·肝纤维化及肝硬化·

DOI：10.12449/JCH260316

黄芪甲苷Ⅳ对四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠模型的影响及其作用机制

朱宛春[1,2]，邱嘉昊[1,2]，崔 钰[1,2]，张伊婧[3]，尚 志[1,2]，高月求[1,2,3]，黄凌鹰[4]

1 上海中医药大学附属曙光医院细胞免疫实验室，上海 201203

2 上海市中医临床重点实验室，上海 201203

3 上海中医药大学附属曙光医院药剂科，上海 201203

4 上海中医药大学附属曙光医院肝病科，上海 201203

通信作者：黄凌鹰，huanglingying@shutcm.edu.cn（ORCID：0009-0003-4996-9138）；高月求，gaoyueqiu@hotmail.com（ORCID：0000-0001-7276-9810）

摘要：目的 明确黄芪甲苷Ⅳ（AS-Ⅳ）在体内外的肝脏保护和抗肝纤维化作用，并探讨其在抗肝纤维化中的作用机制。**方法** 动物实验：将C57BL/6J小鼠分为对照组、模型组、AS-Ⅳ低剂量组（20 mg/kg）和AS-Ⅳ高剂量组（80 mg/kg）。通过腹腔注射四氯化碳6周构建肝纤维化模型，从第3周开始，AS-Ⅳ组分别予以AS-Ⅳ 20 mg/kg、80 mg/kg灌胃，给药4周后检测血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）水平，以及血清透明质酸（HA）、层粘连蛋白（LN）、Ⅲ型前胶原（PⅢNP）及Ⅳ型胶原（Col-Ⅳ）水平；苏木精-伊红染色、天狼星红染色和马松染色观察肝组织病理及胶原沉积情况；定量逆转录聚合酶链反应检测肝组织Acta2、Col1a1、Col3a1的mRNA表达；Western Blot法检测肝组织α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、Ⅲ型胶原蛋白（Col-Ⅲ）、磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶（pPI3K）/PI3K、磷酸化蛋白激酶B（pAkt）/Akt蛋白表达水平；运用转录组学技术对小鼠肝组织进行测序分析，筛选差异基因并进行生物信息学分析。细胞实验：采用转化生长因子β（TGF-β）诱导LX-2细胞活化，进一步使用PI3K抑制剂LY294002以及PI3K激动剂740 Y-P对细胞进行干预，设对照组、模型组、AS-Ⅳ组、LY294002组、AS-Ⅳ+740 Y-P组，36 h后收集细胞。检测LX-2细胞α-SMA、Col-Ⅲ、pPI3K/PI3K和pAkt/Akt蛋白表达的变化，以及Acta2、Col1a1和Col3a1的mRNA相对表达量。计量资料多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较使用LSD-*t*检验。**结果** 动物实验：与模型组相比，AS-Ⅳ治疗组小鼠血清ALT、AST、HA、LN、PⅢNP和Col-Ⅳ水平均显著降低（*P*值均<0.01）；肝组织Acta2、Col1a1和Col3a1的mRNA表达均显著降低（*P*值均<0.05）；与模型组相比，治疗组小鼠肝组织α-SMA、Col-Ⅲ、pPI3K和pAkt（Ser473）的蛋白表达均显著减少（*P*值均<0.05）。细胞实验：与对照组相比，TGF-β诱导后模型组细胞α-SMA、Col-Ⅲ、pPI3K和pAkt蛋白表达水平显著升高（*P*值均<0.05）；与模型组比较，AS-Ⅳ组细胞α-SMA、Col-Ⅲ、pPI3K和pAkt（Ser473）蛋白表达水平显著降低（*P*值均<0.05），LY294002组细胞pPI3K蛋白表达，以及Acta2、Col1a1和Col3a1的mRNA相对表达量亦显著降低（*P*值均<0.05）。而予740 Y-P干预后，与AS-Ⅳ组相比，pPI3K蛋白表达及Acta2、Col1a1和Col3a1的mRNA相对表达量均明显升高（*P*值均<0.05）。**结论** AS-Ⅳ通过抑制肝星状细胞活化从而改善肝纤维化，其作用机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路有关。

关键词： 肝纤维化；黄芪甲苷Ⅳ；小鼠，近交C57BL；肝星状细胞

基金项目： 国家自然科学基金面上项目（82074372）；上海市科技创新行动计划（23Y21920200）；上海市加强公共卫生体系建设三年行动计划（GWVI-2.1.5）

Effect of astragaloside Ⅳ on a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and its mechanism

ZHU Wanchun[1,2], *QIU Jiahao*[1,2], *CUI Yu*[1,2], *ZHANG Yijing*[3], *SHANG Zhi*[1,2], *GAO Yueqiu*[1,2,3], *HUANG Lingying*[4]

1. Laboratory of Cellular Immunity, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Department of Pharmacy, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 4. Department

of Liver Diseases, *Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, *Shanghai 201203*, *China*

Corresponding authors: *HUANG Lingying*, *huanglingying@shutcm. edu. cn* (*ORCID*: *0009-0003-4996-9138*); *GAO Yueqiu*, *gaoyueqiu@hotmail.com* (*ORCID*: *0000-0001-7276-9810*)

Abstract: **Objective** To investigate the liver-protecting and anti-liver fibrosis effects of astragaloside Ⅳ (AS-Ⅳ) *in vitro* and *in vivo*, as well as its mechanism of action in intervention against liver fibrosis. **Methods** In the animal experiment, C57BL/6J mice were divided into control group, model group, low-dose AS-Ⅳ (20 mg/kg) group, and high-dose AS-Ⅳ (80 mg/kg) group. The mice were given intraperitoneal injection of carbon tetrachloride for 6 weeks to induce liver fibrosis, and since week 3 of injection, the mice in the low-dose AS-Ⅳ group and the high-dose AS-Ⅳ group were given AS-Ⅳ by gavage at a dose of 20 mg/kg and 80 mg/kg, respectively. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured after 4 weeks of administration, as well as the serum levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen Ⅲ N-terminal peptide (PⅢNP), and collagen type Ⅳ (Col-Ⅳ). HE staining, picrosirius red staining, and Masson staining were used to observe liver histopathology and collagen deposition; RT-qPCR was used to measure the mRNA expression levels of Acta2, Col1a1, and Col3a1 in liver tissue, and Western blot was used to measure the protein expression levels of α-smooth muscle actin (α-SMA), collagen type Ⅲ (Col-Ⅲ), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (pPI3K), protein kinase B (Akt), and phosphorylated AKT (p-Akt) in liver tissue; transcriptome sequencing was performed for liver tissue to identify differentially expressed genes and perform a bioinformatics analysis. In the cell experiment, transforming growth factor-β (TGF-β) was used to induce the activation of LX-2 cells, and the PI3K inhibitor LY294002 and the PI3K activator 740 Y-P were used for intervention. The cells were divided into control group, model group, AS-Ⅳ group, LY294002 group, and AS-Ⅳ +740 Y-P group, and the cells were harvested after 36 hours of intervention. Changes in the protein expression levels of α-SMA, Col-Ⅲ, pPI3K/PI3K, and pAkt/Akt in LX-2 cells were measured, as well as changes in the relative mRNA expression levels of Acta2, Col1a1, and Col3a1. A one-way analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups, and the least significant difference *t*-test was used for further comparison between two groups. **Results** In the animal experiment, compared with the model group, the AS-Ⅳ treatment group had significant reductions in the serum levels of ALT, AST, HA, LN, PⅢNP, and Col-Ⅳ (all $P<0.01$), the mRNA expression levels of Acta2, Col1a1, and Col3a1 in liver tissue (all $P<0.05$), and the protein expression levels of α-SMA, Col-Ⅲ, pPI3K, and pAkt (Ser473) in liver tissue (all $P<0.05$). In the cell experiment, compared with the control group, the model group had significant increases in the protein expression levels of α-SMA, Col-Ⅲ, pPI3K, and pAkt (Ser473) after TGF-β induction (all $P<0.05$); compared with the model group, the AS-Ⅳ group had significant reductions in the protein expression levels of α-SMA, Col-Ⅲ, pPI3K, and pAkt (Ser473) (all $P<0.05$), and both the AS-Ⅳ group and the LY294002 group had significant reductions in the protein expression level of pPI3K and the relative mRNA expression levels of Acta2, Col1a1, and Col3a1 (all $P<0.05$). Compared with the AS-Ⅳ group, there were significant increases in the protein expression level of pPI3K and the relative mRNA expression levels of Acta2, col1a1, and Col3a1 after 740 Y-P intervention (all $P<0.05$). **Conclusion** AS-Ⅳ can inhibit hepatic stellate cell activation and improve liver fibrosis, possibly by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: Hepatic Fibrosis; Astragaloside Ⅳ; Mice, Inbred C57BL; Hepatic Stellate Cells

