

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.07.007

文章编号: 1005-8982 (2025) 07-0039-09

实验研究·论著

基于非靶向代谢组学及实验验证探讨蒙药 额力根汤治疗肝纤维化的作用机制*

藏焱帆¹, 董至恒², 梁丽娟¹, 申子晴¹, 杨文龙¹, 于久旺³, 包立道⁴

(1. 内蒙古医科大学 药学院, 内蒙古 呼和浩特 010107; 2. 内蒙古医科大学附属医院
药学部, 内蒙古 呼和浩特 010030; 3. 呼和浩特市中医蒙医医院 科研部, 内蒙古
呼和浩特 010020; 4. 呼和浩特市第一医院 药学部, 内蒙古 呼和浩特 010030)

摘要: 目的 采用非靶向代谢组学及实验验证探讨蒙药额力根汤(ET)治疗肝纤维化的作用机制。**方法** 将50只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、ET低剂量组(90 mg/100 g)、ET中剂量组(180 mg/100 g)、ET高剂量组(450 mg/100 g)。采用腹腔注射四氯化碳 CCl_4 复制肝纤维化大鼠模型,并在此基础上采用ET干预,干预21 d后取肝脏组织进行非靶向代谢组学分析。采用苏木精-伊红染色和Masson染色检测肝脏病理变化。酶联免疫吸附试验检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)及肝脏羟脯氨酸(Hyp)的水平。实时荧光定量聚合酶链反应检测肝脏组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和胶原蛋白I(Collagen I)的基因相对表达量;Western blotting检测肝脏组织 α -SMA、Collagen I的蛋白相对表达量,以及过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路与转化生长因子- β (TGF- β)信号通路的蛋白相对表达量。**结果** 模型组共筛选出83种差异代谢物($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠肝脏间质结构有纤维化损伤;模型组血清ALT、AST及Hyp水平,肝脏组织Collagen I、 α -SMA水平,肝脏组织p-Smad2和p-Smad3表达均升高($P < 0.05$),肝脏组织PPAR γ 水平降低($P < 0.05$)。ET给药组筛选出34个明显回调肝纤维化发病相关的差异代谢物($P < 0.05$)。与模型组比较,ET给药组大鼠肝脏纤维化损伤减轻;血清ALT、AST及Hyp水平,肝脏组织Collagen I、 α -SMA水平,肝脏组织p-Smad2和p-Smad3表达均降低($P < 0.05$);肝脏组织PPAR γ 水平上升($P < 0.05$)。**结论** ET可以调节肝纤维化状态下PPAR信号通路与TGF- β 信号通路,缓解 CCl_4 导致的大鼠肝纤维化。

关键词: 肝纤维化; 额力根汤; 非靶代谢组学; 实验验证; 大鼠

中图分类号: R575.2

文献标识码: A

Elucidating the anti-fibrotic mechanism of Mongolian medicine Elegen Tang via integrated untargeted metabolomics and experimental validation*

Zang Yi-fan¹, Dong Zhi-heng², Liang Li-juan¹, Shen Zi-qing¹, Yang Wen-long¹, Yu Jiu-wang³, Bao Li-dao⁴
(1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region
010107, China; 2. School of Pharmacy, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot,
Inner Mongolia Autonomous Region 010030, China; 3. Department of Research, Hohhot Hospital of
Traditional Chinese Medicine and Mongolian Medicine, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region
010020, China; 4. School of Pharmacy, The First Hospital of Hohhot, Hohhot,
Inner Mongolia Autonomous Region 010030, China)

收稿日期: 2024-10-16

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 8216140372, 82160703); 内蒙古自治区自然科学基金(No: 2023ZD15); 内蒙古自治区高等学校
青年科技英才支持项目(No: NJYT23114); 中央引导地方科技发展专项资金(No: ZY20200071); 内蒙古卫生局卫生科技计划(No:
202202158); 内蒙古医科大学重点项目(No: YKD2022ZD013); 内蒙古自治区蒙医药标准化项目(2023-[MB020])

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of Mongolian medicine Eligen Tang (ET) in the treatment of hepatic fibrosis, employing non-targeted metabolomics and experimental validation. **Methods** Fifty male SD rats were randomly assigned to five groups: control group, model group, and low, medium, and high-dose ET groups (90 mg/100 g, 180 mg/100 g, 450 mg/100 g). A liver fibrosis model was induced by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride (CCl₄), and after 21 days of ET treatment, liver tissues were collected for non-targeted metabolomics analysis. Pathological changes were assessed using hematoxylin-eosin (HE) staining. Masson's trichrome staining was used to evaluate liver fibrosis. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measured serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and hydroxyproline (Hyp). Real-time quantitative PCR was used to quantify mRNA levels of α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen I. Western blotting was employed to detect the expression of α -SMA, collagen I, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling proteins, and proteins involved in the transforming growth factor- β (TGF- β) signaling pathway in liver tissues. **Results** Compared with the control group, 83 differential metabolites were identified in the model group ($P < 0.05$), interstitial fibrosis injury in liver, serum ALT and AST levels, liver Collagen I, α -SMA and Hyp levels, p-Smad2 and p-Smad3 were increased ($P < 0.05$), and PPAR γ levels decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the ET administration group screened 34 different metabolites ($P < 0.05$), reduced liver fibrosis damage, serum ALT and AST levels, liver Collagen I, α -SMA and Hyp levels, p-Smad2 and p-Smad3 were decreased ($P < 0.05$), PPAR γ levels increased ($P < 0.05$), and the effect was better in the ET-H group. **Conclusions** ET alleviates CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats by regulating the PPAR and TGF- β .

