

黄芪-丹参药对通过抑制 ERVs/RLRs/IFN-I 信号通路缓解肝纤维化的机制

周 峰^{1,2}, 李泽威^{1,2}, 黄 仪^{1,2}, 宋 浩^{1,2}, 杨学斌^{2,3}, 谭 洋^{1,2}, 裴 刚^{1,2*}, 邝 鸣^{1,2*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省高等普通学校中药现代化研究重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 湖南中医药大学中医药科学院, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 基于调控内源性逆转录病毒(endogenous retroviruses, ERVs)/维甲酸诱导基因I样受体(retinoic acid-inducible gene I-like receptors, RLRs)/I型干扰素(type I interferon, IFN-I)信号通路,探讨黄芪-丹参药对(*Astragali Radix-Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herb pair, HQ-DS)治疗肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)的作用机制。方法 通过超高效液相色谱-串联质谱(ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)对HQ-DS提取物以及含药血清进行成分分析与鉴定。将48只雄性C57BL/6J小鼠随机分为对照组、模型组及HQ-DS低、中、高剂量(4.55、9.10、18.20 g/kg)组和水飞蓟素(100 mg/kg)组,每组8只。采用四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)建立HF小鼠模型,给予药物干预后,检测血清中肝功能相关指标;通过苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、Masson和天狼星红染色观察肝组织病理变化;流式细胞术检测肝组织巨噬细胞浸润情况;Western blotting检测肝组织纤维化相关蛋白表达;采用高通量转录组测序分析肝组织基因转录水平变化;通过qRT-PCR、Western blotting和ELISA检测肝组织ERVs/RLRs/IFN-I信号通路相关因子表达。通过*Mavs*^{-/-}小鼠建立HF模型后给予HQ-DS进行干预,验证HQ-DS抗HF的作用机制。体外实验采用CCK-8实验评估HQ-DS对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、尼日利亚菌素(Nigericin)刺激iBMDM细胞活力的影响,免疫荧光检测dsRNA表达,qRT-PCR和Western blotting进一步验证HQ-DS对ERVs激活的抑制作用。结果 与对照组比较,模型组小鼠体质量增加缓慢,肝组织出现空泡样变性以及炎症细胞浸润,血清中肝功能相关指标显著升高($P<0.001$),肝组织中ERVs/RLRs/IFN-I信号通路相关因子表达显著升高($P<0.001$);与模型组比较,HQ-DS和水飞蓟素干预后小鼠体质量增长缓慢显著改善($P<0.01$ 、 0.001),肝组织空泡变性炎症浸润程度明显减轻,血清中肝功能相关指标显著降低($P<0.01$ 、 0.001),HF进程得到有效缓解,肝组织ERVs/RLRs/IFN-I信号通路相关因子表达显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。进一步的机制验证显示,在*Mavs*^{-/-}小鼠中,CCl₄诱导的促炎因子升高被显著抑制($P<0.001$),且ERVs/RLRs/IFN-I通路相关因子的mRNA表达水平亦被显著下调($P<0.001$);给予HQ-DS后炎症因子和ERVs/RLRs/IFN-I通路相关因子的mRNA表达水平平均无显著改变。细胞实验中,与模型组比较,HQ-DS显著提高iBMDM细胞活力($P<0.001$),减少dsRNA积累,并下调ERVs及IFN-I通路核心基因的表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),同时抑制RLRs通路关键蛋白磷酸化TANK结合激酶1(phosphorylated TANK-binding kinase 1, p-TBK1)、磷酸化干扰素调节因子3(phosphorylated interferon regulatory factor 3, p-IRF3)的表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 HQ-DS通过抑制ERVs/RLRs/IFN-I信号通路,减轻肝组织炎症损伤,缓解小鼠HF进程。

关键词: 肝纤维化; 黄芪-丹参药对; 内源性逆转录病毒; RLRs信号通路; I型干扰素; 巨噬细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)18-7162-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.008

Mechanism of *Astragali Radix-Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herb pair alleviates hepatic fibrosis through inhibition of ERVs/RLRs/IFN-I signaling pathway

ZHOU Feng^{1,2}, LI Zewei^{1,2}, HUANG Yi^{1,2}, SONG Hao^{1,2}, YANG Xuebin^{2,3}, TAN Yang^{1,2}, PEI Gang^{1,2}, KUANG Ming^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

收稿日期: 2026-05-15

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(82505414); 湖南省自然科学基金青年科学基金项目(2026JJ40093); 中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(25PTKF1005, 24PTKF1005)

作者简介: 周 峰,男,讲师,从事中药物质基础及作用机制研究。E-mail: 004871@hnuocm.edu.cn

*通信作者: 邝 鸣,男,讲师,从事中药调控天然免疫应答缓解肝脏疾病及自身免疫病的机制研究。E-mail: 004956@hnuocm.edu.cn

裴 刚,男,教授,博士生导师,从事中药治疗肝纤维化的物质基础及作用机制研究。E-mail: 002173@hnuocm.edu.cn

2. Key Laboratory of Modern Research of Traditional Chinese Medicine, Education Department of Hunan Province, Changsha 410208, China

3. College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which Huangqi (*Astragali Radix*)-Danshen (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*) herb pair (HQ-DS) in treating hepatic fibrosis (HF) via regulating the endogenous retroviruses (ERVs)/retinoic acid-inducible gene I-like receptors (RLRs)/type I interferon (IFN-I) signaling pathway. **Methods** The components of HQ-DS extract and drug-containing serum were analyzed and identified using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). A total of 48 male C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, HQ-DS low-, medium-, high-dose (4.55, 9.10, 18.20 g/kg) groups and silymarin (100 mg/kg) group, with eight mice in each group. A mouse model of HF was established using carbon tetrachloride (CCl₄), and after drug intervention, liver function related indicators in serum were detected. The pathological changes of liver tissue through hematoxylin eosin (HE) staining, Masson and Sirius red staining were observed. Flow cytometry was used to detect macrophage infiltration in liver tissue. Western blotting was used to detect the expressions of fibrosis related proteins in liver tissue. High-throughput transcriptome sequencing was used to analyze changes in gene transcription levels in liver tissue. The expressions of factors related to the ERVs/RLRs/IFN-I signaling pathway in liver tissue were detected using qRT-PCR, Western blotting and ELISA. A HF model was established in *Mavs*^{-/-} mice and intervened with HQ-DS to verify the mechanism of HQ-DS's anti-HF effect. *In vitro* experiments were conducted using CCK-8 assay to evaluate the effect of HQ-DS on the activity of iBMDM cells stimulated by lipopolysaccharides (LPS) and nigericin. Immunofluorescence detection of dsRNA expression was performed, qRT-PCR and Western blotting were used to further verify the inhibitory effect of HQ-DS on the activation of ERVs. **Results** Compared with control group, the body weight of mice in model group was increased slowly, with vacuolar degeneration and inflammatory cell infiltration in liver tissue, liver function related indicators in serum were significantly increased ($P < 0.001$), and the expressions of factors related to the ERVs/RLRs/IFN-I signaling pathway in liver tissue were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with model group, HQ-DS and silymarin intervention significantly improved the slow growth of body weight in mice ($P < 0.01, 0.001$), significantly reduced the degree of vacuolar degeneration and inflammatory infiltration in liver tissue, significantly reduced liver function related indicators in serum ($P < 0.01, 0.001$), effectively alleviated the process of HF, and significantly reduced the expressions of factors related to the ERVs/RLRs/IFN-I signaling pathway in liver tissue ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Subsequent verification of the underlying mechanisms revealed that in *Mavs*^{-/-} mice, the elevation of pro-inflammatory factors induced by CCl₄ was markedly suppressed ($P < 0.001$), the mRNA expression levels of factors associated with the ERVs/RLRs/IFN-I signaling pathway were significantly downregulated ($P < 0.001$). However, following the administration of HQ-DS, there was no significant change in the mRNA expression levels of inflammatory factors and factors related to the ERVs/RLRs/IFN-I pathway. In cell experiments, compared with model group, HQ-DS significantly increased iBMDM cell viability ($P < 0.001$), reduced dsRNA accumulation, and downregulated the expressions of core genes in ERVs and IFN-I pathways ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while inhibited the expressions of key proteins [phosphorylated TANK binding kinase 1 (p-TBK1), phosphorylated interferon regulatory factor 3 (p-IRF3)] in RLRs pathway ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** HQ-DS alleviates inflammatory injury and ameliorates the progression of HF in mice by inhibiting ERVs/RLRs/IFN-I signaling pathway.

Key words: hepatic fibrosis; *Astragali Radix*-*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herb pair; endogenous retrovirus; RLRs signaling pathway; type I interferons; macrophage

肝纤维化是各种慢性肝病进展为肝硬化乃至肝癌的共同病理过程，全球肝脏疾病负担日益加剧^[1-2]。2021 年全球肝硬化发病数较 1990 年增长 58.21%，累计发病数达 5 841 万例，已成为全球范围内不可忽视的健康挑战^[3]。近年来，免疫炎症在肝纤维化进程中的作用受到广泛关注。肝星状细胞的持续活化与转分化是肝纤维化的核心驱动事件，而这一过程受到肝脏复杂免疫微环境的精密调控^[4]。肝巨噬细胞作为肝脏中最丰富的固有免疫细胞群

体，是肝脏免疫监测的前哨细胞，当肝组织发生损伤时，肝巨噬细胞能迅速活化^[5-6]，并在肝纤维化的启动、维持与逆转过程中发挥核心作用^[7]。

I 型干扰素 (type I interferons, IFN-I) 是介导抗病毒免疫和炎症调控的核心细胞因子，在肝纤维化进程中发挥着复杂的双向调控作用^[8]。IFN-I 的过度产生被认为是造成肝纤维化的重要原因，IFN-I 虽可促进组织修复，但其异常持续激活会引发炎症级联反应，导致不可逆的组织损伤^[9-10]。IFN-I 的产生

