

基于蛋白质组学探讨益肝化癥方改善肝纤维化的机制^Δ

王聪慧^{1*}, 马贵萍¹, 王龙珠¹, 卢芬萍¹, 李艳芳², 葛秋寒¹, 胡世平^{1#} [1. 北京中医药大学深圳医院(龙岗)肝病科, 广东深圳 518172; 2. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东临沂 276006]

中图分类号 R965;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)09-1155-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.09.08



摘要 **目的** 探讨益肝化癥方改善小鼠肝纤维化的作用及机制。**方法** 将小鼠随机分为空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和益肝化癥方低、高剂量组(28.98、57.96 g/kg, 以生药量计), 每组8只。除空白组外, 其余各组均腹腔注射15%四氯化碳橄榄油溶液建立肝纤维化模型。自造模第3周起, 每天灌胃给药/生理盐水1次, 连续4周。末次给药后, 计算肝脏指数, 检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性及肝组织中羟脯氨酸(HYP)含量; 评估肝组织病理学变化; 基于蛋白质组学分析肝组织中差异表达蛋白, 对其进行生物信息学分析, 并利用蛋白免疫印迹(WB)法及免疫组化(IHC)法验证核心差异蛋白的表达情况。**结果** 与空白组相比, 模型组小鼠肝脏指数以及血清中ALT、AST活性和肝组织中HYP含量均显著升高($P<0.05$), 肝组织出现明显病理损伤及胶原纤维沉积。与模型组相比, 益肝化癥方高剂量组小鼠上述指标均显著降低($P<0.05$), 肝脏病理损伤及胶原纤维沉积明显改善。在模型组与益肝化癥方高剂量组中, 共筛选出210个差异蛋白; 差异蛋白显著富集于细胞外基质(ECM)-受体相互作用、脂质代谢等通路。WB法及IHC法检测结果表明, 益肝化癥方能显著抑制模型小鼠肝组织中异常升高的IV型胶原 $\alpha 1$ 链(COL4A1)、富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)、玻连蛋白(VTN)和层粘连蛋白亚基 $\alpha 5$ (LAMA5)的表达($P<0.05$)。**结论** 益肝化癥方可能通过抑制COL4A1、LAMA5、SPARC及VTN等蛋白的表达, 从而阻断ECM-受体相互作用通路, 进而抑制ECM的过度沉积与基底膜重构, 最终发挥抗肝纤维化作用。

关键词 益肝化癥方; 肝纤维化; 蛋白质组学; ECM-受体相互作用; 生物机制

Mechanism of Yigan huayu formula in alleviating liver fibrosis based on proteomics

WANG Conghui¹, MA Guiping¹, WANG Longzhu¹, LU Fenping¹, LI Yanfang², GE Qiuhan¹, HU Shiping¹ [1. Dept. of Liver Diseases, Shenzhen Hospital (Longgang) Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518172, China; 2. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Shandong Linyi 276006, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects and mechanism of Yigan huayu formula in alleviating liver fibrosis in mice. **METHODS** Mice were randomly divided into blank group (normal saline), model group (normal saline), Yigan huayu formula low- and high-dose groups (28.98, 57.96 g/kg, calculated by crude drug), with 8 mice in each group. Except for the blank group, the liver fibrosis model was induced by intraperitoneal injection of 15%CCl₄-olive oil solution. From the third week, the mice received the medicine/normal saline intragastrically, once a day, for 4 consecutive weeks. After the last medication, liver indexes were calculated, the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum, as well as the hydroxyproline (HYP) content in liver tissue, were measured. Liver histopathology was evaluated. Differentially expressed proteins (DEPs) in liver tissue were analyzed based on proteomics, followed by bioinformatics analysis. The expressions of core DEPs were validated using Western blot (WB) and immunohistochemistry (IHC) methods. **RESULTS** Compared with the blank group, the model group showed significantly elevated liver indexes, serum activities of ALT and AST, and hepatic HYP content ($P<0.05$), along with obvious pathological damage and collagen deposition. Compared with the model group, the above indexes of mice in the Yigan huayu formula high-dose group were decreased significantly ($P<0.05$), with marked improvement in liver pathological damage and collagen deposition. Proteomics identified 210 DEPs between the model group and Yigan huayu formula high-dose group. DEPs were significantly enriched in extracellular matrix (ECM)-receptor interaction and lipid metabolism pathways. WB and

