·肝纤维化及肝硬化·

DOI：10.12449/JCH260818

八珍荔核抗纤方对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠模型的影响

廖丹丹[1,2]，吴卓檀[1,2,3]，龚俊文[1,2]，徐之然[3]，罗伟生[1,2,4]

1 广西中医药大学研究生院，南宁 530001

2 广西中医药防治医学分子生物重点实验室，南宁 530023

3 广西中医药大学附属瑞康医院中西医结合转化医学中心，南宁 530011

4 广西中医药大学附属瑞康医院肝病科，南宁 530011

通信作者：罗伟生，4011188@qq.com（ORCID：0009-0005-5879-192X）

摘要：目的 观察八珍荔核抗纤方对四氯化碳（CCl_4）诱导的肝纤维化大鼠模型的治疗作用，探讨八珍荔核抗纤方抗肝纤维化的作用机制。**方法** 将50只雄性SD大鼠随机分为空白组、模型组、水飞蓟宾组（43.19 mg/kg）及八珍荔核抗纤方低剂量组（7.96 g/kg）、中剂量组（15.93 g/kg）、高剂量组（31.86 g/kg），通过皮下注射40% CCl_4橄榄油混合液（每周2次，连续8周）建立肝纤维化模型。验证造模成功后，空白组及模型组予生理盐水灌胃，各治疗组予相应药物灌胃（每日1次，连续4周）。采用苏木精-伊红染色、马松染色观察大鼠肝脏组织病理学变化；采用生化仪检测血清白蛋白（Alb）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）水平；采用酶联免疫吸附测定法检测血清透明质酸（HA）、Ⅳ型胶原（Col-Ⅳ）、Ⅲ型前胶原肽（PⅢNP）、层粘连蛋白（LN）水平；采用蛋白免疫印迹法检测肝脏组织磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶（p-PI3K）/磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）、磷酸化蛋白激酶B（p-Akt）/蛋白激酶B（Akt）、磷酸化雷帕霉素靶蛋白（p-mTOR）/雷帕霉素靶蛋白（mTOR）蛋白表达水平；采用逆转录荧光定量聚合酶链式反应法检测肝脏组织Ⅰ型胶原蛋白（ColⅠ）、平滑肌肌动蛋白α（α-SMA）基因表达水平。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。**结果** 与空白组比较，模型组大鼠肝小叶结构破坏，肝细胞索排列紊乱，肝细胞脂肪变性，炎性细胞浸润严重，大量蓝色胶原纤维沉积，AST、ALT、HA、LN、Col-Ⅳ和PⅢNP水平均显著升高，Alb水平显著降低（*P*值均<0.01）；与模型组比较，水飞蓟宾组及八珍荔核抗纤方各剂量组大鼠肝脏组织炎性细胞浸润、肝细胞脂肪变性及蓝色胶原纤维沉积情况呈不同程度改善，AST、ALT、HA、LN、Col-Ⅳ和PⅢNP水平均显著降低，Alb水平显著升高（*P*值均<0.01）。与空白组比较，模型组大鼠肝脏组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt和p-mTOR/mTOR蛋白表达水平及ColⅠ、α-SMA基因表达水平均显著升高（*P*值均<0.01）；与模型组比较，水飞蓟宾组及八珍荔核抗纤方中、高剂量组大鼠肝脏组织p-PI3K/PI3K蛋白水平均显著降低（*P*值均<0.01），水飞蓟宾组及八珍荔核抗纤方各剂量组大鼠肝脏组织p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR蛋白表达水平及ColⅠ、α-SMA基因表达水平均显著降低（*P*值均<0.01）。**结论** 八珍荔核抗纤方可改善CCl_4诱导的大鼠肝纤维化，减轻肝损伤，其作用机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR通路有关。

关键词： 肝纤维化；八珍荔核抗纤方；信号传导；大鼠，Sprague-Dawley

基金项目： 国家自然科学基金（82160834）；全国名老中医药专家传承工作室建设项目（国中医药人教函〔2022〕75号）；罗伟生桂派中医大师传承工作室（桂中医药发〔2023〕16号）；广西名中医传承工作室建设项目（桂中医药科教发〔2021〕6号）；中西医结合广西一流学科（培育）建设项目（桂教科研〔2018〕12号）

Effect of Bazhen Lihe Kangxian prescription on rats with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride

Liao Dandan[1,2], *Wu Zhuotan*[1,2,3], *Gong Junwen*[1,2], *Xu Zhiran*[3], *Luo Weisheng*[1,2,4]

1. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Traditional Chinese Medicine and Preventive Medicine, Nanning 530023, China; 3. Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Translational Medicine Center, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 4. Department of Hepatology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China

Corresponding author: *Luo Weisheng*, *4011188@qq.com* (*ORCID*: *0009-0005-5879-192X*)

Abstract: **Objective** To investigate the therapeutic effect of Bazhen Lihe Kangxian prescription on rats with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl_4), and to explore its mechanism of action against liver fibrosis. **Methods** A total of 50 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank group, model group, silybin group (43.19 mg/kg), and low-, middle-, and high-dose Bazhen Lihe Kangxian prescription groups (7.96, 15.93, and 31.86 g/kg, respectively). Subcutaneous injection of 40% CCl_4-olive oil solution (twice a week for 8 consecutive weeks) was performed to establish a model of liver fibrosis. After successful modeling, the rats in the blank group and the model group were given normal saline by gavage, while those in the treatment groups were given the corresponding drug by gavage, once a day for 4 consecutive weeks. HE staining and Masson staining were used to observe liver histopathological changes; an automatic biochemical analyzer was used to measure the serum levels of albumin (Alb), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT); ELISA was used to measure the serum levels of hyaluronic acid (HA), collagen Ⅳ (Col-Ⅳ), procollagen Ⅲ N-terminal peptide (PⅢNP), and laminin (LN); Western blotting was used to measure the protein expression levels of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B (Akt), phosphorylated Akt (p-Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), and phosphorylated mTOR (p-mTOR) in liver tissue; RT-qPCR was used to measure the mRNA expression levels of collagen Ⅰ (Col-Ⅰ) and α-smooth muscle actin (α-SMA) in liver tissue. 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** Compared with the blank group, the model group had disrupted hepatic lobular structure, disordered arrangement of hepatic cell cords, hepatocyte fatty degeneration, severe inflammatory cell infiltration, and deposition of massive blue collagen fibers, as well as significant increases in the levels of AST, ALT, HA, LN, Col-Ⅳ, and PⅢNP and a significant reduction in the level of Alb (all $P<0.01$). Compared with the model group, the silybin group and the three Bazhen Lihe Kangxian prescription groups had varying degrees of improvement in inflammatory cell infiltration, hepatocyte fatty degeneration, and collagen deposition in liver tissue, as well as significant reductions in the levels of AST, ALT, HA, LN, Col-Ⅳ, and PⅢNP and a significant increase in the level of Alb (all $P<0.01$). Compared with the blank group, the model group had significant increases in the protein expression levels of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR and the mRNA expression levels of Col-I and α-SMA in liver tissue (all $P<0.01$); compared with the model group, the silybin group and the high- and middle-dose Bazhen Lihe Kangxian prescription groups had significant reductions in the protein expression levels of p-PI3K/PI3K (all $P<0.01$), and the silybin group and the three Bazhen Lihe Kangxian prescription groups had significant reductions in the protein expression levels of p-Akt/Akt and p-mTOR/mTOR and the mRNA expression levels of Col-Ⅰ and α-SMA in liver tissue (all $P<0.01$). **Conclusion** Bazhen Lihe Kangxian prescription can improve CCl_4-induced liver fibrosis in rats and alleviate liver injury, possibly by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway.