Research funding: General Program of National Natural Science Foundation of China (82074372); Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan (23Y21920200); Three-year Action Plan for Strengthening Public Health System Construction in Shanghai Municipality (GWVI-2.1.5)

肝纤维化是由多种慢性肝损伤引起的肝组织病理性修复反应，其特征为细胞外基质(extracellular matrix，ECM)异常沉积与结构重塑，导致正常肝实质被纤维瘢痕组织替代，进一步发展为肝硬化甚至肝癌。肝硬化是全球慢性肝病患者死亡的主要原因，2019年肝硬化死亡人数占全球死亡人数的2.4%[1]。晚期肝纤维化或肝硬化几乎不可逆转。因此，早期干预并寻找可有效阻断纤维化的药物具有重要意义。然而，目前临床尚缺乏相关特异性药物，病因治疗仍是肝纤维化的主要治疗策略[2]。

肝星状细胞(hepatic stellate cell，HSC)活化是肝纤维化发生的关键环节。HSC定位于窦周隙，主要储存维生素A。当肝脏受损时，HSC接收来自受损肝细胞和免疫细胞释放的信号，由静止状态进一步分化为肌成纤维细胞样细胞，上调α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle

actin，α-SMA）表达，并大量合成Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白等成分，导致ECM过度沉积。同时，活化的HSC还可分泌转化生长因子β（transforming growth factor-β，TGF-β）、血小板源性生长因子、单核细胞趋化蛋白1等细胞因子，进一步促进炎症反应、增强ECM合成并抑制其降解，从而加速纤维化进程[3-4]。

黄芪甲苷Ⅳ（astragaloside Ⅳ，AS-Ⅳ）是黄芪的主要活性成分，属环阿屯型三萜苷，具有抗氧化、抗炎和抗细胞凋亡等药理作用。已有研究报道其在保护神经、保护肝脏和抗癌等方面具有潜在作用[5-6]，还可显著改善代谢相关脂肪性肝病小鼠的肝损伤[7]。本研究旨在通过构建小鼠肝纤维化模型，并结合转录组学分析，系统探究AS-Ⅳ对肝纤维化的治疗效果及其作用机制，以明确其通过调控磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，PKB/Akt）信号通路抑制HSC活化发挥抗肝纤维化作用的机制，从而为肝纤维化的治疗提供新的理论依据和潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 动物实验

1.1.1 实验动物 本研究选用雄性C57BL/6J小鼠，6～8周龄，体重18～22 g，购自浙江维通利华实验动物有限责任公司，饲养于上海中医药大学实验动物中心。实验动物生产许可证编号：SCXK（沪）2024-001，实验动物使用许可证编号：SYXK（沪）2020-0009。

1.1.2 药物与试剂 AS-Ⅳ（货号：HY-N0431，纯度：99.93%）购自美国MedChemexpresss生物科技公司；四氯化碳（CCl_4）和橄榄油购自上海麦克林生化科技股份有限公司；肝纤维化四项[层粘连蛋白（laminin，LN）、透明质酸（hyaluronic acid，HA）、Ⅲ型前胶原（N-terminal procollagen Ⅲ propeptide，PⅢNP）、Ⅳ型胶原（collagen type Ⅳ，Col-Ⅳ）]酶联免疫检测试剂盒均购自泉州市科诺迪生物公司；苏木精-伊红（hematoxylin and eosin，HE）染液购自南京建成生物工程研究所；马松染液购自Solarbio公司；anti-α-SMA（货号：ab124964）、anti-Col-Ⅲ（货号：ab184993）、anti-GAPDH（货号：ab181602）购自英国Abcam公司；PI3 Kinase p85 Antibody（货号：4292S）、磷酸化PI3K（phospho phosphoinositide 3-kinase，pPI3K）p85抗体（货号：4228S）、磷酸化Akt（pAkt）（Ser473）单克隆抗体（兔）（货号：4060S）、Akt单克隆抗体（兔）（货号：4685S）均购自美国CST公司；PI3K抑制剂LY294002（货号：HY-10108）、PI3K激活剂740 Y-P（货号：HY-P0175）均购自美国MedChemexpresss生物科技公司。

1.1.3 主要仪器 聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）仪（型号：QSTUDIO6PRO，美国Themo Fisher Scientific公司）；酶标仪（型号：SYNERGY H1，美国BIO-TEK公司）；Western Blot显影仪（型号：ChemiDoc MP，美国Bio-Rad公司）；细胞培养箱（型号：CLM-170/240B-8-CN，新加坡ESCO公司）。

1.1.4 肝纤维化动物模型制备及分组给药 将32只C57BL/6J雄性小鼠按随机数字表法分为4组（每组8只）：对照组、模型组（CCl_4造模）、AS-Ⅳ低剂量组[CCl_4+AS-Ⅳ低剂量（20 mg/kg）]及高剂量组[CCl_4+AS-Ⅳ高剂量（80 mg/kg）]。AS-Ⅳ给药剂量及溶解方法参考Zhang等[8]研究。除对照组腹腔注射橄榄油（2 mL/kg）外，其余各组均注射相同体积的CCl_4橄榄油溶液（CCl_4与橄榄油比例为1∶9，2 mL/kg），每周2次，持续6周。第3周起，AS-Ⅳ低剂量组和高剂量组分别灌胃相应剂量AS-Ⅳ，每日1次，其余组则灌服等量生理盐水，给药4周后处死小鼠，收集血清和肝脏。

1.1.5 血清生化学检测 采用东芝TBA-40FR全自动生化分析仪（上海中医药大学附属曙光医院检验科）检测小鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）和丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）活性。肝纤维化四项（HA、LN、PⅢNP、Col-Ⅳ）的水平按说明书进行检测。

1.1.6 肝组织HE染色、天狼星红染色、马松染色 肝组织经福尔马林固定后，常规脱水石蜡包埋，制备4 μm切片，进行HE染色、天狼星红染色和马松染色，评估小鼠肝脏病理学改变。

