·肝纤维化及肝硬化·

DOI：10.12449/JCH260819

鳖甲煎丸对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠模型的影响及其作用机制

吴龙达[1,2]，杜沅沁[1,2]，韦燕飞[1,2]，毛德文[3]，林 镛[3]，卢 露[1,2]，舒发明[3]

1 广西中医药大学，南宁 530000

2 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室，南宁 530200

3 广西中医药大学第一附属医院肝病科，南宁 530000

通信作者：舒发明，1013768213@qq.com（ORCID：0000-0002-9633-3146）

摘要：目的 探讨鳖甲煎丸对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的治疗作用及其基于胆汁酸-短链脂肪酸代谢轴的机制。**方法** 采用四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化模型，将32只SD雄性大鼠随机分为对照组、模型组、鳖甲煎丸组（2.2 g/kg）和水飞蓟素组（43.19 mg/kg），每组8只。除对照组外，其余各组腹腔注射四氯化碳（4∶6玉米油稀释，2 mL/kg）诱导肝纤维化模型，连续8周，给药组同时灌胃相应药物。采用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、总胆红素（TBil）和白蛋白（Alb）水平；氯胺T比色法检测肝组织羟脯氨酸（HYP）含量；苏木精-伊红染色和马松染色观察肝组织病理学变化；UPLC-MS/MS和GC-MS分别检测胆汁酸和短链脂肪酸水平。所有数据均经Shapiro-Wilk检验和Levene检验进行正态性和方差齐性验证；满足正态分布的计量资料采用单因素方差分析进行多组间比较，进一步两两比较采用LSD-*t*检验；Ishak评分多组间比较采用Kruskal-Wallis *H*检验，进一步两两比较采用Dunn's检验。对代谢组学数据中有差异的代谢物进行筛选，采用Benjamini-Hochberg法进行多重比较校正。结合正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）模型得到变量重要性投影（VIP）值，选取VIP>1且*P*<0.05的代谢物作为组间的显著差异代谢物。OPLS-DA模型的稳健性通过200次置换检验进行评估，并报告模型的主要参数模型，包括对分类变量的解释率（R^2Y）和模型的预测能力（Q^2）。采用Spearman进行等级相关性分析。**结果** 染色结果显示，鳖甲煎丸组肝细胞排列较整齐，炎性细胞浸润和胶原纤维沉积明显减轻。与对照组相比，模型组血清TBil和HYP水平均显著升高，Alb水平显著降低（*P*值均<0.05）。与对照组相比，鳖甲煎丸组血清AST、ALT、TBil和HYP水平显著升高，Alb水平显著降低（*P*值均<0.05）；水飞蓟素组血清ALT、TBil和HYP水平显著升高，Alb水平显著降低（*P*值均<0.05）。与模型组比较，鳖甲煎丸组血清ALT、AST、TBil和HYP水平均显著降低（*P*值均<0.05），水飞蓟素组血清ALT、TBil、HYP和AST水平显著降低，Alb水平显著升高（*P*值均<0.05）。机制研究表明，与对照组相比，模型组牛磺石胆酸、牛磺-α-鼠胆酸、牛磺胆酸、甘氨脱氧胆酸、牛磺猪胆酸、鹅去氧胆酸、甘氨猪去氧胆酸、7,12-二酮石胆酸、牛磺鹅去氧胆酸和甘氨鹅去氧胆酸水平均显著下降（*P*值均<0.05），猪去氧胆酸、去甲胆酸、β-鼠胆酸和胆酸水平均显著提高（*P*值均<0.05）。与模型组比较，鳖甲煎丸组保护性胆汁酸牛磺石胆酸、牛磺胆酸、牛磺猪胆酸、鹅去氧胆酸和牛磺脱氧胆酸水平均显著升高（*P*值均<0.05），牛磺-α-鼠胆酸、牛磺-β-鼠胆酸、牛磺猪去氧胆酸+牛磺熊去氧胆酸、α-鼠胆酸、甘氨熊去氧胆酸和去甲胆酸水平均显著降低（*P*值均<0.05）；短链脂肪酸中乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和己酸水平均显著升高（*P*值均<0.05）。与模型组相比，水飞蓟素组牛磺石胆酸、牛磺-α-鼠胆酸、去甲胆酸、甘氨胆酸、脱氧胆酸、牛磺-β-鼠胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸+牛磺熊去氧胆酸和α-鼠胆酸水平均显著下降（*P*值均<0.05），牛磺胆酸和鹅去氧胆酸显著升高（*P*值均<0.05），短链脂肪酸中乙酸、丙酸、戊酸和己酸水平均显著升高（*P*值均<0.05）。相关性分析结果表示，胆汁酸及短链脂肪酸代谢与血清指标的变化之间存在密切联系。**结论** 鳖甲煎丸可通过调节胆汁酸-短链脂肪酸代谢轴改善四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠模型。

关键词： 肝纤维化；鳖甲煎丸；水飞蓟素；大鼠，Sprague-Dawley

基金项目： 国家自然科学基金（82274434）

Effect and mechanism of action of Biejiajian Pills on a rat model of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride

Wu Longda[1,2], *Du Yuanqin*[1,2], *Wei Yanfei*[1,2], *Mao Dewen*[3], *Lin Yong*[3], *Lu Lu*[1,2], *Shu Faming*[3]

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine for Treating High-Incidence Infectious Diseases with Integrative Medicine, Nanning 530200, China; 3. Department of Hepatology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China

Corresponding author: Shu Faming, 1013768213@qq.com (ORCID: 0000-0002-9633-3146)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of Biejiajian Pills on rats with carbon tetrachloride (CCl_4)-induced hepatic fibrosis and its mechanism based on the bile acid (BA)-short-chain fatty acid (SCFA) metabolic axis. **Methods** The method of CCl_4 induction was used to establish a rat model of hepatic fibrosis, and 32 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, model group, Biejiajian Pills group (2.2 g/kg), and silymarin group (43.19 mg/kg), with 8 rats in each group. All rats except those in the control group were given intraperitoneal injection of CCl_4 (diluted with corn oil at a ratio of 4∶6, 2 mL/kg) to induce a model of hepatic fibrosis for 8 consecutive weeks, and the rats in the drug administration groups were given the corresponding drug by gavage. An automatic biochemical analyzer was used to measure the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBil), and albumin (Alb); chloramine-T colorimetry was used to measure the content of hydroxyproline (HYP) in liver tissue; HE staining and Masson staining were used to observe liver histopathological changes; UPLC-MS/MS and GC-MS were used to measure the levels of BAs and SCFAs. The Shapiro-Wilk test and the Levene test were performed for all data to determine normality and homogeneity of variance; a one-way analysis of variance was used for comparison of normally distributed continuous data between multiple groups, and the least significant difference *t*-test was used for further comparison between two groups; the Kruskal-Wallis *H* test was used for comparison of Ishak score between groups, and the Dunn's test was used for further comparison between two groups. The Benjamini-Hochberg method was used for multiple comparison correction in the screening of differentially expressed metabolites in metabolomics data. The variable importance in projection (VIP) values were obtained in combination with the orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) model, and metabolites with VIP>1 and $P<0.05$ were selected as significantly differentially expressed metabolites between groups. The robustness of the OPLS-DA model was evaluated through 200 permutation tests, and the main parameters of the model were reported, including the interpretation rate of the model for categorical variables (R^2Y) and the predictive ability of the model (Q^2). A Spearman's rank correlation analysis was performed. **Results** The results of staining showed ordered arrangement of hepatocytes in the Biejiajian Pills group, with significant alleviation of inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition. Compared with the control group, the model group had significant increases in the serum levels of TBil and HYP and a significant reduction in the serum level of Alb (all $P<0.05$). Compared with the control group, the Biejiajian Pills group had significant increases in the serum levels of AST, ALT, TBil, and HYP and a significant reduction in the serum level of Alb (all $P<0.05$), and the silymarin group had significant increases in the serum levels of ALT, TBil, and HYP and a significant reduction in the serum level of Alb (all $P<0.05$). Compared with the model group, the Biejiajian Pills group had significant reductions in the serum levels of ALT, AST, TBil, and HYP (all $P<0.05$), and the silymarin group had significant reductions in the serum levels of ALT, TBil, HYP, and AST and a significant increase in the serum level of Alb (all $P<0.05$). Mechanism studies showed that compared with the control group, the model group had significant reductions in the levels of taurolithocholic acid, tauro-α-muricholic acid, taurocholic acid, glycodeoxycholic acid, taurohyocholic acid, chenodeoxycholic acid, glycohyodeoxycholic acid, 7, 12-diketolithocholic acid, taurochenodeoxycholic acid, and glycochenodeoxycholic acid and significant increases in the levels of hyodeoxycholic acid, norcholic acid, β-muricholic acid, and cholic acid (all $P<0.05$). Compared with the model group, the Biejiajian Pills group had significant increases in the levels of the protective BAs taurolithocholic acid, chenodeoxycholic acid, taurocholic acid, taurohyocholic acid, and taurodeoxycholic acid and significant reductions in the levels of tauro-α-muricholic acid, tauro-β-muricholic acid, taurohyodeoxycholic acid+tauroursodeoxycholic acid, α-muricholic acid, glycoursodeoxycholic acid, and norcholic acid (alll $P<0.05$). As for SCFAs, compared with the model group, the Biejiajian Pills group had significant increases in the levels of acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid,

