

• XXXX •

清肝健脾活血方通过FoxO1调控肝星状细胞糖酵解代谢 重编程抗肝纤维化机制

潘富珍¹, 朱梦², 施传坚¹, 徐世强¹, 刘定^{3*}, 张锦芳^{1*}

(1. 广州中医药大学深圳医院(福田), 广东深圳 518000; 2. 浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310000;
3. 江门市五邑中医院, 广东 江门 529000)

[摘要] 目的:采用代谢组学探讨清肝健脾活血方抗肝纤维化小鼠的作用机制。方法:按20%四氯化碳(CCl₄),橄榄油稀释,比例4:1)2.5 mL·kg⁻¹剂量腹腔注射4周建立肝纤维化小鼠模型,将54只C57BL/6J小鼠随机分为空白组,模型组,清肝健脾活血方高剂量组(47.32 g·kg⁻¹)、中剂量组(23.66 g·kg⁻¹)、低剂量组(11.83 g·kg⁻¹)和鳖甲煎丸组(1.365 g·kg⁻¹),每组9只。造模同时,各给药组按剂量连续给药4周,1次/d。4周后取小鼠肝组织、血液,进行肝功能及肝脏病理检测,基于非靶向代谢组学检测肝脏代谢产物,采用主成分分析(PCA)、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)探讨空白组、模型组和清肝健脾活血方高剂量组小鼠肝组织代谢产物及其所参与的代谢通路,并从细胞和动物水平进行蛋白免疫印迹法(Western blot)验证。结果:与空白组比较,模型组丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平明显升高($P<0.05$),炎症细胞增多,纤维间隔形成,富集的通路主要为叉头框蛋白O(FoxO)信号通路;与模型组比较,清肝健脾活血方高剂量组ALT、AST水平显著降低($P<0.01$),清肝健脾活血方各给药组炎症细胞减少,纤维间隔缩小、变窄,胶原纤维变小,胶原面积显著减少;非靶向代谢检测出79个差异代谢产物,其中上调49个,下调30个,主要富集到三羧酸(TCA)循环、丙酮酸代谢等通路。蛋白免疫印迹法(Western blot)验证结果显示,与空白组比较,模型组肝组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、乳酸脱氢酶A(LDHA)、FoxO1、丙酮酸激酶M2(PKM2)、己糖激酶2(HK2)、磷酸果糖激酶1(PFK1)蛋白表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$);肝星状细胞葡萄糖浓度上升同时 α -SMA、LDHA、FoxO1、PKM2、葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)、PFK1蛋白表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,清肝健脾活血方高剂量组肝组织 α -SMA、LDHA、FoxO1、PKM2、HK2、PFK1蛋白表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$),肝星状细胞葡萄糖浓度下降同时 α -SMA、LDHA、FoxO1、PKM2、GLUT1、PFK1蛋白表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:清肝健脾活血方能够减轻肝纤维化小鼠的病理进展,可能通过FoxO1调节TCA循环、丙酮酸代谢,调控肝星状细胞糖酵解代谢重编程促进小鼠肝组织修复。

[关键词] 清肝健脾活血方; 肝纤维化; 代谢组学; 肝星状细胞; 糖酵解

[中图分类号] R242;R256;R575 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260766

[网络出版地址]

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



Mechanism of Qinggan Jianpi Huoxue Formula Against Hepatic Fibrosis via FoxO1 Mediated Regulation of Glycolytic Metabolic Reprogramming of Hepatic Stellate Cells

PAN Fuzhen¹, ZHU Meng², SHI Chuanjian¹, XU Shiqiang¹, LIU Ding^{3*}, ZHANG Jinfang^{1*}

(1. Shenzhen Hospital (Futian) of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China;
2. School of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China;
3. Jiangmen Wuyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangmen 529000, China)

[收稿日期] 2026-02-11

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82505506);深圳市基础研究专项自然科学基金计划面上项目(JCYJ20240813160705007, JCYJ20250604190553066);广东省江门市基础与应用基础研究重点项目(2220002000220);广州中医药大学校院联合科技创新基金项目(GZYFT2024Y07)

[第一作者] 潘富珍, 博士, 主治医师, 从事中医药防治肝病研究, E-mail: Panfuzhen07@163.com

[通信作者] * 张锦芳, 博士生导师, 教授, 从事表观遗传学研究, Tel: 0755-83548611, zhangjif06@gzucm.edu.cn

* 刘定, 博士, 副主任医师, 从事慢性肝病的中医药基础与临床研究, Tel: 0750-3509688, E-mail: liuding1984@163.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Qinggan Jianpi Huoxue formula against hepatic fibrosis in mice using metabolomics. **Methods:** A hepatic fibrosis mouse model was established by intraperitoneal injection of 20% carbon tetrachloride (CCl_4 , diluted with olive oil at a ratio of 4:1) at a dose of $2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 4 weeks. A total of 54 C57BL/6J mice were randomly divided into the blank control group, model group, Qinggan Jianpi Huoxue formula high-dose group ($47.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium-dose group ($23.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), low-dose group ($11.83 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and Biejiajian pill group ($1.365 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 9 mice in each group. Concurrently with modeling, each administration group received the corresponding dose continuously for 4 weeks, once daily. After 4 weeks, liver tissues and blood samples were collected for liver function and hepatic pathological examinations. Non-targeted metabolomics was employed to detect hepatic metabolites. Principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were performed to explore the metabolites and their involved metabolic pathways in the liver tissues of mice in the blank control group, model group and Qinggan Jianpi Huoxue formula high-dose group. Western blot validation was conducted at both the cellular and animal levels. **Results:** Compared with the blank control group, the model group showed significantly increased levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) ($P < 0.05$), along with increased inflammatory cell infiltration, and formation of fibrous septa. The predominantly enriched pathway was the forkhead box O (FoxO) signaling pathway. Compared with the model group, the Qinggan Jianpi Huoxue formula high-dose group exhibited significantly decreased ALT and AST levels ($P < 0.01$). In all administration groups of Qinggan Jianpi Huoxue formula, inflammatory cell infiltration was reduced, fibrous septa were narrowed and diminished, collagen fibers were reduced, and the collagen area was significantly decreased. Non-targeted metabolomics identified 79 differential metabolites, among which 49 were up-regulated and 30 down-regulated, primarily enriched in the tricarboxylic acid (TCA) cycle and pyruvate metabolism pathways. Western blot results demonstrated that, compared with the blank control group, the model group exhibited significantly upregulated protein expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), lactate dehydrogenase A (LDHA), FoxO1, pyruvate kinase M2 (PKM2), hexokinase 2 (HK2), and phosphofructokinase 1 (PFK1) in liver tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In hepatic stellate cells, the glucose concentration increased, and the protein expression of α -SMA, LDHA, FoxO1, PKM2, glucose transporter 1 (GLUT1), and PFK1 were significantly up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conversely, compared with the model group, the Qinggan Jianpi Huoxue formula high-dose group showed significantly downregulated protein expression of α -SMA, LDHA, FoxO1, PKM2, HK2, and PFK1 in liver tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In hepatic stellate cells, the glucose concentration decreased, and the protein expression of α -SMA, LDHA, FoxO1, PKM2, GLUT1, and PFK1 were significantly down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Qinggan Jianpi Huoxue formula can alleviate the pathological progression of hepatic fibrosis in mice, potentially by regulating the TCA cycle and pyruvate metabolism through FoxO1, and by modulating glycolytic metabolic reprogramming in hepatic stellate cells, thereby promoting liver tissue repair.