1.1.7 定量逆转录PCR检测 取小鼠肝组织及人肝星状细胞（LX-2细胞），加入Trizol试剂提取总RNA，测定样品浓度和纯度后，进行逆转录并制备互补DNA，进行PCR扩增，检测HSC活化相关基因Col1a1、Col3a1及Acta2的mRNA表达。以GAPDH为内参计算相对表达量，实验所用引物序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成（表1）。

1.1.8 Western Blot检测 采用Western Blot法检测小鼠肝脏组织和LX-2细胞中α-SMA、Col-Ⅲ、pPI3K/PI3K、pAkt/Akt的蛋白表达水平。使用放射免疫沉淀法裂解液提取总蛋白，定量后每孔上样10 μg进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，随后转印至聚偏氟乙烯膜，5%脱脂牛奶室温下封闭1 h。于4 ℃下一抗孵育过夜，次日二抗室温孵1 h，等渗缓冲盐溶液洗膜后显影。采用ImageJ软件计算条带灰度值。

1.1.9 转录组测序 分别采集模型组与AS-Ⅳ高剂量组小鼠的肝组织样本，每组重复5次。使用Trizol试剂提取总RNA，经NanoDrop 2000分光光度计检测纯度与浓度，Agilent 2100 Bioanalyzer评估完整性。采用VAHTS

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	正向(5′-3′)	反向(5′-3′)
Col3a1		
小鼠肝组织	CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA	CCATAGCTGAACTGAAAACCACC
人LX-2细胞	CGTGGTAGCCCTGGTGAGAGAG	TGGAGAACCGCTGGGACCTG
Col1a1		
小鼠肝组织	CAGGCTGGTGTGATGGGATT	CGTTCTCCGCTCTCTCCAAA
人LX-2细胞	GAGGGCCAAGACGAAGACATC	CAGATCACGTCATCGCACAAC
Acta2		
小鼠肝组织	TATCCCCGGGACTAAGACGG	CTGTAGTCCCCCACTACCAC
人LX-2细胞	CTCTGGACGCACAACTGGCATC	CCCATCAGGCAACTCGTAACTCTTC
GAPDH		
小鼠肝组织	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
人LX-2细胞	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

Universal V10 RNA-seq Library Prep Kit构建转录组文库，测序委托上海欧易生物技术有限公司完成。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞培养 LX-2细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心，培养于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中。

1.2.2 细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8，CCK-8)法检测LX-2细胞活力 将细胞接种于96孔板培养过夜，待细胞完全贴壁后以不同浓度(0、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L)的AS-Ⅳ对细胞进行干预，继续培养24 h。而后每孔加入10 μL CCK-8溶液，于37 ℃下避光孵育1 h后，使用酶标仪检测450 nm波长下的吸光度值。

1.2.3 细胞处理 LX-2细胞接种于6孔板，待细胞贴壁后，替换为无血清培养基进行饥饿处理6 h。而后予以TGF-β(10 ng/mL)诱导LX-2细胞活化，在此基础上，进一步使用PI3K抑制剂LY294002以及PI3K激动剂740 Y-P对细胞进行干预，分别设置对照组、模型组(TGF-β组)、AS-Ⅳ(80 μmol/L)组、LY294002(20 μmol/L)组、AS-Ⅳ(80 μmol/L)+740 Y-P(30 μmol/L)组，干预36 h后提取细胞RNA以及总蛋白进行后续实验。

1.3 统计学方法 采用GraphPad Prism 10.0软件进行数据统计分析。计量资料多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。转录组测序数据富集显著性基于超几何分布检验计算，以错误发现率(false discovery rate，FDR)<0.05为显著性阈值。P<0.05为差异有统计学意义。

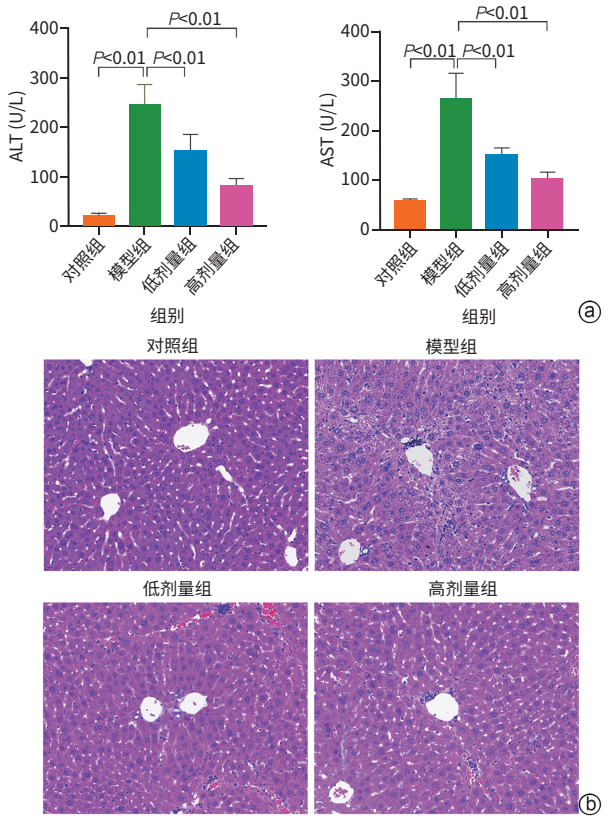
2 结果

2.1 动物实验

2.1.1 AS-Ⅳ对CCl_4诱导的小鼠肝损伤的影响 CCl_4诱导肝纤维化小鼠血清肝损伤指标ALT、AST的水平显著升高。与模型组相比，AS-Ⅳ显著下调小鼠血清ALT、AST水平(P值均<0.01)(图1a)。肝脏HE染色结果显示，对照组小鼠肝组织结构完整，肝小叶内肝细胞索排列规则；模型组则呈现肝板结构紊乱，汇管区周围可见显著炎性细胞浸润；用药后小鼠肝脏炎症细胞浸润以及肝小叶结构破坏程度得到明显改善(图1b)。以上结果表明，AS-Ⅳ可显著改善CCl_4诱导的小鼠肝损伤，并减轻炎症反应。

2.1.2 AS-Ⅳ对CCl_4诱导的小鼠肝组织胶原沉积的影响 马松染色及天狼星红染色结果显示，模型组小鼠肝组织可见大量肝脏胶原沉积，而AS-Ⅳ可显著降低肝脏胶原沉积(图2a)。生化分析结果显示，与模型组相比，AS-Ⅳ能显著降低小鼠血清HA、LN、PⅢNP和Col-Ⅳ水平(P值均<0.01)(图2b)。Western Blot结果显示，模型组小鼠肝组织Col-Ⅲ蛋白的表达显著增加，AS-Ⅳ干预后显著降低了肝组织Col-Ⅲ的蛋白表达(P值均<0.05)(图3a)。PCR结果显示，与对照组相比，模型组小鼠肝组织中Col1a1与Col3a1的mRNA表达显著上调，AS-Ⅳ可显著降低Col1a1、Col3a1的mRNA表达水平(P值均<0.01))(图3b)。以上结果表明，AS-Ⅳ可显著抑制CCl_4诱导的小鼠肝脏胶原沉积，有效延缓肝纤维化病理进展。

2.1.3 AS-Ⅳ对肝纤维化小鼠肝脏HSC活化的影响 为探究AS-Ⅳ抑制肝纤维化模型小鼠肝脏胶原沉积的作用机制，本研究进一步检测了AS-Ⅳ对小鼠肝脏HSC活化的影响。PCR及Western Blot结果显示，AS-Ⅳ可显著降低小鼠肝组织α-SMA蛋白表达水平(P值均<0.05)(图3a)，以及Acta2的mRNA表达水平(P值均<0.01)(图3b)。以上结果表明，AS-Ⅳ可显著抑制CCl_4诱导的肝纤维化小鼠肝脏HSC活化。



