

## • 药理与临床 •

## 桑黄中性多糖结构特征及其通过调控肠道菌群改善小鼠肝纤维化的作用机制

许秋莹, 姚路蒙, 王星星, 高珍洁, 高思琦, 吴建军\*, 秦路平\*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

**摘要:** 目的 表征桑黄水部位多糖 (water-eluted fraction of *Sanghuangporus vaninii* polysaccharides, SHP-W) 的结构特征, 并探讨其调节肠道菌群改善四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>) 诱导的小鼠肝纤维化的作用机制。方法 采用水提醇沉、弱阴离子交换色谱法从桑黄 *Sanghuangporus vaninii* 子实体中制备得到 SHP-W。采用苯酚硫酸法、间羟基联苯法和 BCA 法测定 SHP-W 的总糖、糖醛酸和蛋白含量, 通过高效尺寸排阻色谱法 (high performance size exclusion chromatography, HPSEC)、傅里叶红外光谱法 (fourier transform infrared spectrophotometer, FT-IR)、离子色谱法 (ion chromatography, IC) 和甲基化结合气相色谱-质谱联用 (gas chromatography and mass spectrometry, GC-MS) 等对 SHP-W 的结构特征进行表征。C57BL/6J 小鼠 ip 15% CCl<sub>4</sub>-橄榄油溶液 6 周构建肝纤维化模型, 给予 SHP-W (25、50、100 mg/kg) 或索拉非尼 (10 mg/kg) 干预 3 周, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE)、天狼星红和 Masson 染色观察小鼠肝脏的病理形态学改变; 采用全自动生化分析仪分析血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆汁酸 (total bile acids, TBA)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 和直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL) 水平; 采用免疫组化法检测肝组织 I 型胶原 (collagen-I, Col-I) 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 的表达; 采用 Western blotting 检测肝组织 Col-I、 $\alpha$ -SMA 和转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 的蛋白表达; 采用 16S rDNA 测序分析肠道菌群, 并采用抗生素干扰验证菌群作用。**结果** SHP-W 是由 2 个不同相对分子质量 ( $1.818 \times 10^4$ 、 $2.040 \times 10^3$ ) 的多糖组成的部位多糖, 其总糖质量分数为  $(88.27 \pm 3.76)\%$ , 不含糖醛酸和蛋白质。单糖组成结果显示 SHP-W 由半乳糖、甘露糖和岩藻糖以及葡萄糖组成, 物质的量比为 34.6 : 23.0 : 22.7 : 19.7, 同时含有 3-O-甲基半乳糖; 甲基化分析显示 SHP-W 由 1,3,6-Glcp 等 14 种糖苷键组成。动物实验结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 AST、ALT、TBIL、DBIL 和 TBA 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), 肝细胞索排列紊乱, 炎性细胞浸润明显, 出现大量的纤维组织增生, 肝组织中 Col-I、 $\alpha$ -SMA 和 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达显著上调 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织的假小叶及汇管区胶原纤维沉积均有不同程度改善, 血清肝功能水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 肝组织 Col-I、 $\alpha$ -SMA 和 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达下调 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。抗生素干扰后, SHP-W 改善肝纤维化的效果被显著抑制。**结论** 从桑黄子实体中制备得到 SHP-W, 糖醛酸含量测定、红外光谱以及单糖组成显示其为中性多糖。SHP-W 可显著改善血清肝功能、抑制 HSCs 活化、减少胶原纤维沉积从而改善 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化, 且其抗肝纤维化作用依赖于对肠道微生物的调节。

**关键词:** 桑黄中性多糖; 结构特征; 单糖组成; 肝纤维化; 肠道菌群; 肝星状细胞活化; 胶原纤维沉积

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)12-4644-18

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.012

## Structural characteristics of neutral polysaccharides from *Sanghuangporus vaninii* and their mechanism of ameliorating liver fibrosis in mice by regulating gut microbiota

XU Qiuying, YAO Lumeng, WANG Xingxing, GAO Zhenjie, GAO Siqu, WU Jianjun, QIN Luping

School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

收稿日期: 2025-10-25

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (ZCLY24H2801); 浙江中医药大学“5151 远志人才工程” (112123A12201/001/004/019); 浙江中医药大学科研项目 (2023RCZXZK20)

作者简介: 许秋莹, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药物质基础研究。E-mail: ying1002233@163.com

\*通信作者: 秦路平, 男, 教授, 从事中药资源品质评价与开发利用。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

吴建军, 男, 副教授, 从事中药多糖化学及其生物学研究。E-mail: wjjpharmacy@163.com

**Abstract: Objective** To analyze the structural characteristics of water-eluted fraction of *Sanghuangporus vaninii* polysaccharides (SHP-W) and explore the mechanism of SHP-W on improving carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver fibrosis in mice by regulating gut microbiota. **Methods** SHP-W was extracted from *S. vaninii* using water extraction and ethanol precipitation, followed by purification through weak anion-exchange chromatography. The total sugar, uronic acid and protein contents of SHP-W were determined by phenol sulfuric acid method, m-hydroxybiphenyl method and BCA method. The structural characterization of SHP-W was carried out by high performance size exclusion chromatography (HPSEC), Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR), ion chromatography (IC) and methylation combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). C57BL/6J mice were prepared with a 15% CCl<sub>4</sub> olive oil solution via ip for six weeks to establish a liver fibrosis model. SHP-W (25, 50, 100 mg/kg) or sorafenib (10 mg/kg) were administered for three weeks, and the pathological morphological changes in liver tissues were observed using hematoxylin-eosin (HE), sirius red and Masson staining. A fully automated biochemical analyzer was used to analyze the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bile acids (TBA), total bilirubin (TBIL) and direct bilirubin (DBIL) in serum. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of collagen-I (Col-I) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in liver tissue. Western blotting was used to detect the expressions of Col-I,  $\alpha$ -SMA and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) proteins in liver tissue. 16S rDNA sequencing was used to analyze the gut microbiota, and antibiotic interference was used to verify the role of the microbiota. **Results** SHP-W was a refined polysaccharide composed of two polysaccharides with different relative molecular weights ( $1.818 \times 10^4$ ,  $2.040 \times 10^3$ ), with a total sugar content of  $(88.27 \pm 3.76)\%$ , and without uronic acid and protein. The monosaccharide composition results showed that SHP-W was composed of galactose, mannose, fucose and glucose, with a molar ratio of 34.6 : 23.0 : 22.7 : 19.7, and also contained 3-O-methylgalactose. Methylation analysis showed that SHP-W was composed of 14 glycosidic bonds, including 1,3,6-Glcp. The animal experiment results showed that compared with control group, the levels of AST, ALT, TBIL, DBIL and TBA in serum of mice in model group were significantly increased ( $P < 0.001$ ), the arrangement of liver cell cords was disordered, inflammatory cell infiltration was obvious, and a large amount of fibrous tissue proliferation was appeared, the expressions of Col-I,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 protein in liver tissue was significantly up-regulated ( $P < 0.05, 0.001$ ). Compared with model group, the collagen fiber deposition in pseudo lobules and portal area of liver tissue of mice in each treatment group was improved to varying degrees, and the serum liver function level was significantly reduced ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), the expressions of Col-I,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 protein in liver tissue was down-regulated ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). After antibiotic interference, the effect of SHP-W on improving liver fibrosis was significantly inhibited. **Conclusion** SHP-W were prepared from *S. vaninii* fruiting bodies, the determination of uronic acid content, infrared spectroscopy and monosaccharide composition showed that SHP-W were neutral polysaccharide. SHP-W could significantly improve serum liver function, inhibit HSCs activation, reduce collagen fiber deposition, and thus improve CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. Its anti-fibrotic effect depends on the regulation of gut microbiota.

**Key words:** neutral polysaccharides from *Sanghuangporus vaninii* (Ljub) L. W. Zhou et Y. C. Dai; structural characteristics; monosaccharide composition; liver fibrosis; gut microbiota; activation of hepatic stellate cells; collagen fiber deposition

肝纤维化是慢性肝病进展为肝硬化和肝癌的核心病理阶段,其特征是肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的持续活化及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的病理性沉积<sup>[1-2]</sup>。中国是全球慢性肝病负担最重的国家,超过 1/3 的成年人群存在脂肪肝变性、代谢性功能障碍相关脂肪肝和肝纤维化<sup>[3]</sup>,尽管肝纤维化病理机制已被广泛研究,但目前美国食品药品监督管理局和中国国家药品监督管理局批准的抗肝纤维化的药物仍然十分局限,远未满足临床治疗需求<sup>[4]</sup>,这一现状反映了开发抗肝纤维化新型治疗策略的迫切需求。中药多成分、多靶点的作用特点与肝纤维化复杂的发病机制高度契合。研究发现,中药复方在抑制肝脏炎症和调节免疫方面具有确切的作用,如扶正祛瘀方、复方

鳖甲软肝片和芪甲柔肝汤等可在体内外抑制 HSCs 活化以及减少胶原纤维沉积<sup>[5-8]</sup>。柚皮素、槲皮素、阿魏酸、黄芪甲苷以及莪术醇等通过抑制转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)/Smad 信号通路发挥改善肝纤维化的作用<sup>[9-13]</sup>。尽管中药复方和单体成分在肝纤维化治疗中展现出一定疗效,然而其应用仍存在一定局限性:(1)复方制剂化学成分复杂,药效物质基础不明确;(2)部分单体成分生物利用度低且可能丧失中药多靶点协同优势;(3)现有的研究尚未系统阐明多糖抗肝纤维作用<sup>[14-15]</sup>。

近年来,中药多糖是天然产物开发中研究相对较少的大分子物质,展现出多靶点、多通路的调控特性,在抗肝纤维化研究中具有独特优势<sup>[16]</sup>。麦冬多糖

可通过调节 TGF- $\beta$ 1/Smad 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路改善肝损伤<sup>[17]</sup>; 菊粉样果聚糖则能通过抑制黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) / 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路抑制 HSCs 活化<sup>[18]</sup>。以上发现为中药多糖的抗肝纤维化研究提供了重要参考。桑黄 *Sanghuangporus vaninii* (Ljub) L. W. Zhou et Y. C. Dai 作为传统药用真菌, 其多糖成分在改善肝损伤方面显示出潜在疗效, Chen 等<sup>[19]</sup>发现桑黄多糖可通过剂量相关性地降低四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>) 诱导的血清转氨酶升高、减少肝脂质过氧化、提高抗氧化酶活性及改善肝组织病理损伤, 从而发挥保肝、抗氧化作用; Zhao 等<sup>[20]</sup>发现桑黄多糖通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) / 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related-factor 2, Nrf2) 信号通路显著减轻对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 诱导的急性肝损伤, 并改善肝组织病理变化。尽管桑黄多糖具有良好的抗肝损伤作用, 但改善肝纤维化的作用及潜在机制尚不明确。

多糖因其高相对分子质量和复杂结构难以被宿主直接消化吸收, 主要依赖肠道菌群代谢为短链脂肪酸等活性物质发挥系统作用<sup>[21]</sup>。多项研究发现, 多糖可通过调节肠道菌群从而改善肥胖、代谢性肝病等疾病状态<sup>[22-23]</sup>, 这为研究桑黄多糖的抗肝纤维化机制提供了新思路。基于此, 本研究制备桑黄水部位多糖 (water-eluted fraction of *S. vaninii* polysaccharides, SHP-W), 采用系列仪器分析方法对 SHP-W 进行结构表征, 通过建立 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化模型, 系统考察 SHP-W 对肝功能指标、纤维化标志物及肝脏组织病理学的影响, 并结合 16S rDNA 高通量测序技术分析肠道菌群变化, 旨在解析 SHP-W 通过重塑肠道菌群-肝脏互作改善肝纤维化的作用, 为其临床应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 (22±2) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK (沪) 2022-0004。动物饲养于浙江中医药大学实验动物中心, 环境温度为 22~24 °C, 相对湿度为 (40±10) %, 自由进食饮水。动物实验经浙江中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号

2023121108)。

### 1.2 药材

桑黄的干燥子实体购自杭州市淳安县千岛湖, 经浙江中医药大学药学院秦路平教授鉴定为桑黄 *S. vaninii* (Ljub) L. W. Zhou et Y. C. Dai。

