

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.03.012

茵芪三黄解毒汤对肝纤维化模型小鼠肝脏组织巨噬细胞极化及 Piezo1/PI3K/AKT 通路的影响

黄渤皓^{1,2}, 武庆娟¹, 汪九重¹, 李彦波¹, 雷超¹, 吕文良¹✉

1. 中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁5号, 100053; 2. 北京中医药大学研究生院

[摘要] **目的** 基于机械敏感性离子通道蛋白1 (Piezo1)/磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶B (AKT) 通路探讨茵芪三黄解毒汤改善肝纤维化的作用机制。**方法** 将50只C57BL/6J小鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组和茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组, 每组10只。除对照组外, 其余各组小鼠通过腹腔注射10% CCl₄ (每周2次, 持续6周) 复制肝纤维化小鼠模型。造模结束当天, 茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组分别予茵芪三黄解毒汤混悬液3.79、7.58、15.16 ml/(kg·d)灌胃, 对照组和模型组予等量生理盐水灌胃, 每日1次, 持续8周。给药结束次日, 采用超声成像检测肝脏硬度值, 原子力显微镜检测肝组织杨氏模量, HE染色检测肝脏组织病理形态, 天狼猩红染色检测肝脏组织胶原沉积情况, 全自动生化分析仪检测血清肝功能[丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)] 和肝纤维化四项[层粘连蛋白 (LN)、透明质酸 (HA)、Ⅲ型前胶原 (PC-Ⅲ) 及Ⅳ型胶原 (C-Ⅳ)] 水平, 流式细胞术检测肝脏组织M1/M2比值, 实时荧光定量PCR法检测肝脏组织转化生长因子β1 (TGF-β1)、α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA)、Ⅰ型胶原 (collagen-Ⅰ)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、肿瘤坏死因子α (TNF-α)、精氨酸酶1 (Arg-1)、甘露糖受体 (CD206) mRNA表达, Western Blot法检测Piezo1、磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶 (p-PI3K)、PI3K、磷酸化蛋白激酶B (p-AKT) 及AKT蛋白水平。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏硬度值、杨氏模量升高 ($P<0.01$); 肝脏结构紊乱, 胶原纤维沉积比例升高 ($P<0.01$); 血清ALT、AST、TBIL、DBIL、HA、PC-Ⅲ水平及M1/M2比值升高, TGF-β1、α-SMA、collagen-Ⅰ、iNOS、TNF-α mRNA表达升高, Arg-1、CD206 mRNA表达降低, 肝脏组织Piezo1、p-PI3K、p-AKT蛋白水平升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 茵芪三黄解毒汤各剂量组上述各指标均显著改善 ($P<0.01$)。茵芪三黄解毒汤高剂量组在改善肝脏硬度值、肝脏杨氏模量、胶原纤维沉积比例、ALT、DBIL、HA、PC-Ⅲ、M1/M2比值, TGF-β1、α-SMA、collagen-Ⅰ、TNF-α、Arg-1、CD206 mRNA表达, Piezo1、p-PI3K、PI3K蛋白水平方面, 均优于茵芪三黄解毒汤低剂量组 ($P<0.01$)。**结论** 茵芪三黄解毒汤可能通过抑制Piezo1/PI3K/AKT信号通路, 促进巨噬细胞由促炎的M1型向抗炎的M2型极化, 发挥抗肝纤维化的作用。

[关键词] 肝纤维化; 巨噬细胞极化; 机械转导; 肝脏硬度; 茵芪三黄解毒汤

肝纤维化是由慢性肝炎 (如病毒性肝炎、非酒精性脂肪肝、自身免疫性肝炎等) 引起的细胞外基质 (ECM) 过度沉积而形成的病理过程^[1]。以基底硬度异常增加、血流动力学异常为主要特征的力学微环境改变是肝纤维化重要的变化特征^[2]。力学微

环境的改变与炎症因子改变结合, 可促进组织黏附和纤维化^[3]。在此过程中, 肝脏巨噬细胞是关键性的免疫细胞, 其极化状态与肝纤维化的发展密切相关。巨噬细胞可根据微环境的变化极化为不同亚型, 包括M1型与M2型。促炎的M1型主要启动炎症和促进肝纤维化, 而M2型则参与组织修复^[4]。

巨噬细胞的机械敏感离子通道能够感知肝脏基质硬度的变化, 将力学信号转化为生物信号, 影响疾病进程^[5]。其中, 机械敏感性离子通道蛋白1 (Piezo1)

基金项目: 国家自然科学基金 (82374332); 中央高水平中医医院临床研究和成果转化能力提升项目 (HLCMHPP2023086); 国家中医药传承创新团队项目 (ZYXCXTD-C-202405)

✉ 通讯作者: lvwenliang@sohu.com

是一种机械激活的非选择性阳离子通道蛋白,其在肝纤维化组织中高度表达^[6]。研究^[7-8]显示,Piezo1可通过下调磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)通路而抑制巨噬细胞向M1型极化,提示该通路是连接力学信号与免疫反应的关键枢纽。

