

整合成分分析和代谢组学线纹香茶菜醇提物的抗肝纤维化作用及机制研究

陈奎奎^{1,2}, 郭忠会^{1,2}, 李耀华³, 郭家成¹, 罗鑫¹, 蒋锐澧¹, 樊力华¹, 张文涛^{3*}, 梁洁^{1,2*}

1. 广西中医药大学 药学院, 广西 南宁 530200

2. 广西中医药大学 广西壮瑶药重点实验室, 广西 南宁 530200

3. 广西中医药大学 教学实验实训中心, 广西 南宁 530200

摘要: **目的** 探讨线纹香茶菜醇提物 (ILEE) 对 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化的作用及其机制。**方法** 建立超高效液相色谱四级杆飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 结合 UNIFI 平台的分析方法, 表征 ILEE 的化学成分。将昆明小鼠随机分为对照组、模型组、秋水仙碱 (阳性药, 0.20 mg·kg⁻¹) 和 ILEE 高、中、低剂量 (16.28、8.14、4.07 g·kg⁻¹) 组, 每组 12 只。除了对照组外, 所有小鼠均 ip 10% CCl₄ 橄榄油溶液, 剂量为 4 mL·kg⁻¹, 3 d 1 次, 连续 6 周, 建立肝纤维化模型。从模型建立的第 1 天起, 同时 ig 给药, 对照组和模型组小鼠 ig 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液 (20 mL·kg⁻¹), 其余各组小鼠 ig 对应的药物, 每天 1 次, 连续 6 周。试剂盒法检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、III 型前胶原 (PC-III)、IV 型胶原 (COL-IV)、层黏蛋白 (LN) 和透明质酸 (HA) 水平; 观察肝组织病理形态学变化。采用 UPLC-MS/MS 技术检测对照组、模型组和 ILEE 高剂量组小鼠肝脏代谢物的变化, 并进行差异代谢物筛选。采用网络药理学对化学成分和差异代谢物进行整合分析。**结果** 共鉴定了 24 个化学成分; 与模型组相比, ILEE 高、中剂量显著降低了血清中 ALT、AST、PC-III、COL-IV、LN 和 HA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 病理切片显示, ILEE 各剂量均减轻了肝细胞肿大、炎症细胞浸润和纤维化程度。代谢组学分析表明, ILEE 高剂量对肝纤维化小鼠肝脏中 13 种差异代谢物具有显著回调作用。整合分析显示异泽兰黄素、迷迭香酸、丹酚酸 B、laxiflorin B 等 9 个成分可能作用于胸苷酸合成酶 (TYMS)、酪氨酸酶 (TYR)、醛酮还原酶家族 1 成员 A1 (AKR1A1) 等 17 个靶点, 影响酪氨酸代谢、糖酵解/糖异生和叶酸的一碳代谢通路, 调节肝纤维化小鼠肝脏中维生素 B₉、甲状腺素、邻羟基苯乙酸和 2-磷酸-D-甘油酸的水平。**结论** ILEE 对 CCl₄ 所致小鼠肝纤维化具有良好的防治作用, 其机制可能与酪氨酸代谢、糖酵解/糖异生和叶酸的一碳代谢通路等途径有关。

关键词: 线纹香茶菜醇提物; 肝纤维化; 成分分析; 代谢组学; 异泽兰黄素; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 酪氨酸代谢; 糖酵解/糖异生; 叶酸的一碳代谢通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)07-1729-15

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.003

Anti-liver fibrosis effect and mechanism of ethanol extract of *Isodon lophanthoides* integrated component analysis and metabolomics

CHEN Kuikui^{1, 2}, GUO Zhonghui^{1, 2}, LI Yaohua³, GUO Jiacheng¹, LUO Xin¹, JIANG Kaili¹, FAN Lihua¹, ZHANG Wentao³, LIANG Jie^{1, 2}

1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Guangxi Zhuang Yao Key Laboratory of Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

3. Teaching Experiment Training Center, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To investigate the anti-liver fibrosis effects and the underlying mechanisms of the ethanol extract of *Isodon lophanthoides* (ILEE) on CCl₄-induced liver fibrosis in mice. **Methods** An analytical method based on ultra-performance liquid

收稿日期: 2024-12-22

基金项目: 广西科技基地与人才专项 (桂科 AD21238032); 广西青年科学基金资助项目 (2023GXNSFBA026276); 国家重大新药创制科技重大专项资助项目 (2019ZX09201004); 广西中医药大学博士科研启动项目 (2020BS015); 广西中医药大学青年科学基金资助项目 (2021QN006, 2024QN47); 广西中医药大学第三批“岐黄工程”高层次人才团队培育项目 (202406)

作者简介: 陈奎奎, 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: 15299951086@163.com

***通信作者:** 张文涛, 男, 硕士, 实验师, 研究方向为中药药理学。E-mail: 1358632635@qq.com

梁洁, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制。E-mail: liangjie1101@126.com

chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) combined with the UNIFI platform was established to characterize the chemical constituents of ILEE. KM mice were randomly divided into a control group, a model group, a colchicine (positive drug, $0.20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and high-, medium-, and low-dose ILEE groups (16.28 , 8.14 , and $4.07 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 12 mice in each group. Except for the control group, all mice were intraperitoneally injected with 10% CCl_4 olive oil solution at a dose of $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ once every 3 days for six consecutive weeks to establish a liver fibrosis model. From the first day of model establishment, intragastric administration was simultaneously given. Mice in the control and model groups were intragastrically administered 0.1% sodium carboxymethyl cellulose solution ($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), while mice in the other groups were intragastrically administered the corresponding drugs once a day for 6 consecutive weeks. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) levels, type III procollagen (PC-III), type IV collagen (COL-IV), laminin (LN), and hyaluronic acid (HA) were measured. Liver tissue pathological changes were also observed. UPLC-MS/MS technology was employed to assess changes in liver metabolites across the control, model, and high-dose groups, enabling differential metabolite screening. Network pharmacology was employed to perform an integrated analysis of the chemical components and differential metabolites. **Results** A total of 24 chemical components were identified. Compared with the model group, the high- and medium-dose ILEE significantly reduced the serum levels of ALT, AST, PC-III, COL-IV, LN, and HA ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001). Pathological sections revealed that ILEE at high, medium, and low doses reduced hepatocyte enlargement, inflammatory cell infiltration, and fibrosis. Metabolomic analysis demonstrated that high doses of ILEE significantly reversed 13 differential metabolites in the livers of mice with liver fibrosis. Integrated analysis indicated that nine components including eupatilin, rosmarinic acid, salvianolic acid B, and laxiflorin B, may act on 17 targets such as TYMS, TYR, and AKR1A1, affecting tyrosine metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, and one carbon pool by folate, regulating the levels of vitamin B9, thyroxine, 2-hydroxyphenylacetic acid, and 2-phospho-D-glyceric acid in the livers of mice with liver fibrosis. **Conclusion** ILEE exhibits significant preventive and therapeutic effects on CCl_4 -induced liver fibrosis in mice, with its mechanism may be associated with tyrosine metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, and the one carbon pool by folate.

Key words: ethanol extract of *Isodon lophanthoides*; liver fibrosis; component analysis; metabolomics; isophosphorus flavin; rosmarinic acid; salvianolic acid B; tyrosine metabolism; glycolysis/gluconeogenesis; one-carbon metabolic pathway of folic acid

肝纤维化是由肝炎病毒、酒精、药物以及血吸虫等多种因素引起的慢性肝病的常见病理特征，其主要表现为细胞外基质（ECM）的过度积累与异常沉积。肝纤维化的持续进展可导致肝硬化、门脉高压甚至肝癌，最终导致肝功能衰竭，对患者生命健康构成严重威胁。流行病学数据显示，晚期纤维化和肝硬化在中国成年人中的患病率分别为 2.85% 和 0.87%^[1]。尽管早期干预可在一定程度上延缓甚至逆转病程^[2]，但目前临床上尚缺乏特异性抗肝纤维化的化学药物，现有治疗主要以保肝、抗炎、抗氧化及利胆等对症措施为主。中药因其多成分、多靶点的特点，在抗肝纤维化方面展现了独特优势和广阔前景。

线纹香茶菜 *Isodon lophanthoides* (Buch. Ham. ex D. Don) H. Hara 为唇形科植物，主要分布于我国广东、广西等地，具有清热利湿、退黄、凉血散瘀的功效，广泛用于治疗黄疸型肝炎、乙型肝炎及胆囊炎等疾病。目前，其研究主要集中在化学成分的提取与分离、质量控制、含量测定以及保肝作用等方面^[3-4]。已有研究表明，线纹香茶菜水煎剂对肝损伤具有显著的保护作用^[5-6]。与水煎剂相比，醇提

物富含有机酸类、黄酮类及二萜类成分，且具有更高的浓缩度和质量稳定性。然而，目前尚无关于线纹香茶菜醇提取物（ILEE）体内抗肝纤维化作用及其机制的研究报道，其活性成分对疾病代谢物轮廓的调节作用有待进一步探索。