[Keywords] Qinggan Jianpi Huoxue formula; hepatic fibrosis; metabolomics; hepatic stellate cells; glycolysis

肝纤维化(HF)是由各种病因导致的肝损伤-修复反应,其进展与肝星状细胞(HSCs)活化及其 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表型转变关系密切。活化的HSCs主要分泌胶原构成的细胞外基质(ECM),引发ECM沉积与降解失衡,导致胶原增多,长期则可能演变为肝硬化甚至肝癌^[1]。虽然HSCs可以在各种慢性肝病病因中直接被激活,但与损伤相关炎症细胞和信号通路是促进肝纤维化进展的关键,在HSCs向肌成纤维细胞样表型转换过程中,伴随高能量需求,涉及大量的代谢重编程,主要包括糖酵解^[2]。然而,HSCs的代谢重编程尤其是糖酵解增强驱动HSCs活化,靶向HSCs糖酵解代谢重编程有望成为HF治疗的全新策略^[3]。HF已成为广泛影响人类的全球性流行病,而其导致的肝硬化是慢性肝病患者发病和死亡的重要原因^[4]。目前针对HF的有效治疗药物十分有限,而中医药在该领域有明确优势,中医药在抗肝纤维化方面具有多部位、多靶点、不良反应小的独特优势^[5]。

中医认为,HF是外感六淫、疫毒,情志失调,饮

食不节,烦劳过度等引起肝失疏泄,气机升降失调,肝血瘀滞,日久化热,肝病传脾,脾虚湿阻,湿热内蕴,耗伤阴液,进而肝病及肾,肝肾阴虚,肝脾肾三脏功能失调而发病^[6-7]。因此导师曹洪欣教授基于多年临床经验,确立清肝、健脾、活血之法。方用清肝健脾活血方,由《伤寒论》大柴胡汤与《重订严氏济生方》鳖甲饮子化裁,临床疗效显著。前期研究发现清肝健脾活血方能够改善大鼠肝功能、降低胶原沉积、抑制氧化应激,调控巨噬细胞M1型向M2型极化发挥抗炎抗肝纤维化作用^[8-9]。本研究拟利用代谢组学的方法,通过分析空白组、模型组、清肝健脾活血方高剂量组代谢差异,进一步探讨清肝健脾活血方调控肝星状细胞糖酵解代谢重编程抗肝纤维化具体作用机制。从代谢重编程的全新视角,深入探讨清肝健脾活血方治疗HF分子机制,研究结果丰富清肝健脾活血方治疗HF的科学内涵,并为HF有效中药的开发提供理论依据。

1 材料

1.1 动物与细胞 SPF级雄性C57BL/6J小鼠

54只,3~4周龄,体质量(20 ± 2)g,购自广东药康生物科技有限公司(新基地),实验单位使用许可证号SYXK(粤)2022-0172,合格证号SCXK(粤)2023-0067。饲养于北京大学深圳研究生院SPF级屏障系统中,室温 $20\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%~70%,光照自然,饮食、饮水自由。经过适应性喂养7d后开展实验。人肝星形细胞(LX-2细胞)购于MEISENCTCC/美森细胞,货号CTCC-ZHYC-0296,传至10代。

1.2 伦理 本研究涉及动物的实验经北京大学深圳研究生院实验动物伦理委员会审查批准,批准号AP0044005。

1.3 药物与试剂 中药组成柴胡(批号240601)10g、白芍(批号240302J1)15g,购自广东慧达康制药有限公司;法半夏(批号240204021)9g、甘草(批号240400701)10g、川芎(批号C4524911)10g,购自广东省药材公司;鳖甲(批号230401-01)20g、黄精(批号2406282)15g、枳实(批号240504321)10g、黄芩(批号240801601)10g、黄芪(批号240604511)30g均购自康美药业股份有限公司;炒白术(批号240500319)12g,购自康美世纪国药有限公司,生姜5g,所有药材均由广州中医药大学深圳医院采购,经广州中医药大学深圳医院药学部杨志义主任药师鉴定符合2025年版《中华人民共和国药典》质量规范。鳖甲煎丸(国药集团中联药业有限公司,国药准字Z42020772)。天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号均为20240527)。丙酮酸激酶M2(PKM2)、葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)、己糖激酶2(HK2)、磷酸果糖激酶1(PFK1)、乳酸脱氢酶A(LDHA)、叉头框蛋白O1(FoxO1)、微管蛋白(Tubulin)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗、HRP标记山羊抗鼠二抗(武汉三鹰生物科技有限公司,货号分别为15822-1-AP、21829-1-AP、22029-1-AP、55028-1-AP、19987-1-AP、18592-1-AP、11224-1-AP、20536-1-AP、SA00001-2、SA00001-1)。 α -SMA抗体(英国Abcam公司,货号ab5694)。葡萄糖检测试剂盒(O-toluidine法)(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号S0201S)。杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清、青霉素-链霉素、胰蛋白酶(美国Invitrogen公司,货号12430054、10010023、10091148、15140122、25200056),苏木素染液、Harris苏木素染色液(珠海

贝索生物技术有限公司,货号BA-4041),马松(Masson)套盒(湖北百奥斯生物科技有限公司,货号BP028)。转化生长因子- β (TGF- β)(美国MCE公司,货号HY-P70543)

1.4 仪器 H1850-R型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),5305型真空浓缩仪(德国Eppendorf公司),shandon finesse 325型石蜡切片机、Vanquish Flex型超高效液相色谱仪和Orbitrap Exploris 120型高分辨质谱仪、HM325型病理切片机(美国赛默飞世尔公司),CX31型显微镜(日本Olympus公司),BMJ-A型包埋机、PHY-III型病理组织漂烘仪、TSJ-SD型脱水机、PHY-III型组织摊片机(常州市中威电子仪器有限公司),HAMAMATSU C13220-0型成像系统(日本滨松公司),GS-20型水平摇床(杭州米欧仪器有限公司),Bio-Rad PowerPac HC164-5052型高电流电泳仪(美国Bio-Rad公司),SpectraMax iD3型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司),FL1000型高灵敏度化学发光成像系统(新加坡Life Technologies Holdings公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 54只C57BL/6小鼠,随机分为空白组、模型组、清肝健脾活血方高、中、低剂量组和鳖甲煎丸组。按剂量 $2.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给小鼠腹腔注射20%四氯化碳(CCl_4)-橄榄油混悬液,每周2次,空白组小鼠腹腔注射等体积橄榄油,造模同时给药组按剂量灌胃给予清肝健脾活血方低、中、高剂量(11.83 、 23.66 、 $47.32\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),按比例称取药材,先将鳖甲先煎煮30min,再加入其他11味药材加10倍量水煎煮提取2次,每次1h,过滤取滤液;合并2次滤液浓缩至药物浓度为 $4\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (生药量), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。鳖甲煎丸研磨加蒸馏水配置成质量浓度为 $0.1851\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混悬液,灌胃剂量为 $1.365\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,根据徐叔云教授主编的《药理实验方法学》中人和小鼠的体表面积折算法,设置清肝健脾活血方中剂量为60kg人体等效剂量,清肝健脾活血方低剂量为等效0.5倍剂量,清肝健脾活血方高剂量组为等效2倍剂量,空白组和模型组给予相同剂量纯净水,每日灌胃1次,共4周。

