

本文引用: 贺映辉, 高元峰, 陈春茗, 柏玉冰, 欧巧玲, 刘红宇, 唐 锋. 基于 LC-MS 非靶向代谢组学技术探讨经典名方化肝煎干预 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(2): 288–296.

基于 LC-MS 非靶向代谢组学技术探讨经典名方化肝煎 干预 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠的作用机制

贺映辉¹, 高元峰¹, 陈春茗¹, 柏玉冰¹, 欧巧玲², 刘红宇^{1*}, 唐 锋^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

[摘要] **目的** 基于非靶向代谢组学技术探讨化肝煎干预四氯化碳(CCl₄)诱导肝纤维化大鼠的作用机制。**方法** 以 48 只适应性喂养 1 周的 SPF 级雄性 SD 大鼠为研究对象, 腹腔注射 40% CCl₄ 橄榄油溶液诱导肝纤维化大鼠模型。将大鼠按照随机数字表法分为正常组、模型组、化肝煎低剂量组(4.25 g/kg)、化肝煎中剂量组(8.50 g/kg)、化肝煎高剂量组(17.0 g/kg)、阳性组(秋水仙碱, 0.2 mg/kg), 每组 8 只。除正常组腹腔注射等体积橄榄油溶液外, 其余各组均腹腔注射 40% CCl₄ 橄榄油溶液, 每周 2 次, 持续 8 周。从第 5 周开始, 各组分别灌胃给予相应药物或生理盐水, 每日 1 次。实验结束后, 麻醉处死大鼠, 采集大鼠血清及肝组织, 检测大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST), 取肝脏组织进行病理学观察。采用高效液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)对大鼠血清进行非靶向代谢组学分析。**结果** 病理学结果显示, 化肝煎中、高剂量组可显著减轻大鼠肝纤维化; 与正常组相比, 模型组大鼠血清中 ALT、AST 的含量显著升高($P<0.05$); 与模型组比较, 化肝煎中、高剂量组 AST、ALT 的含量显著降低($P<0.05$)。代谢组学结果表明, 化肝煎干预后可显著调控磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)、胆酸、去氧胆酸、牛磺胆酸等差异代谢物, 其相关代谢途径涉及甘油磷脂代谢、鞘脂信号通路、鞘脂代谢、亚油酸代谢及胆汁分泌等通路。**结论** 化肝煎可能通过调控甘油磷脂代谢、鞘脂信号通路、鞘脂代谢、亚油酸代谢及胆汁分泌等通路, 并降低血清 ALT、AST 含量, 从而达到改善肝纤维化的作用。

[关键词] 化肝煎; 肝纤维化; LC-MS 技术; 代谢组学; 甘油磷脂代谢; 胆汁分泌

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.02.009

Mechanism of action of the classical formula Huagan Decoction in intervening CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats based on LC-MS non-targeted metabolomics

HE Yinghui¹, GAO Yuanfeng¹, CHEN Chunming¹, BAI Yubing¹, OU Qiaoling², LIU Hongyu^{1*}, TANG Feng^{1*}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of action of Huagan Decoction in intervening carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis (HF) in rats based on non-targeted metabolomics. **Methods** Totally 48 SPF-grade male SD rats were

[收稿日期] 2025-08-28

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174069, 82474180); 湖南省自然科学基金医卫联合项目(2025JJ80962, 2025JJ80943); 湖南省卫生健康委科研计划项目(B202319018491, D202302048806, 20256149); 湖南省“十四五”中医药学科带头人培养项目(湘中医药[2024]3号); 国家中医优势专科建设项目(国中医药医政函[2024]90号)。

[通信作者] * 唐 锋, 男, 硕士, 主管药师, E-mail: tangfeng@hnu.edu.cn; 刘红宇, 女, 博士, 主任药师, 博士研究生导师, E-mail: lhy9544@163.com。

assigned into 6 groups ($n=8$ per group) using a random number table: normal group, model group, low-(4.25 g/kg), medium-(8.50 g/kg), and high-dose Huagan Decoction groups (17.0 g/kg), and positive group (colchicine, 0.2 mg/kg). Except for the normal group, which received an equal volume of olive oil solution intraperitoneally, all other groups were injected intraperitoneally with 40% CCl₄-olive oil solution twice a week for 8 consecutive weeks. From the fifth week onward, each group was given the corresponding drug intervention or saline at the set dose by gavage once daily. At the end of the experiment, the rats were anesthetized and euthanized, whose serum and liver tissue were collected to determine the serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) and the pathological changes were observed. Non-targeted metabolomic analysis of rat serum was performed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Results** Pathological findings showed that medium- and high-dose Huagan Decoction groups significantly alleviated HF in rats. Compared with the normal group, serum ALT and AST levels in the model group were significantly higher ($P<0.05$); Compared with the model group, AST and ALT activities medium- and high-dose Huagan Decoction groups were significantly reduced ($P<0.05$). Metabolomics results indicated that Huagan Decoction intervention significantly regulated differential metabolites such as phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), cholic acid, deoxycholic acid, and taurocholic acid. The related metabolic pathways involved glycerophospholipid metabolism, sphingolipid signaling, sphingolipid metabolism, linoleic acid metabolism, bile secretion, and so on. **Conclusion** Huagan Decoction can alleviate HF, which may be achieved by regulating pathways such as glycerophospholipid metabolism, sphingolipid signaling, sphingolipid metabolism, linoleic acid metabolism, and bile secretion, as well as by reducing serum levels of ALT and AST.

