

基于“主客交”理论的补虚通络法抗肝纤维化大鼠的分期调控效应的蛋白质组图谱

王鑫¹, 朱朋玉¹, 文莉¹, 刘悛斌¹, 岳傲春¹, 陈梓怡¹, 张晶¹, 朱丽², 冯全生^{1*}, 姜岑^{1*}

(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137; 2. 彭州市人民医院, 成都 611930)

[摘要] 目的:采用蛋白质组学技术探讨芪甲柔肝方抗肝纤维化的分期疗效差异机制。方法:采用皮下注射四氯化碳(CCl₄)+橄榄油的方式建立大鼠肝纤维化分期模型。104只SD大鼠随机分为13个组:正常组(Control组)、模型-2、4、6、8周组(Model-2W、4W、6W、8W组),芪甲柔肝方-2、4、6、8周组(QRF-2W、4W、6W、8W组),复方鳖甲软肝片-2、4、6、8周组(FBR-2W、4W、6W、8W组)。药物干预2周后。采集大鼠肝脏组织和腹主动脉血样检测。苏木素-伊红(HE)、马松(Masson)染色,天狼星红(PSR)染色观察肝组织病理损伤和胶原纤维沉积;免疫组化(IHC)检测肝组织纤维化标志物含量。全自动生化分析仪检测血清肝功能指标;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清肝纤维化指标水平。取Control组、各期Model组、各期QRF组肝组织,采用非标记定量蛋白质组学分析各组差异蛋白,并利用蛋白免疫印迹法(Western blot)对关键蛋白进行验证;最后对差异蛋白进行生物信息学分析。结果:(1)CCl₄+橄榄油构建的大鼠肝纤维化分期模型,在造模第2、4、6、8周病理结果符合F1、F2、F3、F4期Metavir标准;与Control组比较,各期Model组 α -肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原蛋白(Collagen I)蛋白的表达明显增高($P<0.05$),各期Model组大鼠血清肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、直接胆红素(DBIL)、总胆红素(TBil)水平显著升高($P<0.01$),各期Model组大鼠血清肝纤维化指标Ⅲ型前胶原肽(PⅢP),Ⅳ型胶原蛋白(Ⅳ-C),透明质酸(HA),层粘连蛋白(LN)水平明显升高($P<0.05, P<0.01$)。研究成功构建了肝纤维化大鼠分期模型。(2)与各期Model组比较,同时点各期给药组肝细胞气球样变减少,肝细胞排列较Model组规整,炎症细胞浸润减少;蓝染胶原纤维明显变细、变薄,纤维间隔缩小、变窄;胶原纤维面积及PSR染色面积缩小($P<0.05$)。 α -SMA、Collagen I表达阳性面积明显减少($P<0.05$),各期Model组大鼠ALT、AST、ALP、DBIL、TBil水平显著降低($P<0.05, P<0.01$),各期Model组大鼠PⅢP,Ⅳ-C,HA, LN水平明显降低($P<0.05$)。其中各项指标改善以F3期最为显著($P<0.01$)。(3)蛋白质组学结果显示:4个期Model组与Control组比较和QRF组与Model组比较共有165个差异蛋白呈回调趋势;Western blot检测NAD(P)H醌氧化还原酶1(NQO1)、丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、精氨酸酶1(Arg1)、谷胱甘肽S-转移酶 α 1(GSTA1)水平与蛋白质组学结果一致。生物信息学结果显示165个差异蛋白富集到多条信号通路,发现药物代谢-细胞色素P450、精氨酸生物合成、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路与肝纤维化密切相关,提示芪甲柔肝方可能通过调节上述通路发挥分期调控肝纤维化分期调控的作用。结果:芪甲柔肝方可能是通过调节药物代谢-细胞色素P450、精氨酸生物合成、PPAR信号通路分期调控肝纤维化。

[关键词] 蛋白质组学; 芪甲柔肝方; 肝纤维化; 分期模型; 分期调控

[中图分类号] R242;R575;R256.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)14-0119-14

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260594

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251202.0953.001>

[网络出版日期] 2025-12-02 12:19:20 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



DIA Proteomic Profiling on Staged Regulatory Effect of Tonifying Deficiency and Dredging Collaterals Method on Liver Fibrosis in Rats Based on Theory of "Zhu Ke Jiao"

WANG Xin¹, ZHU Pengyu¹, WEN Li¹, LIU Jibin¹, YUE Aochun¹, CHEN Ziyi¹, ZHANG Jing¹,
ZHU Li², FENG Quansheng^{1*}, JIANG Cen^{1*}

(1. School of Basic Medicinal Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine,

[收稿日期] 2025-10-10

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82074399);四川省科技计划重点研发项目(2020YFS0301)

[第一作者] 王鑫,在读博士,从事温病理论与感染性疾病防治研究,E-mail:553035946@qq.com

[通信作者] *冯全生,博士,二级教授,博士生导师,从事温病理论与感染性疾病防治研究,E-mail:fengqs118@163.com;

*姜岑,博士,教授,硕士生导师,从事中医气血与脏器纤维化研究,E-mail:Jiangcen517@163.com

Chengdu 611137, China; 2. The People's Hospital of Pengzhou, Chengdu 611930, China)

[Abstract] **Objective:** This paper aims to investigate the differential mechanisms underlying the staged therapeutic effects of Qijia Rougan formula on liver fibrosis using proteomic technology. **Methods:** The staged rat model of liver fibrosis was established by subcutaneous injection of carbon tetrachloride (CCl₄) and olive oil. One hundred and four SD rats were randomized into thirteen groups: a normal group, a two-week model group, a four-week model group, a six-week model group, an eight-week model group, a two-week Qijia Rougan formula group, a four-week Qijia Rougan formula group, a six-week Qijia Rougan formula group, an eight-week Qijia Rougan formula group, a two-week compound Biejia Ruangan tablet group, a four-week Compound Biejia Ruangan Tablet group, a six-week Compound Biejia Ruangan Tablet group, and an eight-week compound Biejia Ruangan tablet group. After two weeks of drug intervention, liver tissue and abdominal aortic blood samples were collected from the rats for testing. Hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson staining, and Picro Sirius red staining were used to observe pathological damage and collagen fiber deposition in liver tissues. Immunohistochemistry (IHC) was employed to detect the contents of fibrosis markers in liver tissues. The contents of liver function indicators in the serum were measured using a fully automated biochemical analyzer, and the levels of liver fibrosis indicators in the serum were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Liver tissues from the normal group, each model group, and each Qijia Rougan formula group were subjected to label-free quantitative proteomic analysis to identify differential proteins among the groups, with key proteins validated by Western blot. Finally, bioinformatics analysis was performed on the differential proteins. **Results:** (1) The staged rat model of liver fibrosis constructed with CCl₄ and olive oil showed pathological results at the 2nd, 4th, 6th, and 8th weeks of modeling that were consistent with the Metavir standards for the F1, F2, F3, and F4 stages. Compared with those in the normal control group, the protein expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and Collagen I were significantly increased in each stage ($P < 0.05$). The levels of liver function indicators in the serum, including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), direct bilirubin (DBIL), and total bilirubin (TBil) in each model group, were significantly elevated in each stage ($P < 0.01$). The levels of liver fibrosis indicators in the serum, including procollagen III peptide (P III P), type IV collagen (IV -C), hyaluronic acid (HA), and laminin (LN) in each model group, were significantly increased in each stage ($P < 0.05$, $P < 0.01$). This study successfully established a staged rat model of liver fibrosis. (2) Compared with the model groups at each stage, the administration groups showed a reduction in hepatocyte ballooning degeneration, a more orderly arrangement of hepatocytes, and a decrease of inflammatory cell infiltration. The blue-stained collagen fibers became significantly thinner and finer, with reduced and narrowed fibrous septa. The areas of collagen fibers and Picro Sirius red staining were reduced ($P < 0.05$). The positive areas of α -SMA and Collagen I expression were significantly decreased ($P < 0.05$). The levels of ALT, AST, ALP, DBIL, and TBil in the rats of the model groups at each stage were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The levels of P III P, IV -C, HA, and LN in the rats of the model groups at each stage were significantly decreased ($P < 0.05$). Among these, the improvements in all indicators were most significant in the F3 stage ($P < 0.01$). (3) The proteomic results show that a total of 165 differential proteins exhibit a callback trend when comparing the model groups at four stages with the normal group, and when comparing the Qijia Rougan formula group with the model group. Western blot analysis reveals that the levels of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), arginase 1 (Arg1), and glutathione S-transferase α 1 (GSTA1) were consistent with the proteomic results. Bioinformatics results reveal that 165 differentially expressed proteins are enriched in multiple signaling pathways. Notably, signaling pathways such as drug metabolism-cytochrome P450, arginine biosynthesis, and the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway were found to be closely associated with liver fibrosis, suggesting that the Qijia Rougan formula may exert its staged regulatory effects on liver fibrosis by regulating these pathways. **Conclusion:** The Qijia Rougan formula may achieve staged regulation of liver fibrosis by regulating drug metabolism-cytochrome P450, arginine biosynthesis, and the PPAR signaling pathway.