Keywords: hepatic fibrosis; Eligen Tang; non-target metabolomics; experimental verification; rat

肝纤维化是一种通常与多种慢性肝病相关的组织学病变,是这些疾病可能进展为肝硬化的关键途径^[1]。许多致病因素,包括肝炎、脂肪酸、乙醇、代谢紊乱及有毒物质,均可能导致肝纤维化发展^[2]。肝纤维化的形成是由于肝脏受到致病因素持续刺激,静息状态的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)被激活,合成大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),造成肝脏内ECM过度积聚,并逐渐形成肝纤维化^[3]。HSCs的激活受多种细胞信号分子和胞内信号通路的调控^[4]。例如,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是目前已知的肝纤维化过程中最重要的促进因子之一,其通过激活TGF- β /Smad信号通路,促进生物标志物I胶原蛋白(Collagen I)基因的表达,引起胶原的沉积^[5]。此外,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR)通过减少生物标志物 α -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α -SMA)的表达和抑制HSCs的增殖,从而发挥抗纤维化作用^[6]。因此,通过调节生物标志物改善肝纤维化能更准确地了解疾病的发展,TGF- β /Smad和PPAR信号通路可作为潜在的肝纤维化治疗靶点。

蒙药传统方剂额力根汤(ET)是由红花、牛胆粉、川楝子、栀子、瞿麦、五灵脂、关木通、诃子等8味

药材组成,具有清肝凉血的作用,用于肝胆痛、肝肿胀、肝区痛等,该药来自蒙医经典名方《观者之喜》^[7]。有研究报道,ET在临床经常被用作抗纤维化药物,然而其抗肝纤维化的机制仍知之甚少^[8]。因此,本实验采用代谢组学技术,通过系统分析ET治疗肝纤维化代谢物谱的改变,有助于发现潜在的生物标志物,并通过动物实验验证探究其合理性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠50只,6周龄,体重180~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006;实验动物使用许可证号:SYXK(蒙)2020-0003。环境条件保持在(22±1)℃的温度和(50±10)%的湿度水平。大鼠处于12 h的光照和黑暗循环中,并且不受限制地获取食物和水。此外,根据中国国家实验动物护理指南,以人道的方式对待大鼠。研究方案已获得内蒙古医科大学伦理委员会和动物实验委员会的批准(批号:YKD202201124)。

1.2 实验试剂

ET(批号:M20190014000)购自呼和浩特市中医蒙医医院。天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)酶联免疫吸附试验(enzyme-

linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:ab263883)、丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)ELISA试剂盒(批号:ab234579)、羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)检测试剂盒(批号:ab222941)、2-氯-L-苯丙氨酸(内标标准物质,纯度98%)均购自上海艾博抗贸易有限公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:A55864)、TRIzol试剂(批号:15596026CN)、甲醇(纯度 $\geq 99.0\%$)和乙腈(纯度 $\geq 99.0\%$)均购自美国Thermo公司,氯仿(纯度99.0%)购自成都市科隆化学品有限公司,水购自香港屈臣氏公司蒸馏水,甲酸(质谱级)购自上海梯希爱化成工业发展有限公司,甲酸铵(纯度 $\geq 99.0\%$)购自上海西格玛奥德里奇贸易有限公司,逆转录试剂盒(批号:RR037Q)购自北京宝日生物技术有限公司。使用的一抗:抗 α -SMA抗体(1:1 000,批号:ab5694)、抗Collagen I抗体(1:1 000,批号:ab34710)、抗PPAR γ 抗体(1:1 000,批号:ab209350)、抗p-Smad2抗体(1:1 000,批号:ab280888)、抗p-Smad3抗体(1:2 000,批号:ab52903)和抗 β -actin抗体(1:1 000,批号:ab8227),使用的二抗:山羊抗小鼠IgG HRP(1:5 000,批号:ab6789)和山羊抗兔IgG HRP(1:5 000,批号:ab205718)均购自上海艾博抗贸易有限公司。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.3 实验动物分组与药物治疗

按随机数字表法将SD大鼠分为5组:对照组、模型组、ET低剂量组(90 mg/100 g)、ET中剂量组(180 mg/100 g)及ET高剂量组(450 mg/100 g),每组10只。参照文献[9]的方法复制肝纤维化模型大鼠。对照组按照体重注射0.2 mL/100 g的橄榄油溶液,其他组注射0.2 mL/100 g的40%四氯化碳 CCl_4 橄榄油溶液,2次/周,连续7周。检测大鼠血清AST和ALT水平,指标水平升高即表示肝纤维化模型复制成功。第4周开始灌胃给药,1次/d,连续4周,ET用0.5%羧甲基纤维素钠溶液(0.5% CMC-Na)溶解,对照组和模型组灌胃0.5% CMC-Na溶液,ET临床用药根据成人剂量体表面积公式 $^{[10]}$,1包/次(5 g),2次/d。ET低剂量组、ET中剂量组和ET高剂量组分别灌胃90 mg/100 g、180 mg/100 g和450 mg/100 g。4周后,所有大鼠禁食过夜,将大鼠置于一个装满二氧化碳

(体积置换率,70% vol/min)的密封容器中,从腹主动脉采血,并对其实施安乐死。4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min离心15 min,收集血清,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。取右叶肝用4%多聚甲醛液固定,其余肝脏组织保存于液氮中。

1.4 组织病理形态学

将大鼠肝组织样本(1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 1 cm)在室温下固定48 h,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,蜡浸渍,然后包埋并切成4 μm 厚的切片。在室温下进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色及Masson染色,在光学显微镜下观察肝组织的病理形态变化。

1.5 ELISA法检测大鼠血清ALT、AST和Hyp水平

将大鼠血清取出放入冰水浴中解冻,采用ELISA法分别检测各组大鼠血清ALT、AST和Hyp水平,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.6 非靶向代谢组学分析

