

神效托里散对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化作用及代谢组学研究

李楠楠¹, 孟宪生¹, 郭文昭¹, 米朦¹, 卢秉久^{2*} (1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

摘要: **目的** 探讨神效托里散对 CCl₄ 所致大鼠肝纤维化的作用及其可能的作用机制。 **方法** 采用 40% CCl₄ (2 mL·kg⁻¹) 诱导大鼠肝纤维化模型, 每周 2 次, 共计 8 周。造模第 6 周开始灌胃给予神效托里散, 给药时间为 8 周。采用脏器指数及 Masson 染色评价抗肝纤维化的药效; 采用 HPLC-QTOF-MS 联用技术检测神效托里散干预后各组大鼠血浆中代谢物的变化, 利用 Ropls 软件进行偏最小二乘法判别分析、差异代谢物筛选及代谢通路分析。 **结果** 脏器指数结果显示, 神效托里散可以不同程度地降低大鼠的肝指数、脾指数, 升高胸腺指数, 与模型组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); Masson 染色结果表明, 神效托里散干预后肝脏中纤维结缔组织增生变浅变窄, 与空白组大鼠较接近; 代谢组学分析显示, 与模型组比较, 神效托里散干预后共有 385 种代谢物发生变化, 其中上调的有 20 种, 下调的有 365 种, 如花生四烯酸、皮质酮、胆汁酸、亚油酸等。主要与脂解的调节、亚油酸代谢、胆汁分泌、鞘脂信号通路、不饱和脂肪酸的生物合成等代谢途径有关。 **结论** 神效托里散对 CCl₄ 所致大鼠肝纤维化具有很好的防治作用, 其作用机制可能与脂解的调节、胆汁酸代谢、脂肪酸代谢等途径有关。

关键词: 神效托里散; 肝纤维化; 代谢组学; 作用机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)19-2483-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.19.008

引用本文: 李楠楠, 孟宪生, 郭文昭, 等. 神效托里散对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化作用及代谢组学研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(19): 2483-2488.

Metabolomics Study and Effect of Shenxiao Tuolisan on CCl₄-induced Hepatic Fibrosis Rats

LI Nannan¹, MENG Xiansheng¹, GUO Wenzhao¹, MI Meng¹, LU Bingjiu^{2*} (1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. Liaoning Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of Shenxiao Tuolisan on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats and its possible mechanism. **METHODS** The rat hepatic fibrosis model was established by intragastric administration of 40% CCl₄ (2 mL·kg⁻¹), twice a week for 8 weeks. After the intervention of Shenxiao Tuolisan at 6 week for 8 weeks. Evaluated anti-fibrotic efficacy by organ index and Masson staining. HPLC-QTOF-MS combined technology was used to detect the changes of metabolites in the plasma of rats in each group. Ropls software was used to partial least squares discriminant analysis, differential metabolite screening and metabolic pathway analysis. **RESULTS** The organ index results showed that Shenxiao Tuolisan could reduce the liver index and spleen index, increase the thymus index in different degrees, and there was a significant difference compared with the model group ($P < 0.01$). The results of Masson staining showed that the hyperplasia of fibrous connective tissue in the liver became shallower and narrower after the intervention of Shenxiao Tuolisan. Metabolomics analysis indicated that, compared to the model control group, 385 metabolites changed after the intervention of Shenxiao Tuolisan, of which 20 were up-regulated and 365 were down-regulated, such as arachidonate acid, cholic acid, linoleate acid. Mainly related to regulation of lipolysis in adipocytes, linoleic acid metabolism, bile secretion, sphingolipid signaling pathway, biosynthesis of unsaturated fatty acids. **CONCLUSION** Shenxiao Tuolisan has a good effect on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats, and its mechanism of action may be related to the regulation of lipolysis in adipocytes, bile acid synthesis and other metabolic pathways.

