·肝纤维化及肝硬化·

DOI：10.12449/JCH260513

黄芪皂苷Ⅰ和毛蕊异黄酮在胆汁淤积性肝纤维化小鼠模型中的调控作用分析

姜小钰[1,2]，刘　伟[1,2,3]，陈佳美[1,2]，刘　平[1,2,4]，李春晖[1,2]

1 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所，上海 201203

2 肝肾疾病病证教育部重点实验室/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学部/国家中医药管理局中药制剂三级实验室，上海 201203

4 上海中医药大学交叉科学研究院/上海市中医药化学生物学前沿基地，上海 201203

通信作者：刘平，liuliver@vip.sina.com（ORCID：0000-0002-6152-4508）；李春晖，lchtcm@163.com（ORCID：0009-0002-0534-3101）

摘要：目的　筛选黄芪皂苷Ⅰ（ASⅠ）与毛蕊异黄酮（CY）抗胆汁淤积性肝纤维化最佳配伍剂量并进行验证。**方法**　采用3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢-2,4,6-三甲基吡啶（DDC）饮食诱导建立小鼠肝纤维化模型，以黄芪中皂苷成分ASⅠ和黄酮类成分CY为研究对象，运用均匀设计法筛选最佳配比；均匀设计实验选用80只C57/BL6J雄性小鼠，按随机数字表法分为Ctrl组（正常组，n=8）、DDC组（模型组，n=8）、TAS组（n=8）、均匀设计（JY）A～F组（每组n=8）、OCA组（n=8）；经多元回归分析，建立最优回归方程，获得潜在最佳剂量配比。进一步比较均匀设计实验中药效最优组及多元回归方程拟合的最佳剂量组药效，完成体内药效验证实验。计量资料多组间比较采用单因素方差分析，方差齐性检验采用Levene检验，若方差齐，采用LSD-t检验进行两两比较；若方差不齐，采用Dunnett T3检验。**结果**　在均匀设计方案中，JYB组（3.125 mg/kg ASⅠ与50 mg/kg CY）可显著降低DDC诱导的胆汁淤积性肝纤维化小鼠血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、碱性磷酸酶（ALP）、总胆汁酸（TBA）、总胆红素（TBil）和间接胆红素（IBil）水平（P值均<0.05），并可降低肝组织羟脯氨酸（Hyp）含量（P<0.01）、胶原面积半定量值（P<0.001）以及平滑肌肌动蛋白α-2基因（Acta2）、Ⅰ型胶原蛋白α1链（Col1a1）、细胞角蛋白7（Ck7）、细胞角蛋白19（Ck19）、表皮生长因子样激素受体1（Adgre1）、Toll样受体4（TLR4）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、趋化因子配体5（CCL5）的mRNA表达水平（P值均<0.05）。回归方程提示，50 mg/kg ASⅠ与50 mg/kg CY是潜在最佳配伍（即配伍P1组）。验证实验表明，配伍P1组仅对DDC小鼠血清AST、IBil水平及肝组织Hyp含量有显著改善（P值均<0.05），对肝组织胶原沉积、Acta2、Ck7、Ck19、Adgre1、CCL5的mRNA表达水平无显著影响（P值均>0.05）；而JYB组对小鼠血清ALP、ALT、AST、TBA、TBil、IBil水平，肝组织胶原沉积及Hyp含量，Acta2、Col1a1、Ck7、Ck19、Adgre1、TLR4、TNF-α、CCL5的mRNA表达水平均有显著改善（P值均<0.05）。**结论**　3.125 mg/kg ASⅠ与50 mg/kg CY组合可显著改善DDC小鼠肝纤维化，疗效与黄芪总皂苷相当，且在改善血清ALP、TBA水平方面较ASⅠ和CY单独给药有更显著的调控作用。

关键词：胆汁淤积；肝纤维化；黄芪皂苷；毛蕊异黄酮；小鼠，近交C57BL

基金项目：上海市科委科技启明星项目（24QA2709200）；上海市东方英才计划青年项目（QNWS2024054）；上海市“科技创新行动计划”自然科学基金项目（24ZR1467100，25ZR1401335）；重大疑难疾病中西医临床协作项目（ZDYN-2024-A-075）；上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划项目[ZY（2025-2027）-3-1-1]

Regulatory effect of astragaloside Ⅰ and calycosin on a mouse model of cholestatic liver fibrosis

JIANG Xiaoyu[1,2], *LIU Wei*[1,2,3], *CHEN Jiamei*[1,2], *LIU Ping*[1,2,4], *LI Chunhui*[1,2]

1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases Ministry of Education/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/Grade 3 Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 4. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine/Shanghai Frontier Science Center of TCM Chemical Biology, Shanghai 201203, China

Corresponding authors: LIU Ping, liuliver@vip.sina.com (ORCID: 0000-0002-6152-4508); LI Chunhui, lchtcm@163.com (ORCID: 0009-0002-0534-3101)

Abstract: Objective To identify and validate the optimal compatibility dosage of astragaloside Ⅰ (ASⅠ) and calycosin (CY) in the treatment of cholestatic liver fibrosis. **Methods** A 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine (DDC) diet was used to establish a mouse model of liver fibrosis, and the uniform design method was used to identify the optimal combination ratio of the saponin component ASⅠ and the flavonoid component CY in *Astragalus membranaceus*. In the uniform design experiment, 80 male C57/BL6J mice were divided into normal group, model group, total astragalosides (TAS) group, groups A — F with a uniform design, and obeticholic acid (OCA) group using a random number table, with 8 mice in each group. The multiple regression analysis was used to establish the optimal regression equation and obtain the potential optimal combination ratio. The *in vivo* efficacy of the empirically optimal combination identified in the uniform design and the optimal dose combination predicted by the regression equation were compared for validation. A one-way analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups; the Levene test was used to determine the homogeneity of variance, and the least significant difference *t*-test was used for comparison of data with homogeneity of variance between two groups, while the Dunnett T3 test was used for comparison of data with heterogeneity of variance. **Results** In the uniform design regimen, the JYB combination (3.125 mg/kg ASI+50 mg/kg CY) significantly reduced the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bile acid (TBA), total bilirubin (TBil), and indirect bilirubin (IBil) in mice with DDC-induced cholestatic liver fibrosis (all $P<0.05$), and it also reduced hepatic Hyp content ($P<0.01$), semi-quantified collagen deposition area ($P<0.001$), and the mRNA expression levels of Acta2, Col1a1, Ck7, Ck19, Adgre1, TLR4, TNF-α, and CCL5 in liver tissue (all $P<0.05$). The regression equation showed that 50 mg/kg ASⅠ+50 mg/kg CY was the potential optimal combination, which was named as P1 combination. However, subsequent validation experiments showed that P1 combination only significantly improved the serum levels of AST and IBil and hepatic Hyp content in DDC mice (all $P<0.05$), with no significant impact on hepatic collagen deposition and the mRNA expression levels of Acta2, Ck7, Ck19, Adgre1, and CCL5 (all $P>0.05$). In contrast, the JYB combination significantly improved the serum levels of ALP, ALT, AST, TBA, TBil, and IBil, hepatic collagen deposition, hepatic Hyp content, and the mRNA expression levels of Acta2, Col1a1, Ck7, Ck19, Adgre1, TLR4, TNF-α, and CCL5 (all $P<0.05$). **Conclusion** This study shows that the JYB combination (3.125 mg/kg ASⅠ+50 mg/kg CY) can significantly alleviate DDC-induced liver fibrosis, with comparable efficacy to total saponins from *Astragalus membranaceus*, and compared with ASⅠ or CY administered alone, the JYB combination has a significantly better regulatory effect on the serum levels of ALP and TBA.