[**Keywords**] Huagan Decoction; hepatic fibrosis; LC-MS technology; metabolomics; glycerophospholipid metabolism; bile secretion

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是一种以慢性炎症和损伤为主要诱因的进行性瘢痕形成过程,其发生发展与病毒性肝炎、酒精性肝病、代谢相关脂肪性肝病、药物性肝损伤以及自身免疫性肝病等密切相关^[1]。HF以细胞外基质成分的过度积累为特征,可能进一步发展为肝硬化、肝衰竭和肝细胞癌,严重威胁人类健康且造成了巨大的社会经济负担^[2-3]。研究表明, HF及早期肝硬化是可以逆转的,中药复方在逆转 HF和早期肝硬化方面展现出确切的临床疗效^[4-6]。化肝煎源自明代医家张景岳所著《景岳全书·新方八阵·寒阵》,由青皮、陈皮、白芍、牡丹皮、炒栀子、泽泻和浙贝母7味中药组成,该方具有疏肝理气、解郁降火之功效。临床研究表明,化肝煎对慢性肝炎、非酒精性脂肪性肝病等疾病疗效显著^[7-9]。近年研究发现,化肝煎可通过调控磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶(protein kinase B, Akt)/核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)信号通路,增强谷胱甘肽合成,从而显著减轻胆汁淤积性肝损伤^[10]。本课题组前期研究^[11-14]发现,化肝煎含药血清不仅具有保护肝细胞的作用,还能抑制活化肝星状细胞 HSC-T6 的增殖,显著下调转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、

有丝分裂原活化蛋白激酶 1(mitogen activated protein kinase, MAPK1)mRNA 的表达水平,同时对真核翻译起始因子 3 亚基 a(eukaryotic translation initiation factor 3 Subunit A, eIF3a)mRNA 及蛋白表达也表现出显著的抑制作用。化肝煎对 CCl₄ 诱导的 HF 大鼠有一定的改善作用,其机制可能与调节大鼠肠道菌群结构多样性与丰度有关。然而,化肝煎改善 HF 的机制仍不明确。

代谢组学技术能够揭示病理状态下的特征性生物标志物和关键代谢途径,全面反映疾病发生发展过程中的代谢网络紊乱,为从整体角度评估药物疗效和阐明疾病复杂机制提供了研究思路和技术手段。目前,代谢组学技术已广泛应用于中药药效评价、活性成分筛选及作用机制研究等领域^[15-17]。基于此,本研究采用高效液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)对 HF 大鼠血清进行非靶向代谢组学分析,筛选差异代谢物并解析相关代谢途径,旨在从代谢组学层面初步阐明化肝煎抗 HF 的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量为(200±20) g, 6~8 周龄,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。

实验动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心,维持昼夜明暗交替各12小时的光照周期,相对湿度控制在 $45\% \pm 10\%$,温度保持在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 范围内,实验动物可自由摄取标准饲料和灭菌饮用水。所有大鼠在实验前进行为期1周的适应性饲养。本动物实验方案经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会审查批准(批准号:ZYFY20220615-19)。

1.2 药物及试剂

实验所用化肝煎组方药材包括青皮、陈皮、白芍、牡丹皮、炒栀子、泽泻、浙贝母均购自湖南中医药大学第一附属医院药学部,并经中药鉴定学专家张志国教授鉴定为正品。秋水仙碱片(广东彼迪药业有限公司,批号:20230302); CCl_4 (上海麦克林生化科技有限公司,批号:C12773729);丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(南京建成科技有限公司,批号:C010-2-1、C009-2-1)。

1.3 主要仪器

KD-TS3S1型组织脱水机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);Histo Core Arcadia型全自动组织包埋机(德国Leica公司);HistoCore BIOCUT型切片机(德国Leica公司);HI1210型摊片机(德国Leica公司);HGZF-101-1型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司);BX43型显微镜(日本Olympus公司);ExionLC AD System型液相色谱系统(AB SCIEX公司);AB SCIEX-Triple TOF 5600+型质谱仪(美国AB SCIEX公司);ACQUITY UPLC HSS T3型色谱柱(美国Waters公司);Centrifuge 5424 R型冷冻离心机(德国Eppendorf公司);XDC-20型氮气吹扫仪(上海净信实业发展有限公司);MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

2 方法

2.1 化肝煎药液的制备

化肝煎药液制备方法参照前期方法^[11],浓缩至适宜浓度药液真空封口包装,置 4°C 冰箱备用,灌胃前用温水复温。

2.2 造模及给药方法

将48只SD大鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法分为6组:正常组、模型组、化肝煎低剂量组、化肝煎中剂量组、化肝煎高剂量组以及阳性组

(秋水仙碱),每组8只。除正常组腹腔注射等体积橄榄油溶液外,其余各组均以 2 mL/kg 剂量腹腔注射 $40\% \text{ CCl}_4$ 橄榄油溶液(V/V),每周2次,连续8周建立HF模型^[12]。从第5周开始,化肝煎低剂量组、化肝煎中剂量组、化肝煎高剂量组分别灌胃给予4.25、8.50、17.00 g/kg化肝煎药液(其中4.25 g/kg为临床等效剂量);阳性组给予 0.2 mg/kg 秋水仙碱溶液;正常组和模型组灌胃等体积生理盐水。所有干预组每日1次,持续至第8周末实验结束。

2.3 样本收集及肝脏组织病理学观察

在末次给药结束后,所有大鼠禁食12 h(自由饮水),随后经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉。无菌条件下经腹主动脉采集全血样本,立即置于 4°C 预冷的离心管中,在 $3\ 000\text{ r/min}$ 条件下离心15 min(离心半径8.5 cm),小心吸取上清液,分装后于 -80°C 保存备用。同时,迅速摘取肝脏组织,用预冷的生理盐水冲洗后,取部分肝组织置于 4% 多聚甲醛固定液中固定24 h,经切片、脱蜡、水化后进行Masson染色,于光学显微镜下观察肝组织病理学改变并采集图像。