Key words: Hepatic Fibrosis; Bazhen Lihe Kangxian Formula; Signal Transduction; Rats, Sprague-Dawley

Research funding: National Natural Science Foundation of China (82160834); National Famous Traditional Chinese Medicine Expert Inheritance Studio Construction Project (National Medical Education Letter [2022] No. 75); Luo Weisheng Guipai Traditional Chinese Medicine Master Inheritance Studio (Guizhong Medical Development [2023] No.16); Construction Project of Guangxi Famous Traditional Chinese Medicine Inheritance Studio (Guizhong Medical Science and Education Development [2021] No.6); Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Guangxi First Class Discipline (Cultivation) Construction Project (Guijiao Research [2018] No.12)

肝纤维化是在多种病因刺激下,肝实质细胞发生损伤,肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)活化,以细胞外基质(extracellular matrix,ECM)过度增生与沉积为特征的一种病理表现[1-2]。我国目前有2 000万~3 000万例慢性乙型肝炎患者[3],其中20%~30%的慢性肝炎患者出现肝纤维化或肝硬化病变[4]。肝纤维化若迁延不愈,可发展为肝硬化或肝癌[5-6]。目前,西医针对肝纤维化的治疗以病因干预为主,尚缺乏公认的特异性抗纤维化药物[7]。相较而言,中医药在肝纤维化的防治领域展现出独特优势[8]。

八珍荔核抗纤方是全国名老中医罗伟生教授基于"慢性肝病从虚论治"的学术思想,创立的用于治疗慢性

肝病的经验方，能够有效改善患者的临床症状及实验室指标[9-11]。本课题组前期研究发现，八珍荔核抗纤方可以通过多靶点、多通路及多途径发挥抗肝纤维化的作用，但其具体机制尚未被完全揭示[12]。磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mechanistic target of rapamycin，mTOR）通路在肝纤维化中具有重要的调控作用[13]。因此，本研究基于PI3K/Akt/mTOR通路，观察八珍荔核抗纤方对四氯化碳（carbon tetrachloride，CCl_4）诱导肝纤维化大鼠的影响，探讨八珍荔核抗纤方抗肝纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 无特定病原体（special pathogen free，SPF）级雄性SD大鼠50只，体重200～220 g，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK（湘）2019-0004，所有实验动物饲养于广西中医药大学SPF级动物房，动物使用许可证号：SYXK（桂）2019-0001。饲养环境控制为恒温20～26 ℃，相对湿度40%～70%，光照12 h明/12 h暗交替，自由饮水进食。

1.2 药物及主要试剂 八珍荔核抗纤方：荔枝核30 g，茯苓、白芍、熟地黄、白术、当归、川芎、柴胡、莪术、海金沙及五味子各10 g，黄芪、丹参各15 g，人参、炙甘草各6 g，均为中药配方颗粒，购自江阴天江药业有限公司；水飞蓟宾胶囊（国药准字号：H20040299，规格为每粒含水飞蓟宾35 mg，批号：350710070）购自天津天士力圣特制药有限公司；CCl_4（批号：20220317）购自广东光华科技股份有限公司；橄榄油（批号：C15311659）购自上海麦克林生化科技股份有限公司；白蛋白（albumin，Alb）、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）及丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）试剂盒（批号分别为50308013N、50409138N及50409011N）均购自山东博科生物产业有限公司；大鼠Ⅳ型胶原（type Ⅳ collagen，Col-Ⅳ）、大鼠Ⅲ型前胶原肽（type Ⅲ collagen N-terminal propeptide，PⅢNP）、大鼠透明质酸（hyaluronic acid，HA）及大鼠层粘连蛋白（laminin，LN）酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号均为20250710）购自武汉贝茵莱生物科技有限公司；p-PI3K、PI3K、p-Akt及Akt抗体（批号分别为1098625-8、1088922-59、1107264-16及1010423-86）均购自英国Abcam公司；p-mTOR、mTOR抗体（批号分别为H681964013、H650062038）均购自杭州华安生物技术有限公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号：AC231125002）购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 BK-280全自动动物生化分析仪（山东博科生物产业有限公司）；DP360+CS500封染一体机（深圳达科为生物技术股份有限公司）；BX43光学显微镜（日本奥林巴斯公司）；AI6000超灵敏多功能成像仪（美国通用有限公司）；1510酶标仪（美国赛默飞世尔科技有限公司）；1645050电泳仪、荧光定量聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）仪（美国Bio-Rad公司）。

1.4 动物造模、分组及灌胃 将50只雄性SD大鼠适应性喂养1周，按照随机数字表法随机选取8只作为空白组，剩余42只大鼠参照课题组既往肝纤维化造模经验[14]进行造模。造模方法为皮下注射体积为3 mL/kg的40% CCl_4橄榄油混合液（CCl_4∶橄榄油=4∶6），每周2次，连续注射8周，以建立肝纤维化大鼠模型。在造模第8周末，采用随机数字表法随机选取2只大鼠，解剖后摘取肝脏，进行苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）、马松（Masson）染色，观察肝纤维化模型是否造模成功。确认造模成功后，将剩余40只肝纤维化大鼠重新按照随机数字表法随机分为模型组、水飞蓟宾组及八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组，每组8只。根据《药理实验方法学》[15]及课题组前期灌胃经验[12]，予0.9%生理盐水溶解八珍荔核抗纤方中药配方颗粒及水飞蓟宾胶囊，大鼠灌胃剂量=人临床剂量/70 kg×6.3，大鼠每100 g体重灌胃1 mL药液，八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组给药剂量比例为1∶2∶4，分别予7.96、15.93及31.86 g/kg灌胃，药液浓度分别为0.796、1.593及3.186 g/mL；水飞蓟宾组予水飞蓟宾43.19 mg/kg灌胃，药液浓度为4.319 mg/mL；空白组、模型组予0.9%生理盐水（2 mL/kg）灌胃，均每日1次，连续灌胃4周。给药期间，除空白组外，其余各组大鼠均皮下注射维持剂量40% CCl_4橄榄油混合液，每周1次。