代谢组学被认为是生物体整个功能状态的“生化表型”，能够从整体代谢的视角解析生物体内源性代谢状态，通过代谢通路的富集分析，可为揭示药物作用机制提供数据支撑^[7]。此外，网络药理学作为一种基于系统生物学和计算生物学的方法，具备出色的组学数据整合能力，能够将药物与特定代谢途径关联，系统揭示药物对代谢途径或差异代谢物的调节作用^[8-10]。基于此，本研究以 ILEE 为研究对象，首先采用超高效液相色谱四级杆飞行时间串联质谱（UPLC-Q-TOF/MS）技术表征其化学成分；其次，基于 CCl_4 诱导的肝纤维化小鼠模型评估其抗肝纤维化作用，并结合广泛靶向代谢组学技术，探讨其对肝脏内源性代谢物的影响；最后，采用网络药理学方法整合化学成分与代谢组学数据，构建“成分-靶点-通路-代谢物”网络，系统分析其抗肝纤维化的潜在机制，为线纹香茶菜在肝纤维化防治中

的应用及其相关产品的开发提供理论支持。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠,雌雄各半,体质量 18~20 g,由长沙市天勤生物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(湘)2019~0013,所有动物均适应性喂养 1 周后开始实验,该动物实验通过广西中医药大学实验中心动物委员会审批(批号 2021AC19102)。

1.2 主要仪器

Infinite M200 pro 全波长酶标仪(瑞士 TECAN 公司);TDZ5-WS 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);SC-316 型立式冷藏柜(青岛海尔特种电冰柜有限公司);ME204/02 型分析天平(美国梅特勒-托利多仪器有限公司);JXFSTPRP-CLN-24 型冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司);MX-S 型涡旋混匀仪(北京大龙兴创实验仪器股份有限公司);Milli-Q 超纯水制备仪(美国 Millipore 公司);SCIEX QTRAP 6500⁺ LC-MS/MS 系统由 Exion LCTM AD 型超高效液相色谱(UPLC)和 QTRAP[®] 6500⁺ 串联质谱(MS/MS)组成(美国 AB Sciex 公司);KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Waters Xevo G2-XS Q-TOF LC-MS 系统,由 Acquity UPLC I-Class 型超高效液相色谱仪及 Xevo G2-XS Q-TOF 型四极杆飞行时间质谱仪组成(配有 UNIFI 科学信息学系统 V1.7 和 Masslynx 4.1 质谱工作站,美国 Waters 公司)。

1.3 药物与主要试剂

线纹香茶菜药材购自广西仙茱中药科技有限公司,经广西中医药大学药学院谭勇教授鉴定为唇形科线纹香茶菜 *I. lophanthoides* (Buch. Ham. ex D. Don) H. Hara 的干燥地上部分。秋水仙碱片(批号 220204)购自西双版纳版纳药业有限责任公司。丙氨酸氨基转移酶(ALT)测试盒(批号 20231024)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)测试盒(批号 20231024)、IV 型胶原(COL-IV)试剂盒(批号 20231123)、III 型前胶原(PC-III)试剂盒(批号 20231123)、层黏连蛋白(LN)试剂盒(批号 20231123)和透明质酸(HA)试剂盒(批号 20231123)购自南京建成生物工程研究所;苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒(批号 G1076)和 Masson 染液套装(批号 G1006)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;四氯化碳(CCl₄,批号 C15152771)购自上海麦克林生

化科技有限公司;0.9%氯化钠溶液(批号 H22030207)购自广西裕源药业有限公司;橄榄油溶液(批号 C15311659)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;夏佛塔昔(批号 AF21061501,质量分数>98%)、异夏佛塔昔(批号 AF21062602,质量分数>98%)、新西兰牡荆苷(批号 AF20112508,质量分数>98%)、迷迭香酸(AF22022152)均购自成都埃法生物科技有限公司;乙腈(质谱级)、甲醇(质谱级)和甲酸(色谱级)购自美国 Fisher 公司。

1.4 数据库与软件

PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>);TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>);Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.SwissTargetPrediction.ch/>);GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>);String 数据库(<https://string-db.org/>);Venny 2.1.0(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>);KEGG 数据库(<http://www.kegg.jp/>);UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>);DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>);Cytoscape 3.10.0 软件。

2 方法

2.1 ILEE 化学成分分析

2.1.1 ILEE 制备 取线纹香茶菜 10 kg,加 8 倍量 95%乙醇,加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,减压浓缩,得醇提物浸膏 270 g。经分析,ILEE 中咖啡酸质量分数为 2.08 mg·g⁻¹、夏佛塔昔质量分数为 0.52 mg·g⁻¹、异夏佛塔昔质量分数为 0.53 mg·g⁻¹、迷迭香酸质量分数为 19.86 mg·g⁻¹。

2.1.2 ILEE 供试品的制备 精密称取 10 mg ILEE 浸膏,加入 10 mL 纯甲醇,超声萃取 30 min(功率 150 W、频率 50 kHz),经 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,得到供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液制备 精密称取夏佛塔昔等对照品各 1 mg,用少量二甲基亚砜助溶,以甲醇为溶剂,制备成单个对照品储备液(1 mg·mL⁻¹)及混合对照品溶液(1 μg·mL⁻¹)。

2.1.4 色谱条件 采用 Acquity PRM HSS T3 FIT 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),以 0.1%甲酸水(A)、乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~3 min, 5% B; 3~10 min, 5%~10% B; 10~20 min, 10%~30% B; 20~30 min, 30%~65% B);进样体积为 2 μL;体积流量为 0.3 mL·min⁻¹;柱温为 40 ℃。

2.1.5 质谱条件 采用电喷雾离子源, MSE 数据采集模式, 质量扫描范围 m/z 50~1 500, 毛细管电压分别为 3.0 kV (+) 和 2.5 kV (-), 锥孔电压为 40 V, 锥孔气体积流量为 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 脱溶剂氮气体积流量为 $600 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 氩气体积流量为 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 离子源温度为 $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气温度为 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 低能通道碰撞能量设置为 6 eV, 高能通道能量设置为 20~35 eV。

2.1.6 数据处理 通过检索中国学术期刊全文数据库 (CNKI)、PubChem、PubMed 和 Chem Spider 等数据库, 收集并整理线纹香茶菜及其亲缘相近品种的化学成分, 建立“化学成分数据库”。随后, 将“原始数据”和“化学成分数据库”导入 UNIFI V1.7 平台进行成分分析。具体参数设置如下: 高能量强度阈值为 50.0, 低能量强度阈值为 400.0; 精确质量数偏差 $\pm 5.0 \times 10^{-3}$, 保留时间容差 0.1 min; 在正离子模式下, 选择 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 作为加合离子, 在负离子模式下, 选择 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 和 $[\text{M}+\text{HCOO}]^{-}$ 作为加合离子; 正离子校正质量数为 556.276 6, 负离子校正质量数为 554.262 0。为辅助鉴定化合物, 还结合元素匹配、碎片离子分析、质谱数据库对比、文献查阅和对照品比对等多种方法。

2.2 药效评价

2.2.1 溶液配制 取秋水仙碱药片 1 粒, 放到洁净干燥的研钵中, 碾碎, 加入 50 mL 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液, 得到秋水仙碱供试溶液。

用移液枪准确移取 4 mL 的 CCl_4 , 量取 36 mL 的橄榄油溶液, 混匀, 得到 10% CCl_4 橄榄油溶液, 现配现用。

2.2.2 分组、造模与给药 将 SPF 级 KM 小鼠称质量后, 随机分为对照组、模型组、秋水仙碱 (阳性药, $0.20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 ILEE 高、中、低剂量 (16.28 、 8.14 、 $4.07 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 每组 12 只。除了对照组外, 所有小鼠均 ip 10% CCl_4 橄榄油溶液, 剂量为 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 3 d 1 次, 连续 6 周, 建立肝纤维化模型^[11-12]。从模型建立的第 1 天起, 同时 ig 给药, 对照组和模型组小鼠 ig 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液 ($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 其余各组小鼠 ig 对应的药物, 每天 1 次, 连续 6 周。每天观察小鼠状态, 每周称 1 次体质量。

2.2.3 样本采集 末次给药后, 禁食不禁水 12 h 后, 采用眼眶静脉采血, 放置于离心管中, 静置大约 1 h 至离心管中出现肉眼可见的上清液, 于

$4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液分装, 放置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。使用颈椎脱臼法处死小鼠, 迅速取出肝脏, 用 0.9% 氯化钠溶液荡洗血渍并用滤纸吸干水分, 取肝脏左叶放在多聚甲醛溶液中固定, 用于病理组织观察, 分装剩余的肝脏组织置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存、备用。

2.2.4 血清 ALT 和 AST 的检测 采用酶标法检测血清中 ALT、AST 的活力, 严格按照检测试剂盒说明书操作。

2.2.5 血清 HA、LN、PC-III 和 COL-IV 的检测 采用 ELISA 法检测血清中 HA、LN、PC-III、COL-IV 水平, 严格按照检测试剂盒说明书操作。

2.2.6 小鼠肝组织病理形态学观察 切取各组小鼠肝组织适量, 用 4% 多聚甲醛固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片 (厚度约 $4 \mu\text{m}$), 经脱蜡、封片后, 取小鼠肝组织石蜡切片, 采用 HE、Masson 染色, 光学显微镜下观察肝脏组织损伤与纤维化程度。

2.2.7 统计学分析 用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析, 若方差齐性则采用 LSD- t 法进行两两比较, 若方差不齐则用 Dunnett's T2 法进行比较。

2.3 肝脏代谢组学

2.3.1 肝脏样本的制备 称取 50 mg 肝脏组织, 置于离心管中, 加入 500 μL 预冷至 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 70% 甲醇水溶液匀浆 3 min, 于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 300 μL , 过蛋白沉淀板后进行上机分析。