2.4 血液生化指标(AST、ALT)检测

按照ELISA试剂盒说明书对血清中的AST、ALT含量进行检测,测定吸光度值,计算浓度。

2.5 代谢组学分析

2.5.1 血清样品制备 精确量取 $100\ \mu\text{L}$ 样品置于 1.5 mL 离心管中,加入 $300\ \mu\text{L}$ 甲醇-乙腈混合溶液(甲醇:乙腈=1:1,含 0.02 mg/mL L-2-氯苯丙氨酸等)。将混合液涡旋振荡30 s,随后在 5°C 条件下进行超声萃取30 min(超声频率 40 kHz)。萃取完成后,将样品置于 -20°C 静置30 min,然后在 4°C 条件下以 $13\ 000\times g$ 离心15 min。小心吸取上清液转移至新的离心管中,采用氮吹仪浓缩至干。加入 $100\ \mu\text{L}$ 复溶液(乙腈:水=1:1)进行复溶,涡旋振荡30 s后,于 5°C 下超声处理5 min(超声频率 40 kHz)。最后,在 4°C 条件下,以 $13\ 000\times g$ 离心,取上清液用于检测。

2.5.2 色谱和质谱条件 采用AB SCIEX公司的超高效液相色谱-三重四极杆飞行时间质谱联用系统(UHPLC-Triple TOF)进行分析。色谱分离在ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱($100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}, 1.8\ \mu\text{m}$)上进行,柱温维持在 40°C 。流动相A为 95% 水+ 5% 乙腈(含 0.1% 甲酸),流动相B为 47.5% 乙腈+ 47.5% 异丙醇+ 5% 水(含 0.1% 甲酸),流速设定为 0.40 mL/min ,

进样量为 10 μL 。质谱分析采用电喷雾电离源,分别在正、负离子模式下进行数据采集,质量扫描范围设定为 50~1 000 m/z 。离子源参数优化如下:正离子模式喷雾电压为 5 000 V,负离子模式为-4 000 V;离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$;辅助气压力 50 psi;气帘气压 30 psi。采用数据依赖性采集模式进行 MS/MS 分析,碰撞能量设置为(40 \pm 20) eV,循环时间为 510 ms。为确保数据质量,在正式样品分析前使用标准品进行系统校准和质量精度校正。

2.5.3 代谢物鉴定与差异分析 采用代谢组学分析软件 Progenesis Q1(Waters Corporation, Milford, USA)对原始数据进行系统化预处理。预处理流程包括:基线校正、色谱峰识别、峰面积积分、保留时间校正以及峰对齐等关键步骤。经过上述处理后,获得包含代谢物保留时间、质荷比(m/z)和峰强度等信息的标准化数据矩阵。随后,利用软件内置的代谢物鉴定功能,将一级质谱(MS)和二级质谱(MS/MS)数据与 HMDB、Metlin 等代谢物数据库进行匹配,实现特征峰的精准鉴定。随后,将预处理后的数据矩阵上传至 Majorbio 云平台进行归一化处理,获得标准化数据矩阵。基于归一化后的数据,采用 R 软件(版本 3.6.1)中的 ropls 包(版本 1.6.2)进行正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),以筛选具有显著差异的代谢物。采用 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 作为差异代谢物筛选标准,并进行了 FDR 校正以控制假阳性。将筛选得到

的差异代谢物与 KEGG 数据库进行比对,完成代谢物的通路注释。最后,利用 Python 软件(版本 3.7)进行 KEGG 通路富集分析,以识别显著富集的代谢通路($P<0.05$),从而系统揭示潜在的代谢调控网络。

2.6 统计学分析

数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析,计量资料结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示;多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝脏组织病理学变化

Masson 染色结果显示,正常组肝小叶结构清晰,汇管区、中央静脉结构完整,肝细胞排列规整。模型组肝脏结构明显紊乱,肝细胞呈现排列紊乱、水肿及空泡变性;汇管区与中央静脉间可见大量蓝色胶原纤维沉积,形成连续的纤维间隔。阳性组肝脏结构有所恢复,肝细胞排列较模型组整齐,但仍有局灶性紊乱;胶原纤维较模型组明显减少,但仍可见较粗纤维间隔。化肝煎低剂量组肝细胞排列轻度紊乱,胶原纤维沉积较模型组减少,纤维间隔仍可见,尚未完全消散。化肝煎中剂量组胶原纤维沉积进一步减少,主要为汇管区轻度增生,纤维间隔变细、减少。化肝煎高剂量组胶原纤维沉积显著减少,仅在血管壁和汇管区有少量蓝色染色,无明确纤维间隔形成。详见图1。

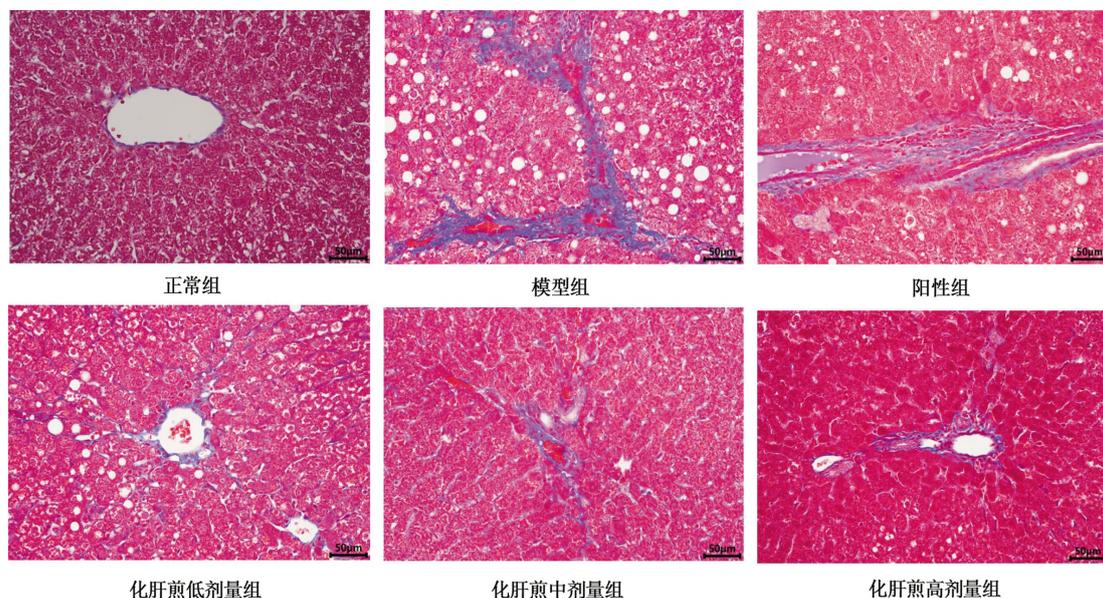


图1 各组大鼠肝脏组织病理学形态(Masson, $\times 50$)