isopentanoic acid, pentanoic acid, and hexanoic acid (all $P<0.05$). Compared with the model group, the silymarin group had significant reductions in the levels of taurolithocholic acid, tauro-α-muricholic acid, norcholic acid, glycocholic acid, deoxycholic acid, tauro-β-muricholic acid, taurodeoxycholic acid, taurohyodeoxycholic acid+tauroursodeoxycholic acid, and α-muricholic acid and significant increases in the levels of taurocholic acid and chenodeoxycholic acid, as well as significant increases in the levels of the SCFAs acetic acid, propionic acid, pentanoic acid, and hexanoic acid (all $P<0.05$). The correlation analysis showed that the metabolism of BAs and SCFAs was correlated with the changes in serum indicators. **Conclusion** Biejiajian Pills can alleviate CCl_4-induced hepatic fibrosis in rats by regulating the BA/SCFA metabolic axis.

Key words: Hepatic Fibrosis; Bie Jia Jian Wan; Silymarin; Rats, Sprague-Dawley

Research funding: National Natural Science Foundation of China (82274434)

肝纤维化作为一种持续肝损伤引发的动态组织重塑过程,其恶化与恢复受损伤程度及干预时机等多种因素的影响[1]。肝纤维化的主要病理特征表现为细胞外基质中的胶原蛋白在肝脏中过度堆积,当肝纤维化进一步发展,肝小叶结构不断被胶原纤维破坏,形成粗大的纤维间隔和假小叶,肝脏生理功能发生不可逆变化时,疾病即进入肝硬化阶段[2]。其后续可能导致门静脉高压[3]及相关并发症、肝衰竭[4]、肝性脑病[5],以及肝细胞癌发病风险显著增加[6]。肝纤维化及其相关病症每年给全球健康体系带来日益沉重的负担[7]。目前,针对肝纤维化的治疗策略主要侧重于病因控制和并发症管理,但这类治疗方式主要通过减轻持续肝损伤间接影响纤维化进程,对已形成的纤维组织缺乏直接逆转作用,这一现状凸显了当前肝纤维化治疗领域面临的巨大困境。

短链脂肪酸作为胃肠道内复杂微生物群落生理状态下的产物,不仅为肠上皮细胞提供能量并维持肠道屏障完整性,还具有全身性抗炎和免疫调节作用[8]。胆汁酸是在肝脏中由胆固醇合成,并在肠道中经菌群修饰(如去结合和7α-脱羟基)的类固醇分子。短链脂肪酸和胆汁酸不仅是脂质消化所必需的物质,更是重要的信号分子,通过激活法尼酯X受体(farnesoid X receptor,FXR)和G蛋白偶联胆汁酸受体1等核受体,调控肝脏代谢、炎症和纤维化过程[9],从而发挥抗纤维化作用。鳖甲煎丸作为《金匮要略》里的经典名方,由23种成分组成[10]。现代中医学认为,鳖甲煎丸具有软坚散结、益气养血、活血化瘀等作用[11]。已有研究表明,鳖甲煎丸在抗纤维化过程中具有一定的作用[12],但其是否能通过调节胆汁酸和短链脂肪酸的代谢紊乱以发挥保肝作用,从而延缓肝纤维化的进展,还需要更进一步的研究加以验证。水飞蓟素是从奶蓟草中提取的黄酮木脂素类化合物,是全球范围内应用最广泛、研究最深入的保肝天然产物之一。数十年来,其一直被作为保肝研究中的阳性对照金标准,广泛应用于各类肝损伤模型的药效验证。

1 材料与方法

1.1 *实验用药和试剂* 鳖甲煎丸(武汉中联药业集团股份有限公司,国药准字Z42020772,批号:211970,规格:3 g/袋),其组方按照《金匮要略》配制,共含23味药材:鳖甲12分(炙)、乌扇3分(炮)、黄芩3分、柴胡6分、鼠妇3分(熬)、干姜3分、大黄3分、芍药5分、桂枝3分、葶苈1分(熬)、石苇3分(去毛)、厚朴3分、牡丹5分(去心)、瞿麦2分、紫葳3分、半夏1分、人参1分、土鳖虫5分(熬)、阿胶3分(炙)、蜂窠4分(炙)、赤硝12分、蜣螂6分(熬)和桃仁2分。盐酸二甲双胍片(河北天成药业股份有限公司,国药准字H13021647,批号:H20240044,规格:0.25 g×120片)。四氯化碳(carbon tetrachloride,CCl_4)购于天津市恒兴化学试剂制造有限公司。

1.2 *动物和实验设计* 选用32只无特定病原体级SD雄性大鼠,均购自湖南纳斯达克实验动物中心,动物使用许可证编号:SYXK(桂)2019-0001,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2021-0002。所有动物实验在广西中医药大学仙葫校区动物实验中心6楼无特定病原体级实验室开展。实验期间,所有大鼠均饲养在单元化的无特定病原体笼中,连接正压换气及过滤系统,恒温24~26 ℃,相对湿度60%~70%,光照依据昼夜节律进行开关,自由进食、取水,定期专人更换垫料。

适应性喂养1周后,将大鼠随机分为4组,分别为:正常对照组(大鼠腹腔注射玉米油,剂量为1 mL/kg)、模型组(将CCl_4溶解在玉米油中,比例为4∶6,并通过腹腔注射CCl_4混合液,给药剂量为2 mL/kg)、鳖甲煎丸组(在腹腔注射CCl_4混合液的同时,大鼠额外通过灌胃的方式给予鳖甲煎丸,剂量为2.2 g/kg)和水飞蓟素组(大鼠在持续给予腹腔注射CCl_4混合液的同时,额外通过灌胃的

方式给予水飞蓟素，剂量为43.19 mg/kg），每组8只。造模持续8周。

1.3 样本采集 末次干预24 h后，禁食12 h，腹腔注射1.25%三溴乙醇（20 mL/kg）麻醉条件下进行解剖，行开腹手术，经肝下胆管插管收集胆汁；通过腹主动脉取血，离心分离血清，-80 ℃保存。完整取出肝脏，部分组织用4%多聚甲醛固定，部分冻存于-80 ℃。收集结肠内容物，经液氮速冻后转-80 ℃保存，并最终处死动物。

1.4 生化指标测定 血清中丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate transferase，AST）、总胆红素（total bilirubin，TBil）及白蛋白（albumin，Alb）水平采用7020全自动生化分析仪（Hitachi，日本）进行测定。肝组织羟脯氨酸（hydroxyproline，HYP）含量采用碱水解法处理样本后，使用分光光度计（BioTek Synergy H1）通过氯胺T比色法进行测定，以评估肝纤维化程度。以上操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 肝脏组织病理学检测 固定后的肝组织经脱水、透明、石蜡包埋后，制备4 μm厚切片。分别进行苏木精-伊红染色（hematoxylin and eosin staining，HE染色）观察组织形态与炎性浸润，马松染色（Masson染色）显示总胶原沉积。所有切片由两位不知晓分组情况的病理学家在光学显微镜下独立观察并评分。HE染色程度采用Ishak评分系统进行半定量评估。