### 1.3 药品与试剂

DEAE Sephrose™ Fast Flow 弱阴离子交换树脂 (货号 17-0709-01) 购自英国 GE Healthcare Biosciences 公司; Shodex 系列右旋糖酐标准品 (P5、P10、P20、P50、P100、P200、P400、P800, 货号分别为 F8400005、F8400010、F8400020、F8400050、F8400100、F8400200、F8400400、F8400800) 购自日本昭和电工株式会社; 单糖标准品甘露糖 (货号 C17D9H77586, 质量分数为 98%)、鼠李糖 (货号 H10S9Z69863, 质量分数为 98%)、半乳糖 (货号 E1927035, 质量分数为 99%)、葡萄糖 (货号 Q18F10N80946, 质量分数为 99%)、阿拉伯糖 (货号 S15A10G85850, 质量分数为 98%)、木糖 (货号 A22S6X3606, 质量分数为 99%)、岩藻糖 (货号 X29D7Y27768, 质量分数为 98%)、盐酸氨基葡萄糖 (货号 A22S6X3606, 质量分数为 98%)、果糖 (货号 J01J10R89818, 质量分数为 99%)、核糖 (货号 H26F10Z81556, 质量分数为 99%)、氨基半乳糖盐酸盐 (货号为 B01J8S37079, 质量分数为 98%)、葡萄糖醛酸 (货号 K14M10S82777, 质量分数≥98%)、半乳糖醛酸 (货号 K02A9B66077, 质量分数为 97%)、古罗糖醛酸 (货号 S200115AG1, 质量分数≥98%) 和甘露糖醛酸 (货号 S200108AM1, 质量分数≥98%) 均购自江苏博睿糖生物技术有限公司; 间羟基联苯 (货号 S30798)、橄榄油 (货号 S30503)、索拉非尼 (货号 S45467) 购自上海源叶生物科技有限公司; 硫酸 (货号 7664-93-9) 购自上海凌峰化学试剂有限公司; CCl<sub>4</sub> (货号 C805332) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na, 货号 FY36183) 购自南通飞宇生物科技有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 试剂盒 (货号 D006-1-3)、Masson 试剂盒 (货号 D026-1-3) 购自南京建成生物工程研究所; 天狼星红试剂盒 (货号 GC307014) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司; I 型胶原 (collagen-I, Col-I) 抗体 (货号 AB270993)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 抗体 (货号 AB124964)、TGF- $\beta$ 1 抗体 (货号

AB179695) 购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (货号 A0208) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; GAPDH 多克隆抗体 (货号 10494-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (货号 D001)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (货号 D002)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 试剂盒 (货号 D101Z)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 试剂盒 (货号 D115)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL) 试剂盒 (货号 D116W) 购自宁波美康生物科技股份有限公司; 甲硝唑 (货号 A600633)、青霉素 G 钾 (货号 A613460) 购自生工生物工程上海股份有限公司; 硫酸新霉素 (货号 MB1716)、盐酸万古霉素 (货号 MB1260) 购自大连美仑生物技术有限公司。

#### 1.4 仪器

Nicolet IS50 型红外光谱仪、MuLiskan GO 型酶标仪、ICS5000 型离子色谱仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司); Agilent 7890 型气相色谱-单四级杆质谱联用仪、Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Su8010 型场发射扫描电子显微镜 (日本日立公司); SCIENTZ-50FG/C 型冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 5810R 型台式高速大容量离心机 (德国艾本德股份公司); GD50102 型凝胶成像系统 (莫纳生物科技有限公司); RE52-99 型旋转蒸发仪 (上海亚荣升华仪器厂)。

## 2 方法

### 2.1 SHP-W 的制备

将桑黄子实体按照料液比 1:12 在 95%乙醇浸泡过夜, 加热至 60 °C 提取 1 h, 滤过, 滤渣挥干乙醇即得脱脂后的桑黄。称取脱脂后的桑黄, 按照料液比 1:20 加入水, 95 °C 加热提取 1 h, 滤过, 将提取液浓缩至一定体积, 慢加快搅加入 95%乙醇直至乙醇终体积分数为 80%, 室温静置过夜。抽滤, 沉淀挥干乙醇, 以一定体积纯水溶解, 经冷冻干燥机干燥, 得桑黄总多糖。取约 4 g 桑黄总多糖溶解在 100 mL 纯水中, 8 000×g 离心 10 min 后, 取上清液上样于 DEAE Sepharose™ Fast Flow 弱阴离子交换柱, 以水为流动相进行洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩, 透析 48 h, 冷冻干燥, 即得 SHP-W。

### 2.2 SHP-W 的结构表征

#### 2.2.1 总糖、糖醛酸以及蛋白含量测定

(1) 总糖含量测定: 采用苯酚硫酸法测定 SHP-

W 的总糖含量。精密称取 2.0 mg 葡萄糖标准品, 配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的标准品母液, 分别精密量取 0、30、60、120、150、180、240、300 μL 标准品母液于试管中, 分别以水补至 300 μL, 配成系列质量浓度为 0、0.05、0.10、0.20、0.25、0.30、0.40、0.50 mg/mL 的葡萄糖标准品溶液; 加入 150 μL 6% 苯酚和 750 μL 浓硫酸, 摇匀, 60 °C 水浴条件反应 30 min 后于 490 nm 处测定吸光度 ( $A$ ) 值。以葡萄糖标准品质量浓度为  $X$  轴,  $A$  值为  $Y$  轴, 得标准曲线。取 SHP-W 3 份各 2.0 mg, 按照标准品方法操作, 根据标准曲线计算得到 SHP-W 的总糖含量。

(2) 糖醛酸含量测定: 采用间羟基联苯法测定 SHP-W 的糖醛酸含量。以葡萄糖醛酸为标准品, 精密称量 2.0 mg, 配制成质量浓度为 0.25 mg/mL 的标准品母液, 分别精密量取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 标准品母液于 20 mL 具塞试管中, 分别以水补至 1.0 mL, 配成系列质量浓度为 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL 的葡萄糖醛酸标准品溶液; 冰浴条件下加入 6 mL 四硼酸钠-浓硫酸溶液, 90 °C 水浴条件下反应 5 min, 冰上冷却后加入 0.1 mL 间羟基联苯溶液, 混匀, 静置 5 min, 超声除泡 1 min, 在 520 nm 处测定  $A$  值。以葡萄糖醛酸标准品质量浓度为  $X$  轴, 以  $A$  值为  $Y$  轴, 得标准曲线。取 SHP-W 3 份各 2.0 mg, 按照标准品方法操作, 根据标准曲线计算得到 SHP-W 的糖醛酸含量。

(3) 蛋白含量测定: 采用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测定, 按照试剂盒说明书 A:B 试剂按 50:1 比例配制工作液, 并配制 1 mg/mL 的蛋白标准溶液, 按照 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加入标准液, 并以水稀释到 20 μL, 配制成系列质量浓度为 0、0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/mL 的标准溶液, 取 SHP-W 3 份配制成 0.5 mg/mL 的样品溶液, 96 孔板中每孔加入 20 μL 标准溶液或样品溶液, 随后标准曲线孔和样品孔同时加入 200 μL 工作液, 置于 37 °C 下反应 30 min, 在 562 nm 处测定  $A$  值, 以牛血清白蛋白浓度为  $X$  轴, 以  $A$  值为  $Y$  轴, 绘制标准曲线。根据标准曲线计算得到 SHP-W 的蛋白浓度。

2.2.2 相对分子质量测定 采用高效液相色谱仪结合示差折光检测器 (refractive index differential detector, RID) 的高效尺寸排阻色谱法 (high-performance size-exclusion chromatography, HPSEC) 测定 SHP-W 的相对分子质量。色谱柱为 TSK-G5000 和 TSK-G4000

串联柱 (300 mm×7.5 mm, 10 μm), 流动相为 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液, 进样体积为 20 μL, 柱温箱温度和检测器温度均设置为 40 °C, 体积流量为 0.8 mL/min, 时间为 30 min。

采用具有不同相对分子质量的右旋糖酐标准品 (P5、P10、P20、P50、P100、P200、P400、P800), 分别以流动相溶解配制为 2.0 mg/mL 的标准品溶液, 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 进样检测。SHP-W 样品同标准品操作。以右旋糖酐标准品的保留时间与对应的重均相对分子质量通过 3 次拟合绘制校正曲线, 并根据拟合方程及样品的保留时间计算 SHP-W 的相对分子质量。

**2.2.3 傅里叶红外光谱分析** 取约 2.0 mg SHP-W 样品与 100 mg 的干燥 KBr 混合, 研细后压片, 在 500~4 000 cm<sup>-1</sup> 进行红外扫描, 对扫描图的吸收峰进行分析。

**2.2.4 扫描电镜分析** 取约 5.0 mg 干燥后的 SHP-W 粉末, 黏附于含有双面黏合剂的导电碳膜上, 置于离子溅射仪的样品舱中, 进行喷金 40 s 左右。接着将样品取出, 置入扫描电镜观察室, 在 2.0 kV 加速电压下使用扫描电子显微镜, 进行观察。

### 2.2.5 单糖组成分析

(1) 标准品溶液的制备: 精密称取 15 种单糖标准品 (岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、氨基半乳糖盐酸盐、盐酸氨基葡萄糖、古罗糖醛酸、甘露糖醛酸) 加入 3 mol/L TFA 2 mL, 120 °C 水解 3 h, 氮吹吹干, 加入水涡旋混匀, 配成标准母液溶液。

(2) 样品溶液的制备: 精确称取 5.0 mg SHP-W 置于安瓿瓶中, 加入 3 mol/L TFA 2 mL, 120 °C 水解 3 h。准确吸取酸水解溶液转移至管中氮吹吹干, 加入 5 mL 水涡旋混匀。吸取 50 μL 加入 950 μL 水, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清进离子色谱仪分析。

(3) 检测条件: 离子色谱仪配置 Dionex CarboPac™ PA20 色谱柱 (150 mm×3 mm, 6 μm), 以 15 种单糖为标准品。流动相 A 为水, B 为 250 mmol/L NaOH, C 为含 500 mmol/L NaOH 水溶液和 50 mmol/L NaAc 的水溶液, 梯度洗脱: 0~23.0 min, 98% A、2% B; 23.0~23.1 min, 98%~80% A、2%~20% B; 23.1~33.0 min, 80% A、20% B; 33.0~33.1 min, 80% A、20%~0 B、0~20% C; 33.1~46.0 min, 80% A、20% C; 46.0~46.1 min, 80%~20% A、

20%~80% C; 46.1~66.0 min, 20% A、80% C; 66.0~66.1 min, 20%~98% A、0~2% B、80%~0 C; 66.1~80.0 min, 98% A、2% B。体积流量为 0.3 mL/min; 进样量为 25 μL; 柱温为 30 °C; 检测器为电化学检测器。根据绝对定量方法, 测定不同单糖质量, 根据单糖摩尔质量计算出各单糖物质的量之比。

**2.2.6 糖苷键连接分析** 取适量 SHP-W 于三颈烧瓶并置于含有 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的真空干燥器中干燥过夜, 加入无水二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 搅拌溶解 2 h, 再加入研成粉末的 NaH, 室温搅拌反应 1 h, 铝箔避光, 逐滴加入 1.5 mL 的 CH<sub>3</sub>I, 滴加完成后继续搅拌反应过夜, 加水终止反应。纯水透析 48 h 后冻干。冻干样品溶于氯仿, 水洗 3 次, 氯仿层无水硫酸钠干燥, 挥干氯仿, 甲基化后样品进行红外光谱验证甲基化是否完全, 若无完全甲基化, 重复进行甲基化反应直至甲基化完全。

取甲基化后样品 1~2 mg, 加入 2 mol/L TFA, 封口, 121 °C 水解 2 h, 水解结束后多次加甲醇蒸干除去 TFA; 加入 30 mg 硼氰化钠, 并加入 1 mL 纯水, 还原 5~8 h, 多次加甲醇-冰醋酸 5:1 减压蒸去溶剂直至粉末, 甲醇蒸干 3 次, 105 °C 烘干 10 min; 加入 3 mL 乙酸酐, 105 °C 乙酰化 10 min, 趁热加入 1 mL 水振摇以终止反应; 用 2 mL 氯仿萃取乙酰化产物, 水洗 3 次, 氯仿层经无水硫酸钠干燥, GC-MS 分析。

GC-MS 条件: Thermo TR-5MS 色谱柱 (60 m×0.25 mm, 0.25 μm); 程序升温条件: 起始温度 140 °C, 以 2 °C/min 升温至 180 °C; 再以 1 °C/min 升温至 200 °C; 再以 3 °C/min 升温至 250 °C, 保持 5 min, 进样口温度为 250 °C; 载气为氦气, 体积流量为 1 mL/min。

