

麸炒苍术醇提物通过代谢调节缓解胆管结扎诱导小鼠肝纤维化作用

王琦^{1,2,3}, 王燕^{1,2,3}, 王光忠^{1,2,3}, 刘艳菊^{1,2,3}, 涂济源^{1,2,3}, 周仲实^{1,2,3*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065
2. 湖北省中药炮制技术工程中心, 湖北 武汉 430065
3. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 研究麸炒苍术醇提物 (ethanol extract of bran-fried *Atractylodis Rhizoma*, EBAR) 对胆管结扎诱导的小鼠肝纤维化模型的治疗作用, 并从调节肝脏代谢物的角度探讨其治疗肝纤维化的机制。方法 C57BL/6 小鼠采用胆管结扎法构建肝纤维化模型, 给予 EBAR 干预 14 d。检测血清中肝功能及炎症因子水平; 采用免疫组化、qRT-PCR、Western blotting 检测肝组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I型胶原 (collagen type I, COL1A1) 和 COL4A2 表达。采用转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 诱导 JS1 细胞建立肝星状细胞活化模型, 给予 EBAR 干预后, 采用免疫荧光、qRT-PCR、Western blotting 检测 α -SMA、COL1A1、COL4A2 和基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP1) 表达。采用网络药理学、分子对接、分子动力学模拟和代谢组学研究 EBAR 抗肝纤维化的潜在机制, 并采用 Western blotting 验证关键机制。结果 肝纤维化小鼠模型中, EBAR 显著降低小鼠的肝脏指数及血清中肝功能指标和炎症因子水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著抑制肝组织 α -SMA、COL1A1 和 COL4A2 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 明显减轻肝脏纤维组织增生和胶原沉积, 改善肝脏组织的病理损伤。网络药理学分析显示, 苍术主要通过调控腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 等信号通路发挥抗肝纤维化的作用。代谢组学分析显示, EBAR 影响肝纤维化小鼠模型肝脏组织中多种代谢物的生成, 尤其是柠檬酸循环和脂肪酸代谢等相关途径代谢物。进一步的机制研究表明, EBAR 通过促进 AMPK 的磷酸化 ($P < 0.05$ 、 0.01), 激活 AMPK/沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1)/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , PGC-1 α) 信号通路, 从而发挥抗肝纤维化作用。结论 EBAR 通过激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路, 调节肝脏能量代谢, 发挥抗纤维化作用。

关键词: 麸炒苍术; 肝纤维化; 代谢组学; 网络药理学; 分子动力学; 柠檬酸循环; 脂肪酸代谢; 苍术素; 白术内酯I; 白术内酯II; 白术内酯III; AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)05-1742-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.05.014

Ethanol extract of bran-fried *Atractylodis Rhizoma* alleviates bile duct ligation-induced liver fibrosis in mice through metabolic regulation

WANG Qi^{1,2,3}, WANG Yan^{1,2,3}, WANG Guangzhong^{1,2,3}, LIU Yanju^{1,2,3}, TU Jiyuan^{1,2,3}, ZHOU Zhongshi^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China
2. Hubei Provincial Engineering Technology Research Center for Processing of Chinese Medicinal Materials, Wuhan 430065, China
3. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of ethanol extract of bran-fried Cangzhu (*Atractylodis Rhizoma*) (EBAR) on bile duct ligation-induced liver fibrosis in mice and explore the mechanism of its treatment for liver fibrosis from the perspective of regulating hepatic metabolites. **Methods** C57BL/6 mice were subjected to bile duct ligation to establish a liver fibrosis model and treated with EBAR for 14 d. Levels of liver function markers and inflammatory cytokines in serum were measured. The expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I (COL1A1) and COL4A2 in liver tissues were detected by immunohistochemistry,

收稿日期: 2025-08-21

基金项目: 湖北省自然科学基金创新发展联合基金项目 (2025AFD477)

作者简介: 王琦, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制工艺、质量控制及原理研究。E-mail: 2609160413@qq.com

*通信作者: 周仲实, 男, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理、中药炮制相关研究。E-mail: monkeyzys@126.com

qRT-PCR and Western blotting. JS1 cells were induced with transforming growth factor- β (TGF- β) to establish a hepatic stellate cell activation model. After EBAR intervention, the expressions of α -SMA, COL1A1, COL4A2 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1) were examined by immunofluorescence, qRT-PCR and Western blotting. Network pharmacology, molecular docking, molecular dynamics simulation and metabolomics were employed to investigate the potential mechanisms of EBAR against liver fibrosis, and key mechanisms were validated by Western blotting. **Results** In the liver fibrosis mouse model, EBAR significantly reduced liver index, serum liver function indicators and inflammatory cytokine levels ($P < 0.05, 0.01$), significantly inhibited the expressions of α -SMA, COL1A1 and COL4A2 in liver tissues ($P < 0.05, 0.01$), significantly alleviated hepatic fibrous tissue hyperplasia and collagen deposition and improved pathological damage in liver tissue. Network pharmacology analysis revealed that *Actractylodis Rhizoma* exerts anti-hepatic fibrotic effects primarily by regulating signaling pathways such as adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK). Metabolomic analysis showed that EBAR affected the generation of various metabolites in liver tissues of liver fibrosis mouse model, particularly metabolites related to the citric acid cycle and fatty acid metabolism. Further mechanistic studies demonstrated that EBAR exerted anti-hepatic fibrotic effects by promoting AMPK phosphorylation ($P < 0.05, 0.01$) and activating AMPK/silent information regulator 1 (SIRT1)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) signaling pathway. **Conclusion** EBAR exerts anti-fibrotic effects by activating AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway and regulating hepatic energy metabolism.

Key words: bran-fried *Actractylodis Rhizoma*; liver fibrosis; metabolomics; network pharmacology; molecular dynamics; citric acid cycle; fatty acid metabolism; atractylodin; atractylenolide I; atractylenolide II; atractylenolide III; AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway

肝纤维化是由各种因素引起的慢性肝损伤而产生的修复反应,表现为肝星状细胞活化、细胞外基质过度沉积^[1-2]。肝纤维化患病情况严峻,全球一般人群中晚期肝纤维化与肝硬化患病率分别为3.3%和1.3%,且呈上升趋势^[3]。目前,临床缺乏特异性抗纤维化药物,现有药物如甘草酸类制剂、糖皮质激素等存在诸多不良反应,如假性醛固酮增多等症、代谢紊乱等^[4-5],因此寻找治疗肝纤维化的新型药物迫在眉睫。中医药因其辨证论治、整体观和多靶点作用的特点在治疗肝纤维化方面具有显著优势,具有重要的开发价值。

现代中医药研究表明,肝纤维化的发病机制复杂多样。肝郁脾虚是肝纤维化常见的证型之一,基于此,中医在治疗肝纤维化时多会考虑以疏肝健脾为主要方法^[6-7]。苍术为菊科植物茅苍术 *Actractylodes lancea* (Thunb.) DC. 或北苍术 *A. chinensis* (DC.) Koidz. 的干燥根茎,具有燥湿健脾的功效。临床苍术的运用经验方如犀泽汤(颜德馨方)、益肝汤等具有疏肝活血的作用,对慢性肝炎患者和早期肝硬化患者均有良好的疗效^[8]。针对脾虚湿盛患者,由于苍术麸炒后燥性减弱,健脾作用增强,麸苍术的使用相比生苍术更为广泛。苍术麸炒后的几种增量成分被证实具有良好的抗炎和保肝活性,如白术内酯I能够保护对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤,减少胰岛素信号传导,减轻非酒精性脂肪肝;白术内酯II能够改善肝脏炎症因子的表达,抑制肝组织炎症损伤;白术内酯III能够改善胰

岛素信号通路,抑制肝脏糖异生、促进肝糖原合成等^[9-11]。提示苍术具有抗肝纤维化潜力,但具体机制有待深入研究。

代谢异常与肝纤维化的发生发展密切相关,研究显示,代谢紊乱会诱导肝星状细胞活化和炎症因子释放,从而促进纤维化^[12]。流行病学研究表明,代谢综合征如肥胖、糖尿病、高血压患者的肝纤维化风险较健康人群显著升高^[13],系统干预代谢紊乱对阻断肝纤维化进展具有关键意义。课题组前期研究发现苍术提取物能够调节多种代谢产物的水平,干扰炎症相关代谢通路,影响炎症信号的传导与调控,发挥治疗作用;且苍术有效成分能通过抑制谷氨酰胺代谢来减轻肝纤维化^[14-16]。提示苍术可能通过调节机体代谢发挥抗肝纤维化的作用。基于此,本研究采用网络药理学分析并筛选出苍术中可能作用于肝纤维化的关键靶点,采用分子对接和分子动力学验证苍术中活性成分与关键靶点之间的结合能力和可靠性,同时建立胆管结扎诱导的肝纤维化模型,结合代谢组学全面分析麸炒苍术醇提物(ethanol extract of bran-fried *Actractylodis Rhizoma*, EBAR)对肝纤维化小鼠代谢的影响,综合探究EBAR治疗肝纤维化的药效及机制,以期麸炒苍术的临床创新应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF级雄性C57BL/6小鼠40只,6周龄,体质量18~22g,购自辽宁长生生物技术有限公司,

许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。动物饲养于温度 (23±1) °C、相对湿度 (65±5)% 的环境中, 12 h 光照/黑暗循环, 自由进食饮水, 适应性饲养 7 d。动物实验经湖北中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 00273385)。

小鼠肝星形 JS1 细胞 (批号 HTX2388) 购自华拓生物科技有限公司。

1.2 药材

苍术采自湖北省英山县, 经湖北中医药大学王光忠教授鉴定为菊科植物茅苍术 *A. lancea* (Thunb.) DC。

1.3 药品与试剂

对照品白术内酯I (批号 PS010510)、白术内酯II (批号 PS010511)、白术内酯III (批号 PS010512)、苍术素 (批号 PS010182) 购自成都普什生物技术有限公司, 质量分数均大于 98%; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 60004-1-Ig)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (批号 14395-1-AP)、I型胶原 (collagen type I, COL1A1) 抗体 (批号 67288-1-Ig)、甲醇 (批号 67-56-1)、戊巴比妥钠购自德国 Merck 公司; 乙腈 (批号 51101) 购自美国赛默飞世尔科技有限公司; *N*-甲基-*N*-三甲基硅基三氟乙酸酐 (BSTFA, 批号 FM05241802)、甲氧胺盐酸盐 (批号 BCBZ8981)、吡啶 (批号 SHBK6453) 购自美国 Sigma Aldrich 公司; 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β , 批号 PKSM041167)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (批号 E-EL-M0037c)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 E-EL-M3063)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 E-EL-M0044c) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; ABScript III RT SuperMix (批号 RK20429) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 通用 SYBR qPCR Master Mix (批号 Q711-02) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 检测试剂盒 (批号 C009-2-1)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 检测试剂盒 (批号 C010-2-1) 购自南京建成生物工程研究所。腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 抗体、p-AMPK 抗体、沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 抗