1.6.1 代谢物提取 精确称量20 μg 肝脏样本,加入1 000 μL 组织提取液,研磨60 s;4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心10 min,将上清液转移至检测瓶中进行液相色谱-质谱联用技术检测。

1.6.2 色谱条件 Vanquish超高效液相系统(美国Thermo公司),ACQUITY UPLC $^{\text{®}}$ HSS T3(2.1 $\times$ 100 mm,1.8 μm)色谱柱(上海沃特世科技有限公司),流速为0.3 mL/min,柱温为40 $^{\circ}\text{C}$,样品进样量为2 μL 。在正离子模式下,流动相为0.1%甲酸乙腈(B1)和0.1%甲酸水(A1),使用梯度洗脱方案:0~1 min,8% B1;1~8 min,8%~98% B1;8~10 min,98% B1;10~10.1 min,98%~8% B1;10.1~12 min,8% B1。在负离子模式下,采用乙腈(B2)和5 mmol/L甲酸铵水(A2)作为流动相,洗脱梯度设置如下:0~1 min,8% B2;1~8 min,8%~98% B2;8~10 min,98% B2;10~10.1 min,98%~8% B2;10.1~12 min,8% B2。

1.6.3 质谱条件 Orbitrap Exploris 120质谱检测器(美国Thermo公司)使用电喷雾离子源,分别在正负离子模式下进行数据采集。正离子模式下的喷雾电压为3.50 kV,负离子模式下则为-2.50 kV,鞘气设置为40 arb,辅助气设置为10 arb。毛细管温度为325 $^{\circ}\text{C}$,使用分辨率60 000进行一级全扫描,一级离子扫描范围为100~1 000 m/z,并使用高能碰撞解离实施二级解离,碰撞能量为30%,二级分辨率为15 000。前4个离子信号被选中进行碎裂,同时动态

排除无必要的再结合串联质谱信息。

1.6.4 代谢组学分析 在 Compound Discover 3.3 软件(美国 Thermo 公司)中导入原始数据,进行精确质量和保留时间的峰对齐与提取。然后,将经过预处理的数据导入 SIMCA-P 14.1 软件(瑞典 Umetrics 公司),进行主成分分析(Principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(Partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。根据 VIP 值 >1 、差异倍数(FC) <0.6 或 FC >1 , $P<0.05$ 来筛选差异代谢物。利用 HMDB 数据库和代谢途径分析数据库(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)鉴定这些代谢产物,然后运用 MetaboAnalyst 5.0 进行代谢途径的富集分析。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应检测基因相对表达量

通过 TRIzol 提取大鼠肝组织总 RNA,在酶标仪上检测 RNA 浓度和纯度。按照逆转录试剂盒说明书方法将 RNA 逆转录成 cDNA,行实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)(SYBR Green 法),反应条件:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 延伸 30 s,重复 40 次。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
β -actin	正向: 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3'	20
	反向: 5'-GCTAGGAGCCAGGGCAGTA-3'	19
α -SMA	正向: 5'-TCCTGACCCTGAAGTATCCG-3'	20
	反向: 5'-TCTCCAGAGTCCAGCACAAAT-3'	20
Collagen I	正向: 5'-CTGCCGATGTCGCTATCC-3'	18
	反向: 5'-CCACAAGCGTGCTAGGT-3'	19

1.8 Western blotting 检测蛋白相对表达量

肝脏样品均质后,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,使用 BCA 法测定蛋白浓度,使用牛血清白蛋白作为标准蛋白。随后,煮沸 5 min 使蛋白变性,每组取 100 μ g 通过电泳分离开,采用湿转将其电转至 PVDF 膜。用 5% 脱脂乳封闭后剪下 α -SMA、Collagen I、PPAR γ 、p-Smad2、p-Smad3 和 β -actin 蛋

白,孵育在对应一抗及二抗溶液,洗膜后滴加化学发光试剂对各组蛋白条带进行显色。检测到的目的蛋白与内参 β -actin 的灰度值的比值表示目的蛋白相对表达量,并进行归一化处理。

1.9 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 9.5 统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较用方差分析,两两比较用 LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ET 对大鼠肝脏组织病理学的影响

HE 染色结果显示,对照组正常的肝细胞呈淡红色的细胞质和深蓝色的细胞核,呈中央静脉放射状,无坏死或炎症细胞浸润迹象。与对照组比较,模型组表现出肝细胞周围组织染色加深,结构紊乱,炎症细胞广泛浸润,纤维组织明显增生,静脉周围的桥接纤维化。与模型组比较,ET 给药组的肝组织结构和炎症反应均有改善,其中 ET 高剂量组尤为明显。Masson 染色结果显示,对照组的肝小叶保持完整,仅在肝静脉壁周围观察到极少的胶原纤维染色,表明不存在胶原纤维增生。与对照组比较,模型组表现出肝小叶结构破坏,肝静脉和门静脉周围有广泛而致密的胶原纤维沉积,导致纤维间隔的形成。与模型组相比,ET 给药组的肝间隔变薄,胶原蛋白表达减少。见图 1。

2.2 ET 对大鼠肝功能 ALT、AST 和 Hyp 的影响

各组大鼠血清 ALT、AST 和 Hyp 水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠血清 ALT 和 AST 水平升高($P<0.05$),表明肝纤维化模型复制成功;与模型组比较,各 ET 给药组大鼠血清 ALT 和 AST 水平降低($P<0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠肝组织 Hyp 水平升高($P<0.05$);与模型组比较,各 ET 给药组大鼠肝组织 Hyp 水平降低($P<0.05$)。见表 2。