1.6 胆汁酸水平的测定 样本经甲醇沉淀蛋白预处理后，使用ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱（1.7 μm，2.1×100 mm）进行分离。流动相为含0.1%甲酸的水溶液（A）和甲醇（B），梯度洗脱（0～15 min，60%～90% B），流速为0.3 mL/min。质谱检测采用电喷雾离子源负离子模式，喷雾电压为-4 500 V，离子源温度为550 ℃。最后，利用Multiquant 3.0.3软件获取定量数据，并基于mixOmics进行正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）。胆汁酸水平采用UPLC-MS/MS系统（Waters UPLC I-Class/AB4000 QqQ）进行定量检测。

1.7 盲肠内容物中短链脂肪酸水平的测定 样本经20%磷酸酸化处理后，使用DB-FFAP色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）进行分离，升温程序为：初始温度90 ℃维持1 min，先以10 ℃/min升至160 ℃，再以40 ℃/min升至240 ℃并保持5 min。质谱检测采用电子轰击电离源，采用全扫描模式（质量范围m/z 40～400）。最终通过内标法（以4-甲基戊酸为内标）进行定量，数据由MSD ChemStation工作站处理。盲肠内容物中的短链脂肪酸水平采用GC-MS系统（Agilent 7890B/5977B）进行分析。

1.8 统计学方法 采用SPSS 23.0统计软件进行数据分析，采用GraphPad Prism 8.0绘制图表。计量资料先通过Shapiro-Wilk检验评估数据正态性，再以Levene检验判断方差齐性。满足正态分布且方差齐的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验；Ishak评分以$M(P_{25}\sim P_{75})$表示，多组间比较采用Kruskal-Wallis H检验，进一步两两比较采用Dunn's检验。对代谢组学数据中有差异的代谢物进行筛选，采用Benjamini-Hochberg法进行多重比较校正。结合OPLS-DA模型得到变量重要性投影（variable importance in projection，VIP）值，选取VIP>1且P<0.05的代谢物作为组间的显著差异代谢物。OPLS-DA模型的稳健性通过200次置换检验进行评估，并报告模型的主要参数R^2Y（模型对分类变量的解释率）和Q^2（模型的预测能力）。为探究胆汁酸、短链脂肪酸与血清生化指标间的潜在关联，采用Spearman等级相关性分析，以相关系数$|r|$>0.5且P<0.05作为存在显著相关性的阈值。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鳖甲煎丸及水飞蓟素减轻大鼠肝损伤和肝纤维化 HE染色和Masson染色结果显示，模型组大鼠肝细胞排列紊乱，出现明显炎性细胞浸润及胶原纤维沉积；经鳖甲煎丸和水飞蓟素干预后，肝组织损伤程度、炎症浸润及胶原沉积面积均显著减轻（图1）。各组Ishak评分结果显示，模型组肝脏病理学评分显著高于对照组[4.0（3.3～4.8）分 vs 0.0（0.0～0.0）分，P<0.01]，表明模型诱导成功。与模型组相比，鳖甲煎丸组的病理学评分显著降低[2.0（2.0～3.0）分 vs 4.0（3.3～4.8）分，P<0.05]，而水飞蓟素组评分[3.0（2.0～3.8）分]虽有降低趋势，但差异无统计学意义（P>0.05）。

与对照组相比，模型组血清TBil和HYP水平均显著升高（P值均<0.05），而Alb水平显著降低（P<0.05），提示成功建立了肝纤维化大鼠模型。与对照组相比，鳖甲煎丸组血清AST、ALT、TBil和HYP水平显著升高，Alb水平显著降低（P值均<0.05）；水飞蓟素组血清ALT、TBil和HYP水平显著升高，Alb水平显著降低（P值均<0.05）；与模型组比较，鳖甲煎丸组血清AST、ALT、TBil和HYP水平均显著降低（P值均<0.05），水飞蓟素组血清ALT、TBil、HYP和AST水平显著降低，Alb水平显著升高（P值

均<0.05)(图2)。提示鳖甲煎丸与水飞蓟素同步干预均能显著逆转上述指标异常。

2.2　鳖甲煎丸调节大鼠胆汁酸代谢　各组样本间的胆汁酸代谢谱未呈现显著聚类差异，但可观察到鳖甲煎丸和水飞蓟素干预组相对于模型组存在一定的偏移趋势(图3a)。鉴于对组内变异较为敏感，进一步采用更能突出组间差异的OPLS-DA模型进行分析。定量分析表明(表1)，鳖甲煎丸干预显著上调肝纤维化模型大鼠的牛磺酸结合胆汁酸水平，显著降低初级胆汁酸、次级胆汁酸和未结合型胆汁酸水平(*P*值均<0.05)。

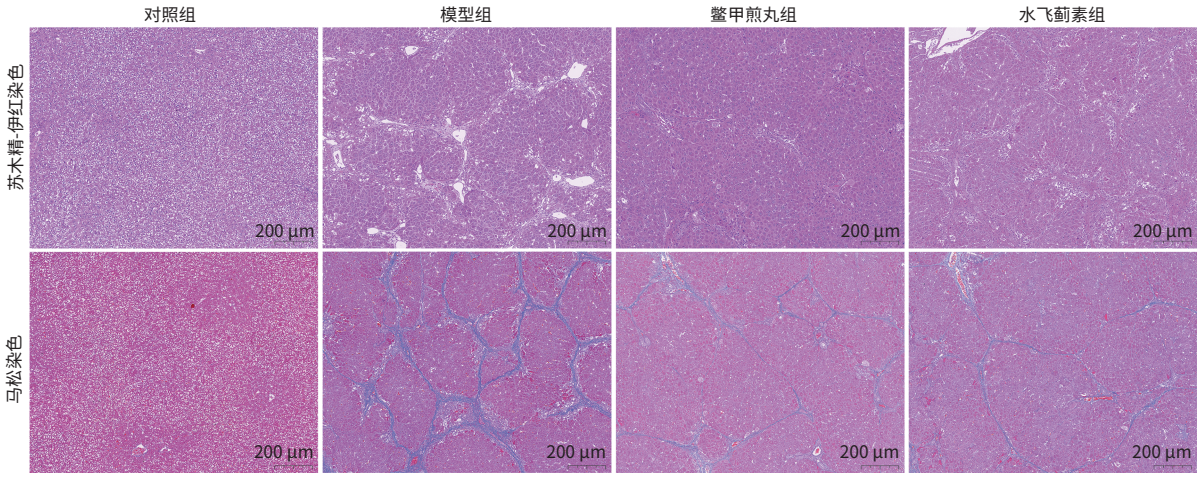
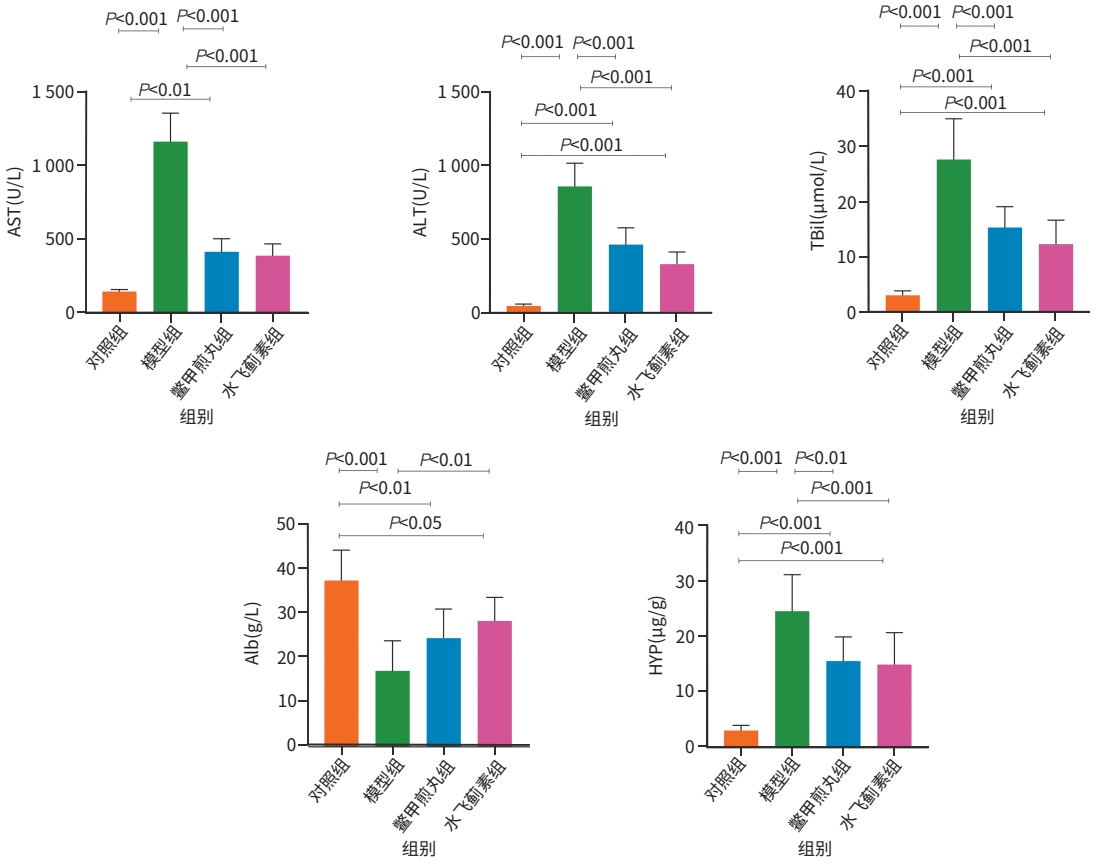


