基于血清代谢组学研究佛手柑内酯治疗肝纤维化的作用机制Δ

吴辉星[1*]，张振华[2]，龙昌锐[1]，郭桂芬[3]，王炎玉[2]，陈燕纯[2]，付钜雄[1]，乡世健[2,4]，周本杰[2,4]，鲁澄宇[1#]（1.广东医科大学药学院，广东 东莞 523808；2.中山大学附属第七医院药学部，广东 深圳 518107；3.惠东县人民医院血液净化中心，广东 惠州 513600；4.深圳市中药活性物质筛选与转化重点实验室，广东 深圳 518107）

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）13-1570-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.13.05

摘 要 目的 基于血清代谢组学技术研究佛手柑内酯（BP）治疗肝纤维化的作用及机制。**方法** 将40只小鼠分为正常对照组（0.5%羧甲基纤维素钠溶液）、模型组（0.5%羧甲基纤维素钠溶液）和BP低、高剂量组（50、100 mg/kg），每组10只。除正常对照组外其余3组小鼠均采用四氯化碳诱导肝纤维化模型。同时，各组小鼠灌胃相应药物/溶剂，每日1次，连续8周。末次给药后，检测小鼠血清中丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）水平，观察小鼠肝组织病理形态学变化，检测小鼠肝组织中α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、Ⅰ型胶原蛋白（Collagen Ⅰ）表达，同时对小鼠血清进行代谢组学分析。**结果** 与模型组比较，BP低、高剂量组小鼠血清中ALT、AST水平和肝组织中α-SMA、Collagen Ⅰ蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$），肝组织的纤维化程度显著改善。代谢组学结果显示，BP高剂量组和模型组共有175个血清差异代谢物，其中18个物质上调、157个物质下调，涉及的主要代谢途径有嘧啶代谢、丁酸盐代谢、脂肪酸合成、酪氨酸代谢、β-丙氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢以及谷胱甘肽代谢等。**结论** BP可能通过调节肝纤维化小鼠血清中嘧啶代谢、丁酸盐代谢和谷胱甘肽代谢等途径达到治疗肝纤维化的作用。

关键词 佛手柑内酯；肝纤维化；血清代谢组学；差异代谢物；代谢途径

Serum metabolomics-based study on the mechanism of action of bergapten in the treatment of liver fibrosis

WU Huixing[1], ZHANG Zhenhua[2], LONG Changrui[1], GUO Guifen[3], WANG Yanyu[2], CHEN Yanchun[2], FU Juxiong[1], XIANG Shijian[2,4], ZHOU Benjie[2,4], LU Chengyu[1] (1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Guangdong Dongguan 523808, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Shenzhen 518107, China; 3. Blood Purification Center of Huidong County People's Hospital, Guangdong Huizhou 513600, China; 4. Shenzhen Key Laboratory of Chinese Medicine Active Substance Screening and Translational Research, Guangdong Shenzhen 518107, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To study the effects of bergapten in the treatment of liver fibrosis and its mechanism based on serum metabolomics. **METHODS** Forty mice were divided into normal control group (0.5% carboxymethyl cellulose sodium solution), model group (0.5% carboxymethyl cellulose sodium solution), and BP low-dose and high-dose groups (50, 100 mg/kg), with 10 mice in each group. Except for the normal control group, the other three groups were all treated with carbon tetrachloride to induce liver fibrosis model; they were given relevant medicine/solution intragastrically, once a day, for consecutive 8 weeks. After the last medication, the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were detected, and liver pathological changes were observed; the expressions of α-smooth muscle actin (α-SMA) and Collagen Ⅰ were detected in liver tissue; the serum of the mice was collected for metabolomics analysis. **RESULTS** Compared with the model group, serum levels of ALT and AST and protein expressions of α-SMA and Collagen Ⅰ in liver tissue were decreased significantly in BP high-dose and low-dose groups ($P<0.05$), while liver fibrosis was improved significantly. Meanwhile, metabolomics analyses showed that there were a total of 175 serum differential metabolites in the BP high-dose group and model group, of which 18 substances were upregulated and 157 substances were downregulated; the main metabolic pathways involved in bergapten intervention were pyrimidine metabolism, butanoate metabolism, fatty acid synthesis, tyrosine metabolism, β-alanine metabolism, nicotinic acid and nicotinamide metabolism, glutathione metabolism, etc. **CONCLUSIONS** BP is effective in the treatment of liver fibrosis by regulating pyrimidine metabolism, butanoate metabolism, glutathione metabolism and so on in rats with liver fibrosis.