2.2 小鼠肝组织病理学检测 取小鼠肝组织进行4%多聚甲醛固定,脱水与透明,浸蜡与包埋,石蜡切片与展片,脱蜡,进行苏木素-伊红(HE)、Masson染色,将染色后的切片脱水透明、中性树胶封片,光学显微镜采集图像。

2.3 小鼠血清肝功能水平检测 小鼠腹腔注射戊

巴比妥麻醉,摘除眼球采血约1.0 mL,置于1.5 mL 无菌离心管中。血液样本室温静置30 min,于4 °C、3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm,下同),取上层血清,-80 °C冰箱保存备用。按照试剂盒说明书采用450 nm酶标仪检测小鼠血清ALT、AST水平。

2.4 肝组织代谢组学样本制备 称取适量样本于2 mL离心管中,加入预冷水200 μL,加入2颗钢珠,放入高通量组织研磨仪中,55 Hz,研磨60 s重复1次,加入甲醇-乙腈(1:1)800 μL,放入超声波清洗机中超声30 min;放入-20 °C冰箱中冷冻30 min;12 000 r·min⁻¹ 4 °C离心10 min,取上清液800 μL,真空浓缩至尽干;加入50 %甲醇150 μL(含5 mg·L⁻¹ 2-氯苯丙氨酸)复溶,涡旋30 s;12 000 r·min⁻¹ 4 °C离心10 min,取上清液过0.22 μm滤膜,过滤液加入到检测瓶中;取样品过滤液10~20 μL混合成1个质量控制(QC)样品。

2.5 色谱条件 使用Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温40 °C,自动进样器8 °C,进样量2 μL。正离子模式,流动相为0.1%甲酸乙腈溶液(B)和0.1%甲酸水溶液(A),负离子模式,流动相为乙腈(B)和甲酸铵水溶液(A)5 μmol·L⁻¹。正负模式梯度洗脱程序均为0~1 min, 8%B; 1~8 min, 8%~98%B; 8~10 min, 98%B; 10~10.1 min, 98%~8%B; 10.1~12 min, 8%B。

2.6 质谱条件 采用Thermo Orbitrap Exploris 120型质谱仪在Xcalibur 4.7软件控制下分别进行正、负离子模式的数据依赖采集(DDA),电喷雾离子源(ESI),正负离子模式分别采集数据。正、负离子模式喷雾电压分别为3.50 kV和-2.50 kV,鞘气40 arb,辅助气10 arb。毛细管温度325 °C,以分辨率60 000进行一级全扫描,扫描范围 m/z 100~1 000,并采用高能碰撞解离(HCD)进行二级裂解,二级分辨率为15 000,碰撞能量为30%,采集信号前4离子进行碎裂,同时采用动态去除无必要MS/MS信息。

2.7 代谢组学数据处理和差异代谢物分析 取样品提取液各10~20 μL混合成1个QC样品,用于评价仪器稳定性和数据可靠性,代谢物基于自建库、mzCloud在线库(<https://www.mzcloud.org/>)、脂质代谢物与通路研究计划(LIPIDMAPS, <https://www.lipidmaps.org/>)、人类代谢组数据库(HMDB, <https://hmdb.ca/>)、北美质谱图谱库(MoNA, <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>)及美国国家标准与技术研究

院(NIST)_2020_MSMS图谱库进行鉴定。采用XCMS 4.8.0软件(R语言包, Bioconductor 3.18, R 4.3.1)进行峰对齐、保留时间校正和提取峰面积。XCMS提取得到的数据进行代谢物结构鉴定、数据预处理,然后进行实验数据质量评价,最后再进行单变量统计分析、多维统计分析。用PMCMR plus(V1.9.6)进行多组比较统计检验分析,获得显著性结果。使用R软件包Ropls分别对样本数据进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)降维分析。并分别绘制得分图,展示各样本间代谢物组成的差异。使用通过R中Pheatmap程序包(V1.0.12)对差异代谢物丰度值进行聚类分析,使用VennDiagram(V1.7.3)和UpSetR(V1.4.0)对不同多组比较的差异物质进行Venn图和Upset图绘制;用corrplot(V4.0.3)对差异代谢物进行Pearson相关性分析、通过clusterProfiler(V4.6.0)对差异物质进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析,获得显著富集的代谢通路信息。OPLS-DA变量重要性投影(VIP)值>1和 $P<0.05$ 为显著性差异代谢物筛选标准。

2.8 含药血清制备 共24只SD大鼠,随机分为2组,每组12只,灌胃组给予清肝健脾活血方,早、晚各灌胃7 d,对照组给予等量无菌水。给药剂量按成人60 kg标准体质量计算,参考《中药药理研究方法学》,大鼠灌胃32.084 g·kg⁻¹清肝健脾活血方^[8]。灌胃完成后取大鼠血清,在56 °C下加热灭活30 min后,注射器通过0.22 μm滤膜过滤,灭菌备用。

2.9 人肝星形细胞(LX2细胞)培养及分组 用1%双抗(100 U·mL⁻¹青霉素和100 mg·L⁻¹链霉素)和10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基LX2细胞,于5%CO₂、37 °C培养箱中进行培养。待细胞密度80%左右时,消化后进行传代。传代后的细胞分为空白组、模型组(20 μg·L⁻¹ TGF-β诱导)、清肝健脾活血方低剂量组(20 μg·L⁻¹ TGF-β诱导+5%大鼠含药血清)、清肝健脾活血方中剂量组(20 μg·L⁻¹ TGF-β诱导+10%大鼠含药血清)、清肝健脾活血方高剂量组(20 μg·L⁻¹ TGF-β诱导+15%大鼠含药血清)。

2.10 细胞葡萄糖浓度检测 将LX2细胞以5×10⁵个/孔接种于6孔板中,待细胞贴壁后,分组干预细胞24 h后收集细胞,按照葡萄糖测定试剂盒说明书操作步骤,在630 nm处测定各组吸光度,进而算出细胞葡萄糖浓度。