[Keywords] proteomics; Qijia Rougan formula; liver fibrosis; staged model; staged regulation

肝纤维化(LF)是各种病因引起的肝损伤的共同病理结果,主要表现为细胞外基质(ECM)沉积,瘢痕形成,肝脏结构发生变化,正常肝功能逐渐丧失^[1]。常见病因有药物、病毒感染、自身免疫、代谢等因素^[2]。进一步发展为肝硬化或肝细胞癌(HCC)。慢性肝病每年导致超过200万人死亡,占全球所有死亡人数的4%,是全球第11大死亡原因。由于全球代谢风险因素等增加,LF发病率将逐年上升^[3]。然而,尚无疗效明确的生物制剂或化学药物

可供LF临床应用^[4]。病因治疗仍然是目前抗LF的首要策略,如长期有效抑制肝炎病毒复制、戒酒等可减轻肝脏持续损伤,从而促进纤维化肝组织的修复^[5]。而中医药防治LF具有改善患者临床症状,控制甚至逆转LF的优势,如扶正化瘀胶囊、安络化纤丸、复方鳖甲软肝片等应用于临床治疗LF,均证实安全有效^[6-7]。因此研究与开发治疗LF的中药,并阐明其机制对LF治疗具有重要的意义。

LF可归属于中医“胁痛”“肝着”“积聚”“胀”“肝

积”等范畴^[8]。是中医药治疗的优势病种。芪甲柔肝方(专利号CN 10727633 B),是团队基于首届全国名中医、著名温病与感染病专家张之文教授的临床经验,化裁《温疫论》名方“三甲散”形成。研究表明其抗LF效果明确,具有保肝降酶,缩小门静脉内径并能有效改善肝硬化、LF病人临床症状^[9]。课题组前期通过开展多中心临床研究(RCT)(注册号ChiCTR 2100049795)工作证实,芪甲柔肝方联合恩替卡韦胶囊治疗慢乙肝LF患者,患者四因素纤维化指数模型(FIB-4)值、透明质酸(HA)、IV型胶原(IV-C)、肝脏硬度值治疗前均显著降低,且芪甲柔肝方联合恩替卡韦胶囊治疗效果明显优于单纯使用恩替卡韦胶囊治疗。芪甲柔肝方联合恩替卡韦胶囊治疗明显改善患者中医证候积分。对研究结果进一步分析发现在改善肝硬度(LSM)、FIB-4的计量差异分析中,治疗前后比较提示F3期亚组疗效最显著,整体疗效优于单纯恩替卡韦治疗组,提示F3期为该方潜在优效干预期^[10]。但其通过分期疗效差异作用机制仍未可知。近年来,组学技术在生物医学研究中得到广泛应用^[11]。他能识别疾病发展或药物治疗期间的生物调节分子,是阐明多靶点、多途径调控的有效方法。蛋白质组学能够促进对疾病发生发展的系统性理解,从整体上把握疾病的复杂性和动态性。本实验在前期工作基础上重点验证芪甲柔肝方抗LF的优势干预期,并探讨分期疗效差异的机制,找出潜在的作用靶点,以期中药干预临床介入时机提供依据,指导临床精准合理用药。主客交理论-临床研究-基础研究见增强出版附加材料。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠104只,体质量160~180 g,6~8周龄,采购于成都达硕实验动物有限公司,动物质量合格证编号51203500020534,许可证号SCXK(川)2020-030。大鼠饲养于成都中医药大学基础医学院科创中心动物房,保持24 h通风换气,室温20~24℃,空气湿度50%~60%,光照模拟正常昼夜循环,予大鼠维持饲料喂养,25 g/只/d,自由饮水,大鼠适应性喂养1周。

1.2 伦理 本研究符合实验动物福利的基本要求,经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(备案编号2021-66)。并严格遵循“减少(reduction)、替代(replacement)、优化(refinement)”3R原则。

1.3 药物 芪甲柔肝方组成包括黄芪(批号25030030,每1 g配方颗粒相当于饮片2.5 g)12 g,当

归(批号25070134,每1 g配方颗粒相当于饮片1.5 g)6 g,醋莪术(批号25010223,每1 g配方颗粒相当于饮片9 g)1.67 g,醋鳖甲(批号23030086,每1 g配方颗粒相当于饮片10 g)1.5 g,红花(批号25030325,每1 g配方颗粒相当于饮片2.2 g)8.18 g,醋三棱(批号24120030,每1 g配方颗粒相当于饮片9 g)1.67 g,桃仁(24070251,每1 g配方颗粒相当于饮片5 g)3 g,甘草(批号25010415,每1 g配方颗粒相当于饮片3 g)1.67 g。由四川新绿色药业科技发展有限公司于成都中医药大学国医馆免煎药房代制成中药配方颗粒。将芪甲柔肝方全方颗粒加入超纯水放入超声波清洗机中加热助溶至完全溶解,药液冷却至常温时使用。复方鳖甲软肝片(内蒙古福瑞医疗科技股份有限公司,批号C0120109,国药准字Z19991011,0.5 g/片)。研磨成粉末后溶解于蒸馏水中,混合得到混悬液。

1.4 试剂 四氯化碳(CCl₄,上海易恩化学技术有限公司,批号RH286938);橄榄油(上海易恩化学技术有限公司,批号RH374289);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBIL)测定试剂盒(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,批号分别为1401210、140221003、140321001、140321001、144420001);伊红染液(合肥博美生物科技有限公司, YE2080);蛋白定量染液(北京Huaxingbio公司,货号HXJ5137);牛血清白蛋白(美国Thermo Scientific公司,货号23209);二硫苏糖醇(DTT)、碘代乙酰胺(IAM)、尿素(美国Amresco公司,货号分别为M109-5G、M216-30G、M123-1KG);Cell lysis buffer for Western and IP(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0013);BCA蛋白浓度测定试剂盒,SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×),彩色预染蛋白Marker(10~180 kDa)(北京Biosharp公司,批号分别为BL521C、BL502A、BL712);苏木素-伊红(HE)染液,马松(Masson)染液,苦味酸天狼猩红(PSR)染液, I型胶原蛋白(Collagen I)(武汉Servicebio公司,批号分别为G1003、G1006、G1018、GB115707);胰蛋白酶(美国Promega公司,货号V5280/100g);乙腈(美国J.T.Baker公司,货号34851 MSDS);氨水(日本Wako Pure Chemical Industries Ltd公司,货号013-23354);四乙基溴化铵(TEAB)、苏木素染液、甲酸(美国Sigma-Aldrich公司,货号分别为T7408-100 mL、H9627、T79708);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(H+L),HRP标记

的山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)(H+L),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉ABclonal公司,批号分别为AS014、AS003、AC033);丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)抗体,精氨酸酶1(Arg1)抗体(杭州HUABIO公司,批号分别为ER65580、ET1605-8);NAD(P)H醌氧化还原酶1(NQO1)(英国Abcam公司,批号ab80588);Ⅲ型前胶原肽(PⅢP),Ⅳ-C,HA,LN/酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司,批号分别为ZC-36014、ZC-36119、ZC-34892-J、ZC-36446); α -肌动蛋白(α -SMA)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号67735-1-ig)。

1.4 仪器 BS-240VET型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);HS-6型数字扫描显微镜成像系统(LEICA & SDPTOP公司);D3024R型速微量冷冻离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司);JB-P5型石蜡包埋机,JB-L5型生物组织冷冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型石蜡切片器(上海徠卡仪器有限公司);MX-S型涡旋振荡器(美国SCILOGEX公司);CV100-DNA型真空离心浓缩仪(北京吉艾母科技有限公司);XMTD-7000型电热恒温水浴锅(北京市光明医疗仪器有限公司);hf-48型高通量组织研磨器(上海贺帆仪器有限公司);JY96-IIN型超声破碎仪(上海沪析实业有限公司);RIGOL L-3000高效液相色谱系统(北京普源精电科技有限公司);CV100-DNA型真空离心浓缩仪(北京吉艾母科技有限公司);电泳系统(美国Bio-Rad公司);JY-SCZ4+型垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);80241ES05型四块胶迷你垂直电泳转印槽(上海Yeasen公司);SpectraMAX Plus384型酶标仪(美谷分子仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备、分组及给药 大鼠随机分为正常组(Control组)8只,模型组32只[模型-2、4、6、8周组(Model-2W、4W、6W、8W组),每组8只];芪甲柔肝方组32只[芪甲柔肝方-2、4、6、8周组(QRF-2W、4W、6W、8W组),每组8只];复方鳖甲软肝片组32只(FBR-2W、FBR-4W、FBR-6W、FBR-8W组,每组8只)。综合考虑LF大鼠造模的成模率、存活率、死亡率、实验周期等因素,依据课题组前期研究基础^[12-13],Control组皮下注射(3 mL·kg⁻¹,2周/次),其余大鼠采用皮下注射40% CCl₄橄榄油(3 mL·kg⁻¹,每周2次)。Model-2W、QRF-2W、

FBR-2W组自造模造模第1周到第6周注射溶媒,第7周到第8周注射40% CCl₄橄榄油。Model-4W、QRF-4W、FBR-4W组自造模第1周到第4周注射溶媒,造模第5周开始注射40% CCl₄橄榄油到第8周。Model-6W、QRF-6W、FBR-6W组从自造模第1周到第2周注射溶媒,自第3周开始造到第8周注射40% CCl₄橄榄油。Model-8W、QRF-8W、FBR-8W组从造模第1周开始注射40% CCl₄橄榄油到第8周。大鼠每周称质量1次,并根据体质量情况及时调整CCl₄及溶媒注射剂量。实验过程中因造模操作不当及疼痛应激性反应、CCl₄毒性、药物灌入呼吸道、麻醉造成大鼠死亡。各组剩余大鼠数量为正常对照组(Control组)8只,模型组26只(Model-2W组8只、Model-4W组6只、Model-6W组7只、Model-8W组5只);芪甲柔肝方组27只(QRF-2W组8只、QRF-4W组6只、QRF-6W组8只、QRF-8W组5只);复方鳖甲软肝片组24只(FBR-2W组8只、FBR-4W组5只、FBR-6W组6只、FBR-8W组5只)。

关于芪甲柔肝方的梯度剂量已发表文献,参照《人和动物间体表面积折算的等效剂量比值表》计算及参考文献,芪甲柔肝方剂量给药以60 kg体质量为标准,按人与鼠体表面积换算公式计算给药剂量确定剂量,课题组前期研究表明,芪甲柔肝方高剂量组效果最佳,给药剂量根据CHEN等^[14]、汪玉梅等^[15]研究确定,得出高剂量组7.49g·kg⁻¹。于第6周开始灌胃治疗,10 mL·kg⁻¹体积灌胃给药,Control组及Model组给予等量生理盐水^[15]。连续干预2周。