2.3 ET 对大鼠肝纤维化差异代谢物的影响

经多元统计分析结果显示,与对照组比较,模型组在正、负离子模式下,分别获得了 6 126 个和 5 260 个化合物。PEAK 综合评估(Peak comprehensive assessment, PCA)显示 QC 样本点密集,说明该分析系统稳定性和重复性较高(见图 2A、2B)。OPLS-DA

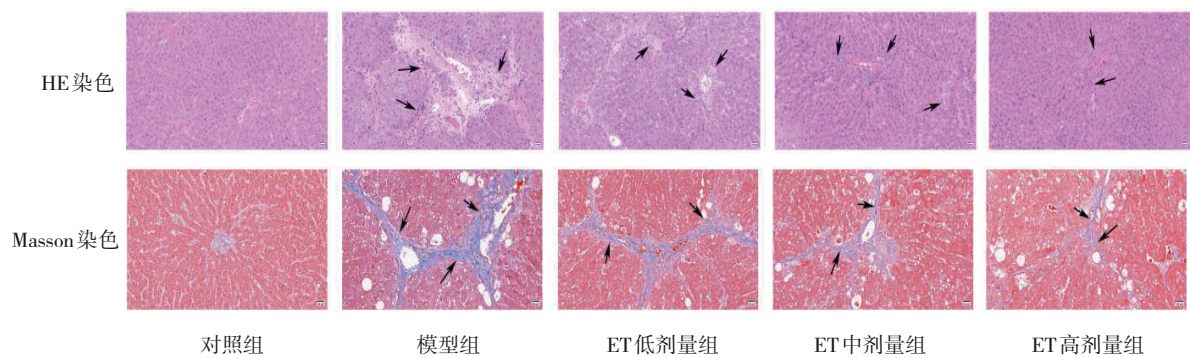


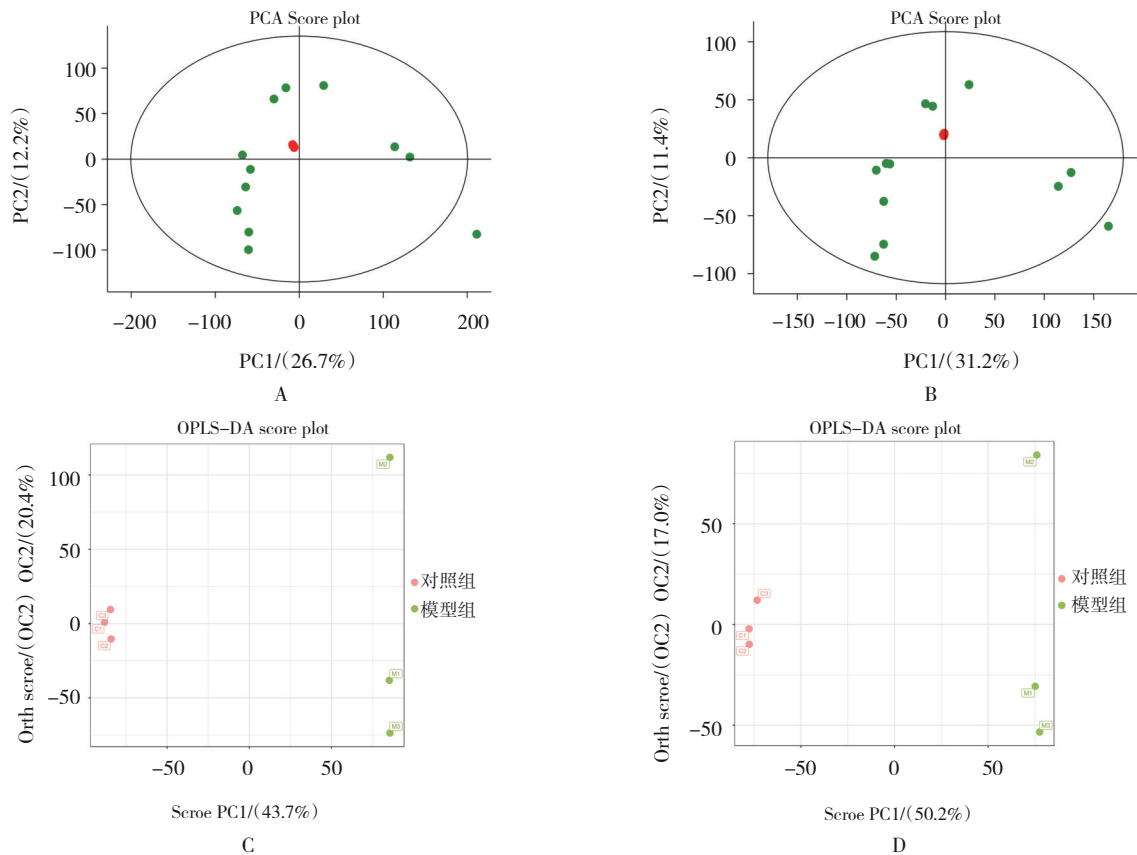
图 1 大鼠肝纤维化不同染色图 (×200)