KEYWORDS: Shenxiao Tuolisan; hepatic fibrosis; metabolomics; mechanism

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是临床常见且多发的疾病,其特征是肝内细胞外基质过量沉淀、纤维结缔组织异常增生^[1]。近年来肝纤维化的患病率及死亡率逐年增加,严重危害人们生命健康^[2]。因此,寻找有效的抗肝纤维化药物,具有重要的

临床意义。

神效托里散载于《宋·太平惠民和剂局方》,由忍冬草(金银花)、黄芪、当归、炙甘草组成。用于治疗痈疽发背、肠痈、奶痈、无名肿毒。现代研究表明,金银花能降低肝纤维化程度,减轻肝细

作者简介: 李楠楠, 女, 博士, 讲师 E-mail: linannan-999@163.com *通信作者: 卢秉久, 男, 博士, 教授, 博导 E-mail: lubingjiu@163.com

胞损伤,对肝纤维化有较好的防治作用^[3];黄芪总黄酮可通过减少炎症反应而抑制大鼠的肝纤维化^[4];当归可减轻小鼠肝损伤,改善肝功能^[5-6];甘草具有抗肝纤维化、保肝的作用^[7]。因此,本研究对神效托里散抗肝纤维化的作用及其可能的作用机制进行研究,为神效托里散的开发和临床应用奠定基础。

1 材料

1.1 动物

SPF级SD大鼠,♂,60只,体质量(200±20)g,购于辽宁长生生物技术有限公司,动物使用许可证号:SYXK(辽)2013-0009。动物实验经辽宁中医药大学动物伦理委员会审查同意实施。

1.2 药物与试剂

神效托里散(提取制备方法见“2.1”);四氯化碳(CCl₄,上海麦克林生化科技有限公司,批号:C805332);橄榄油(益海嘉里粮油食品工业有限公司,批号:958796)。

1.3 仪器

6550型HPLC-QTOF-MS(美国Agilent公司);HC-2517型台式冷冻离心机(科大创新股份有限公司);-80℃超低温冰箱(美国New brunswick scientific公司);Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×100 mm, 2.7 μm)。

2 方法

2.1 神效托里散的制备

取药材金银花75g、黄芪75g、当归18g、炙甘草120g,粉碎,以10倍量水煎煮3次,每次1h,合并滤液,调整药液浓度为生药材0.75 g·mL⁻¹,供后续动物灌胃使用。

2.2 动物分组及给药

按2 mL·kg⁻¹大鼠体质量的给药剂量灌胃给予40% CCl₄(CCl₄:橄榄油=2:3)溶液,每周2次,至第8周停止^[8],造模6周时,将造模大鼠随机分为模型组、神效托里散高、中、低剂量组(9.0, 3.0, 1.0 g·kg⁻¹)和阳性药组(秋水仙碱,0.2 mg·kg⁻¹)5组,每组各10只。随机选取未进行CCl₄灌胃的大鼠10只,作为空白组,灌胃给予相同体积的橄榄油。各组大鼠每天灌胃给药1次,给药时间为8周,每日更换清洁饮用水,隔日更换垫料。

2.3 大鼠脏器指数变化

第15周时,禁食不禁水12h后,大鼠称重,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,处死后解剖取出肝、

脾、胸腺,称重,计算脏器指数(脏器指数=大鼠脏器质量/大鼠体质量×100)。

2.4 肝组织 Masson 染色

第15周时,处死后解剖取出肝脏,部分肝组织以4%组织固定液固定,脱水透明,浸蜡及包埋,切片和贴片,Masson染色,电子显微镜下观察组织结构改变程度^[9]。

2.5 血浆代谢组学分析

2.5.1 血浆样本的制备 第15周时,眼球取血,静置45 min,4℃ 3 000×g离心15 min血浆。取各组大鼠血浆每个200 μL于离心管中,加入800 μL预冷的甲醇,涡旋2 min,10 000×g 4℃下离心10 min,取上清液置于新的离心管中,真空旋转干燥,加100 μL预冷的甲醇复溶,涡旋2 min,10 000×g 4℃下离心2 min,吸取上清液进行分析^[10-11]。