2.11 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肝

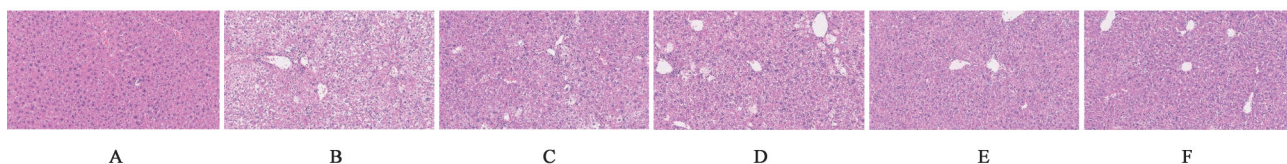
组织及星状细胞 α -SMA、FoxO1及糖酵解相关蛋白的影响。肝组织和LX-2细胞加入蛋白酶、磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,低温研磨裂解,4℃离心,12 000 r·min⁻¹,15 min,取上清,分装后一部分用于聚氧基丙烯酸正丁酯(BCA)试剂盒测定蛋白浓度及上样量,取总蛋白30 μ g进行电泳,经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳分离后,转至PVDF膜。5%脱脂牛奶室温封闭2 h后,分别加入 β -actin、Tubulin(1:5 000),PKM2、PFK1、GLUT1、LDHA(1:2 000), α -SMA、HK2、FoxO1(1:1 000)一抗4℃孵育过夜,TBST洗涤后,加入相应二抗(1:5 000)室温孵育2 h,显影,使用Image J软件分析目标蛋白条带与内参的灰度值比值,计算目的蛋白表达量。

2.12 统计分析 采用Graphpad Prism 8.0软件进行数据分析,计量资料先采用Shapiro-Wilk检验进行正态性检验,Levene检验进行方差齐性检验。符

合正态分布且方差齐的组间比较采用独立样本 t 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;正态分布但方差不齐者采用校正 t 检验;非正态分布资料采用非参数Mann-Whitney U 检验。多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 清肝健脾活血方对肝脏组织病理影响 利用HE、Masson染色观察肝组织病理,空白组肝细胞形态和肝小叶结构均正常,肝板条索状,围绕中央静脉排列紧密,无炎症、充血、水肿或脂肪变性。模型组明显变性坏死,肝小叶结构不规整,纤维间隔增多,形成假小叶结构,中性粒细胞在中央静脉及汇管区大量浸润,血管周围肝细胞呈中度脂肪变性,肝细胞间可见少许蓝染胶原纤维。与模型组比较,各给药组炎细胞减少,纤维间隔缩小、变窄,蓝染胶原纤维变小、变细,表明肝纤维化程度减轻。见图1、图2。



注:A.空白组;B.模型组;C.清肝健脾活血方低剂量组;D.清肝健脾活血方中剂量组;E.清肝健脾活血方高剂量组;F.鳖甲煎丸组(图2、图3同)

图1 清肝健脾活血方对肝纤维化小鼠肝组织病理形态改变的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Qinggan Jianpi Huoxue formula on pathological morphological changes of liver tissue in mice with hepatic fibrosis (HE,×200)

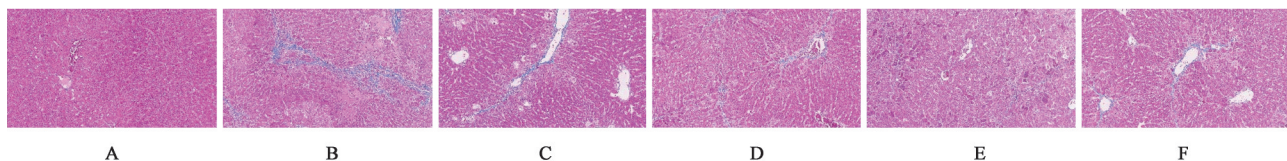


图2 清肝健脾活血方对肝纤维化小鼠肝组织胶原纤维沉积的影响(Masson,×200)

Fig. 2 Effect of Qinggan Jianpi Huoxue formula on collagen fiber deposition in liver tissue of mice with hepatic fibrosis (Masson,×200)

3.2 清肝健脾活血方对C57BL/小鼠血清肝功能影响 各组小鼠血清ALT、AST水平,与空白组比较,模型组ALT、AST水平显著升高($P < 0.01$),与模型组比较,清肝健脾活血方低剂量、中剂量ALT水平差异无统计学意义,AST水平显著降低($P < 0.01$);清肝健脾活血方高剂量、鳖甲煎丸ALT、AST水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1。

3.3 代谢组学分析

3.3.1 代谢轮廓分析 通过线性变换,将高维数据降低至二维或三维,同时保持各方差贡献最大的特征,即降低数据复杂度。将所有实验样本和QC样

本提取得到的峰进行PCA,QC样本间差异越小说明方法稳定性越高数据质量越好。在总体PCA分析中QC样本聚集在一起也说明仪器状态稳定实验可靠,组内样本聚集,组间样本不离散。为进一步分析不同组间代谢谱差异,采用PLS-DA对代谢组数据进行监督模式识别分析。结果显示,各组样本在PLS-DA得分图中明显分离,组内样本聚集良好,组间样本离散,表明不同处理组之间存在显著的代谢差异。见增强出版附加材料。

3.3.2 OPLS-DA 在质谱正、负离子模式下,采用OPLS-DA,通过200次置换检验验证模型可靠性,

表1 清肝健脾活血方对肝纤维化小鼠血清ALT、AST肝功能指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Qinggan Jianpi Huoxue formula on serum alt and ast liver function indexes in mice with hepatic fibrosis ($\bar{x}\pm s, n=6$)
U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST
空白组		17.25±2.35	28.68±12.18
模型组		40.16±5.75 ²⁾	138.2±42.23 ²⁾
清肝健脾活血方低剂量组	11.83	34.74±9.06	81.51±17.36 ⁴⁾
清肝健脾活血方中剂量组	23.66	32.21±4.04	83.73±18.10 ⁴⁾
清肝健脾活血方高剂量组	47.32	26.14±3.74 ⁴⁾	68.21±7.50 ⁴⁾
鳖甲煎丸组	1.365	31.60±4.86 ³⁾	80.5±12.46 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表6同)

正、负离子下空白组与模型组比较, R^2Y (模型对 Y 变量的解释率)为0.97, Q^2 (模型的预测率)为0.08, Q^2 截距为-0.35;正、负离子下模型组与清肝健脾活血方高剂量组比较, R^2 、 Q^2 截距依次为0.95、-0.27、0.87、-0.50。仅空白组与模型组正离子模式 Q^2 截距 >0 ,存在轻微过拟合,其余模型均无过拟合,可用于差异代谢物筛选。见增强出版附加材料。

3.3.3 小鼠肝组织差异代谢产物筛选 以OPLS-DA的VIP值 >1 、 $P<0.05$,以及差异倍数(FC) >2 或FC <0.05 为筛选标准,得到空白组和模型组的差异内源性代谢物79个,其中上调31个,下调48个;模型组和清肝健脾活血方高剂量组的差异内源性代谢物79个,其中上调49个,下调30个。见增强出版附加材料。

3.3.4 小鼠肝组织差异物质富集分析 空白组与模型组代谢通路主要涉及氨基酸生物合成、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、FoxO信号通路、2-氧羧酸代谢、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路等;模型组与清肝健脾活血方高剂量组涉及代谢通路花生四