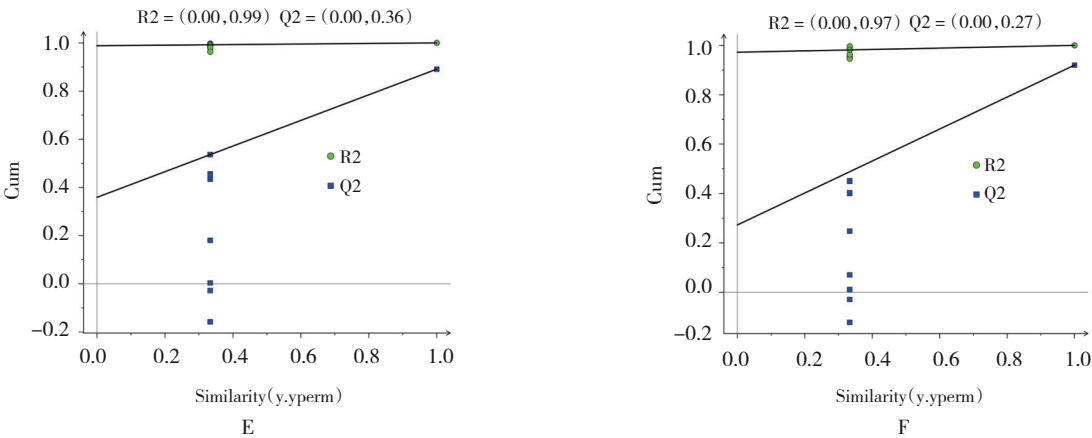
表 2 各组大鼠血清AST、ALT和Hyp水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT/(u/L)	AST/(u/L)	Hyp/(μg/mg)
对照组	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01
模型组	5.47 ± 0.03	3.35 ± 0.03	2.36 ± 0.02
ET低剂量组	3.57 ± 0.02	2.57 ± 0.02	1.94 ± 0.02
ET中剂量组	3.01 ± 0.01	2.36 ± 0.01	1.61 ± 0.03
ET高剂量组	2.49 ± 0.03	2.03 ± 0.03	1.27 ± 0.02
F值	343.600	52.790	129.600
P值	0.000	0.000	0.000

发现,与对照组比较,模型组在正、负离子模式下,样品点均明显分离,且组内样品点紧密聚集(见图 2C、2D);随机置换检验中模型组和对照组在正、负离子模式下的R2(解释率,表示拟合优度)和Q2(预测率,反映模型预测能力)分别为0.99、0.97和0.36、0.27(见图 2E、2F),显示各组模型具有较高的解释能力和预测准确性,拟合良好,可用于筛选差异代谢物。

经差异代谢物分析结果显示,在正、负离子模式下,与对照组比较,模型组大鼠体内代谢物水平发生了显著变化,共筛选到 34 种与肝纤维化发病相





A 和 B:正、负离子模式下 PCA 分析; C 和 D:正、负离子模式下对照组与模型组肝脏样本 OPLS-DA 分析; E 和 F:正、负离子模式下对照组与模型组肝脏样本置换检验。

图2 大鼠肝纤维化样本差异代谢物的筛选

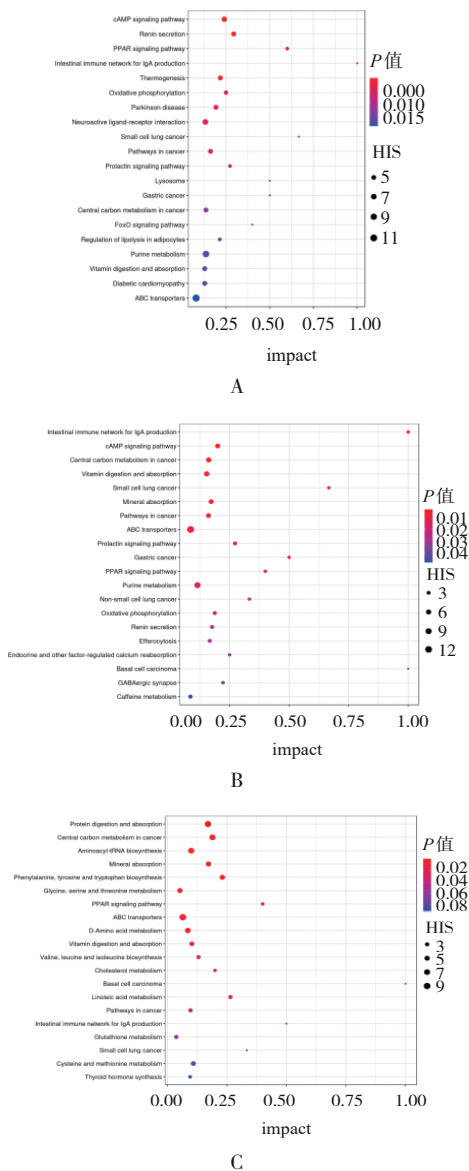
关的差异性代谢物,20 种化合物含量上调 ($P < 0.05$),14 种化合物含量显著下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较,ET 高剂量组筛选到 34 个能够明显回调肝纤维化发病相关的差异代谢物,20 种化合物含量显著上调 ($P < 0.05$),14 种化合物含量显著下调 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 ET 对大鼠肝纤维化差异代谢物的影响