受到模式识别受体通路的精密调控,包括 Toll 样受体通路 (Toll-like receptor, TLR)、RIG-I 样受体通路 (RIG-I-like receptors, RLRs) 及环磷酸鸟苷-腺苷合成酶-干扰素基因刺激因子 (cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes, cGAS-STING) 信号通路,其中 RLRs 轴通过识别胞质内异常 RNA,激活下游信号级联,驱动 IFN-I 大量合成^[11-12]。内源性逆转录病毒 (endogenous retroviruses, ERVs) 在生理状态下被表观遗传机制沉默,而在许多病理过程中,ERVs 被重新激活,其转录产物被胞内的 RLRs 识别并激活天然免疫信号通路,最终诱导 IFN-I 的产生^[13]。

在四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导的肝纤维化小鼠模型中,纤维化肝组织中的巨噬细胞数量显著增加,尤其是浸润性单核细胞来源的巨噬细胞,同时 IFN- α 、IFN- β 等 IFN-I 特征基因的表达水平也显著升高^[14]。在慢性肝损伤状态下,肝巨噬细胞中 RLRs 通路的持续性活化会导致 IFN 和促炎细胞因子的过量产生,形成恶性炎症循环,从而加剧肝纤维化。靶向巨噬细胞 ERVs/RLRs/IFN-I 信号轴有望成为抗肝纤维化治疗的新型策略。

根据肝纤维化的临床表现,中医医家多将其归属在鼓胀、积聚等病证的范畴。尽管肝纤维化的病因和临床表现有所不同,但肝血瘀阻是肝纤维化的重要病机,肝血壅滞成瘀,最终成积,促进了肝纤维化发展^[15]。黄芪善补中焦之气,《医学衷中参西录》有云:“肝属木而应春令,其气温而性喜条达,黄芪之性温而上升,以之补肝原有同气相求之妙用”,临床中凡遇肝气虚弱、失于条达之证,医家往往重用黄芪以补肝益气、助其条达。丹参性善走窜,能活血通脉、化瘀止痛,《神农本草经》载其“治心腹邪气,肠鸣幽幽如走水,寒热积聚,破症除瘕”,对多种病因所致的瘀血阻滞证均有良好治疗效果。黄芪与丹参配伍,一补一活、益气活血,共奏活血化瘀、消积通络之功。相关诊疗指南已将黄芪-丹参药对 (*Astragali Radix-Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herb pair, HQ-DS) 列入气虚血瘀型肝纤维化的治疗推荐组合,且在近 20 年中医药治疗肝纤维化的临床文献中,其配伍出现频率居于各药对之首^[16-17]。此外, HQ-DS 以“益气活血”为核心治法立方,临床研究已证实其能显著缓解肝纤维化患者的临床症状、改善肝功能^[18]。因此,本研究采用 sc 10% CCl₄ 玉米油溶液诱导小鼠肝纤维化模型,通过

给予 HQ-DS 干预,系统研究其对肝纤维化的治疗效果,深入探讨其缓解肝纤维化的潜在作用机制,为进一步扩大 HQ-DS 的临床适用范围、提供科学合理的临床应用依据奠定坚实基础。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只,体质量 (200 $\pm$ 20) g; SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 48 只,6 周龄,体质量 (20 $\pm$ 2) g,均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,生产许可证号 SCXK (湘) 2021-0002,动物质量合格证号 ZS-202512160028。SPF 级雄性 C57BL/6J 背景 *Mavs*^{-/-} 小鼠 24 只,6~8 周龄,体质量 (20 $\pm$ 2) g,由赛业 (苏州) 生物科技有限公司构建,生产许可证号 SCXK (苏) 2022-0016,由课题组长期饲养于湖南中医药大学动物实验中心,小鼠子代通过剪脚趾提取 DNA 经 PCR 鉴定为敲除小鼠后纳入实验 (*Mavs*^{-/-} 小鼠组织结构与炎症水平和野生型小鼠无显著差异)。所有动物在正式实验前均先进行 7 d 的适应性饲养,饲养间相对湿度为 (36 $\pm$ 4) %、温度为 (22 $\pm$ 2) °C,提供标准饮食及充足饮用水。本实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 SLBH-202512120001)。

永生小鼠骨髓来源巨噬细胞 (immortalized bone-marrow-derived macrophages, iBMDM, 批号 TCM-C809) 购自海星生物科技有限公司。

1.2 药材

黄芪 (批号为甘 20160003) 购自岷县顺兴和中药材有限责任公司,丹参 (批号为 HY20091606) 购自湖南中医药大学第一附属医院,以上饮片分别经湖南中医药大学王智副教授鉴定为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎。

1.3 药品与试剂

对照品黄芪甲苷 (批号 PU0215-0025,质量分数为 98.5%)、芒柄花苷 (批号 PS0441-0020,质量分数为 98%)、芒柄花素 (批号 PU0125-0025,质量分数为 99%) 购自上海源叶生物科技有限公司;对照品毛蕊异黄酮 (批号 B20846,质量分数 $\geq$ 98%)、丹酚酸 A (批号 B20260,质量分数 $\geq$ 98%)、丹酚酸 B (批号 B20261,质量分数 $\geq$ 98%)、丹参酮 II_A (批号 V96750,质量分数为 99.88%)、二氢丹参酮 I (批号 V98076,质量分数为 98%)、丹皮

酚(批号 B20266, 质量分数 $\geq 98\%$)购自普思生物科技股份有限公司; 天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)、 β 干扰素(interferon- β , IFN- β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)试剂盒(批号分别为 E-EL-M0160、E-BC-K235-M、E-BC-K062-M、E-EL-M0033、E-EL-M3063、E-EL-M0044)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; I 型胶原蛋白(type I collagen, collagen I)抗体(批号 14695-1-AP, 稀释比例 1:1 000)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(批号 14395-1-AP, 稀释比例 1:2 000)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体(批号 18985-1-AP, 稀释比例 1:2 000)、TANK 结合激酶 1(TANK-binding kinase 1, TBK1)抗体(批号 67211-1-Ig, 稀释比例 1:1 000)、p-TBK1 抗体(批号 82383-1-RR, 稀释比例 1:5 000)、干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3)抗体(批号 11312-1-AP, 稀释比例 1:5 000)、p-IRF3 抗体(批号 29528-1-AP, 稀释比例 1:1 000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 60004-1-Ig, 稀释比例 1:50 000)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 实验所用甲酸、甲醇和乙腈均为 LC-MS 级, 购自德国 CNW 公司; 戊巴比妥钠(批号 P11011)购自德国 Merck 公司, 通过湖南中医药大学对公试剂采购渠道购入, 试剂储存、领用严格遵守学校危险化学品管理规定, 仅限本研究实验动物麻醉使用; 水飞蓟素(批号 HY-N7073)、尼日利亚菌素(nigericin, 批号 HY-127019)购自美国 MedChemExpress 公司; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 G1120)、Masson 染色试剂盒(批号 G1340)购自北京索莱宝科技有限公司; 天狼星红染色试剂盒(批号 GC307014)购自武汉塞维尔生物科技有限公司; APC-H-CD45(批号 561487)购自美国 BD 公司; FITC-CD11b(批号 G4666)、APC-Cy7-F4/80(批号 G0066)荧光标记抗体购自 Selleck 公司; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 批号 L2630)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; J2 抗 dsRNA IgG2a(批号 10010200)购自美国 SCICONs 公司; Alexa Fluor

488 标记山羊抗小鼠 IgG2a(批号 ab150113)购自英国 Abcam 公司。

1.4 仪器

超高效液相色谱-串联质谱、1510 型全波长酶标仪[ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; D24 UV 型纯水仪(德国 Merck Millipore 公司); Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m, 美国 Waters 公司); DC-150 型氮吹仪(杭州佑宁仪器有限公司); LSM 900 型激光共聚焦(卡尔·蔡司股份公司)。

2 方法

2.1 HQ-DS 的制备及成分分析

2.1.1 HQ-DS 提取物的制备 取黄芪和丹参饮片各 200 g, 以 10 倍量的水煎煮 2 次, 每次 60 min, 合并提取液, 减压浓缩获得 HQ-DS 提取物, 制成含生药 2 g/mL 的提取物母液。采用 UPLC-MS/MS 测定 HQ-DS 提取物中毛蕊异黄酮、黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、二氢丹参酮 I、丹皮酚的含量。

2.1.2 HQ-DS 含药血清的制备 取 12 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量(200 $\pm$ 20) g, 适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组和 HQ-DS 组。HQ-DS 组大鼠按照正常人 10 倍给药量进行 ig 给药(10 mL/kg), 采用体表面积换算法折算为大鼠等效剂量为 31.5 g/kg, 1 次/d, 共给药 3 d。对照组大鼠于相同时间点 ig 等体积的生理盐水。末次给药后 1~2 h 内采血。戊巴比妥钠麻醉后于腹主动脉取血, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜, 3 000 r/min 离心 10 min。将所得血清于 56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30 min, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.1.3 血清样本的处理 取 0.4 μ L 血清样本, 加入 40 μ L 盐酸(2 mol/L), 涡旋 1 min, 4 $^{\circ}$ C 静置 15 min; 重复涡旋静置操作 4 次后, 加入 1.6 mL 乙腈, 涡旋 5 min, 1 200 r/min 离心 5 min, 取 1 800 μ L 上清液, 用氮吹仪干燥; 加入 150 μ L 80%甲醇复溶, 再次涡旋 5 min, 1 200 r/min 离心 5 min, 取上清液 100 μ L, 于-80 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

2.1.4 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m, 美国 Waters 公司); 流动相为 0.5%甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0~1 min, 5% B; 1~8 min, 5%~95% B; 8~9 min, 95% B; 9~10 min, 95%~5% B; 10~12 min, 5%