2.3.2 色谱条件 采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 C_{18} 色谱柱 ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$), 以 0.05% 甲酸水 (A)-0.05% 甲酸乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱 ($0 \sim 8 \text{ min}$, 5%~95% B; $8.0 \sim 9.5 \text{ min}$, 95% B; $9.5 \sim 9.6 \text{ min}$, 95%~5% B; $9.6 \sim 12.0 \text{ min}$, 5% B), 后运行 10 min; 进样体积为 2 μL ; 体积流量为 $0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.3 质谱条件 采用电喷雾离子源, 毛细管电压分别为 5.5 kV (+) 和 4.5 kV (-), 气帘气 241.32 kPa, 离子源温度 $550 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 应用动态多反应监测 (MRM) 模式采集质谱数据信息, 离子对信息来源于美国 AB SCIEX 公司。

2.3.4 数据分析 将 UPLC-MS/MS 质谱采集得到的原始数据使用 MultiQuant 3.0.3 软件进行峰提取、峰对齐、色谱峰积分校正。基于 MetaboAnalyst 6.0 平台 (<https://www.metaboanalyst.ca>) 进行正交偏最

小二乘法判别分析 (OPLS-DA)、差异代谢物的筛选及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 代谢通路富集分析, 筛选标准为 $VIP > 1$, 差异倍速 (Fold change) > 2 或 < 0.5 ; 采用 OmicStudio 云工具平台 (<https://www.omicstudio.cn/tool>), 设置相关性计算方法为 Pearson, 将差异代谢物数据与血清生化指标进行相关分析。

2.3.5 代谢组学与化学成分的整合分析 首先, 通过 TCMSP 平台 (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>) 和 SwissTargetPrediction 平台 (<http://www.swiss-targetprediction.ch/>) 收集 ILEE 中鉴定化学成分的靶点信息; 在合并、去除重复数据后, 获得 365 个成分靶点。随后, 将差异代谢物和上述成分靶点导入

Cytoscape 3.10.2 软件的 MetScape 插件, 进行整合分析, 获取相关代谢通路的“代谢物-反应-酶-基因”关系信息。最后, 利用 Cytoscape 3.10.2 软件构建“成分-靶点-通路-代谢物”网络, 展示成分与代谢通路的关联。

3 结果

3.1 ILEE 化学成分分析

正、负离子模式下 ILEE 的基峰色谱图见图 1。基于 UNIFI 平台和自建化学成分数据库, 结合分子离子信息、碎片离子分析、对照品及文献比对等, 共鉴定了 24 个化合物, 其中, 黄酮类 6 个, 有机酸类 9 个, 二萜类 7 个, 其他类 2 个。结果见表 1。

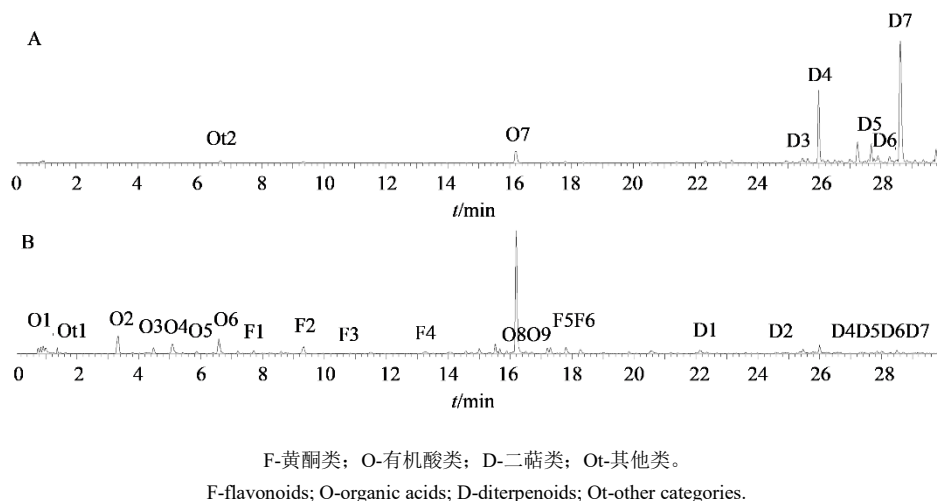


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下 ILEE 的基峰色谱图

Fig. 1 Base peak chromatograms of ILEE in positive (A) and negative (B) ion mode

3.2 抗肝纤维化药效评价

3.2.1 ILEE 对肝纤维化小鼠血清 ALT、AST 水平的影响 如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.001); 与模型组比较, 秋水仙碱组和 ILEE 各剂量组小鼠血清中 ALT 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), ILEE 中、高剂量组小鼠血清中 AST 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2.2 ILEE 对肝纤维化小鼠血清 COL-IV、PC-III、LN、HA 水平的影响 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 COL-IV、PC-III、LN 和 HA 的含量都显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 秋水仙碱组和 ILEE 各剂量组小鼠血清中的 COL-IV、HA 和 LN 含量明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 与模型组比较, 秋水仙碱组和 ILEE 中、高剂量组

小鼠血清中 PC-III 的含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

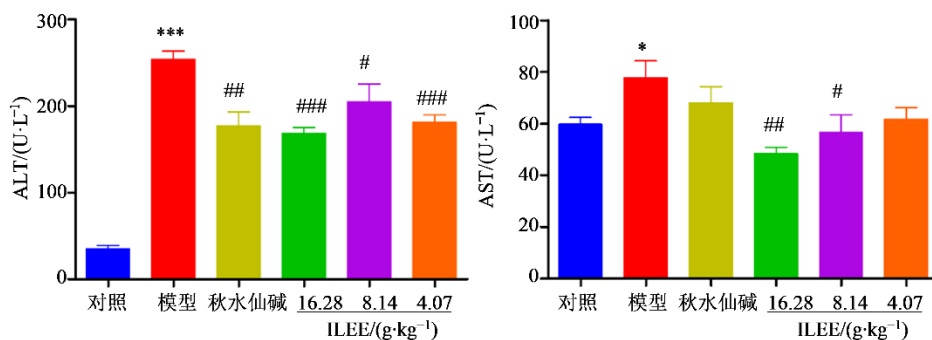
3.2.3 ILEE 对肝纤维化小鼠肝脏病理损伤的影响 如图 4 所示, 肝脏病理切片 HE 染色结果表明, 对照组小鼠肝细胞形态正常, 排列有序; 模型组肝组织结构紊乱, 细胞出现水肿、破裂及坏死, 汇管区可见大量炎症细胞浸润。与模型组相比, ILEE 各剂量组均表现出不同程度的肝损伤改善效果, 且改善程度随剂量增加而增强。高剂量组肝组织结构接近正常, 肝细胞形态和排列显著改善, 炎症细胞浸润减少; 中剂量组表现次之, 肝细胞水肿和脂肪变性减轻, 坏死灶减少; 低剂量组虽有改善作用, 但效果相对较弱。肝脏病理切片 Masson 染色结果显示, 对照组小鼠肝组织结构清晰, 肝小叶和中央静脉排列有序, 肝细胞形态正常, 胞质和细胞核染色均匀, 未见明显的蓝色胶原纤维增生; 模型组小鼠肝组织

表 1 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的 ILEE 成分分析结果
Table 1 Analysis results of ILEE based on UHPLC-Q-TOF/MS

序号	t_R/min	化学式	m/z 实测值	偏差/ $(\times 10^{-6})$	碎片离子	化学式名称
F1	7.71	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_5$	593.150 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.8	503.107 7、473.110 3、383.078 8、353.068 5	新西兰牡荆苷 ^a
F2	9.34	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	563.140 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.4	503.107 7、473.107 1、443.099 4、383.078 9、353.066 4	夏佛塔苷 ^a
F3	10.83	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	563.141 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$	2.3	473.104 0、443.096 4、383.076 9、353.066 8	异夏佛塔苷 ^a
F4	13.27	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	533.127 1 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-4.5	443.093 3、383.073 7、353.068 3	芹菜素-6,8-二- <i>C-α-L</i> -葡萄糖苷 ^[13]
F5	17.30	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	547.143 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-2.7	519.078 6、415.767 9、295.052 3	葛根素-6"- <i>O</i> -木糖苷 ^[14]
F6	17.80	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	343.081 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-0.3	328.100 8、313.120 8、299.061 3	异泽兰黄素 ^[15]
O1	1.38	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	191.019 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.0	129.015 9、111.005 6	柠檬酸 ^[16]
O2	3.34	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$	197.044 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-3.0	179.033 6、135.043 1	丹参素 ^[17]
O3	4.49	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$	181.049 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-2.8	163.035 9、135.040 9	4-羟基苯乳酸
O4	5.11	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	137.023 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-3.6	109.029 0	原儿茶醛 ^[18]
O5	5.97	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_8$	285.059 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-4.2	153.013 6、109.028 0	乌拉尔新苷 ^[19]
O6	6.57	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	179.034 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.7	135.044 8	咖啡酸 ^[17]
O7	16.19	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	359.077 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.9	197.046 1、179.033 9、161.024 3、135.038 5	迷迭香酸 ^a
O8	16.50	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	493.112 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-1.2	295.060 1、185.024 1	丹酚酸 A ^[17]
O9	17.20	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	717.144 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-0.7	519.091 6、339.047 9、321.039 2	丹酚酸 B ^[17]
D1	22.33	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_5$	343.153 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-2.0	328.115 6、313.051 9、295.094 5	laxiflorin B ^[20]
D2	24.89	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6$	387.180 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.8	327.167 0、309.170 3	maoecrystal A ^[20]
D3	25.89	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$	331.192 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$	3.3	313.185 3、295.176 4、257.125 4、243.110 3	gerardianin C ^[21]
D4	26.98	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$	347.187 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$	4.0	329.173 3、314.146 8、301.167 0	megathyrin A ^[20]
D5	27.67	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$	389.197 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.5	329.177 1	effusanin B ^[20]
D6	28.31	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$	313.179 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-1.6	283.128 1、257.120 7	6,7-dehydroroyleanone ^[18]
D7	28.50	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$	331.189 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-4.2	313.167 8、295.171 9	umbrosin B ^[22]
Ot1	1.47	$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_5$	188.055 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-1.6	144.065 3、128.035 8、102.056 8	<i>N</i> -乙酰- <i>L</i> -谷氨酸
Ot2	6.67	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$	163.038 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$	-4.9	145.028 7、135.043 9、119.049 3	7-羟基香豆素 ^[23]

a-与对照品比对; F-黄酮类; O-有机酸类; D-二萜类; Ot-其他类。

a-comparison with reference substance; F-flavonoids; O-organic acids; D-diterpenes; Ot-other classes.