Key words: Cholestasis; Hepatic Fibrosis; Astragaloside; Calycosin; Mice, Inbred C57BL

Research funding: Shanghai Science and Technology Committee Rising-Star Program (24QA2709200); Shanghai Oriental Talent Program Youth Project (QNWS2024054); Shanghai Natural Science Foundation (24ZR1467100, 25ZR1401335); Major and Difficult Diseases Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Clinical Collaboration Project (ZDYN-2024-A-075); Shanghai Three-Year Action Plan for Further Accelerating the Inheritance, Innovation and Development of Traditional Chinese Medicine [ZY(2025-2027)-3-1-1]

胆汁淤积是一种因胆汁生成或排泄受阻,无法正常流入十二指肠而反流入血引起的病理状态。持续胆汁淤积可引发慢性肝内炎症,导致胆管与肝细胞损伤,并逐步进展为肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌[1]。目前,熊去氧胆酸和奥贝胆酸(obeticholic acid,OCA)是临床治疗胆汁淤积性肝病的一线药物,但仍有约40%的原发性胆汁性胆管炎患者对熊去氧胆酸应答不佳[2],其他病因所致的胆汁淤积性肝纤维化(cholestatic liver fibrosis,CLF)尚无明确有效的治疗药物。因此,开发直接有效的抗纤维化疗法仍是临床亟待解决的课题。

中医药多途径、多靶点综合治疗的特点,与该病复杂的发病机制相契合。本课题组前期研究表明,黄芪汤

能够显著改善肝硬化患者的肝组织炎症、坏死[3]，黄芪总皂苷（total astragalus saponins，TAS）被证实能在多种CLF动物模型中减轻胆管反应，抑制纤维化进展，是黄芪汤发挥抗CLF作用的核心药效部位[4]，但其具体效应成分尚未明确。前期成分分析显示，本课题组制备的TAS以皂苷类成分为主，并含有一定量的黄酮类成分，药效比较发现黄芪皂苷Ⅰ（astragaloside Ⅰ，ASⅠ）抗CLF效应与TAS相当，是皂苷类成分中药效最佳的单体皂苷[5]。肠道菌群体外孵育实验进一步筛选出黄酮类成分毛蕊异黄酮（calycosin，CY），该成分能够显著促进ASⅠ代谢为药效活性成分环黄芪醇。为阐明TAS药效优于单一成分的机制，本研究将通过均匀设计筛选出ASⅠ与CY的最佳配伍剂量并进行验证，以期为组分中药的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 药品与试剂 3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢-2,4,6-三甲基吡啶（3,5-diethoxycarbonyl-1,4- dihydrocollidine，DDC）（货号：137030）购自默克医药生物科技公司，并由无锡帆泊生物技术有限公司定制为含0.1% DDC的小鼠饲料；ASⅠ（货号：AB0164）、CY（货号：AB1328）均购自成都埃法生物科技有限公司；OCA（货号：MB6084）购自大连美仑生物技术有限公司；羧甲基纤维素钠（货号：S14016）购自上海源叶生物科技有限公司；羟脯氨酸（hydroxyproline，Hyp）试剂盒（碱水法）（货号：A030-2-1）、无毒环保苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染液（货号：D006-1-3）购自南京建成生物工程研究所；天狼星红（sirius red，SR）染液购自上海中医药大学肝病研究所；中性树胶（货号：10004160）购自国药集团化学试剂有限公司；TAS由课题组自制[5]。

1.1.2 主要仪器 石蜡包埋机（型号：ASP300，德国Leica公司），轮转切片机（型号：EG1160，德国Leica公司），全自动脱水机（型号：RM2035，德国Leica公司），病理烤片机（型号：HI1220，德国Leica公司），离心机（型号：MICRO21R，美国Thermo Fisher公司），多功能酶标仪（型号：AF100，上海天能科技有限公司）。

1.2 动物实验

1.2.1 实验动物 无特定病原体（specific pathogen free，SPF）级C57BL/6J雄性小鼠144只，体重22～24 g，购自上海斯莱克实验动物有限公司，实验动物生产许可证编号：SCXK（沪）2021-0006，实验动物使用许可证编号：SYXK（沪）2020-0009，饲养于上海中医药大学动物中心，环境温度（25±2）℃，相对湿度40%～60%，自由饮食。

1.2.2 分组及给药 采用均匀设计法对ASⅠ、CY进行分组配伍筛选有效配伍及比例，并对多元回归结果进行验证。均匀设计选用U6*（6^4）表，将ASⅠ、CY作为考察因子，每个因子各取6个剂量水平。根据检索文献中两者体内用量[5-7]，确定ASⅠ剂量范围为0.56～50 mg·kg^{-1}·d^{-1}、CY剂量范围为0.56～50 mg·kg^{-1}·d^{-1}。

均匀设计实验：选用80只C57/BL6J雄性小鼠，自由饮食饲养至22～24 g，按随机数字表法分为正常组（Ctrl组，n=8）、模型组（DDC组，n=8）、TAS组（n=8）、均匀设计6组（JYA～JYF组，每组n=8）、OCA组（n=8）。除Ctrl组给予对照饮食外，其余各组均给予含0.1% DDC的定制饲料，连续造模8周。小鼠造模4周后予以相应药物灌胃：Ctrl组和DDC组予0.3%羧甲基纤维素钠，给药体积为10 mL/kg，连续给药4周；JYA～JYF组具体给药剂量见表1，连续给药4周；TAS组给予TAS 56 mg/kg体重灌胃，给药体积为10 mL/kg，连续给药4周。8周末禁食不禁水12 h后，腹腔注射3%戊巴比妥钠麻醉，经腹主动脉取血并摘取肝脏、脾脏。以肝组织Hyp含量为筛选指标，对均匀设计各组肝组织Hyp含量及血清碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）、丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransaminase，ALT）水平进行逐步回归分析，建立回归方程，得出理论最佳配比P1。

表1 均匀设计实验中每日给药剂量

Table 1 Dosing regimens in uniform design experiment

组别	ASⅠ（mg/kg）	CY（mg/kg）
JYA组	1.560	6.250
JYB组	3.125	50.000
JYC组	6.250	3.125
JYD组	12.500	25.000
JYE组	25.000	1.560
JYF组	50.000	12.500

注：ASⅠ，黄芪皂苷Ⅰ；CY，毛蕊异黄酮。

配伍验证实验：选用64只C57/BL6J雄性小鼠，自由饮食饲养至22～24 g，按随机数字表法分为Ctrl组（n=8）、DDC组（n=8）、TAS组（n=8）、多元回归组（P1组，n=8）、药效最优组（JYB组，n=8）、ASⅠ组（n=8）、CY组（n=8）、OCA组（n=8）。造模方法、给药时间及检测指标与均匀设计实验相同，每日给药剂量见表2，验证并比较回归方程得出的最佳配伍组及药效最佳组对肝纤维化的干预作用。

表2 配伍验证实验中每日给药剂量

Table 2 Dosing regimens in compatibility verification experiment

组别	每日给药剂量
Ctrl组	0.3% 羧甲基纤维素钠（10 mL/kg）
DDC组	0.3% 羧甲基纤维素钠（10 mL/kg）
TAS组	TAS（56 mg/kg）
P1组	ASⅠ（50 mg/kg）+CY（50 mg/kg）
JYB组	ASⅠ（3.125 mg/kg）+CY（50 mg/kg）
ASⅠ组	ASⅠ（50 mg/kg）
CY组	CY（50 mg/kg）
OCA组	OCA（10 mg/kg）