B; 体积流量 0.35 mL/min; 柱温 35 °C; 进样体积 5 μ L。样本经 UPLC 分离后进入高分辨率质谱仪进行检测。

2.1.5 质谱条件 采用电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI), 正、负离子模式下检测, 雾化气体为高纯度氮气, 碰撞气体为高纯度氦气, 鞘气体积流量 45 arb, 辅助气体流量 15 arb, 毛细管温度 400 °C, 全质谱分辨率 70 000, MS/MS 分辨率 17 500, 碰撞能量 15~45 V, 质量扫描范围 m/z 100~1 500。将质谱原始数据导入 XCMS 软件, 进行保留时间校正、峰识别、峰提取、峰积分和峰对齐等工作, 利用自建二级质谱数据库及相应裂解规律匹配法对含有二级质谱数据的峰进行鉴定。

2.2 动物分组、肝纤维化模型的建立与给药

48 只雄性 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组及 HQ-DS 低、中、高剂量 (4.55、9.10、18.20 g/kg, 分别相当于临床等效剂量的 1、2、4 倍) 组和水飞蓟素 (100 mg/kg) 组, 每组 8 只。除对照组外, 其余小鼠 sc 10% CCl₄-玉米油溶液 (0.5 mL/kg) 建立肝纤维化模型^[19-20], 每周 3 次, 保证每次注射时间间隔一致, 持续造模 6 周。于造模第 1 天同步开始药物干预, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的纯净水, 1 次/d, 连续给药 6 周。

另取 24 只 6 周龄 *Mavs*^{-/-}小鼠, 随机分为 *Mavs*^{-/-}对照组、*Mavs*^{-/-}模型组和 *Mavs*^{-/-} HQ-DS (9.10 g/kg) 组, 每组 8 只。除对照组外, 其余小鼠建立肝纤维化模型。给予相应药物干预 6 周后, 所有小鼠禁食不禁水 24 h, 小鼠眼底静脉丛取血后, 颈椎脱臼法处死并采集肝脏标本进行后续分析。

2.3 肝组织病理学染色

将小鼠肝组织于 4%多聚甲醛中固定, 经石蜡包埋后切片 (厚度为 4 μ m)。切片经脱蜡处理后, 分别进行 HE 染色、Masson 染色及天狼星红染色, 通过光学显微镜观察肝组织病理形态、炎症浸润及胶原沉积情况, 明确肝纤维化程度。使用 Image J 软件进行图像定量分析, 计算相对染色面积。

相对染色面积 = 目标染色区域面积/同一视野内有效组织总面积

2.4 血清中 AST、ALT 活性和 Hyp 水平检测

将小鼠眼底静脉丛血于 4 °C 静置过夜, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血清, 按照试剂盒说明书检测血清中 AST、ALT 活性和 Hyp 水平。

2.5 血清中炎症因子水平检测

将小鼠眼底静脉丛血于 4 °C 静置过夜, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 按照 ELISA 试剂盒按说明书检测血清中 TNF- α 、IL-6 和 IFN- β 水平。

2.6 肝组织转录测序分析

取模型组、HQ-DS 中剂量组小鼠肝组织样本, 采用液氮速冻后, 使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 选取质量检测合格样本用于后续实验。构建链特异性 RNA 测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 文库, 采用 Illumina 测序平台进行高通量转录组测序。对原始测序数据进行过滤处理, 去除含接头序列、低质量读数 (Q 值 < 20 的碱基占比超过 50%) 及模糊序列, 得到高质量清洁读数 (clean reads)。利用比对软件将清洁读数比对至物种参考基因组, 以 FPKM 值进行表达水平标准化处理。设定差异筛选标准 ($|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC)| ≥ 1 且 $P < 0.05$), 筛选组间差异表达基因; 对差异表达基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路富集分析, 明确差异表达基因参与的生物学过程及调控通路。

2.7 流式细胞术检测肝组织中巨噬细胞 (F4/80⁺) 的表达

取各组肝组织样本, 制备成单细胞悬液, 分别加入流式管中, 依次加入 APC-H-CD45、FITC-CD11b、APC-Cy7-F4/80 荧光标记抗体, 轻混后于避光条件下孵育。使用流式细胞仪进行检测, 采集并分析细胞表面标志物的表达比例。

2.8 细胞培养

iBMDM 细胞复苏后, 用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。待细胞融合度达到 80%~90%时, 采用 0.25%胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期细胞用于后续实验。

2.9 CCK-8 检测细胞活力

取对数生长期的 iBMDM 细胞, 以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 设置对照组、模型组和 HQ-DS 含药血清组。对照组加入不含药物的培养基; 模型组加入终质量浓度为 1 μ g/mL 的 LPS 处理 4 h, 再加入终浓度为 10 μ mol/L 的 nigericin 处理 1 h; HQ-DS 含药血清组采用不同体积分数 (5%、10%、15%) HQ-DS 含药血清预处理细胞 4 h 后, 加入终

质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 处理 4 h, 再加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 nigericin 处理 1 h。弃去培养基, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 试剂的培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。

2.10 Western blotting 检测肝组织和 iBMDM 细胞中相关蛋白表达

取小鼠肝组织或 iBMDM 细胞样本, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, 冰上静置 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 使用 BCA 检测试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂牛奶的 Tris 缓冲盐溶液封闭处理后, 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 1 h 后, 将 ECL 发光液均匀滴加在膜上, 使用 Image J 软件定量分析条带灰度值。

2.11 免疫荧光检测 dsRNA 表达

按“2.9”项下方法处理后, 收集 iBMDM 细胞,

吸弃培养基, 加入 PBS 清洗细胞; 经 4% 多聚甲醛室温固定、0.1% Triton X-100 透膜、5% 牛血清白蛋白室温封闭后, 弃去封闭液, 加入 J2 抗 dsRNA 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS 洗涤后加入荧光二抗, 室温避光孵育 1 h; 加入 DAPI 于室温避光孵育, 固定爬片, 室温避光晾干。采用激光共聚焦显微镜采集图像。

2.12 qRT-PCR 检测肝组织和 iBMDM 细胞中相关基因表达

取小鼠肝组织或 iBMDM 细胞样本, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 扩增反应体系总体积 20 μL , 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共设置 40 个循环。熔解曲线程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s。以 *Gapdh* 作为细胞样本内参, 以 $\beta\text{-actin}$ 作为肝组织样本内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>Isg15</i>	GGTGTCCGTGACTAACTCCAT	CTGTACCACTAG CATCACTGTG
<i>Cxcl10</i>	TGTTGAGATCATTGCCACGAT	CCTTTTAGACCTTTTTTGGCTAAACG
<i>Ifnb1</i>	GATGCTCCAGAATGTCTTTCTTGT	CGAATGATGAGAAAGTTCCTGAAGA
<i>eMlv</i>	GCTGACCCCGTCTAAAGACT	GAGGCTGCCTATCTAGGCTG
<i>Mervk</i>	CTCATTTCAGGTCCTGGCA	CCACTTGTCTGACTGCCTGT
<i>Mervl</i>	CAGTCCTTTGTTGGGGCCTA	GGTCTCTCTTGCCCATGCTA
<i>Gapdh</i>	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC	TGGAATTTGCCATGGGTGGA
$\beta\text{-actin}$	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG	TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

Isg15-干扰素刺激基因 15; *Cxcl10*-C-X-C 基序趋化因子配体 10; *Ifnb1*-干扰素 β 1; *eMlv*-小鼠内源性嗜亲性白血病病毒; *Mervk*-小鼠内源性逆转录病毒 K; *Mervl*-小鼠内源性逆转录病毒 L。

Isg15-interferon-stimulated gene 15; *Cxcl10*-C-X-C motif chemokine ligand 10; *Ifnb1*-interferon beta 1; *eMlv*-endogenous ecotropic murine leukemia virus; *Mervk*-murine endogenous retrovirus-K; *Mervl*-murine endogenous retrovirus-L。

2.13 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行单因素方差分析 (ANOVA) 或 Student's t 检验, 以分析组间差异。

3 结果

3.1 HQ-DS 成分分析与鉴定

采用 UPLC-MS/MS 分别在电喷雾正、负离子模式下采集 HQ-DS 提取物及含药血清的总离子流图 (图 1)。高分辨液质采集的数据通过 CD2.1 完成初步整理后, 与 mzCloud、mzVault 数据库检索进行比对, 并采用 Xcalibur 4.0 软件进行分析。结果显

示, HQ-DS 提取物与含药血清的色谱图存在显著差异, 提取物中多个特征峰在含药血清中消失或峰强度降低, 同时出现了新的吸收峰, 提示药物经体内代谢吸收后其成分谱发生了改变。基于对照品的保留时间、精确相对分子质量及二级碎片离子信息, 对提取物中的主要成分进行鉴定, 见表 2。采用外标法对提取物中各目标成分进行定量分析, 结果表明, HQ-DS 提取物中含黄芪甲苷 0.599%、芒柄花苷 0.003%、芒柄花素 1.778%、毛蕊异黄酮 0.281%、丹皮酚 0.992%、二氢丹参酮 I 0.401%、丹酚酸 A 1.694%、丹酚酸 B 3.557% 和丹参酮 II_A 1.161%。