1.5 大鼠一般情况观察 观察大鼠进食、饮水、大便、毛发、精神、活动及体重等情况。

1.6 标本采集与处理 末次灌胃后，各组大鼠禁食12 h，予2%戊巴比妥钠（3 mL/kg）腹腔注射麻醉。取腹主动脉血，常温静置2 h，于4 ℃条件下以3 000 r/min离心15 min，取上层血清后置于-80 ℃保存，用于血清生化、ELISA检测。取血后摘取肝脏，肉眼观察肝脏形态，剪取部分肝组织用4%多聚甲醛固定，用于组织病理学检测；其余组织放置于-80 ℃保存，用于蛋白免疫印迹、逆转录定量PCR检测。

1.7　HE、Masson染色法观察肝脏组织病理变化　肝脏组织经石蜡包埋后，连续制备约5 μm的厚切片，分别行HE、Masson染色于光学显微镜下观察大鼠肝脏组织的病理学改变。参照Ishak评分系统[16]进行肝纤维化程度评分。

1.8　生化仪检测肝功能指标　采用全自动动物生化分析仪测定大鼠血清Alb、AST及ALT水平。

1.9　ELISA法检测肝纤维化四项水平　按照ELISA试剂盒说明书测定大鼠血清HA、LN、Col-Ⅳ及PⅢNP水平。

1.10　蛋白免疫印迹法检测肝脏组织蛋白表达水平　提取肝组织总蛋白，采用二喹啉甲酸法（bicinchoninic acid assay，BCA）测定蛋白浓度，制备蛋白样本。经制胶、电泳及转膜后，以5%脱脂牛奶封闭1 h，三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水-吐温20（Tris buffered saline with Tween 20，TBST）清洗3次，分别加入一抗p-PI3K（1∶1 000）、PI3K（1∶1 000）、p-mTOR（1∶1 000）、mTOR（1∶1 000）、p-Akt（1∶5 000）、Akt（1∶10 000）及GAPDH（1∶3 000），于4 ℃孵育过夜，TBST清洗3次，二抗孵育1 h，TBST清洗3次后显影。使用Image J软件分析各条带的灰度值。

1.11　逆转录定量PCR法检测肝脏组织基因表达水平　采用TRIzol法提取肝组织总RNA，测定RNA浓度，按照逆转录试剂盒说明书合成互补DNA。使用荧光定量PCR仪，以两步法扩增，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算Ⅰ型胶原蛋白（type Ⅰ collagen，Col Ⅰ）、平滑肌肌动蛋白α（smooth muscle actin α，α-SMA）基因的相对表达量。引物由南宁捷尼斯生物科技有限公司合成，具体序列见表1。

表1　引物序列表

Table 1　List of primer sequences

名称		序列（5′-3′）
Col Ⅰ	上游	GATCCTGCCGATGTCGCTATCC
	下游	TCTTGAGGTTGCCAGTCTGTTGG
α-SMA	上游	CCCAGATTATGTTTGAGACCTTCA
	下游	CATCTCCAGAGTCCAGCACAATAC
GAPDH	上游	GGTGCTGAGTATGTCGTGGAG
	下游	TTGCTGACAATCTTGAGGGAG

注：Col Ⅰ，Ⅰ型胶原蛋白；α-SMA，平滑肌肌动蛋白α；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.12　统计学方法　采用SPSS 26.0软件进行数据分析。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。P<0.05为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组大鼠一般情况　与空白组比较，模型组大鼠进食及饮水量减少，毛发枯黄无光泽，精神不振，活动迟缓，形体消瘦，大便溏烂。与模型组比较，水飞蓟宾组及八珍荔核抗纤方高剂量组大鼠进食及饮水量接近空白组，毛发恢复光泽，精神好转，活动增多，体重增长，大便逐渐成形；八珍荔核抗纤方中剂量组次之，八珍荔核抗纤方低剂量组改善效果弱于中、高剂量组。

2.2　各组大鼠肝脏形态　空白组大鼠肝脏呈红褐色，色泽鲜亮，表面光滑，质地柔软，边缘锐利；模型组大鼠肝脏呈砖红色，色泽暗淡，表面粗糙并呈颗粒样改变，质地坚韧，边缘钝化；八珍荔核抗纤方低剂量组色泽接近模型组，但质地、表面颗粒感较模型组改善；水飞蓟宾组、八珍荔核抗纤方中剂量组和高剂量组色泽、质地及表面颗粒感较模型组明显改善（图1）。

