◇ 基础研究 ◇

http://www.cjcpt.com
2026 Oct; 31(10): 1330-1341

基于代谢组学和宏基因组学的古日古木-13 丸抗药物性肝损伤的作用机制研究

黄永奇[1]，赵龙山[1,2]，赵冬冬[1]，薄彧坤[1]，杨　丹[1]，郭晶晶[1]，杨雪苗[3]，吕雅楠[3]，李淑敏[1]，张海燕[1]，邬国栋[1]，安　明[1]

[1] 内蒙古科技大学包头医学院药学院，包头 014040，内蒙古；
[2] 沈阳药科大学药学院，沈阳 117004，辽宁；
[3] 包头市第四医院药剂科，包头 014030，内蒙古

摘要　**目的**：评估古日古木-13 丸抗对乙酰氨基酚（acetaminophen，APAP）诱导药物性肝损伤（drug-induced liver injury，DILI）的作用并探讨其作用机制。**方法**：采用 APAP 口服诱导 SD 大鼠 DILI 模型。结合生化血清测定丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）、谷草转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）水平，肝组织病理学检查评估肝损伤程度；采用宏基因组测序分析粪便菌群结构变化，应用非靶向代谢组学探索代谢重编程。**结果**：与模型组相比，古日古木-13 丸显著降低 ALT、AST 水平（$P<0.05$），改善肝组织病理学结构；逆转药物诱导的肠道菌群失调，增加菌群多样性；同时还调控与 DILI 相关的代谢通路，促进代谢稳态的恢复。**结论**：古日古木-13 丸可能通过恢复肠道微生态平衡与重建代谢稳态，发挥明显的保肝作用。

关键词　药物性肝损伤；古日古木-13 丸；宏基因组学；代谢组学

中图分类号：R969.1；R575

文献标志码：A

文 章 编 号：1009-2501(2026)10-1330-12

doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2026.10.004

药物性肝损伤（drug-induced liver injury，DILI）是由药物导致的肝损伤疾病[1]。DILI 可引发不同程度的肝脏损害，严重时导致急性肝衰竭，威胁患者生命，部分还会发展为慢性 DILI，长期影响患者健康，同时也给医疗资源带来负担[2]。对乙酰氨基酚（acetaminophen，APAP）作为一种全球广泛使用的解热镇痛药，其过量或长期使用可导致肝功能障碍及肝细胞死亡，这些因素相互影响，共同导致肝脏受损[3]。在体内，APAP 主要在肝脏进行代谢，在此过程中会产生有毒代谢产物 N-乙酰对苯醌亚胺（N-acetyl-p-benzoquinone imine，NAPQI）[4]。NAPQI 具有高度反应性，能够与肝脏细胞内的蛋白质和酶发生反应，致使肝细胞损伤、坏死，同时激活免疫系统反应，引发肝脏损伤[5]。肠道微生物群在 DILI 的发病中起着关键作用。肠道微生物群不仅能够调节药物的代谢路径，还能影响肠道屏障功能、免疫反应和代谢物的生成，间接参与肝脏损伤过程[6]。药物进入体内后，部分药物和代谢产物通过胆汁酸代谢进入肠道，在肠道微生物的作用下发生转化，产生不同的代谢产物，这些产物被肠道吸收后可经门静脉循环影响肝脏的代谢和免疫功能[7]。肠道微生物群的紊乱与药物肝毒性相互影响，成为研究其机制的一个重要方向。

蒙医药作为我国优秀文化的瑰宝，拥有悠久的发展历史和丰富的民族特色。其独特的多味药方剂在临床上广泛应用，展现出显著的疗效。古日古木-13 丸（Gurigumu-13 Pill，GRGM-13P）是源自《诊治明医典》的传统蒙药方剂，1998 年载入《中

2025-09-30 收稿　2025-12-26 修回
国家自然科学基金项目（82460807）；内蒙古自治区自然科学基金项目（2025LHMS08010，2025QN08097，2024QN08060）；内蒙古自治区研究生科研创新项目（KC2024085S）
黄永奇，男，硕士研究生在读，研究方向：蒙中药质量标准和活性成分研究以及蒙中药药物代谢研究。
E-mail: 2961134691@qq.com
安明，通信作者，男，硕士，教授，硕士生导师，研究方向：中蒙药质量标准和药效药代安全性评价的研究。
E-mail: 102009113@btmc.edu.cn
邬国栋，通信作者，男，硕士，教授，硕士生导师，研究方向：蒙中药质量标准和活性成分研究以及蒙中药药物代谢研究。
E-mail: wgdzd@126.com

华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册》，现已由包头市蒙中医院制备并上市[8]。该方由红花、麦冬、丁香、莲子、木香、诃子、川楝子、栀子、紫檀香、水牛角浓缩粉、人工牛黄、麝香和银朱等十三味药材组成。临床上主要用于治疗肝脏疾病、高血压、心绞痛和脑梗死等症。研究表明，GRGM-13P 由于其清肝热、凉血、强身、止痛和消肿等作用对肝脏疾病发挥疗效[9]。其中，红花具有清肝热、凉血、强身、止痛和消肿的作用；牛黄用于清肝热、解毒；紫檀香和栀子用于清血热；水牛角用于燥恶血和解毒；诃子用于解毒，并主治肝肾热病，多味药材的协同配伍构成了 GRGM-13P 发挥整体疗效的重要基础。目前已有研究表明，中药复方在 DILI 中的保护作用不仅与其直接抗炎、抗氧化效应有关，还与其调控肠道菌群结构、改善肠黏膜屏障功能密切相关。解毒护肝通络方作为一种中药复方可通过改善肠道菌群组成及增强肠黏膜屏障功能在 DILI 中发挥肝保护作用[10]。基于上述研究背景，本研究采用 APAP 建立 SD 大鼠 DILI 模型，并结合宏基因组学与非靶向代谢组学技术来阐明 GRGM-13P 的保肝机制，并对肠道微生物群组成和代谢物进行综合分析，以期为 DILI 的治疗提供新的策略。

1　材料与方法

1.1　实验仪器　酶标仪[型号：MULTISKAN GO，赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；血样离心机（型号：TG16 WS，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；电子天平（型号：BSA224S-CW，北京赛多利斯科学仪器有限公司；高速冷冻离心机（型号：JIDI - 20D，广州吉迪仪器有限公司）；正置光学显微镜（型号：Sunny EX30，宁波舜宇仪器有限公司）；高通量测序仪（型号：NovaSeq 6000，因美纳中国科学器材有限公司）。

1.2　化学品和试剂　GRGM-13P 购自包头市蒙中医院（批号：908021，规格：2 g/丸），羧甲基纤维素钠（CMC-Na）购自北京酷来搏科技有限公司（批号：CA34132801），氯化钠购自天津市光复科技发展有限公司（批号：20230802），戊巴比妥钠购自阿达马斯贝塔化学试剂有限公司（批号：P2907613），丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）（批号：G020240524R01/02）、谷草转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）试剂盒（批号：G020240524R01/02）购自江苏省苏州格锐思生物科技有限公司。

1.3　实验动物　6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只，体质量（200±20）g，购自北京斯贝福生物技术有限公司，动物合格证号：SCXK（京）2024-0001，伦理审批编号：[2023]36。实验大鼠在温度（20±2）℃、湿度（55±5）%、12 h 明暗循环环境的条件下，适应性喂养 1 周。随机分为 4 组，每组 6 只：Control 组、Model 组、GRGM-13P 低剂量组、GRGM-13P 高剂量组。