## 2.3 SHP-W 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化小鼠的影响

**2.3.1 动物分组、造模与给药** 将 36 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、索拉非尼 (10 mg/kg) 组和 SHP-W 低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 组, 每组 6 只。既往文献报道<sup>[19]</sup>, 桑黄多糖 (50、100 mg/kg) 对小鼠急性肝损伤有显著的保护作用, 基于此, 本研究选择 25、50、100 mg/kg 分别作为低、中、高剂量组。配制 15% CCl<sub>4</sub>-橄榄油溶液, 按 2 mL/kg 每周 ip 3 次, 共造模 6 周。自造模第 4 周起, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 3 周。

**2.3.2 样品收集** 末次给药后,小鼠禁食过夜,采集全血,4℃下静置1h,3500 r/min离心15 min,取上清于-80℃冰箱保存。取肝脏和肠道进行影像采集并记录质量,计算肝脏指数(肝脏指数=肝脏质量/体质量),取肝脏大叶组织块(0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm)置于4%多聚甲醛固定液中固定,用于后续病理染色分析,余下肝组织液氮速冻后置于用于肠道微生物16S rDNA测序分析。

**2.3.3 血清生化指标测定** 取血清,采用全自动双酶联用仪检测肝功能指标,包括ALT、AST、TBA、TBIL和DBIL。

**2.3.4 组织病理学分析** 肝组织浸泡在4%中性多聚甲醛中48 h进行完全固定,经脱水包埋后切片。切片置于70℃烘箱中烘烤1 h,在环保脱蜡液中浸泡30 min,脱蜡2次,经无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇进行梯度复水,按照HE、天狼星红和Masson染色试剂盒说明书进行染色,中性树脂封片,密封的切片由动力断层扫描仪扫描。

**2.3.5 免疫组化染色检测肝组织相关蛋白表达** 将肝组织切片置于烘箱70℃烘烤1 h,进行梯度脱蜡复水;随后将切片没入修复液(柠檬酸缓冲液)中进行热修复(100℃、10 min,60℃、25 min),冷却后浸泡于PBS中置于摇床清洗,重复3次,后将切片避光浸泡在3%过氧化氢溶液中,静置15 min灭活内源性过氧化物酶。用10%山羊血清室温孵育1 h,封闭完成后滴加Col-I(1:200)、 $\alpha$ -SMA(1:2000)一抗,并置于湿盒中4℃孵育过夜;滴加二抗,37℃孵育30 min。将切片暴露于DAB标记的显色液进行显色,并用苏木素染液染核,切片用中性树脂封片,由动力断层扫描仪自动扫描。

**2.3.6 Western blotting** 检测肝组织相关蛋白表达 称取30 mg肝组织,用含1%混合抑制剂的RIPA裂解液裂解肝组织,匀浆,4℃、14000 r/min离心15 min,取上清,采用BCA试剂盒测定蛋白浓度后,加入5×Loding Buffer,在95℃的金属浴条件下加热10 min使蛋白变性。经过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移到聚偏二氟乙烯膜上,加入5%牛血清白蛋白封闭2 h,加入Col-I(1:1000)、 $\alpha$ -SMA(1:5000)、TGF- $\beta$ 1(1:1000)一抗,4℃孵育过夜;加入二抗,室温孵育1 h;PBST洗涤后,滴加超敏ECL化学发光试剂,于化学发光显影仪进行曝光,应用Image J软件对目的条带进行灰度统计,计算各目的蛋白的相对表达量。

**2.3.7 16S rDNA 测序分析肠道菌群结构** 采用16S rDNA高通量测序技术对肠道内容物样本中的肠道微生物群落进行分析。首先从内容物样本中提取微生物总DNA,使用特异性引物扩增16S rDNA的V3~V4可变区,并对PCR产物进行纯化。随后,利用Illumina测序平台构建测序文库并进行双端测序(paired-end sequencing)。获得原始测序数据后,通过质量控制和过滤去除低质量序列,保留高质量的有效数据。对有效序列进行可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类分析,采用去噪算法优化序列数据,并在不同分类水平(门、属)上进行物种分析。基于标准化处理后的OTU丰度矩阵,计算 $\alpha$ 多样性指数(Chao1指数)和 $\beta$ 多样性指数[主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)],并进行群落结构的多元统计分析、线性判别分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)等。

## 2.4 SHP-W 对抗生素干扰后肝纤维化小鼠的影响

**2.4.1 抗生素溶液的制备** 称取1 g甲硝唑、1 g青霉素G钾、1 g硫酸新霉素、0.5 g万古霉素,加入到2 L的干净瓶中,即得抗生素溶液。

**2.4.2 动物分组、造模、给药及指标测定** 将36只SPF级雄性C57BL/6J小鼠随机分为对照组、模型组、SHP-W(100 mg/kg)组和对照+抗生素组、模型+抗生素组和模型+抗生素+SHP-W(100 mg/kg)组,每组6只。肝纤维化小鼠造模与给药方法同“2.3.1”项,抗生素各处理组小鼠饮用抗生素溶液,其他组自由饮用正常水。实验结束后,动物取材及处理检测同“2.3”项。

## 2.5 统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行统计学分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析法(One-way ANOVA)对多组进行比较分析,采用最小显著性差异法(LSD)-*t*对2组进行比较。采用GraphPad Prism 9.5软件制图。

## 3 结果

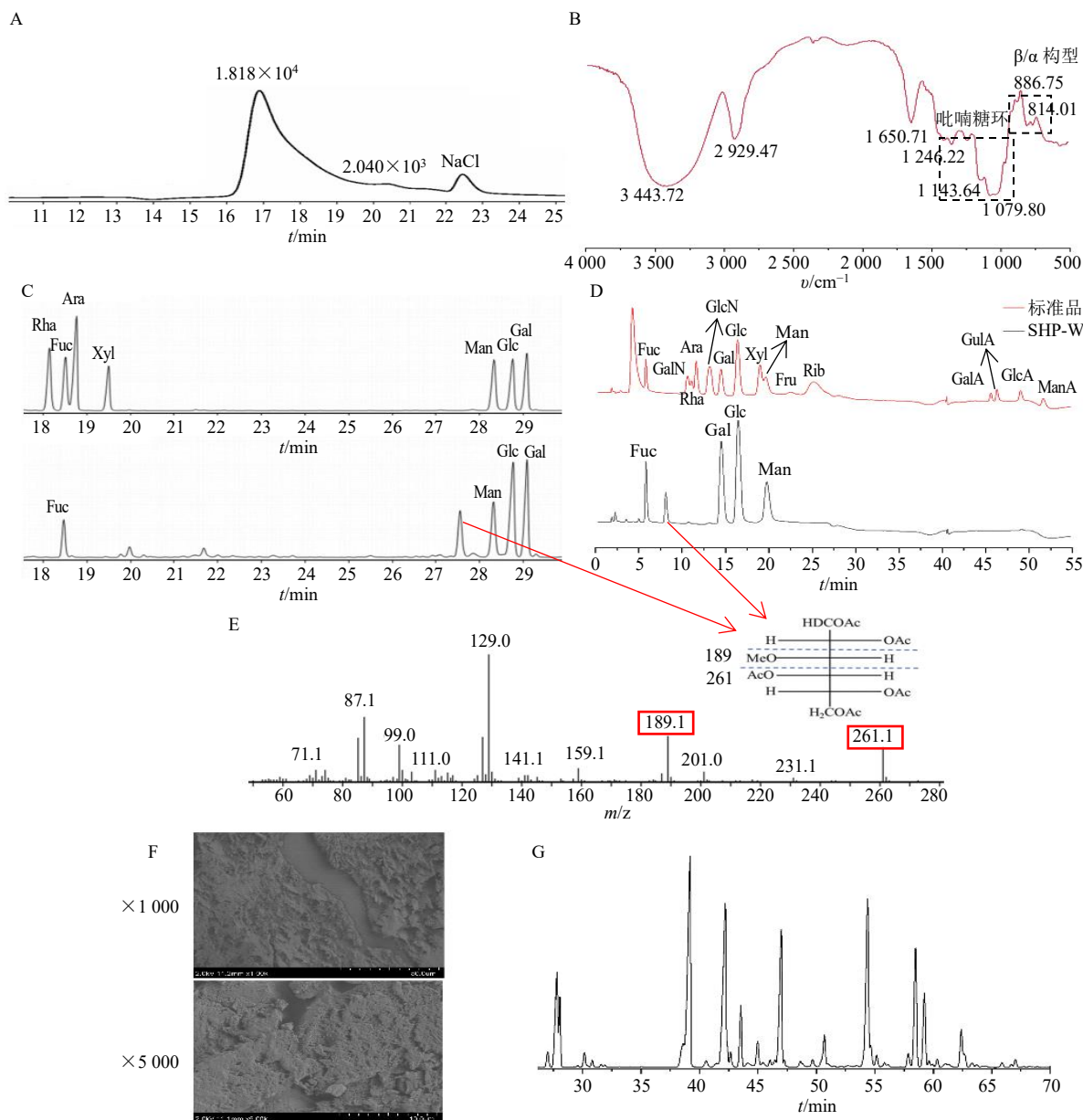
### 3.1 SHP-W 的结构表征

**3.1.1 SHP-W 总糖、糖醛酸以及蛋白质含量测定** 通过水提醇沉法、弱阴离子交换色谱法从桑黄子实体中制备得到SHP-W,采用苯酚硫酸法测定总糖含量,标准曲线的回归方程为 $y=2.7746x+0.1156$ , $R^2=0.9957$ ,计算得到总糖质量分数为(88.27±3.76)%;间羟基联苯法测定糖醛酸含量,标准曲线的回归方程为 $y=4.6032x+0.038$ , $R^2=0.9962$ ,

未测出糖醛酸；BCA 试剂盒测定蛋白质含量，标准曲线的回归方程为  $y=1.7381x+0.174$ ,  $R^2=0.9981$ ，未测出蛋白质。结果说明 SHP-W 几乎不含有糖醛酸和蛋白质，为中性多糖。

**3.1.2 相对分子质量测定** 采用 HPSEC 对 SHP-W 进行相对分子质量测定，如图 1-A 所示，除 NaCl 溶剂峰外，SHP-W 在 16.88、20.34 min 显示 2 个主

峰，根据标准曲线和软件计算，2 个主峰主要相对分子质量分别为  $1.818 \times 10^4$  和  $2.040 \times 10^3$ 。结果显示，SHP-W 是由 2 个不同相对分子质量多糖组成的部位多糖。其中高相对分子质量组分 ( $1.818 \times 10^4$ ) 可能对应于支化度较高的多糖结构，而低相对分子质量组分 ( $2.040 \times 10^3$ ) 则提示存在较低的相对分子质量多糖。



A-SHP-W 的 HPSEC 图；B-SHP-W 的红外光谱图；C-GC-MS 法检测 SHP-W 的单糖组成；D-IC 法检测 SHP-W 的单糖组成；E-3-O-甲基半乳糖的 MS 图；F-SHP-W 的扫描电镜图；G-甲基化联合 GC-MS 检测 SHP-W 的糖苷键类型。

A-HPSEC of SHP-W; B-FT-IR of SHP-W; C-determination of monosaccharide composition of SHP-W by GC-MS; D-determination of monosaccharide composition of SHP-W by IC; E-MS of 3-O-methylgalactose; F-scanning electron micrographs of SHP-W; G-determination of glycosidic linkage patterns of SHP-W by methylation analysis coupled with GC-MS.