体、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , PGC-1 α) 抗体购自美国 CST 公司。

1.4 仪器

FA1004 型电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); BTC-8J 型超声波清洗机 (鼎泰生化科技设备制造有限公司); Eclipse Ci 型正置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); 1580R 型多功能离心机 (韩国 Gene Company Limited 公司); Nano-600 型超微量核酸蛋白测定仪 (上海嘉鹏科技有限公司); qTOWER3G 型荧光定量 PCR 仪 (德国 Analytik Jena AG 公司); Agilent 1260 型液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); TRACE 1300 型气相色谱-质谱系统 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 苍术活性成分的筛选和靶点预测 使用 TCMSP 数据库 (<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>), 设定口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 $\geq 0.18\%$, 筛选苍术的活性成分; 使用 SYMMAP 数据库 (<http://www.symmap.org/>), 设定口服生物利用度 $\geq 30\%$, 筛选苍术的活性成分。合并 2 个数据库的筛选结果, 并删除重复成分, 将活性成分对应的 SMILES 号导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 预测活性成分靶点。

2.1.2 肝纤维化相关基因的收集 通过 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 及 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>), 检索关键词 “liver fibrosis” 和 “hepatic fibrosis”, 获得肝纤维化的相关靶点基因名。将 3 个数据库的结果合并, 以 2 倍中位数筛选出重要靶点并删除重复靶点, 最终获得肝纤维化的相关靶点。将苍术活性成分潜在靶点与肝纤维化疾病靶点导入微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>), 绘制韦恩图, 得到交集靶点, 即苍术干预肝纤维化的作用靶点, 并运用 Cytoscape 3.10.0 软件构建 “药物-活性成分-靶点-疾病” 网络图。

2.1.3 靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将交集靶点上传至 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 设置物种为 “homo sapiens”, 其他均为默认条件, 得到 PPI 网络, 导入 Cytoscape 3.10.0 软件中, 通过 Centiscape 2.2

插件中的度值筛选出核心靶点。将核心靶点导入 STRING 数据库中,获得核心靶点的相互作用关系,导入 Cytoscape 3.10.0 软件绘制核心靶点 PPI 网络。

2.1.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将“2.1.3”项下筛选得到的核心靶点上传至 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>),物种选择为“*homo sapiens*”,列表类型设置为“*genelist*”,设置 SELECT identifier 为“OFFICIAL_GENE_SYMBOL”,进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。GO 和 KEGG 分析分别选择 *P* 值排名前 10 和前 15 的结果,通过微生信平台进行可视化。

2.2 分子对接与分子动力学模拟

从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载活性成分的结构文件, PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶点的蛋白 3D 结构文件,通过 AutodockTools 1.5.6 软件处理并保存成 *pdqt* 文件。使用 Autodockvina 1.1.2 软件将配体与受体进行分子对接,计算活性成分与靶点蛋白的最低结合效能,在 PyMol 软件中对结果进行可视化。

使用 Gromacs 2022 软件对复合物进行 100 ns MD 模拟。蛋白质采用 CHARMM 36^[17]力场参数,配体拓扑结构由 GAFF2 力场参数构建。采用周期性边界条件,将蛋白质-配体复合物放置在立方盒中。采用 TIP3P 水模型将水分子填充到盒子中,形成周期边界为 1.2 nm 的水盒^[18]。使用粒子网格 Ewald 和 Verlet 算法分别处理静电相互作用,随后进行 100 000 步的等温等容系综平衡和等温等压系综平衡,偶合常数为 0.1 ps,持续时间为 100 ps 模拟。范德华和库仑相互作用均使用 1.0 nm 的截止值计算。系统在恒定温度 (310 K) 和恒压 (100 kPa) 下利用 Gromacs 2022 软件进行分子动力学模拟,共时长 100 ns。

2.3 EBAR 的制备及成分分析

2.3.1 EBAR 的制备 按《中国药典》2025 年版规定,取苍术片,照麸炒法 (通则 0213) 炒至表面深黄色,即得麸炒苍术。取 100 g 麸炒苍术饮片,粉碎,用 10 倍体积的 80% 乙醇超声提取 1 h,滤过,滤液浓缩并真空干燥,提取率为 30.0%。

2.3.2 EBAR 的成分分析

(1) 供试品溶液的制备:取 10 g 麸炒苍术粉末于 100 mL 带塞子的锥形烧瓶中,加入 50 mL 80%

乙醇超声提取 1 h,吸取上清液并用 0.22 μ m 有机微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

(2) 混合对照品溶液的制备:白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术素对照品用甲醇配制成含白术内酯 I 0.786 mg/mL、白术内酯 II 0.074 mg/mL、白术内酯 III 0.077 mg/mL、苍术素 0.071 mg/mL 的混合对照品溶液,于 4 $^{\circ}$ C 保存。

(3) 色谱条件:Agilent C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B),梯度洗脱:0~15 min, 45%~50% A; 15~25 min, 50%~56% A; 25~50 min, 56% A; 50~60 min, 56%~70% A; 60~70 min, 70%~80% A; 70~75 min, 80%~95% A。柱温 30 $^{\circ}$ C;体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μ L;紫外检测波长为 220 nm。

(4) 含量测定:按“2.3.2 (3)”项下方法进样测定,采用保留时间结合紫外吸收光谱特征进行定性分析,利用外标法 (标准曲线法) 结合峰面积进行定量,测定样品中白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III 和苍术素含量。

2.4 动物实验

2.4.1 剂量设定依据 根据《中国药典》2025 年版中苍术的临床标准剂量 (60 kg),成人的每日剂量为 150 mg/kg,人与小鼠之间的换算系数为 12.3,计算出小鼠的等效剂量为 1.845 g/kg。由于 EBAR 的提取率为 30%,故 EBAR 的等效剂量为 554 mg/kg。将等效剂量 (554 mg/kg) 设为低剂量组、4 倍剂量 (2 216 mg/kg) 设为高剂量组进行实验。

2.4.2 分组、造模与给药 将 40 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组和 EBAR 低、高剂量 (554、2 216 mg/kg) 组,每组 10 只。小鼠 ip 苯巴比妥钠麻醉,常规消毒皮肤后,用灭菌手术器械沿腹中线切开腹腔。除假手术组仅暴露胆管不结扎外,其余各组均用不可吸收外科缝线对胆总管进行双重结扎,逐层缝合腹壁肌肉及皮肤。术后 48 h 开始给药,假手术组和模型组 ig 生理盐水 (10 mL/kg),各给药组分别 ig 质量浓度为 0.055 4、0.221 6 g/mL 的 EBAR 溶液 (以生理盐水配制),1 次/d,连续给药 14 d。给药期间每日观察小鼠活动状态及进食情况。末次给药后 1 h,采用眼球摘除法采集全血于抗凝管中,随后通过颈椎脱臼法处死小鼠,取部分肝组织固定于 4% 多聚甲醛,其余冻存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

2.4.3 肝脏指数的测定 记录小鼠处死时的体质

量和肝脏质量, 计算肝脏指数。

肝脏指数=肝质量/体质量

2.4.4 血清中肝功能及炎症因子水平的检测 取全血, 4 °C、3 000×g 离心 15 min, 分离血清, 按照试剂盒说明书测定 ALT、AST 活性及 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平。

2.4.5 肝组织病理学检测 将置于 4%多聚甲醛中固定的肝组织取出, 进行乙醇脱水、石蜡包埋、切片, 经苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)、Masson 和 Sirius Red 染色后, 于显微镜下观察并拍照。

2.4.6 免疫组化法检测肝组织 α-SMA 和 COL1A1 表达 取肝组织石蜡切片, 经脱蜡至水化与抗原修复后, 分别滴加 α-SMA 和 COL1A1 一抗, 4 °C 湿盒孵育过夜; 次日, PBS 洗涤后, 滴加相应二抗, 室温孵育 30 min, 于显微镜下观察并拍照。

2.4.7 qRT-PCR 检测肝组织 α-SMA、COL1A1、COL4A2、TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 表达 取肝组织, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析^[19]。引物序列见表 1, 以 β-actin 作为内参基因, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的相对表达量。

2.4.8 Western blotting 检测肝组织 α-SMA、COL1A1 和 AMPK/SIRT1/PGC-1α 信号通路相关蛋白表达 取肝组织, 加入裂解液提取蛋白, 蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5%脱脂牛奶于室温封闭 2 h, 加

入一抗, 4 °C 孵育过夜; 洗涤后加入二抗(1:10 000), 室温孵育 1 h。用 ECL 化学发光检测试剂盒检测蛋白条带, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.4.9 肝脏代谢组学分析

(1) 样品制备: 取假手术组、模型组和 EBAR 低剂量组小鼠肝组织 50 mg, 研磨后加入 1 mL -80 °C 预冷的甲醇溶液, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。取上清液, 用氮气在 35 °C 下吹干。将样品溶解于含 80 μL 甲氧胺盐酸盐(20 mg/mL)的吡啶中, 离心 2 min, 37 °C 孵育 2 h。加入 80 μL BSTFA, 离心 2 min。将样品在 80 °C 水浴中孵育 15 min 以完成衍生化, 冷却 5 min, 涡旋 15 s, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集 150 μL 上清液至带衬垫的进样瓶中, 于 4 °C 保存。

(2) 气相色谱-质谱分析: 每组收集 6 个样本, 制备后 24 h 内使用气相色谱-质谱仪、色谱指纹相似度评价系统(2012 版)、Origin(2018 版)和 SIMCA 软件进行代谢组学分析。样品进样量为 1 μL, 进入配备 DB-5MS 毛细管柱(30.0 m×250 μm, 0.25 μm)的分流进样口, 条件如下: 初始炉温保持在 70 °C、2 min, 然后以 5 °C/min 的速率升至 300 °C 并保持 5 min。使用氦气作为载气, 进样器分流比为 10:1, 恒定体积流量为 1 mL/min。进样器和质谱仪的温度为 280 °C, 离子源温度为 200 °C。电子电离模式下的能量设置为 70 eV。扫描范围 m/z 50~650, 全扫描模式采集^[20]。

2.5 细胞实验

2.5.1 细胞培养 JS-1 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

2.5.2 细胞活力的检测 JS-1 细胞以 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中, 分别加入不同质量浓度(5、10、20、40、80、160、320、640 μg/mL)的 EBAR 溶液处理 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。加入 CCK-8 试剂, 孵育 2 h 后, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞活力。