烯酸代谢、TGF- β 信号通路、半乳糖代谢、三羧酸(TCA)循环、胰高血糖素信号通路、丙酮酸代谢等;空白组、模型组与高剂量组的代谢通路主要涉及四烯酸代谢、cAMP信号通路、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、亚油酸代谢、生物素代谢、FoxO信号通路、氨基酸代谢、 β -丙氨酸代谢、丙酮酸代谢等。见增强出版附加材料。

3.4 清肝健脾活血方小鼠肝组织核心蛋白结果的影响 与空白组比较,模型组小鼠肝组织 α -SMA、LDHA、FoxO1、PKM2、HK2、PFK1蛋白表达明显上调($P<0.05, P<0.01$),GLUT1差异无统计学意义,与模型组比较,清肝健脾活血方低、中剂量组小鼠肝组织 α -SMA、LDHA、FoxO1、PKM2、HK2、GLUT1蛋白表达差异无统计学意义,中剂量组PFK1蛋白表达显著下调($P<0.01$);高剂量组 α -SMA、LDHA、FoxO1、PKM2、HK2、PFK1蛋白表达明显下调($P<0.05, P<0.01$);鳖甲煎丸组 α -SMA、LDHA、PKM2、HK2蛋白表达明显下调($P<0.05, P<0.01$),GLUT1、FoxO1、PFK1蛋白表达差异无统计学意义。结果表明,清肝健脾活血方通过抑制FoxO1信号通路,抑制糖酵解代谢重编程,从而减轻小鼠肝纤维化。见图3、表2、表3。

3.5 LX2细胞葡萄糖浓度 与空白组比较,模型组的葡萄糖显著浓度显著升高($P<0.01$);与模型组比较,清肝健脾活血方低、中、高剂量组葡萄糖浓度均显著下降($P<0.01$),见表4。

3.6 清肝健脾活血方对LX-2细胞核心蛋白结果的影响 与空白组比较,模型组 α -SMA、LDHA、FoxO1、PKM2、GLUT1、PFK1蛋白表达明显上调($P<0.05, P<0.01$),HK2蛋白表达差异无统计学意义;与模型组比较,清肝健脾活血方低剂量组 α -SMA、LDHA、HK2、GLUT1、PFK1蛋白表达差异无统计学意义,FoxO1、PKM2蛋白表达明显下调($P<0.05, P<0.01$),清肝健脾活血方中、高剂量组 α -SMA、FoxO1、PKM2、GLUT1、PFK1蛋白表达明

表2 清肝健脾活血方对肝纤维化小鼠肝脏 α -SMA、LDHA、FoxO1和PKM2蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Qinggan Jianpi Huoxue formula on α -SMA, LDHA, FoxO1 and PKM2 protein expression in liver of mice with hepatic fibrosis ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	α -SMA/Tubulin	LDHA/Tubulin	FoxO1/ β -actin	PKM2/ β -actin
空白组		0.50±0.24	0.75±0.15	0.40±0.13	0.16±0.09
模型组		1.10±0.08 ²⁾	1.07±0.19 ¹⁾	1.16±0.14 ²⁾	1.17±0.11 ²⁾
清肝健脾活血方低剂量组	11.83	1.12±0.21	1.05±0.03	1.04±0.11	1.05±0.17
清肝健脾活血方中剂量组	23.66	1.11±0.11	0.99±0.08	0.91±0.21	0.97±0.28
清肝健脾活血方高剂量组	47.32	0.70±0.22 ⁴⁾	0.66±0.03 ⁴⁾	0.61±0.25 ³⁾	0.51±0.07 ⁴⁾
鳖甲煎丸组	1.365	0.74±0.15 ³⁾	0.68±0.01 ⁴⁾	0.86±0.28	0.78±0.13 ⁴⁾

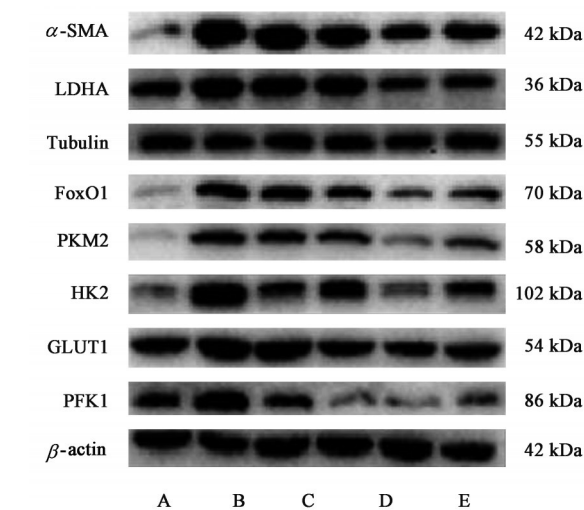


图3 各组小鼠肝组织糖酵解代谢相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of glycolysis related protein expression in liver tissue of mice in each group

显下调($P<0.05$, $P<0.01$),清肝健脾活血方中剂量组LDHA蛋白表达显著下调($P<0.01$)。结果表明,清肝健脾活血方通过抑制FoxO1信号通路,抑制LX-2细胞糖酵解代谢重编程,从而减轻LX-2细胞活化。见图4,表5、表6。

4 讨论

前期研究发现清肝健脾活血方能够改善大鼠肝功能、降低胶原沉积、抑制氧化应激,调控巨噬细胞极化发挥抗炎,从而改善大鼠肝纤维化^[8-9]。曹洪欣教授提出肝纤维化核心病机是肝失条达,气机逆乱,血滞成瘀,郁遏生热。热扰不已,肝气横逆犯脾,脾气虚弱,水湿不化,湿与热合,内灼阴津。病久不愈,下劫肾阴,终致肝肾阴液两伤,肝脾肾三脏整体失调^[7]。提出清肝健脾活血方,由《伤寒论》大柴胡汤与《重订严氏济生方》鳖甲饮子化裁而成。方中柴胡、枳实、黄芩、法半夏、白芍,取大柴胡汤之意以清肝泻热,去大黄防其苦寒伤脾;鳖甲、黄芪、白术、白芍、川芎,合鳖甲饮子之意以软坚散结、健脾活血、祛湿消癥;佐以黄精补气养阴、滋肾固本;