图 1 SHP-W 的结构特征

Fig. 1 Structural characteristics of SHP-W

**3.1.3 红外光谱分析** 如图 1-B 所示, SHP-W 显示出多糖的基本红外光谱特征, 3 443.72  $\text{cm}^{-1}$  处出现强而宽的吸收峰, 对应多糖中丰富的-OH 的伸缩振动; 2 929.47  $\text{cm}^{-1}$  归属于多糖中骨架 C-H 对称和不对称的伸缩振动, 可能存在-CH<sub>2</sub>和-CH<sub>3</sub>; 1 000~1 200  $\text{cm}^{-1}$  的 3 个特征吸收峰表明存在吡喃糖; 900~800  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰表示存在异头碳的  $\alpha$  和  $\beta$  构型; 在 1 740  $\text{cm}^{-1}$  处没有检测到吸收峰, 说明不含羰基官能团, 即 SHP-W 不含糖醛酸, 为中性多糖, 与糖醛酸测定结果一致。

**3.1.4 单糖组成分析** 采用离子色谱仪和糖醇乙酸酯 (partially methylated alditol acetates, PMAAs) 法联合 GC-MS 测定 SHP-W 中的单糖组成。如图 1-C、D 所示, 与 15 种单糖标准品对比, SHP-W 由半乳糖、葡萄糖、甘露糖、岩藻糖组成, 物质的量比为 34.6 : 23.0 : 22.7 : 19.7。此外, PMAAs 总离子流图显示在保留时间为 27.5 min 观察到 1 个色谱峰, 该峰不属于已知的单糖标准。通过 PMAA 的 GC-MS 分析 (图 1-E), 该化合物的主要离子碎片为  $m/z$  71、81、99、111、129、141、159、189、201、231、261, 特征性片段为  $m/z$  261、189, 与文献报

道的 3-O-甲基半乳糖糖醇乙酸酯衍生物的质谱图一致<sup>[24]</sup>, 提示 PMAAs 总离子流图显示在保留时间为 27.5 min 的单糖为 3-O-甲基半乳糖。

**3.1.5 扫描电镜分析** 如图 1-F 所示, 在放大 1 000 倍下, SHP-W 样品表面呈现紧密堆积的片层状结构, 表明多糖分子间通过较强的相互作用 (如氢键或疏水作用) 形成了致密的凝聚态。进一步放大 ( $\times 5 000$ ) 显示, 片层结构内部存在明显的多孔特征, 孔壁由纤维状多糖聚集体构成。

**3.1.6 糖苷键连接分析** 甲基化结合 GC-MS 联用分析 SHP-W 的糖苷键连接方式, 将部分甲基化 PMAAs 的 SHP-W 的质谱与标准 PMAAs 质谱进行比较。根据单糖衍生物的保留时间和主要的离子碎片峰, 推断峰表示的糖部分及其连接方式。乙酰化 PMAAs 和相应的总离子流图如图 1-G 和表 1 所示。SHP-W 由 1,2,4-Fucp、1,4-Galp、1,3,6-Glcp、1,6-Galp、1,2,6-Manp、t-Glcp、1,3,6-Galp、t-Manp、1,4-Manp、1,2,4,6-Manp、1,2-Manp、1,3,4-Galp、1,3-Galp 和 1,3,4-Fucp 组成, 物质的量比为 19.7 : 16.4 : 13.4 : 10.3 : 8.8 : 8.6 : 5.1 : 4.1 : 3.9 : 2.5 : 2.4 : 2.1 : 1.7 : 0.8。

表 1 SHP-W 的 14 种糖苷键及物质的量

Table 1 14 Types of glycosidic bonds and molar ratios of SHP-W

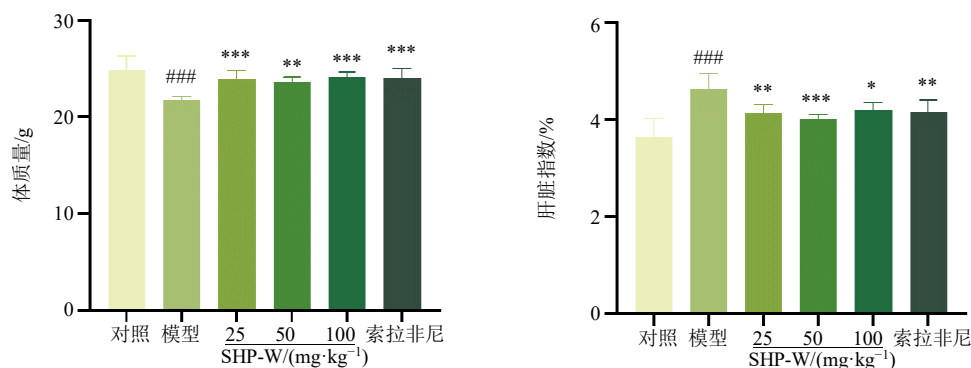
$t_R/\text{min}$	糖苷键	质谱碎片 ( $m/z$ )	物质的量比	连接类型
27.795	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glcp	43, 71, 87, 101, 117, 129, 143, 161, 205	0.086	Glcp-(1→
28.033	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Manp	43, 71, 87, 101, 117, 129, 143, 161, 205	0.041	Manp-(1→
30.155	2-Me <sub>1</sub> -Fucp	43, 87, 99, 115, 117, 129, 131, 145, 175, 189	0.008	→3,4)-Fucp-(1→
38.617	3,4,6-Me <sub>3</sub> -Manp	43, 87, 129, 161, 189	0.024	→2)-Manp-(1→
39.182	3-Me <sub>1</sub> -Fucp	43, 87, 101, 117, 129, 143, 159, 189	0.197	→2,4)-Fucp-(1→
42.192	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Galp	43, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 161, 173, 233	0.164	→4)-Galp-(1→
43.538	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Manp	43, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 161, 173, 233	0.039	→4)-Manp-(1→
44.974	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Galp	43, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 175	0.017	→3)-Galp-(1→
46.994	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Galp	43, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189, 233	0.103	→6)-Galp-(1→
50.681	2,6-Me <sub>2</sub> -Galp	43, 87, 99, 117, 129, 149	0.021	→3,4)-Galp-(1→
54.374	2,4-Me <sub>2</sub> -Glcp	43, 87, 117, 129, 159, 189, 233	0.134	→3,6)-Glcp-(1→
58.472	3,4-Me <sub>2</sub> -Manp	43, 87, 99, 129, 189	0.088	→2,6)-Manp-(1→
59.221	2,4-Me <sub>2</sub> -Galp	43, 87, 117, 129, 159, 189, 233	0.051	→3,6)-Galp-(1→
62.381	3-Me <sub>1</sub> -Manp	43, 85, 87, 99, 127, 129, 159, 189	0.025	→2,4,6)-Manp-(1→

**3.2 SHP-W 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化小鼠的改善作用**

**3.2.1 SHP-W 对肝纤维化小鼠体质量和肝脏指数的影响** 如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠体质量显著降低 ( $P < 0.001$ ), 肝脏指数显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠体质量均显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 肝脏指数显著降低

( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。

**3.2.2 SHP-W 对肝纤维化小鼠血清肝功能的影响** 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 AST、ALT、TBIL、DBIL 及 TBA 水平均显著升高 ( $P < 0.001$ ), 提示肝损伤及胆汁代谢异常; 与模型组比较, 各给药组小鼠血清中 AST、ALT 活性显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), SHP-W 中、高剂量组和索



与对照组比较: # $P < 0.05$  ### $P < 0.01$  #### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 下图同。  
# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as below figures.

图2 SHP-W对CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化小鼠体质量和肝脏指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of SHP-W on body weight and liver index in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

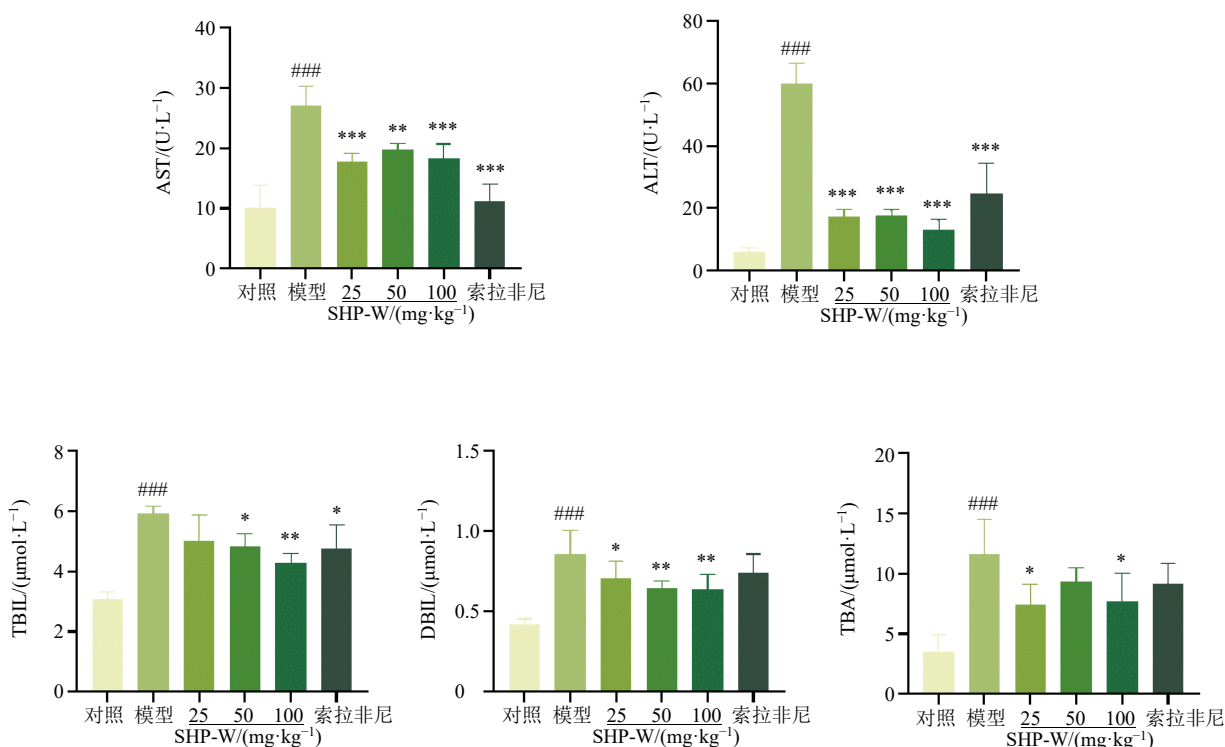


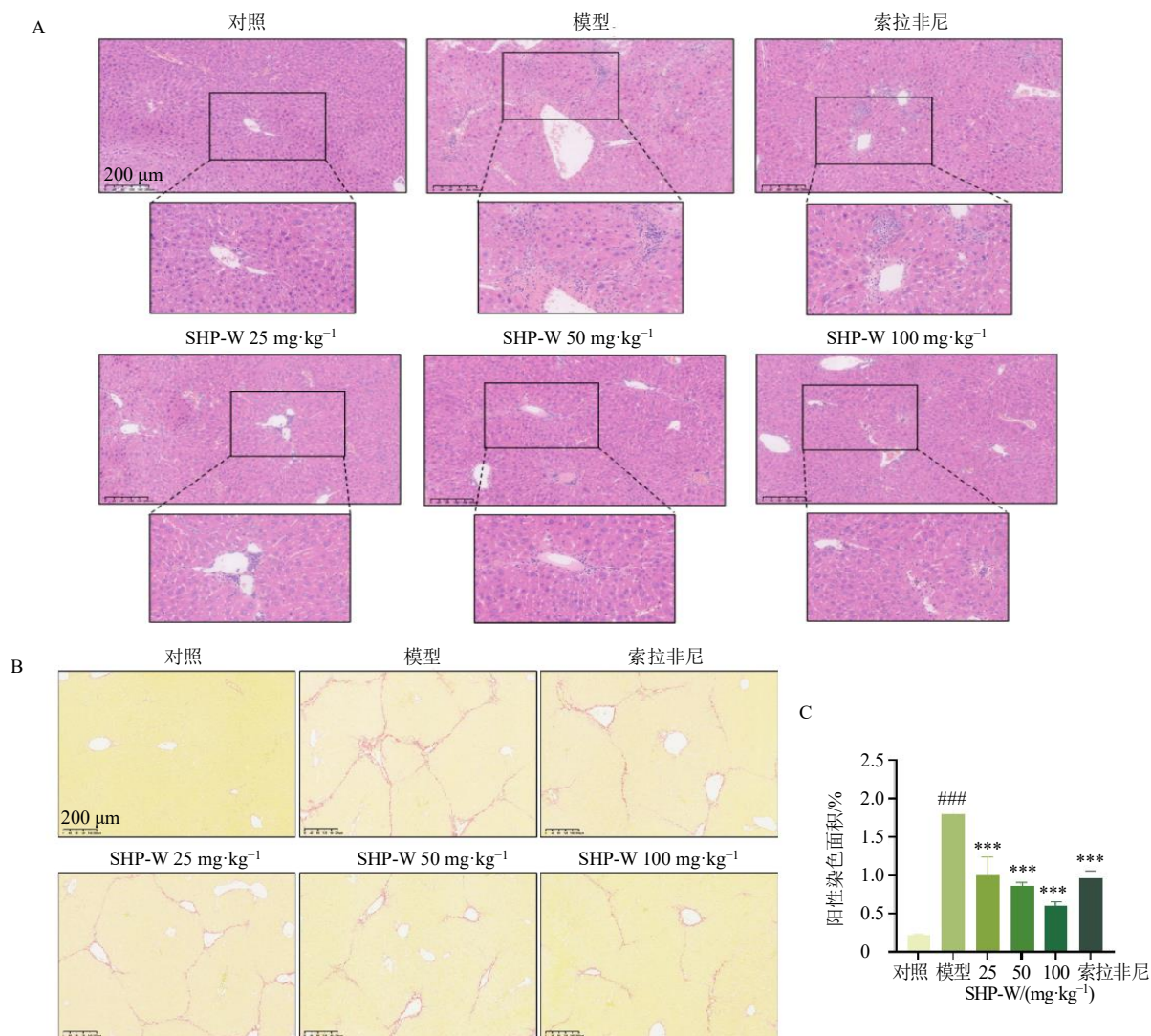
图3 SHP-W对CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化小鼠血清生化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effects of SHP-W on serum biochemistry in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

拉非尼组 TBIL 水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), SHP-W 各剂量组 DBIL 水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), SHP-W 低、高剂量组 TBA 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。表明 SHP-W 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化小鼠血清肝功能改变有显著的改善作用。

**3.2.3 SHP-W 对肝纤维化小鼠肝组织病理和胶原纤维沉积的影响** HE 染色结果 (图 4-A) 显示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织呈现出肝小叶结构

紊乱, 并伴有大量炎性细胞浸润; 经 SHP-W 或索拉非尼干预后, 肝组织结构破坏程度减轻, 炎性细胞浸润减少, 以 SHP-W 高剂量组的改善效果最为显著。天狼星红染色结果 (图 4-B、C) 显示, 模型组小鼠肝脏汇管区胶原纤维沉积显著增加 ( $P < 0.001$ ), 并形成连续纤维间隔; 经 SHP-W 或索拉非尼干预后, 胶原纤维沉积显著减少 ( $P < 0.001$ ), 其中 SHP-W 高剂量组的改善作用最佳。



A-HE 染色结果; B-天狼星红染色结果; C-天狼星红染色阳性面积半定量分析。

A-HE staining result; B-sirius red staining result; C-semi-quantitative analysis of area stained positively with sirius red.