2.5.2 HPLC-QTOF-MS 分析条件 色谱条件:Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×100 mm, 2.7 μm);柱温30℃;流速0.4 mL·min⁻¹;流动相A为0.1%甲酸-水,流动相B为乙腈-甲醇(9:1);进样量5 μL。按照以下梯度洗脱:0~5 min,5%→20% B;5~6 min,20%→30% B;6~26 min,30%→65% B;26~32 min,65%→100% B。

质谱条件:电喷雾离子源,采用负离子模式检测,干燥气体流速为13 L·min⁻¹,雾化器为45 psig,干燥气体温度为350℃,毛细管电压为3 500 V,碎裂电压为125 V,射频电压为750 V,质谱扫描范围为m/z 100~1 500。

2.6 数据处理

将HPLC-QTOF-MS质谱采集得到的原始数据使用MS-DIAL(version:4.38)软件进行峰提取、峰对齐、峰校正处理,使用MassBank、HMDB、ReSpec、GNP等数据库进行代谢物结构鉴定。应用软件Ropls(version:1.24.0)进行偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)及差异代谢物的筛选,筛选标准为P<0.05, VIP>1。将分析得到的差异代谢物使用KEGG数据库进行相关通路分析。

3 结果

3.1 大鼠脏器指数结果

与空白组大鼠比较,CCl₄所致肝纤维化模型组大鼠的肝指数、脾指数增加,胸腺指数降低(P<0.01),神效托里散高、中剂量组大鼠的肝指

数降低,与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。神效托里散中、低剂量脾指数降低,与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。神效托里散高、中、低剂量组胸腺指数有不同程度的升高,与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。说明神效托里散对大鼠的肝脏的病变有一定的改善,而且对大鼠的免疫器官有一定的保护作用。结果见图 1。

3.2 肝组织 Masson 染色结果

肝组织 Masson 染色见图 2,结果显示,空白组肝细胞以中央静脉为中心成条索状规则排列。模型组肝细胞排列已杂乱无规则,纤维结缔组织增生形成纤维间隔已经将肝叶分割形成假小叶,蓝染区域明显。神效托里散不同剂量干预后胶原纤维增生带不同程度的减少,纤维间隔变窄,说明神效托里散对 CCl_4 诱导的肝纤维化具有很好的防治作用。

3.3 血浆代谢组学分析

3.3.1 HPLC-QTOF-MS 分析 TIC 图 采用 HPLC-QTOF-MS 对空白组、模型组、神效托里散 ($3.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组血浆中代谢物进行检测,得到的正离子模式总离子流图谱(TIC 图)见图 3,不同组别大鼠血浆中内源性的代谢物在 32 min 内分离度较好,且 TIC 图具有明显差异,说明各组的内源性

代谢物表达存在差异。

3.3.2 正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) OPLS-DA 是生物学中常用的一种有监督的判别分析统计方法,运用该分析可以反映样本组间和组内的差异。空白组与模型组比较的 OPLS-DA 得分图见图 4A,图中空白组、模型组数据分离度较好,说明 2 组内源性代谢物表达量具有差异。如图 4B 所示,该组数据正离子模式的 OPLS-DA 模型置换检验图, R^2 、 $Q^2 \geq 0.5$,说明本实验正离子模式数据建立的 OPLS-DA 模型未发生过拟合。空白组、模型组、神效托里散组大鼠血浆样本的 PLS-DA 图(图 4C)可以看出不同组别间数据距离较远,而且神效托里散组与空白组较接近,与模型组距离较远,说明各组血浆中内源性物质在代谢层面存在差异。

3.3.3 差异代谢物分析 以模型组为对照组,采用变异倍数分析、T 检验 2 种单变量分析方法进行差异代谢物分析,筛选标准 $\text{Fold Change} > 2.0$ 且 $P < 0.05$,综合 2 种分析方法绘制火山图,见图 4D,其中红色代表上调的代谢物,蓝色代表下调的代谢物,灰色为无变化的代谢物。鉴定结果表明,经软肝冲剂干预后共有 385 种代谢物发生变化,其中上调的有 20 种,下调的有 365 种,将数