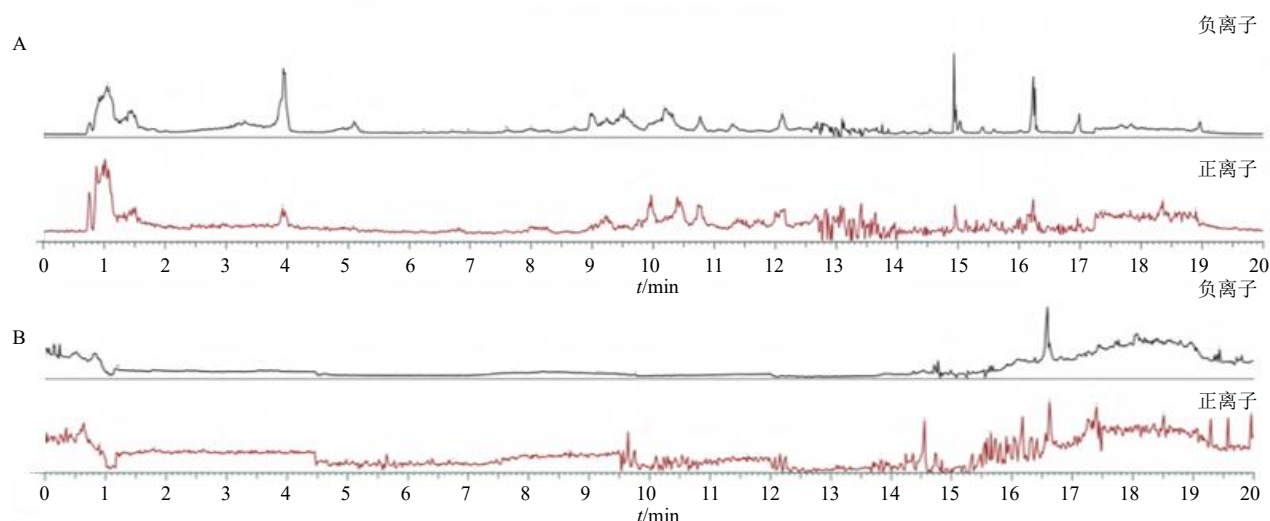


图 1 HQ-DS 提取物 (A) 及含药血清 (B) 的总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatograms of HQ-DS extract (A) and drug containing serum (B)

表 2 通过 UPLC-MS/MS 对 HQ-DS 提取物中的成分进行鉴定

Table 2 Identification of components in HQ-DS extract by UPLC-MS/MS

序号	分子式	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片离子 (m/z)	化合物
			理论值	实测值			
1	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	[M+H] ⁺	785.468 7	785.466 9	-2.3	475.345 7, 437.331 4	黄芪甲苷
2	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	431.134 2	431.134 3	0.2	269.082 1, 254.053 6, 197.059 2	芒柄花苷
3	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	269.081 4	269.081 5	0.4	254.058 3, 237.052 2	芒柄花素
4	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.076 3	285.073 6	-9.5	270.056 4, 253.044 7, 137.026 7	毛蕊异黄酮
5	C ₉ H ₁₀ O ₃	[M+H] ⁺	167.070 8	167.073 3	15.0	149.053 2, 105.076 9	丹皮酚
6	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	[M+H] ⁺	279.102 1	279.102 4	1.1	261.095 7, 189.076 4	二氢丹参酮I
7	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	493.113 5	493.113 5	0.0	295.068 3, 185.060 2	丹酚酸A
8	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	717.145 6	717.145 8	0.3	537.114 6, 321.032 7, 295.068 1	丹酚酸B
9	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	[M+H] ⁺	295.133 4	295.136 2	9.5	277.126 1, 262.094 8, 249.091 6	丹参酮II _A

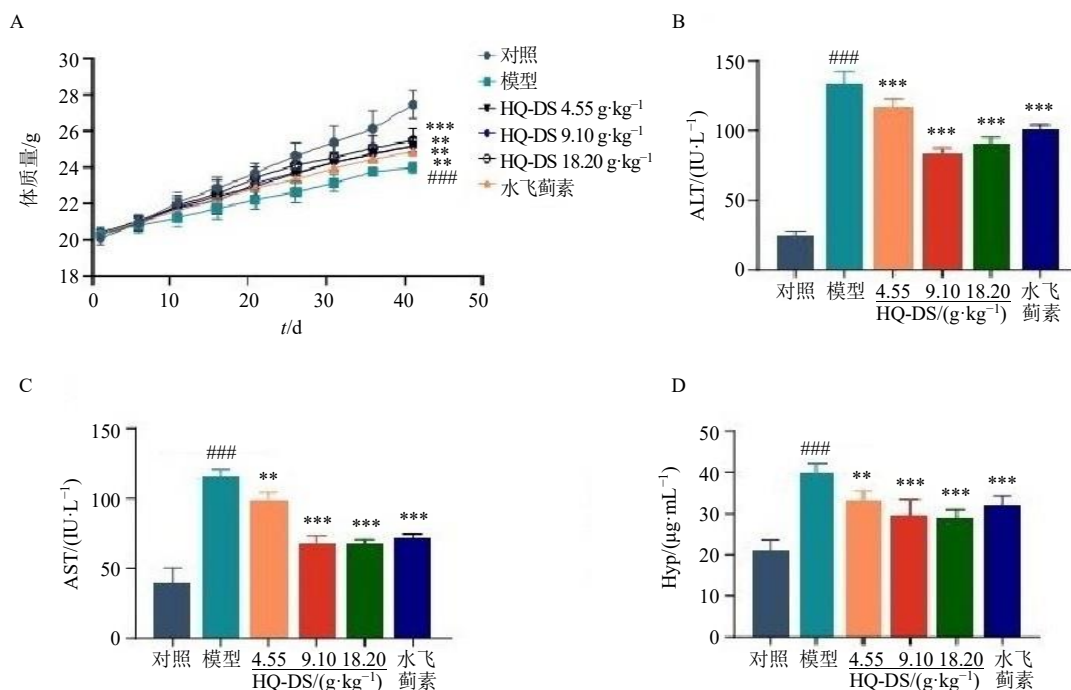
3.2 HQ-DS 减轻肝纤维化模型小鼠肝损伤

为验证 HQ-DS 对小鼠肝纤维化的体内治疗作用, 构建 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型。结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠体质量增长显著减缓 ($P<0.001$, 图 2-A); 与模型组比较, 各给药组可显著改善小鼠的体质量下降 ($P<0.001$)。血清生化指标检测结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 ALT、AST 活性及 Hyp 水平显著升高 ($P<0.001$, 图 2-B~D), Hyp 作为胶原蛋白特有的氨基酸组分, 其含量可直接反映肝脏胶原沉积的总量, 提示模型组肝细胞损伤及胶原沉积增加; 与模型组比较, 各给药组小鼠血清中 ALT、AST 活性及 Hyp 水平均显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 表明 HQ-DS 可有效减轻肝细胞损伤并抑制胶原沉积。

3.3 HQ-DS 改善肝纤维化模型小鼠肝纤维化

肝脏大体形态 (图 3-A) 观察显示, 对照组肝

脏呈正常红褐色、质地柔软; 模型组肝脏肿大、颜色发黄、表面粗糙; 各给药组肝脏形态、颜色及质地均有明显改善。采用 HE 染色、Masson 染色及天狼星红染色系统评估各组小鼠肝脏组织病理学改变及胶原沉积程度。HE 染色用于观察肝小叶结构完整性、肝细胞坏死及炎症细胞浸润等基本病理改变; Masson 染色与天狼星红染色则用于特异性显示胶原纤维的分布与沉积量, 定量评估肝纤维化程度。如图 3-A、B 所示, HE 结果显示, 模型组肝组织结构紊乱, 炎症细胞浸润明显; Masson 染色及天狼星红染色可见大量胶原纤维沉积。HQ-DS 干预后, 可显著改善肝组织结构紊乱及炎症浸润, 并明显减少胶原纤维沉积, 抑制肝纤维化进展。通过 Western blotting 进一步检测纤维化标志物 collagen I 及 α -SMA 的蛋白表达水平, 如图 3-C、D 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织 collagen I 和 α -SMA



A-各组小鼠体重变化曲线; B~D-血清中 ALT、AST 活性及 Hyp 水平; 与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 图 3、4、7、8 同。

A-body weight change curve of mice in each group; B-D-activities of ALT, AST and level of Hyp in serum; ### $P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group, same as Figs. 3, 4, 7, 8.

图 2 HQ-DS 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 HQ-DS on liver injury in mice model of hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

蛋白表达水平显著升高($P<0.001$);与模型组比较,各给药组 collagen I 和 α -SMA 蛋白表达水平显著降低($P<0.05, 0.001$)。上述结果表明, HQ-DS 对 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化具有显著的治疗作用。