KEYWORDS bergapten; liver fibrosis; serum metabolomics; differential metabolites; metabolic pathway

肝纤维化通常由各类慢性肝损伤，如乙肝病毒引起的肝损伤、非酒精性脂肪性肝病、酒精性脂肪性肝病、胆汁淤积性肝病和化学性肝损伤等引起的慢性损伤和自我修复过程，并在此过程中以细胞外基质（extracellular matrix，ECM）过度沉积为特征进而形成纤维化瘢痕，若

Δ**基金项目** 国家自然科学基金项目（No.82074078）；广东基础与应用基础研究基金项目（No.2022A1515220027）；深圳市科技计划项目（No.ZDSYS20220606100801003）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：代谢组学与肝纤维化。E-mail：whx2021@gdmu.edu.cn

＃**通信作者** 教授，硕士生导师，博士。研究方向：药效学与药物代谢动力学。E-mail：luchengyu@gdmc.edu.cn

不加以控制，最终会引起肝硬化乃至肝癌[1]。虽然关于肝纤维化治疗的药理研究较多，但临床上尚无特异、有效的肝纤维化治疗方法，主要还是通过保肝类药物（如水飞蓟素、奥贝胆酸等）缓解肝损伤和肝脏炎症来改善症状。但水飞蓟素会导致腹泻，奥贝胆酸会引起皮肤瘙痒和甲状腺功能异常等不良反应[2]。因此，开发有效且安全的肝纤维化治疗药物具有重要意义。

佛手柑内酯（bergapten，BP）又名5-甲氧基补骨脂素，是中国传统的药食两用植物佛手中的一种呋喃香豆素类成分[3]，具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等多种药理活性[4－5]。既往研究表明，BP能够减轻对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤[6]，提示其有一定的保肝作用，但BP对肝纤维化的治疗效果和机制还鲜有报道。由于代谢组学已广泛应用于挖掘肝纤维化的发病机制，因此本研究采用四氯化碳（CCl_4）诱导并制备肝纤维化小鼠模型，以此来评价BP改善肝纤维化的效果，并采用广泛靶向代谢组学技术探讨BP对肝纤维化小鼠血清中差异代谢物的影响，初步探究BP改善肝纤维化的作用机制，以期为BP用于肝纤维化的防治提供理论基础。

1　材料

1.1　主要仪器

本研究所用的主要仪器有KF-PRO-020型数字病理切片扫描仪（宁波江丰生物信息技术有限公司）、Tanon 5200型全自动化学发光图像分析系统（上海天能生命科学生物有限公司）、QuantStudio 6型实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、Mini-PROTEAN型垂直电泳装置（美国Bio-Rad公司）、Triple Quad™ 5500型液质联用系统（美国AB Sciex公司）等。

1.2　主要药品与试剂

BP对照品（批号155600，纯度99.95%）购自上海陶术生物科技有限公司；BCA蛋白检测试剂盒（批号060823240207）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）单克隆抗体（批号62u0922）购自江苏亲科生物研究中心有限公司；兔源α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）、重组Ⅰ型胶原蛋白（Collagen Ⅰ）单克隆抗体（批号分别为1000229-3、1002394-4）均购自英国Abcam公司；丙氨酸转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）试剂盒（批号分别为20230925、20230923）均购自南京建成生物工程研究所有限公司；甲醇、乙腈为色谱纯，水为超纯水。

1.3　动物

本研究所用动物为SPF级C57BL/6小鼠，共40只，雄性，8周龄，体重18～22 g，购自珠海百试通生物科技有限公司，动物生产许可证号为SCXK（粤）2020-0051。所有小鼠均饲养于深圳市华腾生物科技有限公司，动物使用许可证号为SYXK（粤）2023-0327。小鼠饲养在环境温度（22±1）℃、12 h光照/12 h黑暗循环的环境中，适应性喂养1周后开始造模给药。本研究经深圳华腾生物科技有限公司实验动物使用与管理委员会批准，伦理批件编号为B202308-3。

2　方法

2.1　动物分组、造模与给药

将40只小鼠按体重随机分成4组，即正常对照组（NC组）、模型组（CCl_4组）和BP低、高剂量组（BP-L、BP-H组），每组10只。CCl_4组、BP-L组、BP-H组小鼠腹腔注射含10%CCl_4的橄榄油溶液（0.5 mL/kg），NC组小鼠腹腔注射等量橄榄油溶液，每周注射2次，持续8周[7]。根据以往报道[6,8]，BP的小鼠灌胃剂量为30～100 mg/kg，鉴于BP确切的疗效和较低的毒性，本研究采用50、100 mg/kg为低、高剂量进行给药。BP-L、BP-H组小鼠自首次腹腔注射含10%CCl_4的橄榄油溶液后的第2日起，每天早上灌胃相应剂量BP（以0.5%羧甲基纤维素钠溶液作为溶剂）1次，持续8周；NC组和CCl_4组小鼠灌胃等体积的0.5%羧甲基纤维素钠溶液。