1.4　方法

1.4.1　*给药与造模*　给药与造模方法遵循前期研究，但前期仅对 GRGM-13P 的单一剂量（2 000 mg/kg）进行检测。因此，本研究引入 GRGM-13P 低剂量组[11]。分别称取 GRGM-13P 粉末，配制成低剂量（1 000 mg/kg）和高剂量（2 000 mg/kg）GRGM-13P 灌胃溶液。Control 组与 Model 组在造模前使用生理盐水溶液进行灌胃。第 14 天，在灌胃前新制 APAP 灌胃溶液。除 Control 组外，其他各组一次性灌胃 2 000 mg/kg 的 APAP 悬浮液。所有实验动物在 APAP 灌胃前禁食 12 h，灌胃后 12 h 立即处死，Control 组接受等体积的羧甲基纤维素钠溶液。

1.4.2　*样本处理*　造模结束后第 2 天，首先收集大鼠粪便于无菌无酶离心管中，速冻于液氮罐中用于宏基因组学及代谢组学分析。之后所有大鼠用戊巴比妥钠麻醉后进行腹主动脉取血，采集血清并储存在−80 ℃ 下，用于试剂盒检测。取肝脏标本观察肝脏的形态、颜色并拍照，肝脏左外叶用 PBS 清洗后，固定在 10% 福尔马林中进行组织病理学研究。

1.4.3　*组织病理学分析*　采用 10% 中性福尔马林固定肝脏组织，经乙醇梯度脱水及石蜡包埋等步骤后采用常规方法进行 HE 染色，封片，光学显微镜下观察肝组织病理变化，以评价肝脏炎症及损伤变化。

1.4.4　*生化分析*　依照试剂盒说明书的操作方法，采用生化检测法测定血清 ALT、AST 水平。

1.5　宏基因组学

1.5.1　*基因组 DNA 提取、文库构建和测序*　采用特定试剂盒进行 paired end 文库构建，文库质检合格后用 NovaSeq 6000 进行高通量测序，测序模式为 PE150。通过基因组 DNA 用超声打断、DNA 片段末端修复、加'A'碱基至 DNA 片段的 3'末端、加测序接头、片段选择和 PCR 扩增来构建文库。

1.5.2 *宏基因组数据分析* 将测序得到的原始数据进行去接头、去低质量序列数据处理。当已知宿主的情况下，需要去除宿主序列，保证后续组装以及分析结果均为微生物的序列，进而得到更为准确的物种注释以及功能注释结果。经过数据预处理，按照单个样本分别进行 de novo 组装。将组装好的 contigs 进行 CDS 预测，并过滤掉短片段 contig 序列。通过序列聚类获得非冗余 Unigenes 集。将 Unigenes 与 NR_meta 库进行比对，获得各层级的物种分类信息。针对种层级物种注释统计结果进行 Alpha 和 Beta 多样性分析。将 Unigenes 分别与 12 个功能数据库进行比对，获得各数据库的注释信息。分别在物种和功能水平上进行丰度统计及差异比较分析。

1.6 代谢组学 将上清液样品在 4 ℃ 下解冻。取 100 μL 样品，加入 300 μL 甲醇，涡旋 3 min 后以 13 000 r/min 离心 10 min。离心后，将上清液在 40 ℃ 下吹干，加入 100 μL 初始摩尔相溶液。再次旋转 1 min 后重新溶解，放入注射瓶进行分析。每个样品取 50 μL 上清液放入 10 mL 离心管中，涡旋混合以制备质控样品。随机血浆分为 6 个部分，进行相同制备以验证方法的重复性。

Thermo Ultimate 3000 超高效液相色谱系统（Thermo Fisher Scientific），使用 ACQUITY UHPLCTM BEHC1s（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）柱，50 ℃ 进行分离。流速 0.2 mL/min，进样量 10 μL。洗脱液为 0.1% 甲酸水溶液（A）和乙腈（B）。洗脱梯度：0～2 min，98%（A）；2～10 min，98%-70%（A）；10～12 min，70%-5%（A）；12～13 min，5%（A）；13～14 min，5%-98%（A）；14～17 min，98%。

MS 检测使用 Waters Quattro micro API（Thermo Fisher Scientific），使用 ESI 源，正负离子模式下扫描。扫描范围 50～1 500 Da，流速 0.2 mL/min。干燥气体流速 450 L/h，温度 400 ℃；源温度 120 ℃；样品锥电压 35 V，毛细管电压 3 kV。

每 6 个样品中设有 1 个质量控制样品，用于评估仪器的稳定性和可重复性。MassLynx V4.1 系统用于提取、区分和归一化代谢组学数据。使用 SIMCA 13.0 进行偏最小二乘判别分析（PLS-DA）观察组间分离，并通过置换测试评估模型的过拟合情况。结合 S-图的正交投影到潜在结构判别分析（OPLS-DA）用于识别生物标志物，进一步分析 VIP 值高的标志物，并进行方差分析（ANOVA）。

1.7 宏基因组学与代谢组学联合分析 Spearman R 包：使用 Package stats version 4.3.3 计算相关系数，使用 Package ggcorrplot version 0.1.4.1 计算相关系数 *P* 值，使用 Package ggplot2 version 3.5.1 和 Package pheatmap version 1.0.12 画图。

1.8 统计学处理 所有数据均以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。使用 GraphPad Prism（9.5.0）进行统计分析和数据可视化。使用单因素方差分析，然后采用秩和检验来分析非正态分布的数据，评估多组之间的差异。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GRGM-13P 对 DILI 诱导大鼠肝损伤的改善作用 首先对老鼠的体质量进行为期 15 d 的监测，结果未发现显著差异（Fig.1A）。与 Control 组相比，Model 组 ALT、AST 水平均显著提高（*P*<0.05，*P*<0.01），可见 APAP 诱导的 DILI 模型建立成功；与 Model 组相比，GRGM-13P 给药组 ALT、AST 水平均明显下降（*P*<0.05），说明 GRGM-13P 可使肝损伤指标水平降低，具有显著治疗效果，且 GRGM-13P 低剂量组疗效更佳，因此后续组学选择低剂量进行测序（Fig.1B）。对大鼠肝脏形态观察显示，Control 组大鼠肝脏呈现红褐色，表面光滑且有光泽，质地柔软；Model 组大鼠的肝脏颜色为深褐色，出现肿胀，质硬，边缘变钝可见凹凸不平，部分出现局部颜色改变、不同程度的变形、萎缩；GRGM-13P 低剂量组肝脏较 Model 组颜色更加红润，表面更加光滑（Fig.1C）。肝脏组织的 HE 染色显示，Control 组肝脏组织细胞以中央静脉为中心呈放射状排列，形态规则，大小均匀；与 Control 组相比，Model 组细胞明显疏松，出现炎性细胞浸润以及散在或灶性的肝细胞坏死；GRGM-13P 低剂量和高剂量组明显改善细胞疏松，减少炎性细胞浸润和肝细胞坏死，低剂量组较高剂量组改善状况更佳（Fig.1D）。

2.2 GRGM-13P 调节 DILI 大鼠粪便微生物群落

2.2.1 *基因数目及群落多样性综合评估* 基因长度分布柱状图（Fig.2A）观察到，大部分基因的长度集中于 500～1 000 范围内；进一步利用韦恩图（Fig.2B）显示，Control 组、Model 组和 GRGM-13P 组的基因总数分别为 4 326 363、4 372 111 和 4 372 558 个，且 3 组共有基因有 3 977 462 个。利用 Chao1、Shannon 和 Simpson 指标评估样本内的物种丰富度及均匀性。结果显示 Chao1 指数在测序初期迅速上升，并在约 2.5×10^7 序列后趋