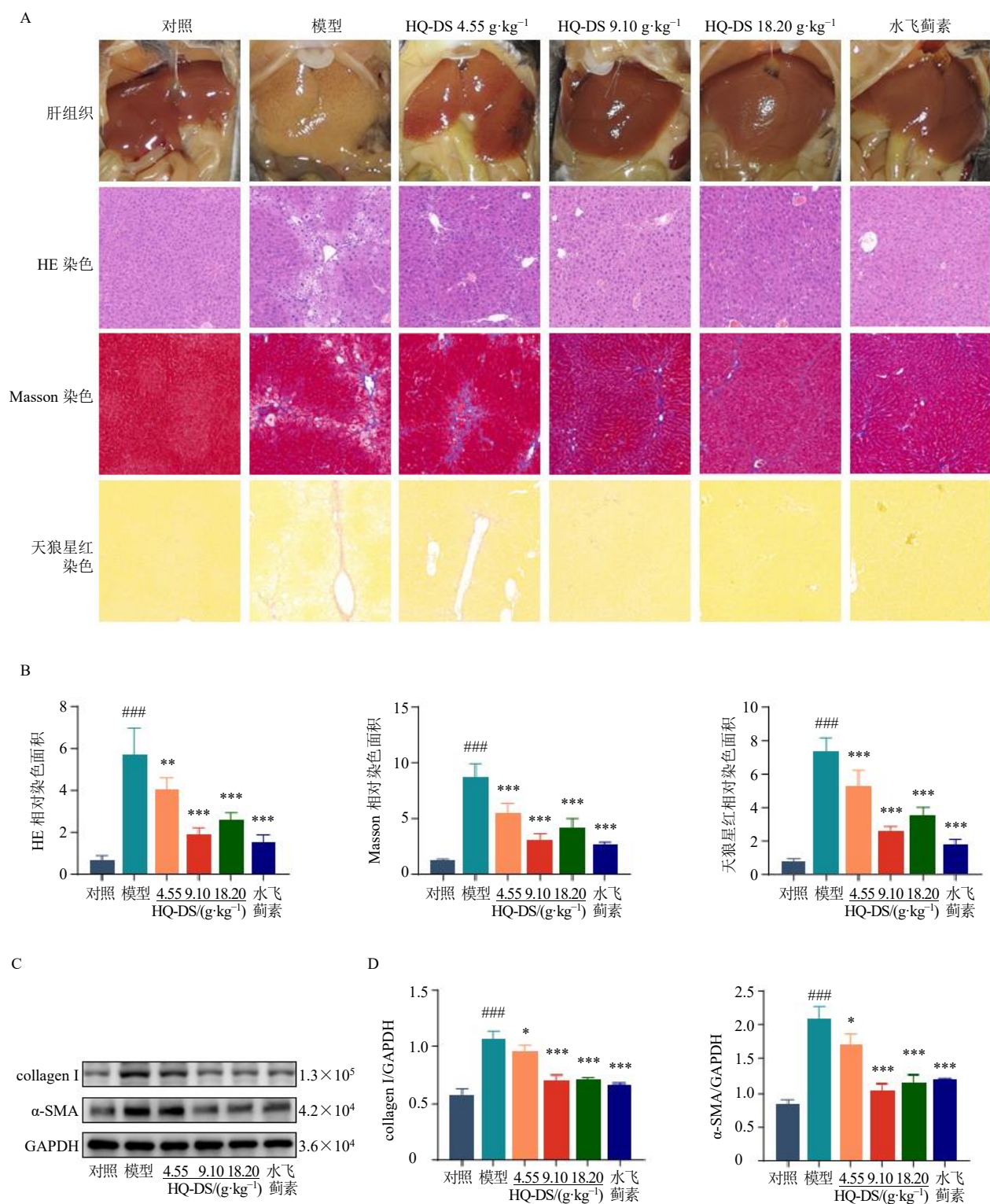
3.4 HQ-DS 抑制肝纤维化模型小鼠肝组织巨噬细胞浸润

图 4-A 展示肝脏单细胞悬液完整圈门流程,逐步筛选肝脏巨噬细胞。流式细胞术结果(图 4-B、C)显示,与对照组比较,模型组肝组织 CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺巨噬细胞浸润比例显著升高($P<0.001$);与模型组比较, HQ-DS 干预可显著降低巨噬细胞浸润比例($P<0.05, 0.001$)。Western blotting 结果(图 4-D、E)显示,与对照组比较,模型组肝组织 M1 型巨噬细胞标志性蛋白 iNOS 表达水平显著上调($P<0.001$)。上述结果证实, CCl₄ 介导的肝损伤促进巨噬细胞向肝脏募集,并诱导巨噬细胞发生 M1 型促炎极化。

3.5 肝组织转录组学分析

为揭示 HQ-DS 抗肝纤维化的分子机制,采用转录组学测序技术对对照组、模型组及 HQ-DS 中

剂量组小鼠肝脏组织进行差异表达基因筛选与分析。如图 5-A、B 所示, GO 功能富集分析结果显示,差异表达基因在天然免疫应答等生物学过程中显著富集; KEGG 通路富集分析则进一步揭示,模型组小鼠肝脏组织中 RIG-I 样受体信号通路及 TNF 信号通路显著激活。上述结果提示, HQ-DS 可能通过调控以 RLRs 通路为核心的天然免疫应答网络,减轻肝脏炎症反应并延缓肝纤维化的进展。通过转录组测序分析结合功能验证,探究其关键调控通路。GO 及 KEGG 富集分析显示,模型组显著富集的生物学过程主要集中在炎症反应、天然免疫应答和肝星状细胞活化等过程,与肝纤维化的病理特征高度吻合。KEGG 通路富集分析则进一步揭示, CCl₄ 诱导的肝纤维化进程伴随 RLR 信号通路的显著激活。而 HQ-DS 干预后,上述异常富集的生物学过程及通路均受到明显抑制,与模型组相比, HQ-DS 干预组中 RLRs 信号通路的富集程度显著下降。火山图(图 5-C)分析进一步证实, HQ-DS 可显著逆转 CCl₄ 诱导的肝脏组织差异基因表达变化,与通路富集分析结果相一致。

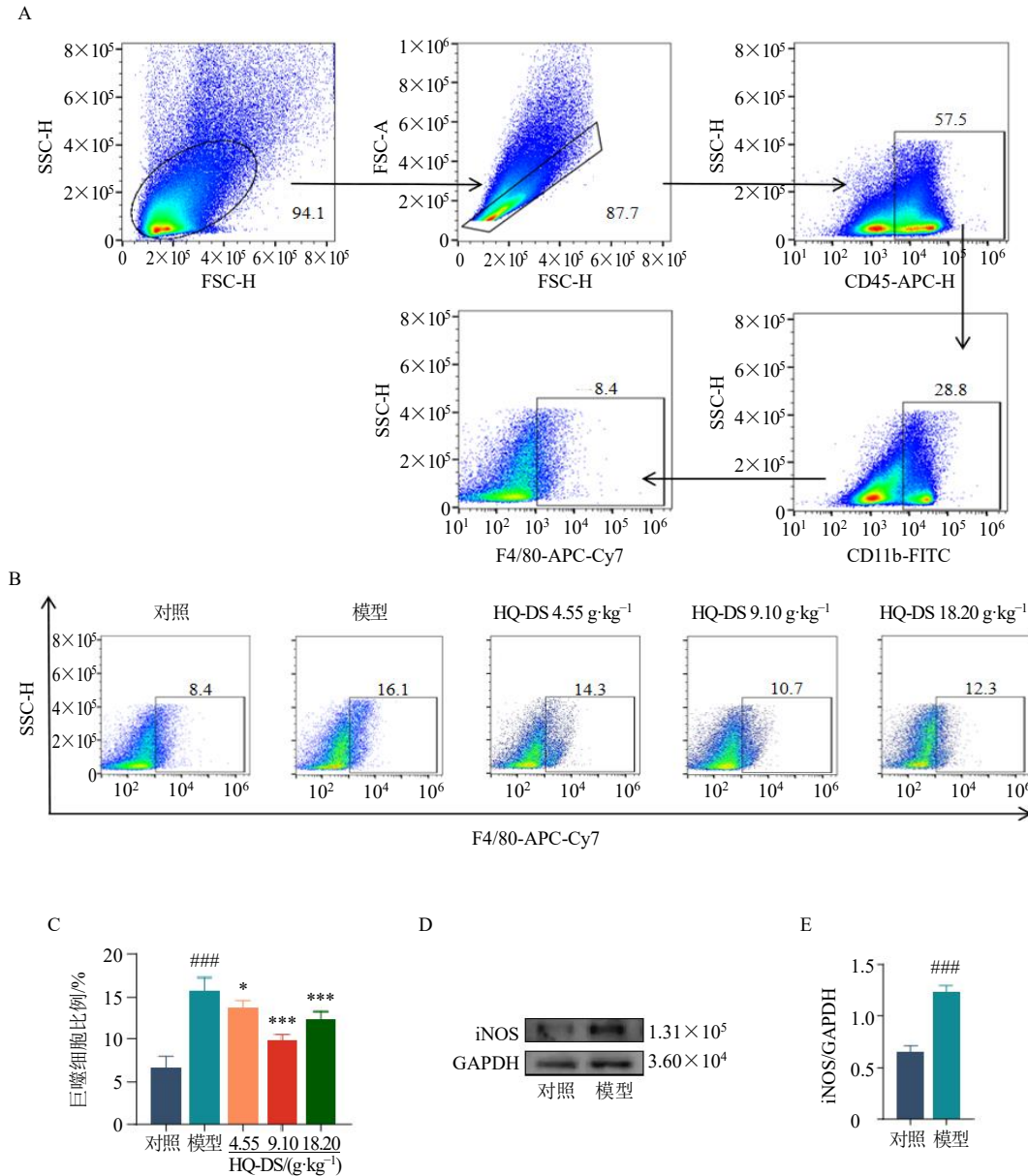


A-肝脏大体形态及组织病理学染色 ($\times 100$); B-肝组织切片相对染色面积 ($n=6$); C、D-Western blotting 检测肝纤维化标志物 collagen I 和 α -SMA 蛋白表达水平 ($n=3$)。

A-gross morphology and histopathological staining of liver ($\times 100$); B-relative staining area of liver tissue sections ($n=6$); C、D-protein expression levels of hepatic fibrosis markers collagen I and α -SMA detected by Western blotting ($n=3$).

图 3 HQ-DS 对肝纤维化模型小鼠肝纤维化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of HQ-DS on hepatic fibrosis in mice model of hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s$)



A-肝脏免疫细胞流式分群圈门流程; B、C-流式细胞术检测肝脏巨噬细胞分群对比; D、E-Western blotting 检测 M1 型促炎巨噬细胞标志物 iNOS 蛋白表达水平。

A-process of grouping liver immune cells was conducted using a ring gate method; B, C-flow cytometry was employed to analyze the distribution of liver macrophages; D, E-expression level of inducible a marker iNOS indicative of M1 proinflammatory macrophages detected by Western blotting.