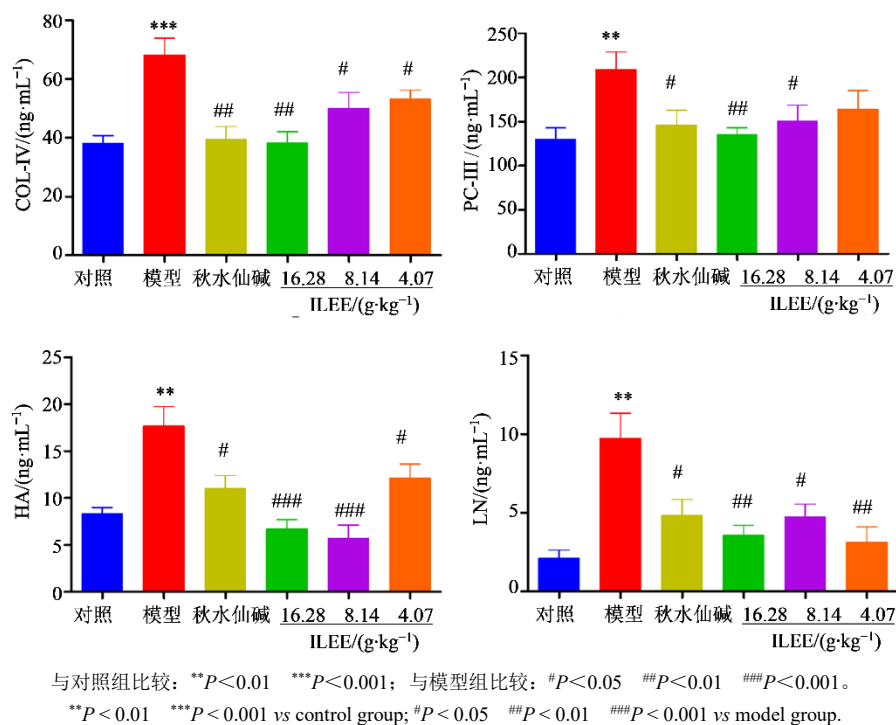
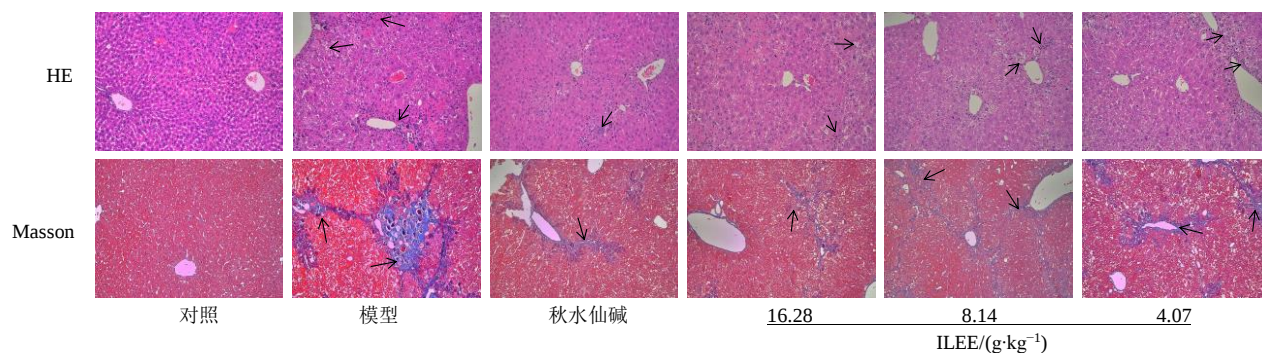


与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 2 ILEE 对肝纤维化小鼠血清 ALT 和 AST 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 2 Effects of ILEE on serum ALT and AST activities in mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

图 3 ILEE 对肝纤维化小鼠血清 COL-IV、PC-III、HA 和 LN 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)Fig. 3 Effects of ILEE on serum COL-IV, PC-III, HA and LN levels in mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)图 4 ILEE 对肝纤维化小鼠肝脏病理损伤的影响 ($\times 100$)Fig. 4 Effects of ILEE on liver pathological damage in mice with liver fibrosis ($\times 100$)

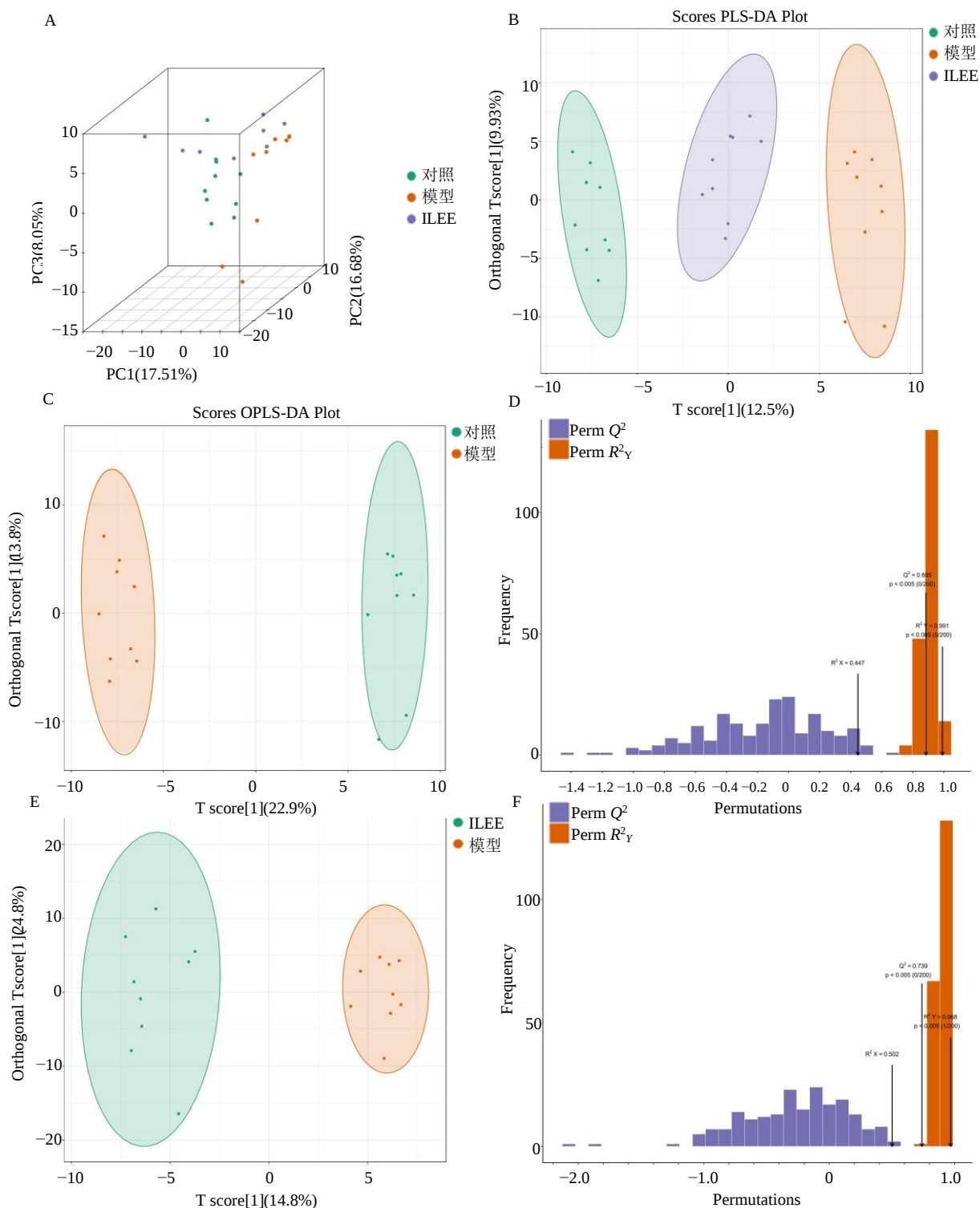
结构紊乱, 出现大量的蓝色胶原纤维, 分布范围广泛, 从汇管区向肝小叶延伸, 形成明显纤维间隔; 与模型组比较, 秋水仙碱组和 ILEE 各剂量组小鼠肝小叶结构有所恢复, 蓝色胶原纤维增生明显减轻, 纤维间隔数量减少, 但改善程度因剂量不同而异。