代谢物	化学式	m / z	对照组 VS		模型组 VS		代谢物	化学式	m / z	对照组 VS		模型组 VS	
			VIP	变化	VIP	变化				VIP	变化	VIP	变化
4-羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂	123.043 9	1.474 12	↓	1.489 73	↑	腺苷酸	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	348.072 1	1.351 39	↑	1.314 40	↓
消旋蛋氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	150.060 2	1.501 75	↑	1.450 48	↓	花生四烯酸	C ₂₂ H ₃₇ NO ₂	348.288	1.471 63	↑	1.503 01	↑
十一烷酸	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	186.954 6	1.505 76	↑	1.438 85	↓	乙醇胺	C ₂ H ₇ NO	75.071 4	1.433 89	↑	1.328 90	↑
L-2-氨基-6-氧代庚二酸	C ₇ H ₁₁ NO ₅	190.086 5	1.443 33	↑	1.329 01	↓	二磷酸腺苷钠	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₇ P ₂ Na	391.283 4	1.433 89	↑	1.328 90	↑
吡布特罗	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃	241.154 2	1.405 23	↓	1.492 36	↑	3β,5β-酮二醇	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	399.324 4	1.477 80	↑	1.495 67	↑
苯乙酰谷氨酰胺	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	265.116 9	1.392 03	↓	1.388 38	↑	地奥司明	C ₂₇ H ₄₂ O ₃	415.318 4	1.395 54	↑	1.436 17	↑
维生素 B1	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	265.110 6	1.417 85	↓	1.430 29	↑	20-羟基蛻皮激素	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	463.288 4	1.413 03	↑	1.499 48	↓
雌二醇	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	273.253 2	1.496 19	↓	1.507 89	↑	5-氧阿维菌素'2a'	C ₃₄ H ₄₈ O ₉	600.328 9	1.405 07	↓	1.457 41	↑
南诺龙	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	274.200 4	1.267 11	↓	1.532 73	↑	腺嘌呤	C ₅ H ₅ N ₅	134.047 2	1.312 57	↑	1.297 32	↓
神经鞘氨醇	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	282.278 9	1.492 77	↓	1.470 01	↑	1-萘胺	C ₁₀ H ₉ N	143.071 4	1.330 15	↓	1.407 73	↑
油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	283.174 8	1.503 72	↓	1.499 76	↑	D-木糖醇	C ₅ H ₁₂ O ₅	151.060 9	1.344 77	↓	1.366 91	↑
反油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	283.262 1	1.332 49	↑	1.485 10	↓	5-羟基吡啶乙酸	C ₁₀ H ₉ NO ₃	191.108	1.349 78	↑	1.308 95	↓
9-顺式视黄醛	C ₂₀ H ₂₈ O	285.220 7	1.262 68	↓	1.371 09	↑	1,3-二磷酸甘油酸	C ₃ H ₈ O ₁₀ P ₂	264.951 3	1.368 46	↑	1.384 48	↓
棕榈酰乙醇胺	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	300.289 2	1.358 90	↑	1.374 48	↑	α-亚麻酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	277.216 8	1.330 74	↑	1.345 76	↓
癸酰左旋肉碱	C ₁₇ H ₃₃ NO ₄	316.247 9	1.465 79	↑	1.401 73	↑	牛磺酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.233 6	1.404 20	↑	1.167 60	↓
咖啡醇	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	317.209 7	1.472 75	↑	1.423 73	↓	十六烷二酸	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	285.206 8	1.407 56	↓	1.355 08	↑
前列腺素 E2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	335.220 6	1.490 74	↑	1.272 45	↓	全反式视黄酸	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300.204 4	1.233 72	↓	1.390 35	↑
							三磷酸腺苷	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	505.984 9	1.397 19	↑	1.409 77	↓

注：↑ 表示代谢物上调; ↓ 表示代谢物下调。

经代谢通路分析结果显示,对照组与模型组的比较,筛选得到 20 条代谢通路,见图 3A;ET 高剂量组与模型组的比较,筛选得到 20 条代谢通路,见图 3B;最后,比较对照组、模型组和 ET 高剂量组,筛选得到 20 条代谢通路,见图 3C;根据 KEGG 分析结果显示,ET 对治疗肝纤维化的关键途径主要包括:PPAR 信号通路、促进免疫球蛋白 A 生成的肠道免疫网络、小细胞肺癌、癌症途径、癌症中心碳代谢、维生素在消化吸收中的作用、ABC 转运蛋白等。



A:对照组 VS 模型组差异代谢物的 KEGG 富集分析气泡图;B:ET 高剂量组 VS 模型组差异代谢物的 KEGG 富集分析气泡图;C:对照组 VS 模型组 VS ET 高剂量组差异代谢物的 KEGG 富集分析气泡图。

图 3 大鼠肝纤维化样本差异代谢物的 KEGG 富集分析

2.4 ET 对大鼠肝组织肝纤维化标志物 Collagen I 和 α -SMA 表达水平的影响

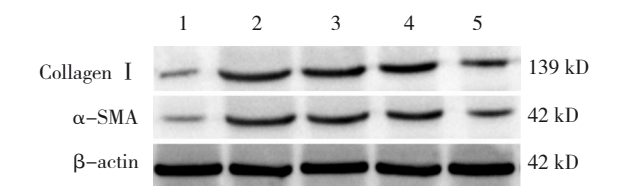
各组大鼠肝组织 Collagen I 和 α -SMA 基因和蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),与对照组比较,模型组大鼠肝组织 Collagen I 和 α -SMA 基因和蛋白相对表达量均升高($P<0.05$);与模型组比较,各 ET 给药组大鼠肝组织 Collagen I 和 α -SMA 基因和蛋白相对表达量均下降($P<0.05$)。见表 4、5 和图 4。

表 4 各组大鼠肝组织 Collagen I 和 α -SMA 基因相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Collagen I 基因	α -SMA 基因
对照组	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
模型组	22.32 $\pm$ 0.02	13.39 $\pm$ 0.03
ET 低剂量组	16.19 $\pm$ 0.02	11.08 $\pm$ 0.01
ET 中剂量组	7.43 $\pm$ 0.03	3.40 $\pm$ 0.02
ET 高剂量组	2.33 $\pm$ 0.01	1.90 $\pm$ 0.01
F 值	267.300	148.700
P 值	0.000	0.000

表 5 各组大鼠肝组织 Collagen I 和 α -SMA 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Collagen I 蛋白	α -SMA 蛋白
对照组	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
模型组	4.57 $\pm$ 0.01	4.21 $\pm$ 0.02
ET 低剂量组	4.12 $\pm$ 0.02	3.39 $\pm$ 0.01
ET 中剂量组	3.75 $\pm$ 0.02	3.15 $\pm$ 0.02
ET 高剂量组	1.78 $\pm$ 0.01	1.52 $\pm$ 0.02
F 值	238.300	382.000
P 值	0.000	0.000