注：TAS，黄芪总皂苷；ASⅠ，黄芪皂苷Ⅰ；CY，毛蕊异黄酮；OCA，奥贝胆酸。

1.2.3 血清学结果测定 腹主动脉取血，4 ℃静置3 h后，在4 ℃、3 500 r/min条件下离心15 min（离心机半径10.1 cm），分离血清。血清样本送至上海中医药大学附属曙光医院检验科，检测血清ALP、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate transaminase，AST）、ALT、总胆汁酸（total bile acid，TBA）、总胆红素（total bilirubin，TBil）和间接胆红素（indirect bilirubin，IBil）水平。

1.2.4 肝脏病理及胶原半定量 HE染色：石蜡切片烤片机溶蜡，并脱蜡至水，苏木素染核，伊红染胞浆，擦拭组织周围残留液体，室温晾干后封片，室温静置48 h后借助KFBIO数字病理扫描仪扫片获取图像。SR染色：烤片溶蜡，脱水，擦拭残余水分，滴加SR染液染色，无水乙醇分化，二甲苯透明后封片，室温静置48 h后借助KFBIO数字病理扫描仪扫片获取图像，并使用Leica SCN400数字病理信息扫描软件计算胶原染色面积比。

1.2.5 肝组织Hyp含量测定 肝组织Hyp含量测定参照试剂盒说明书。精准切取50 mg肝组织，加入1 mL碱水解液，95 ℃水浴20 min（每10 min混匀1次），流水冷却至常温，调pH值至6.0～6.8，加双蒸水定容至10 mL。取4 mL稀释水解液，加入30 mg活性炭混匀，在3 500 r/min条件下离心10 min（离心机半径10.1 cm），取上清液1 mL，先后加入试剂一、二和三并静置，60 ℃水浴15 min。冷却后3 500 r/min条件下离心10 min（离心机半径10.1 cm），取上清液，于550 nm波长下测定吸光度值，计算Hyp含量（μg/mg湿肝）。

1.2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应 Trizol提取肝脏总RNA，测定RNA浓度后统一稀释至500 ng/μL并逆转录为cDNA，体系为20 μL，37 ℃、15 min，85 ℃ 5 s，以GAPDH为内参，每组样品重复3次，采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$计算目的基因的相对表达量。引物序列见表3。

表3 引物序列

Table 3 Primer sequences

基因	引物序列（5′-3′）	引物长度（bp）
Acta2	F：GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	21
	R：TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	21
Col1a1	F：GCTCCTCTTAGGGGCCACT	19
	R：CCACGTCTCACCATTGGGG	19
Ck7	F：TCAGGATGGTAAGCGGATGTT	21
	R：AAGGGCTCCACGTAGGTAATC	21
Ck19	F：GGGGGTTCAGTACGCATTGG	20
	R：GAGGACGAGGTCACGAAGC	19
Adgre1	F：TGACTCACCTTGTGGTCCTAA	21
	R：CTTCCCAGAATCCAGTCTTTCC	22
TLR4	F：AGCTCCTGACCTTGGTCTTG	20
	R：CGCAGGGGAACTCAATGAGG	20
TNF-α	F：GGAACACGTCGTGGGATAATG	21
	R：GGCAGACTTTGGATGCTTCTT	21
CCL5	F：GCTGCTTTGCCTACCTCTCC	20
	R：TCGAGTGACAAACACGACTGC	22

注：Acta2，平滑肌肌动蛋白α-2基因；Col1a1，Ⅰ型胶原蛋白α1链；Ck7，细胞角蛋白7；Ck19，细胞角蛋白19；Adgre1，表皮生长因子样激素受体1；TLR4，Toll样受体4；TNF-α，肿瘤坏死因子α；CCL5，趋化因子配体5。

1.3 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件分析数据，借助Graphpad Prism 9.5制作统计图表。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，方差齐性检验采用Levene检验，若方差齐，采用LSD-t检验进行两两比较；若方差不齐，采用Dunnett T3检验。采用多元回归分析，分别以Hyp、ALP、ALT为因变量，以ASⅠ、CY为自变量，并进行共线性诊断与Durbin-Watson检验，建立最优回归方程，获得潜在最佳剂量配比。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 均匀设计实验结果

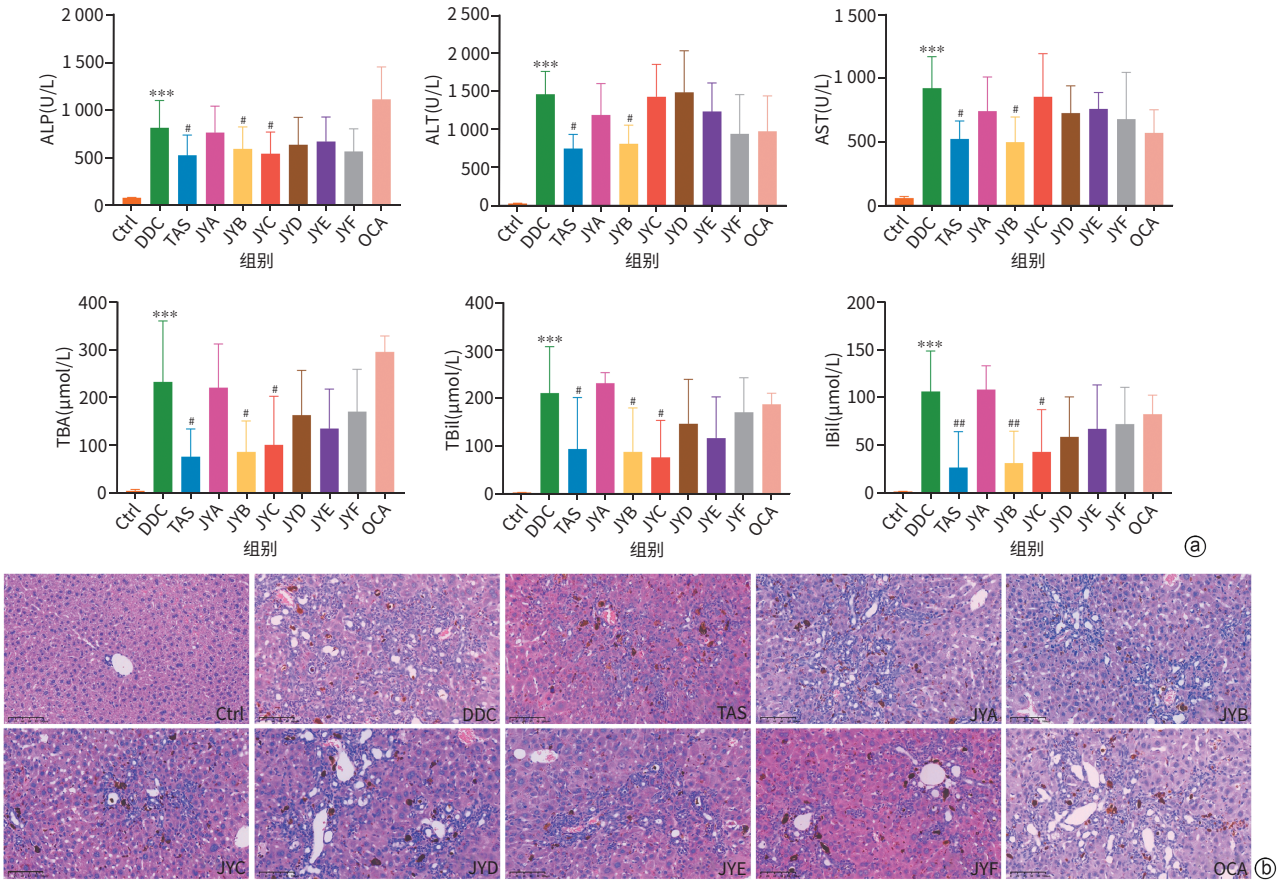
2.1.1 均匀设计实验各组小鼠血清学指标及肝损伤情况 血清学结果显示（图1），与Ctrl组相比，DDC组小鼠血清ALT、AST、ALP、TBA、TBil和IBil水平均显著升高（P值均<0.001）；与DDC组相比，JYB、JYC组血清ALP、TBA、TBil和IBil水平均显著下调（P值均<0.05），JYB组ALT、AST水平亦显著下调（P值均<0.05）；TAS可显著降低DDC小鼠血清ALT、AST、ALP、TBA、TBil、IBil水平（P值均<0.05）。肝组织HE病理染色结果显示（图1），Ctrl组小鼠肝组织小叶结构清晰，汇管区及中央静脉无扩大，未见炎性细胞浸润；DDC组小鼠肝组织结构紊乱，可