2.2　样本采集及处理

每周一的早上记录小鼠体重。末次给药后，小鼠禁食不禁水12 h。24 h后，麻醉小鼠并眼球取血，然后颈椎脱臼处死小鼠，取出小鼠肝组织，将一部分肝组织置于4%多聚甲醛中固定，剩余肝组织分装后置于－80 ℃冰箱中冻存。小鼠全血室温静置分离30 min后，在4 ℃下以3 000 r/min离心15 min，收集上层血清，置于－80 ℃冰箱中冻存，备用。

2.3　肝功能指标检测

每组随机选取6只小鼠的血清，分别按照ALT、AST试剂盒说明书操作，检测小鼠血清中ALT、AST水平。

2.4　肝组织病理形态学观察

取经4%多聚甲醛固定24 h的肝组织适量，以梯度乙醇脱水后，在室温条件下以二甲苯溶液Ⅰ、Ⅱ分别浸泡10 min，常规制备石蜡切片（厚度3 μm）。随机选取6只小鼠的肝组织石蜡切片，分别采用苏木素-伊红（HE）、Sirius Red和Masson三色染色法进行染色。采用光学显微镜观察肝组织病理形态学变化，然后分别使用Image J软件分析Sirius Red染色和Masson染色的胶原阳性面积比（胶原阳性面积与总面积的比值）。Sirius Red阳性染色呈红色，Masson阳性染色呈蓝色。

2.5　肝组织中纤维化相关蛋白表达检测

2.5.1　免疫组化法检测α-SMA蛋白表达

取“2.4”项下制备的小鼠肝组织石蜡切片，采用α-SMA一抗（稀释比例1∶1 000）进行染色，烘干后室温干燥保存，随后使用光学显微镜观察肝组织中α-SMA的表达情况（阳性染色呈棕褐色），并用Image J软件分析阳性面积比（阳性面积与总面积的比值）。

2.5.2　Western blot法检测α-SMA、Collagen Ⅰ蛋白表达

取适量冻存的肝组织，加入研磨珠和RIPA裂解液

研磨，然后于4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，取上清液以相同条件再次离心，使用BCA蛋白检测试剂盒对上清液中总蛋白进行定量。将蛋白变性处理后，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质（电压80 V，电泳时间30 min；电压120 V，电泳时间60 min），然后电转（电流80 V，转膜时间90 min）至聚偏二氟乙烯膜上，用5%牛血清白蛋白在常温条件下封闭1.5 h。加入相应一抗（α-SMA、GAPDH的稀释度均为1∶5 000，Collagen Ⅰ的稀释度为1∶2 000），在4 ℃下孵育过夜。TBST洗膜后，加入二抗（稀释度为1∶8 000），于室温孵育1 h；TBST洗膜后，滴加显色液，应用成像系统显影。应用Image J软件分析条带灰度值，以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.6 小鼠血清代谢组学研究

基于药效学结果发现，高剂量BP对于肝纤维化的改善作用较好，遂本研究选取NC组、CCl_4组和BP-H组小鼠的血清进行代谢组学分析。每只小鼠取100 μL血清置于1.5 mL EP管中，加入400 μL乙腈-甲醇（1∶1，*V*/*V*）溶液，涡旋30 s，放置在－20 ℃冰箱中1 h后取出，在4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，取上清，氮气挥干。加入100 μL乙腈-水（1∶1，*V*/*V*）溶液复溶，涡旋30 s，在4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，取上清液于进样瓶中。每个样品取5 μL上清液混合成质量控制（quality control，QC）样品，每隔10个样本插入1个QC样品，进行分析[9]。采用Triple Quad™ 5500型液质联用系统进行检测，离子对信息来源于美国AB SCIEX公司。

将得到的数据导入Metaboanalyst 6.0平台（https://www.metaboanalyst.ca）进行分析，组间差异部分利用偏最小二乘-判别分析法（partial least squares discriminant analysis，PLS-DA）和正交偏最小二乘-判别分析法（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）分析呈现；绘制火山图，以Fold Change≥1.5或Fold Change≤0.8，且$P<0.05$筛选血清差异代谢物；利用京都基因和基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）进行通路富集分析，以$P<0.05$为阈值筛选差异代谢途径[10]。

2.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析和图表绘制。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐性时组间两两比较选择LSD检验，方差不齐时组间两两比较则采用Tamhane's *T*2检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 BP对肝纤维化小鼠肝功能指标的影响

与NC组比较，CCl_4组小鼠血清中ALT、AST水平均显著升高（$P<0.05$）；与CCl_4组比较，BP-L组、BP-H组小鼠血清中ALT、AST水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组小鼠血清中ALT、AST水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，U/L）