图1　各组大鼠肝脏组织病理学染色(×20)

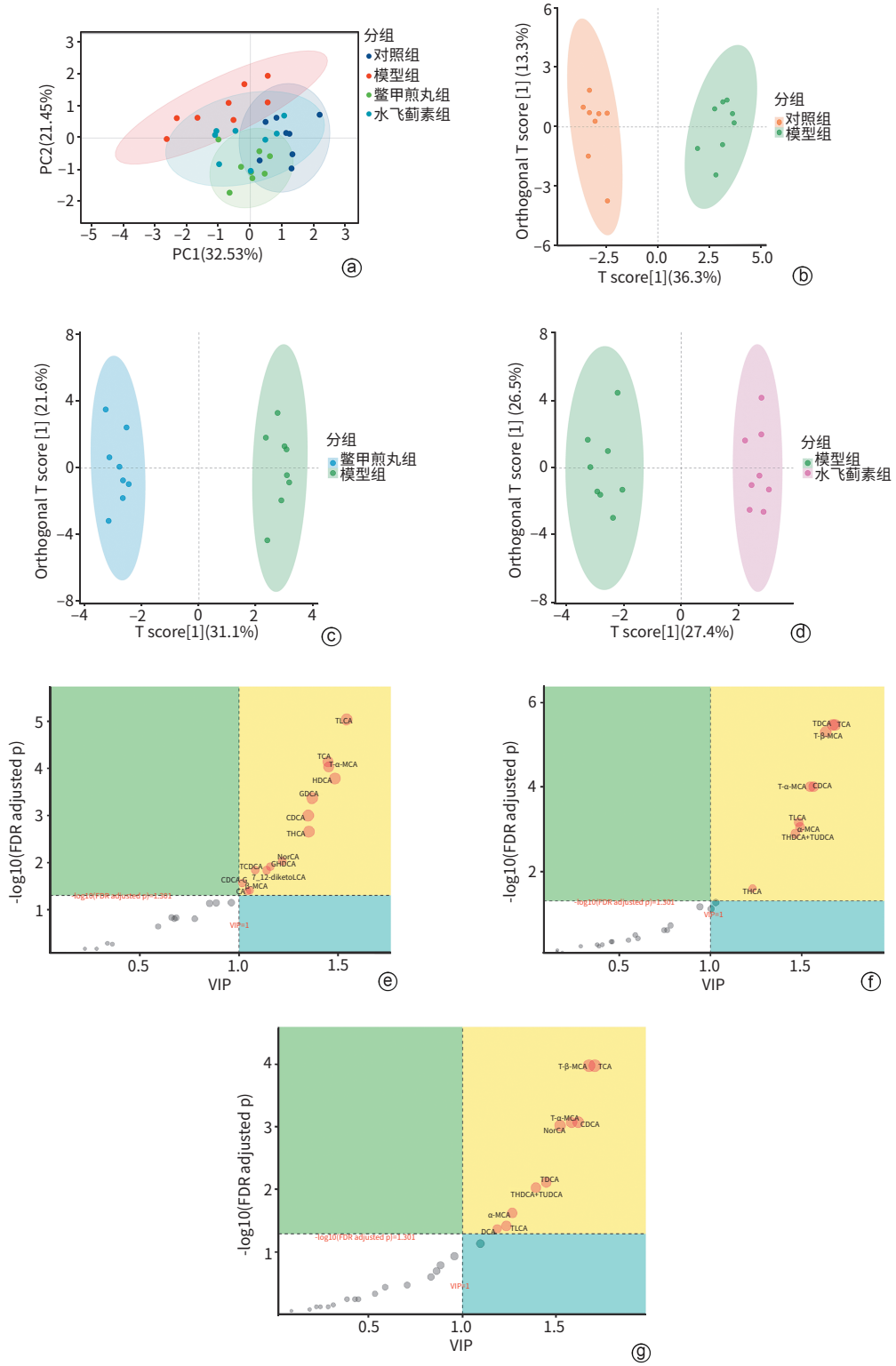
Figure 1　Histological staining of liver tissues from each group of rats



注：AST，天冬氨酸氨基转移酶；ALT，丙氨酸氨基转移酶；TBil，总胆红素；Alb，白蛋白；HYP，羟脯氨酸。

图2　各组大鼠血清指标检测结果

Figure 2　Detection results of serum parameters in each group of rats



注：a，主成分分析图；b～d，对照组vs模型组、模型组vs鳖甲煎丸组、模型组vs水飞蓟素组的OPLS-DA模型正交信号校正得分图；e～g，对照组vs模型组、模型组vs鳖甲煎丸组、模型组vs水飞蓟素组的OPLS-DA胆汁酸差异图。HDCA，猪去氧胆酸；NorCA，去甲胆酸；β-MCA，β-鼠胆酸；CA，胆酸；TLCA，牛磺石胆酸；T-α-MCA，牛磺-α-鼠胆酸；TCA，牛磺胆酸；GDCA，甘氨脱氧胆酸；THCA，牛磺猪胆酸；CDCA，鹅去氧胆酸；GHDCA，甘氨猪去氧胆酸；7_12-diketoLCA，7，12-二酮石胆酸；TCDCA，牛磺鹅去氧胆酸；CDCA-G，甘氨鹅去氧胆酸；T-β-MCA，牛磺-β-鼠胆酸；THDCA+TUDCA，牛磺猪去氧胆酸+牛磺熊去氧胆酸；α-MCA，α-鼠胆酸；TDCA，牛磺脱氧胆酸；DCA，脱氧胆酸；FDR，假发现率；VIP，变量重要性投影。

图3　鳖甲煎丸和水飞蓟素调节肝纤维化大鼠的胆汁酸代谢

Figure 3　Biejiajian Pills and silybin regulate bile acid metabolism in rats with liver fibrosis

表1 各组大鼠胆汁酸变化比较

Table 1 Comparison of bile acid changes in rats of each experimental group

组别	动物数（只）	初级胆汁酸（μg/mL）	次级胆汁酸（μg/mL）	未结合型胆汁酸（μg/mL）	甘氨酸结合胆汁酸（μg/mL）
对照组	8	33.69±16.56	7.37±3.43	42.21±19.59	382.01±208.54
模型组	8	57.50±11.84	20.51±4.45	78.01±12.11	474.47±320.09
鳖甲煎丸组	8	34.27±8.03[1)]	13.11±5.30[1)]	47.38±11.02[1)]	237.57±80.83
水飞蓟素组	8	38.34±10.54	13.53±4.75[1)]	51.87±13.13[1)]	360.12±119.75
*F*值		6.829	11.250	9.845	1.824
*P*值		0.001	<0.001	0.001	0.166

组别	动物数（只）	牛磺酸结合胆汁酸（μg/mL）	结合型胆汁酸（μg/mL）	总胆汁酸（μg/mL）
对照组	8	3 480.90±647.64	3 862.90±836.07	3 905.11±845.83
模型组	8	2 679.12±724.42	3 153.59±918.34	3 231.60±916.80
鳖甲煎丸组	8	3 756.20±906.04[1)]	3 993.77±960.30	4 041.15±958.94
水飞蓟素组	8	3 650.80±794.31[1)]	4 010.92±752.40	4 062.79±752.10
*F*值		3.186	1.745	1.617
*P*值		0.039	0.181	0.208