见广泛的卟啉沉积，大量胆管上皮细胞异常增生，炎性细胞浸润；各用药组均较DDC组有不同程度减轻。

2.1.2 均匀设计实验各组小鼠肝组织胶原沉积情况 SR染色结果显示，DDC组可见汇管区胶原纤维大量沉积，纤维间隔明显，阳性着色较深。各用药组胶原沉积较DDC组均有不同程度减轻（图2a），胶原阳性面积减少（P值均<0.05）（图2b）。Hyp检测结果显示，与Ctrl组相比，DDC组Hyp含量显著升高（P<0.001）；与DDC组相比，TAS组、JYB组、JYC组、JYD组和JYE组Hyp含量显著降低（P值均<0.05）（图2c）。

2.1.3 均匀设计实验各组小鼠肝组织纤维化及炎症标志物的比较 与Ctrl组相比，DDC组小鼠肝组织平滑肌肌动蛋白α-2（smooth muscle actin alpha 2，Acta2）、Ⅰ型胶原蛋白α1链（collagen type Ⅰ α1 chain，Col1a1）、细胞角蛋白7（cytokeratin 7，Ck7）、细胞角蛋白19（cytokeratin 19，Ck19）、黏附性G蛋白偶联受体E1（又称表皮生长因子样激素受体1）（adhesion G protein-coupled receptor E1，Adgre1）、Toll样受体4（Toll-like receptor 4，TLR4）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和趋化因子配体5（C-C motif chemokine ligand 5，CCL5）的mRNA表达水平均显著上调（P值均<0.001）。与DDC组相比，TAS组及均匀设计各组肝纤维化相关基因Acta2、Col1a1及胆管反应相关基因Ck7的mRNA表达均显著下调（P值均<0.05）；各治疗组对炎症相关基因的表达影响不同，其中TAS组、JYB组和JYD组胆管反应相关基因Ck19的mRNA表达显著下调（P值均<0.05），并且肝脏炎症相关基因Adgre1、TLR4和CCL5的mRNA表达显著降低（P值均<0.05）；TAS组、JYB组TNF-α的mRNA表达亦显著下调（P值均<0.01）（图3）。

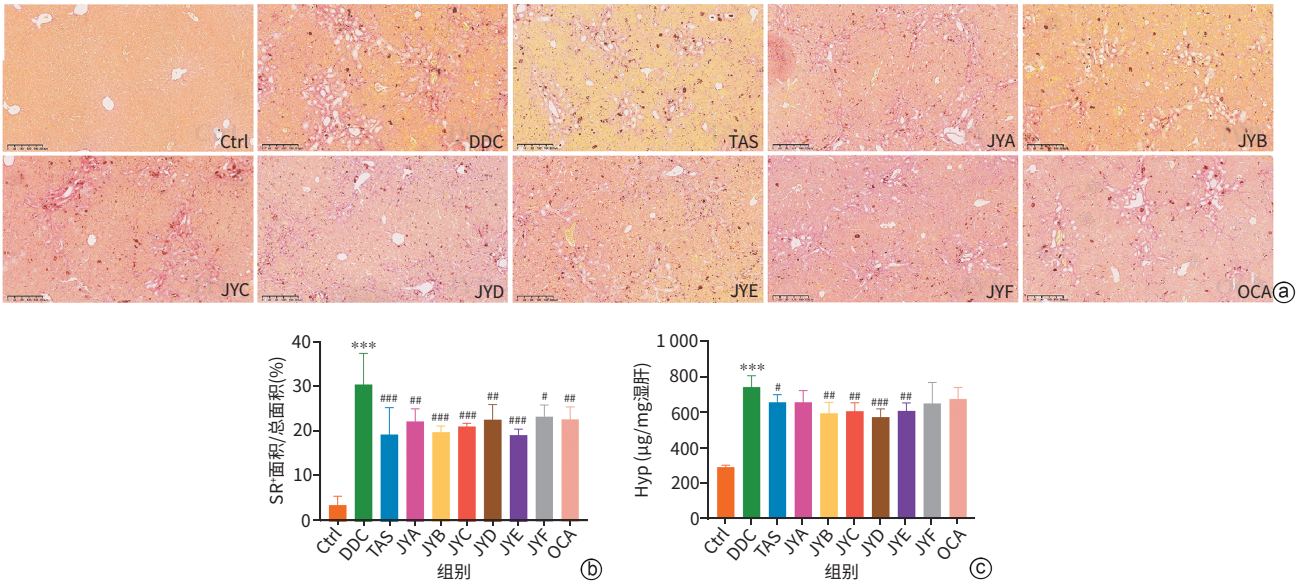
2.1.4 均匀设计方程筛选 对均匀设计各组小鼠肝组织Hyp含量以及血清ALP、ALT水平进行多元回归分析，得到以下回归方程：Hyp=635.63+0.618×ASⅠ+0.081×CY−0.043×ASⅠ×CY；ALP=675.98−0.363×ASⅠ−1.749×CY−0.007×ASⅠ×CY；ALT=1143.76+3.737×ASⅠ+



注：a，各组小鼠血清肝功能指标；b，各组小鼠肝组织病理HE染色（×200）。与Ctrl组相比，***P<0.001；与DDC组相比，#P<0.05，##P<0.01。DDC，3，5-二乙氧基羰基-1，4-二氢-2，4，6-三甲基吡啶；TAS，黄芪总皂苷；OCA，奥贝胆酸；HE，苏木素-伊红。