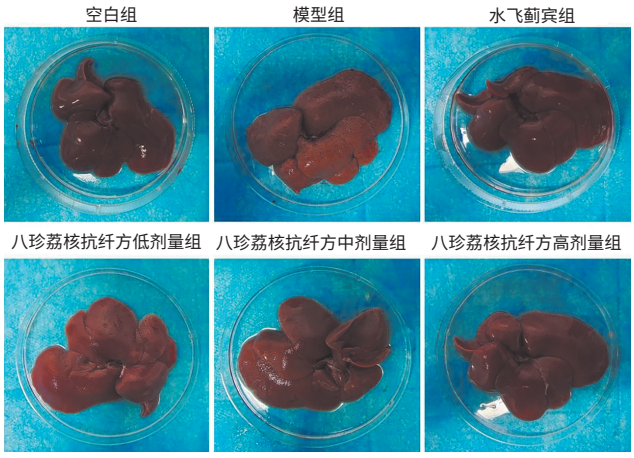


图1　肝脏组织形态

Figure 1　Liver histomorphology

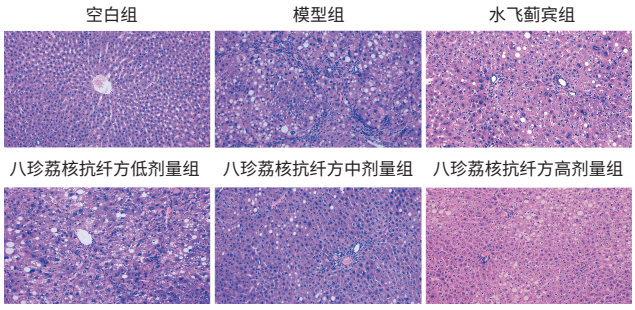
2.3　各组大鼠肝脏组织病理变化　HE染色结果显示，空白组大鼠肝小叶结构完整，肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列，无炎性细胞浸润；模型组大鼠肝小叶结构破坏，肝细胞索排列紊乱，炎性细胞浸润严重，大量肝细胞脂肪变性，汇管区可见纤维条索状物。与模型组比较，水飞蓟宾组、八珍荔核抗纤方中剂量组及高剂量组大鼠肝细胞脂肪变性明显减轻，其中水飞蓟宾组及八珍荔核抗纤方高剂量组胶原纤维改善情况优于八珍荔核抗纤方中剂量组；八珍荔核抗纤方低剂量组大鼠肝细胞脂肪变性、炎性细胞浸润、纤维条索物较模型组改善，但效果不及八珍荔核抗纤方中剂量组和高剂量组（图2）。

Masson染色结果显示，空白组大鼠的肝小叶结构完整，肝细胞排列整齐，未见蓝色胶原纤维沉积；模型组大鼠肝小叶结构破坏，可见大量蓝色胶原纤维沉积；与模型组比较，八珍荔核抗纤方低剂量组大鼠蓝色胶原纤维沉积有所改善，肝纤维化评分降低，但差异无统计学意义（P>0.05）；八珍荔核抗纤方中剂量组大鼠蓝色胶原纤

维沉积轻度改善，肝纤维化评分降低且差异有统计学意义（P<0.01）；水飞蓟宾组及八珍荔核抗纤方高剂量组大鼠蓝色胶原纤维沉积明显改善，肝纤维化评分显著降低（P值均<0.01）（图3、4）。

2.4　各组大鼠血清Alb、AST及ALT水平　与空白组比较，模型组大鼠血清AST［（148.94±5.94）U/L］及ALT［（185.73±7.27）U/L］水平显著升高，Alb［（26.70±1.10）g/L］水平显著降低（P值均<0.01）。与模型组比较，水飞蓟宾组和八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组大鼠血清AST［（59.84±5.52）、（120.84±7.08）、（86.68±5.32）和（57.15±3.68）U/L］及ALT［（61.15±4.80）、（135.98±8.74）、（90.66±4.83）和（62.13±5.25）U/L］水平均显著降低，Alb［（34.14±1.11）、（30.05±0.71）、（32.04±0.67）和（34.78±0.57）g/L］水平均显著升高（P值均<0.01）。八珍荔核抗纤方可呈剂量依赖性降低AST、ALT水平并升高Alb水平，且以高剂量组效果最佳（P值均<0.01）（图5）。

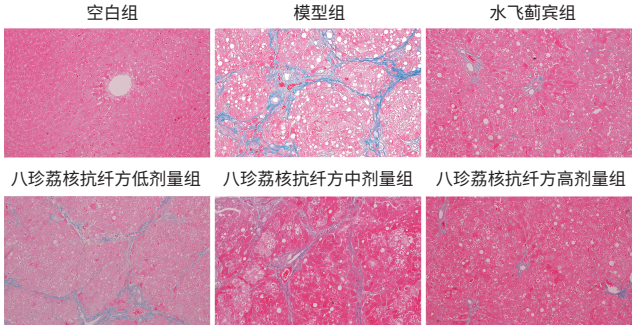
2.5　各组大鼠血清HA、LN、Col-Ⅳ及PⅢNP水平　与空白组比较，模型组大鼠血清HA［（35.76±1.21）ng/mL］、LN［（170.48±13.13）ng/mL］、Col-Ⅳ［（5.33±0.41）ng/mL］及PⅢNP［（954.72±46.77）pg/mL］水平均显著升高（P值均<0.01）；与模型组比较，水飞蓟宾组和八珍荔核抗纤方低、



注：HE，苏木精-伊红。

图2　HE染色结果（×200）

Figure 2　HE staining results（×200）



注：Masson染色，马松染色。

图3　Masson染色结果（×200）

Figure 3　Masson staining results（×200）

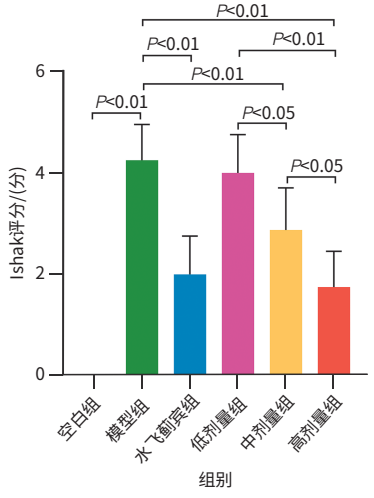
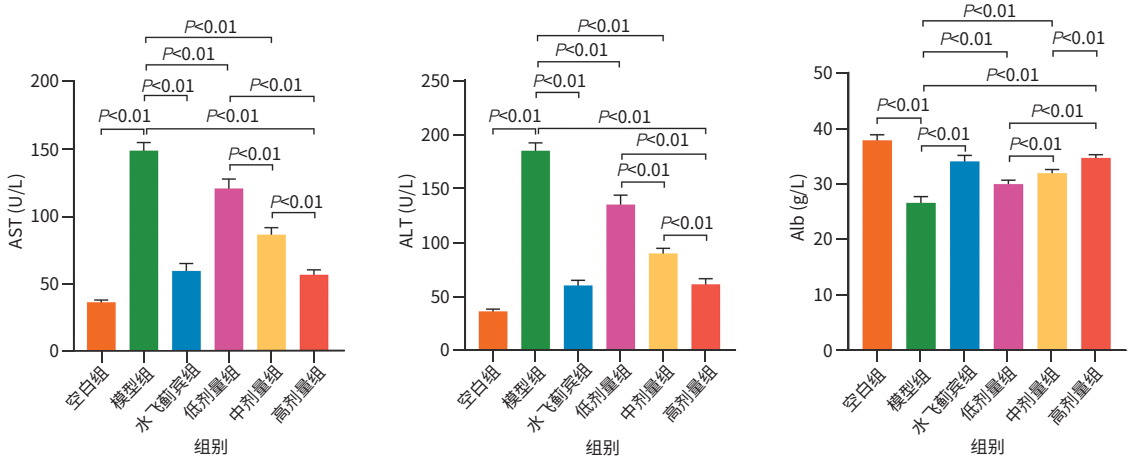