**图 4 SHP-W 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化小鼠肝组织病理和胶原纤维沉积的影响 (×200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )**  
**Fig. 4 Effect of SHP-W on liver histopathology and collagen fiber deposition in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice (× 200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )**

**3.2.4 SHP-W 对肝纤维化小鼠肝组织中纤维化相关蛋白表达的影响** 为评估肝纤维化程度及 HSCs 活化状态, 采用免疫组化染色对肝组织 Col-I 及  $\alpha$ -SMA 的表达进行检测。Col-I 作为肝纤维化中主要的胶原类型, 其沉积程度可客观反映肝纤维化进程<sup>[25]</sup>;  $\alpha$ -SMA 作为 HSCs 活化的特异性分子标志物, 其表达水平可有效评估 HSCs 的活化状态<sup>[26]</sup>。如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 Col-I、 $\alpha$ -SMA 的阳性表达显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织中 Col-I、 $\alpha$ -SMA 的阳性表达均显著降低 ( $P < 0.001$ ), 其中 SHP-W 高剂

量组的作用最佳。

为进一步验证上述结果, 采用 Western blotting 检测肝纤维化小鼠肝脏中纤维化标志物 (Col-I、TGF- $\beta$ 1 和  $\alpha$ -SMA) 的蛋白表达水平。如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 Col-I、TGF- $\beta$ 1 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织中 Col-I 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), SHP-W 低、高剂量组和索拉非尼组肝组织 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), SHP-W 中、高剂量组和索拉非尼组  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平显著降低

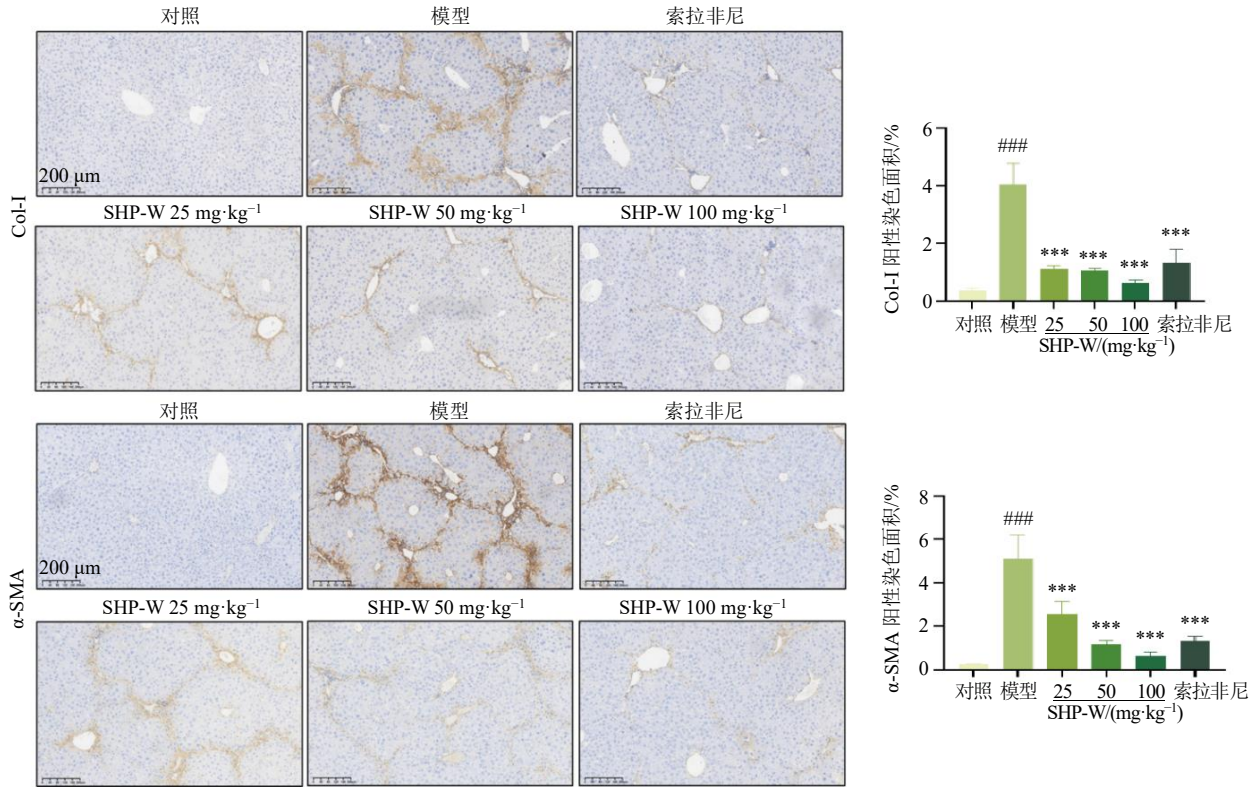


图 5 SHP-W 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化小鼠肝组织中 Col-I 及 α-SMA 表达的影响 (×200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
 Fig. 5 Effect of SHP-W on expressions of Col-I and α-SMA in liver tissues of CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice (× 200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

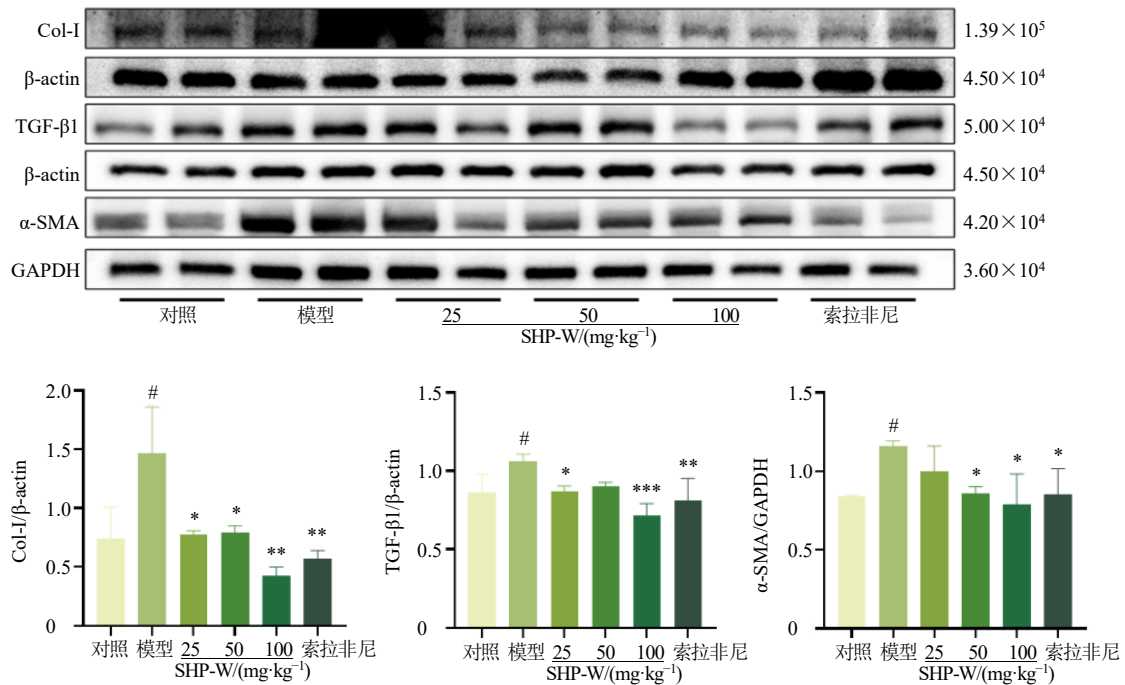
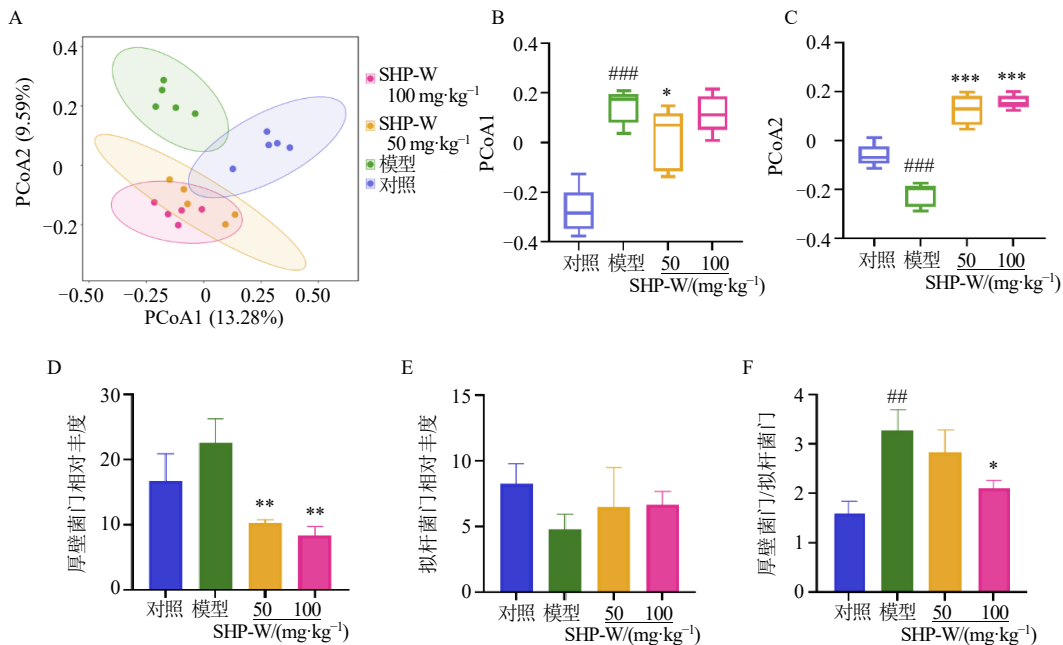


图 6 SHP-W 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化小鼠肝组织中纤维化标志物表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 6 Effect of SHP-W on expressions of fibrotic markers in liver tissues in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

( $P < 0.05$ ), 其中 SHP-W 高剂量组对纤维化标志物表达的抑制作用最佳。以上结果表明, SHP-W 可能通过抑制 HSCs 活化、减少纤维沉积来发挥其抗肝纤维化作用。

**3.2.5 SHP-W 对肝纤维化小鼠肠道微生物的影响**  
 基于 Jaccard 距离矩阵的 PCoA 结果 (图 7-A~C) 显示, 对照组与模型组在坐标空间上呈现显著分离, 表明  $CCl_4$  诱导的肝纤维化显著改变了肠道菌群的  $\beta$  多样性结构。SHP-W 组的样本分布呈现出向对照组方向迁移的趋势, 提示 SHP-W 干预可能部分逆转了  $CCl_4$  引起的菌群失调。在门水平上 (图 7-D~F), 与模型组相比, SHP-W 干预显著降低了厚壁菌门 (Firmicutes) 的相对丰度 ( $P < 0.01$ ), 同时拟杆菌门 (Bacteroidetes) 相对丰度呈现上升趋势, 且 SHP-W 高剂量组厚壁菌门/拟杆菌门值显著降低 ( $P < 0.05$ )。对属水平进行热图 (图 8-A) 和 LEfSe (图 8-B、C)

分析, 以  $\lg LDA > 3$  为阈值, 与模型组相比, 中剂量的 SHP-W 显著改变了 9 个菌属的丰度, 其中杜氏菌属 *Dubosiella*、回肠杆菌 *Ileibacterium*、欧陆森氏菌属 *Olsenella*、苏黎世杆菌属 *Turicibacter*、罗氏菌属 *Roseburia* 丰度增加, 而 *Ligilactobacillus*、*Lachnospiraceae\_UCG\_006*、*Coriobacteriaceae\_UCG\_002* 丰度降低; 高剂量的 SHP-W 则影响了 7 个菌属的丰度变化, 杜氏菌属 *Dubosiella*、穆氏菌属 *Muribaculum*、脱硫弧菌属 *Desulfovibrionaceae\_unclassified*、苏黎世杆菌 *Turicibacter*、红球菌属 *Rhodococcus* 丰度增加, *Peptococcaceae\_unclassified* 丰度下降。相关性分析 (图 8-D) 进一步显示, 杜氏菌 *Dubosiella*、脱硫弧菌属 *Desulfovibrionaceae\_unclassified* 与血清 AST、ALT 和天狼星红染色半定量呈现负相关 ( $P < 0.05$ )。提示 SHP-W 可能通过调节特定菌群的丰度来改善  $CCl_4$  诱导的肝纤维化。



A~C-PCoA 图; D~E-门水平厚壁菌门、拟杆菌门相对丰度; F-厚壁菌门/拟杆菌门值。

A—C-PCoA; D—E-relative abundances of Firmicutes and Bacteroidetes at phylum level; F-Firmicutes/Bacteroidetes ratio.

