4:鸡血藤提取物低剂量组;5:鸡血藤提取物中剂量组;6:鸡血藤提取物高剂量组

图4　Western blot检测各组肝脏p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT蛋白电泳结果

Fig 4　Western blot was used to detect the results of p-PI3K, PI3K, p-AKT and AKT protein electrophoresis in the liver of each group

表7　鸡血藤提取物对肝组织PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 7　Effect of *S. suberectus* extract on PI3K、p-PI3K、AKT and p-AKT protein expressions in liver tissue ($\bar{x}\pm s$)

组别	PI3K	p-PI3K	AKT	p-AKT
正常组	1.10±0.08	0.86±0.16	1.22±0.09	0.73±0.04
模型组	0.61±0.05$^{\#\#}$	0.39±0.12$^{\#\#}$	0.53±0.12$^{\#\#}$	0.37±0.13$^{\#\#}$
硫酸亚铁组	0.88±0.08*	0.53±0.10	1.20±0.09**	0.54±0.05
鸡血藤提取物低剂量组	0.73±0.01	0.49±0.06	0.71±0.21	0.42±0.08
鸡血藤提取物中剂量组	0.76±0.13	0.55±0.01	0.85±0.28	0.49±0.05
鸡血藤提取物高剂量组	0.86±0.06*	0.80±0.13**	1.03±0.15*	0.70±0.05**
F	13.86	8.79	7.76	11.36

注:与正常组相比,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

3　讨论

IDA是一种广泛存在的贫血类型,其病理机制涉及造血系统和铁代谢的紊乱,并可能导致全身多器官损伤[18]。血红蛋白作为红细胞内运输氧的主要成分,其合成过程对铁的需求量极大[19]。在IDA的病理条件下,铁的缺乏导致血清铁水平下降,总铁结合力(TIBC)升高,而转铁蛋白饱和度(TSAT)在循环铁有限的情况下也显著降低[21,22]。因此,提升IDA患者的血红蛋白(HGB)水平和铁含量是缓解贫血症状的有效途径。本研究发现,鸡血藤提取物对IDA大鼠的外周血象和铁代谢水平具有显著的改善作用。血清铁蛋白(SF)是细胞内铁储存的主要形式,其水平通常与体内铁储备量密切相关[23]。然而,实验结束时,各组间血清铁蛋白值比较,差异无统计学意义,这可能与模型复制时间不足有关,未能充分反映铁蛋白水平的变化。氧气对生物体至关重要,分子氧与血红蛋白结合后被输送至全身各个器官[24]。在IDA状态下,组织缺氧引发氧化应激,导致肝脏、肾脏等器官损伤[25]。实验结果显示,持续失血和低铁饮食的大鼠肝肾组织出现

了病理损伤,肝脏组织中氧化应激指标如丙二醛(MDA)过量产生,而总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽还原酶(GSH)、总抗氧化能力(T-AOC)降低。鸡血藤提取物治疗显著增强了肝脏的抗氧化能力,进一步证实了氧化应激和IDA病理生理学的联系。Hepcidin是由肝细 药效也随之增强,且在高剂量组中观察到最佳疗效。然而,关于继续增加鸡血藤提取物剂量后药效是否会趋于稳定、增加或降低,仍需进一步的研究来明确。