组别	ALT	AST
NC组	5.52±1.19	37.41±7.93
CCl_4组	13.83±1.79[a]	87.07±23.82[a]
BP-L组	8.97±3.55[b]	36.24±6.79[b]
BP-H组	6.30±2.65[b]	33.80±8.33[b]

a：与NC组比较，$P<0.05$；b：与CCl_4组比较，$P<0.05$。

3.2 BP对肝纤维化小鼠肝组织病理形态学的影响

HE染色结果显示，NC组小鼠肝细胞排列整齐，细胞界限清晰，细胞核无明显核固缩和核破裂溶解现象；与NC组比较，CCl_4组小鼠肝组织细胞排列紊乱，细胞界限模糊，出现明显的核固缩和核破裂溶解现象；与CCl_4组比较，BP-L组和BP-H组小鼠肝组织细胞较为整齐，细胞界限清楚，细胞核固缩和核破裂溶解情况改善，其中以BP-H组小鼠的改善作为更显著。肝组织Masson和Sirius Red染色结果显示，NC组小鼠无明显胶原纤维染色，无假小叶形成；与NC组比较，CCl_4组小鼠肝组织有明显胶原纤维染色和假小叶形成，Masson染色阳性面积比、Sirius Red染色阳性面积比均显著升高（$P<0.05$）；与CCl_4组比较，BP-L组和BP-H组小鼠肝组织胶原纤维染色和假小叶形成明显减少，Masson染色阳性面积比、Sirius Red染色阳性面积比均显著降低（$P<0.05$），其中以BP-H组小鼠的改善作用更明显。结果见图1、表2。

3.3 BP对肝纤维化小鼠肝组织中纤维化相关蛋白表达的影响

3.3.1 免疫组化检测结果

与NC组[阳性面积比为（1.59±0.74）%，$n=6$]比较，CCl_4组小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达[阳性面积比为（3.08±1.17）%，$n=6$]显著增强（$P<0.05$）；与CCl_4组比较，BP-L组和BP-H组小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达[阳性面积比分别为（1.28±0.50）%、（0.99±0.50）%，$n=6$]均显著减弱（$P<0.05$）。结果见图2。

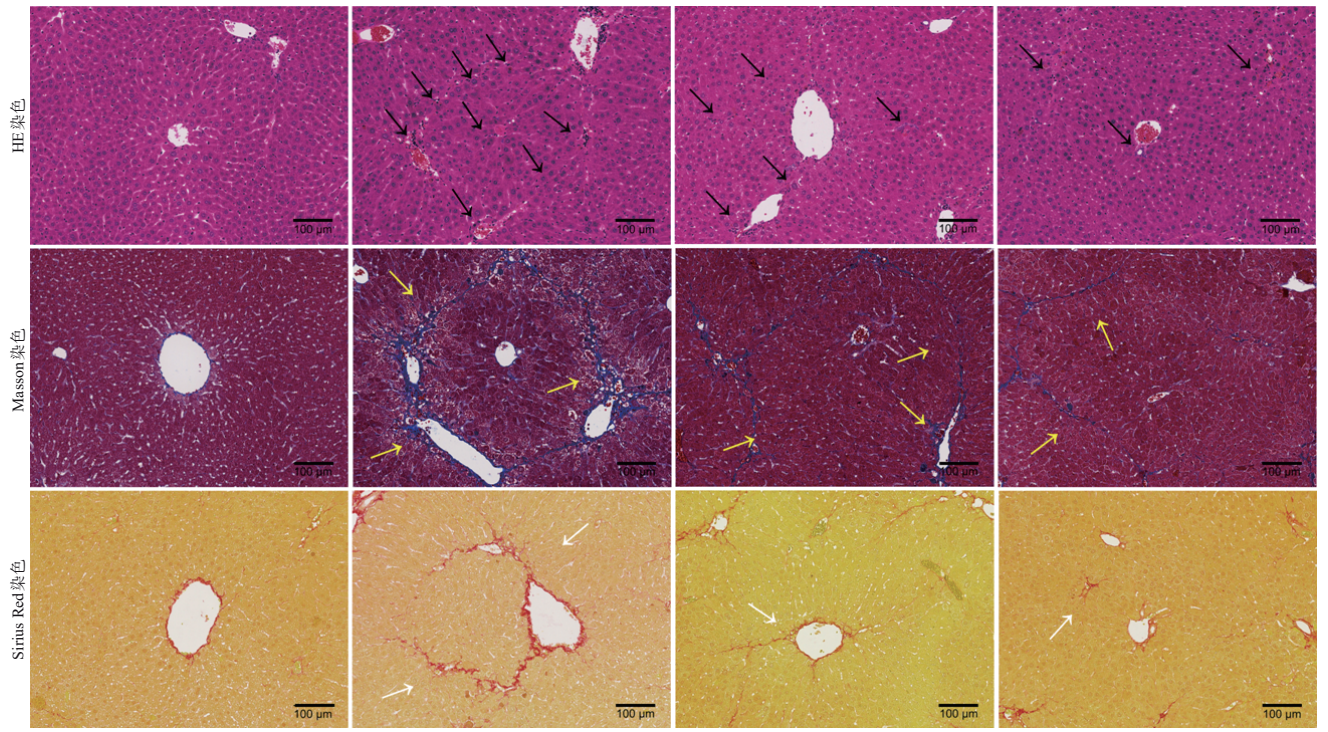
3.3.2 Western blot检测结果

与NC组比较，CCl_4组小鼠肝组织中α-SMA、Collagen Ⅰ蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与CCl_4组比较，BP-L组和BP-H组小鼠肝组织中α-SMA、Collagen Ⅰ蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图3、表3。