2.2 观察指标

2.2.1 一般情况观察 实验期间,观察各组大鼠毛发、精神状态、饮食饮水量、垫料干湿程度。

2.2.2 样本采集 末次给药后,大鼠禁食禁水12 h后,腹腔注射3%戊巴比妥(50 mg·kg⁻¹)进行麻醉。经腹主动脉抽血置于无菌离心管中,血样在室温静置1 h,待血液凝固分层,3 500 r·min⁻¹离心10 min(离心半径14 cm),收集上清液并分装,-80 °C低温保存。用0.9%氯化钠溶液自门静脉快速冲洗肝中血液,剪取肝脏,洗净肝表面并去除肝包膜和周围残留组织后,滤纸吸干。称肝脏质量,取肝中、外叶置于4%多聚甲醛中固定48 h以上,剩余组织迅速液氮冷冻后置于-80 °C冰箱保存。

2.2.3 肝组织病理学检查 使用4%多聚甲醛固定好的肝组织,进行石蜡包埋,使用切片器将蜡块切片后烘干,以5 μ m厚度连续切片,分别行HE、

Masson、PSR染色,密封,干燥后,使用M8数字显微成像系统进行观察。Metavir分期标准^[16-17]见表1。

表1 Metavir评分系统-肝组织纤维化分期评分

Table 1 Metavir scoring system-Staging of liver fibrosis

| 病变 | 对应纤维化分期(F) |
|-------------------|------------|
| 无纤维化 | 0 |
| 汇管区纤维性扩大,但无纤维间隔形成 | 1 |
| 汇管区纤维性扩大,少数纤维间隔形成 | 2 |
| 多数纤维间隔形成,但无硬化结节 | 3 |
| 肝硬化 | 4 |

2.2.4 血清肝功能检测 按试剂盒说明书严格操作,取出保存于-80℃的血清样本,采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清ALT、AST、ALP、DBIL、TBil水平。

2.2.5 血清纤维化标志的检测 取出保存于-80℃的血清样本,按照ELISA试剂盒说明书检测血清中PⅢP、PCⅣ、HA、LN含量,用样品稀释液将血清稀释5倍,分别设置标准品孔、空白孔、各组样品孔,每孔设置3个复孔。在450 nm下,依序测量各孔的吸光度A,按照说明书计算PⅢP、PCⅣ、HA、LN的血清相对含量。

2.2.6 免疫组化分析 大鼠肝组织中 α -SMA、Collagen I表达测定。采用免疫组织化学法检测,石蜡切片,依次进行脱水、透明、浸蜡、切片和脱蜡。脱蜡后用二甲苯和梯度乙醇处理,再用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗。通过EDTA缓冲液修复抗原,加入过氧化氢抑制酶活性,血清封闭后添加一抗孵育(α -SMA 1:1 000、Collagen I 1:400),接着加入HRP标记。用DAB显色,Mayer苏木素复染,最后脱水、风干并封片。采用Image J分析进行蛋白定量分析,以计算阳性面积占比反映其表达水平。

2.3 蛋白组学分析

2.3.1 蛋白质提取与浓度测定质量控制 从空白组、各期Model组、各期QRF组9个组中各随机挑选4个肝组织样本用于蛋白质分析,液氮研磨成粉末状,加入适量SDT裂解液(裂解液:蛋白酶抑制剂=50:1),涡旋混匀,瞬时离心(4℃,115 000 r·min⁻¹,离心半径9.5 cm,1 min)后取上清液。采用BCA法测定提取的蛋白浓度。先将样本用lysis buffer进行一定倍数稀释使其终浓度落在标曲范围内,稀释好的样本和标准品(将BSA用lysis buffer溶解成系列浓度的标准蛋白)各取25 μ L分别和蛋白定量染料200 μ L避光反应30 min,用酶标仪同时测定标准品

和样本在562 nm下的A,根据标准品每管A和浓度的关系绘制标准曲线,然后计算样本浓度。

2.3.2 酶解脱盐 使用微量/通用型蛋白组酶切试剂盒,取适量蛋白加入至含MMB beads的八联排中,37℃反应30 min。加入结合液45 μ L,室温振荡孵育15 min;孵育结束后,弃上清,加入清洗液清洗MMB beads 3次;加入酶工作液40 μ L重悬磁珠,37℃孵育4 h以上;孵育结束后加入终止液5 μ L终止酶切,冻干。

2.3.3 液相色谱-质谱(LC-MS/MS)质谱分析 样本分离,流速为500 nL·min⁻¹,利用流动相A 0.1%甲酸水溶液、流动相B含0.1%甲酸的80%乙腈溶液、进行梯度洗脱(0~17 min, 3.5%~32%B; 17~18 min, 32%~95%B; 18~20 min, 95%B; 20~21 min, 95%~100%B; 21~22 min, 100%B),质谱扫描范围m/z 300~1 500,电喷雾离子源,毛细管电压1.5 kV。经色谱分离后使用timsTOF-HT质谱仪进行分析,生成原始质谱检测数据。

2.3.4 肝组织蛋白样品质谱数据分析 采用Proteome Discovery 2.5对原始数据进行分析,所用数据库为Rattus norvegicus uniprot。设置检索参数:错误发现率(FDR)<1%的蛋白。差异表达蛋白聚焦分析对各组间的差异蛋白(DEPs)进行筛选,以差异倍数(FC) \geq 1.5或FC \leq 0.67和P \leq 0.05为标准筛选差异表达蛋白。对Control组、各期Model组、各期QRF组差异表达蛋白进行Venn图分析,得到各期QRF组干预后有回调趋势的蛋白。

2.3.5 生物信息学分析 对各期芪甲柔肝方治疗后的回调蛋白,分别使用Metascope、WOLF PSPRT II、基因本体(GO)数据库、京都基因与基因组百科全书(KEGG)及STRING数据库对差异蛋白的GO、KEGG进行分析,微生物信在线网站、GraphPad Prism软件用于图形显示。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中相关蛋白表达 对蛋白组学筛选出的分期调控关键蛋白NQO1、MAPK1、Arg1、GSTA1进行验证,取肝组织样本提取总蛋白,BCA法定量。上样后开始电泳,电泳结束将蛋白转移至PVDF膜(半干法),5%牛奶室温封闭3h后,加入兔源一抗GAPDH(1:10 000)、NQO1(1:1 000)、MAPK1(1:2 000)、Arg1(1:2 000)、GSTA1(1:2 000),4℃孵育过夜。再加入HPR标记的山羊抗兔二抗(1:8 000)室温孵育90 min。采用化学发光法凝胶成像。蛋白表达量使用GAPDH进行校正,并通过Image J分析软件进行

灰度值分析。

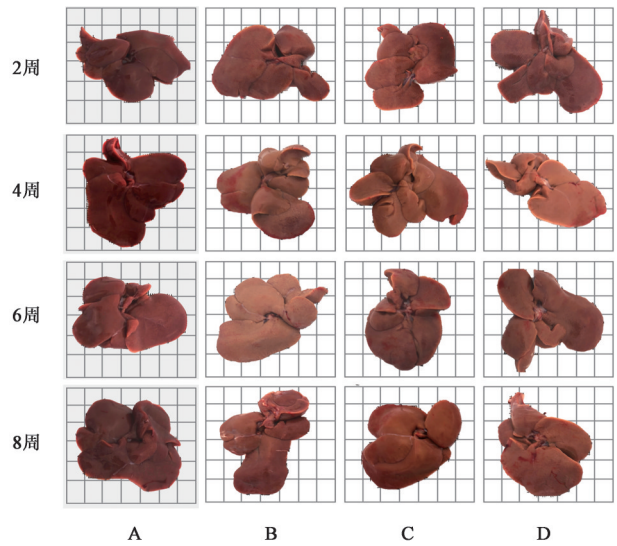
2.5 统计学处理 采用 GraphPad prism 10.0 进行统计分析,计量资料满足正态分布的以 $\bar{x}\pm s$ 描述,计量资料不符合正态分布时采用非参数检验用 $M(P_{25}, P_{75})$ 描述。所有计量资料均采用 Shapiro-Wilk 检验进行正态分布检验,数据符合正态分布用 t 检验(组间比较用独立样本 t 检验,组内比较用配对样本 t 检验),3 组样本则进一步进行方差齐性检验,方差齐则采用单因素方差分析(Bonferroni 法),方差不齐则采用 Tamhane 法检验:对于不符合正态分布的多组数据,采用非参数检验,两组样本则采用 Mann-Whitney U 检验,3 组样本则进行 Kruskal-Wallis 检验。用 Image J 对 Masson 染色、PSR 染色、免疫组化结果进行定量分析。所有检验方法均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 芪甲柔肝方对 LF 大鼠的分期药效评价

3.1.1 芪甲柔肝方对肝组织形态的影响 Control 组大鼠的肝脏形态大小正常,颜色红润有光泽,表面光滑细腻,质地柔软,边缘锐利。与 Control 组比较,随着造模时间的进展,各期 Model 组大鼠肝脏形态大小改变,颜色变浅甚至呈淡黄色,局部肿胀充血,表面粗糙无光泽,质地变硬且易碎裂,边缘不规则。其中 Model-6W 组和 Model-8W 组严重的可见肝脏表面凹凸不平且有大量颗粒状突起,有明显结节样改变,与周围组织粘连严重;与 Model 组比较,各期 QRF 组和各期 FBR 组大鼠肝脏颜色红润且有一定光泽度,表面光滑,质地柔软。见图 1。