生姜配辛温之半夏,燥湿化痰、降逆和胃;使以甘草健脾益气,调和诸药。全方共奏清肝泻热、益气健脾、行气活血、软坚散结之功,切中肝纤维化“肝失疏泄、肝郁化热、肝血瘀滞、肝病传脾”之核心病机。本研究通过代谢组学技术对清肝健脾活血方中药抗肝纤维化作用机制进行阐释,其中医药整体观念和辨证论治与中药复方多组分、多靶点、协同起效的“整体观”相适应。因此,本研究采用代谢组学研究清肝健脾活血方治疗HF小鼠作用机制。HE染色表明清肝健脾活血方减轻小鼠肝组织炎细胞,纤维间隔缩小、变窄,Masson染色蓝染胶原纤维变小、变细,胶原面积显著减少,血清肝功ALT、AST显著下调,与前期研究结果一致。基于LC-MS代谢组学方法共筛选出模型组和清肝健脾活血方高剂量组差异内源性代谢物79个,其中模型组与清肝健脾活血方高剂量组比较,差异代谢物上调49个,下调30个,富集的通路主要为TCA循环、丙酮酸代谢、FoxO信号通路、糖代谢等代谢通路。空白组、模型组与清肝健脾活血方高剂量组的代谢通路主要涉及四烯酸代谢、cAMP信号通路、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、亚油酸代谢、生物素代谢、FoxO信号通路、氨基酸代谢、 β -丙氨酸代谢、丙酮酸代谢等。LC-MS代谢组学显示TCA循环、丙酮酸代谢显著变化,提示能量代谢重编程。清肝健脾活血方干预后,肝组织和LX-2细胞中LDHA、PKM2和PFK1的蛋白表达下调,表明LX-2细胞糖酵解受到抑制。代谢组学富集的FoxO通路与FoxO1蛋白表达下调高度吻合。FoxO1作为转录因子,可激活糖异生和糖酵解相关基因^[10]。清肝健脾活血方抑制FoxO1后,其靶基因(PKM2、LDHA、PFK1、HK2)表达同步降低,阻断糖酵解限速步骤HK2催化葡萄糖磷酸化,PFK1调控果糖-6-磷酸转化。研究发现肝脏FoxO1通过上调肝细胞TGF- β_1 表达,刺激肝脏炎症反应和TGF- β_1 介导的LX-2细胞活化^[11]。FoxO1作为FoxO

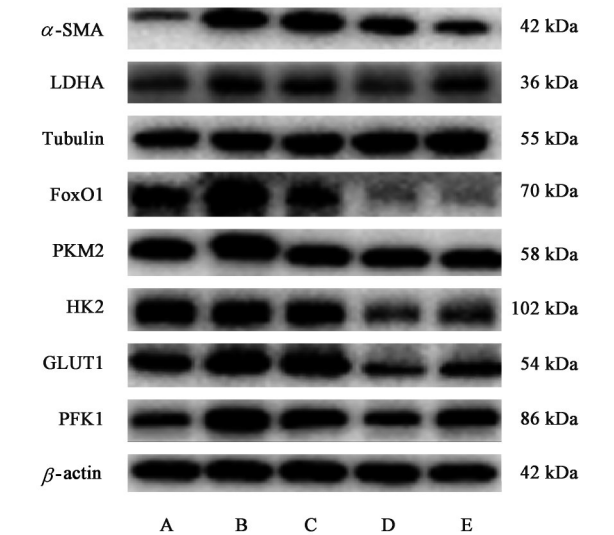
表3 清肝健脾活血方对肝纤维化小鼠肝脏HK2、PFK1和GLUT1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 3 Effect of Qinggan Jianpi Huoxue formula on HK2, PFK1 and GLUT1 protein expression in liver of mouse with hepatic fibrosis ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HK2/ β -actin	PFK1/ β -actin	GLUT1/ β -actin
空白组		0.57±0.17	1.00±0.11	0.93±0.09
模型组		1.16±0.23 ²⁾	1.35±0.15 ¹⁾	1.22±0.16
清肝健脾活血方低剂量组	11.83	0.86±0.09	0.91±0.27	1.10±0.11
清肝健脾活血方中剂量组	23.66	0.88±0.11	0.36±0.06 ⁴⁾	1.06±0.24
清肝健脾活血方高剂量组	47.32	0.50±0.24 ⁴⁾	0.56±0.41 ⁴⁾	0.91±0.13
鳖甲煎丸组	1.365	0.70±0.21 ³⁾	0.72±0.29	1.08±0.06

表4 清肝健脾活血方含药血清对LX-2细胞葡萄糖浓度的影响
($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of medicated serum containing Qinggan Jianpi Huoxue formula on glucose concentration in LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	细胞葡萄糖浓度 /mmol·g ⁻¹
空白组		15.20±4.56
模型组		30.23±8.24 ²⁾
清肝健脾活血方低剂量组	5	13.41±2.04 ⁴⁾
清肝健脾活血方中剂量组	10	14.43±3.60 ⁴⁾
清肝健脾活血方高剂量组	15	15.77±4.26 ⁴⁾



注:A.空白组;B.模型组;C.清肝健脾活血方低剂量组;D.清肝健脾活血方中剂量组;E.清肝健脾活血方高剂量组

图4 各组LX-2细胞活化后糖酵解代谢相关蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoretic detection of expression of glycolysis related proteins after activation of LX-2 cells in each group

转录因子家族的一员,其活性与核质穿梭及多种翻译后修饰(包括磷酸化、乙酰化和甲基化)密切相关^[12]。FoxO1是通过糖酵解代谢重编程来调节巨噬细胞功能^[13]。

研究表明,HSCs活化发生快速代谢重编程,特别是有氧糖酵解增加^[14-15]。有氧糖酵解为HSCs提供额外的生物能量与生物合成物质,从而诱导其活

化、增殖和迁移^[16-17]。活化HSCs以有氧糖酵解为能量来源,维持细胞增殖,分泌ECM,并增强向细胞损伤区域迁移。抑制有氧糖酵解关键酶,包括PKM2、果糖-2,6-二磷酸酶3(PFKFB3)和HK2,可以抑制HSCs活化,改善肝纤维化^[18-19]。近年来,细胞代谢重编程一直是研究热点。肝纤维化过程涉及各种细胞增殖和活化、表型转化及相关细胞因子分泌,这需要糖酵解为细胞增殖和活化提供中间代谢物和能量支持^[20-21]。GLUT在体内主要负责葡萄糖转运,并参与糖酵解过程^[22-23]。肝纤维化中GLUT1、GLUT2和GLUT4表达水平升高,可诱导HSCs内发生糖代谢重编程,增强Warburg效应,促进HSCs活化,最终导致肝纤维化发生和进展^[24-25]。HK酶促进限制糖酵解速率第一步,有效地阻碍葡萄糖从细胞中用于能量代谢的出口^[26]。HK有4种亚型,分别是HK1、HK2、HK3和HK4。而大部分正常组织只表达HK1。然而,HK2在促进有氧糖酵解方面更强,并且在肝纤维化中高表达^[27]。PFK1是糖酵解第二步关键酶,发挥限速因子作用。PFK1保证糖酵解过程的稳定性至关重要^[28]。鸢尾素下调关键糖酵解酶(HK2、PFK1、PKM2、LDHA),显著改善肝纤维化,减少胶原沉积和α-SMA表达^[29]。PKM2是一种丙酮酸激酶,被广泛认为是控制糖酵解速度的酶。促进磷酸基从磷酸烯醇式丙酮酸转移到ADP,从而在细胞质中产生丙酮酸。PKM2存在两种结构变异,最活跃的PKM2四聚体促进葡萄糖氧化磷酸化以完全氧化分解代谢产生ATP,而其二聚体促进有氧葡萄糖发酵的Warburg效应^[30-31]。PKM2在生理条件下主要以四聚体形式存在,但在肝纤维化中多形成二聚体。HSCs中Warburg效应增强,导致HSCs活化^[32]。LDH-A是糖酵解途径中关键酶,是催化丙酮酸转化为乳酸的最终催化剂。LDH-A表达增强或活性增强导致细胞内有氧糖酵解激增,从而满足快速分裂细胞的能量需求^[33]。HK2、PKM2、LDHA和乳酸是肝脏脂肪生成、炎症、纤维化及肝癌