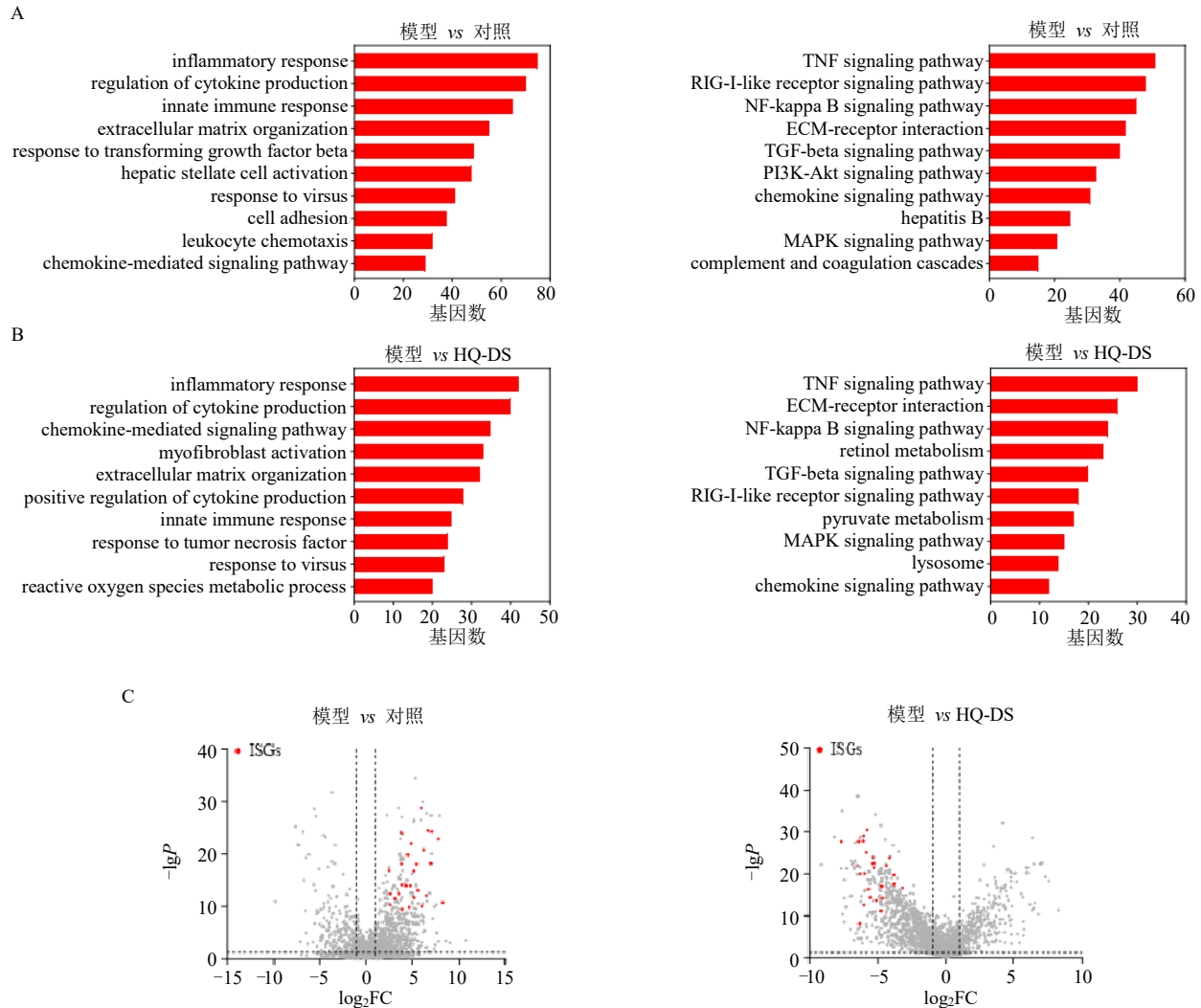
图 4 HQ-DS 对肝纤维化模型小鼠肝组织巨噬细胞浸润的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of HQ-DS on macrophage infiltration in liver tissue of mice model of liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 HQ-DS 抑制 RLRs 信号通路、减少巨噬细胞 IFN-I 的产生从而缓解肝纤维化

为验证 GO 及 KEGG 富集分析中 RLRs 信号通路异常激活的结果,采用 qRT-PCR 技术检测小鼠肝组织中相关基因的表达水平。如图 6-A 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织 RLRs 通路下游基因 *Cxcl10*、*Isg15* 及 *Ifnb1* 的表达水平显著升高 ($P <$

0.001); 而 HQ-DS 干预可降低上述基因的表达 ($P <$ 0.01、0.001)。进一步通过 *Mavs*^{-/-} 小鼠验证 HQ-DS 抗肝纤维化的作用机制,在野生型小鼠体内, HQ-DS 可显著拮抗 CCl₄ 诱导的 IFN-I 通路激活;而在 *Mavs*^{-/-} 小鼠中, CCl₄ 处理未能显著上调 *Cxcl10*、*Isg15* 及 *Ifnb1* 的表达 (图 6-B); 给予 HQ-DS 干预后,并未降低各基因的表达水平,提示 HQ-DS 通过



A-模型组 vs 对照组 GO 功能富集及 KEGG 通路富集分析; B-模型组 vs HQ-DS 组 GO 功能富集及 KEGG 通路富集分析; C-火山图分析模型组 vs 对照组、模型组 vs HQ-DS 组差异表达基因。

A-GO and KEGG enrichment analysis in model group vs control group; B-GO and KEGG enrichment analysis in model group vs HQ-DS group; C-volcano plot of differential expression genes between model group vs control group, model group vs HQ-DS group.

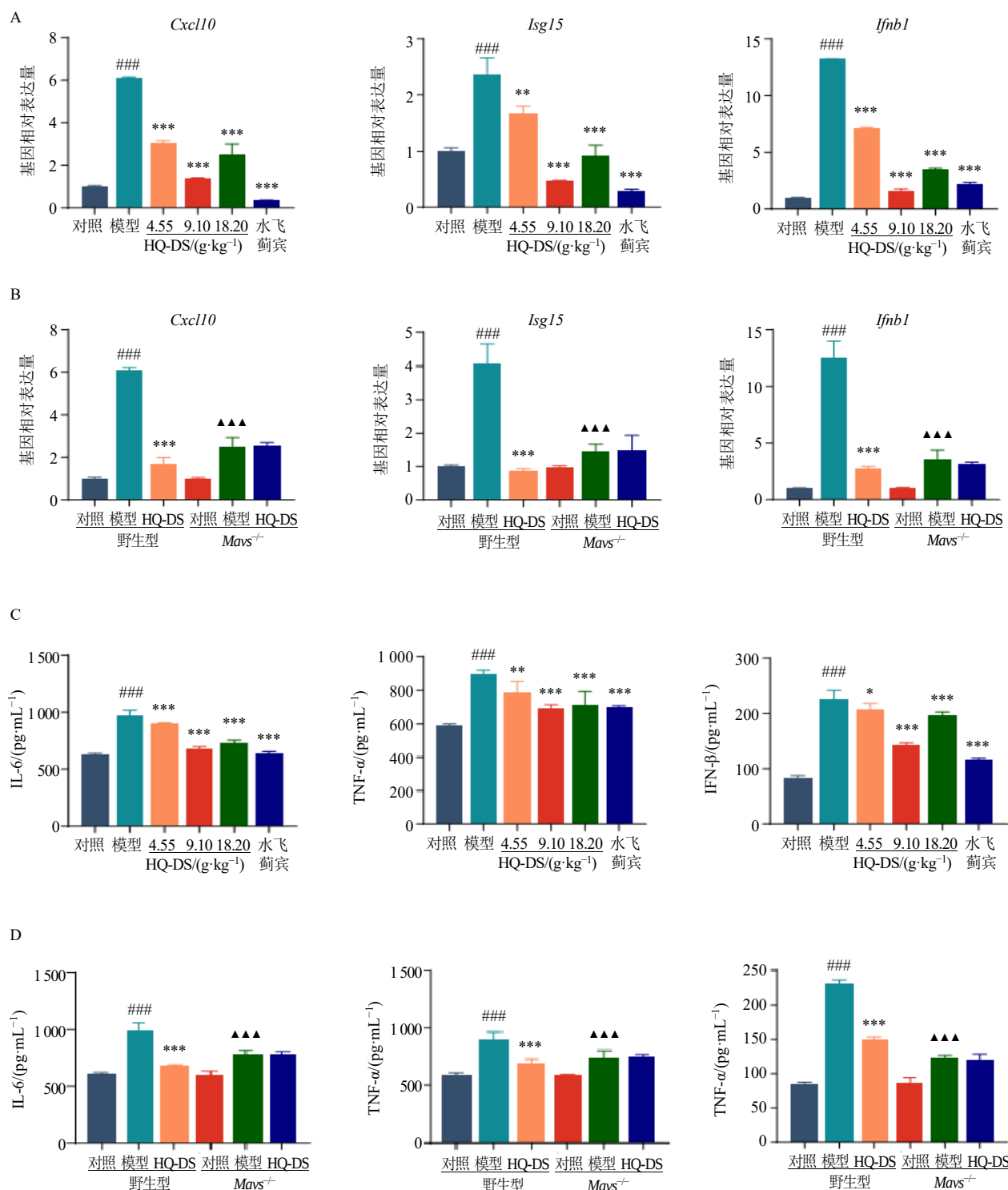
图 5 转录组学分析结果

Fig. 5 Transcriptome analysis results

抑制 RLRs/IFN-I 信号轴发挥抗肝纤维化作用。ELISA 检测结果 (图 6-C) 显示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 及 IFN- β 水平显著升高 ($P < 0.001$); HQ-DS 干预后上述细胞因子的分泌均显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。在 *Mavs*^{-/-} 小鼠中, 经 CCl₄ 造模后诱导促炎因子 IL-6、TNF- α 及 IFN- β 升高的作用显著削弱 ($P < 0.001$, 图 6-D); 给予 HQ-DS 干预后未能降低炎症因子水平。综上, HQ-DS 可通过抑制 RLRs 信号通路激活, 减少肝组织巨噬细胞 IFN-I 产生, 进而减轻肝脏炎症反应, 缓解肝纤维化进程。

3.7 HQ-DS 减少 dsRNA 异常产生

为阐明 HQ-DS 抑制 IFN-I 产生的上游机制, 探究了其炎症诱导的 ERVs 激活及天然免疫应答的调控作用。ERVs 转录产物能够被胞内模式识别受体识别, 进而激活 RLRs 信号通路诱导 IFN-I 及一系列干扰素刺激基因的表达, 从而放大肝脏的炎症反应并促进纤维化进展。火山图 (图 7-A) 清晰地显示, 模型组中部分 ERVs (红色点) 出现显著上调, 提示肝损伤过程中 ERVs 被激活; 在 HQ-DS 干预后, 上调的 ERVs 数量减少, 表明 HQ-DS 能显著抑制 CCl₄ 诱导的 ERVs 激活。采用 LPS 和 nigericin