3.4 代谢组学研究结果

3.4.1 BP对肝纤维化小鼠血清代谢物的影响

PLS-DA结果（图4）显示，NC组、CCl_4组和BP-H组3组样品分离明显，说明各组间代谢物有明显差异。OPLS-DA结果（图5）显示，NC组与CCl_4组的R^2Y（表示模型的解释率，数值越接近于1表示模型的差异性越大）和Q^2（表示模型的预测能力，数值越接近于1表示模型的可靠性越强）分别为0.968、0.715，CCl_4组与BP-H组的R^2Y和Q^2分别为0.998、0.833，所有的OPLS-DA模型无过度拟合。火山图（图6）显示，NC组和CCl_4组共有36个血清差异代谢物，其中16个物质上调，20个物质下调；



注：黑色箭头所指为HE染色中肝细胞凋亡、坏死的病变特征；黄色箭头、白色箭头所指分别为Masson染色和Sirius Red染色后肝组织中的胶原沉积。

图1　各组小鼠肝组织病理形态学观察显微图

表2　各组小鼠肝组织中胶原阳性面积比检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，%）

组别	Masson染色阳性面积比	Sirius Red染色阳性面积比
NC组	0.81±0.56	1.01±0.95
CCl_4组	6.17±2.67[a]	6.45±3.71[a]
BP-L组	1.71±1.20[b]	1.28±0.36[b]
BP-H组	1.30±0.67[b]	1.09±0.47[b]

a：与NC组比较，$P<0.05$；b：与CCl_4组比较，$P<0.05$。

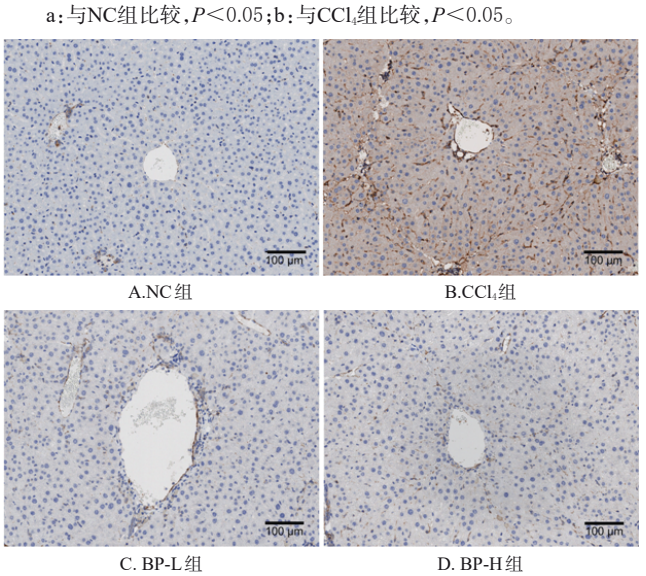


图2　各组小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达的免疫组化染色图

CCl_4组和BP-H组共有175个血清差异代谢物，其中18个物质上调，157个物质下调。CCl_4组与BP-H组排名前20位的血清差异代谢物信息见表4。

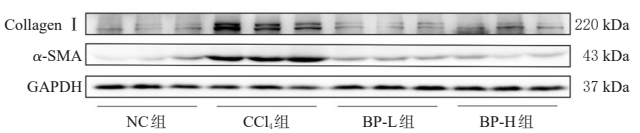


图3　各组小鼠肝组织中α-SMA、Collagen Ⅰ蛋白表达的电泳图

表3　各组小鼠肝组织中α-SMA、Collagen Ⅰ蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	α-SMA/GAPDH	Collagen Ⅰ/GAPDH
NC组	3.02±1.60	0.79±0.30
CCl_4组	26.27±11.14[a]	2.27±0.80[a]
BP-L组	4.42±1.73[b]	0.60±0.18[b]
BP-H组	2.88±1.45[b]	1.01±0.38[b]