图 7 SHP-W 对  $CCl_4$  诱导的肝纤维化小鼠肠道菌群 PCoA 和门水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

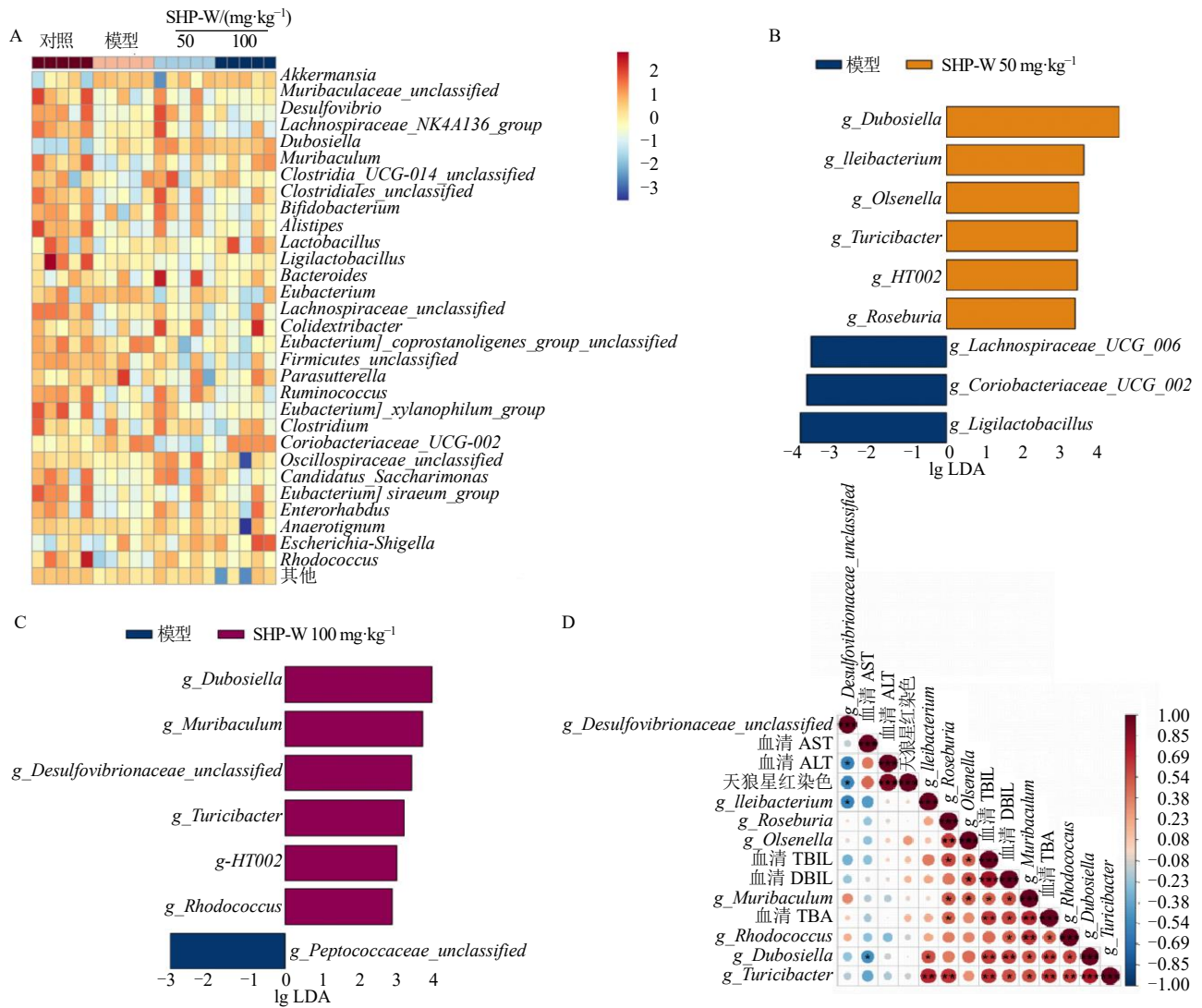
Fig. 7 Effect of SHP-W on PCoA and phylum level of gut microbiota in  $CCl_4$ -induced liver fibrosis mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

**3.3 抗生素干扰后对 SHP-W 改善肝纤维化的影响**

$\alpha$  多样性指数是对样本中物种多样性的分析, 包括样本中物种组成的丰富度和均匀度<sup>[27-28]</sup>。通过 Chao1 指数评估, 发现抗生素处理组的物种丰富度较未加抗生素组急剧下降 ( $P < 0.01, 0.001$ , 图 9-A), 表明抗生素处理显著抑制了肠道微生物丰度。

**3.3.1 SHP-W 对抗生素干扰后肝纤维化小鼠体质**

量和肝脏指数的影响 如图 9-B、C 所示, 在抗生素干扰下, 与抗生素组相比, 模型+抗生素组小鼠体质量显著下降 ( $P < 0.001$ ), 肝脏指数显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型+抗生素组比较, 模型+抗生素+SHP-W 干预后小鼠体质量及肝脏指数无显著变化, 表明 SHP-W 对肝纤维化小鼠体质量和肝脏的保护作用依赖于肠道菌群。

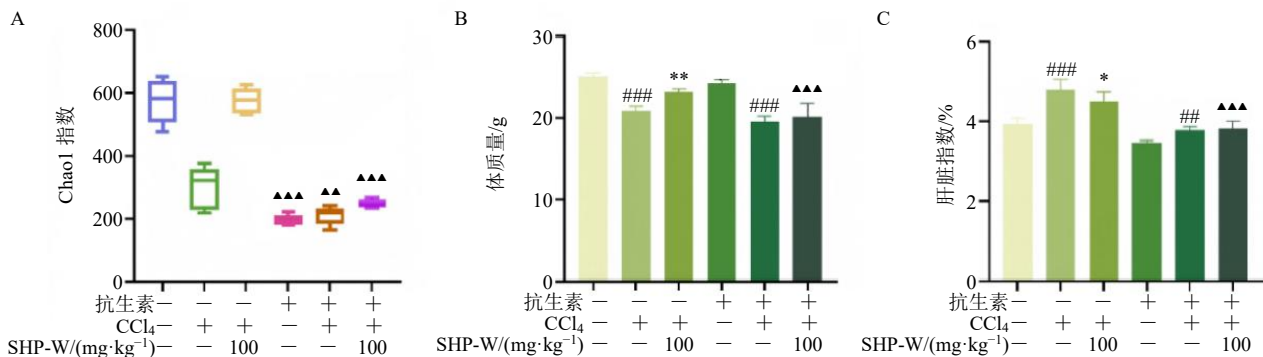


A-属水平上的微生物分布热图；B、C-LEfSE 分析；D-不同菌属和血清肝损伤指标的 Spearman 分析。

A-heatmap of microbial distribution at genus level; B, C-LEfSE analysis; D-Spearman analysis of different genera and serum liver injury indicators.

图 8 SHP-W 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化小鼠肠道菌群属水平的影响

Fig. 8 Effect of SHP-W on genus level of gut microbiota in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice



与未加抗生素的相应组别比较: ▲P<0.05 ▲▲P<0.01 ▲▲▲P<0.001, 下图同。

▲P<0.05 ▲▲P<0.01 ▲▲▲P<0.001 vs corresponding group without antibiotics, same as below figures.

图 9 SHP-W 对抗生素干扰后肝纤维化小鼠肠道 α 多样性分析 (A)、体质量 (B) 和肝脏指数 (C) 的影响 (x̄ ± s, n = 6)

Fig. 9 Effect of SHP-W on α-diversity analysis (A), body weight (B) and liver index in liver fibrosis mice after antibiotic interference (x̄ ± s, n = 6)

**3.3.2 SHP-W 对抗生素干扰后肝纤维化小鼠血清肝功能的影响** 如图 10 所示,与对照组相比,模型组小鼠肝组织中 ALT、AST、TBIL、DBIL 以及 TBA 水平显著升高 ( $P<0.001$ ); SHP-W 干预后小鼠肝功能指标水平显著下降 ( $P<0.001$ )。抗生素干扰后,

与抗生素组相比,模型+抗生素组小鼠肝组织中血清肝功能水平显著升高 ( $P<0.001$ );与模型+抗生素组比较,模型+抗生素+SHP-W 组小鼠血清肝功能指标无显著变化,表明 SHP-W 对肝纤维化小鼠血清肝功能水平的改善作用依赖于肠道菌群。

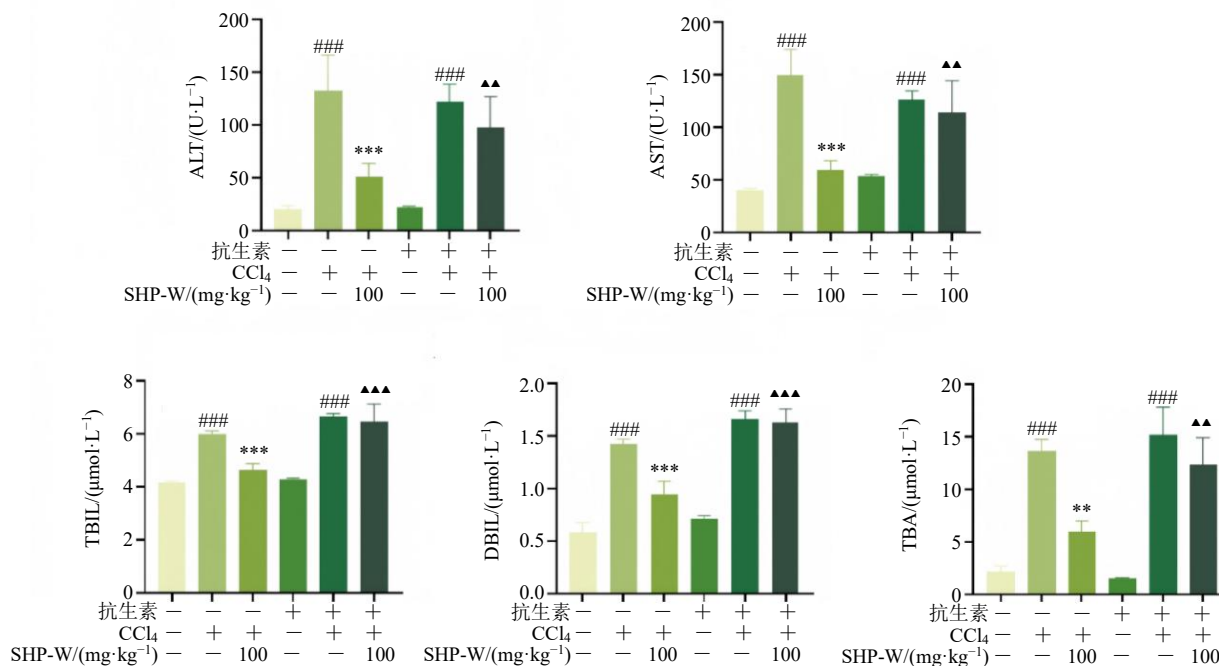


图 10 SHP-W 对抗生素干扰后 CCl<sub>4</sub> 诱导肝纤维化小鼠血清生化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 10 Effects of SHP-W on serum biochemistry in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice after antibiotic interference ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