2.5.3 细胞分组、造模与给药 设置对照组、模型组和给药组, 模型组和给药组加入 10 ng/mL TGF-β 预处理 24 h 以激活其纤维化表型^[21]。然后给药组加入不同质量浓度(20、40、80 μg/mL)的 EBAR 处理 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。

2.5.4 免疫荧光法检测 α-SMA 和 COL1A1 表达 JS-1 细胞接种于细胞爬片中并培养至适宜密度, 按

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/ bp
<i>β-actin</i>	F: GGATTCCTATGTGGGCGACGA	21
	R: GCGTACAGGGATAGCACAGC	20
<i>α-SMA</i>	F: CCTATCCCCGGACTAAGAC	20
	R: CCATCACCCCCTGATGTCTG	20
<i>COL1A1</i>	F: AAGCTGGA AACCTGGTCTG	20
	R: AGCACCATCATTCCACGAG	20
<i>COL4A2</i>	F: GGACAGACGAGACAACAGCA	20
	R: GAGCTGGCATAACATTGGCG	20
<i>TNF-α</i>	F: CTGTAGCCCACGTGGCAACT	20
	R: GGCTTGTCACCTCGAATTTGCTAA	24
<i>IL-1β</i>	F: GCTGAAAGCTCTCCACCTCA	20
	R: AGGCCACAGGTATTTTGTCG	20
<i>IL-6</i>	F: GAGGATACCACTCCCAACAGACC	23
	R: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	24
<i>TIMP1</i>	F: ACAGGTTTCCGGTTCGCCTAC	21
	R: CTGCAGGCAGTGATGTGCAA	20

TIMP1-基质金属蛋白酶组织抑制因子 1。

TIMP1-tissue inhibitor of metalloproteinases 1。

“2.5.3”项下方法处理后,用4%多聚甲醛固定15 min, PBS 洗涤后透化10 min, 5%牛血清白蛋白封闭30 min。加入 α -SMA 和 COL1A1 一抗, 4 °C 孵育过夜; PBS 洗涤后滴加荧光二抗, 室温避光孵育1 h。DAPI 复染核, 封片后于荧光显微镜下观察并采集图像。

2.5.5 qRT-PCR 检测 α -SMA、COL1A1、COL4A2 和 TIMP1 mRNA 表达 收集细胞, 按“2.4.7”项下方法检测各基因的相对表达量。引物序列见表1。

2.5.6 Western blotting 检测 α -SMA、COL1A1 和 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路相关蛋白表达 收集细胞, 按“2.4.8”项下方法检测各蛋白的相对表达量。

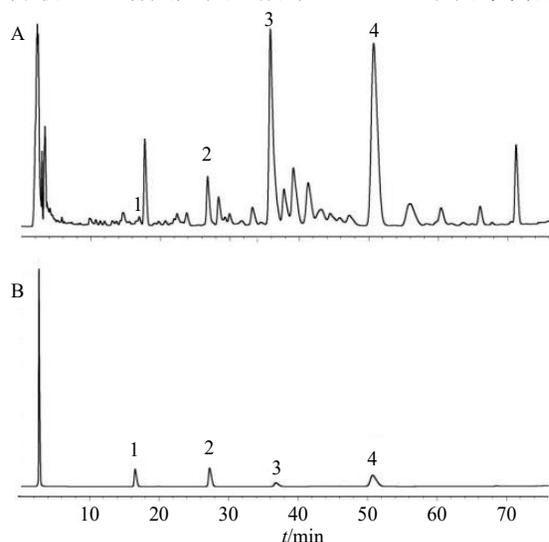
2.6 统计学分析

使用 GraphPad v8.0 软件进行统计分析, 采用 Shapiro-Wilk 检验评估正态分布和卡方检验。对正态分布数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于非正态分布或方差不齐的样本, 采用 Kruskal-Wallis 检验, 结果以中位数 (四分位数) 表示。RNA 测序结果使用 UW Genetics Ltd (2.0 版) 的 Dr. Tom Online 软件进行分析。

3 结果

3.1 EBAR 成分分析

采用高效液相色谱法对 EBAR 中主要成分进行分析。色谱图如图1所示, EBAR 中白术内酯 I、



1-白术内酯III; 2-白术内酯II; 3-白术内酯I; 4-苍术素。
1-atractylenolide III; 2-atractylenolide II; 3-atractylenolide I; 4-atractylodin.

图1 EBAR (A) 和混合对照品溶液 (B) 的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of EBAR (A) and mixed reference solution (B)

白术内酯II、白术内酯III、苍术素的质量分数分别为1.333%、0.067%、0.003%、0.392%, 符合《中国药典》2025年版规定。

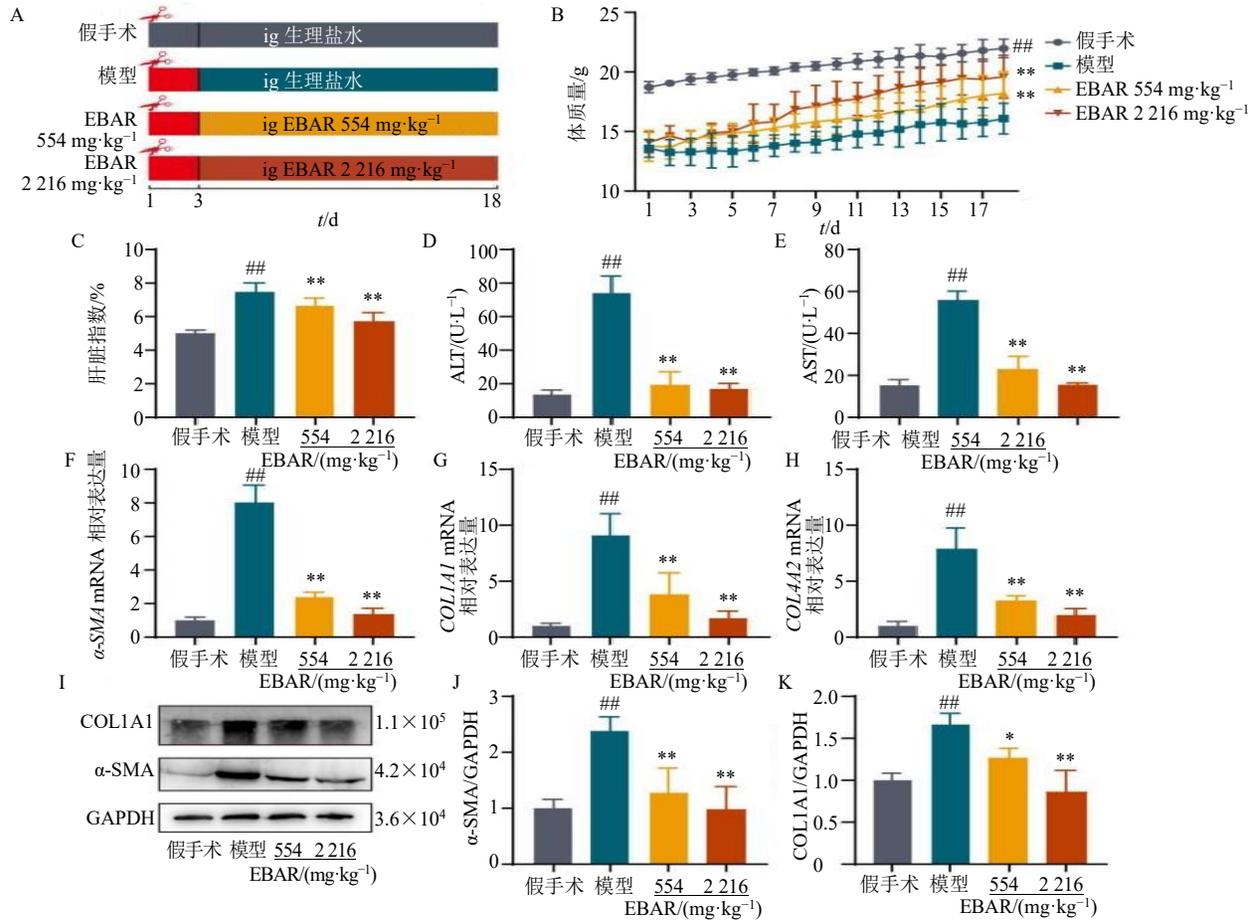
3.2 EBAR 减轻肝纤维化模型小鼠的肝损伤

图2-A 为动物实验设计图。胆管结扎造成肝外胆道梗阻, 引起肝细胞发生缺血和坏死, 导致肝脏损伤。如图2-B 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 经 EBAR 治疗后小鼠体质量显著升高 ($P < 0.01$)。如图2-C~E 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肝脏指数和血清中 ALT、AST 活性显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 经 EBAR 治疗后小鼠肝脏指数和血清中 ALT、AST 活性显著降低 ($P < 0.01$), 表明 EBAR 能缓解 BDL 引起的肝损伤。

采用 qRT-PCR 检测肝组织中细胞外基质增殖相关基因 α -SMA 和胶原沉积基因 COL1A1、COL4A2 的表达, 结果如图2-F~H 所示, 与模型组比较, EBAR 显著下调小鼠肝组织 α -SMA、COL1A1、COL4A2 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。Western blotting 结果与 qRT-PCR 结果一致, 与模型组比较, EBAR 显著下调小鼠肝组织 COL1A1 和 α -SMA 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01, 图2-I~K)。此外, EBAR 显著抑制小鼠肝组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$, 图3-A), 同时显著降低血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的释放 ($P < 0.05$ 、0.01, 图3-B)。以上结果表明, EBAR 对胆管结扎诱导的肝纤维化具有保肝和抗炎的作用。

3.3 EBAR 改善肝纤维化模型小鼠的肝纤维化

肝组织形态学观察结果 (图4-A) 显示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肝脏表面更粗糙, 出现黄色斑点; 与模型组比较, 各给药组小鼠肝脏表面更光滑, 黄色斑点减少。HE 染色结果 (图4-B) 显示, 模型组小鼠肝实质坏死, 肝小叶结构被破坏和胶原沉积; 给予 EBAR 干预后, 肝组织以上病变显著减轻。采用 Masson 和 Sirius Red 染色检测肝组织中的胶原沉积情况, 以评估纤维化的程度, 结果见图4-C、D, 模型组小鼠肝脏门静脉区有大量的胶原蛋白沉积, 甚至扩散到肝实质部分; 给予 EBAR 干预后, 仅在肝门附近有少量的胶原沉积, 而在肝实质内没有明显的胶原沉积。 α -SMA 和 COL1A1 的免疫组化结果 (图4-E、F) 显示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肝组织有较多 α -SMA 和 COL1A1 的沉积; 与模型组比较, 各给药组肝组织 α -SMA 和 COL1A1