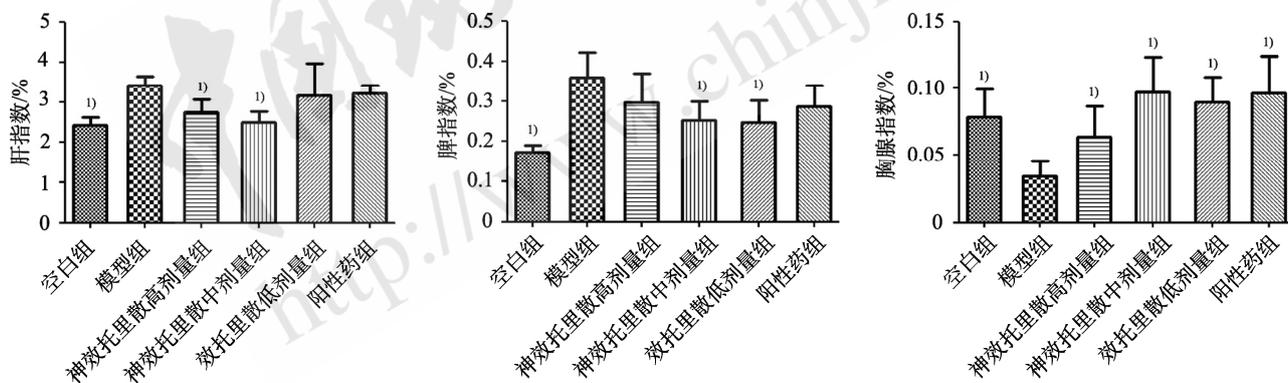


图 1 大鼠脏器指数统计结果与模型组比较, $^{1)}P < 0.01$ 。

Fig. 1 Statistical results of organ index Compared with model group, $^{1)}P < 0.01$.

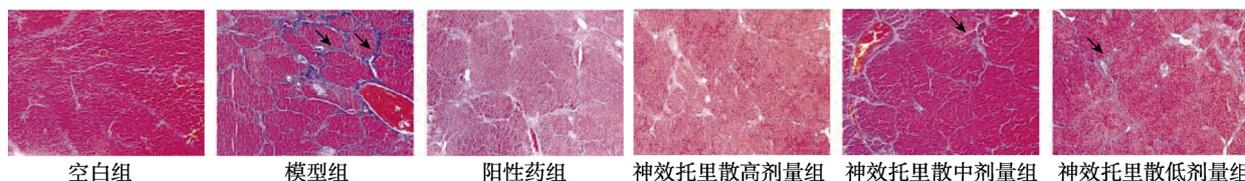


图 2 各组大鼠肝组织 Masson 染色结果(200×)

Fig. 2 Results of Masson staining of rat liver tissue in each group(200×)