1:对照组; 2:模型组; 3:ET 低剂量组; 4:ET 中剂量组; 5:ET 高剂量组。

图 4 大鼠肝组织 Collagen I 和 α -SMA 的蛋白条带图

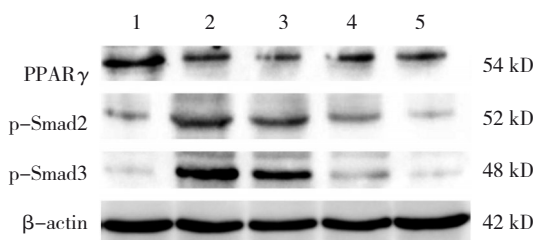
2.5 ET 对大鼠肝组织中 PPAR 信号通路与 TGF- β /Smad 信号通路相关蛋白表达的影响

各组大鼠肝组织 PPAR γ 和 p-Smad2 和 p-Smad3

蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠肝组织 PPAR γ 蛋白相对表达量降低($P < 0.05$);与模型组比较,ET 中剂量组和 ET 高剂量组 PPAR γ 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。与对照组比较,模型组大鼠肝组织 p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白相对表达量升高($P < 0.05$);与模型组比较,ET 给药组 p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白相对表达量降低($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。见表 6 和图 5。

表 6 各组大鼠肝组织 PPAR γ 、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PPAR γ	p-Smad2	p-Smad3
对照组	1.74 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
模型组	1.12 $\pm$ 0.02	29.60 $\pm$ 0.01	8.60 $\pm$ 0.02
ET 低剂量组	1.00 $\pm$ 0.01	22.59 $\pm$ 0.02	6.55 $\pm$ 0.01
ET 中剂量组	1.43 $\pm$ 0.01	9.00 $\pm$ 0.02	4.04 $\pm$ 0.03
ET 高剂量组	1.55 $\pm$ 0.02	1.27 $\pm$ 0.02	2.06 $\pm$ 0.02
F 值	24.750	73.820	43.510
P 值	0.000	0.000	0.000



1:对照组; 2:模型组; 3:ET低剂量组; 4:ET中剂量组; 5:ET高剂量组。

图 5 各组大鼠肝组织 PPAR γ 、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白条带图

3 讨论

肝纤维化被认为是许多慢性肝病中普遍存在的病理过程,导致肝功能丧失和细胞外基质广泛沉积^[11]。复制肝纤维化模型是研究肝纤维化发病机制、评价治疗方法和进行药物筛选的重要手段^[12]。CCl₄ 通常在实验模型中用于诱导肝纤维化,因为 CCl₄ 诱导的肝纤维化与在人类中观察到的肝纤维化表现出形态相似性^[13]。本研究成功复制了 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型,表现在模型组血清 ALT 和 AST 水平升高。使用 HE 染色的组织学分析及 Masson 染色和肝纤维化标志物评估,结果表明,ET 给药组能够改善 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化模型。

在肝纤维化的发展中, Collagen I 不仅作为肿瘤微环境的一部分影响肿瘤细胞的行为,还可能通过其受体介导的信号传导途径促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[14]。此外, Collagen I 的积累破坏正常的肝脏结构,并促进纤维化瘢痕组织的形成^[15]。 α -SMA 是在多种组织和疾病状态下表达的蛋白,特别是在纤维化和肿瘤发展过程中具有重要作用^[16]。 α -SMA 在肝癌的发展中起着关键作用,这表明 α -SMA 可能作为肿瘤发展的生物标志物^[17]。Hyp 是一种非蛋白原性氨基酸,主要存在于胶原蛋白中^[18]。Hyp 水平的升高是肝脏中胶原蛋白周转和纤维生成增加的可靠生物标志物^[19]。在肝纤维化过程中, Hyp 含量增加,反映胶原合成和沉积增强^[20]。Hyp 水平的测量为了解肝纤维化的程度和抗纤维化治疗的疗效提供了有价值的见解^[21]。本研究中肝纤维化标志物在 ET 治疗下表达水平有所改善,为临床应用提供了科学依据。

本研究采用代谢组学技术来探究大鼠肝脏差异代谢物,以及代谢物表达水平、趋势和 KEGG 代谢途径富集分析,得到 PPAR 信号通路是 ET 治疗肝纤维化的主要代谢途径。PPAR γ 是 PPAR 家族中的一个重要成员,其在调节脂肪代谢、炎症反应,以及细胞增殖和凋亡等方面发挥着重要作用^[22]。研究表明, PPAR γ 通过抑制 TGF- β 诱导的细胞分化和增殖,对抗纤维化和炎症反应^[23]。PPAR γ 的激活可以抑制 HSCs 的活化和增殖,从而减缓肝纤维化的进程^[24]。黄璐等^[25]研究发现,丹参酮 II A 通过激活 PPAR 信号通路,能够抑制 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型中的炎症反应和氧化应激,减少纤维化形成。此外,安祯祥等^[26]研究发现,扶脾柔肝方通过激活 PPAR 和 TGF- β 信号通路,也能有效抑制 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化。总而言之,ET 抗 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化作用可能与 PPAR 信号通路的调节相关。

蒙医是一门以实践和探索为基础的学科。ET 是内蒙古地区常用的一种方剂,主要用于治疗肝病,其疗效已有充分证明,哈斯巴根等^[27]研究发现, ET 治疗组对血清生化指标是有改善作用,得到抗大鼠肝纤维化和抗炎作用较显著。本研究结果显示, ET 给药组显著减少了病理学特征、降低了血清生化指标、肝纤维化标志物的表达,以及 PPAR 和 TGF- β 信号通路相关蛋白的表达。