A-动物实验设计图; B-体质量变化; C-肝脏指数; D、E-肝功能; F~H-肝组织 α -SMA、COL1A1 和 COL4A2 mRNA 表达; I~K-肝组织 α -SMA 和 COL1A1 蛋白表达; 与假手术或对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$, 下图同。

A-animal experiment design diagram; B-body weight changes; C-liver index; D, E-liver function; F~H-mRNA expressions of α -SMA, COL1A1 and COL4A2 in liver tissue; I~K-protein expressions of α -SMA and COL1A1 in liver tissue; $##P < 0.01$ vs sham or control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 2 EBAR 对肝纤维化模型小鼠肝损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of EBAR on liver injury in mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

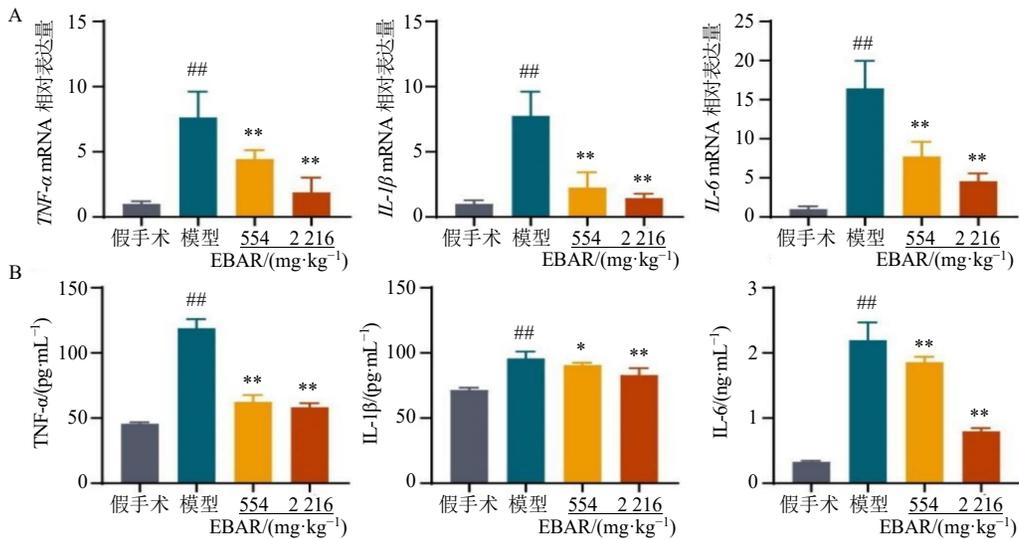
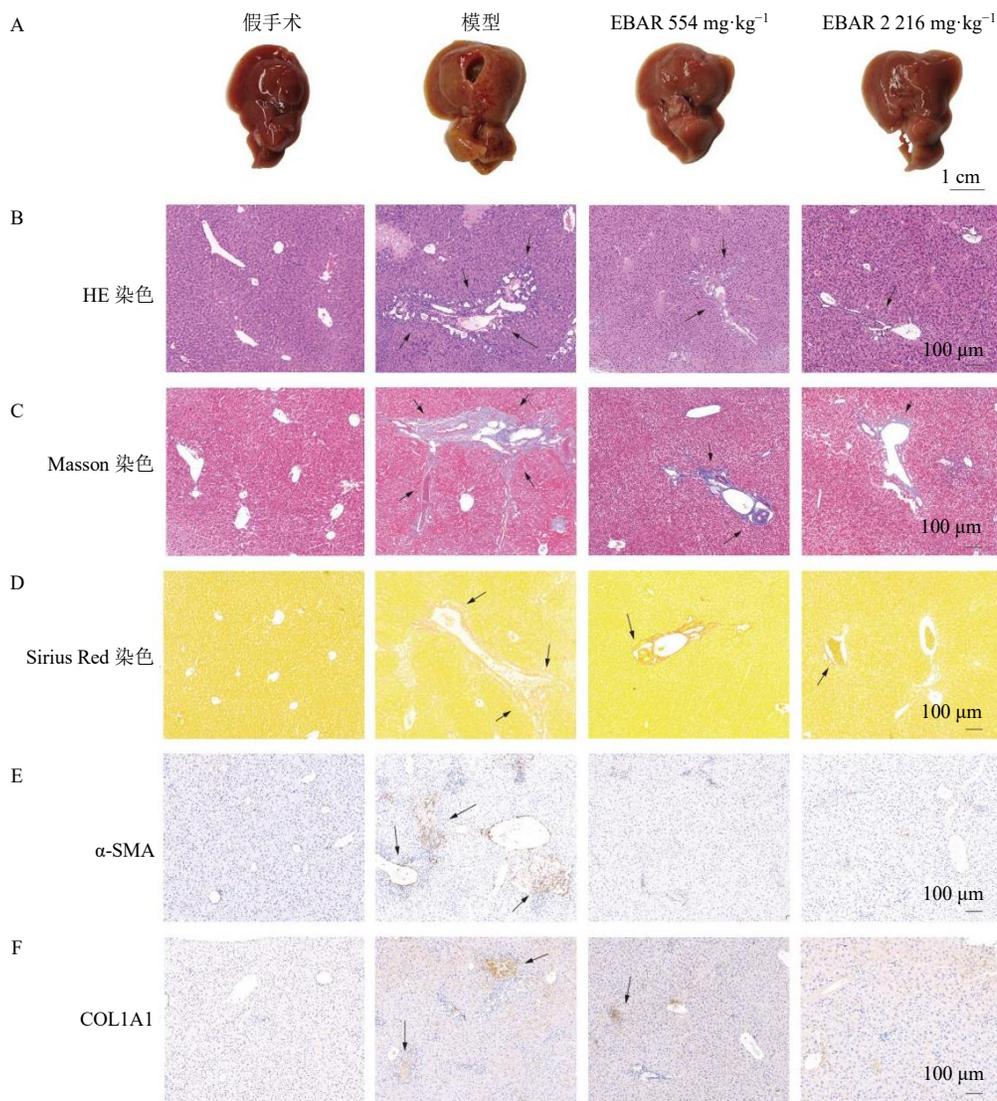


图 3 EBAR 对肝纤维化模型小鼠肝组织炎症因子表达 (A) 和血清中炎症因子水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of EBAR on expressions of inflammatory factors in liver tissue (A) and levels of inflammatory factors in serum (B) of mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-肝组织外观形态；B-肝组织 HE 染色（×100），箭头指向肝细胞坏死、炎症细胞浸润区域；C-肝组织 Masson 染色（×100），箭头指向蓝色的胶原纤维沉积；D-肝组织 Sirius Red 染色（×100），箭头指向红色的胶原纤维；E、F-免疫组化检测肝组织 α -SMA 和 COL1A1 蛋白表达（×100），箭头指向活化的肝星状细胞和 COL1A1 的表达区域。

A-appearance and morphology of liver tissue; B-HE staining of liver tissue (× 100), arrow points to area of hepatocyte necrosis and inflammatory cells infiltration; C-Masson staining of liver tissue (× 100), arrow points to deposition of blue collagen fibers; D-Sirius Red staining of liver tissue (× 100), arrow points to red collagen fibers; E, F- α -SMA and COL1A1 protein expressions in liver tissue detected by immunohistochemistry (× 100), arrow points to activated hepatic stellate cells and expression region of COL1A1.

图 4 EBAR 对肝纤维化模型小鼠肝纤维化的影响 (n = 3)

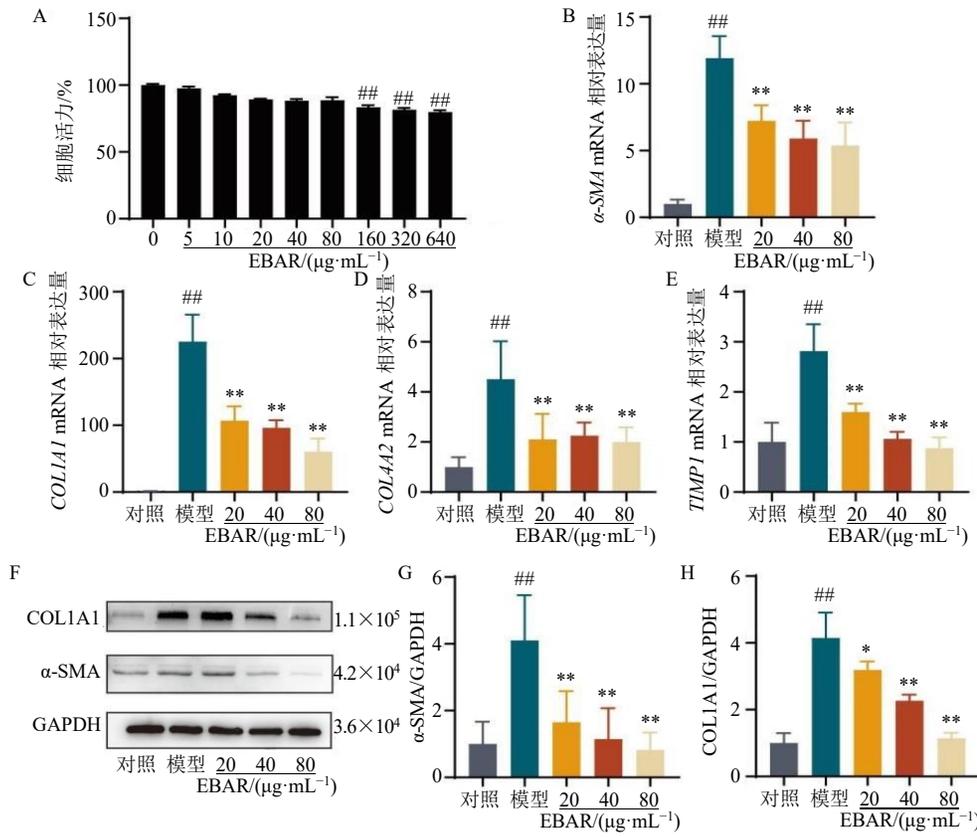
Fig. 4 Effect of EBAR on liver fibrosis in mice with liver fibrosis (n = 3)

表达减少。以上结果表明，EBAR 能减少胆管结扎诱导的肝脏胶原沉积和纤维化，具有改善肝纤维化的作用。

3.4 EBAR 抑制肝星状细胞的活化

为了进一步研究 EBAR 在治疗肝纤维化中的作用，在体外观察了 EBAR 对肝星状细胞活化的影响。如图 5-A 所示，5~80 μ g/mL 的 EBAR 对 JS-1 细胞活力无明显影响，因此选择 20、40、80 μ g/mL

3 个质量浓度，研究 EBAR 对肝星状细胞活化的抑制作用。qRT-PCR 结果（图 5-B~E）显示，与模型组比较，EBAR 显著下调肝纤维化相关基因 α -SMA、COL1A1、COL4A2 和 TIMP-1 的表达 ($P < 0.01$)。Western blotting 结果（图 5-F~H）显示，EBAR 显著下调 α -SMA 和 COL1A1 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01)，与 qRT-PCR 结果一致。免疫荧光结果（图 6）显示，与对照组比较，模型组 JS-1 细胞周围 α -



A-EBAR 对 JS-1 细胞活力的影响 ($n = 6$); B~E- α -SMA、COL1A1、COL4A2 和 TIMP1 mRNA 表达 ($n = 6$); F~H- α -SMA 和 COL1A1 蛋白表达 ($n = 3$)。 A-effect of EBAR on viability of JS-1 cells ($n = 6$); B—E- α -SMA, COL1A1, COL4A2 and TIMP1 mRNA expressions ($n = 6$); F—H- α -SMA and COL1A1 protein expressions ($n = 3$).