3.3 肝脏代谢组学分析

3.3.1 主成分分析(PCA)及 OPLS-DA 对对照组、模型组及 ILEE 高剂量组小鼠肝脏样本进行 PCA, 结果表明 PC1、PC2 和 PC3 分别解释了总方差的 17.51%、16.68% 和 8.05% (图 5-A)。在 PCA 图中, 对照组与模型组的样本表现出明显的分离, 说明这

2 组内源性代谢物的表达模式存在显著差异。此外, ILEE 高剂量组与模型组之间也有一定程度的分离, 提示 ILEE 高剂量对肝纤维化小鼠肝脏代谢物表达产生了影响。进一步使用 PLS-DA 对 3 组样本进行分析 (图 5-B), 结果显示各组样品存在明显分离, ILEE 高剂量组位于对照组与模型组之间。这表明, 各组的肝脏内源性代谢物存在差异, 且 ILEE 对肝纤维化小鼠肝脏代谢物变化具有一定的回调作用。

3.3.2 差异代谢物筛选 采用 OPLS-DA 和倍数变化分析分别筛选模型组与对照组、ILEE 高剂量组与模型组的差异代谢物。如图 5-C 所示, 模型组与对



A-3 组样品 PCA 图; B-3 组样品 PLS-DA 得分图; C-模型组与对照组 OPLS-DA 得分图; D-模型组与对照组置换验证图; E-ILEE 高剂量组与模型组 OPLS-DA 得分图; F-ILEE 高剂量组与模型组置换验证图。

A-PCA plot of three sample groups; B-PLS-DA score plot of three sample groups; C-OPLS-DA score plot of model group vs control group; D-Permutation validation plot for model group vs control group; E-OPLS-DA score plot of the ILEE high-dose group vs model group; F-Permutation validation plot for the ILEE high-dose group vs model group.

图 5 多元分析结果

Fig. 5 Results of multivariate analysis

照组的数据分离度较好，表明 2 组内源性代谢物的表达存在显著差异。同样，ILEE 高剂量组与模型组之间的内源性代谢物表达也表现出明显差异（图 5-E）。此外，OPLS-DA 模型的置换检验图（如图 5-D、F）显示 $Q^2 \geq 0.5$ ，进一步验证了所构建的模型的可靠性及未发生过拟合。以 VIP 值 ≥ 1 、Fold change ≥ 2.0 或 Fold change ≤ 0.5 为筛选标准，分别从模型组与对照组、ILEE 高剂量组与模型组的比较中筛选出 54 种和 33 种差异代谢物，其中 13 种代谢物在 2 组比较中均表现为差异显著，如猪脱氧胆酸（hyodeoxycholic acid）、维生素 B₉（vitamin B₉）、N6-甲基腺苷（N6-methyladenosine）等，其热图分析见图 6、信息见表 2。

3.3.3 差异代谢物与血清生化指标的相关性分析

差异代谢物与血清生化指标的相关性分析结果如

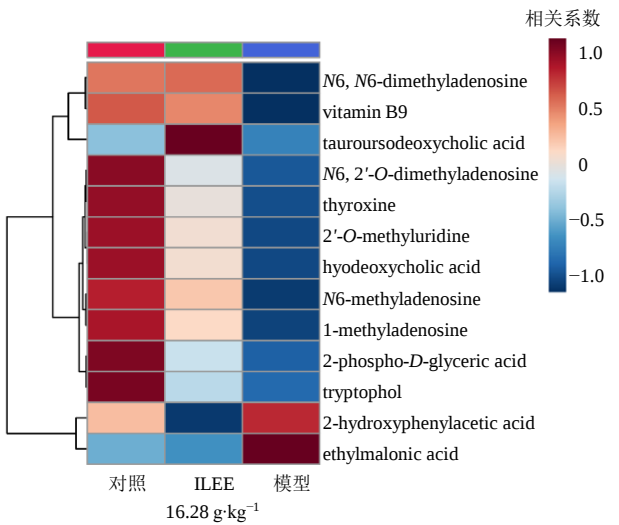


图 6 差异代谢物热图

Fig. 6 Heatmap of differential metabolites

表 2 差异代谢物信息

Table 2 Deta ILEE information of screened differential metabolites

序号	名称	化学式	离子模式	母离子 (Q1)	子离子 (Q3)	模型 vs 对照	ILEE 高剂量 vs 模型
1	猪脱氧胆酸 (hyodeoxycholic acid)	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	负离子	391.3	391.3	下调	上调
2	牛磺熊去氧胆酸 (tauroursodeoxycholic acid)	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	负离子	498.3	79.8	下调	上调
3	维生素 B ₉ (vitamin B ₉)	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	正离子	442.2	295.1	下调	上调
4	甲状腺素 (thyroxine)	C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₄	正离子	777.7	731.4	下调	上调
5	3-吲哚乙醇 (tryptophol)	C ₁₀ H ₁₁ NO	正离子	162.1	144.1	下调	上调
6	N6, N6-二甲基腺苷 (N6, N6-dimethyladenosine)	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄	正离子	296.1	164.1	下调	上调
7	2'-O-甲基尿苷 (2'-O-methyluridine)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₆	正离子	259.1	113.0	下调	上调
8	1-甲基腺苷 (1-methyladenosine)	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄	正离子	282.1	150.1	下调	上调
9	N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine)	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄	正离子	282.1	150.1	下调	上调
10	N6, 2'-O-二甲基腺苷 (N6, 2'-O-dimethyladenosine)	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄	正离子	296.1	150.1	下调	上调
11	乙基丙二酸 (ethylmalonic acid)	C ₅ H ₈ O ₄	负离子	131.0	87.1	上调	下调
12	邻羟基苯乙酸 (2-hydroxyphenylacetic acid)	C ₈ H ₈ O ₃	负离子	151.1	107.1	上调	下调
13	2-磷酸-D-甘油酸 (2-phospho-D-glyceric acid)	C ₃ H ₇ O ₇ P	负离子	184.9	78.8	下调	上调

图 7 所示。颜色梯度表示相关性的强度和方向，其中深蓝色代表较强的负相关（接近-0.8），红色表示较弱的正相关（接近 0.2）；相关性显著性通过 t 检验。总体来看，图中负相关性占主导地位，表明这些代谢物的变化与生化指标的升高呈抑制性关

系。具体而言，10 种代谢物包括 N6-甲基腺苷、2-磷酸-D-甘油酸、N6, 2'-O-二甲基腺苷、1-甲基腺苷、2'-O-甲基尿苷、N6, N6-二甲基腺苷、牛磺熊去氧胆酸、乙基丙二酸、猪脱氧胆酸和维生素 B₉ 与所有血清生化指标（AST、ALT、PC-III、COL-IV、LN

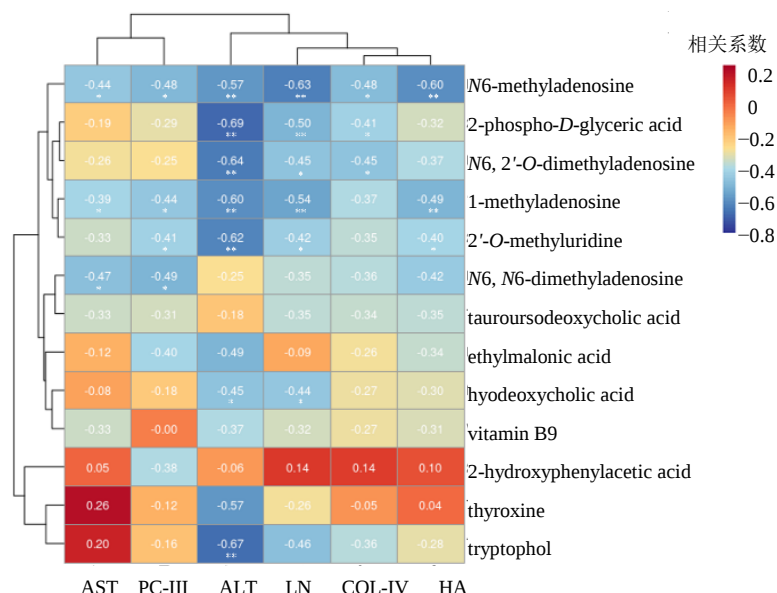


图 7 相关性分析热图

Fig. 7 Correlation analysis heat map

和 HA) 呈负相关; 其中, N6-甲基腺苷与所有血清生化指标呈显著负相关 ($P < 0.05$), 表明其水平的增加可能与这些生化指标的降低相关, 而这些指标通常用于评估肝损伤和纤维化程度, 推测 N6-甲基腺苷可能在抑制肝纤维化的过程中发挥保护作用。此外, 代谢物邻羟基苯乙酸与血清 AST、LN、COL-IV 和 HA 呈弱正相关 (相关系数分别为 0.05、0.14、0.14 和 0.10), 提示在这些指标升高时, 邻羟基苯乙酸的浓度可能也会相应增加。