IHC confirmed that Yigan huayu formula could significantly inhibit the abnormally elevated expressions of collagen type IV alpha1 chain (COL4A1), secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), vitronectin (VTN) and laminin subunit alpha5 (LAMA5) in liver tissue of mice ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Yigan huayu formula may exert anti-hepatic fibrosis effects by inhibiting the expressions of proteins such as COL4A1, LAMA5, SPARC, and VTN, thereby blocking the ECM-receptor interaction signaling pathway, and subsequently suppressing excessive ECM deposition and basement

^Δ **基金项目** 2025年度国家中医药管理局中医药监测统计研究课题(No.2025JCTJC111); 经方与现代中药融合创新全国重点实验室开放课题(No.LSLSKL20240117); 广东省基础与应用基础研究基金面上项目(No.2023A1515220096); 深圳市“医疗卫生三名工程”中医药高层次医学团队立项项目(No.SZZYSM202311018)

* **第一作者** 博士研究生。研究方向: 中医药防治慢性肝病。
E-mail: 1065885061@qq.com

通信作者 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中医药防治慢性肝病。
E-mail: hspctm@163.com

肝纤维化是肝脏在慢性损伤刺激下,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积的病理修复反应,常继发于病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病等慢性肝病,是肝硬化甚至肝癌发生的关键环节^[1]。我国肝纤维化的患病率约为2.85%,已成为重要的公共卫生负担^[2-3]。因此,探寻肝纤维化的有效防治策略、揭示其干预机制具有重要意义。

目前西医对肝纤维化的治疗手段有限,而中医药具有多成分、多靶点、多通路协同作用,在延缓甚至逆转肝纤维化方面展现出独特优势。益肝化癥方为北京中医药大学深圳医院(龙岗)抗肝纤维化治疗的医疗机构制剂,由广东省名中医胡世平教授经多年临床实践创制。该方由经典名方四君子汤合逍遥散化裁而来,由黄芪、党参、白术、茯苓、丹参、鳖甲等多味药材组成,具有运脾疏肝、利湿化癥之功效,临床应用广泛。本课题组在前期临床研究中已证实,该方可降低患者肝脏硬度值,改善患者胁痛、乏力等症状,治疗总有效率达90%^[4]。然而,其发挥疗效的具体分子机制尚未完全阐明。

蛋白质组学技术能够系统揭示疾病或药物干预下蛋白质表达的动态变化^[5]。因此,本研究拟通过建立肝纤维化小鼠模型,结合蛋白质组学技术,系统分析益肝化癥方干预后小鼠肝脏蛋白质表达谱的变化,从蛋白调控层面深入揭示该方抗肝纤维化的作用机制,为该方的临床应用提供更充分的实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器与软件

本研究所用的主要仪器与软件有:Chemray 240型全自动生化仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司),Epoch型酶标仪(美国Bio-Tek公司),Vanquish Neo型色谱分离系统、Astral型高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),DIA-NN软件、DYY-6C型电泳仪、Mini-PROTEAN Tetra Cell型小型垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司)。

1.2 主要药品与试剂

生药饮片黄芪、党参、北柴胡、当归(产地均为甘肃,批号分别为20250905、J2508236、25090227、251209),白术、青皮(产地均为浙江,批号分别为2508018、251113),茯苓(产地云南,批号250903J1),泽泻(产地四川,批号J25110229),苍术、赤芍(产地均为内蒙古,批号分别为250701H2、C2625112),丹参(产地山西,批号A241114),醋鳖甲(产地湖北,批号251113),醋莪术(产地广西,批号A250614),陈皮(产地广东,批号250704),香附(产地海南,批号2505223),白芍(产地安徽,批号B4125911),叶下珠、垂盆草(产地均为湖南,批号分别为A240823、251013)均购自北京中医药大学深圳医院(龙岗)中药房。

四氯化碳(CCl_4)、橄榄油购自上海麦克林生化科技股份有限公司;羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗、HRP标记的山羊抗兔IgG二抗、ECL化学发光超敏显色试剂盒(批号分别为MPC2503061、AC2504239020、AC2506211138、2511F002)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)生化试剂盒(批号分别为20250326、20250506)均购自深圳雷杜生命科学有限公司;鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、兔源玻连蛋白(vitronectin, VTN)抗体(批号分别为10049290、10025607)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源 β -类微管蛋白(β -tubulin)抗体、兔源IV型胶原 $\alpha 1$ 链(collagen type IV alpha1 chain, COL4A1)抗体、兔源富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)抗体(批号分别为11、1、2)均购自美国Cell Signaling Technology公司;兔源层粘连蛋白亚基 $\alpha 5$ (laminin subunit alpha5, LAMA5)抗体(批号L780609P)购自湖南远泰生物技术有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物为6周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠,体重18~22 g,购于广州维通利华实验技术有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(粤)2022-0063。动物饲养于深圳市众循精准医学研究院,实验动物使用许可证号为SYXK(粤)2025-0380,饲养环境符合SPF级实验室标准。本研究通过深圳市众循精准医学研究院的伦理审批(批号为AP-SZZX-2025-07-004)。