3.1.2 芪甲柔肝方对 LF 大鼠肝组织病理改变的影响 (1)HE 染色。Control 组大鼠可见肝组织结构清晰,肝细胞胞浆丰富,无变性、坏死,呈条索状围绕中央静脉向四周整齐放射排列,肝小叶结构正常,汇管区未见明显增宽和炎性细胞浸润,肝窦清晰,无扩张或狭窄。与 Control 组比较,Model-2W 组肝小叶结构尚规整,部分肝细胞水肿,少量炎细胞聚集于小叶内及汇管区;Model-4W 组肝小叶结构不整,肝窦迂曲,中央静脉及汇管区周围形成坏死并伸入小叶内,小叶内可见较多片状坏死及炎症细胞聚集;Model-6W 组部分肝小叶肝板塌陷、肝窦迂曲、汇管区体积增大,可见明显纤维结缔组织包绕;Model-8W 组可见中央静脉-汇管区、中央静脉-中央静脉及汇管区-汇管区间桥接纤维化,纤维间隔分割肝实质,分割后小叶内无完整结构,假小叶形成。各期病理结果符合 Metavir 评分标准^[16-17],见表 1。



注: A. Control 组; B. Model 组; C. QRF 组; D. FBR 组(图 2-图 8 同); 1 格为 1 cm

图 1 芪甲柔肝方对 LF 大鼠肝脏形态的影响

Fig. 1 Effect of Qijia Rougan formula (QRF) on hepatic morphology in LF rats

与各期 Model 组比较,各期给药组中央静脉区、汇管区和小叶间胶原纤维明显减少,纤维间隔变细,见图 3。对肝纤维化(LF)病理评分,评分结果显示,F3 期纤维化降期最为明显($P<0.05$)。见表 2。胶原纤维面积占比定量结果显示,与 Control 比较,Model 各组大鼠胶原纤维面积占比显著升高($P<0.01$)。与 Model 组同时间点比较,QRF 各组大鼠胶原纤维面积占比明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表 3。

(2)Masson 染色。Control 组大鼠仅在中央静脉和汇管区周围可见极少量胶原纤维(蓝色),肝小叶结构完整,无异常纤维组织增生。与 Control 组比较,Model-2W 组中央静脉及汇管区周围纤维间质增多并有伸入小叶内趋势;Model-4W 组广泛窦周纤维化形成,中央静脉、汇管区周围纤维沉积增多并向小叶内延伸,可见广泛桥接纤维化;Model-6W 组肝板塌陷,桥接纤维化呈现分割肝小叶趋势,可见散在纤维间隔;Model-8W 组可见广泛纤维间隔分割肝实质,假小叶形成。与各期 Model 组比较,各期给药组中央静脉区、汇管区和小叶间胶原纤维明显减少,纤维间隔变细,见图 3。应用 Metavir 进行 LF 病理评分。结果显示 F3 期降期最为明显($P<0.05$)。与 Control 比较,Model 各组大鼠胶原纤维面积占比明显升高($P<0.01$)。与 Model 组同时间点比较,QRF 各组大鼠胶原纤维面积占比明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表 2 和表 3。

(3)PSR 染色。Control 组大鼠小叶内无胶原纤

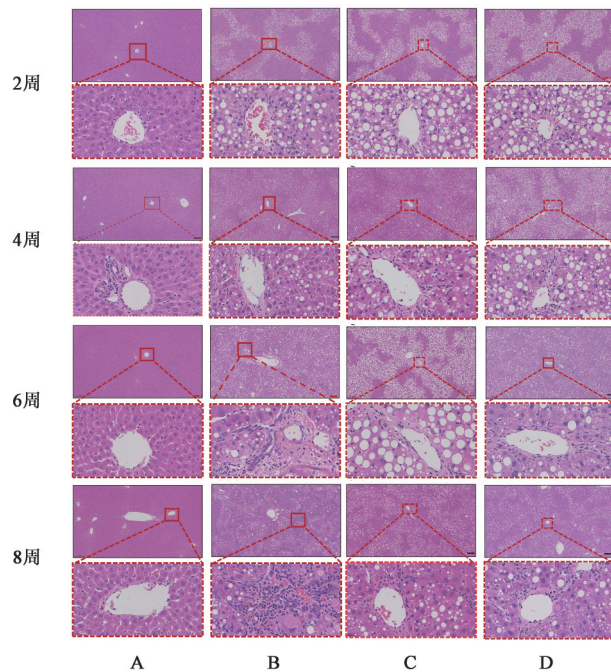


图2 芪甲柔肝方对LF大鼠肝组织病理学的影响(HE, ×100, ×400)

Fig. 2 Effect of QRF on hepatic histopathology in LF rats (HE, ×100, ×400)

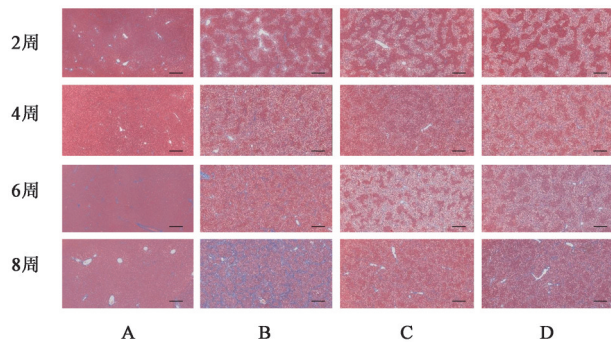


图3 芪甲柔肝方对LF大鼠肝组织病理学的影响(Masson, ×40)

Fig. 3 Effect of QRF on hepatic histopathology in LF rat (Masson, ×40)

纤维沉积。与Control组比较, Model-2W组肝窦内散在胶原纤维沉积; Model-4W组可见桥接样胶原纤维沉积; Model-6W组可见胶原纤维沉积, 部分间隔分割肝实质, 其内无血供结构; Model-8W组肝窦内可见大量胶原纤维沉积, 间隔分割肝实质, 假小叶形成。各期病理结果符合Metavir评分标准^[16-17]。与各期Model组比较, 各给药组的蓝染胶原纤维明显变细、变薄, 纤维间隔缩小、变窄, 假小叶形成得到改善。见图4。使用Image J 8.0软件对大鼠PSR染色区域占比进行计算, 与Control组比较, Model各组大鼠PSR染色区域显著升高($P < 0.01$)。Model组同时间点比较, QRF各组大鼠PSR染色区域明显

表2 芪甲柔肝方对各期LF大鼠Metavir评分的影响 [$M(P_{25}, P_{75})$]
Table 2 Effect of QRF on Metavir scores of rats with liver fibrosis in different stages [$M(P_{25}, P_{75})$] 分

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | n | Metavir评分 |
|-----------|-----------------------|-----|-------------------------|
| Control组 | | 8 | 0(0, 0) |
| Model-2W组 | | 8 | 1(1, 1) ¹⁾ |
| QRF-2W组 | 7.49 | 8 | 1(1, 1) |
| FBR-2W组 | 0.63 | 8 | 1(1, 1) |
| Model-4W组 | | 6 | 2(2, 2) ¹⁾ |
| QRF-4W组 | 7.49 | 6 | 1(1, 1) |
| FBR-4W组 | 0.63 | 5 | 2(2, 1) |
| Model-6W组 | | 7 | 3(3, 2) ¹⁾ |
| QRF-6W组 | 7.49 | 8 | 1(1, 1) ³⁾ |
| FBR-6W组 | 0.63 | 6 | 2(2, 2.24) |
| Model-8W组 | | 5 | 4(3.5, 3) ¹⁾ |
| QRF-8W组 | 7.49 | 5 | 3(2.5, 2) |
| FBR-8W组 | 0.63 | 5 | 3(3, 3.4) |

注: 与Control组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与Model组同时间点比较³⁾ $P < 0.05$

表3 芪甲柔肝方对各期LF大鼠胶原纤维面积占比的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of collagen fiber area percentage in rats with liver fibrosis at different stages treated with QRF ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | n | 胶原纤维面积占比/% |
|-----------|-----------------------|-----|--------------------------|
| Control组 | | 8 | 1.89±0.62 |
| Model-2W组 | | 8 | 5.04±1.34 ¹⁾ |
| QRF-2W组 | 7.49 | 8 | 3.10±1.15 ²⁾ |
| FBR-2W组 | 0.63 | 8 | 3.48±1.37 |
| Model-4W组 | | 6 | 6.61±1.69 ¹⁾ |
| QRF-4W组 | 7.49 | 6 | 3.40±1.11 |
| FBR-4W组 | 0.63 | 5 | 3.68±1.08 |
| Model-6W组 | | 7 | 9.47±0.91 ¹⁾ |
| QRF-6W组 | 7.49 | 8 | 4.69±1.45 ³⁾ |
| FBR-6W组 | 0.63 | 6 | 5.60±1.66 |
| Model-8W组 | | 5 | 13.90±1.56 ¹⁾ |
| QRF-8W组 | 7.49 | 5 | 10.49±0.90 ²⁾ |
| FBR-8W组 | 0.63 | 5 | 9.94±3.52 |

注: 与Control组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与Model组同时间点比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表4同)

下降($P < 0.05, P < 0.01$)。见表4。

3.1.3 芪甲柔肝方对分期大鼠肝脏组织 α -SMA、Collagen I表达的影响 与Control组比较, Model各组大鼠 α -SMA表达阳性面积水平显著升高($P < 0.01$); 与Model组比较, QRF-4W组、QRF-6W组、QRF-8W组阳性面积水平明显下降($P < 0.05, P < 0.01$)。与Control

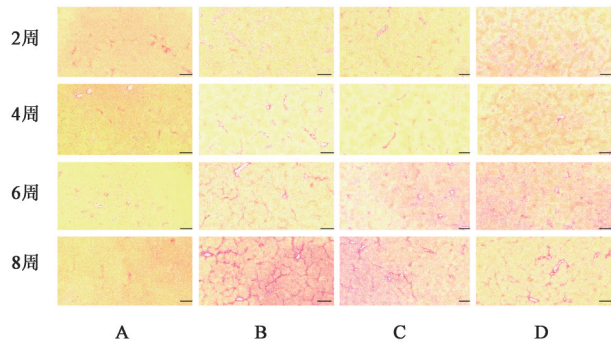


图4 芪甲柔肝方对HF大鼠肝组织病理学的影响(PSR, ×40)
Fig. 4 Effect of QRF on hepatic histopathology in LF rats (PSR, ×40)