a：与NC组比较，$P<0.05$；b：与CCl_4组比较，$P<0.05$。

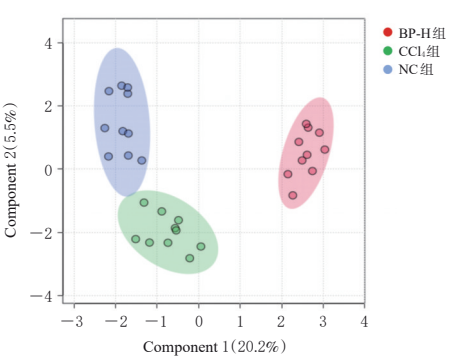
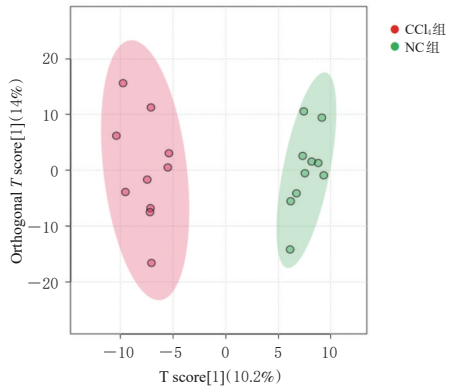


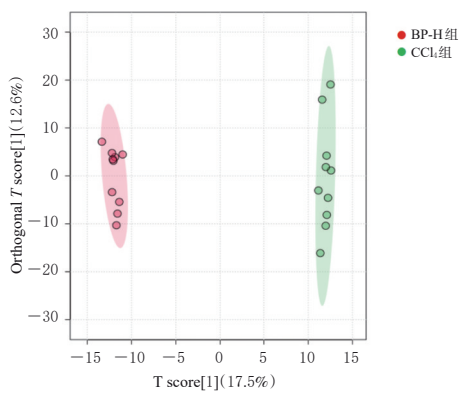
图4　3组小鼠血清代谢物分析的PLS-DA图

3.4.2　BP对肝纤维化小鼠血清代谢途径的影响

KEGG通路富集分析结果显示，CCl_4组和BP-H组有56条差异代谢途径，其中嘧啶代谢、丁酸盐代谢、脂肪

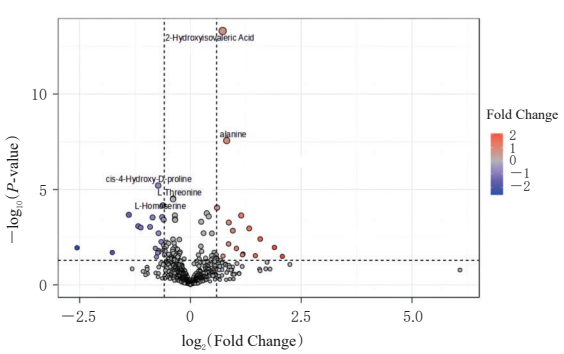


A. NC组 vs. CCl_4组

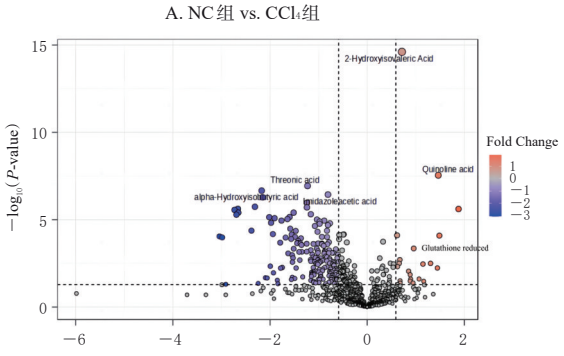


B. CCl_4组 vs. BP-H组

图5　3组小鼠血清代谢物分析的OPLS-DA图



A. NC组 vs. CCl_4组



B. CCl_4组 vs. BP-H组

图6　3组小鼠血清代谢物分析的火山图

酸合成、酪氨酸代谢、β-丙氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢以及谷胱甘肽代谢等代谢途径发生显著变化。CCl_4组和BP-H组排名前10位的血清差异代谢途径见表5。