2 方法

2.1 药液制备

按益肝化癥方组成(黄芪、党参、白术、茯苓、泽泻、苍术、当归、丹参、赤芍、醋鳖甲、醋莪术、醋香附、白芍、叶下珠各10 g,北柴胡、陈皮、醋青皮各6 g,垂盆草15 g)称取相应饮片,加10倍量纯水煎煮1 h,过滤,取药液;药渣再次加8倍量纯水煎煮30 min,过滤。合并2次煎煮所得药液,用旋转蒸发仪于60℃条件下浓缩成生药质量浓度为2.88 g/mL的药液,分装后于4℃冰箱中保存备用。

2.2 实验动物分组、造模与给药

将32只小鼠适应性饲养1周后,按随机数字表法分为空白组、模型组和益肝化癥方低、高剂量组,每组8只。除空白组小鼠腹腔注射等体积橄榄油外,其余各组小鼠均腹腔注射15% CCl_4 橄榄油溶液(5 mL/kg),每周2次,连续6周,以建立肝纤维化模型^[6]。造模成功判定标准为:小鼠一般情况欠佳,血清AST、ALT水平显著升高,肝组织病理学检查可见明显炎症细胞浸润及胶原纤维

沉积。参考《药理实验方法学》(第4版)中人与小鼠等效剂量换算方法,设定益肝化瘀方低、高剂量组小鼠的给药剂量分别是临床等效剂量的1、2倍,即分别为28.98、57.96 g/kg(以生药量计)。于造模第3周开始给药干预,益肝化瘀方各剂量组小鼠灌胃相应药液,空白组和模型组小鼠则灌胃等体积生理盐水,灌胃体积为10 mL/kg,每天1次,连续给药4周。

2.3 取材及肝脏指数测定

末次给药结束24 h后取材。取材前称取小鼠体重,并且取材前12 h小鼠禁食不禁水。腹腔注射2%戊巴比妥钠(0.035 g/kg)将小鼠麻醉,摘取眼球取血,血样在室温下静置30 min后,以3 000 r/min离心15 min,收集血清。剖取小鼠肝脏,称质量并计算肝脏指数(肝脏指数=肝脏质量/体重 $\times$ 100%)。将部分肝组织置于4%多聚甲醛中固定,用于后续病理学观察;剩余肝组织冻存于-80℃冰箱中,备用。

2.4 肝组织病理学观察

采用苏木精-伊红(HE)染色法观察肝组织基本结构变化;采用天狼星红染色法观察肝组织胶原纤维的分布与沉积情况,以评估肝纤维化程度。取“2.3”项下固定的小鼠肝组织,经梯度乙醇脱水、透明、石蜡包埋后,使用切片机连续切片(厚5 μ m)。切片分别常规进行HE染色和天狼星红染色,染色后的切片经脱水、透明、封片后,置于显微镜下观察并采集图像。各组随机选取5张天狼星红染色切片进行观察,每张切片随机选取5个不重叠视野(视野直径为200 μ m),使用Image J软件识别红色阳性区域,计算胶原阳性面积占视野总面积的百分比,取平均值作为该样本的胶原面积分数。

2.5 分子生物学指标检测

2.5.1 血清中肝功能指标检测

取“2.3”项下小鼠血清样本,根据生化试剂盒说明书方法操作,采用全自动生化仪检测血清中ALT、AST活性。

2.5.2 肝组织中HYP含量检测

准确称取“2.3”项下冻存的小鼠肝组织,加入生理盐水于冰上进行机械匀浆,取上清液,按照试剂盒说明书方法操作,检测肝组织中HYP含量。

2.6 肝组织的蛋白质组学分析

2.6.1 蛋白质提取及差异蛋白筛选

取“2.3”项下空白组、模型组和益肝化瘀方高剂量组(该组治疗效果更为显著,故本研究选取该组样本进行蛋白质组学检测)小鼠冻存的肝组织样本(每组随机取3个),送至上海伟寰生物科技有限公司完成蛋白质组学检测。蛋白鉴定以错误发现率(false discovery rate, FDR) $\leq$ 1%为阈值,以表达倍数变化(fold change, FC) $\geq$ 1.2(表示上调)或 $\leq$ 0.83(表示下调)且校正后 $P<0.05$ 为差异蛋白筛选标准^[7]。筛选出的差异蛋白用于后续生物信息学分析。