表4 芪甲柔肝方对各期LF大鼠PSR染色区域占比的影响(̄±s)
Table 4 Effect of percentage of Sirius Red staining area in rats with liver fibrosis at different stages treated with QRF (̄±s)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | PSR染色区域占比/% |
|-----------|-----------------------|---|--------------------------|
| Control组 | | 8 | 3.09±1.01 |
| Model-2W组 | | 8 | 4.26±0.85 ¹⁾ |
| QRF-2W组 | 7.49 | 8 | 3.89±0.72 ²⁾ |
| FBR-2W组 | 0.63 | 8 | 4.25±0.39 |
| Model-4W组 | | 6 | 6.38±0.99 ¹⁾ |
| QRF-4W组 | 7.49 | 6 | 4.05±0.72 ³⁾ |
| FBR-4W组 | 0.63 | 5 | 4.26±1.37 |
| Model-6W组 | | 7 | 7.42±1.86 ¹⁾ |
| QRF-6W组 | 7.49 | 8 | 3.86±0.45 ³⁾ |
| FBR-6W组 | 0.63 | 6 | 4.37±0.61 |
| Model-8W组 | | 5 | 11.56±2.70 ¹⁾ |
| QRF-8W组 | 7.49 | 5 | 8.26±1.49 ³⁾ |
| FBR-8W组 | 0.63 | 5 | 8.80±1.66 |

组比较, Model各组大鼠Collagen I阳性面积显著升高($P<0.01$); 与Model组比较, QRF各组大鼠阳性面积水平明显下降($P<0.05, P<0.01$)。见表5、图5和图6。

3.1.4 芪甲柔肝方对分期大鼠肝功能血清学指标的影响 与Control组比较, Model各组ALT、AST、ALP、TBil、DBIL水平显著升高($P<0.01$); 与Model组比较, QRF各组大鼠血清ALT、AST、ALP、TBil、DBIL水平均明显下降, 差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表6。

3.1.5 芪甲柔肝方对血清肝纤四项指标的影响 与Control组比较, Model各组HA、LN、IV-C、PⅢP水平明显升高($P<0.05, P<0.01$)。与Model组比较, QRF各组大鼠血清HA、LN、IV-C、PⅢP水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表7。

3.2 芪甲柔肝方抗LF的差异表达蛋白的筛选 本研究中鉴定到的肽段总数为80 702, 蛋白质总数为

表5 芪甲柔肝方对各期LF大鼠α-SMA和Collagen I阳性表达区域占比的影响(̄±s)

Table 5 Effect of percentage of α-SMA and Collagen I positive expression areas in rats with liver fibrosis at different stages treated with QRF (̄±s)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | α-SMA | Collagen I |
|-----------|-----------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| Control组 | | 8 | 2.64±0.44 | 2.37±0.54 |
| Model-2W组 | | 8 | 4.43±1.21 ¹⁾ | 4.90±1.33 ²⁾ |
| QRF-2W组 | 7.49 | 8 | 2.62±0.60 | 3.08±1.17 ³⁾ |
| FBR-2W组 | 0.63 | 8 | 3.18±1.17 | 4.41±0.37 |
| Model-4W组 | | 6 | 5.12±0.47 ²⁾ | 5.07±1.45 ²⁾ |
| QRF-4W组 | 7.49 | 6 | 3.90±0.55 ³⁾ | 3.25±1.45 ³⁾ |
| FBR-4W组 | 0.63 | 5 | 4.67±0.84 | 4.48±0.76 |
| Model-6W组 | | 7 | 8.54±1.18 ²⁾ | 8.35±0.96 ²⁾ |
| QRF-6W组 | 7.49 | 8 | 5.92±0.87 ⁴⁾ | 6.02±0.81 ⁴⁾ |
| FBR-6W组 | 0.63 | 6 | 6.38±0.66 | 6.88±1.08 |
| Model-8W组 | | 5 | 13.67±1.88 ²⁾ | 12.74±1.97 ²⁾ |
| QRF-8W组 | 7.49 | 5 | 9.83±2.38 ³⁾ | 10.00±1.18 ³⁾ |
| FBR-8W组 | 0.63 | 5 | 10.86±2.29 | 9.06±1.77 |

注: 与Control组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与Model组同时点比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表6和表7同)

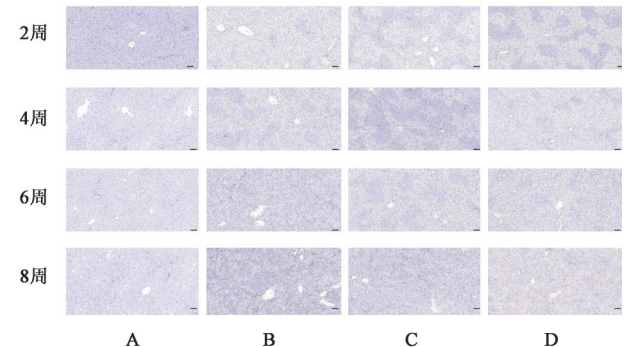


图5 芪甲柔肝方对LF大鼠α-SMA表达的影响(免疫组化, ×100)
Fig. 5 Effect of QRF on expression of α-SMA positive area in rats with LF (IHC, ×100)

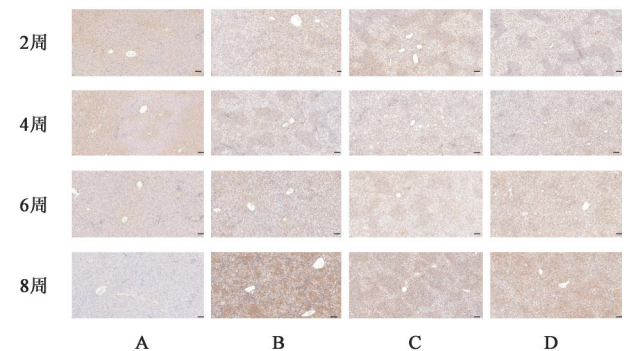


图6 芪甲柔肝方对LF大鼠Collagen I表达的影响(免疫组化, ×100)
Fig. 6 Effect of QRF on expression of Collagen I positive area in rats with LF (IHC, ×100)

表6 芪甲柔肝方对各组大鼠血清肝功能的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effect of QRF on serum hepatic function of rat in each group ($\bar{x}\pm s$)

U·L⁻¹

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | ALT | AST | ALP | TBil | DBIL |
|-----------|-----------------------|---|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Control组 | | 8 | 103.5±15.8 | 136.6±10.91 | 88.52±20.64 | 3.54±0.65 | 2.08±0.55 |
| Model-2W组 | | 8 | 298.7±20.3 ²⁾ | 497.4±53.23 ²⁾ | 290.70±31.28 ²⁾ | 7.44±1.40 ²⁾ | 12.59±0.83 ²⁾ |
| QRF-2W组 | 7.49 | 8 | 255.0±21.3 ³⁾ | 371.5±91.66 ³⁾ | 224.30±39.95 ³⁾ | 5.47±0.78 ³⁾ | 9.49±0.74 ³⁾ |
| FBR-2W组 | 0.63 | 8 | 258.5±31.4 | 380.5±80.15 | 248.70±22.64 | 5.86±0.77 | 10.46±2.23 |
| Model-4W组 | | 6 | 357.5±45.7 ²⁾ | 524.0±52.60 ²⁾ | 364.10±45.05 ²⁾ | 7.87±1.34 ²⁾ | 14.76±2.17 ²⁾ |
| QRF-4W组 | 7.49 | 6 | 258.9±43.2 ³⁾ | 412.2±61.40 ³⁾ | 274.00±30.58 ³⁾ | 5.94±0.50 ³⁾ | 9.81±0.62 ³⁾ |
| FBR-4W组 | 0.63 | 5 | 275.1±62.4 | 396.4±79.74 | 299.80±53.19 | 6.24±0.65 | 10.42±2.26 |
| Model-6W组 | | 7 | 454.4±151.1 ²⁾ | 710.8±141.2 ²⁾ | 418.10±166.70 ²⁾ | 9.22±1.83 ²⁾ | 15.34±2.40 ²⁾ |
| QRF-6W组 | 7.49 | 8 | 205.8±30.9 ⁴⁾ | 367.8±26.97 ⁴⁾ | 201.30±25.56 ⁴⁾ | 5.61±0.42 ⁴⁾ | 8.88±1.55 ⁴⁾ |
| FBR-6W组 | 0.63 | 6 | 214.0±20.6 | 306.3±45.44 | 214.00±20.62 | 7.06±0.58 | 10.45±2.81 |
| Model-8W组 | | 5 | 394.4±91.2 ²⁾ | 545.0±72.76 ²⁾ | 389.70±106.00 ²⁾ | 8.48±0.79 ²⁾ | 15.34±2.40 ²⁾ |
| QRF-8W组 | 7.49 | 5 | 279.5±69.4 ³⁾ | 437.5±71.42 ³⁾ | 250.90±30.00 ³⁾ | 6.46±1.10 ³⁾ | 11.24±2.10 ³⁾ |
| FBR-8W组 | 0.63 | 5 | 278.1±61.8 | 420.1±78.28 | 223.40±16.09 | 7.09±0.52 | 10.93±2.22 |

表7 芪甲柔肝方对各组大鼠血清肝纤四项的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effect of QRF on four results of hepatic fibrosis in serum of rat in each group ($\bar{x}\pm s$)