表4　CCl_4组与BP-H组排名前20位的血清差异代谢物

序号	化合物英文名称	化合物中文名称	$\log_2$(Fold Change)	P	趋势
1	glutathione reduced	还原型谷胱甘肽	1.88	2.44×10^{-6}	↑
2	cysteine	半胱氨酸	1.49	8.14×10^{-5}	↑
3	quinoline acid	喹啉酸	1.46	2.86×10^{-8}	↑
4	2-pyrocatechuic acid	2-焦儿茶酸	1.45	5.80×10^{-3}	↑
5	nicotinic acid	烟酸	1.30	3.16×10^{-3}	↑
6	L-cystathionine	L-胱硫胺酸	1.16	3.34×10^{-2}	↑
7	Hippuric acid	马尿酸	1.15	3.46×10^{-3}	↑
8	3-indolepropionic acid	3-吲哚丙酸	1.07	2.47×10^{-2}	↑
9	shikimic acid	莽草酸	0.96	4.41×10^{-4}	↑
10	uridine triphosphate	尿苷三磷酸	0.94	4.15×10^{-2}	↑
11	3-hydroxymethylglutaric acid	3-羟基甲基戊二酸	−2.10	2.11×10^{-2}	↓
12	α-hydroxyisobutyric acid	α-羟基异丁酸	−2.15	5.25×10^{-7}	↓
13	1-methylnicotinamide	1-甲基烟酰胺	−2.17	2.19×10^{-7}	↓
14	indole	吲哚	−2.24	4.43×10^{-2}	↓
15	malonic acid	丙二酸	−2.38	4.25×10^{-5}	↓
16	3-hydroxybutyric acid	3-羟基丁酸	−2.66	2.37×10^{-6}	↓
17	2-hydroxybutyric acid	2-羟基丁酸	−2.73	2.75×10^{-6}	↓
18	3-hyrdoxybutyrate	3-羟基丁酸酯	−2.91	4.98×10^{-2}	↓
19	acetoacetic acid	乙酰乙酸	−2.99	1.04×10^{-4}	↓
20	isovaleric acid	异戊酸	−3.04	9.01×10^{-5}	↓

↑：BP-H组与CCl_4组比较，该代谢物水平显著升高；↓：BP-H组与CCl_4组比较，该代谢物水平显著降低。

表5　CCl_4组与BP-H组排名前10位的血清差异代谢途径

序号	代谢途径	P	$-\log_{10}$(P-value)	影响力数值
1	嘧啶代谢	1.03×10^{-6}	5.99	0.34
2	丁酸盐代谢	1.22×10^{-6}	5.91	0.11
3	脂肪酸合成	3.20×10^{-6}	5.49	0.01
4	酪氨酸代谢	3.63×10^{-6}	5.44	0.09
5	β-丙氨酸代谢	4.10×10^{-6}	5.39	0.10
6	烟酸和烟酰胺代谢	5.14×10^{-6}	5.29	0.33
7	泛酸和辅酶A合成	7.41×10^{-6}	5.13	0.05
8	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	2.16×10^{-5}	4.67	0.40
9	谷胱甘肽代谢	6.12×10^{-5}	4.21	0.30
10	泛醌及其他萜类醌生物合成	6.65×10^{-5}	4.18	<0.01

4　讨论

由于CCl_4诱导的肝纤维化模型与人类肝纤维化具有相似的病理形态学改变，因而常用于肝纤维化研究[11]。肝纤维化的典型特征是肝星状细胞活化和胶原过度沉积，α-SMA是肝星状细胞活化的标志，Collagen Ⅰ则是胶原纤维中的主要类型[12]。在本研究中，BP对CCl_4诱导的肝纤维化模型小鼠的血清肝功能、肝细胞凋亡坏死和胶原沉积具有明确的改善作用；并且，BP能够降低肝纤维化模型小鼠肝组织中α-SMA、Collagen Ⅰ的表达，表明其能够在一定程度上抑制肝星状细胞活化和改善胶原沉积情况。

本研究通过代谢组学分析和文献调研发现，BP在治疗肝纤维化过程中调节的代谢物主要有还原型谷胱甘肽、半胱氨酸、3-吲哚丙酸、尿苷三磷酸和异戊酸等物质。其中，3-吲哚丙酸为吲哚类衍生物，研究报道，其可以调节非酒精性脂肪性肝病小鼠肠道菌群紊乱，抑制核因子-κB轻链增强子通路以抑制肝脏炎症和肝损伤；此外，3-吲哚丙酸还可以抑制纤维化和胶原基因的表达，对非酒精性脂肪性肝病所致的肝损伤表现出良好的效果[13]。

本研究通过代谢途径富集分析和文献调研发现，主要是嘧啶代谢、丁酸盐代谢、脂肪酸合成、酪氨酸代谢、β-丙氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢以及谷胱甘肽代谢等代谢途径在肝纤维化小鼠中发生了显著变化。相关研究发现，肝脏嘧啶在高脂合并胆碱缺乏饮食、高脂高胆固醇高果糖饮食分别诱导的2种肝纤维化小鼠模型中维持较低水平，而抑制嘧啶分解代谢可以有效改善肝纤维化[14]。丁酸可经门静脉进入肝脏下调脂质合成基因的表达，改善非酒精性脂肪性肝病所致的肝损伤；此外，在肠道中，丁酸可经革兰氏阳性菌厚壁菌属分解代谢成丁酸盐的形式，而丁酸盐作为一种有益的短链脂肪酸，可以改善高脂饮食诱导的肥胖和抑制非经典的转化生长因子β通路，进而改善小鼠肝纤维化症状[15-16]。此外，谷胱甘肽代谢途径对于肝纤维化的防治具有重要意义[17]。谷胱甘肽由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸结合而成，是一种有效的抗氧化剂和自由基清除剂，谷胱甘肽的缺失会引起肝细胞氧化和抗氧化系统失衡，进而引起谷胱甘肽过氧化物酶4的失活，导致肝细胞发生铁死亡，促进肝纤维化的发展[18]。本研究发现，血清中还原型谷胱甘肽和半胱氨酸水平在BP干预后显著升高，提示BP可能通过促进还原型谷胱甘肽的合成产生抗氧化作用，进而减少肝细胞铁死亡，改善肝纤维化。