2.6.2 差异蛋白的生物信息学分析及筛选

对筛选得到的差异蛋白进行基因本体(gene ontology, GO)功能注释以及京都基因和基因组百科全书

(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。以 $P<0.05$ 为显著富集标准,根据3组小鼠KEGG通路富集分析得到的 P 值,采用层次聚类分析方法,使用R语言(版本4.4.1)的pheatmap包绘制热图。利用String数据库(<http://string-db.org/>)进行差异蛋白的互作分析,构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein-protein interaction, PPI)。综合KEGG通路富集分析、层次聚类分析与PPI分析结果,识别与肝纤维化密切相关的信号通路及核心差异蛋白。

2.7 肝组织中核心差异蛋白表达检测

2.7.1 蛋白免疫印迹法检测

采用蛋白免疫印迹(Western blot, WB)法进行检测。取“2.3”项下冻存的小鼠肝组织样本(每组随机取3个),提取组织中总蛋白,采用BCA法对总蛋白进行定量分析,然后进行变性处理。取变性蛋白,上样进行SDS-PAGE电泳,大分子蛋白(分子量为200~400 kDa)在300 mA恒流冰浴条件下转印120 min,中、低分子蛋白(分子量为30~70 kDa)在200 mA恒流冰浴条件下转印60 min。转膜后经5%脱脂牛奶封闭1 h,随后在4℃下与相应一抗(COL4A1、LAMA5、SPARC、VTN、GAPDH、 β -tubulin,稀释度均为1:1 000)孵育过夜;洗膜后与相应二抗(稀释度均为1:5 000)在室温下孵育1 h。经ECL显影后,使用Image J软件分析条带灰度值,以目的蛋白与对应内参蛋白条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达量。

2.7.2 免疫组化法检测

采用免疫组化(immunohistochemistry, IHC)法进行检测。取“2.4”项下小鼠肝组织石蜡切片(每组随机取3份),经常规脱蜡、梯度乙醇水化、柠檬酸盐缓冲液高温高压抗原修复后,以3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶,然后以山羊血清封闭1 h。滴加一抗(COL4A1、LAMA5、SPARC、VTN,稀释度均为1:1 000),在4℃下孵育过夜;洗膜后加入相应二抗(稀释度均为1:5 000),室温孵育1 h。经DAB显色、苏木精复染、脱水透明、封片后。采用显微镜观察ECM及肝窦周围阳性染色情况,阳性信号强度根据着色深浅分为弱阳性(淡黄色)、中度阳性(棕黄色)、强阳性(棕褐色)。采用Aipathwell®数字病理图像分析软件对全切片进行扫描及定量分析,以组织化学评分(histochemistry score, H-score)进行半定量分析。 $H\text{-score} = \text{弱阳性面积}(\%) \times 1 + \text{中度阳性面积}(\%) \times 2 + \text{强阳性面积}(\%) \times 3$ ^[8]。

2.8 统计学分析

采用GraphPad Prism 10.5软件进行统计分析及绘图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis H 检验,组间两两比较采用Nemenyi检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 小鼠肝脏指数测定结果

与空白组[(5.05±1.05)%]比较,模型组小鼠肝脏指数[(8.35±0.75)%]显著升高($P<0.05$);与模型组比较,益肝化癆方高剂量组小鼠肝脏指数[(5.95±0.74)%]显著降低($P<0.05$),益肝化癆方低剂量组小鼠肝脏指数[(6.40±0.80)%]差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 小鼠肝组织病理学观察结果

HE染色结果显示,空白组小鼠肝小叶结构正常、肝细胞索排列规整;模型组小鼠肝小叶结构及肝索排列紊乱,肝细胞水肿伴炎症细胞浸润;益肝化癆方低、高剂量组小鼠肝小叶结构及肝细胞索排列紊乱较模型组改善,肝细胞水肿伴炎症细胞浸润较模型组减少。天狼星红染色结果显示,空白组小鼠肝组织内仅见少量胶原纤维,胶原面积分数为(1.20±0.43)%;模型组小鼠肝组织胶原纤维沉积明显,胶原面积分数为(11.02±2.23)%,较空白组显著升高($P<0.05$);益肝化癆方低、高剂量组小鼠肝组织胶原面积分数分别为(4.43±0.68)%、(3.67±1.67)%,较模型组显著降低($P<0.05$)。结果见图1。

3.3 小鼠血清中肝功能指标及肝组织中HYP含量测定结果

与空白组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST活性及肝组织中HYP含量均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,益肝化癆方低、高剂量组小鼠血清中ALT、AST活性及益肝化癆方高剂量组肝组织中HYP含量均显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