图 5 EBAR 抑制肝星状细胞的活化 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 EBAR inhibits activation of hepatic stellate cells ($\bar{x} \pm s$)

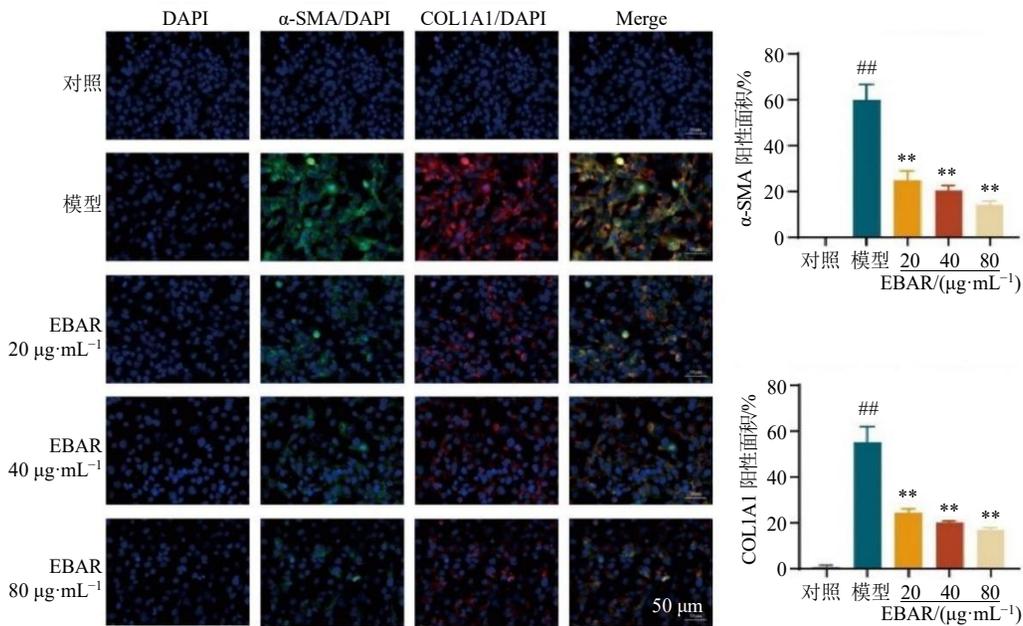


图 6 免疫荧光检测 EBAR 对 TGF- β 诱导的 JS-1 细胞 α -SMA 和 COL1A1 表达的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of EBAR on expressions of α -SMA and COL1A1 in TGF- β -induced JS-1 cells detected by immunofluorescence ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

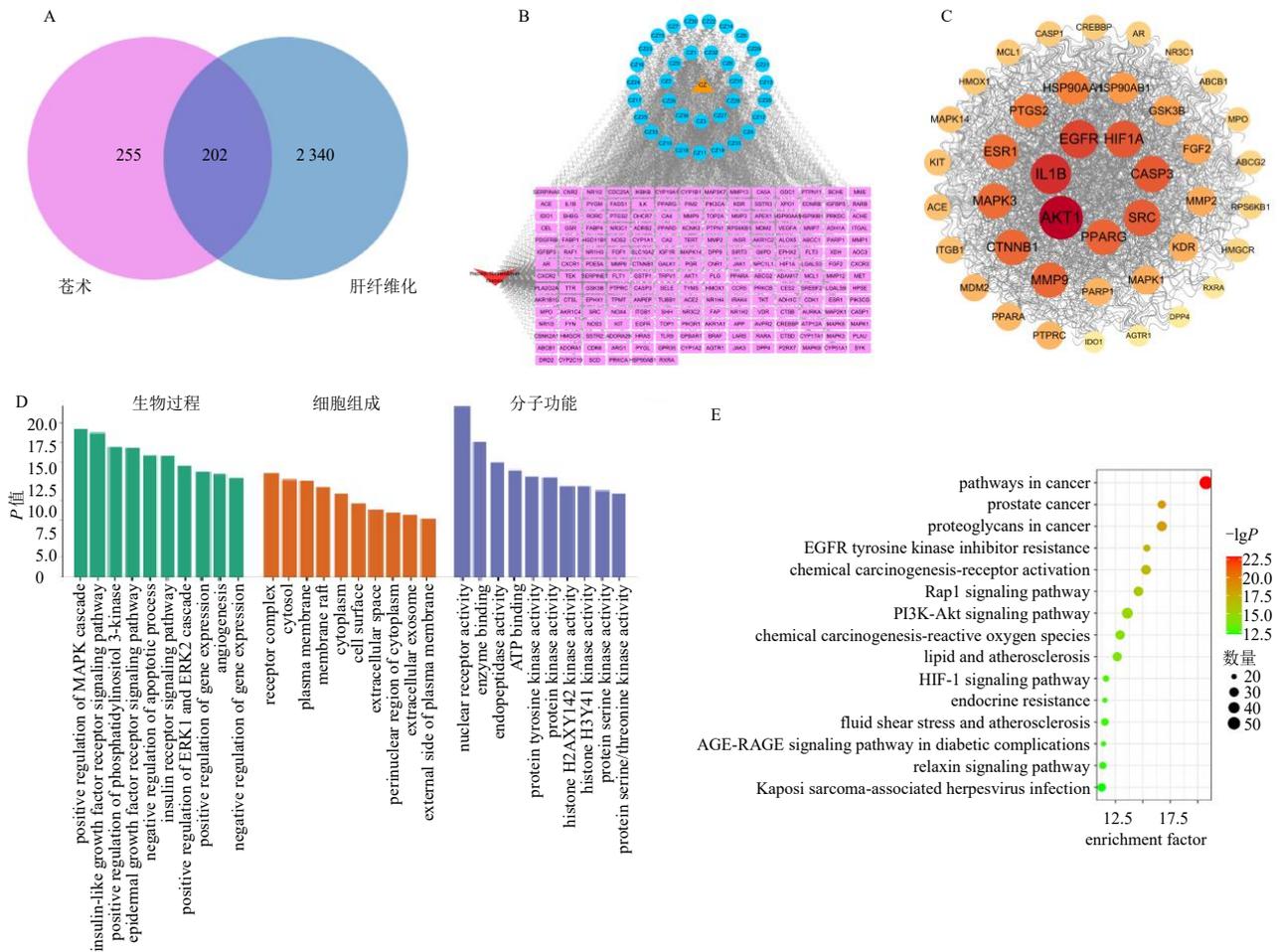
SMA 和 COLA1 荧光区域明显增多 ($P < 0.01$); 与模型组比较, EBAR 组 α -SMA 和 COLA1 荧光区域明显减少 ($P < 0.01$)。以上结果表明, EBAR 能够抑制 TGF- β 诱导的 JS-1 细胞活化, 减少 α -SMA 和 COLA1 的表达。

3.5 网络药理学分析

为了进一步探究 EBAR 缓解肝纤维化的具体机制, 通过网络药理学探究苍术活性成分作用于肝纤维化的关键靶点与通路。如图 7-A 所示, 获得苍术活性成分潜在靶点 457 个, 肝纤维化相关靶点共 2 542 个, 两者的交集靶点 202 个。“药物-活性成分-靶点-疾病”网络见图 7-B。经度值筛选出苍术治疗肝纤维化的核心靶点 42 个(图 7-C), 颜色越深、形状越大, 其度值则越大。

GO 功能富集分析得到 1 053 个富集条目, 包

括 731 个生物过程、95 个细胞组成和 227 个分子功能, P 值排名前 10 条的结果见图 7-D。其中生物过程主要包括胰岛素受体信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶的正向调控、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联的正向调控以及细胞外调节蛋白激酶 1 (extracellular regulated protein kinase 1, ERK1) 和 ERK2 级联的正向调控、基因表达的正向调控和负调控等过程; 细胞组成主要涉及细胞质基质、细胞膜、细胞表面、细胞质围核区等组分; 分子功能主要涉及三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合、蛋白激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性等功能。KEGG 通路富集分析得到苍术抗肝纤维化的重要相关信号通路共 169 条, 在 P 值排名前 15 条的通路中(图 7-E), 排除无关的广谱通路, 发现苍术治疗肝纤维化的主



A-苍术与肝纤维化靶点的 Venn 图; B-“药物-活性成分-靶点-疾病”网络; C-潜在作用靶点的 PPI 网络; D、E-GO 和 KEGG 富集分析。

A-Venn diagram of *Atractylodis Rhizoma* and liver fibrosis targets; B-“drug-active ingredient-target-disease” network; C-PPI network of potential therapeutic targets; D, E-GO and KEGG enrichment analysis.