3.3.4 通路富集分析 代谢通路富集分析结果见图 8, 共获得 10 条代谢通路, 包括苯丙氨酸代谢 (phenylalanine metabolism)、叶酸的一碳代谢 (one carbon pool by folate)、甘油脂质代谢 (glycerolipid metabolism)、磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway)、糖酵解 / 糖异生 (glycolysis/gluconeogenesis)、叶酸生物合成 (folate biosynthesis)、乙醛酸和二羧酸代谢 (glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (glycine, serine and threonine metabolism)、酪氨酸代谢 (tyrosine metabolism) 和初级胆汁酸生物合成 (primary bile acid biosynthesis)。

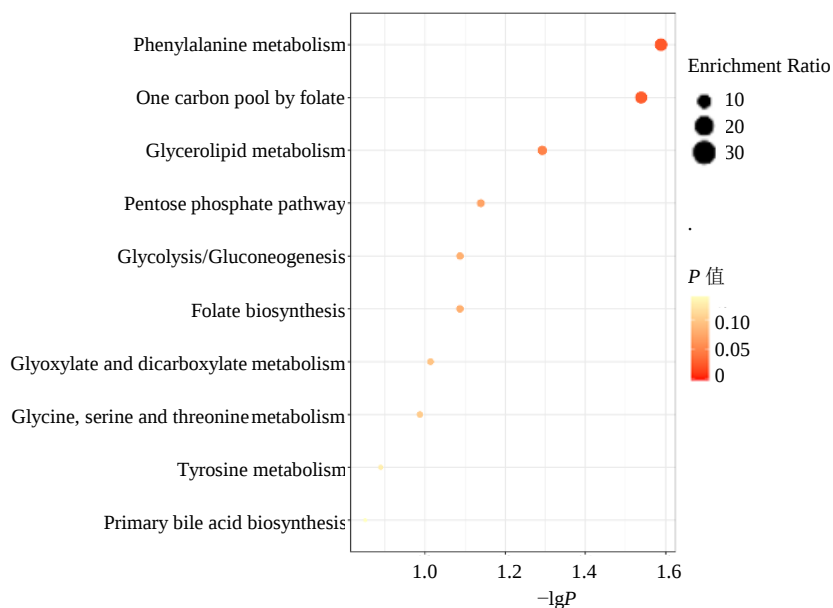


图 8 KEGG 气泡图

Fig. 8 KEGG bubble map

酸代谢 (glycine, serine and threonine metabolism)、酪氨酸代谢 (tyrosine metabolism) 和初级胆汁酸生物合成 (primary bile acid biosynthesis)。这些结果表明, ILEE 对 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维的改善作用可能与上述代谢通路的调节相关, 为进一步探索 ILEE 的作用机制及其在代谢网络中的调控效应提供了重要线索。

3.3.5 整合分析 基于 TCSMP 平台 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 和 SwissTarget Prediction 平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 共筛选获得 365 个成分靶点。随后, 将 13 个差异代谢物和 365 个成分靶点导入 Cytoscape 3.10.2 软件, 通过 MetScape 插件进行整合分析, 构建“成分-靶点-通路-代谢物”网络 (图 9)。该网络包含 33 个节点 (包括 9 个成分、17 个靶点、3 条代谢通路和 4 个差异代谢物) 及 51 条

边。其中, 三角形节点表示化学成分、圆形节点表示靶点、V 型节点表示代谢通路、六边形节点表示差异代谢物。分析结果表明, ILEE 的 9 种化学成分, 包括异泽兰黄素 (eupatilin)、丹参素 (danshensu)、咖啡酸 (caffeic acid)、迷迭香酸 (rosmarinic acid)、丹酚酸 B (salvianolic acid B)、柠檬酸 (citric acid)、原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde)、laxiflorin B 和 7-羟基香豆素 (7-hydroxycoumarin), 可能通过作用于 TYMS、TYR、AKR1A1 等 17 个靶点, 影响酪氨酸代谢、糖酵解/糖异生和叶酸的一碳代谢等 3 条关键代谢通路, 从而调控肝纤维化小鼠肝脏中维生素 B_9 、甲状腺素、邻羟基苯乙酸和 2-磷酸-D-甘油酸水平。这些结果初步揭示 ILEE 对肝纤维化的多成分、多靶点、多通路的综合调控机制, 为阐释其抗肝纤维化作用及机制提供了重要理论支持。

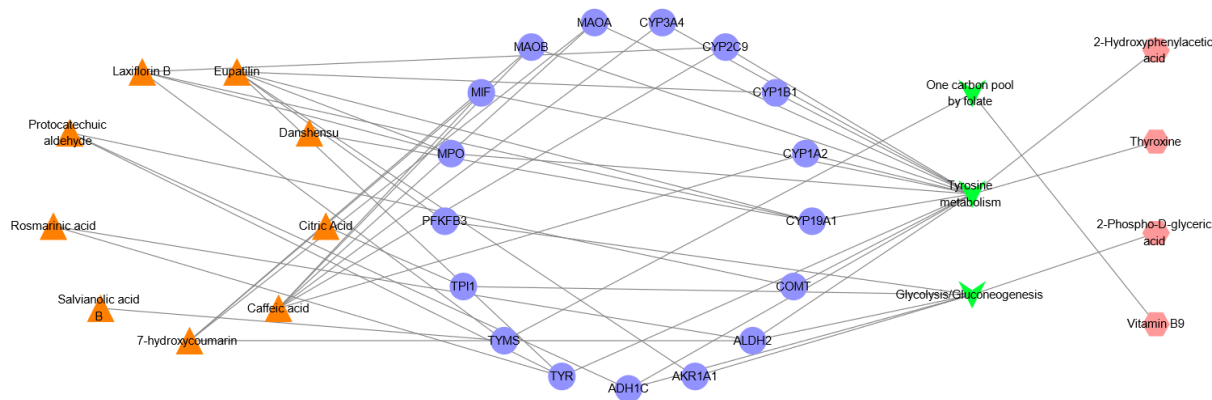


图 9 “成分-靶点-通路-代谢物”网络

Fig. 9 “ingredients-targets-pathways-metabolites” network diagram

4 讨论

本研究通过化学成分分析和代谢组学方法, 揭示了 ILEE 的化学组成及其潜在的抗肝纤维化分子机制。采用 UPLC-Q-TOF/MS 分析技术, 在 30 min 内实现了 ILEE 的高效分析, 鉴定出 24 个化学成分, 主要包括黄酮类、有机酸类和二萜类物质, 这些成分具有抗氧化应激、抑制炎症反应等生物活性^[24-26], 推测其可能是 ILEE 抗肝纤维化的物质基础。

CCl_4 是一种常用的肝纤维化造模剂, 其诱导的肝纤维化模型在病理形态和生理特征上与人类肝纤维化高度相似^[27], 因此被广泛应用于抗肝纤维化药物的筛选和作用机制研究。 CCl_4 进入机体后可导致肝细胞损伤, 使 AST 和 ALT 大量释入血^[28]。同

时, 肝星状细胞 (HSCs) 的活化引发细胞外基质 (ECM) 合成和降解失衡, 并伴随 HA、LN、PC-III、COL-IV 等 ECM 成分的显著升高, 这些指标常用于评估肝纤维化和肝损伤程度^[29]。在本研究中, 模型组小鼠的血清 ALT、AST、HA、LN、PC-III 和 COL-IV 水平显著高于对照组, 肝组织呈现出细胞肿大、炎症细胞浸润及纤维增生的病理特征, 表明模型构建成功。而 ILEE 中、高剂量组小鼠的上述指标显著降低, 且肝细胞病变、坏死和纤维化程度明显改善, 表明 ILEE 具有显著的抗肝纤维化作用。

代谢组学分析显示, ILEE 高剂量干预可逆转肝纤维小鼠肝脏中猪脱氧胆酸、维生素 B_9 、N6-甲基腺苷等 13 个差异代谢物的异常水平。其中, N6-

甲基腺苷不仅直接参与肝细胞损伤、炎症细胞募集和肝星状细胞激活等肝纤维化过程,还通过与微小 RNA 和肠道菌群相互作用等途径间接影响肝纤维化的发生和进展^[30-31]。相关性分析表明,N6-甲基腺苷与血清 ALT、AST、PC-III、COL-IV、LN 和 HA 水平呈显著负相关,提示其水平升高可能对肝纤维化具有保护作用。