Fig.1 Pathological morphology of liver tissues in groups of rats (Masson staining, $\times 50$)

基于化肝煎中剂量组显示出较好的干预效果,在后续的代谢组学研究中选择中剂量组的血清样本进行分析。

3.2 化肝煎对肝纤维化大鼠血清 AST、ALT 含量的影响

与正常组相比,模型组大鼠血清中肝功能指标 ALT、AST 的含量显著升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性组和化肝煎中、高剂量组 AST、ALT 的活力显著降低($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠血清 AST、ALT 含量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of AST and ALT levels in serum of rats among groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)
正常组	122.28±11.95	39.37±5.22
模型组	231.26±41.56*	120.17±32.33*
阳性组	143.17±11.43 [#]	75.18±8.46 [#]
化肝煎低剂量组	192.06±23.76	112.17±14.84
化肝煎中剂量组	175.57±11.39 [#]	92.12±17.22 [#]
化肝煎高剂量组	160.34±27.52 [#]	83.75±12.98 [#]

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$ 。

3.3 代谢组学分析

3.3.1 代谢轮廓分析 采用 OPLS-DA 对正、负离

子模式下的质谱数据进行分析。结果表明,在正、负离子模式下,正常组和模型组之间的组间离散度明显增加,说明造模后大鼠血清代谢物发生了明显变化;对模型组与化肝煎组进行对比分析(图 2D、图 3D),结果显示两组样本在 OPLS-DA 得分图上呈现良好的分离状态,表明所建模型具有较高的区分效能,适用于后续差异代谢物的筛选与分析。通过 200 次随机排列的置换检验,置换后的模型 Q^2 回归线斜率较大且与纵坐标负半轴相交(R^2 接近 1,置换后 Q^2 截距 <0),再次证实原模型不存在过拟合问题,确保了分析结果的可靠性,详见图 2、图 3。

在正离子模式下,火山图结果显示,与正常组相比,模型组中共筛选出 102 个差异代谢物,其中 58 个表达上调、44 个下调。相比之下,经化肝煎干预后,与模型组比较,其组间差异代谢物数量增至 212 个,其中 158 个代谢物表达上调、54 个下调(图 2C、2F)。在负离子模式下,模型组与正常组间存在 175 个差异代谢物,包括 57 个上调、118 个下调。而经化肝煎干预后,与模型组相比,差异代谢物进一步增至 339 个,其中 122 个上调、217 个下调(图 3C、3F)。

3.3.2 差异代谢物的分类富集分析 通过对化肝煎

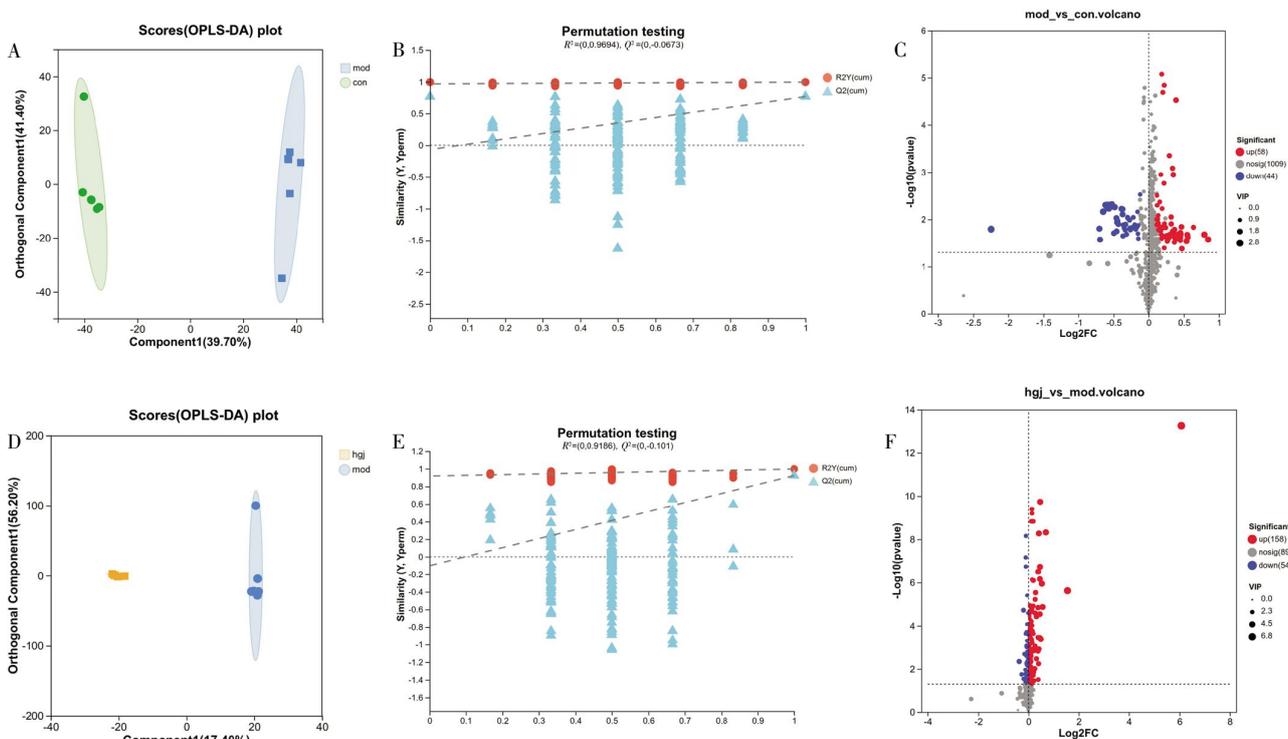


图 2 正离子模式下血清代谢物的 OPLS-DA、置换检验和火山图($n=6$)