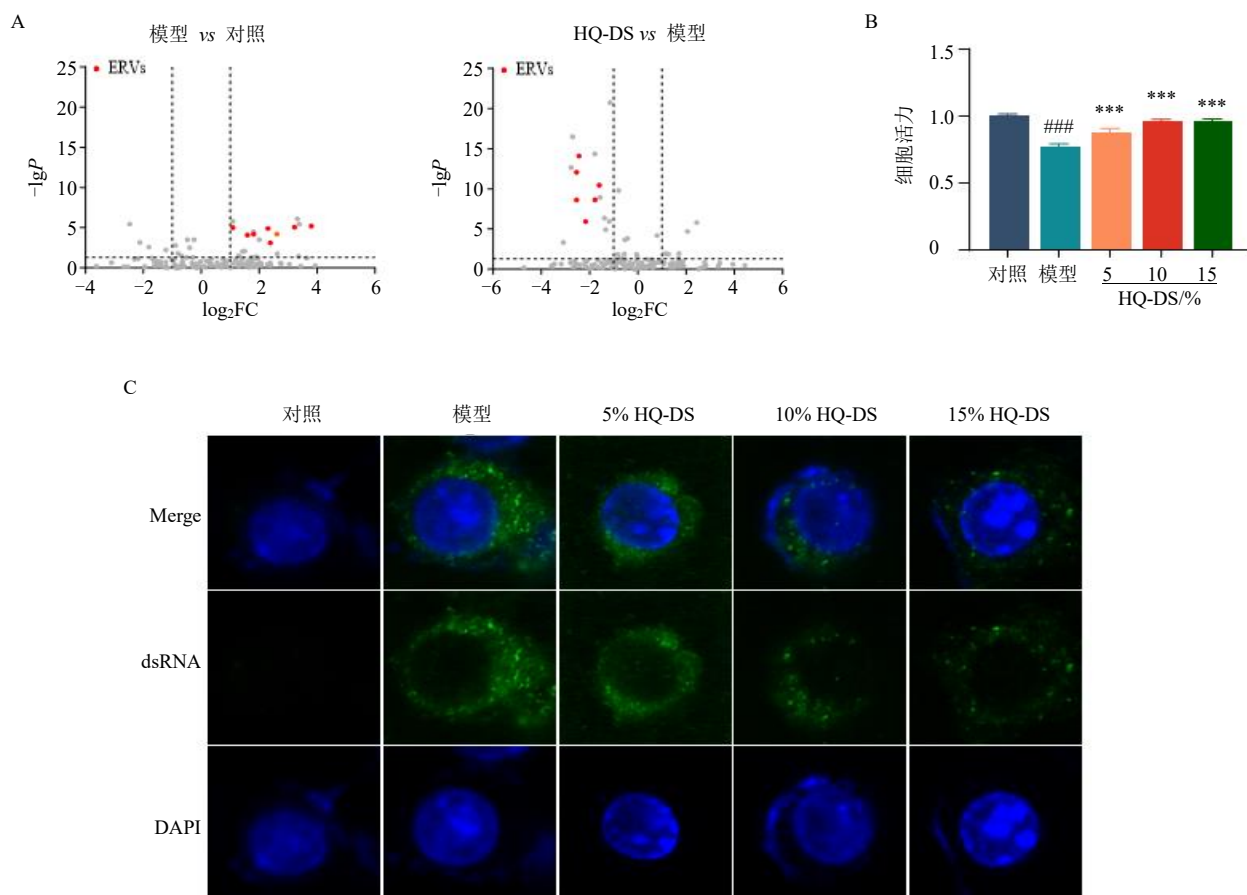


A、B-qRT-PCR 检测 RLRs 通路下游关键基因表达；C、D-ELISA 检测血清中 IL-6、TNF-α 和 IFN-β 水平；与对照组比较：####*P*<0.001；与模型组比较：**P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001；与野生型小鼠相同组别比较：▲▲▲*P*<0.001。

A、B-qRT-PCR was used to detect the expressions of key genes downstream of RLRs pathway; C、D-ELISA was used to detect the levels of IL-6, TNF-α and IFN-β in serum; ####*P*<0.001 vs control group; **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001 vs model group; ▲▲▲*P*<0.001 vs same group of wild-type mice.

图 6 HQ-DS 抑制肝组织巨噬细胞 IFN-I 表达及其下游干扰素刺激基因的转录 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

Fig. 6 HQ-DS inhibits expression of IFN-I in macrophages and transcription of downstream interferon-stimulated genes in liver tissue ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)



A-火山图分析 CCL₄ 诱导肝纤维化模型中 ERVs 的差异表达; B-CCK-8 法检测 HQ-DS 对 LPS+Nigericin 诱导的 iBMDM 细胞活力的影响; C-免疫荧光染色检测细胞内 dsRNA 水平 ($\times 630$)。

A-volcano plot analysis of differentially expressed ERVs in CCL₄-induced hepatic fibrosis model; B-CCK-8 assay detection of cell viability in LPS + nigericin-induced iBMDM cells after HQ-DS treatment; C-immunofluorescence staining detection of intracellular dsRNA level ($\times 630$).

图 7 HQ-DS 抑制 ERVs 激活和 dsRNA 累积以改善炎症诱导的细胞损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

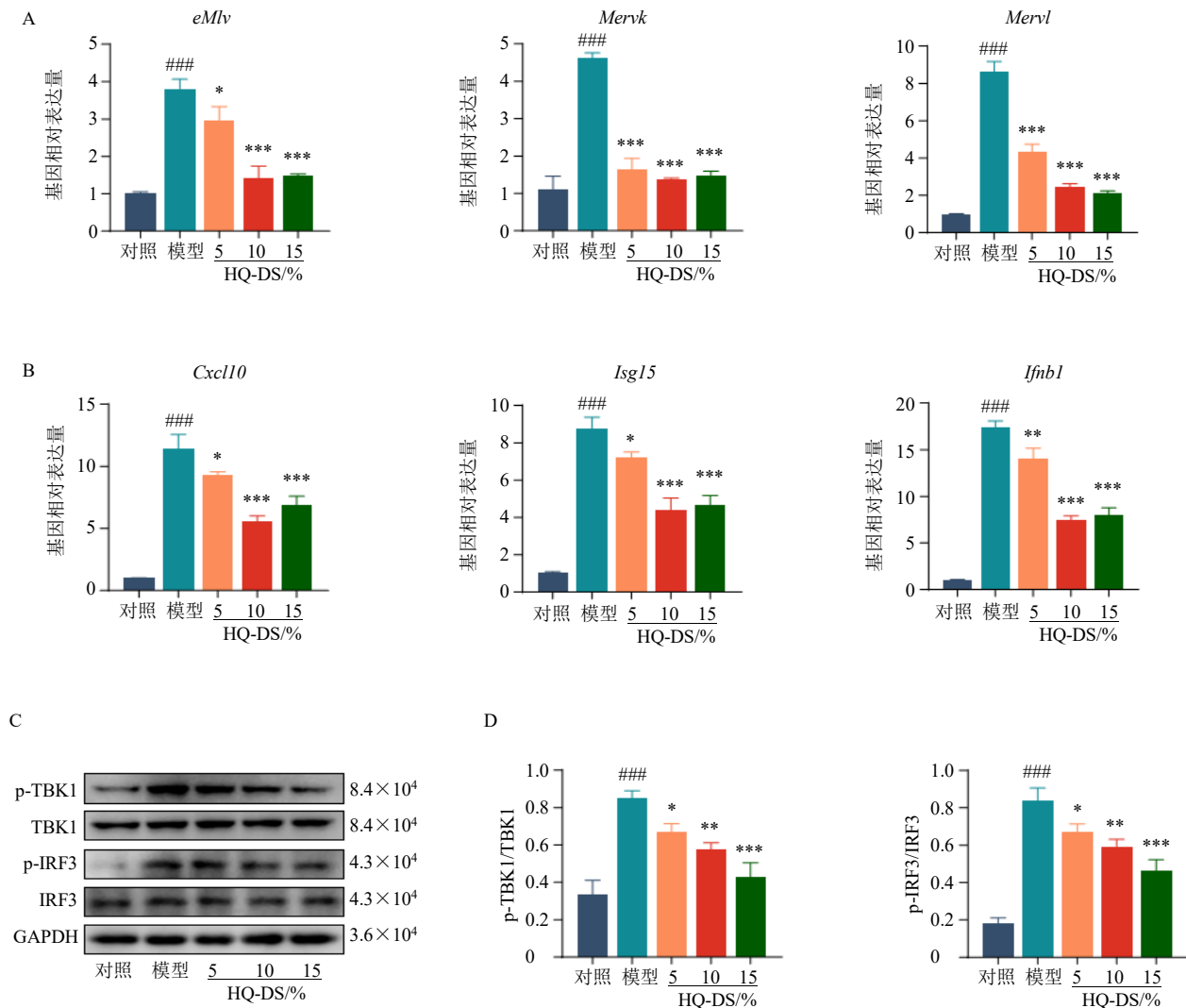
Fig. 7 HQ-DS inhibits ERVs activation and dsRNA accumulation, thereby alleviating inflammation-induced cellular injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

刺激 iBMDM 巨噬细胞, 诱导炎症与 ERVs 激活, 以模拟肝纤维化中的巨噬细胞炎症状态。采用 CCK-8 法检测 HQ-DS 含药血清对 LPS 和 nigericin 刺激的 iBMDM 细胞活力的影响, 如图 7-B 所示, HQ-DS 能够显著恢复细胞活力 ($P < 0.001$)。免疫荧光染色结果 (图 7-C) 显示, LPS+Nigericin 刺激可显著诱导 iBMDM 巨噬细胞内 ERVs 转录产物 dsRNA 的大量积累; 而 HQ-DS 处理可显著减少细胞内 dsRNA 表达, 提示 HQ-DS 可抑制 LPS 诱导的 ERVs 激活。

3.8 HQ-DS 抑制 ERVs 积累

采用 qRT-PCR 进一步验证 HQ-DS 对 ERVs 激活的抑制作用, 如图 8-A 所示, 与对照组比较, 模型组 ERVs 相关基因 *eMlv*、*Mervk*、*Mervl* 的表达显