注：与模型组比较，1）*P*<0.05。

OPLS-DA评分图（图3b～d）显示，对照组vs模型组（R^2Y=0.977，Q^2=0.905）、模型组vs鳖甲煎丸组（R^2Y=0.989，Q^2=0.962）和模型组vs水飞蓟素组（R^2Y=0.983，Q^2=0.906）的模型均具有良好的解释率和预测能力。经200次置换检验证实模型未出现过拟合。基于此，结合VIP>1和多重比较校正后的显著性水平（*P*<0.05），筛选出各组间的差异胆汁酸（图3e～g，表2）。与对照组相比，模型组中猪去氧胆酸、去甲胆酸、β-鼠胆酸和胆酸均显著升高（*P*值均<0.05），而牛磺石胆酸、牛磺-α-鼠胆酸、牛磺胆酸、甘氨脱氧胆酸、牛磺猪胆酸、鹅去氧胆酸、甘氨猪去氧胆酸、7，12-二酮石胆酸、牛磺鹅去氧胆酸和甘氨鹅去氧胆酸显著降低（*P*值均<0.05）；与模型组相比，鳖甲煎丸组中牛磺-α-鼠胆酸、去甲胆酸、牛磺-β-鼠胆酸、牛磺猪去氧胆酸+牛磺熊去氧胆酸、α-鼠胆酸和甘氨熊去氧胆酸均显著下降（*P*值均<0.05），牛磺石胆酸、牛磺胆酸、牛磺猪胆酸、鹅去氧胆酸和牛磺脱氧胆酸显著上升（*P*值均<0.05）；与模型组相比，水飞蓟素组则特异性降低牛磺石胆酸、牛磺-α-鼠胆酸、去甲胆酸、甘氨胆酸、脱氧胆酸、牛磺-β-鼠胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸+牛磺熊去氧胆酸和α-鼠胆酸水平（*P*值均<0.05），并显著上调牛磺胆酸和鹅去氧胆酸（*P*值均<0.05）。

2.3 鳖甲煎丸调节大鼠短链脂肪酸代谢 主成分分析显示，各组短链脂肪酸代谢谱呈现特定分布模式，但组间差异未达显著水平（图4）。定量分析表明（表3），与模型组相比，鳖甲煎丸组和水飞蓟素同步干预后，乙酸、丙酸、戊酸和己酸均呈现显著改变（*P*值均<0.05）；鳖甲煎丸组异丁酸、丁酸和异戊酸呈现显著上调（*P*值均<0.05），表明上述两种干预方案对短链脂肪酸代谢均具有特异性调节作用。

2.4 胆汁酸及短链脂肪酸与血清指标的相关性分析 肝纤维化的病理进程与宿主肝损伤密切相关，而胆汁酸与短链脂肪酸的结构改变可通过代谢调控进一步影响疾病表型。为进一步揭示胆汁酸、短链脂肪酸与肝纤维化表型之间的代谢互作网络，本研究基于Spearman相关性分析（阈值>0.5），系统探究了胆汁酸谱、短链脂肪酸与血清肝功能指标之间的关联特征。胆汁酸与血清指标的相关性分析显示（图5a），肝损伤指标与特定胆汁酸代谢物呈现显著的共变关系。TBil水平与脱氧胆酸、β-鼠胆酸、去甲胆酸、猪去氧胆酸和胆酸呈正相关，提示疏水性结合胆汁酸的累积可能与胆汁淤积性肝损伤密切相关。HYP、ALT、AST水平则与牛磺-α-鼠胆酸和牛磺石胆酸呈负相关，而与脱氧胆酸、β-鼠胆酸、去甲胆酸、猪去氧胆酸和胆酸呈正相关。Alb水平作为肝脏合成功能指标，与牛磺-α-鼠胆酸、牛磺石胆酸呈正相关，与β-鼠胆酸、去甲胆酸和猪去氧胆酸呈负相关，提示胆汁酸代谢稳态的恢复有助于改善肝脏合成功能。

胆汁酸与短链脂肪酸的相关性分析揭示了二者之间可能存在代谢耦联关系（图5b）。亲水性胆汁酸（如鹅去氧胆酸、牛磺胆酸）与乙酸、己酸、戊酸呈正相关趋势，提示在生理状态下亲水性胆汁酸与短链脂肪酸存在协同代谢关系。相反，疏水性胆汁酸（如猪去氧胆酸、去甲胆

表2 胆汁酸代谢物的统计分析

Table 2 Statistical analysis of bile acid metabolites

代谢物	模型组vs对照组		模型组vs鳖甲煎丸组		模型组vs水飞蓟素组	
	*P*值	VIP	*P*值	VIP	*P*值	VIP
牛磺石胆酸	↓<0.01	1.52	↓<0.05	1.48	↑<0.05	1.22
猪去氧胆酸	↑<0.01	1.50	—	—	—	—
牛磺-α-鼠胆酸	↓<0.01	1.47	↑<0.05	1.54	↑<0.05	1.52
牛磺胆酸	↓<0.01	1.46	↓<0.01	1.64	↓<0.01	1.60
甘氨脱氧胆酸	↓<0.01	1.37	—	—	—	—
牛磺猪胆酸	↓<0.05	1.34	↓<0.05	1.25	—	—
鹅去氧胆酸	↓<0.05	1.32	↓<0.01	1.54	↓<0.01	1.62
去甲胆酸	↑<0.05	1.20	↑<0.05	1.03	↑<0.05	1.48
甘氨猪去氧胆酸	↓<0.05	1.16	—	—	—	—
7,12-二酮石胆酸	↓<0.05	1.11	—	—	—	—
牛磺鹅去氧胆酸	↓<0.05	1.09	—	—	—	—
β-鼠胆酸	↑<0.05	1.06	—	—	—	—
胆酸	↑<0.05	1.03	—	—	—	—
甘氨鹅去氧胆酸	↓<0.05	1.02	—	—	—	—
甘氨石胆酸	—	—	—	—	—	—
熊胆酸	—	—	—	—	—	—
甘氨胆酸	—	—	—	—	↑<0.05	1.10
脱氧胆酸	—	—	—	—	↑<0.05	1.15
牛磺-β-鼠胆酸	—	—	↑<0.01	1.61	↑<0.01	1.63
牛磺脱氧胆酸	—	—	↓<0.01	1.63	↑<0.01	1.41
熊去氧胆酸	—	—	—	—	—	—
别胆酸	—	—	—	—	—	—
牛磺猪去氧胆酸+牛磺熊去氧胆酸	—	—	↑<0.05	1.44	↑<0.01	1.37
α-鼠胆酸	—	—	↑<0.05	1.48	↑<0.01	1.27
β-胆酸	—	—	—	—	—	—
12-酮石胆酸	—	—	—	—	—	—
甘氨熊去氧胆酸	—	—	↑<0.05	1.00	—	—

注：↑，与后组相比上调；↓，与后组相比下调。VIP，变量重要性投影；VIP>1，对两组间的差异有显著贡献；VIP<1，对分组的贡献较小。—，*P*>0.05或VIP<1。

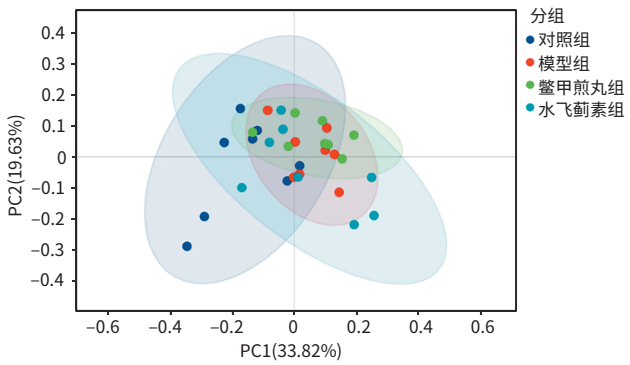


图4 肝纤维化大鼠模型的短链脂肪酸代谢主成分分析

Figure 4 Principal component analysis diagram of short-chain fatty acid metabolism in rats with liver fibrosis

酸）与丁酸、异丁酸呈显著负相关。值得注意的是，脱氧胆酸作为典型的疏水性胆汁酸，与丁酸呈显著负相关，而与HYP呈显著正相关，提示肠道菌群介导的7α-脱羟基转化增强（产生脱氧胆酸）与短链脂肪酸生成减少（丁酸降低）共同构成了“肠-肝轴”失衡的核心特征。