图4　各组大鼠肝纤维化评分

Figure 4　Liver fibrosis scores of rats in each group



注：AST，天冬氨酸氨基转移酶；ALT，丙氨酸氨基转移酶；Alb，白蛋白。

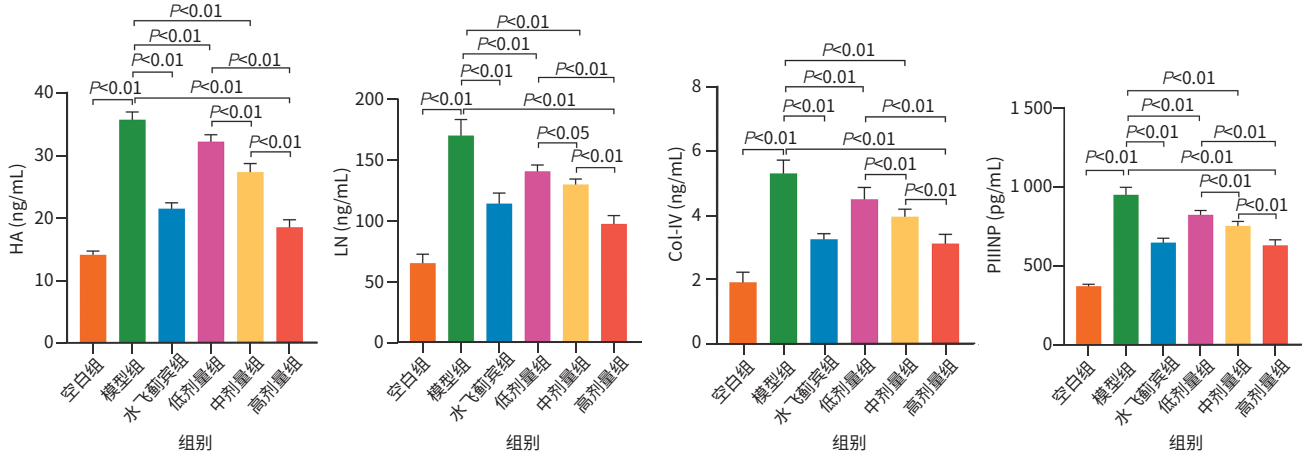
图5　各组大鼠肝功能水平

Figure 5　Liver function levels of rats in each group

中、高剂量组大鼠的血清HA[(21.55±0.93)、(32.25±1.10)、(27.38±1.35)和(18.57±1.21)ng/mL]、LN[(114.56±8.71)、(141.10±5.09)、(130.17±4.64)和(97.96±6.72)ng/mL]、Col-Ⅳ[(3.29±0.17)、(4.53±0.36)、(3.99±0.24)和(3.16±0.28)ng/mL]、PⅢNP[(653.18±28.03)、(828.37±27.01)、(758.61±28.66)和(635.07±34.96)pg/mL]水平均显著降低(*P*值均<0.01)。八珍荔核抗纤方可呈剂量依赖性降低上述4项指标水平，且以高剂量组效果最佳(*P*值均<0.05)(图6)。

2.6　各组大鼠肝脏组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt及p-mTOR/mTOR蛋白表达水平　与空白组比较，模型组大鼠肝脏组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt及p-mTOR/mTOR蛋白表达水平均显著升高(*P*值均<0.01)。与模型组比较，八珍荔核抗纤方低剂量组大鼠肝脏组织p-PI3K/PI3K蛋白表达水平差异无统计学意义(*P*>0.05)，p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR蛋白表达水平均显著降低(*P*值均<0.01)；水飞蓟宾组和八珍荔核抗纤方中剂量组、高剂量组大鼠肝脏组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt及p-mTOR/mTOR蛋白表达水平均显著降低(*P*值均<0.01)。八珍荔核抗纤方各剂量组之间呈剂量依赖性降低上述指标水平，高剂量组效果最佳(*P*值均<0.05)(图7)。

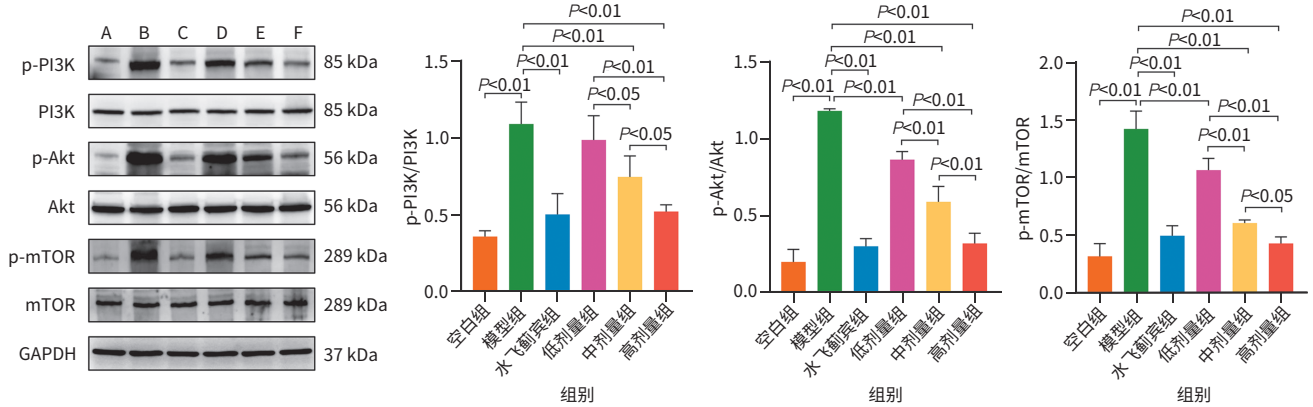
2.7　各组大鼠肝脏组织ColⅠ、α-SMA基因表达水平　与空白组比较，模型组大鼠肝脏组织ColⅠ、α-SMA基因表达水平均显著升高(*P*值均<0.01)。与模型组比较，水飞蓟宾组和八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组大鼠肝脏组织ColⅠ、α-SMA基因表达水平均显著降低(*P*值均<0.01)；八珍荔核抗纤方对上述基因表达的抑制作用呈剂量依赖性，以高剂量组效果最佳(*P*值均<0.01)(图8)。