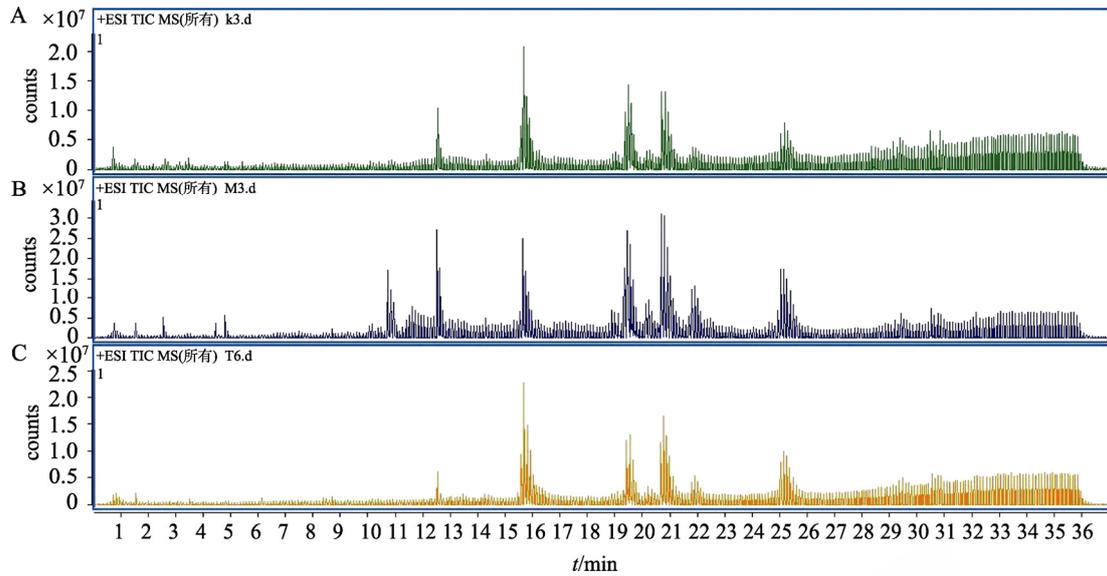


图3 各组大鼠血浆样品正离子模式 TIC 图

A-空白组; B-模型组; C-神效托里散组。

Fig. 3 Positive TIC map of plasma samples of rats in each group

A-blank group; B-model group; C-Shenxiao Tuolisan group.