3.4 小鼠肝组织的蛋白质组学分析结果

3.4.1 差异蛋白分析结果

在空白组、模型组、益肝化癆方高剂量组小鼠肝组织中共鉴定出7 300个蛋白。模型组与益肝化癆方高剂量组中共筛选出210个差异蛋白。与模型组比较,益肝化癆方高剂量组有139个蛋白上调、71个蛋白下调。

表1 各组小鼠血清肝功能指标及肝组织中HYP含量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	HYP/($\mu\text{g}/\text{mg}$)
空白组	38.19±4.06	147.28±6.25	0.13±0.02
模型组	502.83±7.06 ^a	653.23±12.06 ^a	0.39±0.10 ^a
益肝化癆方低剂量组	119.16±8.34 ^b	279.87±23.37 ^b	0.31±0.08
益肝化癆方高剂量组	87.98±7.37 ^b	167.50±9.96 ^b	0.26±0.04 ^b

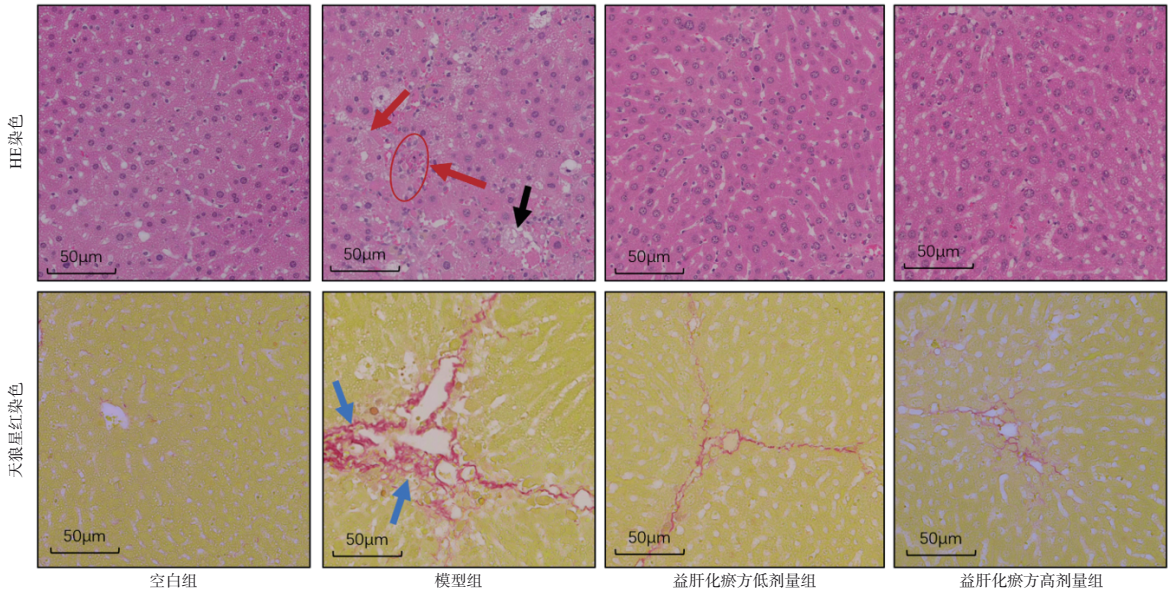
a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.4.2 GO功能注释及KEGG通路富集分析结果

GO功能注释结果(具体结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图1)显示,差异蛋白主要涉及小分子结合、蛋白结合、水解酶及转移酶活性等分子功能,以及细胞膜、细胞外区域等细胞组分,生物过程富集于代谢调节、应激反应等。KEGG通路富集分析结果(具体结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图2)表明,差异蛋白显著富集于ECM-受体相互作用、黏着斑、脂质代谢(亚油酸、花生四烯酸代谢)、补体与凝血级联、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR)等通路。层次聚类分析结果(具体结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图3)显示,ECM-受体相互作用、黏着斑等通路簇在各组间呈高度一致的共富集趋势。

3.4.3 PPI分析结果

PPI分析结果(具体结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图4)显示,ECM-受体相互作用通路成员(如COL4A1、SPARC、VTN、LAMA5)与多个纤维化相关分子存在较强的相互作用,且该通路直接调控胶原沉积、基底膜装配等肝纤维化终末环节,可反映疾病核心表型。综合KEGG通路富集与PPI分析结果,本研究选定ECM-受体相互作用通路的核心差异蛋白COL4A1、SPARC、VTN、LAMA5作为后续机制验证的焦点。