图1 均匀设计各组小鼠血清肝功能及肝组织病理HE染色

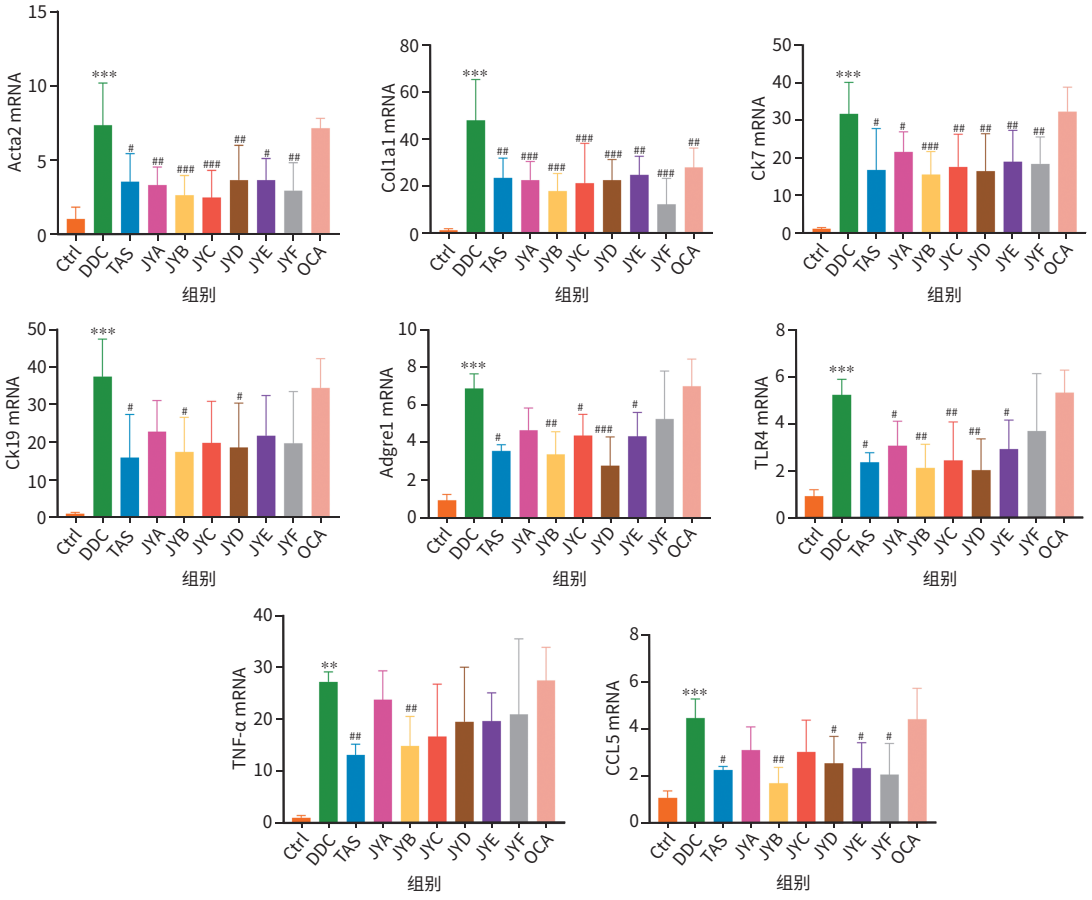
Figure 1 Serum liver function and HE staining in mice from uniform design groups



注：a，肝组织病理SR染色（×100）；b，SR染色面积半定量；c，肝组织Hyp含量。与Ctrl组相比，***P<0.001；与DDC组相比，#P<0.05，##P<0.01，###P<0.001。DDC，3，5-二乙氧基羰基-1，4-二氢-2，4，6-三甲基吡啶；TAS，黄芪总皂苷；OCA，奥贝胆酸；SR，天狼星红；Hyp，羟脯氨酸。

图2　均匀设计各组小鼠肝组织SR染色及Hyp含量测定

Figure 2　Hepatic sirius red staining and hydroxyproline content assay in uniform design groups of mice



注：与Ctrl组相比，**P<0.01，***P<0.001；与DDC组相比，#P<0.05，##P<0.01，###P<0.001。DDC，3，5-二乙氧基羰基-1，4-二氢-2，4，6-三甲基吡啶；TAS，黄芪总皂苷；OCA，奥贝胆酸。

图3　均匀设计各组小鼠肝组织纤维化及炎症相关基因mRNA相对表达水平

Figure 3　Expression levels of hepatic fibrosis and inflammation-related genes in uniform design groups of mice

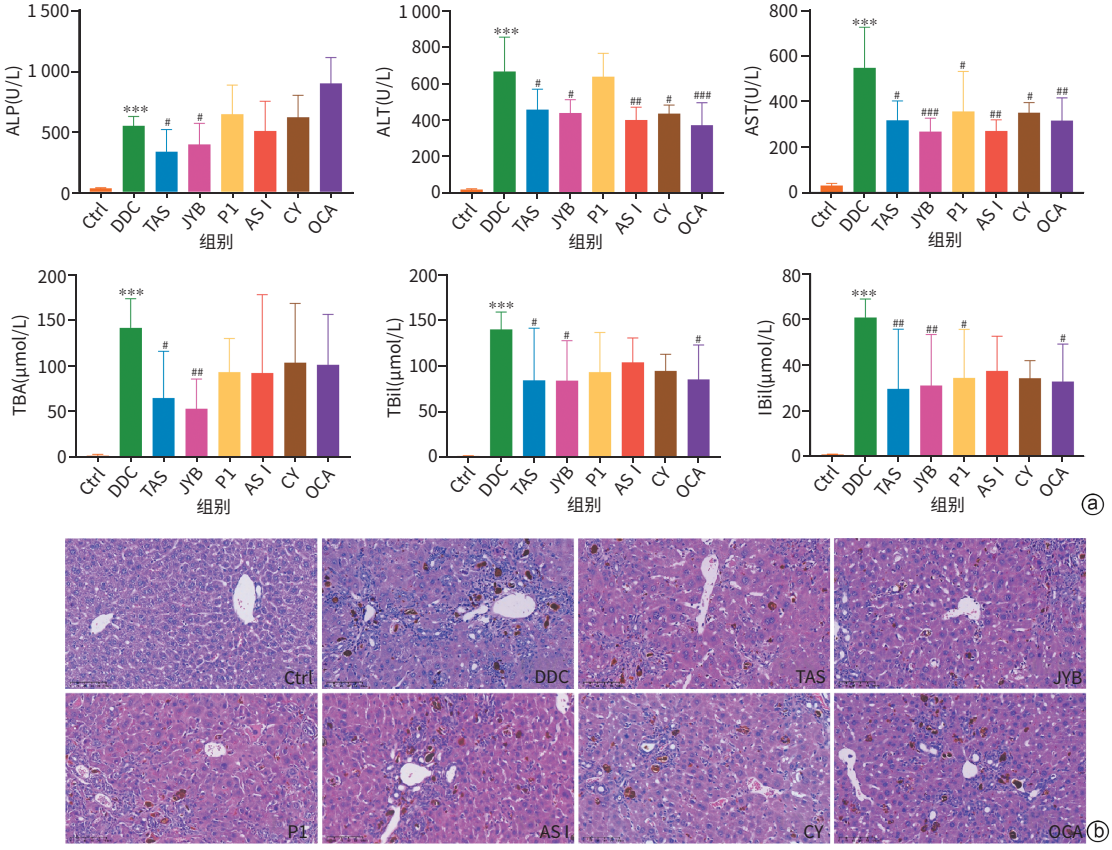
4.673×CY−0.183×ASⅠ×CY。其中，ASⅠ在反映胶原沉积的经典指标Hyp及反映肝细胞损伤的ALT方程中均呈正相关，在剂量范围内越小越好，在反映胆汁淤积的敏感指标ALP方程中呈负相关，在剂量范围内越大越好；ASⅠ与CY的交互项为负相关，两者在剂量范围内越大越好。综合分析提示，ASⅠ（50 mg/kg）+CY（50 mg/kg）为最优剂量配比。