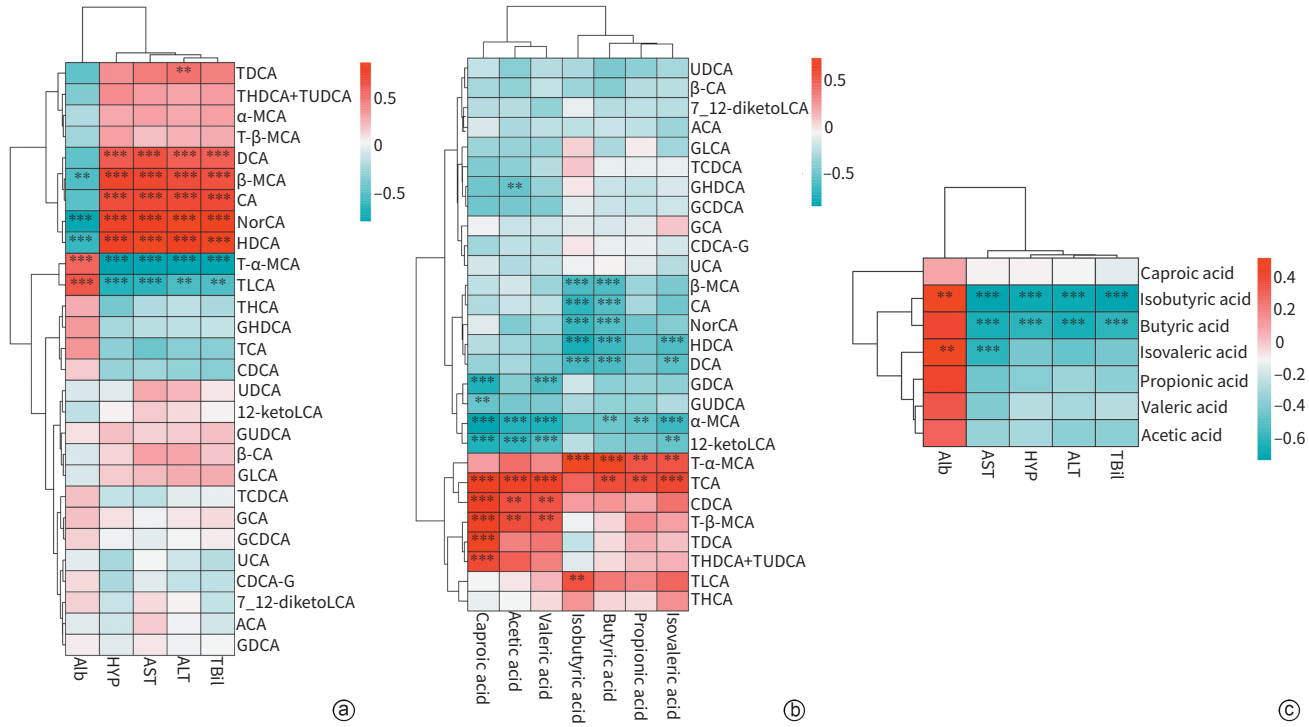
短链脂肪酸与血清指标的相关性分析显示（图5c），短链脂肪酸与肝纤维化表型呈现广泛的负相关关系。丁酸与ALT、AST、HYP水平均呈显著负相关，证实了丁酸通过加固肠道屏障、抑制肝星状细胞（hepatic stellate cell，HSC）活化而发挥保肝作用。值得注意的是，乙酸、戊酸、丙酸与各指标的相关性较弱且关联方向不一，可能与短链脂肪酸作用的双向性有关。

表3　各实验组大鼠短链脂肪酸变化比较

Table 3　Comparison of short-chain fatty acid changes in rats of each experimental group

组别	动物数（只）	乙酸（μg/g）	丙酸（μg/g）	异丁酸（μg/g）	丁酸（μg/g）	异戊酸（μg/g）	戊酸（μg/g）	己酸（μg/g）
对照组	8	1 388.22±286.45	517.23±156.46	52.50±13.42	310.87±61.73	32.33±7.23	61.04±9.77	1.81±0.07
模型组	8	1 065.74±296.86	327.52±57.69	26.19±3.65	158.84±24.40	24.79±4.88	46.01±5.76	1.36±0.42
鳖甲煎丸组	8	1 648.83±362.53[1)]	500.07±68.01[1)]	43.57±4.26[1)]	286.35±54.63[1)]	34.25±10.08[1)]	79.57±9.20[1)]	3.57±0.22[1)]
水飞蓟素组	8	1 527.84±343.87[1)]	508.52±90.00[1)]	42.15±4.46	269.47±49.40	33.86±7.27	70.46±13.27[1)]	2.49±0.34[1)]
*F*值		4.824	6.511	16.560	14.710	2.717	16.870	85.780
*P*值		0.008	0.002	<0.001	<0.001	0.047	<0.001	<0.001

注：与模型组比较，1）*P*<0.05。



注：a，胆汁酸与血清指标的相关性；b，胆汁酸与短链脂肪酸的相关性；c，短链脂肪酸与血清指标的相关性。TDCA，牛磺脱氧胆酸；THDCA，牛磺猪去氧胆酸；TUDCA，牛磺熊去氧胆酸；α-MCA，α-鼠胆酸；T-β-MCA，牛磺-β-鼠胆酸；DCA，脱氧胆酸；β-MCA，β-鼠胆酸；CA，胆酸；NorCA，去甲胆酸；HDCA，猪去氧胆酸；T-α-MCA，牛磺-α-鼠胆酸；TLCA，牛磺石胆酸；THCA，牛磺猪胆酸；GHDCA，甘氨猪去氧胆酸；TCA，牛磺胆酸；CDCA，鹅去氧胆酸；UDCA，熊去氧胆酸；12-ketoLCA，12-酮石胆酸；GUDCA，甘氨熊去氧胆酸；β-CA，β-胆酸；GLCA，甘氨石胆酸；TCDCA，牛磺鹅去氧胆酸；GCA，甘氨胆酸；GCDCA，甘氨鹅去氧胆酸；UCA，熊胆酸；CDCA-G，甘氨鹅去氧胆酸；7_12-diketoLCA，7，12-二酮石胆酸；ACA，别胆酸；GDCA，甘氨脱氧胆酸；ALT，丙氨酸氨基转移酶；AST，天冬氨酸氨基转移酶；TBil，总胆红素；Alb，白蛋白；HYP，羟脯氨酸；Acetic acid，乙酸；Propionic acid，丙酸；Butyric acid，丁酸；Isobutyric acid，异丁酸；Valeric acid，戊酸；Isovaleric acid，异戊酸；Caproic acid，己酸。*，*P*<0.05；**，*P*<0.01；***，*P*<0.001。

图5　胆汁酸/短链脂肪酸与血清指标相关性热图

Figure 5　Heatmap showing the correlation between bile acid/short-chain fatty acid and serum indicators

3　讨论

肝纤维化作为慢性肝病的发展阶段，其发病机制复杂，临床尚缺乏高效的逆转药物[13]。近年来，“肠-肝轴”失调在肝病进展中发挥的作用受到广泛关注，其中肠道菌群代谢产物，如胆汁酸和短链脂肪酸的代谢紊乱，被认为是影响肝脏炎症与纤维化的重要因素[14]。鳖甲煎丸作为一种传统经方，既往研究虽提示其具有保肝潜力，但其是否通过调控“肠-肝轴”发挥抗纤维化作用，具体机制尚不明确。本研究结果发现，鳖甲煎丸不仅能显著减轻肝组织损伤和胶原沉积，还能在一定程度上纠正胆汁酸与短链脂肪酸的代谢失衡。

中医学认为，肝纤维化的病机核心为肝、脾、肾虚损，从而导致气滞、血瘀、痰凝互结，痹阻肝络，并最终形成“瘀积”。《灵枢·百病始生》强调：“湿气不行，凝血蕴里而不散，津液涩渗，著而不去，而积皆成矣”，揭示了湿、

瘀、痰互结致积的病理过程。《张氏医通》亦指出："积之成也，正气不足，而后邪气踞之"，点明了肝、脾、肾虚损是本病的发病基础。鳖甲煎丸作为消癥化积的经典方剂，其组方与肝纤维化病机高度契合。中医理论中有"肝与大肠相通"之说，肝病则湿浊内生，蕴结肠道，浊毒上攻熏肝。方中大黄、赤硝等可活血通腑，荡涤肠道瘀热湿毒，阻断对肝脏的二次损伤，体现"通腑保肝"之法。张仲景强调"见肝之病，当先实脾"。方中人参、阿胶、桂枝等益气养血、调和营卫，实脾气以御肝木，助气血生化，使瘀去而正不伤。全方消补兼施、气血津液同治，并通过化瘀通腑以调肠、补益肝脾以固本[15]，契合现代医学"肠道稳态影响肝脏病理"的"肠-肝轴"理论，于肝纤维化诸证中疗效显著。