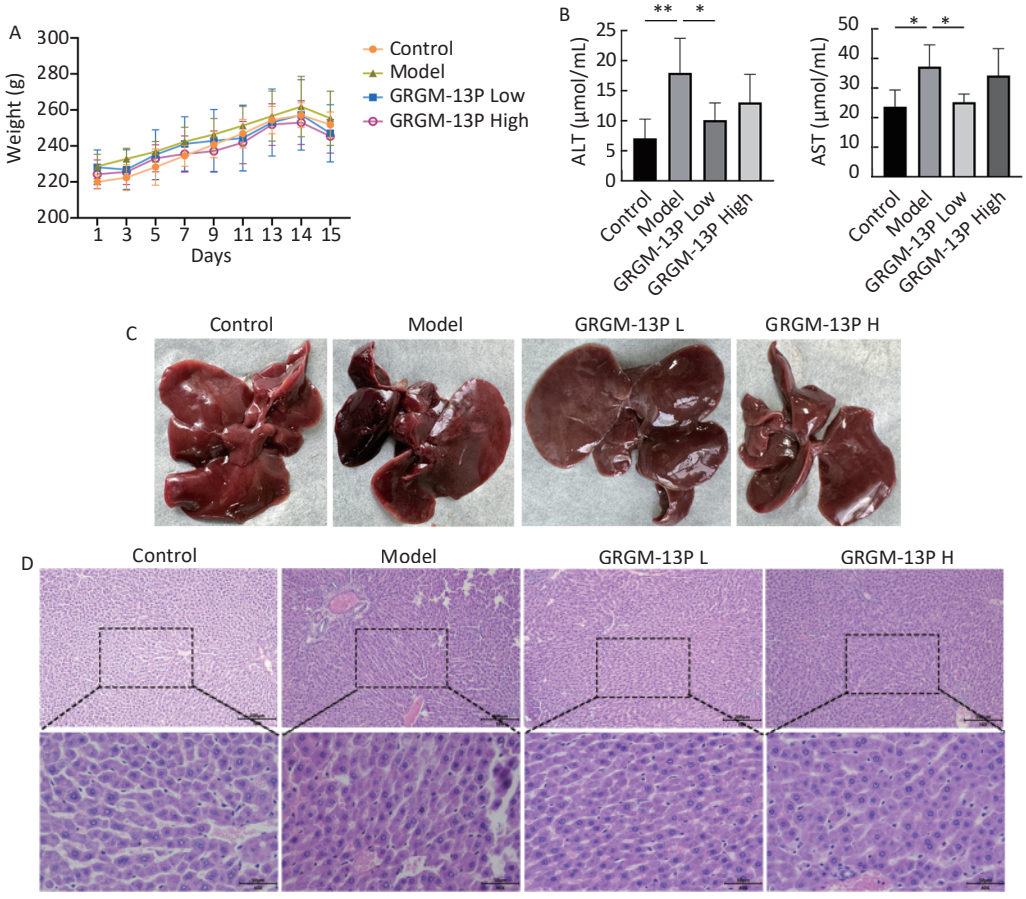


Fig.1　Pharmacodynamic study of GRGM-13P in DILI rats

A: curve of rat body weight changes ($\bar{x}\pm s$, n=6); B: effect of GRGM-13P on ALT and AST in DILI rats ($\bar{x}\pm s$, n=6); C: representative images of liver morphology observation; D: representative images of liver HE staining. *P<0.05,**P<0.01.

于稳定，提示物种丰富度估计已饱和(Fig.2C)；Shannon 指数逐步上升，初期测序深度的增加显著提高对丰富度及均匀性的检测，后期平缓则表明多样性评估已充分(Fig.2D)；Simpson 指数逐渐接近 1.00，反映优势物种集中度增强，而稀有物种的相对贡献减弱(Fig.2E)。Control 组、Model 组及 GRGM-13P 给药组均显示出较高的多样性。PCoA 分析可以发现 Control 组与 Model 组具有明显差异，而 GRGM-13P 组分布介于二者之间，提示其对 APAP 诱导的 DILI 具有调控作用(Fig.2F)。Anosim 及 Adonis 分析均证实组间群落结构存在统计学差异(P<0.05)，但 Anosim 的弱效应值(R<0.25)表明差异幅度有限，可能受组内异质性或稀有物种分布影响(Tab.1)。

2.2.2　DILI 大鼠肠道菌群结构及功能的分析　本研究共鉴定出 5 个界、199 个门、358 个纲、582 个目、1 148 个科、3 893 个属及 21 182 个种，重点从门和属水平探讨各组样品的菌群组成。门水平的相对丰度柱状图和 Circos 图(Fig.3A, B)显示，芽孢杆菌门(Bacillota)和拟杆菌门(Bacteroidota)在 3 组中均为绝对优势门；属水平上，梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*)均呈优势分布，而拟杆菌属(*Bacteroides*)在 Control 和 GRGM-13P 组中丰度较高，但在 Model 组中相对较低(Fig.3C, D)。对属层级相对丰度前的 30 物种进行 Spearman 相关性分析，借助热图及网络图的可视化(Fig.3E-J)揭示各组物种间的相互作用关系(|rho|>0.8)。在功能方面，GO 分析显示 Model 组在生物学过程上显著富集于转录调控(regulation of transcription, DNA-templated)、运输(translation)及 DNA 重组(DNA recombination)通路，在分子功能上集中于 ATP 结合(ATP binding)、蛋白质结合(protein binding)和核糖体结构(structural constituent of ribosome)，细胞组分则主要涉及胞浆(cytosol)及细胞质(cytoplasm)相关结构(Fig.3K)；KEGG 分析则表明代谢相关通路中，如碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)等，基因占比

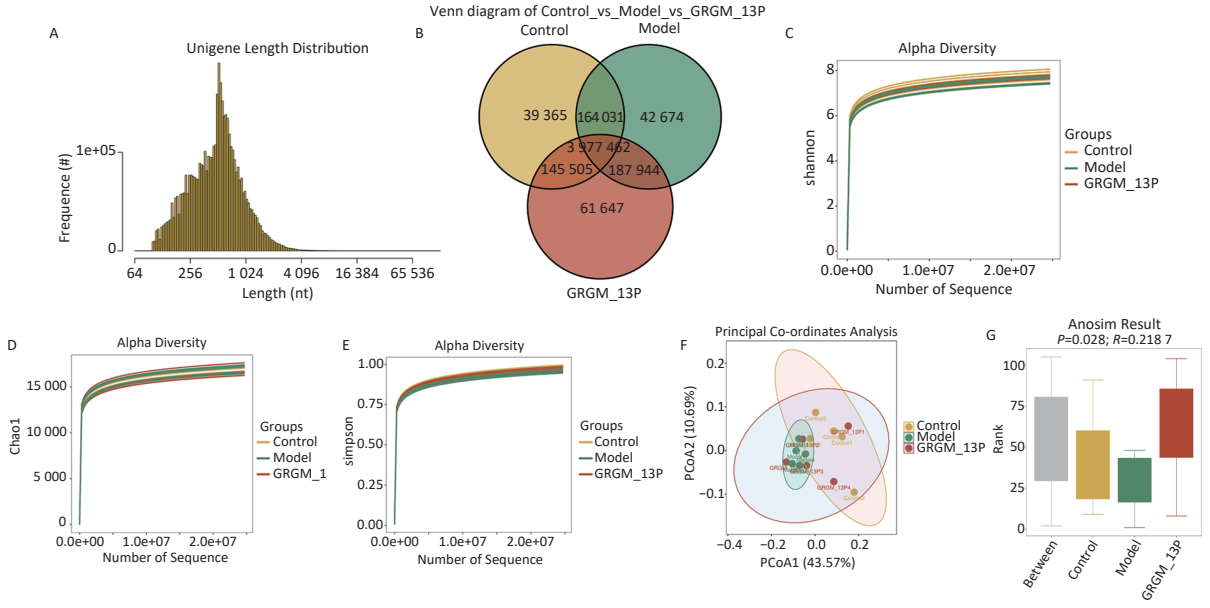


Fig.2　Analysis of the number and diversity of genes in the intestinal microbiota

A: histogram of gene length distribution; B: venn diagram analysis of gene numbers; C: Shannon index; D: Chao1 index; E: Simpson index; F: PCoA analysis of the control, model and GRGM-13P groups; G: anosim analysis.