注：HA，透明质酸；LN，层粘连蛋白；Col-Ⅳ，Ⅳ型胶原；PⅢNP，Ⅲ型前胶原肽。

图6　各组大鼠肝纤维化四项水平

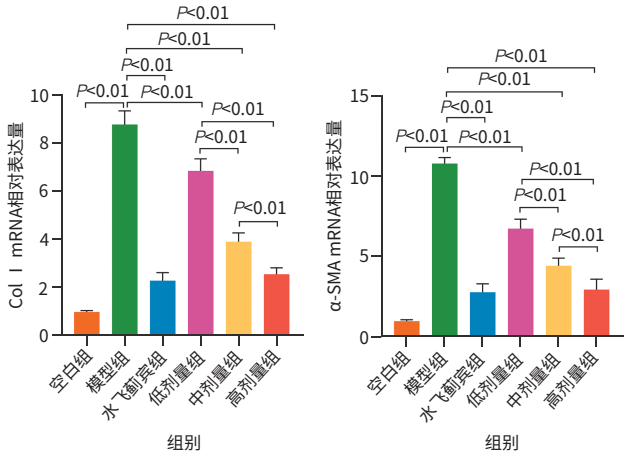
Figure 6　Liver fibrosis four-item levels in each group of rats



注：A～F分别是空白组、模型组、水飞蓟宾组、八珍荔核抗纤方低剂量组、八珍荔核抗纤方中剂量组和八珍荔核抗纤方高剂量组。p-PI3K，磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶；PI3K，磷脂酰肌醇3-激酶；p-Akt，磷酸化蛋白激酶B；Akt，蛋白激酶B；p-mTOR，磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白；mTOR，哺乳动物雷帕霉素靶蛋白；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图7　各组大鼠肝脏组织蛋白表达水平

Figure 7　Protein expression levels in liver tissues of rats in each group



注：Col Ⅰ，Ⅰ型胶原蛋白；α-SMA，平滑肌肌动蛋白α。

图8　各组大鼠基因表达水平

Figure 8　Gene expression levels of rats in each group

3　讨论

中医学中并无“肝纤维化”的记载，根据其临床表现，可归属为“胁痛”“积聚”等范畴。罗伟生教授认为，肝纤维化是慢性肝病发病的前奏，肝炎肝纤维化-肝硬化-肝癌是慢性肝病的动态演变过程。“正虚血瘀”是肝纤维化发病的主要病机，其中，“正虚”体现为肝细胞持续损伤、长期炎症导致机体修复能力下降、免疫功能紊乱；“血瘀”表现为HSC持续活化、ECM异常沉积及肝小叶结构破坏。基于此，罗教授提出“慢性肝病从虚论治”的学术思想，以八珍汤为基础，加入荔枝核、柴胡、莪术、海金沙、五味子、黄芪和丹参创立八珍荔核抗纤方治疗慢性肝病，方中八珍汤益气养血，黄芪增强八珍汤益气之效，荔枝核行气散结，柴胡疏肝解郁，莪术、丹参活血化瘀，海金沙疏肝利胆，五味子收涩降酶，全方共奏益气健脾、疏肝利胆、活血化瘀之功，有效改善肝病患者的临床症状及肝功能、肝纤维化四项等指标[9-11]。

本研究采用皮下注射40% CCl_4橄榄油混合液的方法建立肝纤维化大鼠模型，造模后大鼠体型消瘦、毛发枯黄无光泽、进食及饮水量减少、精神不振、活动迟缓，经不同剂量八珍荔核抗纤方干预后，上述症状均呈不同程度改善。肝脏活组织检查可以明确诊断、评估炎症活动度、纤维化程度及判定药物疗效，是诊断肝纤维化的“金标准”[17]。本研究通过肉眼观察肝脏形态及HE、Masson染色发现，造模大鼠出现肝脏表面粗糙颗粒状、炎性细胞浸润、脂肪变性及胶原纤维增生等肝纤维化改变，证明肝纤维化大鼠模型建立成功。经八珍荔核抗纤方干预后，可有效减少炎性细胞浸润，改善肝细胞脂肪变性、胶原纤维增生情况，缓解肝纤维化。Ishak评分结果显示，八珍荔核抗纤方可剂量依赖性降低肝纤维化评分，但低剂量组与模型组之间的差异无统计学意义（P>0.05）。Alb、AST和ALT是临床常用的肝功能评估指标，HA、LN、Col-Ⅳ和PⅢNP是反映肝纤维化程度的指标。本研究发现，八珍荔核抗纤方可剂量依赖性降低肝纤维化大鼠血清AST、ALT、HA、LN、Col-Ⅳ、PⅢNP水平并提高Alb水平，且差异均有统计学意义（P值均<0.05），提示八珍荔核抗纤方能够有效改善CCl_4诱导的肝纤维化模型大鼠的肝功能及肝纤维化四项水平，与孙素红[18]的研究结果一致。值得注意的是，低剂量组大鼠血清肝功能、肝纤维化四项水平均显著降低，而Ishak评分无统计学差异，可能归因于肝功能、肝纤维化四项反映肝纤维化活动更为敏感，低剂量八珍荔核抗纤方虽可改善血清标志物水平，但尚不足以逆转已形成的组织学病变，若要实现逆转，可能需要更高剂量或更长疗程的干预。

α-SMA是HSC活化的标志物，Col Ⅰ是活化HSC分泌的主要ECM成分，激活PI3K/Akt/mTOR通路可促进HSC活化及ECM沉积，从而加速肝纤维化进程[19]；反之，抑制该通路可诱导HSC凋亡，促进ECM降解，延缓肝纤维化[13]。本研究结果显示，与模型组比较，八珍荔核抗纤方低剂量组大鼠肝脏组织p-PI3K/PI3K蛋白水平呈降低趋势，但差异无统计学意义（P>0.05）；中、高剂量组可显著降低p-PI3K/PI3K蛋白水平，且八珍荔核抗纤方可剂量依赖性降低大鼠肝脏组织p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR蛋白表达水平及α-SMA、Col Ⅰ基因表达水平，以高剂量组效果最佳。上述结果提示，低剂量组可能仅作用于PI3K/Akt/mTOR通路下游分子，无法影响上游PI3K的磷酸化水平；八珍荔核抗纤方抑制PI3K磷酸化的起效剂量阈值介于低剂量与中剂量之间，且高剂量为八珍荔核抗纤方的最佳效应剂量，表明八珍荔核抗纤方可以通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路，抑制HSC活化，促进ECM降解，从而改善肝纤维化，且具有明确的剂量-效应关系及起效阈值特征。现代药理研究表明，八珍荔核抗纤方中部分药物有效活性成分具有抗肝纤维化作用。例如，荔枝核总黄酮可以通过抑制肝脏炎症小体、减少活性氧积累等多靶点、多通路缓解肝纤维化[20-21]；人参皂苷Rg3可以通过减少肝脏炎症和氧化应激，减轻肝纤维化[22]；黄芪总黄酮可以通过抑制HSC活化从而改善肝纤维化[23]；丹参多酚酸盐可下调PI3K/Akt/mTOR通路活性，抑制HSC激活及ECM合成，发挥抗肝纤维化效应[24]；莪术醇可以通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路，诱导HSC凋亡，从而抑制