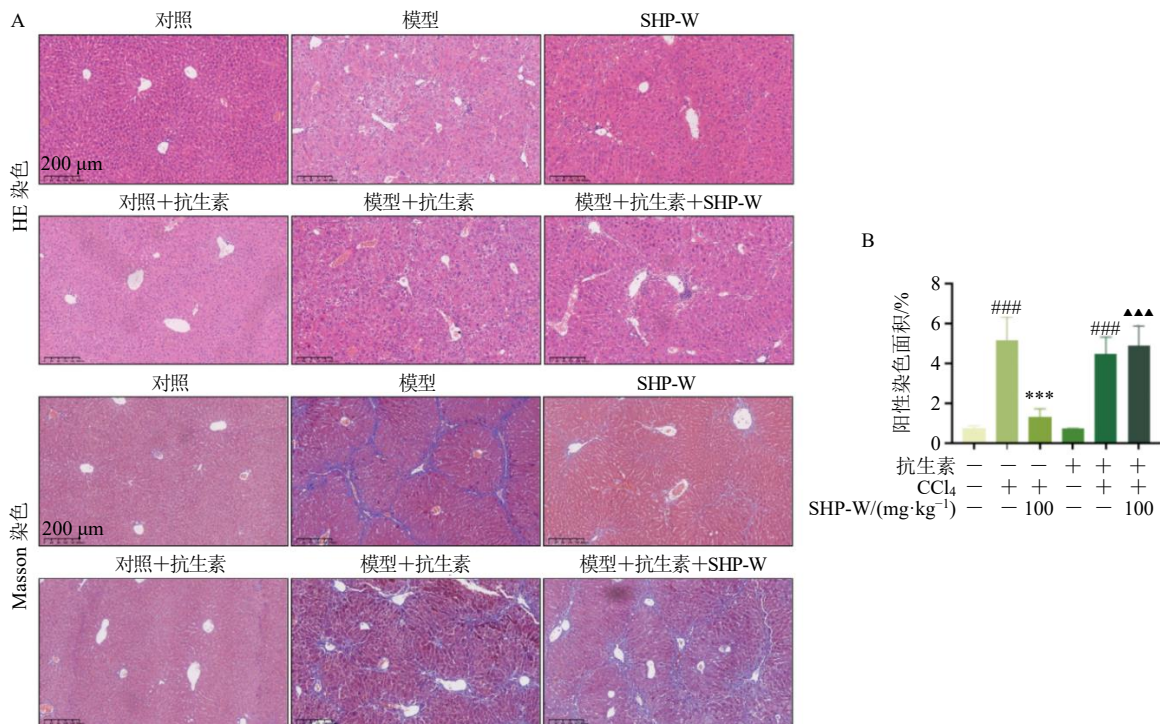
**3.3.3 SHP-W 对抗生素干扰后肝纤维化小鼠肝组织病理变化的影响** HE 染色结果 (图 11-A) 显示,与对照组相比,模型组小鼠肝组织呈现显著的肝小叶结构紊乱,并伴有大量炎性细胞浸润;SHP-W 干预后,肝组织结构破坏程度减轻,炎性细胞浸润减少。抗生素干扰后,与抗生素组相比,模型+抗生素组小鼠肝组织结构破坏严重,并伴随大量的炎性细胞浸润,模型+抗生素+SHP-W 干预后小鼠结构破坏及炎性细胞浸润并无显著改善。

采用 Masson 染色对肝组织胶原沉积情况进行评估。结果如图 11-B、C 所示,与对照组相比,模型组小鼠肝组织内可见大量蓝色胶原纤维沉积 ( $P<0.001$ ),主要分布于汇管区及中央静脉周围,并形成明显的纤维间隔;SHP-W 干预后,胶原沉积程度减轻 ( $P<0.001$ )。抗生素干扰后,与抗生素组相比,模型+抗生素组小鼠肝组织可见大量蓝色胶原纤维沉积 ( $P<0.001$ );模型+抗生素+SHP-W 干预后蓝色胶原纤维沉积仍然存在,并无显著改善。以

上结果表明 SHP-W 改善肝纤维化小鼠肝损伤及抑制胶原沉积的作用依赖于肠道菌群。

**3.3.4 SHP-W 对抗生素干扰后肝纤维化小鼠肝组织中纤维化相关蛋白表达的影响** 免疫组化染色结果 (图 12) 显示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 表达水平升高 ( $P<0.001$ ),SHP-W 干预后表达水平显著下降 ( $P<0.01, 0.001$ )。抗生素干预后,与抗生素组相比,模型+抗生素组小鼠肝组织中 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 的阳性表达显著升高 ( $P<0.001$ ),提示肝纤维化程度加重;与模型+抗生素组比较,模型+抗生素+SHP-W 干预后小鼠肝组织 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 的阳性表达无显著变化。

Western blotting 结果 (图 13) 显示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 Col-I、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 蛋白表达水平显著上调 ( $P<0.05$ ),SHP-W 干预后 Col-I、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 蛋白表达显著下调 ( $P<0.01$ )。抗生素干预后,与抗生素组比较,模型+抗生素组小鼠肝组织中 Col-I、TGF- $\beta$ 1 和  $\alpha$ -SMA 的蛋



A-HE 及 Masson 染色 (×200); B-Masson 染色阳性染色面积半定量分析 (n=6)。

A-HE, Masson staining result (× 200); B-semi-quantitative assessment of area stained positively by Masson staining (n = 6).

图 11 SHP-W 对抗生素干扰后肝纤维化小鼠肝组织病理变化的影响

Fig. 11 Effect of SHP-W on liver histopathology in liver fibrosis mice after antibiotic interference

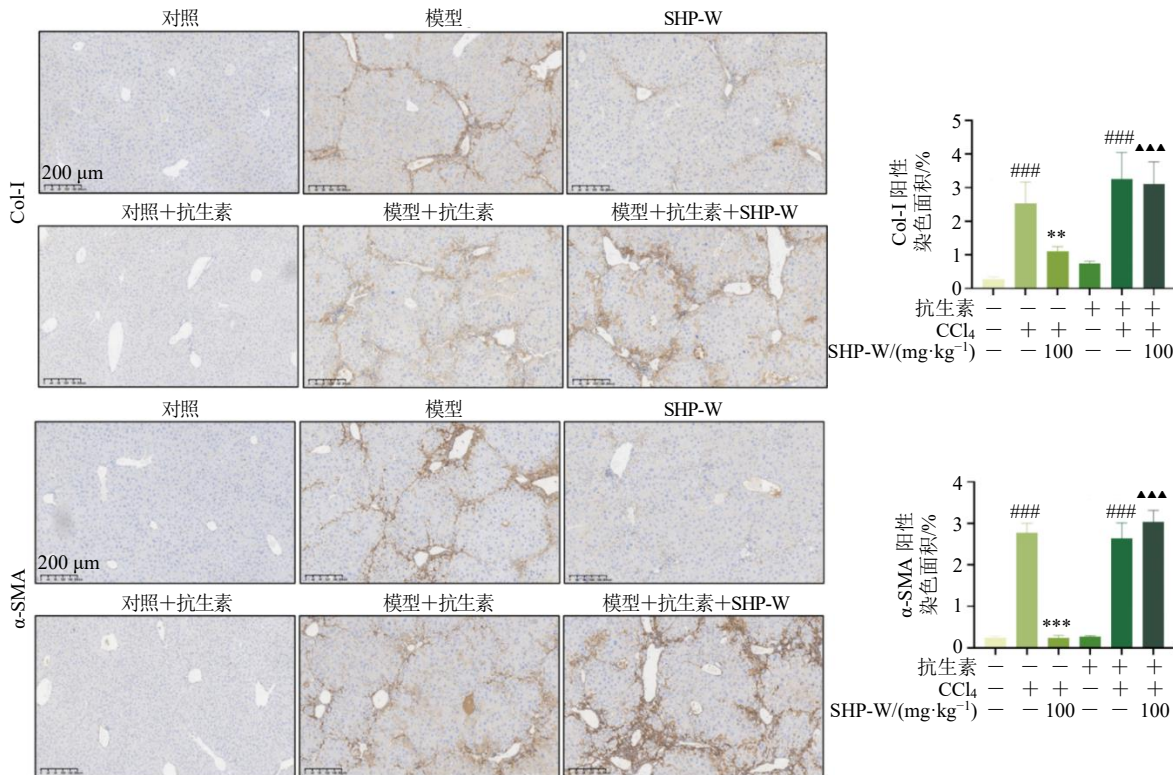


图 12 SHP-W 对抗生素干扰后肝纤维化小鼠肝组织中 Col-I 及 α-SMA 表达的影响 (×200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 12 Effect of SHP-W on expressions of Col-I and α-SMA in liver tissues of liver fibrosis mice after antibiotic interference (× 200;  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

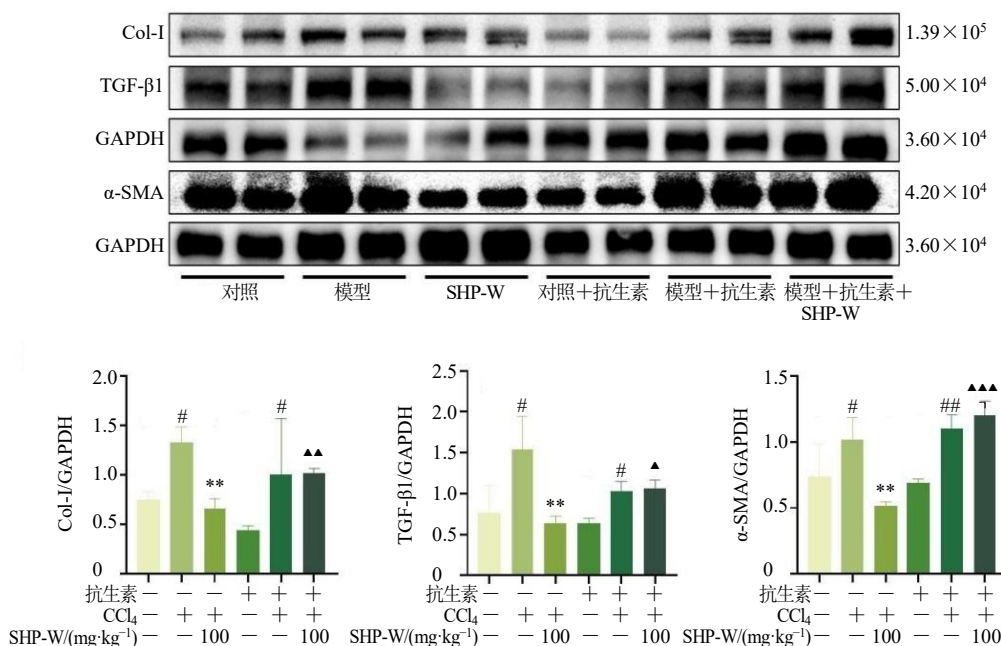


图 13 SHP-W 对抗生素干扰后肝纤维化小鼠肝组织中纤维标志物表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 13 Effect of SHP-W on expressions of fibrotic markers in liver tissues of liver fibrosis mice after antibiotic interference ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

白表达水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 与模型+抗生素组比较, 模型+抗生素+SHP-W 干预后小鼠肝组织中 Col-I、TGF-β1 和 α-SMA 的蛋白表达水平无显著变化。以上结果表明 SHP-W 抑制肝纤维化小鼠 HSCs 活化和减少胶原纤维沉积的作用依赖于肠道菌群。

#### 4 讨论

肝纤维化是各种因素导致慢性肝损伤后引起 HSCs 活化、肝组织内 ECM 过度沉积、肝脏正常结构破坏为主要特征的一种病理性疾病<sup>[29]</sup>。目前临床缺乏特效抗纤维化药物, 天然药物因其多靶点调控特性, 在抗肝纤维化研究中备受关注。药用真菌桑黄已被报道具有良好的保肝活性<sup>[30-31]</sup>, 其中, 桑黄多糖虽表现出显著的抗肝纤维化潜力<sup>[32-33]</sup>, 但其活性多糖的结构和作用机制尚不明确。因此本研究从桑黄子实体中采用水提醇沉、弱阴离子交换柱制备 SHP-W, 经 HPSEC 分析确定 SHP-W 是由 2 个不同相对分子质量 ( $1.818 \times 10^4$ 、 $2.040 \times 10^3$ ) 多糖组成的部位多糖。离子色谱法结果显示其单糖组成为半乳糖、葡萄糖、甘露糖、岩藻糖, 物质的量比为 34.6 : 23.0 : 22.7 : 19.7, 与文献报道的桑黄多糖组成特征相同<sup>[34-35]</sup>。通过甲基化分析联合 GC-MS 鉴定表明, SHP-W 由 14 种特征性糖苷键组成, 包括 1,2,4-