肝纤维化的本质是慢性损伤时HSC的持续异常激活，并转化为肌成纤维细胞，大量分泌胶原等细胞外基质，最终导致肝组织结构与功能破坏。这一过程受到多重因素的影响，而"肠-肝轴"动态平衡的失控放大了这些因素的作用[16]。生理状态下，肠道菌群通过发酵膳食纤维产生短链脂肪酸，既可维持肠屏障完整性，又可经门静脉进入肝脏抑制HSC活化并发挥抗炎作用[17]；同时，经菌群代谢修饰的胆汁酸可激活FXR、G蛋白偶联胆汁酸受体1等受体，调节肝脏代谢与炎症反应，从而影响纤维化进程。然而，在CCl_4等损伤条件下，肠道微生态崩解，导致短链脂肪酸生成减少、屏障破坏和脂多糖易位增加；胆汁酸代谢亦出现紊乱，部分具有潜在细胞毒性的疏水性胆汁酸（如猪去氧胆酸、脱氧胆酸）水平升高，而具有细胞保护作用的亲水性胆汁酸（如牛磺熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸）水平降低。这些异常的肠源性产物可在肝脏激活肝巨噬细胞，诱导肿瘤坏死因子α、转化生长因子β和白细胞介素1β等促炎及促纤维化因子，形成持续刺激并加剧HSC活化，促进肝纤维化恶性循环[18]。本研究表明，鳖甲煎丸能显著降低ALT、AST和HYP水平，减轻肝坏死、炎症及胶原沉积，提示其可能通过调节"肠-肝轴"发挥抗纤维化作用。

为探寻鳖甲煎丸发挥保护作用的具体机制，本研究进一步通过靶向代谢组学技术分析了胆汁酸代谢谱的变化。结果显示，肝纤维化模型大鼠的胆汁酸代谢发生特征性紊乱：首先，具有潜在肝毒性和促炎作用的疏水性胆汁酸，如猪去氧胆酸、去甲胆酸和β-鼠胆酸水平显著升高（P值均<0.05）。这类胆汁酸具有高疏水性，易穿透细胞膜诱发氧化应激与炎症反应，鳖甲煎丸干预后，去甲胆酸和牛磺-α-鼠胆酸水平显著下降（P值均<0.05）。牛磺-α-鼠胆酸作为初级胆汁酸的牛磺酸结合形式，其降低可能反映肠道菌群7α-脱羟基活性的下调——这是将初级胆汁酸转化为疏水性次级胆汁酸的关键步骤。相关性分析显示，去甲胆酸、猪去氧胆酸与HYP呈显著正相关，与丁酸呈显著负相关，这为肠道菌群失调导致特定次级胆汁酸代谢改变，进而可能加重肝纤维化的致病假说提供了间接证据支持。因此，推测鳖甲煎丸对这类疏水性胆汁酸的调节作用，可能与其调控肠道菌群的7α-脱羟基功能有关。其次，具有明确细胞保护作用的亲水性胆汁酸，特别是牛磺酸结合型的牛磺鹅去氧胆酸，与对照组相比，其水平显著降低（P<0.05）。牛磺酸结合是肝脏将疏水性胆汁酸转化为水溶性形式、促进其排泄的关键解毒步骤。结合型胆汁酸的降低提示肝细胞胆汁酸结合能力受损，导致具有潜在毒性的胆汁酸在肝内蓄积。经鳖甲煎丸同步干预后，这种失衡被有效回调。值得注意的是，鳖甲煎丸表现出对胆汁酸代谢的多层次调节：其不仅影响了初级胆汁酸的合成与结合（如提升结合型胆汁酸比例），更可能通过调节肠道菌群功能，抑制了由菌群介导的、产生具有潜在毒性的次级胆汁酸（如牛磺-α-鼠胆酸）的7α-脱羟基反应。相关性分析也证实了这一观点。这种温和而广泛的调节模式，体现了中药复方多靶点协同的优势[19]，与强效FXR激动剂seladelpar（2024年获批用于原发性胆汁性胆管炎）的单靶点策略形成鲜明对比[20]。后者虽能激活FXR调节胆汁酸稳态，但对已形成的纤维化逆转作用有限，且存在肝酶波动等局限。相较之下，鳖甲煎丸通过修复"肠-肝轴"功能稳态，实现胆汁酸代谢网络的系统性重塑，在抗纤维化方面更具综合优势。

同样，短链脂肪酸代谢在肝纤维化模型中也发生了显著改变。本研究发现，与模型组相比，经鳖甲煎丸同步干预后，丁酸、戊酸、丙酸等多种短链脂肪酸水平显著上升（P值均<0.05）。在短链脂肪酸中，尤其是丁酸，在抗肝纤维化中扮演多重角色：其是结肠上皮细胞的主要能量底物，能上调紧密连接蛋白表达，加固肠道屏障，从源头上减少内毒素易位[21]；并能激活G蛋白偶联受体109A等受体，直接发挥抗炎作用。相关性分析显示，丁酸与ALT、AST、HYP呈显著负相关，证实了丁酸的保肝作用。丙酸亦能通过"肠-肝轴"发挥调控纤维化的重要作用。有研究表明，丙酸得到及时补充后，肠道屏障功能可得到明显改善，并显著抑制Toll样受体4/核因子κB介导的肝脏炎症，从而降低纤维化进程的驱动因素[22]。亦有研究发现，来源于*Akkermansia muciniphila*的丙酸可

直接进入肝脏，抑制HSC活化，并通过调控Kelch样ECH关联蛋白1-核转录因子红系2相关因子2抗氧化通路和抑制转化生长因子β/母系抗十五表态蛋白同源物信号通路，最终减轻肝纤维化的组织学表现[23]。然而，短链脂肪酸发挥的作用亦具有双向性，如适量的乙酸能通过激活腺苷一磷酸活化的蛋白质激酶/过氧化物酶体增殖物激活受体γ等通路抑制HSC活化，但在某些免疫细胞和代谢紊乱状态下，较低或过高的乙酸浓度可能促进促炎反应并加重肝纤维化[24]。此外，相关性分析显示，短链脂肪酸与胆汁酸代谢网络之间也存在密切的双向干扰作用，例如，亲水性胆汁酸（如牛磺-α-鼠胆酸、牛磺胆酸）与丁酸、丙酸呈显著正相关，而部分疏水性胆汁酸（如α-鼠胆酸）与丁酸、丙酸呈显著负相关。这揭示了“肠-肝轴”失衡的核心特征：肠道屏障破坏（短链脂肪酸降低）与具有潜在毒性胆汁酸的积累（7α-脱羟基增强）互为因果、协同致病。这种复杂的关系意味着简单地单一调节其中一方可能效果有限或不稳定。相比之下，鳖甲煎丸的干预策略可能并非直接添加外源性代谢物，而是通过作用于“肠-肝轴”，促进内源性胆汁酸和短链脂肪酸代谢谱的整体改善。这种策略可能通过重塑肠道微生态稳态而实现，最终协同调控两大代谢网络。

与同类中成药鳖甲软肝片相比，二者同属仲景消癥之法，均以鳖甲为君药发挥软坚散结的作用。但鳖甲软肝片侧重于活血化瘀、软坚消癥，适用于瘀血阻络证；而鳖甲煎丸与之相比组方更为全面，气血津液同治、攻补兼施，在化瘀同时重视人参、阿胶扶助肝脾，更契合肝纤维化“本虚标实”之病机，尤其适用于久病正虚、痰瘀互结之证。临床研究证实，鳖甲煎丸联合恩替卡韦治疗乙型肝炎肝硬化，可显著调节肠道菌群多样性，增加双歧杆菌、乳酸杆菌等有益菌丰度，降低瘤胃球菌等致病菌丰度，且菌群变化与肝纤维化改善显著相关。本研究从“肠-肝轴”视角进一步证实，鳖甲煎丸通过调节胆汁酸与短链脂肪酸代谢网络、修复“肠-肝轴”稳态实现抗纤维化作用，为其临床应用提供了新的科学内涵。