Tab.1　Anosim analysis of the control, model, and GRGM-13P groups

	Df	Sum of squares	R^2	F	Pr(>F)
Group	2	0.08	0.25	2.00	0.04
Residual	12	0.24	0.75		
Total	14	0.32	1		

较高，说明代谢相关通路是 GRGM-13P 给药后参与的主要通路类型(Fig.3L)。eggNOG 注释进一步证实氨基酸代谢及碳水化合物运输与代谢占较大比例，提示代谢相关功能在宏基因组活动中发挥重要作用(Fig.3M)。

2.2.3　GRGM-13P 干预能够重建 DILI 大鼠肠道微生物生态以及代谢功能　LEfSe 线性判别分析揭示 Control、Model 和 GRGM-13P 3 组间微生物群落的显著差异，其中 Model 组以拟杆菌(Bacteroidota)门及其下属的穆里巴(Muribaculaceae)科及其未分类属显著富集，而 Control 组则以丙型变形菌(Gammaproteobacteria)纲为特征且类杆菌(Bacteroidaceae)科丰度显著降低；此外，Model 组中梭状芽孢杆菌(Clostridia)纲丰度增加及 GRGM-13P 组中未分类类群的高比例均提示组间在代谢和生态位适应性上存在差异(Fig.4A, B)。利用 MetagenomeSeq 方法(筛选阈值：|logFC|>1, P<0.05)进行两两比较，结果显示 Model 组与 Control 组在拟杆菌(Bacteroidota)、假单胞菌(Pseudomonadota)和放线菌(Actinomycetota)等菌门下存在显著丰度变化，而 GRGM-13P 干预后部分异常菌群得到纠正，提示其可能通过调控肠道微生态改善肝功能(Fig.4C, D)。各组间的 Reporter-Score 差异揭示不同通路的富集程度，表明 GRGM-13P 可能在调控微生物群落功能、促进能量与生物合成代谢以及减轻肝损伤相关通路激活方面发挥重要作用(Fig.4E-H)。

2.3　代谢组学分析　采用 PLS-DA 评价各组间差异(Fig.5A, C)，Control 组、Model 组和 GRGM-13P 给药组，均具有良好的分离效果，这表明 DILI 大鼠粪便中代谢物有明显变化。同时，我们采用置换检验对模型进行检验(Fig.5B, D)，以确保模型的有效性，结果显示模型拟合优度较高且具有一定预测能力。根据潜在生物标志物的表达水平构建热图以显示不同组别间潜在生物标志物的变化情况(Fig.5E, F)。对所有发现的内源性代谢物均使用 MetaboAnalyst 进行代谢途径分析(Fig.5G)，共涉及硒化合物代谢(selenocompound metabolism)、鞘脂代谢(sphingolipid metabolism)和亚油酸代谢(linoleic acid metabolism)等 11 条代谢途径。

2.4　差异菌群与差异代谢物的联合分析　为进一步明确各组之间差异的肠道菌群与代谢物之间存在的关联性，对筛选出 4 个门水平和 18 个属水平的差异菌群和 19 个代谢产物进行联合分析，结果担子菌(Basidiomycota)丰度显著异常，与硒代

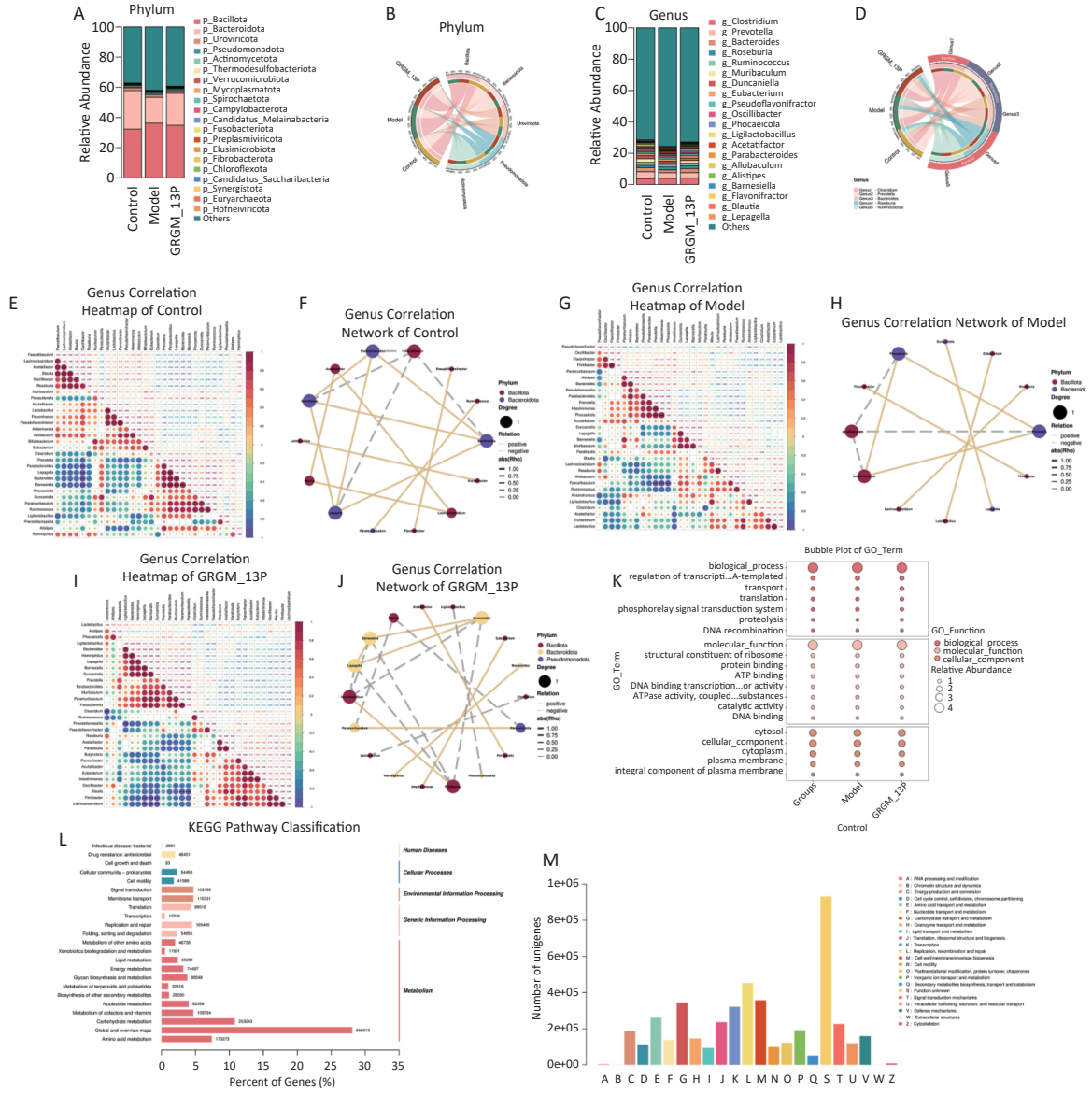


Fig.3　Analysis of the structure and function of the intestinal microbiota

A-B: horizontal species abundance statistical analysis bar charts and Circos diagrams. C-D: vertical species abundance statistical analysis bar charts and Circos diagrams. E-J: heatmaps and network diagrams of microbiome correlations for the control, model, and GRGM-13P groups. K: bubble chart for GO abundance composition analysis. L: bar chart for KEGG pathway classification. M: classification statistical graph of eggNOG.