通过“成分-靶点-通路-代谢物”网络分析发现,ILEE 的 9 个化学成分,包括异泽兰黄素、丹参素、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、柠檬酸、原儿茶醛、laxiflorin B 和 7-羟基香豆素,可能通过作用于 TYMS、TYR 和 AKR1A1 等靶点,影响酪氨酸代谢、糖酵解/糖异生和叶酸的一碳代谢通路,进而调控肝脏中维生素 B₉、甲状腺素、邻羟基苯乙酸和 2-磷酸-D-甘油酸的水平,发挥抗肝纤维化作用。已有研究表明,异泽兰黄素^[32]、丹参素^[33]、咖啡酸^[34]、迷迭香酸^[26]、丹酚酸 B^[35]、柠檬酸^[36]、原儿茶醛^[37]和 7-羟基香豆素^[38]具有抗肝纤维化或保肝作用,进一步支持了 ILEE 在肝纤维化防治中的潜力。酪氨酸代谢是 ILEE 抗肝纤维化作用的重要机制之一。儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 和单胺氧化酶 (MAO) 家族成员 (如 MAOA、MAOB) 通过调控酪氨酸代谢中氧化应激和活性氧 (ROS) 产生,影响肝纤维化的进展^[39-42]。本研究发现,ILEE 高剂量处理可降低肝纤维化小鼠肝脏中邻羟基苯乙酸 (一种酪氨酸代谢产物) 的水平,该物质的过度积累会加剧氧化应激,提示 ILEE 可能通过调控邻羟基苯乙酸的生成和清除,减轻氧化应激反应,进而保护肝脏^[43-44]。此外,酪氨酸代谢产物甲状腺素的水平与肝纤维化程度呈负相关^[45]。值得注意的是,2024 年 FDA 批准了首款甲状腺激素受体 β 激动剂 (resmetirom) 用于治疗代谢相关脂肪性肝炎 (NASH),可显著改善肝脏炎症和肝纤维化进程^[46],进一步支持甲状腺素代谢在肝纤维化中的重要作用。糖酵解/糖异生也是 ILEE 抗肝纤维化的重要调控通路。乙醛脱氢酶 2 (ALDH2)、乙醇脱氢酶 1C (ADH1C) 通过介导乙醛、乙醇转化为乙酸,参与肝细胞能量代谢,而较高的 ADH 水平被视为肝纤维化的危险因素^[47]。醇醛酮还原酶家族 1 (AKR1A1)、丙糖磷酸异构酶 1 (TPI1) 和人果糖-2,6-二磷酸酶 3 (PFKFB3) 等靶点参与糖酵解过程中肝细胞的能量代谢,调控纤维化进展^[48-50]。例如,PFKFB3 的过度激活可促进 HSC 糖酵解以满足其

增殖与表型转化需求,从而加速纤维化。本研究发现,ILEE 治疗能够逆转肝纤维化小鼠肝脏中 2-磷酸-D-甘油酸 (糖酵解关键中间产物) 水平的下降趋势,可能有助于恢复糖异生的正常活性,从而减缓肝纤维化^[51]。在叶酸的一碳代谢通路中,胸苷酸合成酶 (TYMS) 作为关键酶参与胸苷酸的合成,为 DNA 合成与细胞增殖提供必要前体^[52]。维生素 B₉ (叶酸) 作为重要的代谢调节因子,其缺乏可导致同型半胱氨酸积累,诱发氧化应激和炎症,进一步加重肝纤维化^[53]。此外,维生素 B₉ 通过调控脂质代谢,防止脂肪在肝细胞中堆积,有助于减缓纤维化进展。研究显示,联合补充维生素 B₉、维生素 B₁₂ 及抗氧化剂可显著改善慢性肝病患者的肝纤维化^[54-55],提示维生素 B₉ 补充是抗肝纤维化的潜在辅助治疗策略。本研究系统地揭示了 ILEE 通过多条代谢通路调控肝纤维化的作用机制,未来需进一步研究相关通路中的关键基因/蛋白,以全面阐明 ILEE 抗肝纤维化的分子机制。

本研究建立了 UPLC-Q-TOF/MS 结合 UNIFI 平台的分析方法,从 ILEE 中鉴定了 24 个主要的化学成分,初步揭示了其化学物质基础;基于 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型,发现 ILEE 能够显著降低肝纤维化小鼠血清中的 ALT、AST、PC-III、COL-IV、LN 和 HA 水平,并改善肝组织中炎症细胞浸润及纤维化组织增生,具有显著的抗肝纤维化作用;通过化学成分和代谢组学的整合分析,发现 ILEE 中的 9 个化学成分,包括异泽兰黄素、丹参素、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、柠檬酸、原儿茶醛、laxiflorin B 和 7-羟基香豆素,通过作用于 TYMS、TYR 和 AKR1A1 等靶点,影响酪氨酸代谢、糖酵解/糖异生和叶酸的一碳代谢通路,调控肝脏中维生素 B₉、甲状腺素、邻羟基苯乙酸和 2-磷酸-D-甘油酸的水平,发挥抗肝纤维化作用。研究结果可为阐释 ILEE 通过多成分、多靶点、多通路发挥抗肝纤维作用提供科学依据,并为线纹香茶菜在肝纤维化防治中的应用及其产品开发提供理论支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Man S, Deng Y H, Ma Y, et al. Prevalence of liver steatosis and fibrosis in the general population and various high-risk populations: A nationwide study with 5.7 million adults in China [J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(4): 1025-1040.

- [2] 陆伦根, 尤红, 谢渭芬, 等. 肝纤维化诊断及治疗共识 (2019 年) [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(10): 2163-2172.
Lu L G, You H, Xie W F, et al. Consensus on the diagnosis and therapy of hepatic fibrosis (2019) [J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(10): 2163-2172.
- [3] Zhou H L, Han M Z, Nan M M, et al. Isodons AH, seco-abietane and abietane-type diterpenoids from *Isodon lophanthoides*: Isolation, structural elucidation, and anticholestatic activity[J]. Chin J Nat Med, 2024, 22(0): 1-14
- [4] 孙礼芹, 钱菲, 李医明, 等. 多基源溪黄草的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(6): 88-98.
Sun L Q, Qian F, Li Y M, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Linearstripe Rabdosis* Herb from various origins [J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2020, 34(6): 88-98.
- [5] Feng C P, Tang H M, Huang S, et al. Evaluation of the effects of the water-soluble total flavonoids from *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth.) H. Hara on apoptosis in HepG2 cell: Investigation of the most relevant mechanisms [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 188: 70-79.
- [6] 刘银花, 陈秀琴, 沈婕, 等. 溪黄草水煎剂对大鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 山东中医杂志, 2007, 26(8): 565-566.
Liu Y H, Chen X Q, Shen J, et al. Protective effect of *Rabdosis rubescens* decoction on acute liver injury in rats [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2007, 26(8): 565-566.
- [7] 贾志鑫, 潘明霞, 刘力榕, 等. 基于代谢组学的速效救心丸抗心肌缺血作用机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4719-4729.
Jia Z X, Pan M X, Liu L R, et al. Mechanism of Suxiao Jiuxin Pills against myocardial ischemia based on metabolomics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(15): 4719-4729.
- [8] 王晨, 刘苏杰, 阮佳鑫, 等. 基于代谢组学和网络药理学探讨“黄芪-玉竹-灵芝”配伍治疗慢性支气管炎作用机制 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(11): 2475-2488.
Wang C, Liu S J, Ruan J X, et al. Based on metabolomics and network pharmacology mechanism of *Astragali Radix-Polygonati Odorati Rhizoma-Ganoderma* in treatment of chronic bronchitis [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(11): 2475-2488.
- [9] Xu W J, Chen L M, Wei Z Y, et al. Identifying the molecular targets of *Salvia miltiorrhiza* (SM) in ox-LDL induced macrophage-derived foam cells based on the integration of metabolomics and network pharmacology [J]. RSC Adv, 2018, 8(7): 3760-3767.
- [10] 郭忠会, 罗鑫, 冯玉燕, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF/MS、GC-MS 陈皮化学成分分析及其治疗“痰、咳、喘”网络药理学研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(8): 1715-1734.
Guo Z H, Luo X, Feng Y Y, et al. Analysis on chemical constituents in *Citri Reticulatae Pericarpium* by UHPLC-Q-TOF/MS, GC-MS and network pharmacology study on treating “phlegm, cough, and asthma” [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(8): 1715-1734.
- [11] 周佳宁, 肖倩, 黎芳, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路研究瑶药紫九牛醇提物抗小鼠肝纤维化作用 [J]. 中药材, 2022, 45(6): 1470-1474.
Zhou J N, Xiao Q, Li F, et al. Based on PI3K/AKT/mTOR signal pathway, the anti-hepatic fibrosis effect of alcohol extract of Yao medicine Zijiniu cattle was studied [J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(6): 1470-1474.
- [12] 闵远骞, 周欣欣, 刘湘花, 等. 肝纤维化动物模型的中西医临床吻合度分析 [J/OL]. 中华中医药学刊, 2025: 1-17. (2025-03-18).
<https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?FILEName=ZYHS2025031400L&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
Min Y J, Zhou X X, Liu X H, et al. Analysis of clinical coincidence degree between traditional Chinese medicine and western medicine in animal model of liver fibrosis [J/OL]. China Ind Econ, 2025: 1-17. (2025-03-18).
<https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?FILEName=ZYHS2025031400L&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [13] 唐海明, 陈建南, 徐香琴, 等. 狭基线纹香茶菜水溶性成分及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3219-3223.
Tang H M, Chen J N, Xu X Q, et al. Water-soluble constituents from *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus* and their antitumor activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(22): 3219-3223.
- [14] Yang Y, Zhao H, Zhu F R, et al. Analysis of isoflavones in *Pueraria* by UHPLC-Q-orbitrap HRMS and study on α -glucosidase inhibitory activity [J]. Foods, 2022, 11(21): 3523.
- [15] Bai Y, Zheng Y Y, Pang W J, et al. Identification and comparison of constituents of *Aurantii Fructus* and *Aurantii Fructus* immaturus by UFLC-DAD-triple TOF-MS/MS [J]. Molecules, 2018, 23(4): 803.
- [16] 郭忠会, 郑雪莹, 梁洁, 等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合 UNIFI 平台快速鉴定鸡骨草化学成分 [J]. 中国药房, 2022, 33(23): 2852-2857, 2863.
Guo Z H, Zheng X Y, Liang J, et al. Rapid identification of chemical constituents in *Abrus cantoniensis* Hance by