图 7 网络药理学分析结果

Fig. 7 Results of network pharmacology analysis

要信号通路涉及磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGE)-晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 信号通路等。提示苍术可能通过调节细胞代谢与能量平衡、干预关键信号通路以及调控基因表达与细胞信号传

导等多途径协同作用, 发挥抗肝纤维化的作用。

3.6 分子对接与分子动力学模拟验证

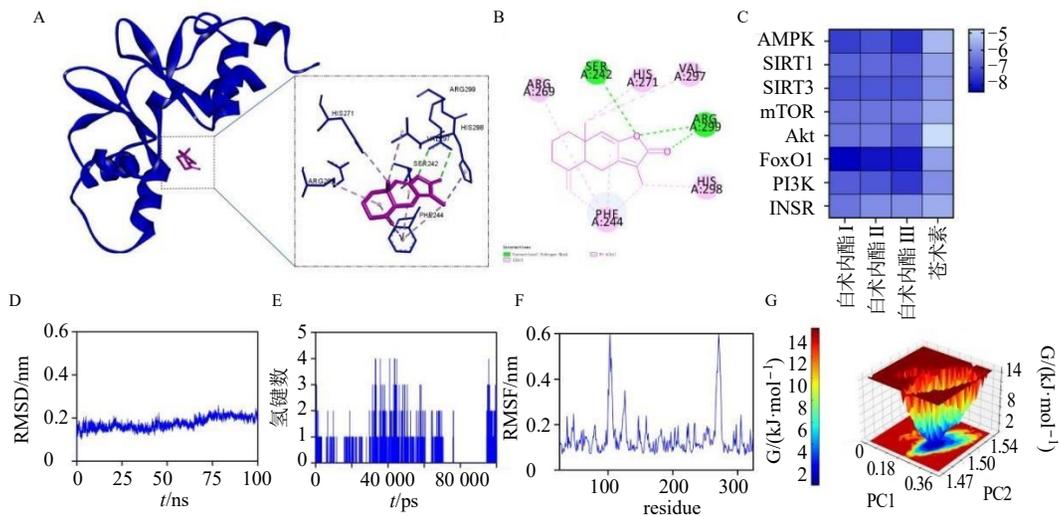
前期分析表明苍术可能通过调节细胞代谢与能量平衡发挥缓解肝纤维化的作用。基于 AMPK 作为能量代谢核心节点的生物学地位, 选取 AMPK 代谢通路相关蛋白与苍术主要活性成分进行分子对接验证。分子对接结果见表 2, 分子对接示例图如图 8-A、B 所示, 对接结果热图见图 8-C, 其中苍术素、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III 这 4 个

表 2 分子对接结果

Table 2 Molecular docking results

关键活性成分	关键靶点	PDBID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)	关键活性成分	关键靶点	PDBID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
苍术素	mTOR	1FAP	-5.6	白术内酯 II	mTOR	1FAP	-6.5
	AKT	1UNP	-5.0		AKT	1UNP	-6.4
	FoxO1	4LG0	-5.8		FoxO1	4LG0	-8.1
	PI3K	5DXU	-6.1		PI3K	5DXU	-7.0
	INSR	1I44	-5.6		INSR	1I44	-6.1
	AMPK	2UV4	-7.4		AMPK	2UV4	-7.6
	SIRT1	4I5I	-6.8		SIRT1	4I5I	-6.9
	SIRT3	4BN4	-7.1		SIRT3	4BN4	-7.1
白术内酯 I	mTOR	1FAP	-6.6	白术内酯 III	mTOR	1FAP	-6.5
	AKT	1UNP	-6.5		AKT	1UNP	-6.9
	FoxO1	4LG0	-8.4		FoxO1	4LG0	-8.1
	PI3K	5DXU	-6.9		PI3K	5DXU	-7.5
	INSR	1I44	-6.5		INSR	1I44	-6.1
	AMPK	2UV4	-7.1		AMPK	2UV4	-5.4
	SIRT1	4I5I	-6.7		SIRT1	4I5I	-5.8
	SIRT3	4BN4	-7.0		SIRT3	4BN4	-5.9

1 kcal·mol⁻¹=4.182 kJ·mol⁻¹.



A-白术内酯 I 与 AMPK 的 3D 结合构象; B-白术内酯 I 与 AMPK 的 2D 结合构象; C-苍术主要活性成分与 AMPK 通路相关蛋白结合能热图; D-RMSD 值; E-白术内酯 I 与 AMPK 的氢键数; F-白术内酯 I 与 AMPK 的 RMSF; G-白术内酯 I 与 AMPK 的吉布斯能图, 蓝色区域表示能量较低的构象, 红色表示能量较高的构象。

A-3D binding conformation of atractylenolide I with AMPK; B-2D binding conformation of atractylenolide I with AMPK; C-heatmap of binding energies between main active components of *Atractylodis Rhizoma* and proteins related to AMPK pathway; D-RMSD values; E-number of hydrogen bonds between atractylenolide I and AMPK; F-RMSF of atractylenolide I with AMPK; G-Gibbs energy diagram of atractylenolide I in interaction with AMPK, blue regions represent conformations with lower energy, red regions represent conformations with higher energy.

图 8 分子对接示例及分子动力学模拟结果

Fig. 8 Examples of molecular docking and results of molecular dynamics simulations

活性成分与能量代谢相关蛋白 AMPK 等均具有很好的结合能力(均 ≤ -5.0 kcal/mol)。表明 AMPK 通路在苍术治疗肝纤维化中发挥重要作用。

通过分子动力学模拟进一步分析验证对接复合物的稳定性及关键相互作用,优化药物结构。均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)是衡量蛋白质和配体构象稳定性的良好指标,也是衡量原子位置与起始位置偏差程度的指标。偏差越小,构象稳定性越好。因此,利用 RMSD 对仿真系统的平衡性进行评估。如图 8-D 所示,复合物体系在 10 ns 后达到平衡,最终 0.2 nm 上下波动。因此,苍术活性成分白术内酯 I 与 AMPK 结合时表现出较高稳定性。氢键(hydrogen bond)是维持蛋白质-配体复合物结构稳定性的重要非共价相互作用。如图 8-E 所示,在 100 ns 分子动力学模拟过程中,白术内酯 I 与 AMPK 之间形成的氢键数目在 0~4 个之间动态波动,多数时间维持在 1~3 个氢键,表明两者之间存在持续且动态的氢键相互作用。均方根涨落(root mean square fluctuation, RMSF)表示蛋白质中氨基酸残基的柔性大小。如图 8-F 所示,复合物体系物的 RMSF 值相对较低(大多在 0.3 nm 以下),因此其灵活性较低,稳定性较高。吉布斯自由能景观(Gibbs energy landscape)则反映了体系在不同构象状态下的能量分布和相对稳定性,能量越低表示构象越稳定,采样概率越高。如图 8-G 所示,复合物体系存在明显的低能量区域(深蓝色谷区),且能量阱较为陡峭,表明白术内酯 I 与 AMPK 结合后倾向于稳定在特定构象,构象采样集中,未出现明显的能量简并或过渡态,进一步证实了该结合模式的稳定性和特异性。

综上,苍术活性成分与 AMPK 蛋白结合作用良好,复合物体系结合稳定,且复合物具有良好的氢键作用。提示苍术发挥肝功能保护作用可能与调节代谢有关。

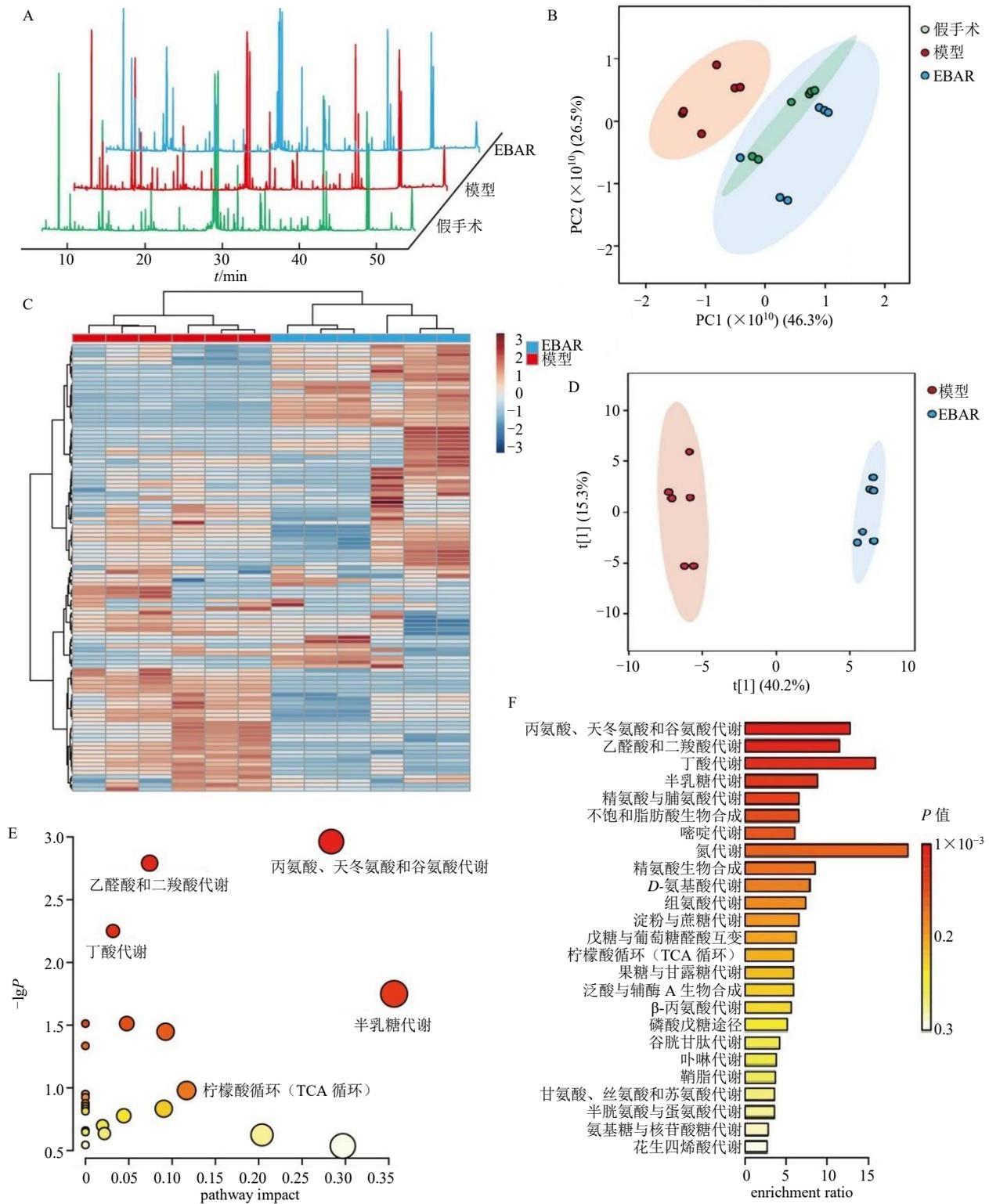
3.7 EBAR 缓解肝纤维化小鼠模型肝脏代谢紊乱

动物实验结果显示,EBAR 能够减轻胆管结扎引起的小鼠肝损伤,具有治疗肝纤维化的作用。利用网络药理学对其可能机制进行预测,发现其发挥抗肝纤维化作用与代谢有关。因此对假手术组、模型组、EBAR 低剂量组小鼠的肝脏进行代谢组学分析。总离子流图(图 9-A)显示,与假手术组比较,模型组小鼠的肝脏代谢产物发生了显著的变化,而 EBAR 组则能回调一些肝脏代谢产物的变化。主成