综上所述，本研究表明，鳖甲煎丸能有效改善CCl_4诱导的肝纤维化，其作用机制与调控胆汁酸及短链脂肪酸代谢密切相关。鳖甲煎丸通过上调亲水性胆汁酸（如鹅去氧胆酸）和短链脂肪酸（如丁酸）水平，调节纤维化进程中失衡的胆汁酸谱（如回调升高的甘氨熊去氧胆酸、上调降低的鹅去氧胆酸等），从而通过调控胆汁酸与短链脂肪酸的代谢抑制肝损伤与纤维化进程。相较于单一靶点药物，鳖甲煎丸依托多组分协同优势，展现了传统中药整体调节、多靶点干预的特点。后续研究需聚焦于明确鳖甲煎丸中核心药效成分及其协同机制，利用无菌动物或粪菌移植模型验证肠道菌群的关键作用，并结合多组学技术系统解析其调控的分子信号通路，为鳖甲煎丸的临床转化提供更充分的依据。

伦理学声明：本研究方案于2022年4月30日经由广西中医药大学实验动物伦理委员会审批，批号：DW20220430-065，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：吴龙达、杜沅沁负责课题设计，资料分析，撰写论文；吴龙达、韦燕飞和毛德文参与收集数据，修改论文；吴龙达、杜沅沁、林镛、卢露和舒发明负责拟定写作思路，指导撰写文章并最后定稿。

参考文献：

[1] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. Cells, 2020, 9(4): 875. DOI: 10.3390/cells9040875.

[2] Li H. Angiogenesis in the progression from liver fibrosis to cirrhosis and hepatocelluar carcinoma[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 15(3): 217-233. DOI: 10.1080/17474124.2021.1842732.

[3] de Franchis R, Bosch J, Garcia-Tsao G, et al. Baveno VII-Renewing consensus in portal hypertension[J]. J Hepatol, 2022, 76(4): 959-974. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.12.022.

[4] Arroyo V, Moreau R, Jalan R, et al. Acute-on-chronic liver failure: A new syndrome that will re-classify cirrhosis[J]. J Hepatol, 2015, 62(1): S131-S143. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.11.045.

[5] Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver[J]. Hepatology, 2014, 60(2): 715-735. DOI: 10.1002/hep.27210.

[6] Llovet J M, Kelley R K, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 6. DOI: 10.1038/s41572-020-00240-3.

[7] Liu Z P, Ouyang G Q, Huang G Z, et al. Global burden of cirrhosis and other chronic liver diseases due to nonalcoholic fatty liver disease, 1990-2019[J]. World J Hepatol, 2023, 15(11): 1210-1225. DOI: 10.4254/wjh.v15.i11.1210.

[8] Parada Venegas D, de la Fuente M K, Landskron G, et al. Corrigendum: Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1486. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01486.

[9] Chiang J Y L, Ferrell J M. Bile acid metabolism in liver pathobiology[J]. Gene Expr, 2018, 18(2): 71-87. DOI: 10.3727/105221618X15156018385515.

[10] 刘思鸿, 李莎莎, 侯酉娟, 等. 《金匮要略》鳖甲煎丸临床应用的古今文献研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 12-17. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20192321.
Liu Sihong, Li Shasha, Hou Youjuan, et al. Ancient and modern literature on clinical application of Biejia Jianwan in medical treasures of the golden chamber[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(6): 12-17. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20192321.

[11] 罗伟康, 王宪贝, 王加锋. 浅谈对《金匮要略》鳖甲煎丸方证的理解[J]. 四川中医, 2018, 36(4): 25-28.
Luo Weikang, Wang Xianbei, Wang Jiafeng. Understanding of the

synopsis of turtle-fried pill in golden chamber[J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2018, 36(4): 25-28.
[12] 孙海涛, 文彬, 陈冠新, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠肝组织中Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白及其靶基因表达的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(10): 876-881. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.10.015.
Sun Haitao, Wen Bin, Chen Guanxin, et al. Effect of Biejiajian pill on Wnt/β-catenin pathway associated protein and its target gene expression in liver tissue of hepatic fibrosis model rats[J]. J Tradit Chin Med, 2018, 59(10): 876-881. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.10.015.
[13] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218. DOI: 10.1172/jci24282.
[14] Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy[J]. J Hepatol, 2020, 72(3): 558-577. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.10.003.
[15] 刘云霄, 窦婧, 王晓忠. 基于"调和肝脾"论述肝纤维化与肠道菌群的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(2): 278-283. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.02.005.
Liu Yunxiao, Dou Jing, Wang Xiaozhong. Association between liver fibrosis and gut microbiota based on "harmonizing liver and spleen"[J]. J Clin Hepatol, 2023, 39(2): 278-283. DOI: 10.3969/j. issn.1001-5256.2023.02.005.
[16] Wiest R, Albillos A, Trauner M, et al. Targeting the gut-liver axis in liver disease[J]. J Hepatol, 2017, 67(5): 1084-1103. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.05.007.
[17] Koh A, de Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, et al. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. Cell, 2016, 165(6): 1332-1345. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
[18] Seki E, Schwabe R F. Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links and key pathways[J]. Hepatology, 2015, 61(3): 1066-1079. DOI: 10.1002/hep.27332.
[19] 陈斌, 徐嘉蔚, 彭杰, 等. 基于逍遥散及其拆方研究"肝病实脾法"对肝纤维化大鼠肠道菌群的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(4): 657-662. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2016.04.009.
Chen Bin, Xu Jiawei, Peng Jie, et al. Effect of "treating liver by nourishing spleen" on gut microbiota in rats with liver fibrosis based on Xiaoyao powder and its separated recipe[J]. J Clin Hepatol, 2016, 32(4): 657-662. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2016.04.009.
[20] Kremer A E, Mayo M J, Hirschfield G M, et al. Seladelpar treatment reduces IL-31 and pruritus in patients with primary biliary cholangitis[J]. Hepatology, 2024, 80(1): 27-37. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000728.
[21] Peng L Y, Li Z R, Green R S, et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers[J]. J Nutr, 2009, 139(9): 1619-1625. DOI: 10.3945/jn.109.104638.
[22] Xu Q, Zhang R S, Mu Y, et al. Propionate ameliorates alcohol-induced liver injury in mice via the gut-liver axis: Focus on the improvement of intestinal permeability[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(20): 6084-6096. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c00633.
[23] Zhang L, Chen J, Ge S J, et al. Propionic acid secreted by *Akkermansia muciniphila* alleviates hepatic fibrosis by antioxidant regulation across the gut-liver axis[J]. Life Metab, 2026, 5(1): loaf036. DOI: 10.1093/lifemeta/loaf036.
[24] Zhang C Y, Liu S, Sui Y X, et al. Roles of short-chain fatty acids in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and metabolic dysfunction-associated steatohepatitis[J]. World J Hepatol, 2025, 17(11): 113756. DOI: 10.4254/wjh.v17.i11.113756.

收稿日期：2026-01-21；**录用日期**：2026-04-01
本文编辑：林姣

引证本文：吴龙达, 杜沅沁, 韦燕飞, 等. 鳖甲煎丸对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠模型的影响及其作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(8): 1866-1877.
Wu Longda, Du Yuanqin, Wei Yanfei, et al. Effect and mechanism of action of Biejiajian Pills on a rat model of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(8): 1866-1877.

读者·作者·编者

《临床肝胆病杂志》关于参考文献著录格式的要求

(1)英文文献著录格式：

英文姓(首字母大写)+英文名首字母(大写,多个名时加空格分隔). 英文题目[文献类型]. 期刊名缩写,年,卷(期):页码. DOI.

示例：

van Leeuwen L P M, de Jong W, Doornekamp L, et al. Exotic viral hepatitis: A review on epidemiology, pathogenesis, and treatment[J]. J Hepatol, 2022, 77(5): 1431-1443. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.06.031.

(2)中文文献著录格式：

中文文献需中英文对照,先著录中文信息,后著录英文信息。中文姓名的英文对照格式为:姓+名全拼,首字母均大写。

示例：

周俭, 黄晓勇. 肝细胞癌治疗新进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(8): 1481-1486. DOI: 10.12449/JCH250801.

Zhou Jian, Huang Xiaoyong. The latest advances in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(8): 1481-1486. DOI: 10.12449/JCH250801.