谢物（3-phosphoadenylylselenate、dimethyl selenide）水平下降及神经毒素（fumonisin A1）累积呈强关联，表明菌群失调后，通过硒抗氧化系统失衡和神经毒性物质沉积加剧代谢紊乱。属水平进一步表明，耐盐菌（Halo）、多糖降解菌（Chitinophagaceae_unclassified）及环境适应菌（*Spirosoma*）的丰度动态与上述代谢异常存在潜在调控关系。GRGM-13P 干预后，门水平弯曲杆菌（Campylobacterota）丰度显著降低，嗜盐菌（Ignavibacteriota）富集（Fig.6A, B），属水平帕雷瑞替菌（*Pararеticibacter*）和莱普索里普兰菌（*Leptospirillum*）增殖，并伴随硒代谢物（hydrogen selenide）、糖代谢中间体（fructose 1,6-bisphosphate）及植物活性物质（theasaponin B1）的恢复（Fig.6C, D）。

根据联合分析结果筛选出 19 个与 GRGM-13P 保肝作用相关的潜在生物标志物，见 Tab.2。将得到的代谢物输入到 SwissTargetPrediction 数据库中预测其潜在靶点，利用 DAVID 数据库和微生信平台对获得的靶点进行 GO、KEGG 富集分析（Fig.6E, F）。GO 功能分析表明，在生物过程层面，差异代谢物参与 negative regulation of transcription by RNA polymerase II、response to xenobiotic

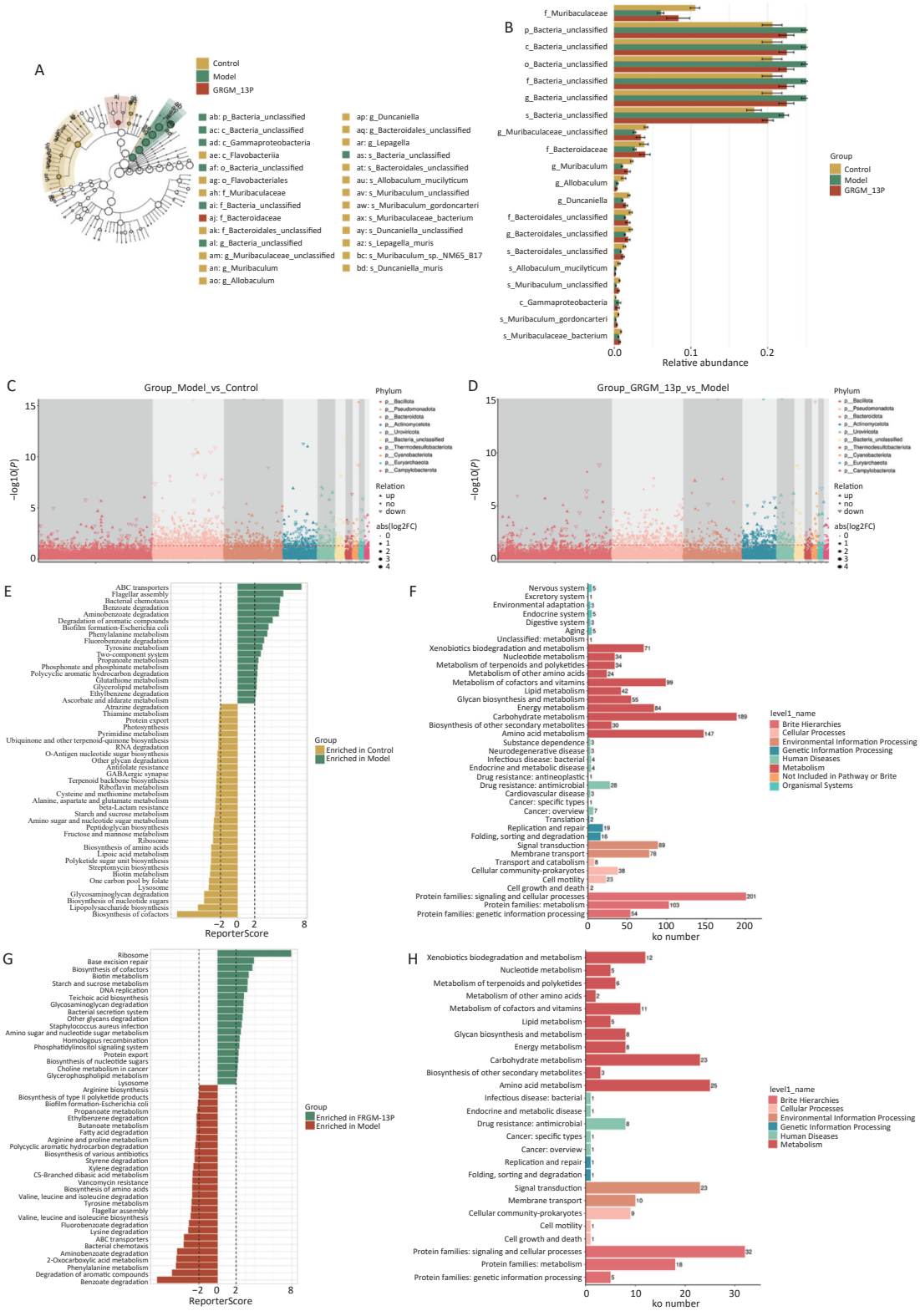


Fig.4 Difference analysis

A: evolutionary branch diagram of LEfSe difference analysis. B: abundance bar chart of LEfSe difference analysis. C-D: Manhattan plots of MetagenomeSeq difference analysis between model *vs.* control group and GRGM-13P *vs.* model group. E-F: pathway bar charts of ReporterScore difference analysis between control group *vs.* model. G-H: ReporterScore difference analysis between GRGM-13P *vs.* model group.