注：a，血清ALT、AST水平；b，HE染色（×400）。ALT，丙氨酸氨基转移酶；AST，天冬氨酸氨基转移酶；AS-Ⅳ，黄芪甲苷Ⅳ；HE，苏木精-伊红。

图1　AS-Ⅳ改善CCl_4诱导的小鼠肝脏炎症

Figure 1　AS-Ⅳ attenuates inflammation in mice treated with CCl_4

2.1.4　小鼠肝脏转录组测序分析　进一步对模型组和AS-Ⅳ用药组小鼠肝组织进行转录组学分析，其中符合表达量倍数变化（fold change，FC）|$\log_2$FC|>1且FDR<0.05的基因被定义为差异表达基因。差异表达基因火山图显示，2组相比，共筛选出43个差异表达基因，其中36个基因表达下调，7个基因表达上调（图4a）。聚类分析热图进一步表明，2组样本基因表达差异显著（图4b）。

2.1.5　差异表达基因的功能富集分析和信号通路分析　GO功能聚类分析结果显示，AS-Ⅳ治疗肝纤维化的生物过程主要与脂肪酸代谢、烯烃化合物代谢等相关；分子功能主要涉及酶激活剂活性、氧化还原酶活性和跨膜转运蛋白活性等；细胞组分主要集中在ECM、蛋白复合物等（图5a～c）。进一步进行KEGG信号通路富集分析，依据富集分数、*P*值及通路内富集基因数量评估显著性，结果显示，PI3K/Akt信号通路是差异基因富集最显著的通路（图5d）。以上结果表明PI3K/Akt通路是AS-Ⅳ治疗肝纤维化的潜在信号通路。

2.1.6　AS-Ⅳ对肝纤维化小鼠肝脏PI3K/Akt信号通路活化的影响　Western Blot结果显示，与对照组相比，模型组小鼠肝组织pPI3K、pAkt（Ser473）蛋白的磷酸化水平明显增加；经AS-Ⅳ干预后，小鼠肝组织pPI3K、pAkt（Ser473）蛋白磷酸化水平显著下降（*P*值均<0.05）（图6）。上述结果表明，AS-Ⅳ能够有效抑制PI3K/Akt信号通路的活化。

2.2　细胞实验

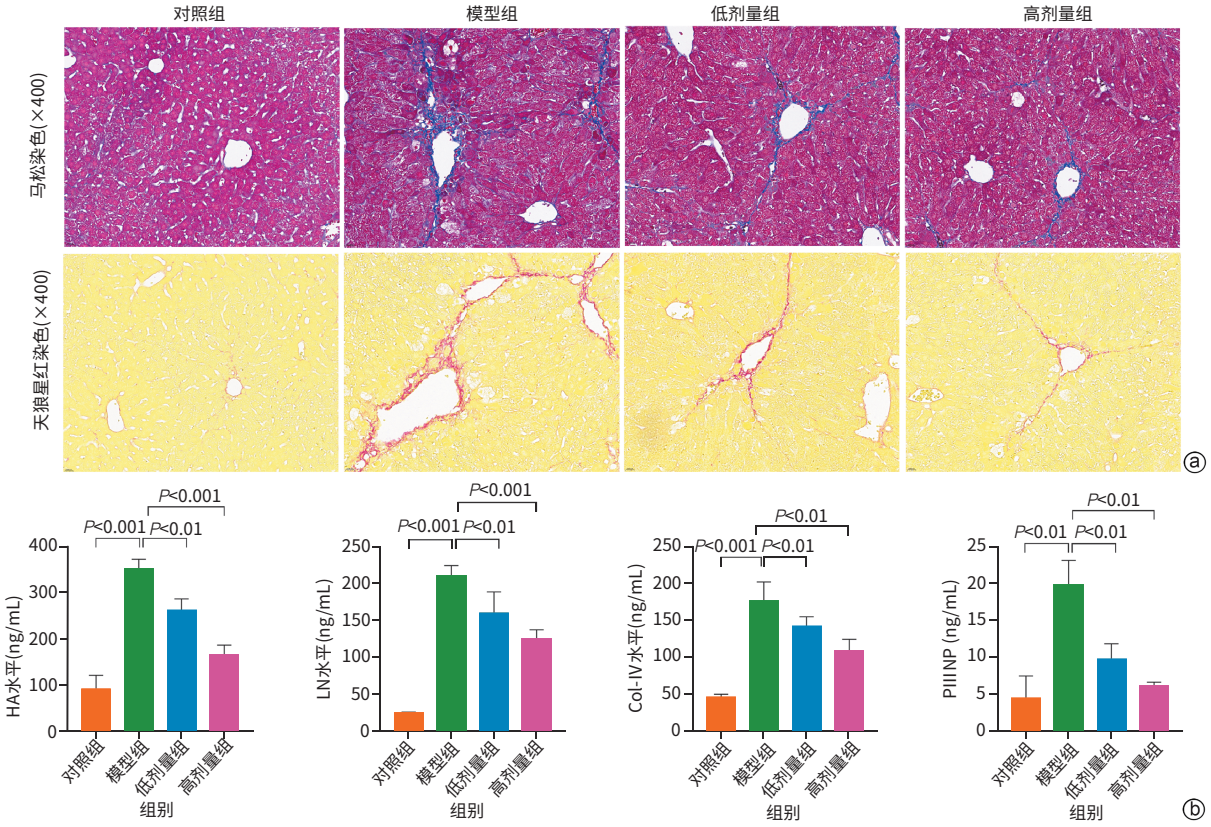
2.2.1　AS-Ⅳ在体外对HSC激活的影响　TGF-β（10 ng/mL）刺激LX-2细胞，可显著增加细胞α-SMA、Col-Ⅲ的表达，且能够被AS-Ⅳ（80 μmol/L）抑制（*P*值均<0.05）（图7a）。与对照组相比，模型组LX-2细胞中pPI3K、pAkt（Ser473）蛋白的磷酸化水平明显增加；经AS-Ⅳ干预后，LX-2细胞中pPI3K、pAkt（Ser473）蛋白磷酸化水平显著降低（*P*值均<0.05）（图7b）。CCK-8检测结果表明，AS-Ⅳ对LX-2细胞均无明显的毒性（图7c）。上述结果提示，AS-Ⅳ可通过抑制PI3K/Akt信号通路抑制HSC的活化。

2.2.2　AS-Ⅳ通过抑制PI3K/Akt通路抑制HSC激活　为了进一步证实AS-Ⅳ对PI3K磷酸化的抑制作用，分别予以PI3K抑制剂LY294002和激动剂740 Y-P对LX-2细胞进行干预。结果显示，LY294002能显著抑制pPI3K的蛋白表达以及HSC活化标志物mRNA表达水平（*P*值均<0.05）（8a～b）；而予以740 Y-P干预后，AS-Ⅳ对LX-2细胞中HSC活化标志物和pPI3K/PI3K水平的抑制作用被一定程度抵消（*P*值均<0.05）（图8c～d）。

3　讨论

肝纤维化进展的本质是肝脏组织损伤修复过程中ECM过度沉积所致，HSC活化在该过程中发挥了关键作用[9-10]。近年来的研究发现，HSC的活化具有可逆性，一旦致病因素被清除，其可发生凋亡或恢复至静息状态，因此HSC成为抗肝纤维化治疗的重要靶点。例如，利用核受体调节HSC活化可促进肝纤维化消退[11]。中药因其多成分、多靶点等特点，在抗肝纤维化治疗方面显示出独特的优势。近年来，中药活性成分在减轻肝脏炎症、抑制HSC活化等方面显示出良好的研究前景[12]。