Fig.2 OPLS-DA, permutation test, and volcano plot of serum metabolites in positive ion mode ($n=6$)

注:con.正常组;mod.模型组;hgj.化肝煎组。A.正常组 vs 模型组的 OPLS-DA 图;B.正常组 vs 模型组的置换检验图;C.正常组 vs 模型组的差异火山图;D.化肝煎 vs 模型组的 OPLS-DA 图;E.化肝煎 vs 模型组的置换检验图;F.化肝煎 vs 模型组的差异火山图。

组与模型组之间的差异代谢物进行系统性分类富集分析,结果显示两组间的代谢物主要可分为10大类(图4)。其中,脂类及类脂类物质(lipids and lipid-like molecules, Lipids)占比最高,达35.76%;其次为有机酸及其衍生物(organic acids and derivatives, OAD),占比16.63%。这一分布特征提示,化肝煎改善HF的作用机制可能与调控脂类代谢和有机酸代谢密切相关。详见图4、表2。

3.3.3 差异代谢物的代谢通路富集分析 对化肝煎组与模型组之间差异代谢物进行KEGG通路富集分析,并采用气泡图直观展示代谢通路的富集结果(图5)。结果显示,化肝煎组与模型组之间的差异代谢物显著富集于多个关键代谢通路,包括甘油磷脂代谢、鞘脂信号通路、鞘脂代谢、亚油酸代谢以及胆汁分泌等。结果表明,化肝煎可能通过调节脂质代谢和胆汁分泌过程发挥改善HF的作用。详见图5。

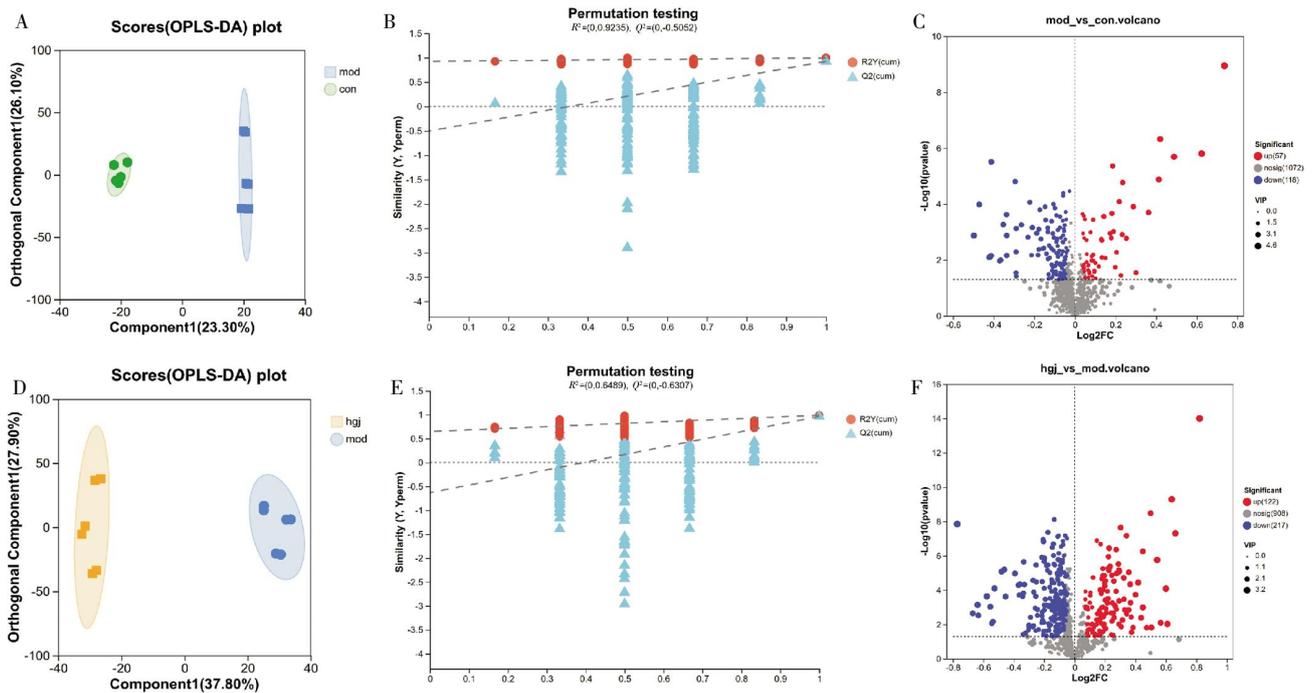


图3 负离子模式下血清代谢物的OPLS-DA、置换检验和火山图(n=6)

Fig.3 OPLS-DA, permutation test, and volcano plot of serum metabolites in negative ion mode (n=6)

注:con.正常组;mod.模型组;hgi.化肝煎组。A.正常组 vs 模型组的OPLS-DA图;B.正常组 vs 模型组的置换检验图;C.正常组 vs 模型组的差异火山图;D.化肝煎 vs 模型组的OPLS-DA图;E.化肝煎 vs 模型组的置换检验图;F.化肝煎 vs 模型组的差异火山图。