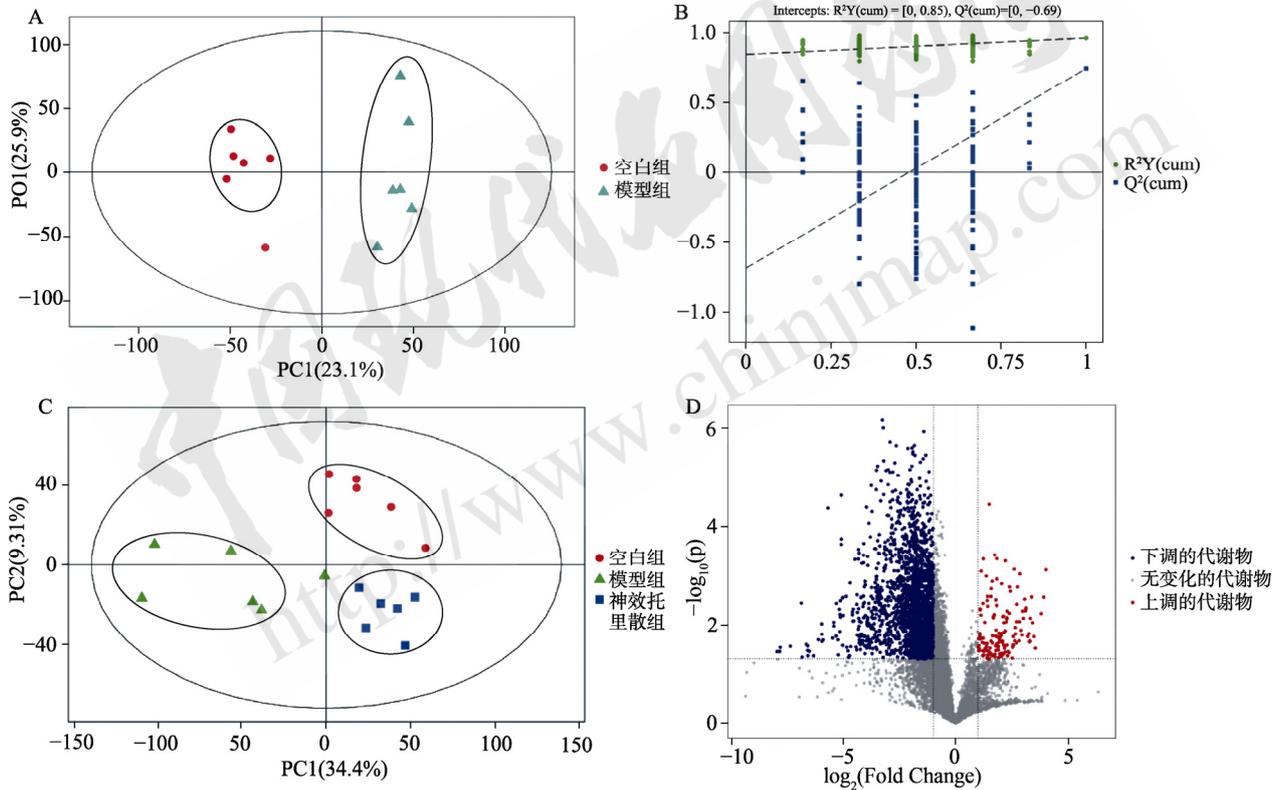


图4 多变量分析结果

A-空白组与模型组 OPLS-DA 得分图; B-空白组与模型组置换验证图; C-3 组 PLS-DA 得分图; D-火山图。

Fig. 4 Multivariate analysis results

A-OPLS-DA score plot of blank group and model group; B-permutation verification plot of blank group and model group; C-PLS-DA score plot of 3 groups; D-volcano plot.

据导入 MassBank、HMDB、ReSpect、RIKEN IMS oxidized phospholipids 等数据库进行代谢物结构鉴定, 结果表明发生变化的代谢物如花生四烯酸

(arachidonate acid)、皮质酮(corticosterone)、胆汁酸(cholic acid)、亚油酸(linoleate acid)等, 表 1 中将部分发生变化的代谢物列出。

表 1 差异代谢物的鉴定结果(部分)

Tab. 1 Identification results of differential metabolites (partial)

序号	化学式	名称	m/z	变化趋势
1	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	adenosine(腺苷)	268.10	上调
2	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	arachidonate acid(花生四烯酸)	305.24	下调
3	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	corticosterone(皮质酮)	347.22	下调
4	C ₈ H ₉ NO ₂	acetaminophen	152.07	下调
5	C ₂₆ H ₃₄ FNO ₅	cerivastatin	460.24	下调
6	C ₃₃ H ₃₆ N ₄ O ₆	bilirubin(胆红素)	602.29	下调
7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	tetrahydroxy-5 α -cholan-24-oic Acid	390.50	下调
8	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	taurodeoxycholic acid(牛磺脱氧胆酸)	499.70	下调
9	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	cholic acid(胆酸)	407.28	下调
10	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	linoleate acid(亚油酸)	281.25	下调
11	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	13-oxoODE	295.22	下调
12	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂	sphinganine(鞘氨醇)	288.29	下调
13	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	tetracosanoic acid(四二十烷酸)	391.36	下调
14	C ₉ H ₁₃ NO ₃	L-tyrosine(L-酪氨酸)	182.08	下调
15	C ₁₀ H ₁₅ NO ₄	kainic Acid(红藻氨酸)	252.06	下调
16	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	2',4-dihydroxychalcone	241.04	上调
17	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	NCGC00380966	247.09	上调

3.3.4 相关通路分析 将初步鉴定出的差异代谢物通过 KEGG 代谢物数据库进行相关通路分析, 结果见图 5, 包括脂解的调节(regulation of lipolysis in adipocytes)、亚油酸代谢(linoleic acid metabolism)、胆汁分泌(bile secretion)、鞘脂信号通路(sphingolipid signaling pathway)、不饱和脂肪酸的生物合成(biosynthesis of unsaturated fatty acids)等, 推测神效托里散对 CCl₄ 所致大鼠肝纤维化的治疗作用可能与调节这些代谢途径有关。

4 讨论

采用非靶向代谢组学近年来在中药抗纤维化的研究中得到广泛应用^[12-13], 通过对机体内小分子代谢物的变化进行测定, 来揭示药物与疾病的关系^[14]。本研究采用 HPLC-QTOF-MS 对不同组大鼠血浆进行检测后进行非靶向代谢组学分析, 寻找神效托里散治疗肝纤维代谢差异物, 阐释其抗肝纤维化的作用机制。