注:红色箭头所指及圆圈圈出部分为炎症浸润区域或胶原沉积区域;黑色箭头所指为肝细胞变性;蓝色箭头所指为胶原沉积。

图1 各组小鼠肝组织病理学观察显微图

3.5 小鼠肝组织中核心差异蛋白表达检测结果

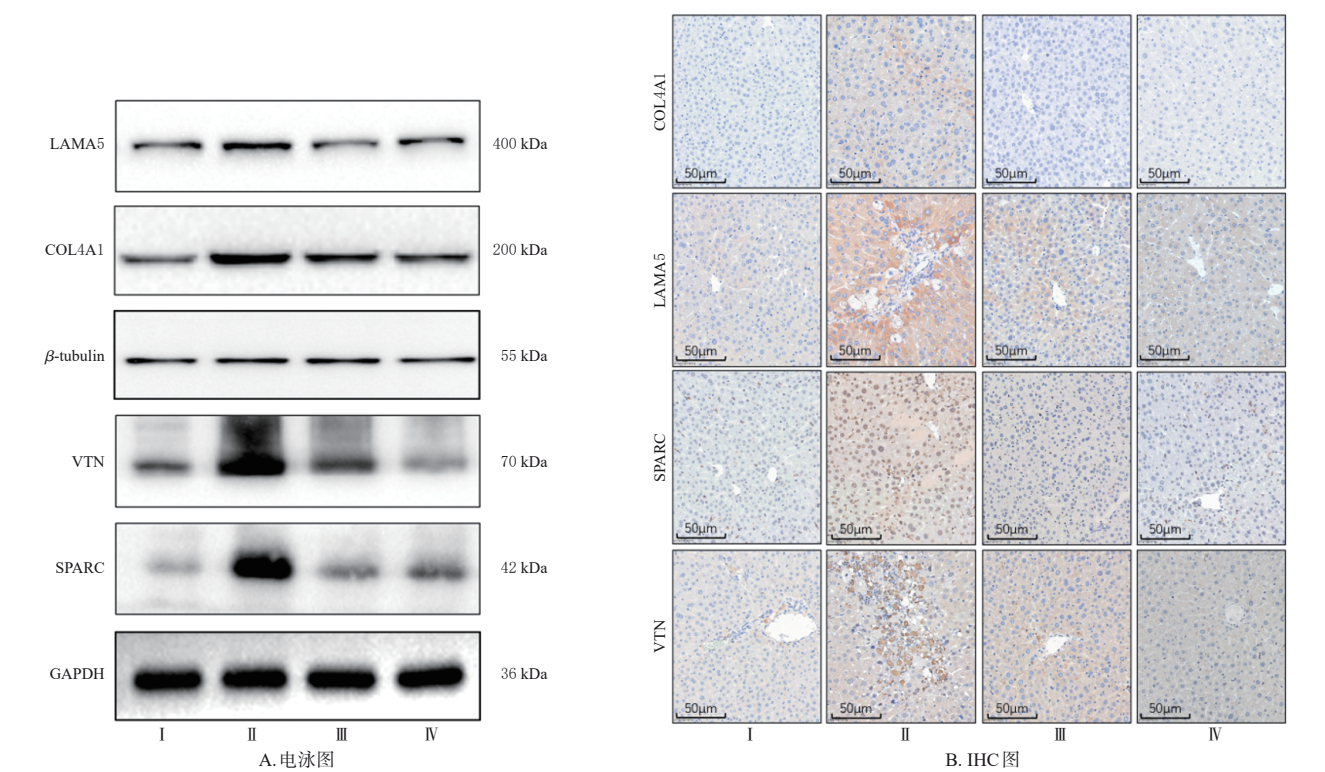
WB 与 IHC 检测结果均显示,与空白组比较,模型组小鼠肝组织中 COL4A1、SPARC、VTN 和 LAMA5 蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,益肝化癆方低、高剂量组小鼠肝组织中上述 4 个蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图 2、表 2。

4 讨论

肝纤维化归属于中医学“胁痛”“肝着”“积聚”等范畴,病机以肝郁脾虚为本、气滞血瘀痰凝为标。益肝化癆方由经典名方四君子汤合逍遥散化裁而来,具有固肝脾之本,解郁祛湿化浊之效。方中黄芪、党参、白术、茯苓为君药,在扶助正气、升脾阳以运肝阳的同时制约寒性活血药物的峻猛之性,避免久用伤阳;北柴胡、陈皮、醋青皮、醋香附、白芍为臣药,可疏肝理气,助血行而不留瘀;当归、丹参、赤芍、醋莪术、醋鳖甲为佐药,可活血化瘀、软坚散结;泽泻、苍术、垂盆草、叶下珠为使药,可清热利湿。全方培土以荣木,疏补渐进,共奏扶肝、清肝、养肝之功,展示了“攻补兼施、气血同调”的配伍模式,亦体现了中药多成分相互制约实现“增效减毒”的科学内涵。此外,经现代研究证实,该方中多药具有调节免疫、保护肝细胞、抑制肝星状细胞活化的作用^[9-11]。