表5 清肝健脾活血方对LX-2细胞α-SMA、LDHA、FoxO1和PKM2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Qinggan Jianpi Huoxue formula on α-SMA, LDHA, FoxO1 and PKM2 protein expression in hepatic stellate cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	α-SMA/Tubulin	LDHA/Tubulin	FoxO1/β-actin	PKM2/β-actin
空白组		0.45±0.02	0.83±0.08	0.83±0.17	1.11±0.05
模型组		1.19±0.05 ²⁾	1.04±0.02 ¹⁾	1.23±0.30 ¹⁾	1.46±0.07 ²⁾
清肝健脾活血方低剂量组	5	1.11±0.02	0.88±0.03	0.77±0.09 ³⁾	0.82±0.06 ⁴⁾
清肝健脾活血方中剂量组	10	0.71±0.02 ⁴⁾	0.71±0.13 ⁴⁾	0.33±0.04 ⁴⁾	0.91±0.08 ⁴⁾
清肝健脾活血方高剂量组	15	0.45±0.02 ⁴⁾	0.97±0.01	0.24±0.01 ⁴⁾	0.74±0.14 ⁴⁾

表6 清肝健脾活血方对LX-2细胞HK2、PFK1和GLUT1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Qinggan Jianpi Huoxue formula on HK2, PFK1 and GLUT1 protein expression in hepatic stellate cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分 数/%	HK2 / β -actin	PFK1 / β -actin	GLUT1 / β -actin
空白组		0.80 $\pm$ 0.41	0.61 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.07
模型组		0.97 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.06 ²⁾	0.84 $\pm$ 0.01 ¹⁾
清肝健脾活血方低剂量组	5	0.99 $\pm$ 0.20	0.89 $\pm$ 0.11	0.82 $\pm$ 0.05
清肝健脾活血方中剂量组	10	0.68 $\pm$ 0.29	0.61 $\pm$ 0.13 ⁴⁾	0.47 $\pm$ 0.02 ⁴⁾
清肝健脾活血方高剂量组	15	0.76 $\pm$ 0.12	0.72 $\pm$ 0.15 ⁴⁾	0.61 $\pm$ 0.05 ³⁾

进展的重要共同因素^[34]。FoxO转录因子家族是连接细胞信号转导与核心能量代谢的关键枢纽,通过调控丙酮酸代谢和TCA循环中的多个关键酶,维持细胞稳态^[35]。

综上所述,本研究表明清肝健脾活血方能够改善肝功能,减轻小鼠肝组织纤维化程度。LC-MS代谢组学显示清肝健脾活血方干预出现TCA循环、丙酮酸代谢显著变化,提示能量代谢重编程。清肝健脾活血方干预后,肝纤维化小鼠肝组织 α -SMA、LDHA、FoxO1、PKM2、HK2、PFK1蛋白表达下降,清肝健脾活血方含药血清降低活化的LX-2细胞葡萄糖浓度同时降低 α -SMA、LDHA、FoxO1、PKM2、GLUT1、PFK1蛋白表达;表明LX-2细胞糖酵解受到抑制。PKM2的下调直接减少丙酮酸生成,与代谢组学中丙酮酸代谢通路的改变相呼应。代谢组学富集的FoxO通路与FoxO1蛋白表达下调高度吻合。FoxO1作为转录因子,可激活糖酵解相关基因^[36]。FoxO1的抑制可能通过降低LX-2细胞的代谢活性,减少 α -SMA表达,从而缓解肝纤维化进程。清肝健脾活血方抑制FoxO1后,其靶基因(PKM2、LDHA、PFK1、HK2)表达同步降低,阻断糖酵解限速步骤HK2催化葡萄糖磷酸化,PFK1调控果糖-6-磷酸转化。推测清肝健脾活血方发挥治疗HF的作用机制可能是通过FoxO1调控LX-2细胞代谢重编程。这也为清肝健脾活血方从肝组织与LX-2细胞糖酵解代谢角度研究作用机制提供实验依据。本文从代谢表型、功能验证等多个维度系统验证清肝健脾活血方通过FoxO1调控HSCs糖酵解的机制。既往中药复方抗肝纤维化研究多聚焦于抗炎、抗氧化、抑制HSCs活化、调控细胞外基质代谢等传统环节,而对HSCs活化背后“能量代谢重编程”这一根本驱动因素关注不足。本课题提出“调控HSCs糖酵解代谢重编程是中药复方抗肝纤维化的关键机制之

一”的创新学术观点,从代谢调控的视角诠释清肝健脾活血方的作用机制,有望开辟中医药抗肝纤维化研究的新方向。清肝健脾活血法的科学内涵与现代“HSCs代谢重编程”理论相融合。清肝可减轻肝脏炎症微环境对HSCs的异常活化刺激,健脾可通过调控能量代谢稳态间接影响HSCs的代谢状态,活血可改善肝内微循环和代谢产物清除。三法合用,共同作用于HSCs糖酵解代谢重编程这一核心环节,体现中医药多靶点、多层次、整体调控的治疗特色。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HAMMERICH L, TACKE F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(10): 633-646.
- [2] HORN P, TACKE F. Metabolic reprogramming in liver fibrosis[J]. Cell Metab, 2024, 36(7): 1439-1455.
- [3] GILGENKRANTZ H, MALLAT A, MOREAU R, et al. Targeting cell-intrinsic metabolism for antifibrotic therapy[J]. J Hepatol, 2021, 74(6): 1442-1454.
- [4] HUANG D Q, TERRAULT N A, TACKE F, et al. Global epidemiology of cirrhosis - aetiology, trends and predictions[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(6): 388-398.
- [5] Radiology Committee on Infectious and Inflammatory Disease, Chinese Research Hospital Association, Radiology of Infection Sub-branch, et al. Expert consensus on MRI diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis B (version 2023)[J]. Chin J Liver Dis, 2023, 31(10): 1009-1017.
- [6] 刘定, 潘富珍, 杨沈秋, 等. 肝脾肾同治法重塑自噬稳态抗肝纤维化的理论探讨[J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(11): 1521-1525.
- [7] LIU D, PAN F Z, YANG S Q, et al. Theoretical exploration of the liver-spleen-kidney integrated therapy in restoring autophagy homeostasis to combat hepatic fibrosis[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 31(11): 1521-1525.
- [8] 刘定, 曹洪欣, 潘富珍. 从“五脏相关”理论探讨肝纤维化病机变化特点[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(8): 4512-4514.
- [9] LIU D, CAO H X, PAN F Z. Exploring the pathogenesis and characteristics of liver fibrosis from the perspective of the "five viscera correlation" theory[J]. Chin J Tradit Chin Med, 2021, 36(8): 4512-4514.
- [10] 潘富珍, 曹洪欣, 张永生, 等. 清肝健脾活血方通过调控M1/M2型巨噬细胞治疗肝纤维化大鼠的作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(21): 94-102.
- [11] PAN F Z, CAO H X, ZHANG Y S, et al. Analysis of the mechanism of clearing liver invigorating spleen and activating blood circulation formula decoction in treating liver fibrosis rats by regulating M1/M2 macrophages[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(21): 94-102.
- [12] 潘富珍, 刘定, 杨沈秋, 等. 清肝健脾活血方对四氯化碳诱导肝