肝纤维化[25]。但八珍荔核抗纤方是中药复方，其发挥抗肝纤维化的具体有效活性成分仍有待进一步探究。

综上所述，八珍荔核抗纤方能够降低CCl_4诱导的肝纤维化模型大鼠的肝功能、肝纤维化四项水平，改善肝脏组织胶原纤维增生，减轻肝损伤及肝纤维化程度，抑制HSC活化，促进ECM降解，其机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR通路有关。课题组后续将深入探究PI3K/Akt/mTOR通路下游的自噬与凋亡调控机制，揭示八珍荔核抗纤方抗肝纤维化的分子作用基础，为临床治疗肝纤维化提供实验依据。

伦理学声明：本研究方案于2025年12月24日经广西中医药大学动物伦理委员会批准通过，批号：GXTCMU-EC KS20250000-656，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：廖丹丹负责课题设计，起草论文；廖丹丹、吴卓檀和龚俊文负责实验操作，研究过程的实施；廖丹丹负责数据收集，统计学分析，绘制图表；徐之然负责论文修改；罗伟生负责指导撰写文章并最后定稿。

参考文献：

[1] Roeb E. Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects)[J]. Matrix Biol, 2018, 68: 463-473. DOI: 10.1016/j.matbio.2017.12.012.

[2] 廖昭辉, 谢正元. 肝纤维化发病的分子机制及其相关治疗靶点的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(5): 1450-1456. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240532.
Liao Zhaohui, Xie Zhengyuan. Research progress in molecular mechanism of hepatic fibrosis and related therapeutic targets[J]. J Jilin Univ (Med Edit), 2024, 50(5): 1450-1456. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240532.

[3] 国家卫生健康委员会. 中国卫生健康统计年鉴-2020[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2020.
National Health Commission. China health statistics yearbook-2020[M]. Beijing: China Union Medical College Press, 2020.

[4] 中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(12): 2648-2669. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2019.12.007.
Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association; Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and treatment of chronic hepatitis B (version 2019)[J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(12): 2648-2669. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2019.12.007.

[5] Toosi A E. Liver fibrosis: Causes and methods of assessment, a review[J]. Rom J Intern Med, 2015, 53(4): 304-314. DOI: 10.1515/rjim-2015-0039.

[6] Aydın M M, Akçalı K C. Liver fibrosis[J]. Turk J Gastroenterol, 2018, 29(1): 14-21. DOI: 10.5152/tjg.2018.17330.

[7] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019年版)[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(11): 1286-1295. DOI: 10.7661/j.cjim.20190916.314.
Professional Committee of Liver Diseases, Chinese Association of Integrative Medicine. Diagnosis and treatment guidelines of integrated Chinese and western medicine for treating hepatic fibrosis (2019 edition)[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2019, 39(11): 1286-1295. DOI: 10.7661/j.cjim.20190916.314.

[8] 王伟, 陈翰翰, 王凯. 中医药治疗肝纤维化研究进展[J]. 河南中医, 2021, 41(1): 137-140. DOI: 10.16367/j.issn.1003-5028.2021.01.0034.
Wang Wei, Chen Hanhan, Wang Kai. Research progress of TCM in the treatment of liver fibrosis[J]. Henan Tradit Chin Med, 2021, 41(1): 137-140. DOI: 10.16367/j.issn.1003-5028.2021.01.0034.

[9] 刘光桥, 罗伟生. 罗伟生教授从虚论治慢性肝病验案举隅[J]. 中西医结合肝病杂志, 2021, 31(12): 1134-1135. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2021.12.020.
Liu Guangqiao, Luo Weisheng. Examples of professor Luo Weisheng's experience in treating chronic liver disease from deficiency[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2021, 31(12): 1134-1135. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2021.12.020.

[10] 唐燕, 马晓聪, 黎敏航, 等. 罗伟生教授从肝阳虚论治慢性乙型肝炎肝纤维化学术思想探微[J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(12): 1130-1131. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2022.012.019.
Tang Yan, Ma Xiaocong, Li Minhang, et al. Probe into professor Luo Weisheng's academic thought of treating liver fibrosis of chronic hepatitis B from liver Yang deficiency[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2022, 32(12): 1130-1131. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2022.012.019.

[11] 杨爽. 八珍荔核抗纤方联合恩替卡韦治疗肝郁脾虚夹瘀型慢性乙型肝炎临床疗效观察[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.
Yang Shuang. Clinical observation of Bazhen Lihe Kangxian prescription combined with entecavir in the treatment of chronic hepatitis B with stagnation of liver and spleen deficiency and blood stasis[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2021.

[12] 唐燕. 基于网络药理学及实验研究探讨八珍荔核抗纤方抗肝纤维化的作用机制[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2023.
Tang Yan. Based on network pharmacology and experimental research, explore the mechanism of Bazhen Lihe Kangxian prescriptionin anti liver fibrosis[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2023.

[13] 吴长会, 沈敏, 李龙, 等. PI3K/Akt/mTOR/$p70^{S6K}$信号通路在肝纤维化发生发展中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(11): 1928-1932. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.11.043.
Wu Changhui, Shen Min, Li Long, et al. Association between PI3K/Akt/mTOR/$p70^{S6K}$ signaling pathway and hepatic fibrosis[J]. J Clin Hepatol, 2015, 31(11): 1928-1932. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.11.043.

[14] 冯茵怡, 严炯艺, 夏星, 等. 荔枝核总黄酮对CCl_4诱导的大鼠肝纤维化的影响及作用机制和潜在Q-marker的预测[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5722-5731. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20200720.401.
Feng Yinyi, Yan Jiongyi, Xia Xing, et al. Effect and mechanism of total flavonoids of Lichi Semen on CCl_4-induced liver fibrosis in rats, and prediction of Q-marker[J]. China J Chin Materia Med, 2020, 45(23): 5722-5731. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20200720.401.