μg·L⁻¹

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | HA | LN | IV-C | PⅢP |
|-----------|-----------------------|---|----------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control组 | | 8 | 42.65±8.56 | 105.70±13.60 | 2.20±0.27 | 2.49±0.64 |
| Model-2W组 | | 8 | 78.12±23.94 ²⁾ | 177.40±41.2 ²⁾ | 3.37±0.95 ²⁾ | 3.64±0.91 ¹⁾ |
| QRF-2W组 | 7.49 | 8 | 50.77±15.15 ³⁾ | 128.20±15.26 ³⁾ | 2.03±0.29 ⁴⁾ | 2.20±0.67 ³⁾ |
| FBR-2W组 | 0.63 | 8 | 72.36±10.87 | 135.50±20.12 | 2.75±0.48 | 3.37±0.78 |
| Model-4W组 | | 6 | 90.94±38.12 ²⁾ | 175.50±25.76 ²⁾ | 3.55±0.72 ²⁾ | 3.63±0.68 ²⁾ |
| QRF-4W组 | 7.49 | 6 | 45.28±10.02 ⁴⁾ | 131.70±14.23 ⁴⁾ | 2.22±0.43 ⁴⁾ | 2.34±0.46 ⁴⁾ |
| FBR-4W组 | 0.63 | 5 | 67.00±17.63 | 136.90±19.32 | 2.90±0.78 | 3.32±0.44 |
| Model-6W组 | | 7 | 104.90±43.44 ²⁾ | 196.20±26.12 ²⁾ | 3.92±1.03 ²⁾ | 4.11±0.68 ²⁾ |
| QRF-6W组 | 7.49 | 8 | 41.83±8.91 ⁴⁾ | 118.50±22.46 ⁴⁾ | 2.10±0.44 ⁴⁾ | 2.51±0.24 ⁴⁾ |
| FBR-6W组 | 0.63 | 6 | 56.89±16.84 | 142.70±25.23 | 2.65±0.45 | 2.64±0.64 |
| Model-8W组 | | 5 | 77.91±16.52 ²⁾ | 150.80±23.74 ²⁾ | 2.97±0.55 ¹⁾ | 3.33±0.40 ¹⁾ |
| QRF-8W组 | 7.49 | 5 | 47.26±21.58 ³⁾ | 114.90±9.90 ³⁾ | 2.23±0.33 ³⁾ | 2.26±0.39 ³⁾ |
| FBR-8W组 | 0.63 | 5 | 70.07±21.27 | 141.50±23.68 | 2.47±0.36 | 4.11±0.68 |

6 961种蛋白质。2周组:Model组 vs Control组共有差异蛋白450个,其中上调179个,下调271个。QRF组 vs Model组共有差异蛋白69个,其中上调30个,下调39个。Venn图分析显示芪甲柔肝方治疗前后有17个差异蛋白具有回调趋势。其中12个蛋白在Model组上调,治疗后下调;5个差异蛋白在Model组下调,治疗后上调。这17个蛋白在造模和治疗前后均有变化,推测与LF发病及芪甲柔肝方干预途径密切相关,可能是其治疗LF的潜在靶标蛋白。4周组:Model组 vs Control组共有差异蛋白648个,其中上调296个,下调352个。QRF组 vs

Model组共有差异蛋白313个,其中上调113个,下调200个。Venn图分析显示芪甲柔肝方治疗前后有50个差异蛋白具回调趋势。其中22个蛋白在Model组上调,治疗后下调;28个差异蛋白在Model组下调,治疗后上调。这50个蛋白在造模和治疗前后均有变化,推测与LF发病及芪甲柔肝方干预途径密切相关,可能是其治疗LF的潜在靶标蛋白。6周组:Model组 vs Control组共有差异蛋白1 333个,其中上调613个,下调720个。QRF组 vs Model组共有差异蛋白181个,其中上调61个,下调120个。Venn图分析显示芪甲柔肝方治疗前后有81个差异

蛋白具回调趋势。其中57个蛋白在 Model 组上调,治疗后下调;22个差异蛋白在 Model 组下调,治疗后上调。这81个蛋白在造模和治疗前后均有变化,推测与 LF 发病及芪甲柔肝方干预途径密切相关,可能是其治疗 LF 的潜在靶标蛋白。8周组:Model 组 vs Control 组共有差异蛋白 1 044 个,其中上调 419 个,下调 625 个。QRF 组 vs Model 组共有差异蛋白 136 个,其中上调 45 个,下调 91 个。Venn 图分析显示芪甲柔肝方治疗前后有 19 个差异蛋白具回调趋势。其中 7 个蛋白在 Model 组上调,治疗后下调;12 个差异蛋白在 Model 组下调,治疗后上调。这 19 个蛋白在造模和治疗前后均有变化,推测与 LF 发病及芪甲柔肝方干预途径密切相关,可能是其治疗 LF 的潜在靶标蛋白。见增强出版附加材料。

3.3 生物信息学分析

3.3.1 GO 功能分析 对 4 个期的 165 个回调蛋白 GO 注释结果显示,共得到 174 条显著富集条目,其中生物过程(BP)有 116 条、细胞组分(CC)有 20 条、分子功能(MF)有 38 条。以 *P* 值最小的前 20 个条目进行作图分析。在 BP 方面,回调蛋白负调控的生物过程排名前 5 的包括类固醇代谢过程、对异生素刺激的反应、小分子生物合成过程、弹性纤维组装、萜类代谢过程。在 MF 方面,回调蛋白负调控的生物过程排名前 5 的包括氧化还原酶、铁离子结合、有

机酸结合、羧酸结合。在 CC 方面排名前 5 的包括弹性纤维、线粒体基质、细胞器内膜、神经元投射细胞质、蛋白复合物参与细胞黏附。见增强出版附加材料。

3.3.2 KEGG 通路富集分析 将回调差异蛋白进行 KEGG 分析,共得到 19 个条目。将排名前 7 的进行可视化分析。富集排名前 5 的条目是药物代谢-细胞色素 P450、精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、运动蛋白、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路。见增强出版附加材料。

3.4 Western blot 验证扶正通络法中药分期调控机制 蛋白质组学分析表明,4 个期的空白组和 Model 组、Model 组和中药组及 3 组重叠蛋白均可富集到肝细胞色素 P450 代谢通路、氧化应激通路。通过 Western blot 方法验证了重叠蛋白 GSTA1 及氧化应激通路、肝细胞色素 P450 代谢通路及通路交叉蛋白如 NQO1、MAPK1、Arg1 结果显示。

与 Control 组比较,Model 各组 MAPK1 水平显著升高,NQO1、Arg1、GSTA1 水平显著降低,差异具有统计学意义(*P*<0.01)。与 Model 同时时间点组比较,QRF 各组 MAPK1 显著降低(*P*<0.01),Arg1、GSTA1 显著升高,差异具有统计学意义(*P*<0.01),QRF-4W、QRF-6W、QRF-8W 组 NQO1 显著升高(*P*<0.01)。见表 8、图 7。

表 8 芪甲柔肝方对各期 LF 大鼠 MAPK1、NQO1、Arg1、GSTA1 的蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Relative protein expression levels of MAPK1, NQO1, Arg1, and GSTA1 in rats with liver fibrosis at different stages treated with QRF ($\bar{x}\pm s, n=3$)

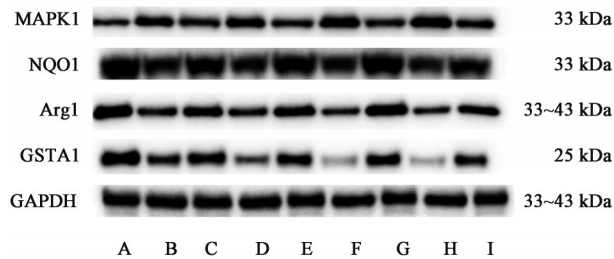
| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | MAPK1/GAPDH | NQO1/GAPDH | Arg1/GAPDH | GSTA1/GAPDH |
|------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control 组 | | 1.00±0.25 | 1.00±0.12 | 1.00±0.05 | 1.01±0.14 |
| Model-2W 组 | | 2.35±0.25 ¹⁾ | 0.47±0.16 ¹⁾ | 0.31±0.05 ¹⁾ | 0.45±0.10 ¹⁾ |
| QRF-2W 组 | 7.49 | 1.33±0.29 ²⁾ | 0.69±0.09 | 0.69±0.07 ²⁾ | 0.74±0.09 ²⁾ |
| Model-4W 组 | | 2.61±0.48 ¹⁾ | 0.36±0.04 ¹⁾ | 0.21±0.05 ¹⁾ | 0.42±0.05 ¹⁾ |
| QRF-4W 组 | 7.49 | 1.35±0.31 ²⁾ | 0.69±0.06 ²⁾ | 0.71±0.09 ²⁾ | 0.73±0.02 ²⁾ |
| Model-6W 组 | | 2.96±0.37 ¹⁾ | 0.27±0.05 ¹⁾ | 0.09±0.03 ¹⁾ | 0.32±0.05 ¹⁾ |
| QRF-6W 组 | 7.49 | 1.17±0.05 ²⁾ | 0.81±0.03 ²⁾ | 0.85±0.15 ²⁾ | 0.85±0.08 ²⁾ |
| Model-8W 组 | | 2.92±0.19 ¹⁾ | 0.26±0.05 ¹⁾ | 0.10±0.03 ¹⁾ | 0.32±0.02 ¹⁾ |
| QRF-8W 组 | 7.49 | 1.70±0.15 ²⁾ | 0.66±0.10 ²⁾ | 0.55±0.08 ²⁾ | 0.61±0.03 ²⁾ |

注:与 Control 组比较¹⁾*P*<0.01;与 Model 组同时时间点比较²⁾*P*<0.01

4 讨论

明代医家吴有性系统提出“主客交”理论,明确其内涵^[16-17]。课题组在著名温病学专家张之文教授指导下^[18],将“主客交”理论应用于慢性肝病的防

治,并围绕“主客交”开展了系统深入的基础和临床研究。“主客交”是虚(即“主”,指人体正气)与实(即“客”,指外感病邪)“胶”于阴分血络之中,形成一种特殊的病理状态。结合 LF 的进展过程,LF 后期正



注: A. Control组; B、D、F、G. Model-2W、Model-4W、Model-6W、Model-8W组; C、E、H、I. QRF-2W、QRF-4W、QRF-6W、QRF-8W组