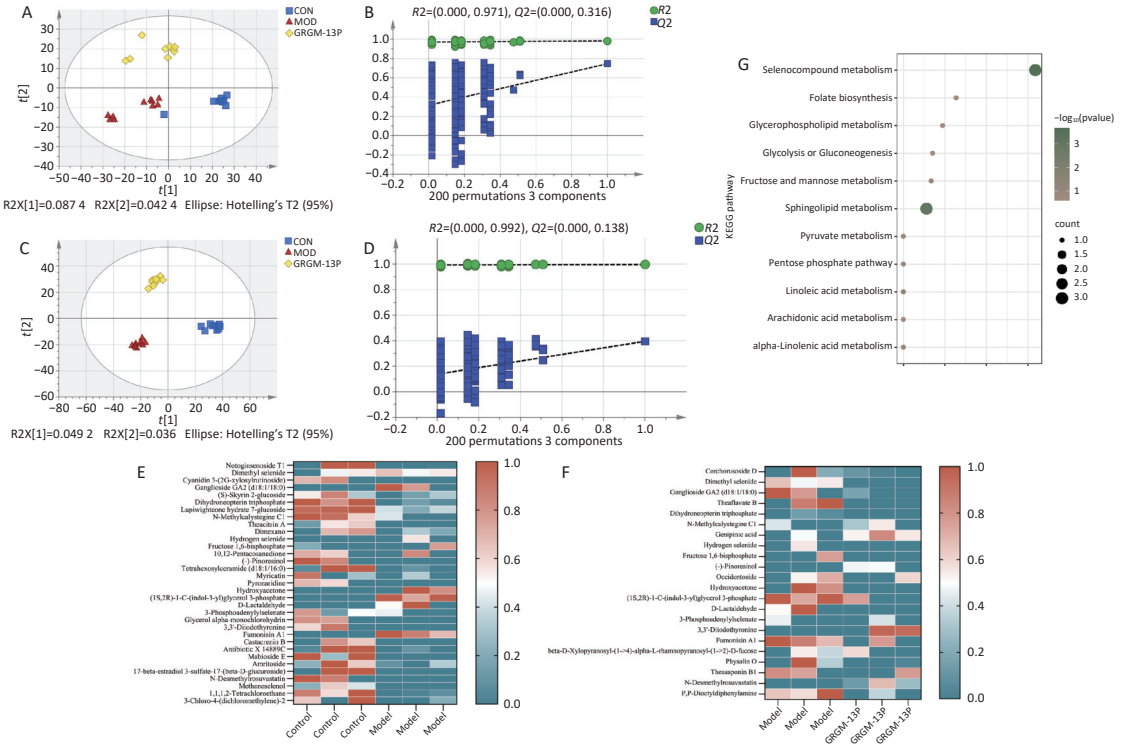


Fig.5　Metabolomics analysis

A-B: positive ion mode PLS-DA and permutation test plots. C-D: negative ion mode PLS-DA and permutation test plots. E-F: heatmaps of potential biomarker expressions for the control group *vs.* model and GRGM-13P *vs.* model groups. G: KEGG metabolic pathway enrichment bubble plot.

stimulus、negative regulation of apoptotic process、positive regulation of gene expression 和 negative regulation of gene expression 等途径；细胞组分层面，主要富集在 cytoplasm、cytosol、extracellular exosome、extracellular region 和 mitochondrion 等组分；分子功能层面，涉及 protein binding、identical protein binding、enzyme binding、protein homodimerization activity 和 ubiquitin protein ligase binding 等，还具备肽酶、内肽酶等活性及核受体活性。差异基因广泛参与基因表达调控、细胞凋亡及对外源刺激的响应，作用于多种细胞组分，并通过蛋白质结合和酶活性等分子功能发挥生物学效应，为机制研究提供了重要依据。KEGG 通路进一步整合发现，差异代谢物靶向 Lipid and atherosclerosis、Pathways in cancer 和 Fluid shear stress and atherosclerosis 等核心通路。

3　讨论

DILI 是由各类药物及其代谢产物和生物制剂等所诱发的肝损伤，属于最为普遍和严重的药物不良反应之一，可导致肝衰竭并最终致命[12]。肠道菌群可调控肝脏药物代谢酶（如 P450 酶）的表达与活性，直接影响 APAP 等药物的毒性代谢路径[13-15]。Lu 等研究发现[16]，过量 APAP 可破坏肠道屏障完整性，导致脂多糖易位入血，激活肝脏 Kupffer 细胞并触发 TLR4/NF-κB 信号通路，进而加剧炎症反应与肝损伤。人类肠道菌群以厚壁菌门（Firmicutes）和放线菌门（Actinobacteria）为优势，其中黏液降解菌（*Akkermansia muciniphila*）和多糖代谢菌（*Bacteroides vulgatus*）等特定共生菌通过维持肠道屏障功能和调节免疫应答，对 DILI 发挥保护作用[17]。基于宏基因组测序的干预研究表明，多糖代谢菌可富集产短链脂肪酸菌群、抑制促炎菌增殖，显著缓解 APAP 诱导的肝损伤[18]。

本研究利用 APAP 诱导的大鼠 DILI 模型，使用 GRGM-13P 对 DILI 大鼠进行治疗，并采用宏基因组学及代谢组学，对 GRGM-13P 对 DILI 的潜在机制进行探讨。对大鼠的肝脏形态、HE 染色病理以及生化指标的检测，综合评估 APAP 诱导 DILI 模型的成功建立及 GRGM-13P 显著的肝保护作用。宏基因组学 Alpha 多样性分析结果显示，各组粪便微生物群落均具有较高的物种丰富度和均匀性。Beta 多样性分析提示 Model 组与 Control 组在群落结构上存在差异，而 GRGM-13P 给

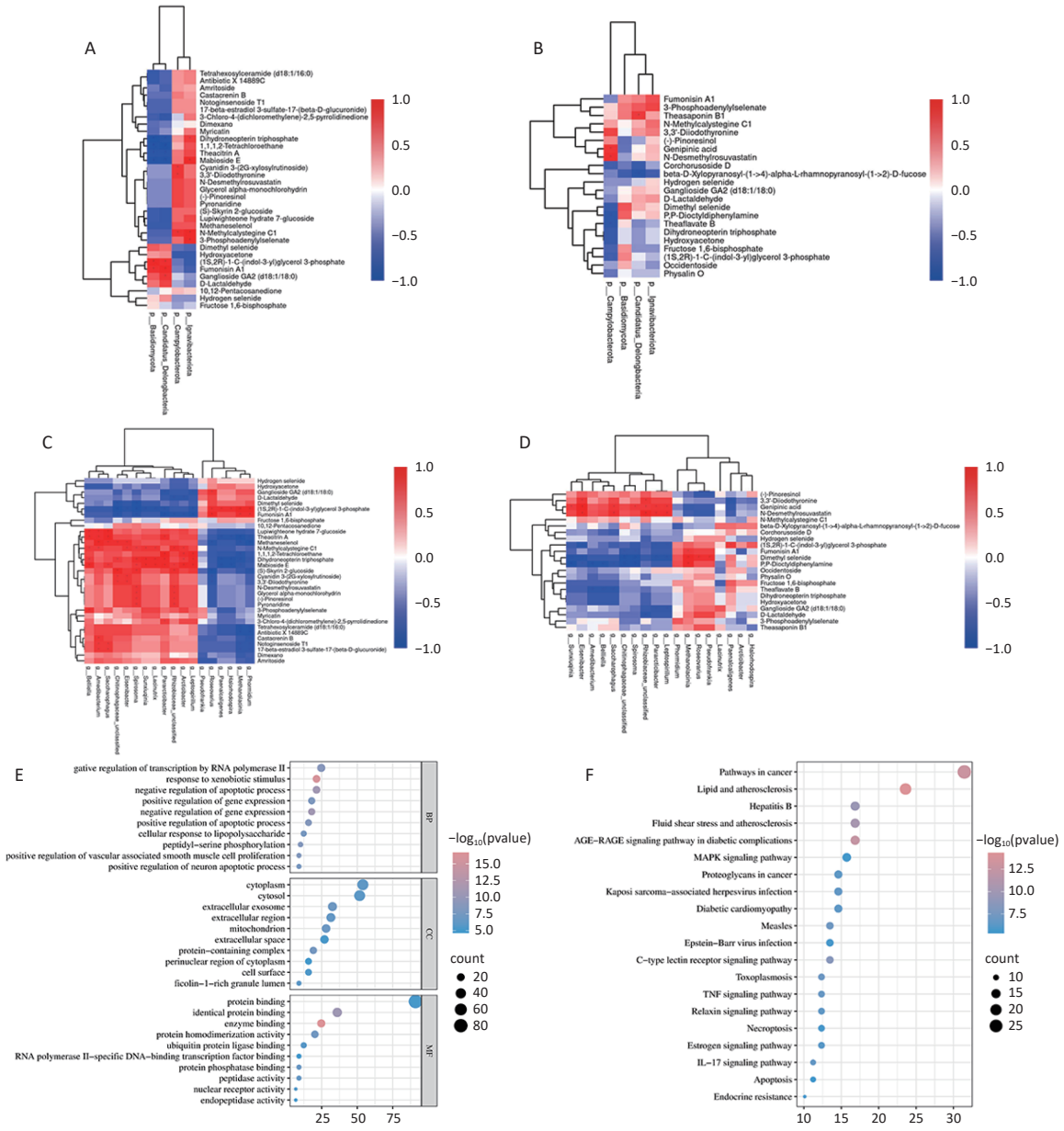


Fig.6 Association analysis between gut microbiota and metabolomics

A-B: heatmap showing the correlations of the differential metabolites at the pathway level between the control group and model group, and between GRGM-13P and model group. C-D: heatmap showing the correlations of the differential metabolites at the family level between the control group and model group, and between GRGM-13P and model group. E: bubble plot for GO enrichment analysis. F: bubble plot for KEGG enrichment analysis.