本研究病理学观察结果显示,益肝化癆方能显著改善肝纤维化小鼠肝组织炎症细胞浸润及胶原纤维沉积,证实其具有抗炎与抗纤维化作用。同时,益肝化癆方能显著降低模型小鼠血清中异常升高的 ALT、AST 水平,表明该方可减轻肝细胞损伤。此外,HYP 是胶原蛋白的特异性氨基酸,益肝化癆方高剂量组 HYP 含量较模型组显著降低,这进一步反映了该方可抑制胶原合成与沉积^[12]。

本研究差异蛋白富集分析结果显示,益肝化癆方能通过多通路协同发挥抗纤维化作用。层次聚类以及 PPI 分析结果提示,ECM-受体相互作用通路可能是该方抗肝纤维化的关键通路,其关键蛋白 COL4A1、SPARC、VTN、LAMA5 在纤维化肝组织中异常高表达。本研究分别通过 WB 法和 IHC 法检测,发现益肝化癆方能显著抑制上述蛋白在模型小鼠肝组织中的异常高表达。其中,COL4A1 是基底膜的主要成分,其过度表达与基底膜增厚、肝窦毛细血管化密切相关,是 ECM 沉积与肝纤维化微环境改变的重要标志^[13];此外,Liu 等^[14]研究发现,该蛋白可结合整合素 α/β_1 ,加速细胞周期进程并促进肝癌发生。SPARC 是一种基质细胞胶原结合蛋白,参与 ECM 中纤维状胶原的组装以及基底层结构的形成,可调



I : 空白组; II : 模型组; III : 益肝化癆方低剂量组; IV : 益肝化癆方高剂量组。

图2 各组小鼠肝组织中核心差异蛋白表达的电泳图和 IHC 图

表2 各组小鼠肝组织中核心差异蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$ 或 $M(P_{25}, P_{75})$, $n=3$)

组别	COL4A1		LAMA5		SPARC		VTN	
	WB法	IHC法	WB法	IHC法	WB法	IHC法	WB法	IHC法
空白组	1.00±0.14	0.01(0.00,0.03)	0.99±0.18	8.50(4.54,11.38)	0.95±0.08	5.89(1.64,7.23)	1.10±0.43	20.04(1.21,24.84)
模型组	1.62±0.40 ^a	0.12(0.04,0.15) ^a	1.45±0.27 ^a	44.10(41.62,48.11) ^a	1.73±0.19 ^a	21.46(17.64,29.15) ^a	2.63±0.34 ^a	41.15(33.71,44.41) ^a
益肝化癆方低剂量组	1.25±0.24 ^b	0.04(0.02,0.05) ^b	1.08±0.19 ^b	25.21(21.52,32.32) ^b	1.12±0.39 ^b	9.80(4.74,14.04) ^b	1.21±0.27 ^b	27.19(21.25,32.79) ^b
益肝化癆方高剂量组	1.26±0.25 ^b	0.03(0.00,0.05) ^b	1.11±0.19 ^b	32.47(25.87,35.35) ^b	1.21±0.09 ^b	14.17(11.07,19.71) ^b	0.96±0.26 ^b	23.82(19.18,27.17) ^b

a: 与空白组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

节细胞黏附与免疫功能,同时还可激活炎症小体,促进肝脏炎症与脂肪变性而加速纤维化进程^[15-16]。LAMA5是一种ECM糖蛋白,可参与肿瘤炎症微环境与ECM重构,是肝纤维化向肝癌发展的重要因素之一^[17]。VTN是一种血液和ECM中的多功能糖蛋白,可参与免疫反应和凝块形成;同时,其作为整合素 $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ 的经典配体可调控细胞黏附、迁移、增殖及基质改建等过程^[18-19]。从分子机制层面而言,VTN、COL4A1及LAMA5均可与多种整合素相互作用,而整合素作为连接ECM与细胞内信号转导的关键分子,可介导转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)的生成并促进肝星状细胞活化及ECM合成^[20]。基于此,本研究推测益肝化癥方对上述蛋白的下调作用,可能与整合素介导的TGF- β 相关信号通路亦存在关联,但仍需进一步验证。