2.2 均匀设计的验证结果

2.2.1 配伍验证实验各组小鼠血清学指标及肝损伤情况 与Ctrl组相比，DDC组小鼠血清ALT、AST、ALP、TBA、TBil和IBil水平均显著升高（*P*值均<0.001）；与DDC组相比，TAS组、JYB组、ASⅠ组、CY组和OCA组能显著降低小鼠血清ALT、AST水平（*P*值均<0.05），TAS组、JYB组能显著降低血清ALP、TBA、TBil和IBil水平（*P*值均<0.05），而P1组仅能下调DDC小鼠血清AST、IBil水平（*P*值均<0.05）（图4）。HE病理染色结果显示，Ctrl组肝小叶结构清晰，肝板排列整齐，汇管区无扩大，无炎症细胞浸润；DDC组小鼠肝组织出现卟啉沉积，大量胆管上皮细胞异常增生，炎性细胞浸润；用药组较DDC组有不同程度改善（图4）。

2.2.2 配伍验证实验各组小鼠的肝组织胶原沉积 SR染色结果显示，DDC组汇管区胶原纤维大量沉积，纤维间隔明显，阳性着色较深；各用药组胶原沉积较DDC组均有不同程度减轻（图5a）。与Ctrl组相比，DDC组胶原沉积显著增加（*P*<0.001）；与DDC组相比，TAS组、JYB组、ASⅠ组、CY组胶原沉积显著降低（*P*值均<0.05）（图5b）。Hyp检测结果显示，与Ctrl组相比，DDC组Hyp含量显著升高（*P*<0.001）；与DDC组相比，TAS、JYB、P1组、ASⅠ、CY组和OCA组Hyp含量显著降低（*P*值均<0.05）（图5c）。

2.2.3 配伍验证各组小鼠肝组织纤维化及炎症标志物的比较 与Ctrl组相比，DDC组小鼠肝组织Acta2、Col1a1、Ck7、Ck19、Adgre1、TLR4、TNF-α和CCL5的mRNA表达水平均显著上调（*P*值均<0.001）；与DDC组相比，TAS及JYB组能显著下调上述mRNA表达（*P*值均<0.05），P1组仅能下调Col1a1、TLR4和TNF-α的mRNA



注：a，各组小鼠血清肝功能指标；b，各组小鼠肝组织病理HE染色（×200）。与Ctrl组相比，***P<0.001；与DDC组相比，#P<0.05，##P<0.01，###P<0.001。DDC，3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢-2,4,6-三甲基吡啶；TAS，黄芪总皂苷；OCA，奥贝胆酸；HE，苏木素-伊红。

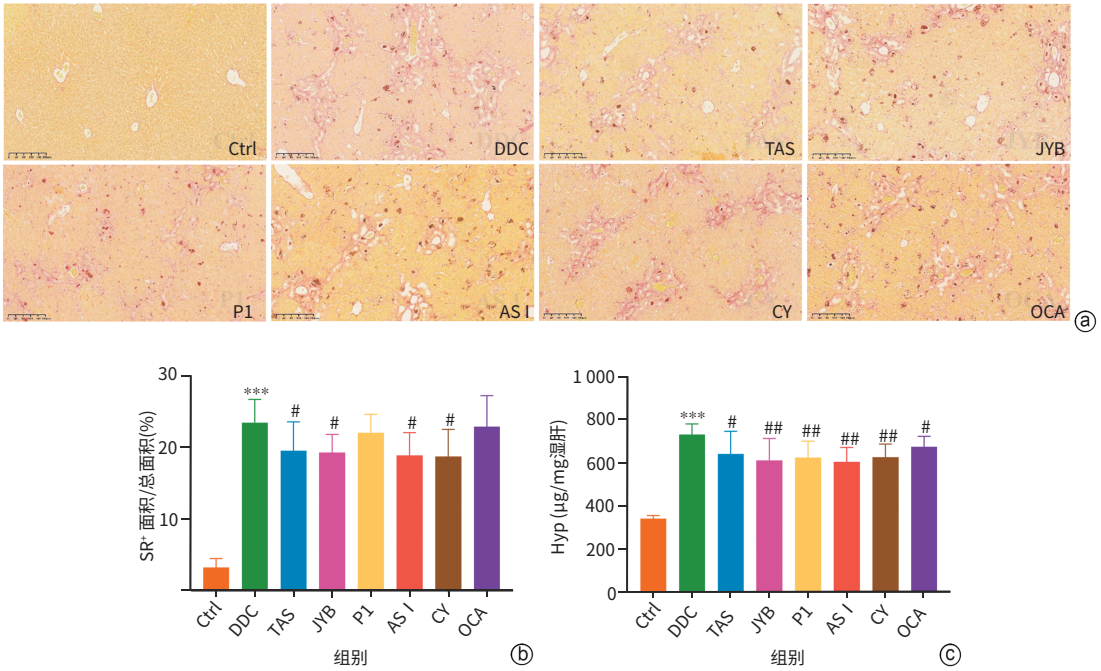
图4 配伍验证各组小鼠血清肝功能及肝组织病理HE染色

Figure 4 Serum liver function and HE staining in mice from combination verification groups

表达（*P*值均<0.01），AS Ⅰ组能显著下调肝纤维化相关基因Acta2、Col1a1及胆管反应相关基因Ck7、Ck19的mRNA表达（*P*值均<0.05），CY组可显著下调肝纤维化相关基因Col1a1、胆管反应相关基因Ck7和炎症相关基因Adgre1、TLR4、TNF-α和CCL5的mRNA表达（*P*值均<0.05）（图6）。

3　讨论

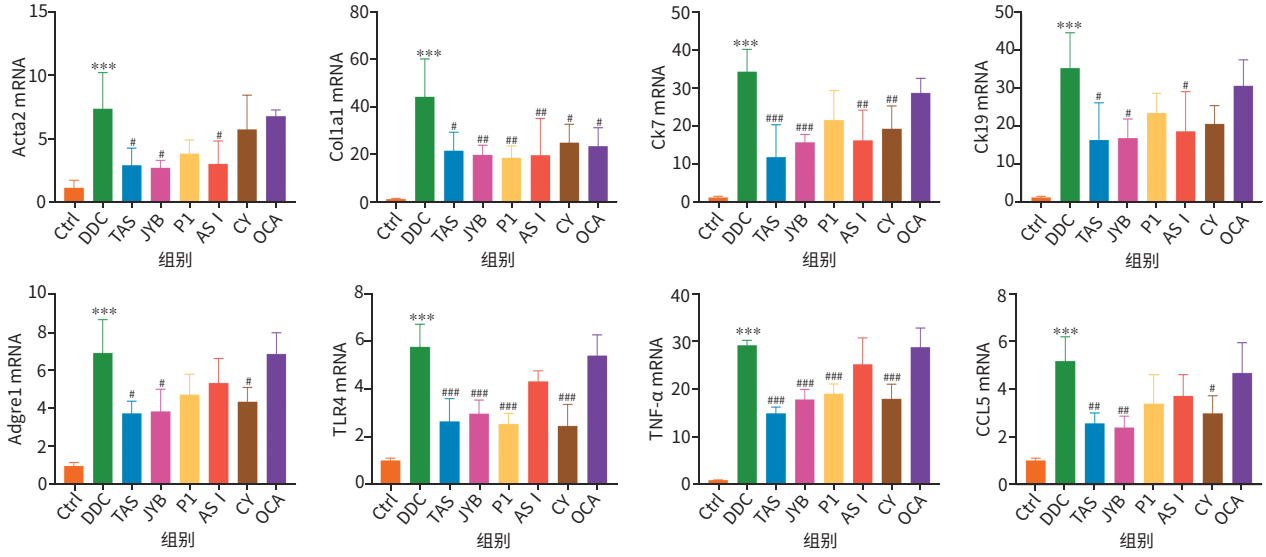
在中医理论体系中，虽无“胆汁淤积性肝纤维化”的病名，但根据其核心症状，可将其归入“黄疸”“胁痛”等范畴，其核心病机多责之于湿热内蕴、气滞血瘀，日久导致正气亏虚[8]。基于此“正虚血瘀”的核心病机，益气补