药组的分布介于两者之间，表明 GRGM-13P 可以调控 APAP 诱导的微生态失衡。Bacteroidota 通过维持肠道屏障、产生抗炎代谢物及调控核心炎症通路，形成多层次的抗炎网络[19]。在门、属水平上的比较和 LEfSe 分析揭示，Model 组中 Bacteroidota 及其部分下属菌群的富集以及其他优势菌群的相对降低可能与肝损伤密切相关。而热图结果表明，GRGM-13P 干预后，部分异常菌群得以纠正。这些结果表明 GRGM-13P 通过调节肠道菌群结构和功能，进而减轻 DILI 病理过程。近年来，越来越多的研究表明，肠道菌群及其代谢产物可通过调控免疫细胞功能，尤其是巨噬细胞的极化状态，在多种器官损伤过程中发挥关键作用。文一如等指出肠道屏障破坏后，脂多糖等微生物相关分子可诱导巨噬细胞向促炎性 M1 型极化，从而加剧氧化应激和炎症反应；相反，短链脂肪酸等有益代谢物可促进抗炎性 M2 型极化，发挥组织保护和修复作用[20]。结合本研究中 GRGM-13P 对

Tab.2 Potential biomarkers related to the hepatoprotective effect of GRGM-13 after joint analysis

NO	Ret. Time	Measured m/z	Metabolite	Formula	Delta (ppm)
1	12.051 8	1 475.395 9	Cyanidin 3-(2G-xylosylrutinoside)	$C_{32}H_{39}O_{19}$	3
2	12.001 8	1 092.739 6	Ganglioside GA2 (d18:1/18:0)	$C_{56}H_{104}N_2O_{18}$	11
3	9.926 5	700.196 2	Theaflavate B	$C_{36}H_{28}O_{15}$	44
4	13.363 5	518.001 7	Dihydroneopterin triphosphate	$C_9H_{16}N_5O_{13}P_3$	32
5	5.310 8	228.079 9	N-Methylcalystegine C1	$C_8H_{15}NO_5$	19
6	14.783 4	783.099 2	Theacitrin A	$C_{37}H_{28}O_{18}$	22
7	5.222 2	242.095 7	Genipinic acid	$C_{11}H_{14}O_6$	25
8	12.183	310.046 2	(1S,2R)-1-C-(indol-3-yl)glycerol 3-phosphate	$C_{11}H_{14}NO_6P$	4
9	13.610 9	1 325.914 1	Goyaglycoside c	$C_{38}H_{62}O_9$	21
10	13.437 8	1 325.849	Goyaglycoside c	$C_{38}H_{62}O_9$	28
11	12.138 4	1 110.908 8	3-Phosphoadenylylselenate	$C_{10}H_{15}N_5O_{13}P_2Se$	36
12	14.431	524.819 7	3,3'-Diiodothyronine	$C_{15}H_{13}I_2NO_4$	184
13	13.123 2	786.41	Fumonisin A1	$C_{36}H_{61}NO_{16}$	28
14	12.027 4	885.332 8	beta-D-Xylopyranosyl-(1->4)-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1->2)-D-fucose	$C_{17}H_{30}O_{13}$	13
15	13.679 5	1 039.529 1	Mabioside E	$C_{48}H_{78}O_{22}S$	49
16	13.447 6	1 329.679	Theasaponin B1	$C_{65}H_{94}O_{27}$	69
17	1.430 6	502.093 1	N-Desmethylrosuvastatin	$C_{21}H_{26}FN_3O_6S$	58
18	1.824 3	195.705 3	P,P-Dioctyldiphenylamine	$C_{28}H_{43}N$	219
19	6.427 4	211.859 4	3-Chloro-4-(dichloromethylene)-2,5-pyrrolidinedione	$C_5H_2Cl_3NO_2$	229

肠道菌群结构、硒代谢及脂质代谢通路的调节作用，推测其肝保护效应可能部分通过改善肠道微生态失衡、抑制促炎免疫反应并促进炎症消退而实现。在前期研究中，我们已通过系统的药效学评价证实 GRGM-13P 在 APAP 诱导的肝损伤模型中具有稳定的肝保护作用[11]，因此本研究在此基础上采用每组 6 只动物开展机制层面的深入分析。为减少性激素周期性波动对肝损伤程度及肠道菌群组成的潜在干扰，本研究选择雄性大鼠以更清晰地揭示 GRGM-13P 的初步作用趋势。未来研究将进一步扩大样本量，纳入不同性别动物，并结合体外模型对研究结论进行系统验证。

代谢组学数据利用 PLS-DA 模型显示，Control 组、Model 组及 GRGM-13P 组之间存在明显代谢物谱的分离。经 VIP 值筛选和 ANOVA 检测鉴定出一系列与肝损伤及其改善密切相关的差异代谢物，主要涉及硒化合物、鞘脂及亚油酸代谢的通路。硒化合物可以调节免疫细胞功能和细胞氧化还原状态，进而对炎症产生影响[21]。硒化合物代谢通路的显著变化，提示 GRGM-13P 可以缓解 APAP 诱导的氧化应激对肝脏细胞的损伤。而鞘脂代谢通路发生改变后，鞘脂代谢中鞘磷脂酶活性迅速升高促使神经酰胺积累引发肝脏氧化应激与炎症[22]。亚油酸可在一系列酶的作用下转化为花生四烯酸，而花生四烯酸能代谢与脂质代谢相关[23]。鞘脂代谢和亚油酸代谢通路显著性变化提示 GRGM-13P 可能通过改善 APAP 诱导的氧化应激、脂质代谢紊乱和炎症反应进而缓解 DILI。需要强调的是，GRGM-13P 是 13 味药材组成的传统复方制剂，其化学成分复杂，本研究尚未对单一活性成分与特定代谢物或信号通路之间的对应关系进行系统解析，当前观察到的整体疗效更可能来源于多种成分之间的协同作用。近年来，超声辅助提取及代谢物检测技术在提高药用植物代谢

物检测灵敏度方面取得了显著进展，相关方法有望为复杂复方制剂中关键活性成分的进一步解析提供技术支持，为后续研究奠定方法学基础[24]。

本研究采用宏基因组与代谢组学联合分析，深入探讨 GRGM-13P 对 APAP 诱导 DILI 的干预机制。Model 组的 Campylobacterota 及 Basidiomycota 异常富集，同时伴随硒代谢物（3-phosphoadenylylselenate、dimethyl selenide）水平下降及 Fumonisin A1 累积，提示菌群失调可能加剧氧化应激和细胞毒性损伤。已有研究表明，膳食纤维能够调控肠道菌群结构，从而减轻 APAP 导致的肝损伤，进一步强调了肠道微生态平衡在 DILI 发生发展中的关键作用，并为通过微生态恢复进行有效干预提供了理论依据[25]。在 GRGM-13P 干预后，Ignavibacteriota 显著富集，同时产短链脂肪酸菌 Parareticibacter 和铁代谢菌 Leptospirillum 的增殖与硒代谢物、糖代谢中间体及植物活性物质的恢复同步，表明 GRGM-13P 可通过多方面逆转 APAP 引起的代谢紊乱。尽管本研究通过宏基因组学与代谢组学的联合分析揭示了关键菌群、代谢物及肝损伤表型之间的显著相关性，但尚未通过粪菌移植实验或菌株特异性干预手段对其因果关系进行直接验证。因此，后续研究将通过构建粪菌移植模型或开展针对特定菌群的精准干预实验，进一步明确关键微生物在 GRGM-13P 肝保护作用中的影响。此外，本研究虽未直接评估 GRGM-13P 在人体中的治疗效果，但其在传统医学中长期用于肝脏相关疾病的临床实践为本研究结果提供了现实背景支持[9]。未来可结合病例观察研究、基于肠道菌群特征的人群分层分析，以及与公开人体肠道菌群数据库的比较研究，进一步验证 GRGM-13P 干预 DILI 的临床可行性。