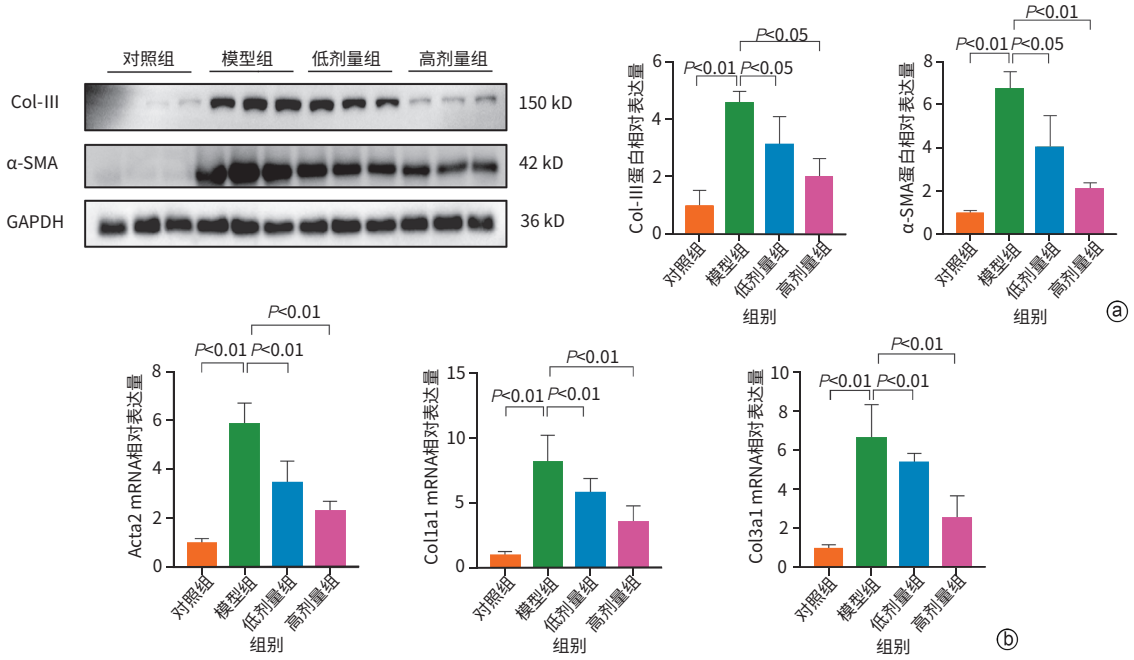
AS-Ⅳ作为黄芪的主要活性成分之一，已被证实具有抗氧化、抗炎及抗纤维化等多种药理活性。研究表明，AS-Ⅳ可通过调节巨噬细胞极化改善心肌损伤[13]。Li等[14]报道AS-Ⅳ可通过激活核转录因子红系2相关因子2抗氧化信号通路保护血脑屏障完整性。在心脏疾病研究中，AS-Ⅳ通过过氧化物酶体增殖物激活受体α-短链脂肪酰辅酶A脱氢酶信号通路改善小鼠心肌肥厚及纤维化[15]。研究表明，PI3K/Akt信号通路在减轻肝纤维



注：a，染色结果；b，小鼠血清HA、LN、PⅢNP、Col-Ⅳ水平。AS-Ⅳ，黄芪甲苷Ⅳ；HA，透明质酸；LN，层粘连蛋白；Col-Ⅳ，Ⅳ型胶原；PⅢNP，Ⅲ型前胶原。

图2　AS-Ⅳ改善小鼠肝脏胶原沉积

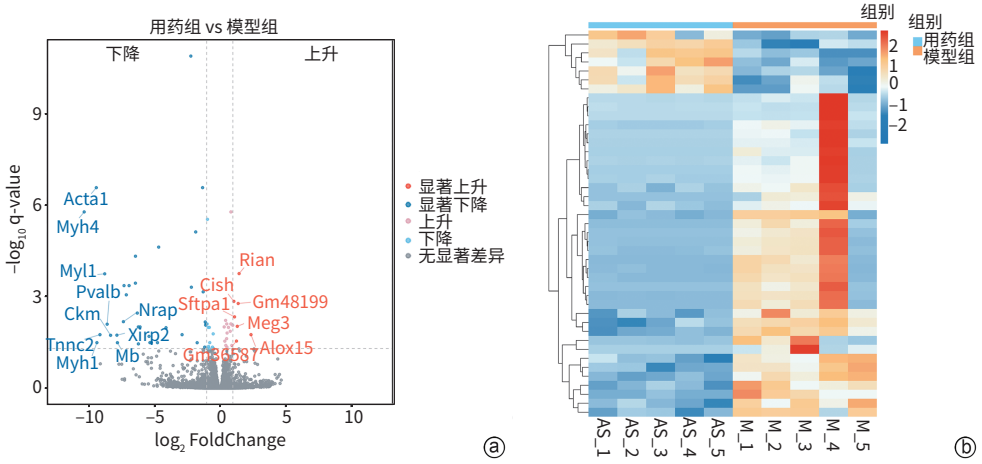
Figure 2　AS-Ⅳ attenuates hepatic collagen deposition in mice



注：a，α-SMA、Col-Ⅲ的蛋白表达；b，Acta2、Col1a1、Col3a1的mRNA表达。AS-Ⅳ，黄芪甲苷Ⅳ；Col-Ⅲ，Ⅲ型胶原蛋白；α-SMA，α-平滑肌肌动蛋白；HSC，肝星状细胞。

图3　AS-Ⅳ抑制小鼠肝脏HSC活化

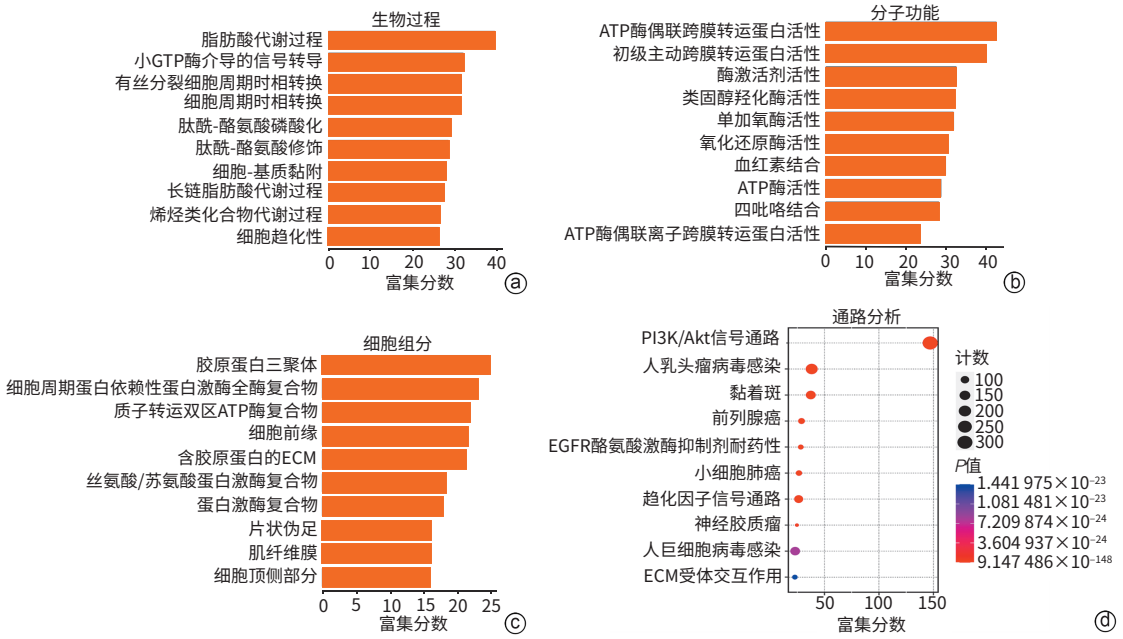
Figure 3　AS-Ⅳ attenuates the activation of HSC in the mouse liver