- 纤维化大鼠氧化应激的影响[J]. 江苏中医药, 2022, 54(4): 66-71.
- PAN F Z, LIU D, YANG S Q, et al. Effects of clearing liver invigorating spleen and activating blood circulation formula decoction on oxidative stress in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis rats[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2022, 54(4): 66-71.
- [10] DUWE L, MUNOZ-GARRIDO P, LEWINSKA M, et al. MicroRNA-27a-3p targets FoxO signalling to induce tumour-like phenotypes in bile duct cells[J]. J Hepatol, 2023, 78(2): 364-375.
- [11] PAN Q, GAO M, KIM D, et al. Hepatocyte FoxO1 deficiency protects from liver fibrosis via reducing inflammation and TGF- β 1-mediated HSC activation[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2024, 17(1): 41-58.
- [12] DELLORUSSO P V, PROVEN M A, CALERO-NIETO F J, et al. Autophagy counters inflammation-driven glycolytic impairment in aging hematopoietic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2024, 31(7): 1020-1037.
- [13] YAN K, DA T T, BIAN Z H, et al. Multi-omics analysis identifies FoxO1 as a regulator of macrophage function through metabolic reprogramming[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(9): 800.
- [14] WANG F, CHEN L, KONG D, et al. Canonical Wnt signaling promotes HSC glycolysis and liver fibrosis through an LDH-A/HIF-1 α transcriptional complex[J]. Hepatology, 2024, 79(3): 606-623.
- [15] GUO X, ZHENG B, WANG J, et al. Exploring the mechanism of action of Chinese medicine in regulating liver fibrosis based on the alteration of glucose metabolic pathways[J]. Phytother Res, 2024, 38(10): 4865-4876.
- [16] XIA Y, WANG Y, XIONG Q, et al. Neutrophil extracellular traps promote MASH fibrosis by metabolic reprogramming of HSC[J]. Hepatology, 2025, 81(3): 947-961.
- [17] KISSELEVA T, GANGULY S, MURAD R, et al. Regulation of hepatic stellate cell phenotypes in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis[J]. Gastroenterology, 2025, 169(5): 797-812.
- [18] ZHANG Q, RAN T, LI S, et al. Catalpol ameliorates liver fibrosis via inhibiting aerobic glycolysis by EphA2/FAK/Src signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 135: 156047.
- [19] KHANAL S, LIU Y, BAMIDELE A O, et al. Glycolysis in hepatic stellate cells coordinates fibrogenic extracellular vesicle release spatially to amplify liver fibrosis[J]. Sci Adv, 2024, 10(26): eadn5228.
- [20] QU H, LIU J, ZHANG D, et al. Glycolysis in chronic liver diseases: Mechanistic insights and therapeutic opportunities[J]. Cells, 2023, 12(15): 1930.
- [21] XIANG L, WANG X, JIAO Q, et al. Selective inhibition of glycolysis in hepatic stellate cells and suppression of liver fibrogenesis with vitamin A-derivative decorated camptothecin micelles[J]. Acta Biomater, 2023, 168: 497-514.
- [22] KLIP A, DE BOCK K, BILAN P J, et al. Transcellular barriers to glucose delivery in the body[J]. Annu Rev Physiol, 2024, 86: 149-173.
- [23] QUALLS-HISTED S J, NIELSEN C P, MACGURN J A. Lysosomal trafficking of the glucose transporter GLUT1 requires sequential regulation by TXNIP and ubiquitin[J]. iScience, 2023, 26(3): 106150.
- [24] ZHOU M Y, CHENG M L, HUANG T, et al. Transforming growth factor beta-1 upregulates glucose transporter 1 and glycolysis through canonical and noncanonical pathways in hepatic stellate cells[J]. World J Gastroenterol, 2021, 27(40): 6908-6926.
- [25] WANG X, WANG Y, BAI B, et al. PKM ζ , a brain-specific PKC ζ isoform, is required for glycolysis and myofibroblastic activation of hepatic stellate cells[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2025, 19(3): 101429.
- [26] FANG J, LUO S, LU Z. HK2: Gatekeeping microglial activity by tuning glucose metabolism and mitochondrial functions[J]. Mol Cell, 2023, 83(6): 829-831.
- [27] RHO H, TERRY A R, CHRONIS C, et al. Hexokinase 2-mediated gene expression via histone lactylation is required for hepatic stellate cell activation and liver fibrosis[J]. Cell Metab, 2023, 35(8): 1406-1423.
- [28] PARK J S, BURCKHARDT C J, LAZCANO R, et al. Mechanical regulation of glycolysis via cytoskeleton architecture[J]. Nature, 2020, 578(7796): 621-626.
- [29] LI F, LIU X, BAI N, et al. Irisin attenuates liver fibrosis by regulating energy metabolism and HMGB1/ β -catenin signaling in hepatic stellate cells[J]. Eur J Pharmacol, 2025, 998: 177519.
- [30] WANG Y, SHU H, QU Y, et al. PKM2 functions as a histidine kinase to phosphorylate PGAM1 and increase glycolysis shunts in cancer[J]. EMBO J, 2024, 43(12): 2368-2396.
- [31] WEI Y, MIAO Q, ZHANG Q, et al. Aerobic glycolysis is the predominant means of glucose metabolism in neuronal somata, which protects against oxidative damage[J]. Nat Neurosci, 2023, 26(12): 2081-2089.
- [32] WANG Y H, ISRAELSEN W J, LEE D, et al. Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis[J]. Cell, 2014, 158(6): 1309-1323.
- [33] WU W H, YANG Y L, WANG T, et al. Ginsenoside compound K restrains hepatic fibrotic response by dual-inhibition of GLS1 and LDHA[J]. Phytomedicine, 2024, 135: 156223.
- [34] 李励, 邓冬杰, 谈相云, 等. 葫芦素B调控糖酵解抑制HuCC-T1细胞增殖的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(16): 74-81.
- LI L, DENG D J, TAN X Y, et al. The mechanism of cucurbitacin B regulating glycolysis inhibition on HuCC-T1 cell proliferation[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(16): 74-81.
- [35] BHARDWAJ G, PENNIMAN C M, KLAUS K, et al. Transcriptomic regulation of muscle mitochondria and calcium signaling by insulin/IGF-1 receptors depends on FoxO transcription factors[J]. Front Physiol, 2022, 4(12): 779121.
- [36] XU K, YIN N, PENG M, et al. Glycolysis fuels phosphoinositide 3-kinase signaling to bolster T cell immunity[J]. Science, 2021, 371(6527): 405-410.

[责任编辑 周冰冰]