综上所述，本研究表明 GRGM-13P 对 APAP 诱导的 DILI 具有显著保护作用，其机制可能与调节肠道微生态结构和恢复关键代谢通路有关。宏基因组学与代谢组学的联合应用为深入揭示中药复方的肝损伤作用机制提供了新视角，并为 DILI 防治策略的探索奠定了理论基础。

参考文献

[1] Allison R, Guraka A, Shawa IT, et al. Drug induced liver injury – a 2023 update [J]. J Toxicol Environ Health B, 2023, 26(8): 442-467.

[2] Andrade RJ, Chalasani N, Bjornsson ES, et al. Drug-induced liver injury [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 58-69.

[3] Hionides-Gutierrez A, Goikoetxea-Usandizaga N, Sanz-Garcia C, et al. Novel emerging mechanisms in acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. Liver Int, 2024, 44(3): 567-581.

[4] Chowdhury A, Nabila J, Adelusi TI, et al. Current etiological comprehension and therapeutic targets of acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. Pharmacol Res, 2020, 161: 105102.

[5] Jaeschke H, Ramachandran A. Acetaminophen hepatotoxicity: paradigm for understanding mechanisms of drug-induced liver injury [J]. Annu Rev Pathol, 2024, 19: 453-478.

[6] Zhu R, Gao Y, Dong J, et al. Changes of gut microbiota and metabolites in different drug-induced liver injuries [J]. J Med Microbiol, 2023, 72(11): 001705.

[7] Tao W, Fan Q, Wei J. Gut–liver axis as a therapeutic target for drug-induced liver injury [J]. Curr Issues Mol Biol, 2024, 46(2): 1219-1236.

[8] 赵艳霞. 蒙药古日古木-13 丸概述 [J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(8): 68-70.

[9] 美丽. 蒙药古日古木-13 的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2025, 31(2): 68-70.

[10] 李思潼, 彭雅宁, 刘晨旭, 等. 解毒护肝通络方对药物性肝损伤小鼠的保护作用及其对肠道菌群和肠黏膜屏障的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2024, 26(2): 351-359.

[11] Kang S, Bo Y, Yang D, et al. Tandem mass tag-based proteomics analysis reveals the effects of Guri Gumu-13 pill on drug-induced liver injury [J]. J Chromatogr B, 2022, 1206: 123353.

[12] Singh D, Khan MA, Siddique HR, et al. Unveiling the therapeutic promise of natural products in alleviating drug-induced liver injury: present advancements and future prospects [J]. Phytother Res, 2024, 38(1): 22-41.

[13] Li G, Hou Y, Zhang C, et al. Interplay between drug-induced liver injury and gut microbiota: a comprehensive overview [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2024, 18(3): 101355.

[14] Beger RD, Bhattacharyya S, Yang X, et al. Translational biomarkers of acetaminophen-induced acute liver injury [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(9): 1497-1522.

[15] Jourova L, Vavreckova M, Zemanova N, et al. Gut microbiome alters the activity of liver cytochromes P450 in mice with sex-dependent differences [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 1303.

[16] Lu J, Gong Y, Gao Y, et al. Wolfberry, yam and chrysanthemum polysaccharides increased intestinal Akkermansia muciniphila abundance and hepatic YAP1 expression to alleviate DILI [J]. FASEB J, 2023, 37(12):

e23286.
[17] Chen H, Li W, Zhang Q, et al. Microbiota-gut-liver axis: a new target for drug-induced liver injury [J]. Acta Pharmacol Sin, 2024, 45(5): 889-901.
[18] Yang F, Wu X, Liu C, et al. Selenium-containing compounds as hepatoprotective agents: mechanisms and therapeutic potential [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 215: 123-135.
[19] Xu B, Hao K, Chen X, et al. Broussonetia papyrifera polysaccharide alleviated acetaminophen-induced liver injury by regulating the intestinal flora [J]. Nutrients, 2022, 14(13): 2636.
[20] 文一如, 杨金拉姆, 美嘎, 等. 巨噬细胞极化与肠道菌群及其代谢产物在器官损伤中相关研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2025, 30(1): 1-9.
[21] An JK, Chung AS, Churchill DG. Nontoxic levels of Se-containing compounds increase survival by blocking oxidative and inflammatory stresses via signal pathways, whereas high levels of Se induce apoptosis [J]. Molecules, 2023, 28(13): 5234.
[22] Jiang Y, He X, Simonaro CM, et al. Acid ceramidase protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by modulating sphingolipid metabolism and reducing inflammation and oxidative stress [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 633657.
[23] Liu YJ, Li H, Tian Y, et al. PCTR1 ameliorates lipopolysaccharide-induced acute inflammation and multiple organ damage via regulation of linoleic acid metabolism by promoting FADS1/FADS2/ELOVL2 expression and reducing PLA2 expression [J]. Lab Invest, 2020, 100(7): 904-915.
[24] Zhou J, Feng Y, Zhou W, et al. Ultrasound-assisted metabolite detection in different extraction processes of Bletilla striata and bitter metabolite detection [J]. Ultrason Sonochem, 2025, 114: 107266.
[25] Swallah MS, Fan H, Wang S, et al. Prebiotic impacts of soybean residue (okara) on eubiosis/dysbiosis condition of the gut and the possible effects on liver and kidney functions [J]. Molecules, 2021, 26(2): 326.

Mechanistic study on the hepatoprotective effects of Gurigumu-13 Pill against drug-induced liver injury based on metabolomics and metagenomics

HUANG Yongqi[1], ZHAO Longshan[1,2], ZHAO Dongdong[1], BO Yukun[1], YANG Dan[1], GUO Jingjing[1], YANG Xuemiao[3], LV Yanan[3], LI Shumin[1], ZHANG Haiyan[1], WU Guodong[1], AN Ming[1]

[1] College of Pharmacy, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014040, Inner Mongolia, China; [2] College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 117004, Liaoning, China; [3] Pharmacy Department, Fourth Hospital of Baotou City, Baotou 014030, Inner Mongolia, China

ABSTRACT **AIM**: To evaluate the hepatoprotective effect of Gurigumu-13 Pill against acetaminophen (APAP)-induced drug-induced liver injury (DILI) and to explore its underlying mechanisms. **METHODS**: An APAP-induced DILI model was established in Sprague-Dawley rats by oral administration. Liver injury was assessed by measuring serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels, along with histopathological examination. Fecal microbiota composition was analyzed using metagenomic sequencing, and metabolic reprogramming was investigated through untargeted metabolomics. **RESULTS**: Compared with the model group, Gurigumu-13 Pill significantly reduced serum ALT and AST levels and improved hepatic histopathology. It markedly reversed APAP-induced gut microbiota dysbiosis, enhanced microbial diversity, and modulated metabolic pathways associated with DILI, thereby promoting the restoration of metabolic homeostasis. **CONCLUSION**: Gurigumu-13 Pill exerts a pronounced hepatoprotective effect by restoring intestinal microecological balance and re-establishing metabolic homeostasis.

KEYWORDS drug-induced liver injury; Gurigumu-13 Pill; metagenomics; metabolomics