注：a，差异表达基因火山图；b，差异表达基因聚类分析热图。

图4　小鼠肝脏转录组测序分析

Figure 4　Mouse liver transcriptome sequencing analysis



注：a～c，生物过程、分子功能及细胞组分的GO富集分析；d，KEGG通路富集结果。GTP，鸟苷三磷酸；ATP，腺嘌呤核苷三磷酸；PI3K/Akt，磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B；EGFR，表皮生长因子受体；ECM，细胞外基质。

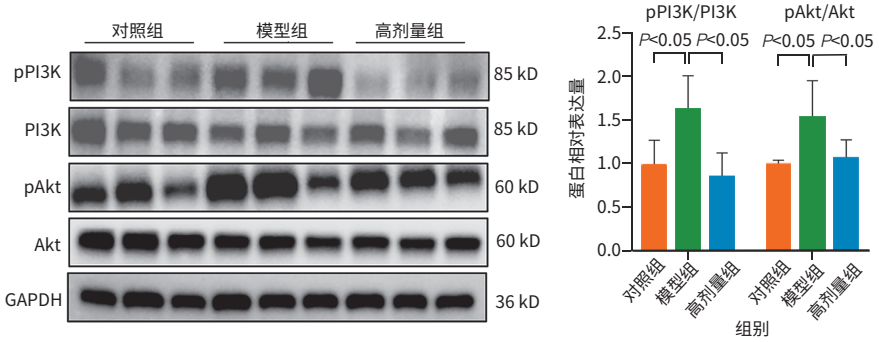
图5　功能富集分析和信号通路分析

Figure 5　Functional annotation and pathway enrichment analysis of differentially expressed genes

化中发挥重要作用，其作用机制与HSC的增殖、激活和ECM合成密切相关[16]。近年来，多种天然药物和中药活性成分被发现可通过干预PI3K/Akt通路抑制HSC活化，从而发挥抗纤维化作用。例如，丹参多酚酸盐能够显著抑制肝脏组织PI3K、Akt和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白磷酸化水平[17]；积雪草酸可通过抑制PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路，抑制HSC活化和ECM合成[18]，从而发挥抗肝纤维化的作用。

本研究结果证实，AS-Ⅳ可通过抑制HSC活化、降低胶原沉积及改善肝功能指标，显著缓解CCl_4诱导的小鼠肝纤维化进程。通过转录组测序发现，PI3K/Akt信号通路可能是AS-Ⅳ的靶通路。体内外实验进一步证实，AS-Ⅳ可通过抑制PI3K/Akt信号通路激活，从而发挥抗肝纤维化的作用。

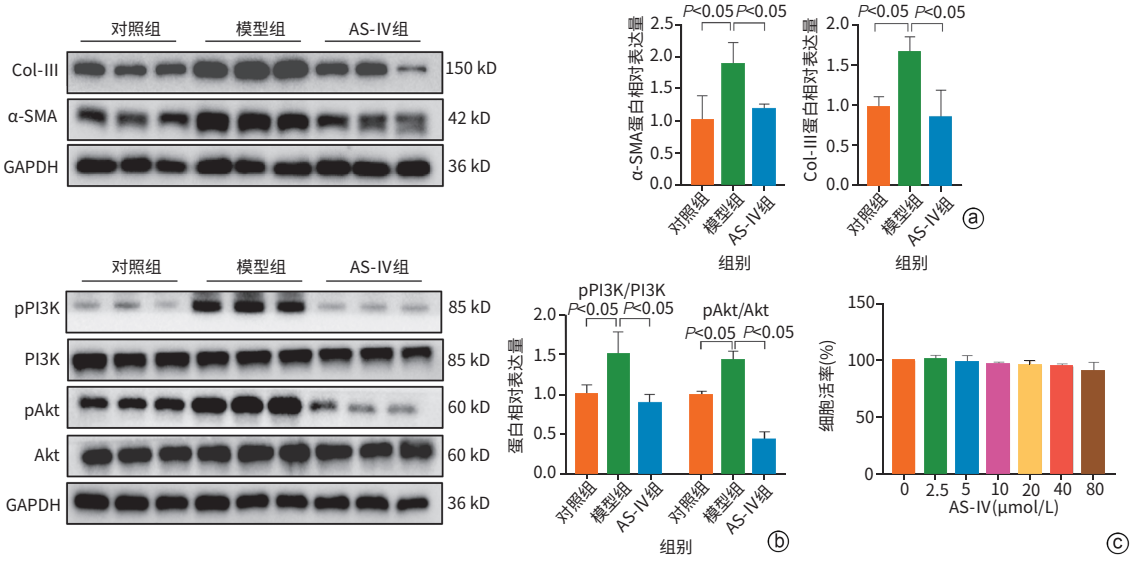
活化的HSC不仅是ECM的生产者，也是大量炎症因子、趋化因子和活性氧的来源，将直接导致肝细胞损伤、凋亡或坏死，从而诱发炎症并促进肝脏中免疫细胞的募集和浸润[19]。作为肝脏最丰富的免疫细胞，巨噬细



注：PI3K，磷脂酰肌醇3-激酶；pPI3K，磷酸化PI3K；Akt，蛋白激酶B；pAkt，磷酸化Akt；AS-Ⅳ，黄芪甲苷Ⅳ。

图6　AS-Ⅳ对小鼠肝脏PI3K/Akt通路活化的影响

Figure 6　Effect of AS-Ⅳ on the activation of the PI3K/Akt pathway in the mouse liver