除此之外,本研究的KEGG通路富集分析结果显示,脂质代谢相关通路(亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、PPAR等通路)被显著富集。既往研究证实,肝脏脂质代谢异常可导致脂毒性增加、氧化应激增强及炎症反应持续,进而激活肝星状细胞并促进ECM沉积,是肝纤维化的重要驱动因素^[21]。笔者据此推测,益肝化癥方可能通过调节肝脏脂质代谢稳态,间接抑制纤维化进程。未来可进一步结合微生物组学、代谢组学等多组学分析与功能实验等,探究该方在脂代谢稳态调控方面的作用机制。

综上所述,益肝化癥方可能通过抑制COL4A1、LAMA5、SPARC及VTN的异常高表达,从而阻断ECM-受体相互作用通路,进而抑制ECM的过度沉积与基底膜重构,最终发挥抗肝纤维化作用。然而,本研究仍存在动物模型较为单一、核心靶点群与关键调控网不清晰等不足,后续仍需进一步研究。

参考文献

- [1] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 37-55.
- [2] 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.
- [3] DEVARBHAVI H, ASRANI S K, ARAB J P, et al. Global burden of liver disease: 2023 update[J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 516-537.
- [4] 邢光艳,冉云,卢芬萍,等. 益肝化癥颗粒治疗肝郁脾虚型慢性乙型肝炎肝纤维化的临床观察[J]. *中药新药与临床药理*, 2025, 36(11): 1961-1966.
- [5] 蔡碧莲,张扬武,陈姗,等. 蛋白质组学在中医药抗肝纤维化中的应用[J]. *中医学报*, 2019, 34(6): 1170-1173.
- [6] 孙家昌,孙妮弋,厉歆然,等. 不同浓度四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型的比较[J]. *实验动物与比较医学*, 2018, 38(4): 255-260.
- [7] 张玉昆,冯月男,卞敬琦,等. 基于蛋白质组学探讨丹参

饮对高脂血症模型大鼠血脂异常的调节机制[J]. *中国药房*, 2024, 35(9): 1070-1075.

- [8] WEN Z, LUO D, WANG S, et al. Deep learning-based H-score quantification of immunohistochemistry-stained images[J]. *Mod Pathol*, 2024, 37(2): 100398.
- [9] 吴强,杨雁,薛绍礼,等. 黄芪总苷对肝星状细胞增殖和合成胶原的抑制作用[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(8): 892-895.
- [10] 吕梦鸽,李放,李雪微,等. 柴胡活性成分防治代谢相关性脂肪肝病的研究进展[J]. *环球中医药*, 2025, 18(9): 1931-1939.
- [11] 鄢钦文. 丹酚酸B抑制肝细胞铁死亡的抗肝纤维化机制研究[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2025.
- [12] BOLARIN D M, AZINGE E C. Biochemical markers, extracellular components in liver fibrosis and cirrhosis[J]. *Nig Q J Hosp Med*, 2007, 17(1): 42-52.
- [13] MAK K M, MEI R. Basement membrane type IV collagen and laminin: an overview of their biology and value as fibrosis biomarkers of liver disease[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2017, 300(8): 1371-1390.
- [14] LIU Y L, ZHANG J Y, CHEN Y, et al. The correlation and role analysis of COL4A1 and COL4A2 in hepatocarcinogenesis[J]. *Aging*, 2020, 12(1): 204-223.
- [15] RILEY H J, BRADSHAW A D. The influence of the extracellular matrix in inflammation: findings from the SPARC-null mouse[J]. *Anat Rec*, 2020, 303(6): 1624-1629.
- [16] ATORRASAGASTI C, ONORATO A M, MAZZOLINI G. The role of SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) in the pathogenesis of obesity, type 2 diabetes, and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Physiol Biochem*, 2023, 79(4): 815-831.
- [17] GORDON-WEEKS A, LIM S Y, YUZHALLIN A, et al. Tumour-derived laminin $\alpha 5$ (LAMA5) promotes colorectal liver metastasis growth, branching angiogenesis and Notch pathway inhibition[J]. *Cancers*, 2019, 11(5): 630.
- [18] SCHVARTZ I, SEGER D, SHALTIEL S. Vitronectin[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(5): 539-544.
- [19] HAYASHIDA M, HASHIMOTO K, ISHIKAWA T, et al. Vitronectin deficiency attenuates hepatic fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis-induced mouse model[J]. *Int J Exp Pathol*, 2019, 100(2): 72-82.
- [20] HENDERSON N C, ARNOLD T D, KATAMURA Y, et al. Targeting of α_v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs[J]. *Nat Med*, 2013, 19(12): 1617-1624.
- [21] PEISELER M, SCHWABE R, HAMPE J, et al. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease-novel insights into cellular communication circuits[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(4): 1136-1160.

(收稿日期:2026-01-08 修回日期:2026-04-07)

(编辑:林 静)