注：a，肝组织病理SR染色（×100）；b，SR染色面积半定量；c，肝组织Hyp含量。与Ctrl组相比，***P<0.01；与DDC组相比，#P<0.05，##P<0.01。DDC，3，5-二乙氧基羰基-1，4-二氢-2，4，6-三甲基吡啶；TAS，黄芪总皂苷；OCA，奥贝胆酸；SR，天狼星红；Hyp，羟脯氨酸。

图5　配伍验证各组小鼠肝组织SR染色及Hyp含量测定

Figure 5　Hepatic sirius red staining and hydroxyproline content assay in combination verification groups of mice



注：与Ctrl组相比，**P<0.01，***P<0.001；与DDC组相比，#P<0.05，##P<0.01，###P<0.001。DDC，3，5-二乙氧基羰基-1，4-二氢-2，4，6-三甲基吡啶；TAS，黄芪总皂苷；OCA，奥贝胆酸。

图6　配伍验证各组小鼠肝组织纤维化及炎症相关基因mRNA相对表达水平

Figure 6　Expression levels of hepatic fibrosis and inflammation-related genes in combination verification groups of mice

虚、活血祛瘀的黄芪汤成为治疗该病的有效方剂。黄芪为本方君药，药量占比较高（黄芪∶甘草=6∶1）。实验研究证实，黄芪汤能够通过抑制肝星状细胞向肌成纤维细胞转分化[9]、抑制肝祖细胞向胆管细胞分化[10-11]和改善胆汁酸代谢紊乱[12]等多途径发挥抗肝纤维化作用。

皂苷类成分被认为是黄芪干预多种脏器纤维化的重要活性成分[13]。本课题组在验证了TAS抗CLF药效的基础上，对TAS中的主要单体皂苷成分的药效进行了比较，结果表明，在多种黄芪皂苷中，ASⅠ表现出最强的抗肝纤维化活性；药代动力学实验表明，ASⅠ引起的药效活性成分环黄芪醇的暴露量最高[14]，同时，ASⅠ也是黄芪原药材及TAS提取物中含量最高的皂苷成分，是TAS发挥抗纤维化效应的主要皂苷类成分。

本研究采用均匀设计法探索了ASⅠ与CY在DDC诱导的肝纤维化模型中的最佳配伍，为全面评估其对CLF的治疗作用，分别选取了量化胶原沉积的肝组织Hyp含量[15]、反映胆管损伤的ALP[16]和反映肝细胞损伤的ALT[17]作为均匀设计的药效筛选指标。血清ALP和TBil、肝组织Hyp含量及病理染色结果表明，不同剂量的ASⅠ与CY配伍能在不同程度上改善肝细胞损伤和胶原沉积，这与TAS的抗肝纤维化药效作用一致，提示ASⅠ与CY配伍能够发挥与TAS相似的药效作用。在均匀设计各组中，JYB组（3.125 mg/kg ASⅠ与50 mg/kg CY）在DDC诱导的小鼠CLF模型中均表现出显著降低血清ALP、ALT、AST、TBA、TBil和IBil水平及降低肝组织胶原沉积的作用，是均匀设计筛选出的药效最佳组。而通过构建多元回归方程发现，P1配方（50 mg/kg ASⅠ与50 mg/kg CY）可能是改善DDC小鼠肝组织Hyp含量及血清ALP、ALT水平的“最佳配伍”。但进一步对“最佳配伍”的验证实验发现，其对DDC小鼠血清ALP、ALT及SR染色胶原面积半定量并无显著改善作用，尚不如ASⅠ（50 mg/kg）、CY（50 mg/kg）单用组，实际药效与预测药效不符。这表明高剂量下，ASⅠ与CY可能存在不利的药代动力学相互作用，其药效活性成分在体内的浓度-时间曲线不再呈简单的线性关系，这是中药复方的一大特点，需要更精确的药代动力学实验进行进一步研究。验证实验再次证实，JYB配伍组对DDC小鼠的肝损伤（ALT、AST）、胆管反应（ALP）及胆汁淤积（TBA、TBil和IBil）均表现出全面的改善作用。相比之下，ASⅠ、CY单用仅能部分缓解肝细胞损伤（ALT、AST），而对胆汁代谢关键指标无显著影响。这一结果充分证实了JYB组分配伍的优效性，提示其通过多靶点、多环节的整合调控，实现了对CLF更全面的治疗作用。综合前期对TAS的成分分析结果[5]，TAS中CY含量高于ASⅠ，提示ASⅠ与CY配伍使用时，ASⅠ剂量不宜过高，也反映均匀设计所得的回归模型有一定的局限性。

既往研究表明，黄芪皂苷类成分具有广泛的抗纤维化作用[18-20]，但对TAS组分配伍的研究尚不深入。ASⅠ是黄芪的主要活性成分之一，已被证明能够抑制肝星状细胞向肌成纤维细胞转化、减少体内胶原沉积与Hyp含量，对肝纤维化具有治疗作用[21]。另一方面，肝纤维化进程与持续性炎症反应密切相关，而黄芪黄酮类成分被证实可通过减轻肝脏炎症反应[22]，抑制纤维化相关基因的表达，改善大鼠肝纤维化[23]。这与不同剂量ASⅠ与CY配伍协同抑制Adgre1、TLR4、TNF-α和CCL5等关键炎症因子表达，从而增强其抗炎与抗纤维化效应相吻合，也是TAS抗纤维化效应优于单成分的效应基础。此外，ASⅠ作为一种前体药物，需经肠道菌群的糖苷酶水解，转化为其活性代谢产物环黄芪醇，方能充分发挥药效[24]。而黄芪黄酮类成分能够影响肠菌结构及糖苷酶活性，CY与ASⅠ配伍是否能通过调节肠道菌群的代谢酶活性，促进ASⅠ的代谢转化，从而增强药效，是一个值得进一步探索的方向。

综上所述，ASⅠ（3.125 mg/kg）+CY（50 mg/kg）组合可显著改善DDC诱导的小鼠CLF，其疗效与TAS相当，且在改善血清ALP、TBA水平方面较ASⅠ和CY单独给药有更显著的调控作用。

伦理学申明：本研究于2024年9月6日经由上海中医药大学实验动物伦理委员会批准，批号：PZSHUTCM2409060002。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：姜小钰和李春晖负责动物实验操作，数据统计分析及撰写论文；刘伟、陈佳美和刘平负责课题设计，指导撰写文章并最后定稿。

参考文献：

[1] CHEN RL, MA X. Pathogenesis of cholestasis-induced liver fibrosis and thoughts for blockade[J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(2): 247-251. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2019.02.002.
陈瑞玲，马雄．胆汁淤积导致肝纤维化的机制及其阻断策略[J]．临床肝胆病杂志，2019，35(2)：247-251. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2019.02.002.