图7 各期LF大鼠MAPK1、NQO1、Arg1、GSTA1的蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of MAPK1, NQO1, Arg1 and GSTA1 protein expression in LF rats at different stages

气亏耗,邪气内陷,逐步传入营血,胶结于血脉,以致正衰邪胜,无力托邪外出,久之则伏藏血分,发为久治难愈的顽症痼疾。LF后期的病理特点与《瘟疫论》所述“客邪胶固于血脉”的病理状态高度契合^[10]。治疗应以补虚通络为基本大法,切中病机演变过程的关键节点,能够控制LF病情进展,逆转病势,达到治疗效果^[19]。在大量临床实践的基础上,形成了芪甲柔肝方。该方由明代著名温疫学家吴又可《温疫论》三甲散为基础化裁而来。在原方基础上增黄芪以益气扶正,与当归合用,益气润通血脉;减穿山甲、土鳖虫峻猛破血之势,辅以红花、桃仁、丹参逐瘀通络,减蝉蜕、僵蚕,加三棱、莪术,以行气活血,消积软坚;鳖甲引药入肝络,软坚散结,缓急通络。全方以黄芪为君,鳖甲、桃仁、红花为臣药,当归、三棱、莪术为佐药,生甘草为使药调和药性,共奏益气活血,软坚散结,入络搜邪,缓急通络之功^[20]。前期RCT已评价该方联合恩替卡韦治疗慢乙肝LF效果显著。并初步发现F3期为该方的潜在优势干预期。特别是在F3期LF阶段,纤维化程度严重,如失治误治则发展至早期肝硬化,此时正气更为亏虚,邪气更为深伏,也是切入“截断扭转”的最佳时机^[10]。由于“金标准”肝脏穿刺术的局限性,本研究在前期RCT的基础上,进一步开展基础研究。从病理学角度明确该方的优势干预期,并初步探索该方的分期调控效应机制。

LF是各种病因导致肝损伤的常见病理结果。ECM的过度沉积是重要的标志^[21]。LF患者随着病情进展,肝细胞受损、炎症反应加重,导致肝功能障碍^[22]。ALT、AST、ALP、TBil、DBIL水平,是反应肝细胞受损的重要指标^[23]。当肝脏受损时,他们被释放入血引起相关指标升高^[24]。透明质酸(HA)^[25]、LN和IV-C是LF无创评估的主要血清标志物^[26-28]。肝星状细胞(HSC)活化在HF进展过程中起着关键

的作用, Collagen I 和 α -SMA 是 HSC 活化的标志^[29]。肝组织的 LF 程度可使用评分系统获得分数进行量化,包括 Knodell 评分系统, Metavir 评分系统、Scheuer 评分系统等^[30]。研究表明, Metavir 评分反映了局灶性小叶坏死、门静脉炎症、零碎坏死和桥接坏死的综合评级,并且在肝硬化、脂肪变性和门静脉淋巴聚集体的评估方面与 Knodell 系统基本一致^[31]。因此本研究采用 Metavir 评分系统对 LF 进行分期评估。此外,本研究还采用 PSR 染色与 HE、Masson 染色结果相互补充,共同评价组织病理形态变化^[32]。为确保芪甲柔肝方抗 LF 药效评估的可靠性,减少观察者间和观察者内评分变异性。因此本研究使用 Image J 软件对 Masson 染色图像的胶原纤维面积占比和 PSR 染色图像的 PSR 染色区域进行分析^[33]。芪甲柔肝方(扶正通络法)作用机制总结见增强出版附加材料。

在本研究中,设置了空白,2、4、6、8周组。组织病理学是诊断LF及肝硬化的金标准,是证实LF进展的最直接证据。HE染色下可见2周组大鼠肝细胞广泛气球样变,4周组小叶出现结构不整的改变。Masson染色更加直观地证实了随着造模时间的推进,中央静脉周围、汇管区周围纤维组织包绕增加,到第8周数个假小叶分隔肝组织,此时为肝硬化。PSR染色进一步证实Masson染色的镜下表现。各期Collagen I和 α -SMA阳性面积均显著升高。各期血清肝功能指标及肝纤四项水平均显著升高。提示大鼠HF分期模型的成功建立。在此基础上,进一步进行药效验证。结果表明,芪甲柔肝方干预后,各期大鼠肝组织病理形态有不同程度的改善,胶原纤维面积占比、PSR染色区域均得到改善。各期Collagen I和 α -SMA阳性面积均显著降低,各期大鼠血清肝功能及肝纤四项水平与各期Model组比较均得到改善。表明芪甲柔肝方可以改善CCl₄诱导的肝损伤,减轻大鼠HF的程度。其中以F3期效果尤为显著。本实验证明了芪甲柔肝方抗LF多中心随机对照研究的亚组分析结果,提示F3期为芪甲柔肝方抗LF的优效干预期^[10]。为更好地明确芪甲柔肝方治疗LF分期疗效的作用机制,选取了Control组,4个期Model组及4个期QRF组的肝组织进行蛋白质组学分析,筛选出相关的差异蛋白与通路进行深入研究。结果发现Model组vs Control组和QRF组vs Model组的差异蛋白交集分析共鉴定出GSTA1、NQO1、MAPK1、Arg1等165个回调蛋白。

GSTA1在正常肝脏中高表达^[33],在抗氧化防御系统中起着重要作用。GSTA1催化GSH与致癌物、药物、毒素或氧化应激产物的偶联,在防止氧化应激损伤方面发挥重要作用。研究表明,天然产物可能通过调节GSTA1来保护肝脏免受活性氧损伤,在肝损伤的评估中具有重要意义^[34]。NQO1是一种胞质还原酶,是由核因子E₂相关因子2(Nrf2)调控的Ⅱ相解毒酶,通过催化醌类底物的还原,保护细胞免受氧化损伤,在细胞对氧化应激的反应中起重要作用^[35]。研究表明^[36],诸多中药有效成分和复方可通过调节Nrf2及NQO1等组成的信号通路如Keap1/Nrf2/NQO1等信号通路,发挥抑制氧化应激、炎症反应的作用。MAPK1,也称为ERK2,是MAPK/ERK信号通路的关键成员^[37]。MAPK信号通路是细胞内信号转导的关键参与者,是细胞存活、增殖、凋亡、分化等过程的重要调节因子。研究表明,抑制MAPK通路可有效发挥抗氧化应激、炎症和细胞死亡^[38]。Arg1是巨噬细胞极化M2标志物^[39]。研究表明减少ECM沉积是逆转LF的一种策略,胶原蛋白是ECM的主要成分之一^[40]。采用Western blot对GSTA1、NQO1、MAPK1、Arg1蛋白水平进行检测,与Model组比较,QRF组上调GSTA1、NQO1、Arg1的蛋白和下调MAPK1蛋白,与蛋白组学结果一致。

KEGG通路分析显示,回调蛋白主要聚焦于代谢、免疫、信号转导等相关通路,其中细胞色素P450信号转导与氧化应激的启动、发展和细胞死亡呈正相关^[41]。精氨酸代谢是重要的免疫和代谢交叉通路^[42],Arg1是精氨酸代谢中的重要分子,具有重要的免疫调节功能^[43],精氨酸代谢还参与脯氨酸的合成,对胶原蛋白的合成至关重要^[44]。PPAR γ 是一种可以被过氧化物酶体增殖物激活的核转录因子,在多种细胞生长分化过程中均起重要作用。研究表明,PPAR γ 在活化的肝星状细胞中表达降低,加入PPAR γ 激动剂后,活化的PPAR γ 抑制肝星状细胞的激活^[45]。

综上所述,本研究在课题组前期基础上,采用CCl₄联合橄榄油建立LF大鼠分期模型,在此基础上进行药效验证,证实芪甲柔肝方具有良好的抗LF效果,其中F3期效果最为显著。并基于蛋白组学手段,从不同的角度和层次探讨了芪甲柔肝方抗LF的分期疗效差异,发现其作用机制可能与药物代谢-细胞色素P450、精氨酸生物合成、PPAR信号通路等多条信号通路有关。本研究从课题组前期多中心随

机对照研究出发,立足临床问题,在此基础上,通过动物实验及蛋白组学研究,验证了芪甲柔肝方抗LF的优效干预期及分期疗效差异机制。完成了“临床问题-基础研究-临床应用”的良性循环。未来课题组将对具体信号通路进行深入探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ROEHLER N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- [2] YANG L X, QI C, LU S, et al. Alleviation of liver fibrosis by inhibiting a non-canonical ATF4-regulated enhancer program in hepatic stellate cells [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 524.
- [3] DEVARBHAVI H, ASRANI S K, ARAB J P, et al. Global burden of liver disease: 2023 Update [J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 516-537.
- [4] GOLDER M R, LIU J, ANDERSEN J N, et al. Reduction of liver fibrosis by rationally designed macromolecular telmisartan prodrugs [J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(11): 822-830.
- [5] 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.
- [5] XU L M, LIU P, SHEN X Z, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of liver fibrosis with integrated traditional Chinese and Western medicine (2019 edition) [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2019, 39(11): 1286-1295.
- [6] CHEN Q, WU F, WANG M, et al. Transcriptional profiling and miRNA-target network analysis identify potential biomarkers for efficacy evaluation of Fuzheng-Huayu formula-treated hepatitis B caused liver cirrhosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 883.
- [7] LI Z X, ZHAO Z M, LIU P, et al. Treatment of HBV cirrhosis with Fuzheng Huayu tablet and entecavir: Design of a randomized, double-blind, parallel and multicenter clinical trial [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(7): 509-513.
- [8] 张燕燕, 陈月桥, 韦斯榕, 等. 基于“阳化气, 阴成形”理论探析柚皮素对肝纤维化的调控机制 [J]. *中华中医药学刊*, 2026, 44(1): 98-102.
- [8] ZHANG Y Y, CHEN Y Q, WEI S R, et al. Analysis of the regulatory mechanism of naringenin on liver fibrosis based on the theory of "Yang transforming qi and Yin shaping form" [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2026, 44(1): 98-102.
- [9] 窦铮. 冯全生教授从“脾”论治肝硬化的学术思想探讨 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [9] DOU Z. Discussion on professor FENG Quansheng's academic thought on treating liver cirrhosis from the perspective of the "spleen" [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [10] 李白雪, 王鑫, 刘悸斌, 等. 基于“主客交”理论的芪甲柔肝方