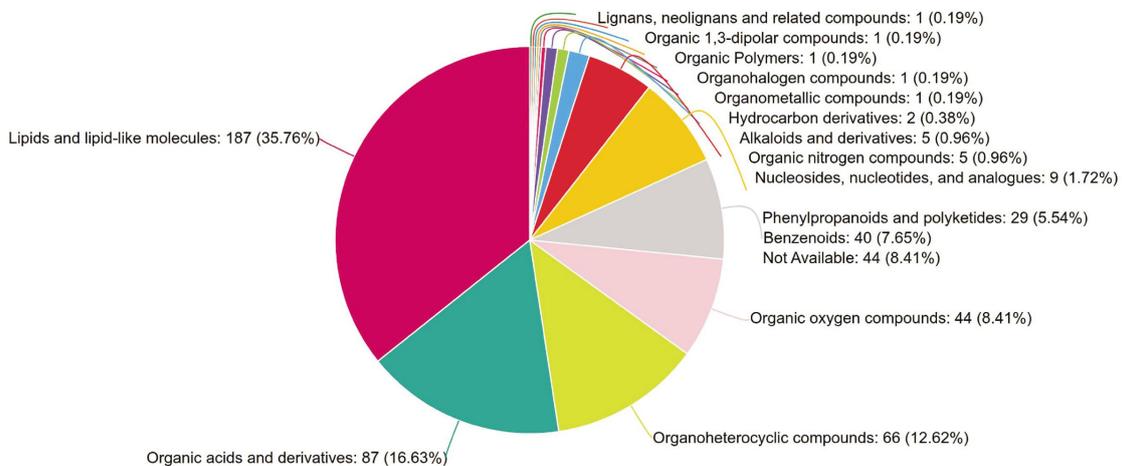


图4 化肝煎组与模型组之间差异代谢物的分类富集分析

Fig.4 Classification and enrichment analysis of differential metabolites between Huagan Decoction group and model group

表 2 化肝煎组与模型组之间主要差异代谢物的变化趋势

Table 2 Variation trend of major differential metabolites between Huagan Decoction group and model group

序号	代谢物	变化趋势
1	cholic acid(胆酸)	下调
2	PC(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	下调
3	deoxycholic acid(去氧胆酸)	下调
4	ursodeoxycholic acid(熊去氧胆酸)	上调
5	PC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/16:0)	下调
6	sphingosine 1-phosphate(1-磷酸鞘氨醇)	上调
7	taurocholic acid(牛磺胆酸)	下调
8	PS(18:1(11Z)/18:0)	下调
9	PE(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/20:0)	下调
10	alpha-Linolenoyl ethanolamide(α -亚油酸乙醇酰胺)	下调
11	malonic acid(丙二酸)	下调
12	eicosapentaenoic acid(二十碳五烯酸)	下调
13	terephthalic acid(对苯二甲酸)	下调
14	lysoPC(14:0/0:0)	上调

4 讨论

近数十年的临床研究和实践表明, 中医药在 HF 防治方面展现出独特的疗效优势和广阔的应用前景^[19-21]。HF 可归属于中医学“胁痛”“黄疸”“积聚”等病证范畴。其基本病机可概括为“虚损生积”, 核心证型表现为气阴虚损、瘀血阻络^[22]。随着中医药防治 HF 研究的不断深入, 开展化肝煎改善 HF 的作用机制研究具有重要意义。

本研究采用腹腔注射 CCl₄ 的方法构建 HF 大鼠模型, 其原理是肝细胞在 CCl₄ 损伤下生成三氯甲基自由基和氯自由基, 引发肝细胞膜脂质过氧化反应, 导致肝细胞损伤和炎症因子大量释放, 最终激活肝星状细胞并促进细胞外基质过度沉积, 形成肝纤维化^[23-24]。Masson 染色结果显示, 模型组大鼠肝组织可见大量蓝色胶原纤维沉积。化肝煎干预组大鼠肝组织胶原纤维沉积明显减少, 化肝煎中、高剂量组 AST、ALT 的含量明显降低, 提示化肝煎对 CCl₄ 诱导的 HF 具有显著的改善作用。代谢组学结果表明, 化肝煎组与模型组之间的差异代谢物显著富集于甘油磷脂代谢、鞘脂信号通路、鞘脂代谢、亚油酸代谢以及胆汁分泌等关键代谢通路。前期研究证实, CCl₄ 诱导的 HF 可导致肝脏代谢稳态失衡, 其中以甘油磷脂和鞘脂代谢紊乱尤为显著^[25]。这种代谢紊乱会引发脂质过载和脂毒性, 破坏细胞膜完整性, 加剧肝细胞损伤^[26]。脂质不仅是构成细胞膜结构和能量储存的基本单元, 还在细胞信号转导、代谢稳态调控以及炎症免疫反应中发挥重要作用^[27]。在众多脂质中, 甘油磷脂在 HF 进程中扮演关键角色^[28]。作为机体主要的代谢器官, 肝脏极易受到甘油磷脂代谢紊乱的影响, 这种紊乱可直接导致脂肪性肝炎和代谢综合征的发生, 从而增加 HF 的发展风险^[29]。进一步分析发现, 化肝煎调节甘油磷脂代谢的关键靶点包括磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)和磷脂酰丝氨酸

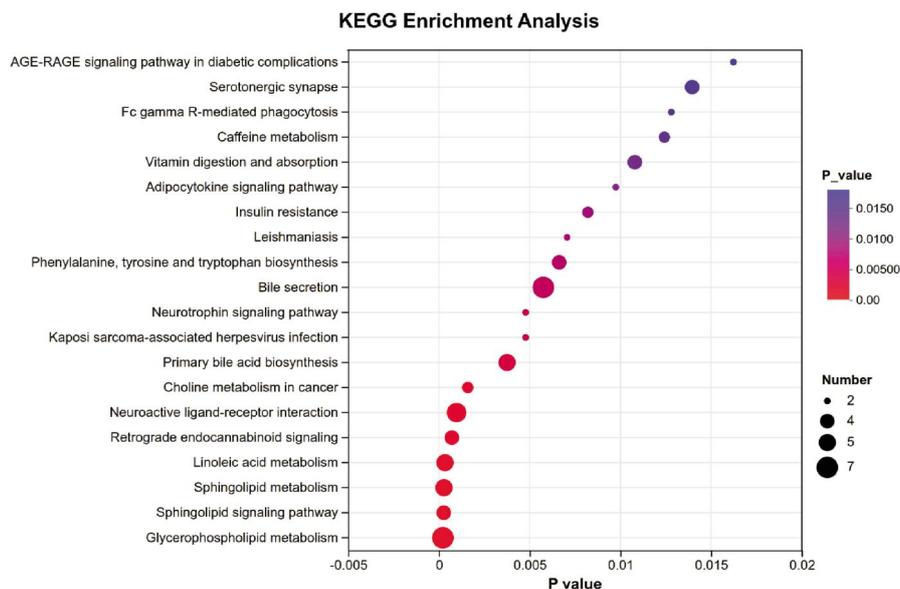


图 5 化肝煎组与模型组之间差异代谢物的 KEGG 通路气泡图

Fig.5 Bubble chart of KEGG pathways for differential metabolites between Huagan Decoction group and model group