- UPLC-Q-TOF/MS combined with UNIFI platform [J]. China Pharm, 2022, 33(23): 2852-2857, 2863.
- [17] 刘悦, 丁晓彦, 王娜, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Plus-Orbitrap MS 的丹参提取物成分表征及其抗血栓作用谱效相关药效物质基础解析 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1609-1619.
Liu Y, Ding X Y, Wang N, et al. Component characterization of *Salvia miltiorrhiza* extracts based on UPLC-Q-Exactive Plus-Orbitrap MS and analysis of pharmacodynamic material basis related to spectral effect of its antithrombotic activity [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(5): 1609-1619.
- [18] 覃萍, 苏阳静, 陈永苗, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 的三种基原溪黄草及其干预小鼠肝纤维化的血清化学研究 [J]. 中南药学, 2024, 22(2): 296-301.
Qin P, Su Y J, Chen Y M, et al. Chemical constituents in three origins of *Rabdosia serra* and their administration serum analysis in hepatic fibrosis mice based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS [J]. Cent South Pharm, 2024, 22(2): 296-301.
- [19] Liu Y N, Hu M T, Qian J, et al. Characterization of the chemical constituents of Jie-Geng-Tang and the metabolites in the serums and lungs of mice after oral administration by LC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Nat Med, 2021, 19(4): 284-294.
- [20] 解伟伟. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术溪黄草化学成分分析及冬凌草乙素体内外代谢研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.
Xie W W. Investigation on the Chemical Constituents in the *Isodon serra* (Maxim.) Hara and metabolism of ponigidin *in vivo* and *in vitro* [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2018.
- [21] 冯秀丽. 南药“溪黄草”化学成分研究—线纹香茶菜 (*Isodon lophanthoides*) 化学成分研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
Feng X L. Studies on the chemical constituents of the southern medicine “*Rabdosia rubescens*”: Studies on the chemical constituents of *Isodon lophanthoides* [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.
- [22] Kubo I, Kamikawa T, Isobe T, et al. Bitter principles of *Isodon umbrosus* Hara. The structures of umbrosin A and B [J]. Bull Chem Soc Jpn, 1974, 47(5): 1277-1279.
- [23] 李琛, 王荣浩, 王丁众, 等. UPLC-Orbitrap HRMS 法测定小鼠血液中香豆素及其代谢物 [J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2017, 45(2): 38-42.
Li C, Wang R H, Wang D Z, et al. Determination of coumarin and its metabolite in mouse blood with UPLC-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. J Henan Norm Univ Nat Sci Ed, 2017, 45(2): 38-42.
- [24] Qi J X, Pan Z P, Wang X Y, et al. Research advances of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. polyphenols in inflammatory diseases [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1305886.
- [25] 刘美静. 基于 FXR 探讨夏佛塔昔对 APAP 或高脂饮食诱导肝损伤的保护作用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
Liu M J. Based on FXR, the protective effect of Shafotaxide on liver injury induced by APAP or high-fat diet was discussed [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2019.
- [26] Elufioye T O, Habtemariam S. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108600.
- [27] 吴芙蓉, 宁丽娟, 周冉. 小柴胡汤对化学性肝纤维化小鼠的保护作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(5): 481-488.
Wu F R, Ning L J, Zhou R. Protective effects of Xiaochaihu Decoction on chemical hepatic fibrosis in mice [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2020, 25(5): 481-488.
- [28] Shah M D, D'Souza U J A, Iqbal M. The potential protective effect of *Commelina nudiflora* L. against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity in rats, mediated by suppression of oxidative stress and inflammation [J]. Environ Health Prev Med, 2017, 22(1): 66.
- [29] Lachowski D, Cortes E, Rice A, et al. Matrix stiffness modulates the activity of MMP-9 and TIMP-1 in hepatic stellate cells to perpetuate fibrosis [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 7299.
- [30] Fan C, Ma Y Z, Chen S, et al. Comprehensive analysis of the transcriptome-wide m6A methylation modification difference in liver fibrosis mice by high-throughput m6A sequencing [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 767051.
- [31] 谢苏杰, 杨悦, 赖渤文, 等. m⁶A 修饰在肝纤维化中的研究进展 [J]. 生命科学, 2023, 35(4): 472-479.
Xie S J, Yang Y, Lai B W, et al. Research progress on m6A modification in liver fibrosis [J]. Chin Bull Life Sci, 2023, 35(4): 472-479.
- [32] Hu J Y, Liu Y Y, Pan Z, et al. Eupatilin ameliorates hepatic fibrosis and hepatic stellate cell activation by suppressing β -catenin/PAI-1 pathway [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5933.
- [33] Qu W, Huang H, Li K, et al. Danshensu-mediated

- protective effect against hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2014, 62(6): 348-353.
- [34] Reyes M T, Mourelle M, Hong E, et al. Caffeic acid prevents liver damage and ameliorates liver fibrosis induced by CCl₄ in the rat [J]. *Drug Dev Res*, 1995, 36(3): 125-128.
- [35] Wu C, Chen W Y, Ding H Y, et al. Salvianolic acid B exerts anti-liver fibrosis effects via inhibition of MAPK-mediated phospho-Smad2/3 at linker regions in vivo and in vitro [J]. *Life Sci*, 2019, 239: 116881.
- [36] Salam O M, Shaffie N M, Sleem A. Hepatoprotective effects of citric acid and aspartame on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats [J]. *EXCLI J*, 2009, 8:41-49.
- [37] Li C M, Jiang W L, Zhu H B, et al. Antifibrotic effects of protocatechuic aldehyde on experimental liver fibrosis [J]. *Pharm Biol*, 2012, 50(4): 413-419.
- [38] Sami D H, Soliman A S, KhowaILEEd A A, et al. The protective effect of 7-hydroxycoumarin against cisplatin-induced liver injury is mediated via attenuation of oxidative stress and inflammation and upregulation of Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30(33): 80181-80191.
- [39] Luangmonkong T, Suriguga S, Mutsaers H A M, et al. Targeting oxidative stress for the treatment of liver fibrosis [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2018, 175: 71-102.
- [40] Forsberg M M, Juvonen R O, Helisalmi P, et al. Lack of increased oxidative stress in catechol-*O*-methyltransferase (COMT)-deficient mice [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2004, 370(4): 279-289.
- [41] Ostadkarampour M, Putnins E E. Monoamine oxidase inhibitors: A review of their anti-inflammatory therapeutic potential and mechanisms of action [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 676239.
- [42] Yang Z M, Mo Q Y, He J M, et al. Mitochondrial-targeted and near-infrared fluorescence probe for bioimaging and evaluating monoamine oxidase A activity in hepatic fibrosis [J]. *ACS Sens*, 2020, 5(4): 943-951.
- [43] Manna S K, Patterson A D, Yang Q, et al. Identification of noninvasive biomarkers for alcohol-induced liver disease using urinary metabolomics and the Ppara-null mouse [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(8): 4176-4188.
- [44] Thilakarathna W P D W, Langille M G I, Vasantha Rupasinghe H P. Hepatotoxicity of polymeric proanthocyanidins is caused by translocation of bacterial lipopolysaccharides through impaired gut epithelium [J]. *Toxicol Lett*, 2023, 379: 35-47.
- [45] 率琪. 非酒精性脂肪性肝病肝纤维化程度与甲状腺激素水平的相关性分析 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2022.
- Shuai Q. Analysis of the correlation between the degree of liver fibrosis and thyroid hormone levels in non-alcoholic fatty liver disease [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2022.
- [46] Harrison S A, Bedossa P, Guy C D, et al. A phase 3, randomized, controlled trial of resmetirom in NASH with liver fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2024, 390(6): 497-509.
- [47] Gao N, Li J, Li M R, et al. Higher activity of alcohol dehydrogenase is correlated with hepatic fibrogenesis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018, 367(3): 473-482.
- [48] Lan Y W, Chen W R, Yen C, et al. Aldo-keto reductase family 1 member A1 (AKR1A1) deficiency exacerbates alcohol-induced hepatic oxidative stress, inflammation, steatosis, and fibrosis [J]. *BioRxiv*, 2022: 2022.12.07.519420.
- [49] Cao W, Zhou Y, Li Y, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of combination therapy with taurine, epigallocatechin gallate, and genistein on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 232(1): 233-245.
- [50] Liu Q, Li J J, Li X, et al. Advances in the understanding of the role and mechanism of action of PFKFB3-mediated glycolysis in liver fibrosis (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2024, 54(6): 105.
- [51] Yang C, Rodionov D A, Rodionova I A, et al. Glycerate 2-kinase of *Thermotoga maritima* and genomic reconstruction of related metabolic pathways [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(5): 1773-1782.
- [52] Chon J, Stover P J, Field M S. Targeting nuclear thymidylate biosynthesis [J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 53: 48-56.
- [53] Yang M L, Wang D Y, Wang X Y, et al. Role of folate in liver diseases [J]. *Nutrients*, 2024, 16(12): 1872.
- [54] Mahamid M, Mahroum N, Bragazzi N L, et al. Folate and B12 levels correlate with histological severity in NASH patients [J]. *Nutrients*, 2018, 10(4): 440.
- [55] Tripathi M, Singh B K, Zhou J, et al. Vitamin B12 and folate decrease inflammation and fibrosis in NASH by preventing syntaxin 17 homocysteinylation[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(5): 1246-1255.