- 联合恩替卡韦对气虚络阻证慢性乙型肝炎肝纤维化的分期疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(9): 180-188.
- LI BX, WANG X, LIU JB, et al. Staged efficacy of Qijia Rougan formula combined with entecavir on chronic hepatitis B liver fibrosis with Qi deficiency and collateral obstruction syndrome based on the "host-guest interaction" theory [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, 32(9): 180-188.
- [11] BAYSOY A, BAI Z, SATIJA R, et al. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(10): 695-713.
- [12] 刘进, 许欣怡, 刘悸斌, 等. 芪甲柔肝方及其拆方调控 VEGF/SRF/c-FOS 通路改善肝纤维化大鼠肝窦毛细血管化的机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(20): 5528-5538.
- LIU J, XU X Y, LIU J B, et al. Mechanism of Qijia Rougan formula and its disassembled formulas in regulating VEGF/SRF/c-FOS pathway and improving hepatic sinusoidal capillarization in liver fibrosis rats [J]. Chin J Chin Mater Med, 2024, 49(20): 5528-5538.
- [13] 苏悦, 彭杨芷, 刘雨樵, 等. 基于 miR-23a-3p 的扶正通络法抗肝纤维化的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 3962-3966.
- SU Y, PENG Y Z, LIU Y Q, et al. Mechanism of Fuzheng Tongluo method in anti-liver fibrosis based on miR-23a-3p [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(7): 3962-3966.
- [14] CHEN X F, WANG Y, JI S, et al. Hepatoprotective efficacy and interventional mechanism of Qijia Rougan decoction in liver fibrosis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 911250.
- [15] 汪玉梅, 吴佩杰, 纪少秀, 等. 芪甲柔肝方通过 miRNA-mRNA 网络改善肝纤维化的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20251901.
- WANG Y M, WU P J, JI S X, et al. Mechanism of Qijia Rougan formula improving liver fibrosis through miRNA-mRNA network [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20251901.
- [16] 王博文, 裴紫娟, 梅莎莎, 等. 基于主客交理论探讨截断扭转思想辨治癌因性疲乏经验 [J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(7): 3567-3570.
- WANG B W, PEI Z J, MEI S S, et al. Exploring the experience of managing cancer-related fatigue based on the host-guest interaction theory of truncated-torsion thinking [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2025, 40(7): 3567-3570.
- [17] 韦一, 洪志明, 邱俊峰, 等. 基于“主客交-络病”理论探讨慢性前列腺炎的病机及辨治 [J]. 北京中医药大学学报, 2025, 48(7): 979-984.
- WEI Y, HONG Z M, QIU J F, et al. Exploring the pathogenesis and treatment of chronic prostatitis based on the 'host-guest interaction-network disease' theory [J]. J Beijing Univ Chin Med, 2025, 48(7): 979-984.
- [18] 张之文. 《温疫论》“主客交”理论学说在感染性疾病中的应用 [J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27(4): 26-27.
- ZHANG Z W. The application of the "host-guest interaction" theory from on warm epidemics in infectious diseases [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2004, 27(4): 26-27.
- [19] 李霞, 吴文军, 刘文平, 等. 基于络病理论探讨肝纤维化病机与治疗 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(8): 4619-4622.
- LI X, WU W J, LIU W P, et al. Discussion on the pathogenesis and treatment of liver fibrosis based on network disease theory [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2021, 36(8): 4619-4622.
- [20] 李白雪, 周航, 刘悸斌, 等. 温病“主客交”视角下感染性疾病慢性化机制-经典传承与创新思考 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20251016.
- LI B X, ZHOU H, LIU J B, et al. Mechanisms of chronicity in infectious diseases from the perspective of "host-guest interaction" in warm diseases-inheritance and innovative thinking [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20251016.
- [21] PINZANI M, ROMBOUTS K, COLAGRANDE S. Fibrosis in chronic liver diseases: Diagnosis and management [J]. J Hepatol, 2005, 42 Suppl(1): S22-S36.
- [22] GARCIA-TSAO G, FRIEDMAN S, IREDALE J, et al. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis [J]. Hepatology, 2010, 51(4): 1445-1449.
- [23] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166.
- [24] 王刚, 谢固雅. 乙型肝炎患者中血清甲胎蛋白、IV 型胶原、透明质酸及层黏蛋白的表达及其与肝功能的关 系 [J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(3): 318-321.
- WANG G, XIE G Y. Expression of serum alpha-fetoprotein, type IV collagen, hyaluronic acid and laminin in hepatitis B patients and their relationship with liver function [J]. Chin J Health Lab Technol, 2021, 31(3): 318-321.
- [25] 许颖, 罗继娜, 杨柳青, 等. 铁皮石斛多糖基于 Notch 信号通路抗大鼠肝纤维化作用及其超声评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(21): 70-77.
- XU Y, LUO J N, YANG L Q, et al. Anti-liver fibrosis effect of *Dendrobium officinale* polysaccharides based on Notch signaling pathway in rats and its ultrasound evaluation [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(21): 70-77.
- [26] 宋晨, 朱庆焰, 陈婷. 血清肝纤四项与肝功能联合检测评估慢性乙肝患者肝纤维化程度的价值 [J]. 中国医学创新, 2023, 20(15): 132-137.
- SONG C, ZHU Q Y, CHEN T. The value of combined detection of four serum liver fibrosis markers and liver function in evaluating the degree of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B [J]. Chin Med Innov, 2023, 20(15): 132-137.
- [27] PLEVRIS N, SINHA R, HAY A W, et al. Index serum hyaluronic acid independently and accurately predicts mortality in patients with liver disease [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2018, 48(4): 423-430.

- [28] MURAWAKI Y, IKUTA Y, KODA M, et al. Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1996, 11(5): 459-465.
- [29] CHEN Q, MEI L, ZHONG R, et al. Serum liver fibrosis markers predict hepatic decompensation in compensated cirrhosis[J]. *BMC Gastroenterol*, 2023, 23(1):317.
- [30] THEISE N D. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: A personal, practical approach [J]. *Mod Pathol*, 2007, 20(Suppl 1):S3-S14.
- [31] BRUNT E M. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: The Knodell histology activity index and beyond[J]. *Hepatology*, 2000, 31(1):241-246.
- [32] PILETTE C, ROUSSELET M C, BEDOSSA P, et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis: Quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers[J]. *J Hepatol*, 1998, 28(3):439-446.
- [33] LIU F, LIN Y, LI Z, et al. Glutathione S-transferase A1 (GSTA1) release, an early indicator of acute hepatic injury in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 71:225-230.
- [34] SHI C X, LIN Y X, LIU F P, et al. Hepatoprotective effects of ethanol extracts from *Folium Syringae* against acetaminophen-induced hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Chin Med Assoc*, 2017, 80(10):623-629.
- [35] ZHOU Y, CHEN Y, XUAN C, et al. DPP9 regulates NQO1 and ROS to promote resistance to chemotherapy in liver cancer cells[J]. *Redox Biol*, 2024, 75:103292.
- [36] 张钦媛,陈彦旭,秦大凯,等. 中药调控 Nrf2 信号通路干预糖尿病肾病研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(18):277-285.
- ZHANG Q Y, CHEN Y X, QIN D K, et al. Research progress on traditional Chinese medicine regulating Nrf2 signaling pathway in diabetic kidney disease intervention [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(18):277-285.
- [37] SI W, SHEN J, DU C, et al. A miR-20a/MAPK1/c-Myc regulatory feedback loop regulates breast carcinogenesis and chemoresistance [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(2): 406-420.
- [38] LIN F X, GU H Y, HE W. MAPK signaling pathway in spinal cord injury: Mechanisms and therapeutic potential [J]. *Exp Neurol*, 2025, 383:115043.
- [39] ZHANG M, WU Z, SALAS S S, et al. Arginase 1 expression is increased during hepatic stellate cell activation and facilitates collagen synthesis [J]. *J Cell Biochem*, 2023, 124(6):808-817.
- [40] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(7):397-411.
- [41] 罗星,潘博,傅剑锋,等. 健脾消癌方调控 iNOS/ARG1 轴诱导线粒体功能障碍抑制结肠癌进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20251729.
- LUO X, PAN B, FU J F, et al. Jianpi Xiaogai formula regulates the iNOS/ARG1 axis to induce mitochondrial dysfunction and inhibit colorectal cancer progression [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20251729.
- [42] 陶然. S100B 调控巨噬细胞极化而加剧肝纤维化的实验研究[D]. 长春:吉林大学,2017.
- TAO R. Experimental study on S100B regulating macrophage polarization and aggravating liver fibrosis [D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [43] 赛提尔古丽·克然木,钱蕾,丁思怡,等. 精氨酸代谢调控间充质干细胞功能的研究进展[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2025, 45(7):910-915.
- SAITIERGULI K R M, QIAN L, DING S Y, et al. Research progress on the regulation of mesenchymal stem cell function by arginine metabolism [J]. *J Shanghai Jiao Tong Univ: Med Sci*, 2025, 45(7):910-915.
- [44] 杨星,王振,刘江凯,等. 基于细胞信号通路探讨姜黄素抗肝纤维化的研究进展[J]. *中成药*, 2023, 45(5):1571-1576.
- YANG X, WANG Z, LIU J K, et al. Research progress of curcumin against liver fibrosis based on cellular signaling pathways[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2023, 45(5):1571-1576.
- [45] JIN H, LIAN N, ZHANG F, et al. Activation of PPAR γ /P53 signaling is required for curcumin to induce hepatic stellate cell senescence[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(4):e2189.

[责任编辑 王鑫]