[2] TRAUNER M, FUCHS CD. Novel therapeutic targets for cholestatic and fatty liver disease[J]. Gut, 2022, 71(1): 194-209. DOI: 10.1136/gutjnl-2021-324305.

[3] JANSEN PLM, GHALLAB A, VARTAK N, et al. The ascending pathophysiology of cholestatic liver disease[J]. Hepatology, 2017, 65

(2): 722-738. DOI: 10.1002/hep.28965.
[4] ZHANG LZ, SHI JW, SHEN Q, et al. Astragalus saponins protect against extrahepatic and intrahepatic cholestatic liver fibrosis models by activation of farnesoid X receptor[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt A): 116833. DOI: 10.1016/j.jep.2023.116833.
[5] ZHANG LZ, HU YH, QI SL, et al. Astragalus saponins and its main constituents ameliorate ductular reaction and liver fibrosis in a mouse model of DDC-induced cholestatic liver disease[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 965914. DOI: 10.3389/fphar.2022.965914.
[6] GUO T, LIU ZL, ZHAO Q, et al. A combination of astragaloside I, levistilide A and calycosin exerts anti-liver fibrosis effects *in vitro* and *in vivo*[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(9): 1483-1492. DOI: 10.1038/aps.2017.175.
[7] DUAN XP, MENG Q, WANG CY, et al. Effects of calycosin against high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(2): 533-542. DOI: 10.1111/jgh.13884.
[8] YI W. Clinical and experimental study of Lidan mixture against oxidative stress in the treatment of cholestatic liver fibrosis[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2022. DOI: 10.27134/d.cnki.ghbzc.2022.000006.
易巍. 利胆合剂拮抗氧化应激治疗胆汁淤积性肝纤维化的临床及实验研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022. DOI: 10.27134/d.cnki.ghbzc.2022.000006.
[9] BANALES JM, HUEBERT RC, KARLSEN T, et al. Cholangiocyte pathobiology[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(5): 269-281. DOI: 10.1038/s41575-019-0125-y.
[10] HOHENESTER S, de BUY WENNIGER LM, PAULUSMA CC, et al. A biliary HCO_3^- umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes[J]. Hepatology, 2012, 55(1): 173-183. DOI: 10.1002/hep.24691.
[11] QIU JN, YAN JY, LIU W, et al. Metabolomics analysis delineates the therapeutic effects of Huangqi decoction and astragalosides on α-naphthylisothiocyanate (ANIT)-induced cholestasis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113658. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113658.
[12] KENNEDY L, CARPINO G, OWEN T, et al. Secretin alleviates biliary and liver injury during late-stage primary biliary cholangitis via restoration of secretory processes[J]. J Hepatol, 2023, 78(1): 99-113. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.07.034.
[13] WANG JJ, XIANG SX, XIE ZS, et al. Research progress on antifibrotic effect and molecular mechanisms of chemical components from astragali Radix[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2023, 34(12): 1799-1805. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2023.12.018.
王佳俊, 向世鏸, 谢治深, 等. 黄芪化学成分抗纤维化作用及分子机制研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(12): 1799-1805. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2023.12.018.
[14] LIU W, LI CH, ZHANG LZ, et al. Analysis of rationality of quality control for astragaloside I based on pharmacokinetic characteristics of Astragalus saponins[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2026, 60(1): 73-81. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250513006.
刘伟, 李春晖, 张霖璋, 等. 基于黄芪皂苷类成分药代动力学特征解析黄芪皂苷Ⅰ的质控合理性[J]. 上海中医药杂志, 2026, 60(1): 73-81. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250513006.
[15] YU Q, KODA S, XU N, et al. CsHscB derived from a liver fluke Clonorchis sinensis ameliorates cholestatic hepatic fibrosis in a mouse model of sclerosing cholangitis[J]. Curr Mol Med, 2024, 24(4): 505-515. DOI: 10.2174/1566524023666230418111949.
[16] WANG ZL, JIN R, HAO M, et al. Treatment of ursodeoxycholic acid with glucocorticoids and immunosuppressants may improve the long-term survival rate in primary biliary cholangitis patients[J]. Medicine, 2022, 101(46): e31395. DOI: 10.1097/MD.0000000000031395.
[17] ZENG G, ESLICK GD, WELTMAN M. Systematic review and meta-analysis: Comparing hepatocellular and cholestatic patterns of drug-induced liver injury[J]. ILIVER, 2023, 2(2): 122-129. DOI: 10.1016/j.iliver.2023.05.002.
[18] LI SD, WANG Z, LIU JK, et al. Research progress on Astragalus active ingredient in treatment of hepatic fibrosis based on cell signaling pathway[J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(1): 18-23. DOI: 10.12360/CPB202101088.
李淑娣, 王振, 刘江凯, 等. 基于细胞信号通路探讨黄芪活性成分抗肝纤维化的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(1): 18-23. DOI: 10.12360/CPB202101088.
[19] ZHU Y, CHAI YL, XIAO GJ, et al. Astragalus and its formulas as a therapeutic option for fibrotic diseases: Pharmacology and mechanisms[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1040350. DOI: 10.3389/fphar.2022.1040350.
[20] FU K, DAI S, YOU J, et al. Pharmacological action of astragaloside IV in the prevention and treatment of liver diseases and its mechanism[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(10): 2174-2179. DOI: 10.12449/JCH251032.
付珂, 代书, 游娟, 等. 黄芪甲苷防治肝脏疾病的药理作用及其机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(10): 2174-2179. DOI: 10.12449/JCH251032.
[21] YUAN X, GONG Z, WANG B, et al. Astragaloside inhibits hepatic fibrosis by modulation of TGF-β1/Smad signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018: 3231647. DOI: 10.1155/2018/3231647.
[22] LI Y, YI H, CAI YL, et al. Effect of total flavonoids of Astragalus membranaceus on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats[J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(7): 1710-1713. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.07.045.
李艳, 伊航, 蔡轶伦, 等. 黄芪总黄酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响[J]. 中成药, 2019, 41(7): 1710-1713. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.07.045.
[23] AN L, LIN YF, LI LY, et al. Integrating network pharmacology and experimental validation to investigate the effects and mechanism of Astragalus Flavonoids against hepatic fibrosis[J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 618262. DOI: 10.3389/fphar.2020.618262.
[24] MENG XT, YUE SJ, YANG ZR, et al. Investigation on biotransformation characteristics of astragalosides in human intestinal microbiota[J]. Food Drug, 2018, 20(3): 161-167. DOI: 10.3969/j.issn.1672-979X.2018.03.001.
孟欣桐, 乐世俊, 杨智睿, 等. 黄芪皂苷类成分在人源肠道菌群中生物转化特征研究[J]. 食品与药品, 2018, 20(3): 161-167. DOI: 10.3969/j.issn.1672-979X.2018.03.001.

收稿日期：2025-12-04；**录用日期：**2026-01-21
本文编辑：刘晓红

引证本文： JIANG XY, LIU W, CHEN JM, et al. Regulatory effect of astragaloside I and calycosin on a mouse model of cholestatic liver fibrosis[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(5): 1083-1092.
姜小钰, 刘伟, 陈佳美, 等. 黄芪皂苷Ⅰ和毛蕊异黄酮在胆汁淤积性肝纤维化小鼠模型中的调控作用分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(5): 1083-1092.