[15] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
Wei Wei, Wu Ximei, Li Yuanjian. Experimental methodology of pharmacology[M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.

[16] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis[J]. J Hepatol, 1995, 22(6): 696-699. DOI: 10.1016/0168-8278(95)80226-6.

[17] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 肝纤维化诊断及治疗共识(2019年)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(10): 2163-2172. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2019.10.007.
Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association; Chinese Society of Gastroenterology, Chinese Medical Association; Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. Consensus on the diagnosis and therapy of hepatic fibrosis (2019)[J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(10): 2163-2172. DOI: 10.3969/j.issn.

1001-5256.2019.10.007.
[18] 孙素红．基于PI3K/AKT/Bcl-2信号通路探讨加味柴胡当归汤治疗肝纤维化的机制研究[D]．南宁：广西中医药大学，2024.
Sun Suhong. Study on the mechanism of modified Chaihu Danggui powderin treating hepatic fibrosis based on the PI3K/AKT/Bcl-2 signaling pathway[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2024.
[19] Liu X L, Liu W C, Ding C B, et al. Taxifolin, extracted from waste *Larix olgensis* roots, attenuates CCl_4-induced liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR and TGF-β1/Smads signaling pathways[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 871-887. DOI: 10.2147/DDDT.S281369.
[20] 陀银婷，胡兴兰，李泊村，等．荔枝核总黄酮抑制肝脏炎症小体活化并减轻大鼠肝纤维化[J]．中华中医药学刊，2026，44(2)：211-214. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2026.02.036.
Tuo Yinting, Hu Xinglan, Li Bocun, et al. Total flavonoids of Lizhihe (Lichi Semen) inhibiting hepatic inflammasome activation and alleviating hepatic fibrosis in rats[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2026, 44(2): 211-214. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2026.02.036.
[21] 梁瀞云，唐燕，司马玲，等．基于MAPK信号通路的荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠作用机制的研究[J]．中药材，2023，46(11)：2856-2860. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2023.11.037.
Liang Jingyun, Tang Yan, Sima Ling, et al. Study on the mechanism of total flavonoids from *Litchi seed* on hepatic fibrosis in rats based on MAPK signal pathway[J]. J Chin Med Mater, 2023, 46(11): 2856-2860. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2023.11.037.
[22] Tian Z F, Hu R Y, Wang Z, et al. Molecular mechanisms behind the inhibitory effects of ginsenoside Rg3 on hepatic fibrosis: A review[J]. Arch Toxicol, 2025, 99(2): 541-561. DOI: 10.1007/s00204-024-03941-w.
[23] An L, Lin Y F, Li L Y, et al. Integrating network pharmacology and experimental validation to investigate the effects and mechanism of *Astragalus* flavonoids against hepatic fibrosis[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 618262. DOI: 10.3389/fphar.2020.618262.
[24] 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.
Wu Can, Huang Liang, Mo Liqian, 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.
[25] 郑洋，邓青梅，陈豪，等．基于PI3K/AKT/mTOR信号通路探讨莪术醇抗肝纤维化的分子机制[J]．中药药理与临床，2021，37(4)：36-40. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2021.04.005.
Zheng Yang, Deng Qingmei, Chen Hao, et al. Molecular mechanism of curcumol against liver fibrosis based on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Pharmacol Clin Chin Materia Med, 2021, 37(4): 36-40. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2021.04.005.

收稿日期：2026-02-11；**录用日期**：2026-04-13
本文编辑：王莹

引证本文：廖丹丹，吴卓檀，龚俊文，等．八珍荔核抗纤方对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠模型的影响[J]．临床肝胆病杂志，2026，42(8)：1857-1865.
Liao Dandan, Wu Zhuotan, Gong Junwen, et al. Effect of Bazhen Lihe Kangxian prescription on rats with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(8): 1857-1865.

·国外期刊精品文章简介·

Hepatology | 乙型肝炎病毒e抗原阴性乙型肝炎病毒感染中单用核苷(酸)类似物与核苷(酸)类似物停药后序贯聚乙二醇干扰素辅助治疗的效果比较

2026年8月，伦敦帝国理工学院Mark Thursz团队于*Hepatology*在线发表一项多中心随机对照NUC-B试验。研究纳入非肝硬化、乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)阴性、核苷(酸)类似物(NA)治疗不少于3年的慢性乙型肝炎(CHB)患者156例，随机分为两组，对照组(82例)直接停用NA；干预组(74例)停用NA，间隔4周后给予16周短程聚乙二醇干扰素(PEG-IFN)治疗，并开展为期3年的随访。主要终点为3年乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)清除率；次要终点包括定量HBsAg(qHBsAg)动态变化、NA重启治疗率、重度肝炎发生率等。结果显示，对照组3年随访HBsAg清除率仅为3.0%，干预组可达14.3%(P=0.037)；Kaplan-Meier曲线提示干预组实现HBsAg清除的风险显著升高(风险比=5.68，P=0.025)，全程随访干预组qHBsAg下降幅度显著优于对照组。对照组重度肝炎累积发生率为27.9%，干预组为13.4%(比值比=0.38，P=0.028)，加用短程PEG-IFN可显著降低停药后重度肝炎的发生率；发生重度肝炎的患者均未获得HBsAg清除。两组需要重启NA治疗的比例差异无统计学意义(28.4% vs 34.9%，P=0.130)。此外，A型患者qHBsAg下降趋势更显著，但仅为探索性结果。

该研究证实，对于非肝硬化、经长期NA抑制的HBeAg阴性CHB患者，NA停药后间隔4周序贯16周短程PEG-IFN，相较于单纯停药，可显著提升3年HBsAg功能性清除率，同时降低停药后重度肝炎发生风险，为有限疗程追求CHB临床治愈提供了全新思路。但该研究结论不可外推至肝硬化患者，临床实践中需严格筛选适用人群，充分与受试者沟通获益及潜在风险；停药阶段密切监测肝功能、HBV DNA，及时对肝炎发作进行处理，必要时重启NA抗病毒治疗。

摘译自 Thursz M, Lemoine M, Brown A, et al. Nucleos(t)ide withdrawal versus nucleos(t)ide withdrawal with adjuvant pegylated-interferon in HBeAg-negative hepatitis B virus infection (NUC-B trial)[J]. Hepatology, 2026. DOI: 10.1097/HEP.0000000000001821. [Epub ahead of print]

(吉林大学第一医院感染病中心肝病科 郁欣蕾 华瑞 报道)