综上所述，BP可能通过调节肝纤维化小鼠血清中嘧啶代谢、丁酸盐代谢和谷胱甘肽代谢途径等达到治疗肝纤维化的作用。后续，本课题组将设计体内外实验进一步研究BP抗肝纤维化的具体分子机制，从而为BP在肝纤维化临床治疗中的应用提供更多依据。

参考文献

[1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166.

[2] 陆伦根，尤红，谢渭芬，等. 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.
LU L G, YOU H, XIE W F, et al. Consensus on the diagnosis and therapy of hepatic fibrosis: 2019[J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(10): 2163-2172.

[3] 史俊豪，丘琴，刘晓芳，等. 佛手化学成分和药理作用及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中华中医药学刊，2023，41(4)：17-28.
SHI J H, QIU Q, LIU X F, et al. Chemical components and pharmacological action for Foshou (Citri Sarcodactylis Fructus) and predictive analysis on Q-marker[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(4): 17-28.

[4] LUO T, JIA X, FENG W D, et al. Bergapten inhibits NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis via promoting mitophagy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(9): 1867-1878.

[5] ADAKUDUGU E A, AMEYAW E O, OBESE E, et al. Protective effect of bergapten in acetic acid-induced colitis in rats[J]. Heliyon, 2020, 6(8): e04710.

[6] LIU W X, JIA F L, HE Y Y, et al. Protective effects of 5-methoxypsoralen against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(18): 2197-2202.

[7] SCHOLTEN D, TREBICKA J, LIEDTKE C, et al. The carbon tetrachloride model in mice[J]. Lab Anim, 2015, 49 (Suppl. 1): 4-11.

[8] KOWALCZYK J, KURACH Ł, BOGUSZEWSKA-CZUBARA A, et al. Bergapten improves scopolamine-induced memory impairment in mice via cholinergic and antioxidative mechanisms[J]. Front Neurosci, 2020, 14: 730.

[9] WANG L C, SU B Z, ZENG Z D, et al. Ion-pair selection method for pseudotargeted metabolomics based on SWATH MS acquisition and its application in differential metabolite discovery of type 2 diabetes[J]. Anal Chem, 2018, 90(19): 11401-11408.

[10] HONG Y Z, SHEN M Y, YU Q, et al. UPLC-Q-TOF/MS-based metabolomics reveals modulatory effects of *Mesona chinensis* Benth polysaccharide in liver injury mice induced by cyclophosphamide[J]. Food Sci Hum Wellness, 2023, 12(2): 584-595.

[11] HE S, LUO Y R, MA W G, et al. Endothelial POFUT1 controls injury-induced liver fibrosis by repressing fibrinogen synthesis[J]. J Hepatol, 2024: S0168-S8278(24)00152-1.

[12] RHO H, TERRY A R, CHRONIS C, et al. Hexokinase 2-mediated gene expression via histone lactylation is required for hepatic stellate cell activation and liver fibrosis [J]. Cell Metab, 2023, 35(8): 1406-1423.e8.

[13] ZHAO Z H, XIN F Z, XUE Y Q, et al. Indole-3-propionic acid inhibits gut dysbiosis and endotoxin leakage to attenuate steatohepatitis in rats[J]. Exp Mol Med, 2019, 51 (9): 1-14.

[14] LUUKKONEN P K, SAKUMA I, GASPAR R C, et al. Inhibition of HSD17B13 protects against liver fibrosis by inhibition of pyrimidine catabolism in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(4): e2217543120.

[15] ZHAO Z H, WANG Z X, ZHOU D, et al. Sodium butyrate supplementation inhibits hepatic steatosis by stimulating liver kinase B1 and insulin-induced gene[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 12(3): 857-871.

[16] GART E, VAN DUYVENVOORDE W, TOET K, et al. Butyrate protects against diet-induced NASH and liver fibrosis and suppresses specific non-canonical TGF-β signaling pathways in human hepatic stellate cells[J]. Biomedicines, 2021, 9(12): 1954.

[17] KONG Z Y, LIU R, CHENG Y R. Artesunate alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 2043-2053.

[18] FU Y D, ZHOU X X, WANG L, et al. Salvianolic acid B attenuates liver fibrosis by targeting Ecm1 and inhibiting hepatocyte ferroptosis[J]. Redox Biol, 2024, 69: 103029.

（收稿日期：2024-02-27　修回日期：2024-06-03）

（编辑：林　静）