胆汁酸可帮助吸收消化胆固醇, 其含量的多少直接反映肝脏转化胆固醇的能力, 可间接反映肝功能^[15]。临床将胆汁酸的上升作为肝脏病变的指标, 靳东芳等^[16]的临床研究表明, 265 例肝胆疾病患者血清总胆汁酸的含量均明显高于健康人, Gao 等^[17]的研究也表明, 肝纤维化模型大鼠血清中胆汁酸代谢产物如牛磺猪去氧胆酸、牛磺胆酸、猪去氧胆酸和胆酸的水平非常显著高于正常大鼠, 综合以上研究, 说明肝脏病变伴随着胆汁酸合成和代谢的紊乱。本研究的结果中, 模型组大鼠血浆中牛磺胆酸、胆酸、牛磺脱氧胆酸等较正常组大鼠升高, 神效托里散干预后与胆汁酸代谢有关的物质含量均降低, 见表 1, 说明神效托里散调节了肝纤维化大鼠机体异常的胆汁酸合成和代谢而发挥抗肝纤维化的作用。

肝脏是不饱和脂肪酸合成和代谢的重要器官, 当肝脏发生损伤或是病变时则会引起机体脂降解及不饱和脂肪酸代谢的异常, 导致机体脂肪堆积而导致炎性细胞浸润或肝实质病变^[18]。Liu 等^[19]的研究也表明, CCl₄ 所致的大鼠肝损伤后血

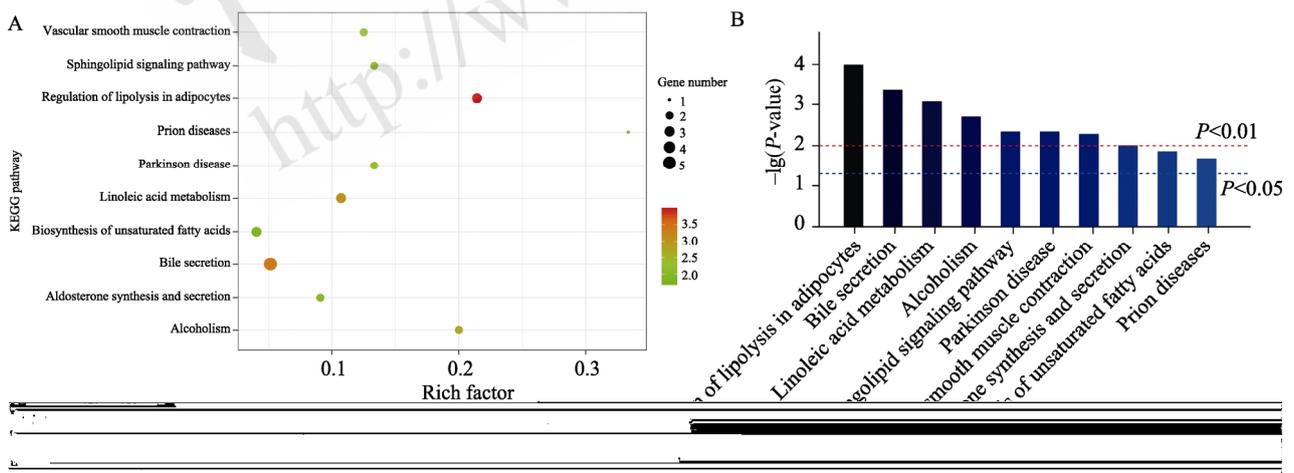


图 5 代谢组学分析结果

A-KEGG 气泡图; B-KEGG P 值图。

Fig. 5 Results of metabolomics analysis

A-KEGG of bubble plot; B-KEGG of P-value plot.