(phosphatidylserine, PS)。PC 和 PE 是构成细胞膜特征性双层结构的关键磷脂成分^[30]。在 HF 过程中, CCl₄ 可通过诱导氧化应激与炎症反应, 触发脂质过氧化, 进而损伤细胞膜及细胞器膜, 引起 PC 和 PE 的异常蓄积, 造成甘油磷脂代谢紊乱, 最终破坏细胞膜结构的完整性^[31]。另有研究证实, 化肝煎中栀子的活性成分栀子苷可通过抑制氧化应激、减轻肝脏炎症反应和细胞凋亡, 并调节甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢等途径, 对肝纤维化发挥改善作用^[32]。化肝煎可能通过调控 PC、PE 和 PS 的水平, 影响甘油磷脂代谢, 这可能是其发挥抗 HF 作用的潜在机制之一。

鞘脂作为细胞膜结构的重要组成部分, 在维持膜屏障功能、调控细胞周期、调节自噬等生物学过程中发挥着关键作用^[33]。近年研究表明, 鞘脂信号通路和鞘脂代谢在 HF 进程中具有重要调控作用^[31]。鞘脂代谢紊乱可能与炎症反应加剧和神经酰胺水平升高密切相关。神经酰胺与鞘磷脂、游离鞘氨醇及其磷酸盐以及复杂的糖鞘脂共同构成了鞘脂类物质家族, 这些物质在多种疾病的发生发展中扮演重要角色, 特别是在组织纤维化过程中具有显著影响^[34]。在 HF 进程中, 鞘脂代谢失调会导致鞘氨醇和鞘磷脂水平发生显著改变^[30]。其中, 1-磷酸鞘氨醇等代谢物可能作为潜在的生物标志物, 为 HF 的早期非侵入性诊断提供新的思路^[35]。此外, 肝脏疾病的发生发展与胆汁酸合成和代谢紊乱密切相关^[36]。有研究证实, 化肝煎中芍药的活性成分芍药苷能够调节胆汁酸池组成, 降低毒性胆汁酸含量, 上调法尼醇 X 受体和胆酸盐外排泵活性, 恢复胆汁酸池稳态^[37]。本研究发现, 经化肝煎干预后, 与胆汁酸代谢相关的物质(如胆酸、去氧胆酸、牛磺胆酸等)含量显著降低。化肝煎的抗 HF 作用可能部分源于其对胆汁酸合成和代谢的调节作用。肝脏是脂质与胆汁酸代谢的核心器官。中医“肝主疏泄”的功能, 部分涵盖了调节脂质代谢、促进胆汁排泄以助消化的生理过程。本研究发现化肝煎能改善肝纤维化大鼠的脂代谢紊乱和胆汁酸稳态, 正是其恢复“肝主疏泄”功能、体现“疏肝解郁”功效的现代生物学内涵。

综上所述, 本研究通过非靶向代谢组学分析发现化肝煎改善 HF 涉及甘油磷脂代谢、鞘脂信号通路、鞘脂代谢以及胆汁分泌等多个代谢途径。然而, CCl₄ 诱导的大鼠 HF 模型通过重复急性肝损伤模拟 HF 发展过程, 具有病因单一、病程可控的特点; 而

临床 HF 通常由多种慢性病因(如病毒感染、酒精摄入、代谢异常等)长期共同作用所致, 病理机制更为复杂, 个体异质性显著, 且常需结合病因治疗与长期综合管理。因此, 基于动物实验的结果在向临床转化过程中仍具有一定局限性。本研究聚焦于化肝煎的代谢调控机制, 因此优先选用机制清晰、表型明确的 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化模型。后续研究拟结合病证结合模型(如慢性束缚应激+CCl₄)进一步验证“肝郁”特异性; 采用分子生物学方法对预测的相关通路进行验证, 结合靶向脂质组学与靶向胆汁酸代谢组学技术, 对关键代谢物进行定量分析, 从而系统阐明化肝煎改善 HF 的作用机制, 以推动研究成果更好地向临床转化。

参考文献

- [1] ZHAO L T, TANG H L, CHENG Z J. Pharmacotherapy of liver fibrosis and hepatitis: Recent advances[J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(12): 1724.
- [2] HUANG D Q, MATHURIN P, CORTEZ-PINTO H, et al. Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: Trends, projections and risk factors[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2023, 20(1): 37-49.
- [3] VERMA H K, PRASAD K, KUMAR P, et al. Viral hepatitis: A global burden needs future directions for the management[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2022, 28(16): 1718-1721.
- [4] 张 鹏, 郑世豪, 苟思媛, 等. 中药复方逆转肝纤维化及早期肝硬化的作用机制[J]. *临床肝病杂志*, 2024, 40(9): 1873-1879.
- [5] 中华中医药学会肝胆病学分会. 鳖甲煎丸治疗肝纤维化临床应用专家共识[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2020, 30(6): 577-578, 584.
- [6] 中华中医药学会肝胆病分会. 肝爽颗粒治疗肝纤维化临床应用专家共识[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2020, 30(5): 481-482.
- [7] 李 点. 基于“木郁达之”探讨化肝煎之临证运用[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(4): 842-845.
- [8] 郑黎明, 郑嘉文, 裘 璟. 郑玉麒运用化肝煎治疗肝病的经验[J]. *浙江中医杂志*, 2021, 56(10): 760.
- [9] 杨海菊, 黄嘉怡, 杨艳玲, 等. 经典方化肝煎的古今文献研究[J]. *中国现代中药*, 2022, 24(5): 897-904.
- [10] DONG Q, CHEN J, JIANG Y P, et al. Integrating network analysis and metabolomics to reveal mechanism of Huaganjian decoction in treatment of cholestatic hepatic injury[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 12: 773957.
- [11] 高元峰, 肖望重, 肖 岚, 等. 化肝煎对 HSC-T6 细胞 TGF- β 1、CTGF 及 MAPK1 表达的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(7): 185-188.
- [12] 高元峰, 肖望重, 肖 岚, 等. 化肝煎对肝细胞和活化肝星状细胞功能的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(12): 2879-2881.