PI3K家族在多种生理功能中扮演着至关重要的角色,参与调控众多信号传导途径。该家族成员通过与生长因子结合激活受体酪氨酸激酶(RTK),进而通过磷酸化作用生成磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3),并通过其下游AKT蛋白的激活发挥生物学功能[29,30]。AKT作为PI3K信号通路的关键效应器,在细胞凋亡、细胞存活等多种细胞过程中发挥着决定性作用,并通过磷酸化途径产生广泛的生物学效应[31]。已有研究证实,在血液疾病如地中海贫血中,通过调节PI3K/AKT信号通路可促进红细胞的生成[32]。本研究通过网络药理学分析识别出AKT1为连接度最大的关键药效靶点,进而选择与其密切相关的信号通路关键分子PI3K进行验证性研究。本研究系统分析了肝脏中*PI3K*、*AKT* mRNA及PI3K、AKT、磷酸化PI3K(p-PI3K)、磷酸化AKT(p-AKT)蛋白的表达水平,发现鸡血藤提取物对IDA的改善作用可能与其影响肝脏中*PI3K*、*AKT* mRNA及相应蛋白的表达水平相关。肝脏中PI3K/AKT信号通路可能是鸡血藤提取物发挥作用的重要途径之一。然而,鸡血藤提取物中发挥药效的活性成分是否主要为木犀草素等黄酮类物质,仍需进一步深入研究。此外,鸡血藤提取物能够提升肝细胞内的磷酸化水平,这可能是其改善IDA的重要机制之一。至于磷酸化水平的提升是否对下游蛋白产生影响,以及这种影响的具体机制如何,需要在未来的研究中进一步探讨。

综上所述,鸡血藤提取物通过提高外周血中RBC、HGB、HCT、MCV及MCH等关键指标,调节体内铁代谢,促进铁的吸收和利用,修复肾脏和肝脏组织的损伤,并调节肝脏中铁调素的含量,缓解肝脏氧化应激损伤,而达到改善IDA的药效;其作用机制可能与激活PI3K/AKT信号通路密切相关。

作者贡献度说明:

侯岚:实验设计、实验操作、分析数据、论文撰写,李保生、韦宝敏、黄艳新、黎飚、方晓燕、黄永毅、罗凯杰:技术支持和指导,杨彩艳、王金花:指导实验设计,对论文进行修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Guo Q, Qian C, Qian ZM. Iron metabolism and atherosclerosis [J]. Trends Endocrin Met, 2023, 34(7): 404-413.

2 Locatelli F, Rossi F, Paola AD, et al. Eltrombopag in paediatric immune thrombocytopenia: Iron metabolism modulation in mesenchymal stromal cells[J]. Brit J Haematol, 2022, 197(1): 110-119.

3 Gallagher PG. Anemia in the pediatric patient [J]. Blood, 2022, 140(6): 571-593.

4 Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, et al. A red carpet for iron metabolism [J]. Cell, 2017, 168(3): 344-361.

5 Bayır H, Dixon SJ, Tyurina YY, et al. Ferroptotic mechanisms and therapeutic targeting of iron metabolism and lipid peroxidation in the kidney [J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19(5): 315-336.

6 Chang J, Sun W, Zeng J, et al. Establishment of an *in vitro* system based on AGM-S3 co-culture for screening traditional herbal medicines that stimulate hematopoiesis [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 240(1): 111938.

7 Huang XJ, Fei QQ, Yu S, et al. A comprehensive review: Botany, phytochemistry, traditional uses, pharmacology, and toxicology of *Spatholobus suberectus* vine stems[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 312(1): 116500.

8 Liu Y, Xiang Q, Liang Q, et al. Genus *Spatholobus*: A comprehensive review on ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and toxicology [J]. Food Funct, 2022, 13(14): 7448-7472.

9 Chen SR, Wang AQ, Lin LG, et al. *In vitro* study on anti-hepatitis C virus activity of *Spatholobus suberectus* Dunn[J]. Molecules, 2016, 21(10): 1367.

10 Dong XZ, Wang YN, Tan X, et al. Protective effect of JXT ethanol extract on radiation-induced hematopoietic alteration and oxidative stress in the liver[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 1-12.

11 Liu XY, Zhang YB, Yang XW, et al. Anti-Inflammatory activity of some characteristic constituents from the vine stems of *Spatholobus suberectus* [J]. Molecules, 2019, 24(20): 3750.

12 Zhang F, Ganesan K, Liu Q, et al. A review of the pharmacological potential of *Spatholobus suberectus* Dunn on cancer[J]. Cells, 2022, 11(18): 2885.