Fucp、1,4-Galp、1,3,6-Glcp、1,6-Galp、1,2,6-Manp、t-Glcp、1,3,6-Galp、t-Manp、1,4-Manp、1,2,4,6-Manp、1,2-Manp、1,3,4-Galp、1,3-Galp 和 1,3,4-Fucp。通过以上信息并结合文献<sup>[36-37]</sup>, SHP-W 为中性多糖。基于上述结构特征, 进一步构建 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化模型以探究 SHP-W 的抗肝纤维化活性, 结果表明 SHP-W 可显著降低血清中肝功能水平, 改善组织病理损伤。HSCs 活化是肝纤维化进展的关键环节, SHP-W 干预可显著降低 α-SMA、Col-I、TGF-β1 表达, 抑制 HSCs 活化, 并呈现一定的剂量相关性, 以上结果表明 SHP-W 通过抑制 HSCs 活化和减少胶原沉积, 显著改善 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化。

中药多糖是一类天然生物大分子, 因其口服吸收利用度低, 肠道菌群是多糖代谢吸收的主要部位。“肠-肝轴”是多糖发挥作用的关键途径之一, 其可通过调节肠道菌群组成, 修复肠道屏障功能, 调节肠道细胞因子水平等途径, 改善肠道微生物紊乱<sup>[38]</sup>。因此进一步分析 SHP-W 对肝纤维化小鼠肠道菌群的影响, 16S rDNA 高通量测序结果显示, SHP-W 干预后, 可显著增加杜氏菌属 *Dubosiella*、回肠杆菌 *Ileibacterium*、欧陆森氏菌属 *Olsenella*、苏黎世杆菌属 *Turicibacter*、罗氏菌属 *Roseburia*、穆氏菌属 *Muribaculum*、脱硫弧菌属 *Desulfovibrionaceae*

unclassified、红球菌属 *Rhodococcus* 丰度, 相关性分析结果显示杜氏菌属 *Dubosiella*、脱硫弧菌属 *Desulfobrivionaceae\_unclassified* 与肝纤维化程度相关。其中杜氏菌属 *Dubosiella* 被报道为慢性肝病中的益生菌, 如泽泻多糖可通过增加杜氏菌属 *Dubosiell* 的相对丰度以改善 APAP 引起的急性肝损伤<sup>[39]</sup>。瓜子金水提物可通过增加杜氏菌属 *Dubosiell* 的相对丰度以改善蛋氨酸-胆碱缺乏 (methionine-choline deficient, MCD) 饮食诱导的肝损伤小鼠的肠道微生物失调<sup>[40]</sup>。以上结果提示 SHP-W 可能通过增加特定菌群的丰度发挥抗肝纤维化的作用。进一步使用抗生素替代无菌小鼠的肠道菌群清除实验探究肠道菌群对 SHP-W 抗肝纤维化作用的影响, 结果显示抗生素干扰使 SHP-W 改善肝纤维化的作用被抵消, 表明 SHP-W 改善 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化的作用依赖于肠道菌群。但 SHP-W 能否通过增加杜氏菌属 *Dubosiell* 丰度发挥改善肝纤维化的作用机制仍需进一步研究。本研究仍存在一些局限, 目前获得的 SHP-W 为部位多糖组分, 尚未分离得到结构明确的均一性多糖, 且缺乏对其精细结构 (如糖苷键连接方式、分支度等) 的全面解析。本研究虽然证实肠道菌群在 SHP-W 抗肝纤维化中的作用, 但尚未鉴定出关键的菌群代谢产物及其作用机制。未来研究将从以下几个方面重点开展: (1) 采取凝胶渗透色谱法结合多维 NMR 技术获取均一性多糖并解析其精细结构; (2) 整合宏基因组学、代谢组学及无菌动物模型, 系统阐明 SHP-W 通过特定菌群代谢物 (如次级胆汁酸、色氨酸衍生物等) 调控肝纤维化的分子机制。

综上, SHP-W 是由 2 种相对分子质量 ( $1.818 \times 10^4$  和  $2.040 \times 10^3$ ) 多糖组成的部位多糖, 由半乳糖、葡萄糖、甘露糖、岩藻糖组成, 为中性多糖。SHP-W 可通过抑制 HSCs 活化、胶原纤维沉积、调节肠道菌群组成, 从而改善 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化, 且其抗肝纤维化作用依赖于肠道菌群。

志谢: 浙江中医药大学中医药科学院药学科研中心公共平台提供技术协助。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Moreira R K. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131(11): 1728-1734.
- [2] Kim J W, Tung H C, Ke M Y, et al. The desulfinylation enzyme sulfiredoxin-1 attenuates HSC activation and liver

fibrosis by modulating the PTPN12-NLRP3 axis [J]. *Hepatology*, 2025, 82(1): 92-109.

- [3] Liu S H, Wan H, Yang L, et al. High prevalence of steatotic liver disease and fibrosis in the general population: A large prospective study in China [J]. *J Hepatol*, 2025, 82(1): e23-e25.
- [4] Lu J L, Yu C X, Song L J. Programmed cell death in hepatic fibrosis: Current and perspectives [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 449.
- [5] Hu X Q, Song Y N, Wu R, et al. Metabolic mechanisms of Fuzheng-Huayu Formula against liver fibrosis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111888.
- [6] 邓莉, 申宝德, 刘园, 等. 复方鳖甲软肝片减方对 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化的影响及机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1371-1378.
- [7] Chen X F, Sun X, Ji S X, et al. TMT-based proteomics analysis identifies the interventional mechanisms of Qijia Rougan Decoction in improving hepatic fibrosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117334.
- [8] 霍子璇, 李佳楠, 窦元枫, 等. 桃红四物汤抑制肝细胞双硫死亡改善肝纤维化的作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(18): 6632-6643.
- [9] 岳杉杉, 彭安康, 马泽江, 等. 柚皮素通过调控 TGF- $\beta$ 1/Smad 通路抑制肝纤维化 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(2): 248-254.
- [10] 周林华, 陈晓. 槲子苷通过 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路抑制肝纤维化和肝星状细胞活化 [J]. *生理学报*, 2022, 74(2): 217-224.
- [11] Mu M, Zuo S, Wu R M, et al. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation via inhibition of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4107-4115.
- [12] 戴鸿志, 安祯祥, 黄丹, 等. 黄芪甲苷对肝纤维化模型大鼠的改善作用机制研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(10): 1268-1274.
- [13] 郑洋, 卢能源, 黄永贤, 等. 基于 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路探讨莪术醇对肝纤维化小鼠作用的实验研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(11): 149-152.
- [14] 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]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(9): 1873-1879.
- [15] 杨鹏, 杨增艳. 中药单体在抗肝纤维化中的研究进展 [J]. *大医生*, 2025, 10(2): 132-135.
- [16] Liang C, Liu J J, Jiang M X, et al. The advancement of targeted regulation of hepatic stellate cells using traditional Chinese medicine for the treatment of liver fibrosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 341: 119298.
- [17] Liu W, Zhang L Z, Wei X, et al. Structural characterization

- of an inulin neoseries-type fructan from *Ophiopogon Radix* and the therapeutic effect on liver fibrosis *in vivo* [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 327: 121659.
- [18] Dai X L, Du Z Y, Jin C, *et al.* Inulin-like polysaccharide ABWW may impede CCl<sub>4</sub> induced hepatic stellate cell activation through mediating the FAK/PI3K/Akt signaling pathway *in vitro* & *in vivo* [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 326: 121637.
- [19] Chen C, Liu X, Qi S S, *et al.* Hepatoprotective effect of *Phellinus linteus* mycelia polysaccharide (PL-N1) against acetaminophen-induced liver injury in mouse [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 1276-1284.
- [20] Zhao L L, Zheng L W, Li Z, *et al.* *Phellinus linteus* polysaccharides mediates acetaminophen-induced hepatotoxicity via activating AMPK/Nrf2 signaling pathways [J]. *Aging*, 2022, 14(17): 6993-7002.
- [21] Song Q Q, Wang Y K, Huang L X, *et al.* Review of the relationships among polysaccharides, gut microbiota, and human health [J]. *Food Res Int*, 2021, 140: 109858.
- [22] Zhang P C, Li J, Miao Y F, *et al.* Sheng-Jiang powder ameliorates NAFLD via regulating intestinal microbiota in mice [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1387401.
- [23] Jiang Z L, He L Q, Li D Y, *et al.* Human gut microbial aromatic amino acid and related metabolites prevent obesity through intestinal immune control [J]. *Nat Metab*, 2025, 7(4): 808-822.
- [24] Yang Y, Zhang J S, Liu Y F, *et al.* Structural elucidation of a 3-*O*-methyl-*D*-galactose-containing neutral polysaccharide from the fruiting bodies of *Phellinus igniarius* [J]. *Carbohydr Res*, 2007, 342(8): 1063-1070.
- [25] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-166.
- [26] Zhang X T, Zeng Y, Zhao L Y, *et al.* Targeting hepatic stellate cell death to reverse hepatic fibrosis [J]. *Curr Drug Targets*, 2023, 24(7): 568-583.
- [27] Delzenne N M, Bindels L B, Neyrinck A M, *et al.* The gut microbiome and dietary fibres: Implications in obesity, cardiometabolic diseases and cancer [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2025, 23: 225-238.
- [28] Hong Y H, Li H, Chen L K, *et al.* Short-term exposure to antibiotics begets long-term disturbance in gut microbial metabolism and molecular ecological networks [J]. *Microbiome*, 2024, 12(1): 80.
- [29] Wu X, Chen C W, Zhang H Y, *et al.* Exploration of chemical components and Rac1-dependent anti-hepatic fibrosis mechanism by total flavonoids derived from *Tetragium hemsleyanum* [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(4): 837-849.
- [30] Huang S C, Wang P W, Kuo P C, *et al.* Hepatoprotective principles and other chemical constituents from the mycelium of *Phellinus linteus* [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1705.
- [31] Qin D D, Han S, Liu M L, *et al.* Polysaccharides from *Phellinus linteus*: A systematic review of their extractions, purifications, structures and functions [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 230: 123163.
- [32] Dong Y, Qiu P, Zhao L S, *et al.* Metabolomics study of the hepatoprotective effect of *Phellinus igniarius* in chronic ethanol-induced liver injury mice using UPLC-Q/TOF-MS combined with ingenuity pathway analysis [J]. *Phytomedicine*, 2020, 74: 152697.
- [33] 张珈宁, 瞿海燕, 张金梦, 等. 桑黄多糖缓解日本血吸虫感染小鼠氧化应激及肝纤维化的实验研究 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(6): 615-621.
- [34] Qu Y H, Zhang P P, Cui J, *et al.* Extraction optimization, structure analysis and antioxidant activity of polysaccharide from *Sanghuangporus baumii* [J]. *Curr Anal Chem*, 2024, 20(4): 264-274.
- [35] 刘利娜. 桑黄多糖分离纯化、结构表征及其活性研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [36] Sun Y Q, Huo J X, Zhong S, *et al.* Chemical structure and anti-inflammatory activity of a branched polysaccharide isolated from *Phellinus baumii* [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 268: 118214.
- [37] Yan J K, Wang Y Y, Ma H L, *et al.* Structural characteristics and antioxidant activity *in vivo* of a polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* mycelia [J]. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2016, 65: 110-117.
- [38] Keung W S, Zhang W H, Luo H Y, *et al.* Correlation between the structures of natural polysaccharides and their properties in regulating gut microbiota: Current understanding and beyond [J]. *Carbohydr Polym*, 2025, 352: 123209.
- [39] Lei P, Li X G, Jiang L, *et al.* *Alisma plantago-Aquatica* polysaccharides ameliorate acetaminophen-induced acute liver injury by regulating hepatic metabolic profiles and modulating gut microbiota [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 285: 138345.
- [40] Liao J B, Cao Y J, Zhao J, *et al.* Aqueous extract of *Polygala japonica* Houtt. ameliorated nonalcoholic steatohepatitis in mice through restoring the gut microbiota disorders and affecting the metabolites in feces and liver [J]. *Phytomedicine*, 2023, 118: 154937.