综上所述,ET显著改善CCl₄诱导的大鼠肝纤维化模型,其机制可能与调节PPAR信号通路有关。然而,进一步的研究对确认该机制是必不可少的。

参考文献:

- [1] 陈宵瑜,杨长青.肝纤维化发生机制研究新进展[J].实用肝脏病杂志,2016(1): 121-124.
- [2] SINGAL A K, MATHURIN P. Diagnosis and treatment of alcohol-associated liver disease: a review[J]. JAMA, 2021, 326(2): 165-176.
- [3] 马会会,夏超明.肝星状细胞活化相关信号通路的研究进展[J].中西医结合肝病杂志,2019, 29(4): 380-382.
- [4] WANG Z R, WANG J H, HU C L, et al. The effect of down-regulation of Smad3 by RNAi on hepatic stellate cells and a carbon tetrachloride-induced rat model of hepatic fibrosis[J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(2): 91-99.
- [5] CHENG K, YANG N N, MAHATO R I. TGF-beta1 gene silencing for treating liver fibrosis[J]. Mol Pharm, 2009, 6(3): 772-779.
- [6] 刁俊玲,伍敏,黄荣凤,等.新型PPAR γ 激动剂CMHX008对高糖诱导人肾小管上皮HK-2细胞纤维化的影响及机制[J].中国药理学通报,2019, 35(10): 1363-1369.
- [7] 崔竞文,张少乾,刘苏瑾,等.蒙医常用524首方剂处方的用药规律[J].世界中医药,2022, 17(11): 1633-1639.
- [8] 萨尔娜,阿拉腾图雅.蒙医治疗肝硬化腹水的临床疗效分析及前景[J].临床医药文献电子杂志,2018, 5(19): 180-182.
- [9] IREDALE J P, BENYON R C, PICKERING J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors[J]. J Clin Invest, 1998, 102(3): 538-549.
- [10] 徐叔云.药理实验方法学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2002: 203-206.
- [11] 夏海珊,陈少茹,钟月春,等.肝纤维化的发病机制和药物治疗现状[J].中国医药导报,2014(18): 162-165.
- [12] 曾志萍,郭津生.肝纤维化发生机制及治疗研究进展[J].世界华人消化杂志,2017, 25(7): 569-575.
- [13] KIM S M, SONG G Y, SHIM A, et al. Hyaluronan synthase 2, a target of miR-200c, promotes carbon tetrachloride-induced acute and chronic liver inflammation via regulation of CCL3 and CCL4[J]. Exp Mol Med, 2022, 54(6): 739-752.
- [14] SHI R, ZHANG Z, ZHU A K, et al. Targeting type I collagen for cancer treatment[J]. Int J Cancer, 2022, 151(5): 665-683.
- [15] YIN L, ZHANG Y J, SHI H C, et al. Proteomic profiling of hepatic stellate cells in alcohol liver fibrosis reveals proteins involved in collagen production[J]. Alcohol, 2020, 86: 81-91.
- [16] 李艳宏,赵秀芳.乳腺肿瘤组织间质中CD34、 α -SMA的表达及意义[J].海南医学院学报,2014, 20(8): 1035-1037.
- [17] 杨智,符碧薇,江朝娜,等.大鼠肝癌发生过程中 α -SMA及AFP动态变化[J].中国老年学杂志,2013, 33(18): 4501-4502.
- [18] 荣华,王正阳,郝亭亭,等.甘氨酸、脯氨酸及羟脯氨酸介导胶原蛋白代谢研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2021, 49(11): 53-61.
- [19] 辛晓恩,孔德元,马宝录,等.抗纤方治疗肝纤维化的临床疗效观察[J].中药材,2017, 40(7): 1732-1734.
- [20] 刘莺,刘平,刘成海,等.细胞增殖与凋亡相关蛋白质在大鼠肝纤维化形成与消减中的动态变化[J].中华肝脏病杂志,2005, 13(8): 563-566.
- [21] MYOJIN Y, HIKITA H, SUGIYAMA M, et al. Hepatic stellate cells in hepatocellular carcinoma promote tumor growth via growth differentiation factor 15 production[J]. Gastroenterology, 2021, 160(5): 1741-1754.e16.
- [22] 尹微. COX-2和PPAR γ 在肝纤维化中的研究进展[J].医学综述,2014, 20(19): 3483-3485.
- [23] KULKARNI A A, THATCHER T H, OLSEN K C, et al. PPAR- γ ligands repress TGF β -induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15909.
- [24] 蔡玲燕,刘菲. PPAR γ 对肝纤维化中肝星状细胞相关信号通路的影响[J].国际内科学杂志,2009, 36(7): 417-419.
- [25] 黄璐.丹参酮IIA通过调节PPAR- γ 信号通路改善非酒精性脂肪肝纤维化的机制研究[D].广州:南方医科大学,2022.
- [26] 安祯祥,何远利,王敏,等.扶脾柔肝方对肝纤维化大鼠肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 与转化生长因子- β_1 表达的影响[J].中国老年学杂志,2018, 38(18): 4474-4478.
- [27] 哈斯巴根,吴哈达,图雅,等.蒙药额力根汤治疗肝纤维化大鼠的实验研究[J].世界最新医学信息文摘,2018, 18(85): 93.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 藏焱帆,董至恒,梁丽娟,等.基于非靶向代谢组学及实验验证探讨蒙药额力根汤治疗肝纤维化的作用机制[J].中国现代医学杂志,2025, 35(7): 39-47.

Cite this article as: ZANG Y F, DONG Z H, LIANG L J, et al. Elucidating the anti-fibrotic mechanism of Mongolian medicine Elegen Tang via integrated untargeted metabolomics and experimental validation[J]. China Journal of Modern Medicine, 2025, 35(7): 39-47.