分分析(principle component analysis, PCA)结果显示,假手术组与模型组明显分开,EBAR 组与假手术组接近(图 9-B)。将模型组和 EBAR 组代谢物的值归一化后进行聚类分析,热图显示 EBAR 影响了肝脏内许多代谢物的产生(图 9-C)。正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)结果显示,EBAR 组与模型组明显分离(图 9-D)。以 OPLS-DA 模型的变量投影重要度(variable importance in projection, VIP) >1 、 $P<0.05$ 和 $|\log_2$ 差异倍数(fold change, FC) >1 为筛选条件,在模型组和 EBAR 组之间共筛选出 16 种代谢物。将这 16 种代谢物上传至 Metaboanalyst 6.0 网站(<https://www.metaboanalyst.ca/>),结果显示,这些代谢物主要富集在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,半乳糖代谢,乙醛酸和二羧酸代谢,丁酸代谢途径(图 9-E、F)。如图 10 所示,与模型组比较,EBAR 组花生四烯酸、L-丝氨酸、尿嘧啶、2-氨基马来酸、4-氨基丁酸、磷酸、L-谷氨酸、柠檬酸、油酸、棕榈油酸、D-(+)-纤维二糖水平显著降低($P<0.01$),L-(-)-阿拉伯糖醇、核糖醇、D-甘露糖、D-葡萄糖酸、尿苷水平显著升高($P<0.01$)。

3.8 EBAR 对肝纤维化小鼠模型和肝星状细胞活化模型 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路相关蛋白表达的影响

研究表明,AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路参与线粒体生物合成和氧化代谢,且是代谢紊乱的潜在靶点,在肝纤维化的治疗中起重要作用^[22]。因此,进一步在体内外实验中探究 EBAR 通过 AMPK 信号通路改善肝纤维化的作用。如图 11-A 所示,在肝纤维化小鼠模型中,与假手术组比较,模型组小鼠肝组织中 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,EBAR 各给药组小鼠肝组织中 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。如图 11-B 所示,在 TGF- β 诱导的肝星状细胞活化模型中,与对照组比较,模型组 JS-1 细胞中 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,EBAR 各给药组 JS-1 细胞中 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 、0.01)。以上结果表明,EBAR 可能通过调控 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路,从而发挥对肝纤维化的治疗作用。



A-各组小鼠肝脏样本的总离子流图; B-PCA 得分图; C-生物标记物的热图; D-OPLS-DA 得分图; E-肝脏 16 种差异代谢物相关代谢通路富集分析图; F-肝脏 16 种代谢物富集概览图。

A-total ion current chromatograms of liver samples from each group of mice; B-PCA score plot; C-heatmap of biomarkers; D-OPLS-DA score plot; E-enrichment analysis diagram of metabolic pathways related to 16 differential metabolites in liver; F-overview diagram of enrichment for 16 metabolites in liver tissue.

图 9 EBAR 缓解肝纤维化小鼠模型肝脏代谢紊乱

Fig. 9 EBAR alleviates liver metabolic disorders in mice with liver fibrosis

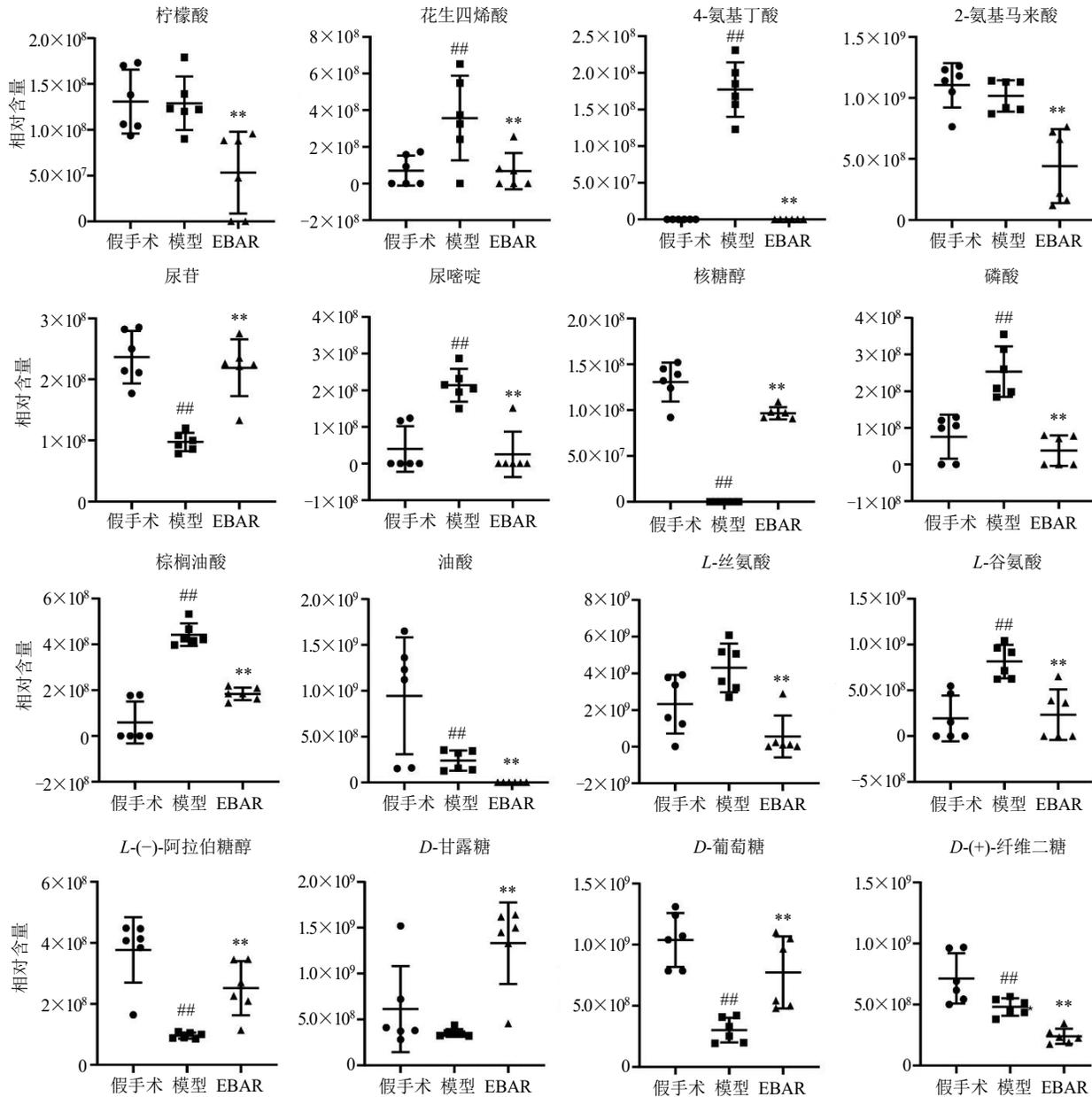


图 10 各组小鼠肝组织中 16 种代谢物含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Changes in content of 16 metabolites in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

肝纤维化是由于慢性肝损伤后细胞外基质的积累而引起的一种病理修复反应，是慢性肝病向肝硬化和肝癌进展过程中唯一可逆的过程^[23-24]。胆管结扎是模拟临床胆汁淤积性肝纤维化的经典模型，术后 1 周开始，造模动物会出现黄疸；术后 2、4、8 周时，AST、ALT、总胆红素、直接胆红素、碱性磷酸酶和 γ -谷氨酰转肽酶含量上升，血清透明质酸和层黏连蛋白、肝组织羟脯氨酸含量亦随胆管阻塞时间的延长而逐渐升高^[25]。本研究发现 EBAR 治疗显著降低了胆管结扎的小鼠血清中 ALT、AST 的活

性，部分逆转了肝功能障碍。此外，EBAR 治疗减轻了小鼠肝脏的质地不规则和肝肿大，为胆管结扎诱导的肝损伤提供了保护。肝星状细胞的激活以及由此产生的细胞外基质的过度积累是肝纤维化的核心事件^[26]。结果显示，与假手术组比较，模型组小鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 表达升高，而经 EBAR 干预后 α -SMA 和 COL1A1 表达降低。此外，免疫组化分析进一步证实了 EBAR 有效抑制了肝星状细胞的激活，显著减少了肝脏门静脉周围胶原沉积，降低了肝脏纤维性增生。以上结果表明 EBAR 对胆管结扎诱导的肝纤维化具有显著的抑制作用。

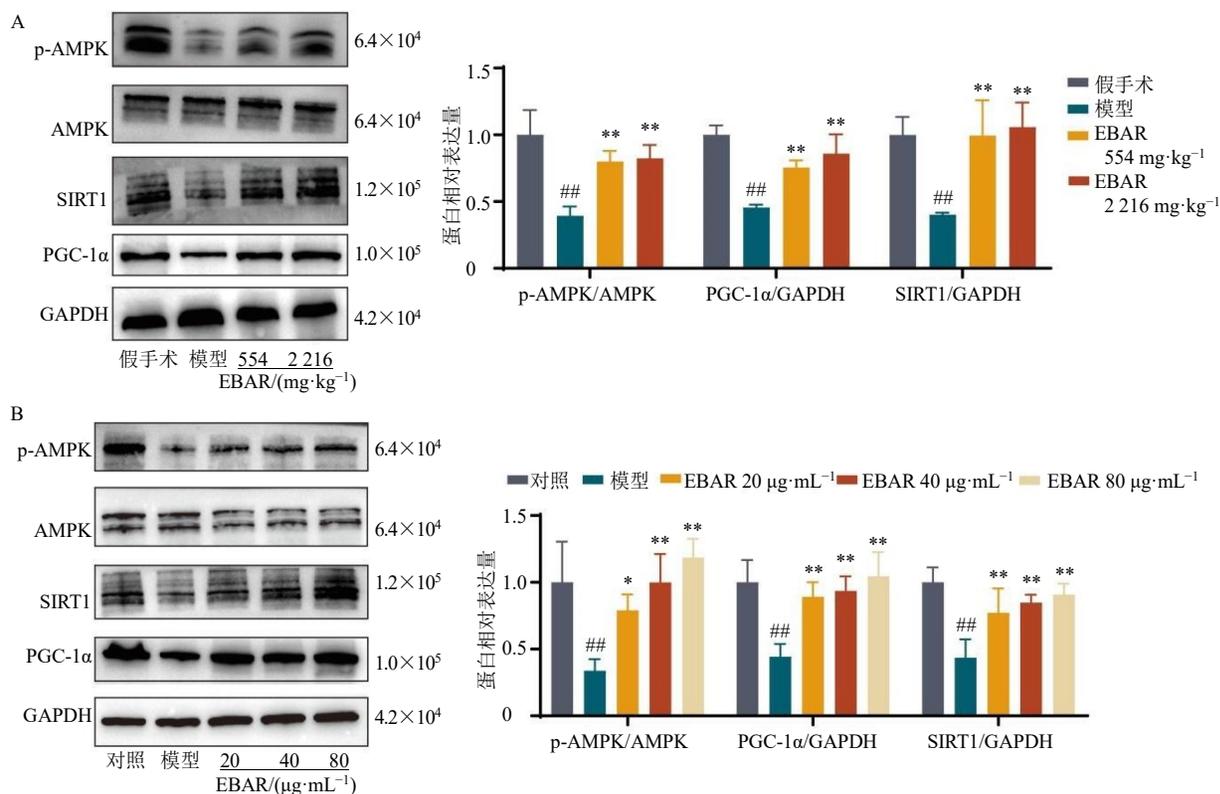


图 11 EBAR 对肝纤维化小鼠模型肝组织 (A) 和肝星状细胞活化模型 (B) AMPK/SIRT1/PGC-1α 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of EBAR on expressions of AMPK/SIRT1/PGC-1α signaling pathway related proteins in liver tissue of mice with liver fibrosis (A) and hepatic stellate cell activation model (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