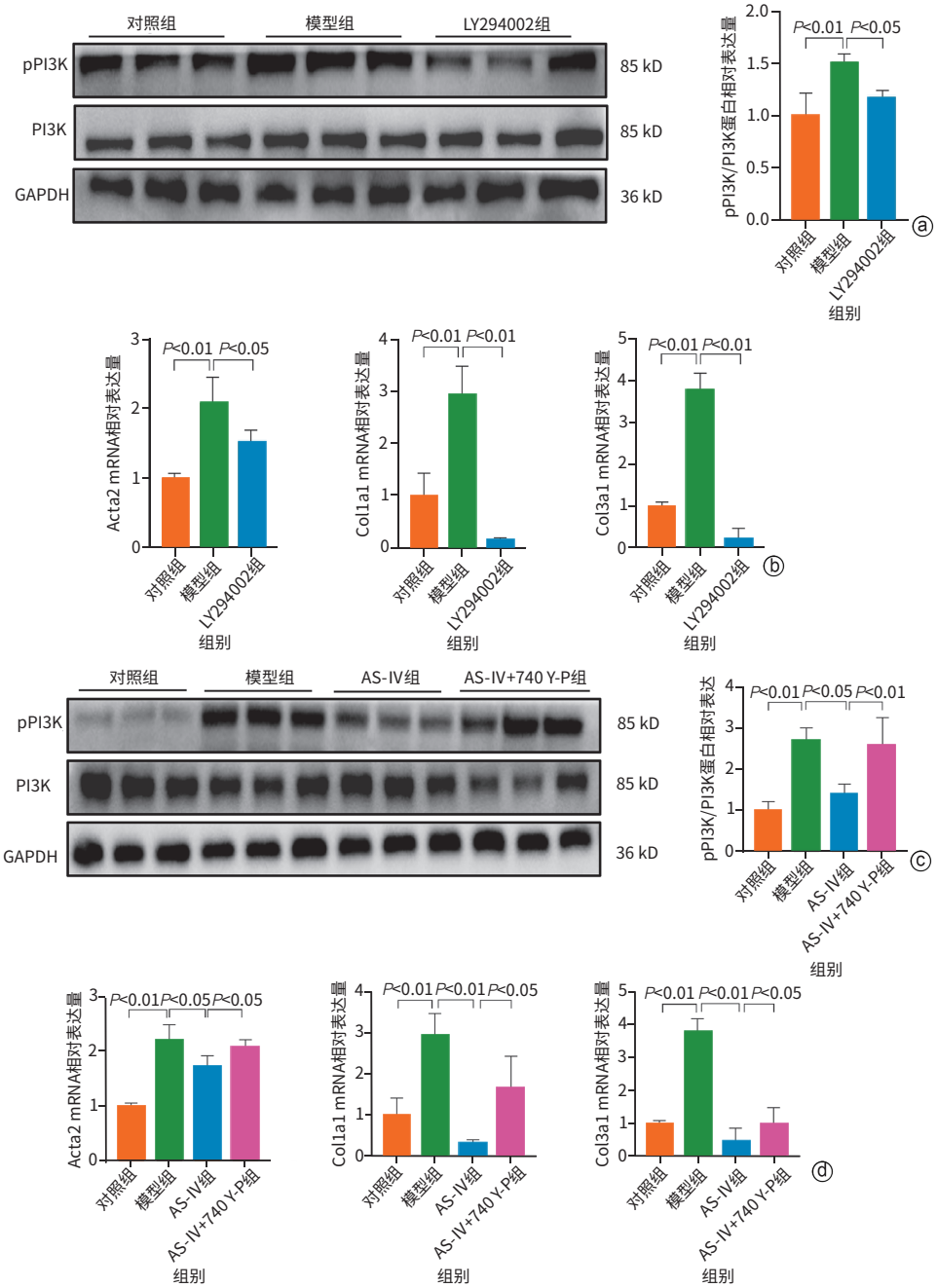
注：a，LX-2细胞中α-SMA、Col-Ⅲ的蛋白表达；b，LX-2细胞中PI3K、pPI3K、Akt、pAkt的蛋白表达；c，CCK-8检测AS-Ⅳ对LX-2细胞存活率的影响。AS-Ⅳ，黄芪甲苷Ⅳ；Col-Ⅲ，Ⅲ型胶原蛋白；α-SMA，α-平滑肌肌动蛋白；PI3K，磷脂酰肌醇3-激酶；pPI3K，磷酸化PI3K；Akt，蛋白激酶B；pAkt，磷酸化Akt；HSC，肝星状细胞；CCK-8，细胞计数试剂盒-8。

图7　AS-Ⅳ对HSC激活的影响

Figure 7　Effect of AS-Ⅳ on HSC activation

胞在肝纤维化的进程中具有双重作用[20-21]。在肝纤维化的生成阶段，肝巨噬细胞[又称库普弗细胞（Kupffer cell，KC）]会释放各种细胞因子，触发经典的TGF-β和血小板源性生长因子通路，促进HSC和KC之间的相互作用，进一步激活HSC并促进肝纤维化过程。而在肝纤维化的消退阶段，巨噬细胞表型可发生转换[22]。KC可通过产生多种基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）促进基质降解和肝纤维化消退。Duffield等[23]研究发现，巨噬细胞是MMP的主要来源，清除KC会延迟纤维化消退。进一步研究提示，KC衍生的MMP9在纤维化消退中发挥关键作用，这可作为开发抗纤维化疗法的基础[24]。因此，肝纤维化的主要治疗目标是抑制HSC的活化，使活化的HSC恢复静止状态可能是肝纤维化更有效的治疗方法[25]。研究表明，HSC可通过R-脊椎蛋白3影响肝细胞增殖、代谢和分区，恢复HSC平衡有助于肝脏恢复正常功能，减轻纤维化程度[26]。

综上所述，AS-Ⅳ可通过调控PI3K/Akt信号通路抑制HSC活化，从而改善肝纤维化。本研究为明确AS-Ⅳ抗肝纤维化的机制提供了现代医学依据，也为中药在肝纤维化治疗中的研发应用奠定了一定的基础。然而本研究尚存在一定不足：本研究主要采用CCl_4诱导肝纤维化模型，尽管该模型可模拟肝纤维化的核心病理过程，但其无法完全复现人类慢性肝病的进展特征，AS-Ⅳ在其他病因模型（如脂肪肝相关肝纤维化）中的确切疗效和机制尚需进一步验证。此外，尽管AS-Ⅳ安全性较高，但其活性成分生物利用度较低，未来可通过纳米颗粒或外泌体等递送系统提升其疗效，充分提高成分生物利用度，以加速其临床应用。



注：a、c，LX-2细胞中PI3K、pPI3K的蛋白表达；b、d，LX-2细胞中Acta2、Col1a1、Col3a1的mRNA表达。AS-Ⅳ，黄芪甲苷Ⅳ；HSC，肝星状细胞；PI3K，磷脂酰肌醇3-激酶；pPI3K，磷酸化PI3K；Akt，蛋白激酶B。

图8　AS-Ⅳ通过调控PI3K/Akt通路抑制HSC激活

Figure 8　AS-Ⅳ activates hepatic stellate cells through the PI3K/Akt pathway

伦理学声明：本研究方案于2024年2月23日经由上海中医药大学实验动物伦理委员会审批通过，批号：PZSHUTCM2402230002，符合实验室动物管理与使用准则。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：朱宛春进行实验和文章撰写；邱嘉昊、崔钰、张伊婧负责数据收集和统计分析；尚志负责技术支持和文章修改；黄凌鹰、高月求指导撰写文章并最后定稿。

参考文献：

[1] HUANG DQ, TERRAULT NA, TACKE F, et al. Global epidemiology of cirrhosis: Aetiology, trends and predictions[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(6): 388-398. DOI: 10.1038/s41575-023-00759-2.