清中游离脂肪酸和酯化脂肪酸水平均明显高于正常组大鼠。

本研究的结果中,神效托里散干预后大鼠血浆中不饱和脂肪酸如花生四烯酸、亚油酸、13-oxoODE、四二十烷酸等较模型组含量明显降低,说明神效托里散可能通过脂解的调节、亚油酸代谢及不饱和脂肪酸的生物合成等代谢而发挥抗肝纤维化的作用。

综上,神效托里散对 CCl₄ 所致大鼠肝纤维化具有很好的防治作用,其作用机制可能与脂解的调节、胆汁酸代谢、脂肪酸代谢等途径有关。本研究对神效托里散抗纤维化的作用及其可能的作用机制进行研究,为神效托里散作为抗肝纤维化药物的开发和临床应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] XIE A Z, LV C, SHI Q L, et al. Research progress on prevention and treatment of liver fibrosis by traditional Chinese medicine[J]. China Med Herald(中国医药导报), 2020, 17(17): 34-37.
- [2] PIMPIN L, CORTEZ-PINTO H, NEGRO F, et al. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies[J]. J Hepatol, 2018, 69(3): 718-735.
- [3] XU X Y, MIAO F, WANG X D, et al. The effect and mechanism of *Lonicera japonica* total flavones on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats[J]. J Taishan Med Coll(泰山医学院学报), 2020, 41(1): 1-4.
- [4] 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.
- [5] FU Z Y, MA C X. Effect of angelica polysaccharide on liver injury induced by cisplatin chemotherapy in H22 ascites tumor mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2018, 34(3): 68-72.
- [6] 王华, 孙娜. 当归的有效化学成分及药理作用研究进展分析[J]. 山东化工, 2017, 46(18): 59-60.
- [7] ZHU S C, ZHENG X M, ZHANG Y, et al. Effect of TY501 on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(17): 3554-3559.
- [8] YAN S H, MIAO H, HUANG Z L, et al. Protective effects of extract combination of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* against CCl₄-induced liver fibrosis in mice[J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med(上海中医药大学学报), 2021(2): 50-56.
- [9] ZHAO S X, ZHANG R S, YANG S B. Study on effects of asiaticoside against hepatic fibrosis in rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(5): 666-670.
- [10] ZHANG N, FANG H, WANG X, et al. Metabonomic study of intervene effect of Xiaoyao Powder on rats with hepatic fibrosis[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(4): 588-594.
- [11] LI N N, MENG X S, BAO Y R, et al. Anti-liver cancer mechanism of total flavonoids from *Oroxylum Semen* based on metabolomics[J]. Central South Pharm(中南药理学), 2019(12): 2034-2039.
- [12] ZHANG H Y, WANG X N, HU P, et al. Serum metabolomic characterization of liver fibrosis in rats and anti-fibrotic effects of Yin-Chen-Hao-Tang[J]. Molecules, 2016, 21(1): E126.
- [13] WU B, SHEN M Y, CHEN H P, et al. Spleen deficiency and phlegm dampness syndrome model in rats treated by *Citri Reticulatae Pericarpium* based on metabolomics[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47(15): 4136-4147.
- [14] YANG N, XU J L, SHENG G G, et al. Progress of metabolomics in the study of anti hepatic fibrosis of traditional Chinese medicine[J]. China Med Herald(中国医药导报), 2020, 17(29): 33-36.
- [15] 陈亮, 马吉芳, 王倩. 血清总胆汁酸检测在肝胆疾病中的临床意义与检验学研究[J]. 中国医药指南, 2016, 14(16): 129-130.
- [16] 靳东芳, 师磊, 何强. 血清总胆汁酸测定在肝胆疾病中的临床意义[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(53): 125-126.
- [17] GAO G Y, ZHENG X Y, PENG Y, et al. Effect of Fuzheng Huayu capsule on serum metabolomics in rats with liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(9): 1725-1731.
- [18] CAO W R, GE J Q, XIE X, et al. Protective effects of petroleum ether extracts of *Herpetospermum caudigerum* against α -naphthylisothiocyanate-induced acute cholestasis of rats[J]. J Ethnopharmacol, 2017(198): 139-147.
- [19] LIU X J, LI H W, HU C, et al. Evaluation of chemical liver injury based on metabolic profiling of serum fatty acids[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2021, 56(8): 647-653.

收稿日期: 2022-01-10
(本文责编: 陈怡心)