肝脏是代谢的中心器官，代谢紊乱在肝纤维化的发病机制中起着核心作用。肝纤维化中，肝细胞及肝星状细胞能量需求激增，通过代谢重构提供能量支持：谷氨酰胺代谢生成 α-酮戊二酸，增强肌成纤维细胞抗凋亡能力并促进肝星状细胞激活；脂质代谢紊乱导致脂滴动态变化，激活的肝星状细胞水解三酰甘油为游离脂肪酸，经线粒体 β-氧化生成 ATP 供能等^[27]。这些代谢途径的重构为纤维化进展提供能量基础，而靶向干预代谢紊乱成为抗肝纤维化的潜在治疗方向。与正常小鼠相比，肝纤维化小鼠会出现氨基酸代谢紊乱、脂质代谢障碍、能量代谢紊乱以及炎症反应的激活等现象。通过代谢组学分析，发现与假手术组比较，模型组小鼠的肝脏代谢产物发生了显著的变化，PCA 结果显示假手术组与模型组明显分开。通过比较 EBAR 治疗组与模型组之间的差异代谢物，并对这些代谢物进行富集分析，发现其主要富集在丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢，半乳糖代谢，乙二酸和二羧酸代谢以及丁酸代谢等途径中，这些途径均与能量代谢密切相关。已有研究证实，在肝纤维化患者的肝组织中上

述代谢明显异常，并伴随氨基酸转移酶活性的升高和氨基酸水平的波动，谷氨酸、丙氨酸水平显著升高，甘氨酸水平显著降低，且与肝纤维化的严重程度密切相关^[28]。本研究揭示了这些代谢变化与肝纤维化进程的紧密联系，为干预肝纤维化提供了新的代谢靶点。

AMPK 已经被证实是阻止或延缓纤维发生过程的关键分子，对肝脏生理能量动态的平衡至关重要^[29-31]。AMPK 通过监测二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) /ATP 和单磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) /ATP 比值以及营养物质的水平，感知细胞的能量状态和代谢需求，并通过刺激产生 ATP 的细胞过程 (如葡萄糖摄取、糖酵解和脂肪酸氧化) 以及抑制消耗 ATP 的过程来调节细胞活性^[32]。其信号的传导能调节参与生物反应的各种细胞内分子水平，影响包括糖原代谢、蛋白质合成和纤维化进展。研究表明，抑制 AMPK 的表达会损害质膜和细胞葡萄糖摄取，加剧了纤维化的发展；而激活 AMPK 信号通路能抑制炎症，减轻非酒精性脂肪肝小鼠的肝脏脂质沉积，缓解肝纤维化^[33-34]。

在肝纤维化模型中, AMPK 的磷酸化被抑制, 影响下游 SIRT1 的活性, 进而导致 SIRT1 的下游靶标 PGC-1 α 被抑制。在本研究中, Western blotting 结果显示, EBAR 给药可显著增加胆管结扎小鼠肝脏中 p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1 α 的表达。提示 EBAR 抗肝纤维化作用与激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路关系密切。EBAR 可能通过调节细胞内的能量感受器, 如改变 ADP/ATP 和 AMP/ATP 值, 激活 AMPK 的上游激酶, 从而促进 AMPK 的磷酸化激活。此外, EBAR 可能直接作用于 AMPK 蛋白的特定结构域, 增强其活性, 进而依次激活下游的 SIRT1 和 PGC-1 α , 调节线粒体生物合成和氧化代谢, 改善肝脏能量代谢紊乱, 最终减轻肝纤维化。未来研究可进一步验证这些假设, 深入解析 EBAR 激活该信号通路的详细分子机制。

综上, 本研究表明, 在胆管结扎诱导的肝纤维化小鼠模型中, EBAR 能够减轻胆管结扎诱导的肝损伤, 缓解肝内炎症, 并减少肝内胶原沉积。EBAR 可以调节肝脏中的代谢物, 激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路, 减轻与肝纤维化进展相关的能量代谢紊乱。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Aydin M M, Akcali K C. Liver fibrosis [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2018, 29(1): 14-21.

[2] Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 37-55.

[3] Zamani M, Alizadeh-Tabari S, Ajmera V, et al. Global prevalence of advanced liver fibrosis and cirrhosis in the general population: A systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2025, 23(7): 1123-1134.

[4] 武媛媛, 顾坤, 高茜茜, 等. 甘草类制剂不良反应及其机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(7): 1363-1368.

[5] Ponticelli C, Locatelli F. Glucocorticoids in the treatment of glomerular diseases: Pitfalls and pearls [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018, 13(5): 815-822.

[6] 杨倩, 冯玉彦, 蒋树林. 姚希贤瘀血论治慢性肝纤维化经验 [J]. *中华中医药杂志*, 2007, 22(3): 168-171.

[7] 王戈. 疏肝健脾化痰法抗肝纤维化的药效机制研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2016.

[8] 颜德馨. 颜乾麟, 等. 整理. 颜德馨临床经验辑要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 277.

[9] Guan G Q, Chen Y X, Dong Y L. Unraveling the AMPK-

SIRT1-FOXO pathway: The in-depth analysis and breakthrough prospects of oxidative stress-induced diseases [J]. *Antioxidants*, 2025, 14(1): 70.

[10] Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, et al. PGC-1 α , inflammation, and oxidative stress: An integrative view in metabolism [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1452696.

[11] Li Q, Tan J X, He Y, et al. Atractylenolide III ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by activating hepatic adiponectin receptor 1-mediated AMPK pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(4): 1594-1611.

[12] Artru F, Sacleux S C, Ursic-Bedoya J, et al. Long-term outcome following liver transplantation of patients with ACLF grade 3 [J]. *J Hepatol*, 2025, 82(1): 62-71.

[13] 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.

[14] Qu L H, Xu Y Y, Cao G S, et al. Effects of *Atractylodes* oil on inflammatory response and serum metabolites in adjuvant arthritis rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110130.

[15] Qu L H, Liu C L, Ke C, et al. *Atractylodes lancea* Rhizoma attenuates DSS-induced colitis by regulating intestinal flora and metabolites [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(2): 525-552.

[16] Wang Y, Shi K, Tu J Y, et al. Atractylenolide III ameliorates bile duct ligation-induced liver fibrosis by inhibiting the PI3K/AKT pathway and regulating glutamine metabolism [J]. *Molecules*, 2023, 28(14): 5504.

[17] Jo S, Kim T, Iyer V G, et al. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM [J]. *J Comput Chem*, 2008, 29(11): 1859-1865.

[18] Mark P, Nilsson L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K [J]. *J Phys Chem A*, 2001, 105(43): 9954-9960.

[19] Qu L H, Shi K, Xu J, et al. Atractylenolide-1 targets SPHK1 and B4GALT2 to regulate intestinal metabolism and flora composition to improve inflammation in mice with colitis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 98: 153945.

[20] Ke C, Gao J L, Tu J Y, et al. Ganfule Capsule alleviates bile duct ligation-induced liver fibrosis in mice by inhibiting glutamine metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 930785.

[21] Zhang J, Jiang N, Ping J, et al. TGF- β 1-induced autophagy activates hepatic stellate cells via the ERK and JNK signaling pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 256-266.

[22] Zhuge A X, Li S J, Han S Y, et al. *Akkermansia*

- muciniphila*-derived acetate activates the hepatic AMPK/SIRT1/PGC-1 α axis to alleviate ferroptosis in metabolic-associated fatty liver disease [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2025, 15(1): 151-167.
- [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] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- [25] Tag C G, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, *et al.* Bile duct ligation in mice: Induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis [J]. *J Vis Exp*, 2015(96): e52438.
- [26] Zhou W C, Zhang Q B, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(23): 7312-7324.
- [27] Chang M L, Yang S S. Metabolic signature of hepatic fibrosis: From individual pathways to systems biology [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1423.
- [28] Hasegawa T, Iino C, Endo T, *et al.* Changed amino acids in NAFLD and liver fibrosis: A large cross-sectional study without influence of insulin resistance [J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1450.
- [29] Hu Y B, Ye X T, Zhou Q Q, *et al.* Sestrin 2 attenuates rat hepatic stellate cell (HSC) activation and liver fibrosis via an mTOR/AMPK-dependent mechanism [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(5): 2111-2122.
- [30] 熊阳昆, 龚名洋, 罗颖熙, 等. 马钱苷调控 AMPK 信号通路改善果糖饮食小鼠肝脏脂代谢紊乱的作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(21): 7325-7334.
- [31] Viollet B, Guigas B, Leclerc J, *et al.* AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: From physiology to therapeutic perspectives [J]. *Acta Physiol*, 2009, 196(1): 81-98.
- [32] Hardie D G, Hawley S A, Scott J W. AMP-activated protein kinase: Development of the energy sensor concept [J]. *J Physiol*, 2006, 574(Pt 1): 7-15.
- [33] Sun L J, Yu J W, Wan L, *et al.* Endocannabinoid system activation contributes to glucose metabolism disorders of hepatocytes and promotes hepatitis C virus replication [J]. *Int J Infect Dis*, 2014, 23: 75-81.
- [34] Huang R S, Guo F, Li Y P, *et al.* Activation of AMPK by triptolide alleviates nonalcoholic fatty liver disease by improving hepatic lipid metabolism, inflammation and fibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2021, 92: 153739.

[责任编辑 李亚楠]