13 Nong N, Zhang GL, Wang XM. Progress of studies on anti-tumor effect with Suberect Spatholobus Stem [J]. Chin J Traditi Chin Med Pharm, 2014, 29(8): 2563-2566.

14 Qin S, Wei K, Cui Z, et al. Comparative genomics of *Spatholobus suberectus* and insight into flavonoid biosynthesis[J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 528108.

15 Jia N, Qiao H R, Zhu W, et al. Antioxidant, immunomodulatory, oxidative stress inhibitory and iron supplementation effect of *Astragalus membranaceus* polysaccharide-iron (Ⅲ) complex on iron-deficiency anemia mouse model[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 132: 213-221.

16 陈育. 加味二至丸对缺铁性贫血模型大鼠铁吸收利用影响的实验研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(04):144-145.
Chen Y. Experimental study on the effect of Jia wei er zhi pill on iron absorption and utilization in iron deficiency anemia model rats [J]. J Guiyang Coll Tradit Chin Med,2011, 33(4): 144-145.

17 方晓燕, 李保生, 黎飚, 等. 基于网络药理学、分子对接和代谢组学研究鸡血藤抗AS药效与机制[J]. 右江民族医学院学报, 2022:783-793.
Fang XY, Li BS, Li B, et al. Study of the anti-AS efficacy and mechanism of *Spatholobus Suberectus* based on network pharmacology, molecular docking and metabolomics [J]. J Youjiang Med Univ Nat, 2022: 783-793.

18 Camaschella C, Longo DL. Iron-deficiency anemia[J]. N Engl J Med, 2015, 372(19): 1832-1843.

19 Mu M, Wu A, An P, et al. Black soyabean seed coat extract regulates iron metabolism by inhibiting the expression of hepcidin[J]. Br J Nutr, 2014, 111(7): 1181-1189.

20 Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era[J]. Haematologica, 2020, 105(2): 260-272.

21 Saini R K, Manoj P, Shetty NP, et al. Dietary iron supplements and *Moringa oleifera* leaves influence the liver hepcidin messenger RNA expression and biochemical indices of iron status in rats[J]. Nutr Res, 2014, 34(7): 630-638.

22 Zhu J, Pan W, Fei X, et al. Effects of food-derived oligopeptide iron chelates on liver injury and gut microbiota homeostasis in iron-deficiency anemia female rats: A pilot study[J]. Food Funct, 2023, 14(13): 6049-6061.

23 Nemeth E, Ganz T. Hepcidin and iron in health and disease[J]. Annu Rev Med, 2023, 74(1): 261-277.

24 Lee J W, Ko J, Ju C, et al. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(6): 1-13.

25 Kieffer DA, Martin RJ, Adams SH. Impact of dietary fibers on nutrient management and detoxification organs: gut, liver, and kidneys[J]. Adv Nutr, 2016, 7(6): 1111-1121.

26 Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6493.

27 Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis[J]. Am J Clin Nutr, 2017, 106(Suppl 6): 1559S-1566S.

28 Koziolek M, Alcaro S, Augustijns P, et al. The mechanisms of pharmacokinetic food-drug interactions - A perspective from the UNGAP group[J]. Eur J Pharm Sci, 2019, 134: 31-59.

29 Glerum PJ, Neef C, Burger DM, et al. Pharmacokinetics and Generic Drug Switching: A regulator′s view[J]. Clin Pharmacokinet, 2020, 59(9): 1065-1069.

30 Jafari M, Ghadami E, Dadkhah T, et al. PI3k/AKT signaling pathway: Erythropoiesis and beyond[J]. J Cell Physiol, 2018, 234(3): 2373-2385.

31 Wang JC, Hu KL, Cai XY, et al. Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(1): 18-32.

32 Parisi S, Finelli C, Fazio A, et al. Clinical and molecular insights in erythropoiesis regulation of signal transduction pathways in myelodysplastic syndromes and β-Thalassemia[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 827.

[本文编辑] 宋睿璞 邹 洲