著上调 ($P < 0.001$); 而 HQ-DS 干预可显著抑制上述 ERVs 相关基因表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)。如图 8-B 所示, 与对照组比较, 模型组 RLRs 通路下游 IFN-I 相关基因 *Cxcl10*、*Isg15* 及 *Ifnb1* 的表达显著上调 ($P < 0.001$); 而 HQ-DS 干预可显著抑制上述 IFN-I 相关基因表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。进一步采用 Western blotting 检测 RLRs 通路关键蛋白 p-TBK1 及 p-IRF3 的表达。TBK1 作为该通路的关键激酶, 被激活后可磷酸化 IRF3, 促使磷酸化的 IRF3 入核, 进而诱导 IFN- β 的转录。如图 8-C、D 所示, 与对照组比较, 模型组 p-TBK1、p-IRF3 水平显著升高 ($P < 0.001$); 而 HQ-DS 干预可显著降低 p-TBK1、p-IRF3 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且对总 TBK1 与 IRF3 蛋白表达无明显影响。上述结果表明, HQ-



A、B-qRT-PCR 检测 ERVs 相关基因 (*eMlv*、*Mervk*、*Mervl*) 及 IFN-I 通路核心基因 (*Cxcl10*、*Isg15*、*Ifnb1*) 的表达水平；C、D-Western blotting 检测 TBK1-IRF3 通路关键蛋白的磷酸化水平。

A, B-expression levels of ERVs-related genes (*eMlv*, *Mervk*, *Mervl*) and type I interferon pathway core genes (*Cxcl10*, *Isg15*, *Ifnb1*) detected by qRT-PCR;

C, D-phosphorylation levels of key proteins in TBK1-IRF3 signaling pathway detected by Western blotting.

图 8 HQ-DS 抑制 TBK1-IRF3 通路的激活 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 HQ-DS inhibits activation of TBK1-IRF3 pathway ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

DS 可通过抑制巨噬细胞内 ERVs 的转录与积累,减少其对 RLRs 通路的激活,进而抑制 IFN-I 的异常产生。

4 讨论

本研究前期结果已证实, HQ-DS 可显著改善 CCl₄ 诱导小鼠的肝损伤,肝脏病理显示胶原沉积显著减少,证实 HQ-DS 能有效缓解肝纤维化。为进一步揭示 HQ-DS 缓解肝纤维化的分子机制,本研究结合 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析,模型组差异表达基因大量富集于天然免疫应答与炎

症反应通路,伴随 RLRs 信号异常激活; HQ-DS 干预可逆转上述通路活化,并下调肝脏 *Isg15*、*Ifnb1* 等干扰素相关基因的表达及血清炎症因子水平。为明确 HQ-DS 作用通路,给予 *Mavs*^{-/-} 小鼠 HQ-DS 干预后,发现 CCl₄ 无法有效诱导 *Cxcl10*、*Isg15*、*Ifnb1* 上调,且 HQ-DS 不再具备显著调控效应。提示 HQ-DS 通过调控 RLR 介导的天然免疫应答发挥抗纤维化效应。

HQ-DS 可显著抑制 RLRs 信号通路的转录活性,RLRs 作为胞质内关键的 RNA 识别受体,其异

常激活可启动下游信号级联反应,进而诱导 IFN-I 大量生成^[21]。已有研究证实,阻断 IFN-I 信号可显著减少肝巨噬细胞浸润数量,进而延缓肝纤维化进程。IFN-I 主要通过下游干扰素刺激基因发挥生物学功能,其中 ISG15 已被证实是调控肝星状细胞活化及纤维化进展的关键分子^[22],这些证据共同提示靶向 RLRs/IFN-I 轴具有良好的抗纤维化治疗潜力。

ERVs 是远古病毒整合于宿主基因组的残留序列,在生理状态下受表观遗传修饰(如 DNA 甲基化、组蛋白修饰)的严密调控而处于沉默状态^[23]。在肝纤维化等病理条件下,ERVs 的表观遗传约束被解除,导致其转录激活并释放 dsRNA 等产物,进而激活 RLRs 天然免疫通路,驱动 IFN-I 应答与炎症反应放大^[24]。本研究通过转录组测序及 ERVs 靶向定量分析发现,CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝组织中多种 ERVs 元件呈现广泛转录激活;其转录产物 dsRNA 可作为内源性危险信号持续激活 RLRs 通路,而 HQ-DS 干预可显著抑制 ERVs 的异常转录,下调各类 ERVs 元件的表达水平,dsRNA 累积明显减少。

在肝纤维化进程中,ERVs 元件因表观遗传约束解除而异常转录,其转录产物持续激活 RLRs 信号通路,促使肝巨噬细胞大量分泌 IFN-I,进而形成炎症-纤维化级联反应的恶性循环。HQ-DS 可通过抑制 ERVs 的转录激活,阻断 ERVs/RLRs/IFN-I 信号轴的异常活化,切断内源性核酸配体介导的天然免疫过度应答,进而发挥抗肝纤维化的作用。这一发现不仅阐明了肝纤维化发病过程中天然免疫异常激活的全新分子机制,同时也为 HQ-DS 配伍用于肝纤维化临床防治提供了重要实验依据和理论基础。本研究亦存在局限性:①仅采用了 CCl₄ 诱导的小鼠模型,ERVs 激活及 HQ-DS 的干预效应尚需在其他纤维化模型及临床样本中进一步验证;② HQ-DS 中具体药效物质基础及其协同作用机制有待深入解析。未来研究将围绕上述问题展开,以期 HQ-DS 的临床应用提供更坚实的理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Taru V, Szabo G, Mehal W, et al. Inflammasomes in chronic liver disease: Hepatic injury, fibrosis progression and systemic inflammation [J]. *J Hepatol*, 2024, 81(5): 895-910.
- [2] Li Y J, Li F H, Ding M N, et al. *Chuanxiong Rhizoma*

extracts prevent liver fibrosis via targeting CTCF-c-MYC-H19 pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(1): 82-93.

- [3] Luo X F, He Y H, Jiang Z, et al. Global burden of liver cirrhosis: Trends from 1990—2021 and projections to 2060 [J]. *J Health Popul Nutr*, 2025, 44(1): 370.
- [4] Widowati W, Sabrina A H N, Sutendi A F, et al. Immune system and hepatic stellate cells' crosstalk in liver fibrosis: Pathways and therapeutic potential [J]. *J Immunol Res*, 2026, 2026: 2656395.
- [5] Taranto D, Kloosterman D J, Akkari L. Macrophages and T cells in metabolic disorder-associated cancers [J]. *Nat Rev Cancer*, 2024, 24(11): 744-767.
- [6] Hammerich L, Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(10): 633-646.
- [7] Wang W Z, Li S W, Liu Y J, et al. Macrophage heterogeneity in liver fibrosis [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1639455.
- [8] Wang Q Y, Yu Y, Zhuang J, et al. Demystifying the cGAS-STING pathway: Precision regulation in the tumor immune microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1): 178.
- [9] Villablanca E J, Selin K, Hedin C R H. Mechanisms of mucosal healing: Treating inflammatory bowel disease without immunosuppression? [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(8): 493-507.
- [10] McElrath C, Espinosa V, Lin J D, et al. Critical role of interferons in gastrointestinal injury repair [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2624.
- [11] Chen R C, Zou J, Chen J W, et al. Pattern recognition receptors: Function, regulation and therapeutic potential [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 216.
- [12] Zheng J, Shi W J, Yang Z Q, et al. RIG-I-like receptors: Molecular mechanism of activation and signaling [J]. *Adv Immunol*, 2023, 158: 1-74.
- [13] Di Giorgio E, Xodo L E. Endogenous retroviruses (ERVs): Does RLR (RIG-I-like receptors)-MAVS pathway directly control senescence and aging as a consequence of ERV de-repression? [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 917998.
- [14] Park S J, Garcia Diaz J, Comlekoglu T, et al. Type I IFN receptor blockade alleviates liver fibrosis through macrophage-derived STAT3 signaling [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1528382.
- [15] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南 (2019 年版) [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(11): 1286-1295.
- [16] 韦柳婷, 高松林, 吴凡, 等. 专利中药复方治疗肝纤维化的用药规律及机制研究 [J]. 科学技术与工程, 2024, 24(8): 3133-3144.

- [17] 杨济铭, 雷雪莉, 庞莉, 等. 基于中医传承计算平台分析中药治疗肝纤维化用药规律 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(11): 1012-1015.
- [18] 黄丹, 孙定隆, 王敏, 等. 扶脾柔肝汤治疗肝硬化 40 例临床报道 [J]. 贵阳中医学院学报, 2015(5): 51-53.
- [19] Hu Y T, Kuang M, Song H, *et al.* Astragaloside IV prevents liver fibrosis by blocking glycolysis-mediated macrophage M1 polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 995: 177353.
- [20] 胡兴兰, 杨莹莹, 黄盼玲, 等. 荔枝核总黄酮通过改善肠道菌群结构减轻四氯化碳诱发的肝纤维化 [J]. 中草药, 2025, 56(1): 145-153.
- [21] van Huizen M, Gack M U. The RIG-I-like receptor family of immune proteins [J]. *Mol Cell*, 2025, 85(20): 3793-3806.
- [22] Yuan Y, Li J X, Rao D A, *et al.* ISG15 deficiency in hepatic stellate cells promotes TGF β 2-induced liver fibrosis by counteracting CREB1 ISGylation [J]. *Gut*, 2026, 75(6): 1186-1200.
- [23] Wu Y, Huang S, Sha Q, *et al.* Emerging and re-emerging viruses as triggers of human endogenous retrovirus activation: Implications for aging and age-related pathologies [J]. *Mol Aspects Med*, 2025, 106: 101422.
- [24] Mikhalkovich N, O'Carroll I P, Tkavc R, *et al.* Response of human macrophages to gamma radiation is mediated via expression of endogenous retroviruses [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(2): e1009305.

[责任编辑 李亚楠]