[2] ZHANG CY, LIU S, YANG M. Treatment of liver fibrosis: Past, cur-

rent, and future[J]. World J Hepatol, 2023, 15(6): 755-774. DOI: 10.4254/wjh.v15.i6.755.
[3] TRIVEDI P, WANG S, FRIEDMAN SL. The power of plasticity-metabolic regulation of hepatic stellate cells[J]. Cell Metab, 2021, 33(2): 242-257. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.10.026.
[4] YIN CY, EVASON KJ, ASAHINA K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer[J]. J Clin Invest, 2013, 123(5): 1902-1910. DOI: 10.1172/JCI66369.
[5] ZHANG JQ, WU CX, GAO L, et al. Astragaloside IV derived from *Astragalus membranaceus*: A research review on the pharmacological effects[J]. Adv Pharmacol, 2020, 87: 89-112. DOI: 10.1016/bs.apha.2019.08.002.
[6] HUANG SW, SHAO XH, ZHANG X, et al. Effects of astragaloside IV on low-glucose mediated tumor immunosuppression microenvironment and its mechanism[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2024, 29(11): 1201-1211. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2024.11.001.
黄仕文, 邵晓寒, 张雪, 等. 黄芪甲苷Ⅳ干预低糖介导的肿瘤免疫抑制微环境作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29(11): 1201-1211. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2024.11.001.
[7] LIANG XY, HONG FF, YANG SL. Astragaloside IV alleviates liver inflammation, oxidative stress and apoptosis to protect against experimental non-alcoholic fatty liver disease[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2021, 14: 1871-1883. DOI: 10.2147/DMSO.S304817.
[8] ZHANG C, LI LL, HOU S, et al. Astragaloside IV inhibits hepatocellular carcinoma by continually suppressing the development of fibrosis and regulating pSmad3C/3L and Nrf2/HO-1 pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 114350. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114350.
[9] CHEN HX, CAI JY, WANG JC, et al. Targeting Nestin^{+} hepatic stellate cells ameliorates liver fibrosis by facilitating TβRI degradation[J]. J Hepatol, 2021, 74(5): 1176-1187. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.11.016.
[10] YAN MY, CUI YM, XIANG Q. Metabolism of hepatic stellate cells in chronic liver diseases: Emerging molecular and therapeutic interventions[J]. Theranostics, 2025, 15(5): 1715-1740. DOI: 10.7150/thno.106597.
[11] SUN YX, YUAN XY, HU ZH, et al. Harnessing nuclear receptors to modulate hepatic stellate cell activation for liver fibrosis resolution[J]. Biochem Pharmacol, 2025, 232: 116730. DOI: 10.1016/j.bcp.2024.116730.
[12] HUANG FJ, XIE XX, LIU X, et al. Research progress on the active ingredients of traditional Chinese medicine against hepatic fibrosis by regulating the MAPK signaling pathway[J]. Chin J Hosp Pharm, 2025, 45(2): 225-233. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2025.02.17.
黄甫静, 谢星星, 刘学, 等. 中药活性成分调控MAPK信号通路抗肝纤维化的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2025, 45(2): 225-233. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2025.02.17.
[13] CHEN SP, KANG RD, HONG XB, et al. Astragaloside IV regulates Snail1 lactylation and acetylation to mediate macrophage polarization and improve myocardial infarction[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2025, 41(4): 289-299. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009952.
陈少鹏, 康儒典, 洪新宝, 等. 黄芪甲苷Ⅳ调控Snail1乳酸化和乙酰化介导巨噬细胞极化改善大鼠心肌梗死[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2025, 41(4): 289-299. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009952.
[14] LI HL, WANG P, HUANG F, et al. Astragaloside IV protects blood-brain barrier integrity from LPS-induced disruption *via* activating Nrf2 antioxidant signaling pathway in mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 340: 58-66. DOI: 10.1016/j.taap.2017.12.019.
[15] QING LY, LIU LT, XU QP, et al. Astragaloside IV attenuates pathological myocardial hypertrophy and fibrosis in mice *via* EGR1-SIRT1-PPARα-SCAD signaling pathway[J]. Chin Pharmacol Bull, 2025, 41(2): 242-250. DOI: 10.12360/CPB202406092.
卿丽媛, 刘兰婷, 徐庆萍, 等. 黄芪甲苷Ⅳ基于EGR1-SIRT1-PPARα-SCAD信号通路减轻小鼠病理性心肌肥厚及纤维化[J]. 中国药理学通报, 2025, 41(2): 242-250. DOI: 10.12360/CPB202406092.
[16] SHAMSAN E, ALMEZGAGI M, GAMAH M, et al. The role of PI3k/AKT signaling pathway in attenuating liver fibrosis: A comprehensive review[J]. Front Med, 2024, 11: 1389329. DOI: 10.3389/fmed.2024.1389329.
[17] WU C, HUANG L, MO LQ, et al. Anti-fibrotic effects of salvianolate on hepatic fibrosis in rats by regulating TGF-β1/Smad and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Chin J Hosp Pharm, 2019, 39(7): 670-675. DOI: 10.13286/j.cnki.chinhosppharmacyj.2019.07.04.
吴灿, 黄亮, 莫立乾, 等. 丹参多酚酸盐通过TGF-β1/Smad和PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制大鼠肝纤维化的进展[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(7): 670-675. DOI: 10.13286/j.cnki.chinhosppharmacyj.2019.07.04.
[18] WEI LW, CHEN QS, GUO AJ, et al. Asiatic acid attenuates CCl_4-induced liver fibrosis in rats by regulating the PI3K/AKT/mTOR and Bcl-2/Bax signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 60: 1-8. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.04.016.
[19] AKKIZ H, GIESELER RK, CANBAY A. Liver fibrosis: From basic science towards clinical progress, focusing on the central role of hepatic stellate cells[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(14): 7873. DOI: 10.3390/ijms25147873.
[20] BAI XY, ZHANG X, HAI L, et al. Regulatory effect and mechanism of macrophage polarization in liver fibrosis[J]. J Clin Hepatol, 2024, 40(3): 611-615. DOI: 10.12449/JCH240329.
白小洋, 张旭, 海龙, 等. 巨噬细胞极化在肝纤维化中的调控作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(3): 611-615. DOI: 10.12449/JCH240329.
[21] GAO YY, ZHAN XY, ZHOU HM. The role of endoplasmic reticulum stress in regulating macrophage immune response in liver diseases[J]. Organ Transpl, 2024, 15(6): 889-894. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024144.
高逸云, 詹欣雨, 周浩明. 内质网应激调控巨噬细胞免疫应答在肝脏疾病中的作用[J]. 器官移植, 2024, 15(6): 889-894. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024144.
[22] WANG LP, HUANG Y, CHEN JR, et al. Dynamic crosstalk between HSCs and liver microenvironment: Multicellular interactions in the regulation of liver fibrosis[J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13: 1635763. DOI: 10.3389/fcell.2025.1635763.
[23] DUFFIELD JS, FORBES SJ, CONSTANDINOU CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair[J]. J Clin Invest, 2005, 115(1): 56-65. DOI: 10.1172/JCI22675.
[24] FENG M, DING J, WANG M, et al. Kupffer-derived matrix metalloproteinase-9 contributes to liver fibrosis resolution[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(9): 1033-1040. DOI: 10.7150/ijbs.25589.
[25] NI J, HONG XD, JI K, et al. Influence of hepatitis B combined with hepatic fibrosis on endogenous and exogenous metabolism and therapeutic implications[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2024, 29(8): 853-860. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2024.08.002.
倪姐, 洪小丹, 计可, 等. 乙肝合并肝纤维化对内外源性代谢的影响及治疗学启示[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29(8): 853-860. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2024.08.002.
[26] SUGIMOTO A, SAITO Y, WANG GX, et al. Hepatic stellate cells control liver zonation, size and functions *via* R-spondin 3[J]. Nature, 2025, 640(8059): 752-761. DOI: 10.1038/s41586-025-08677-w.

收稿日期：2025-08-24；**录用日期：**2025-11-21
本文编辑：林姣

引证本文： ZHU WC, QIU JH, CUI Y, et al. Effect of astragaloside IV on a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and its mechanism [J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(3): 608-617.
朱宛春, 邱嘉昊, 崔钰, 等. 黄芪甲苷Ⅳ对四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠模型的影响及其作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(3): 608-617.