- [13] 唐 锋, 黎 旭, 任香怡, 等. 基于网络药理学探讨化肝煎抗肝纤维化的物质基础及作用机制研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(1): 238-242.
- [14] 唐 锋, 欧阳林旗, 高元峰, 等. 基于 16S rDNA 研究化肝煎对 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠肠道菌群的影响[J]. 时珍国医国药, 2025, 36(17): 3201-3207.
- [15] 张文静, 尚子慧, 孙孝亚, 等. 基于代谢组学和网络药理学探究山茱萸多糖改善 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病的作用机制[J]. 中草药, 2025, 56(15): 5463-5475.
- [16] 温梦昕, 李思媛, 刘颖芳, 等. 基于液质及代谢组学方法分析补阳还五汤灌胃大鼠前后血脑中成分差异[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(2): 250-258.
- [17] GUO X Q, ZHANG C, LI Y Y, et al. Metabolomics analysis of anaphylactoid reactions induced by Xueshuantong injection in normal and immunocompromised mice[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2025, 15: 1526875.
- [18] 吴 娟, 刘苏杰, 陈平平, 等. 黄芩苷通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路减轻大鼠肝纤维化的作用[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(3): 549-553.
- [19] 赵 蕊, 牛 群, 董海舰, 等. 中药调控细胞死亡治疗肝纤维化的研究进展[J]. 中草药, 2025, 56(3): 1016-1027.
- [20] 靳福星, 张 伟, 王婧雯, 等. 中药干预肝纤维化研究的文献计量学分析: 现状、热点与展望[J]. 中草药, 2025, 56(16): 5906-5924.
- [21] 郭晓玲, 贾战生, 张 静. 中药逆转肝纤维化的分子机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(1): 170-175.
- [22] 中国中西医结合学会肝胆病与专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019 年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(7): 1444-1449.
- [23] 苏子衡, 张露蓉, 潘韵芝, 等. 腹腔和皮下注射 CCl₄ 致大鼠肝纤维化 2 种造模方法的比较及自愈性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(5): 501-507.
- [24] 陈秀梅, 王英杰, 赵成周, 等. 三味甘露对大鼠肝纤维化的改善作用及机制[J]. 中国药房, 2024, 35(6): 707-711.
- [25] MERCADO-GOMEZ M, LOPITZ-OTSOA F, AZKARGORTA M, et al. Multi-omics integration highlights the role of ubiquitination in CCl₄-induced liver fibrosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(23): 9043.
- [26] SONG Q, ZHAO Z, LIU H, et al. Pseudotargeted lipidomics analysis of scoparone on glycerophospholipid metabolism in non-alcoholic steatohepatitis mice by LC-MRM-MS[J]. *PeerJ*, 2024, 12: e17380.
- [27] BUECHLER C, ASLANDIS C. Role of lipids in pathophysiology, diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(5): 158658.
- [28] LI Y, LI C Y, XIONG Y H, et al. Didymin ameliorates liver fibrosis by alleviating endoplasmic reticulum stress and glycerophospholipid metabolism: Based on transcriptomics and metabolomics[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2022, 16: 1713-1729.
- [29] WANG S S, TANG K, LU Y J, et al. Revealing the role of glycerophospholipid metabolism in asthma through plasma lipidomics[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2021, 513: 34-42.
- [30] CHANG H, MENG H Y, LIU S M, et al. Identification of key metabolic changes during liver fibrosis progression in rats using a urine and serum metabolomics approach[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11433.
- [31] MAO Y P, XIE Z H, ZHANG X X, et al. Ergothioneine ameliorates liver fibrosis by inhibiting glycerophospholipids metabolism and TGF- β /smads signaling pathway: Based on metabolomics and network pharmacology[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2025, 45(3): 514-530.
- [32] YANG L, BI L P, JIN L L, et al. Geniposide ameliorates liver fibrosis through reducing oxidative stress and inflammatory response, inhibiting apoptosis and modulating overall metabolism[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 772635.
- [33] MU H, HU J L, LIN Z K, et al. Integration of network pharmacology, metabolomics and lipidomics for clarifying the role of sphingolipid metabolism in the treatment of liver cancer by regorafenib[J]. *Life Sciences*, 2024, 358: 123165.
- [34] SHEA B S, TAGER A M. Sphingolipid regulation of tissue fibrosis[J]. *The Open Rheumatology Journal*, 2012, 6: 123-129.
- [35] ROHRBACH T, MACEYKA M, SPIEGEL S. Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate in liver pathobiology[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 52(5): 543-553.
- [36] 刘长发, 袁星星, 王炳予, 等. 小鼠肝纤维化模型中胆汁酸研究[J]. 黑龙江中医药, 2024, 53(2): 137-139.
- [37] 邓昕雨, 吴和霏, 李煜兵, 等. 基于胆汁酸代谢组学探讨芍药苷改善 α -萘异硫氰酸酯诱导胆汁淤积的作用机制[J]. 中草药, 2024, 55(1): 148-158.

(本文编辑 苏 维)