目前尚无疗效确切的、针对肝纤维化的药物^[9],中医药治疗肝纤维化具有多靶点、多途径、多层次的调控优势。课题组研究表明,茵芪三黄解毒汤能降低患者肝硬化发病率,改善肝纤维化,改善临床症状^[10];基础研究发现,该方能调节肝脏力学微环境、改善肝星状细胞力学特性、逆转肝窦毛细血管化,从而发挥抗肝纤维化作用^[11-12]。然而,该方是否能够调控Piezo1/PI3K/AKT通路影响肝脏巨噬细胞极化,目前尚属未知。基于此,本研究从Piezo1/PI3K/AKT通路调控巨噬细胞极化角度探讨茵芪三黄解毒汤改善肝纤维化的作用。本实验通过中国中医科学院广安门医院实验动物伦理委员会审批,伦理批准号:IACUC-GAMH-2025-011。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠50只,6周龄,体重18~24 g,由北京维通利华实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。动物饲养于国家纳米科学中心标准实验室,温度(26±2)℃,12 h光照/黑暗循环,湿度45%~55%,保持通风,适应性饲养1周。

1.2 药物

茵芪三黄解毒汤组成:黄芪12 g,茵陈12 g,黄芩3 g,黄连3 g,黄柏3 g,莪术6 g,醋鳖甲3 g,焦山楂15 g,白芍12 g,凌霄花6 g,麸炒白术9 g,茯苓9 g,北柴胡6 g,白花蛇舌草12 g。药物购于中国中医科学院广安门医院,将上述药材加10倍量蒸馏水浸泡30 min,煮沸后文火煎煮60 min,过滤药液,制得浓缩液浓度为2.22 g/ml。

1.3 主要试剂与仪器

Piezo1抗体(批号:TD12083)、磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(p-PI3K)抗体(批号:T40116S)、PI3K抗体(批号:T40115S),艾比玛特生物医药(上海)有限公司;磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)抗体(批号:4060T)、AKT抗体(批号:9272S),美国Cell Signaling Technology公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号:GB15004),武汉赛维尔生物科技有限公司;BCA试剂盒(批号:

ZJ102),武汉三鹰生物技术有限公司;RIPA裂解液(批号:P0013B)、苯甲磺酰氟(PMSF,批号:ST506)、超敏ECL化学发光试剂盒(批号:P0018S),上海碧云天生物技术有限公司;实时荧光定量PCR试剂盒(批号:Q331),南京诺唯赞生物科技股份有限公司;FITC-CD45抗体(批号:103107)、PE-F4/80抗体(批号:123109)、PerCP-CD80抗体(批号:104721)、APC-CD206抗体(批号:141707)、流式细胞固定液(批号:422101),美国Biolegend公司;羊抗兔二抗(批号:bsm-52262R)、羊抗鼠二抗(批号:bs-40296G-IRDye800CW),北京博奥森生物技术有限公司;红细胞裂解液(批号:R1010-500 ml)、改良HE染色试剂盒(批号:G1121)、改良天狼猩红染色试剂盒(批号:G1472),北京索莱宝科技有限公司;OCT冰冻切片包埋剂(批号:4583),海德创业(北京)生物科技有限公司;四氯化碳(CCl₄,批号:H1810200),阿拉丁生化科技股份有限公司。

H1型多功能酶标检测仪,美国伯腾仪器有限公司;KD-2260型轮转式切片机,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;Hitachi-7100型全自动生化分析仪,北京日立科学仪器有限公司;D3024R型高速低温离心机,大龙兴创实验仪器(北京)股份有限公司;CX40型生物显微镜,宁波舜宇仪器有限公司;Resona R9型超声诊断系统,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;PicoScan5500型原子力显微镜,美国安捷伦科技有限公司;165-8001型蛋白电泳仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;1708370型化学发光成像系统,美国伯腾仪器有限公司;BD FACS Calibur流式细胞仪,美国碧迪公司;75002543型Sorvall™ Legend™ Micro 17R微量离心机、ABI7500型实时荧光定量PCR仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.4 动物分组、造模及给药

将50只小鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组及茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组,每组10只。除对照组外,其余各组小鼠均通过腹腔注射10% CCl₄橄榄油溶液(橄榄油与CCl₄的体积比为9:1)0.1 ml、每周2次(固定于周二、周五),持续6周,建立肝纤维化模型。造模成功判定标准^[13]:模型小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)>150 U/L、天冬氨酸氨基转移酶(AST)>250 U/L,HE染色显示肝组织胶原纤维面积密度增加,汇管区纤维组织增生,则证明造模成功;若造模不成功,统一继

续造模至 8 周。本研究造模成功率为 100%。

参考《中药药效研究方法学》^[14], 根据成人临床剂量 1.85 g/(kg·d), 通过体表面积折算系数(1:9.1)换算, 小鼠等效生药剂量为 16.84 g/(kg·d)。造模结束当天开始灌胃, 茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组分别给予茵芪三黄解毒汤浓缩液 3.79、7.58、15.16 ml/(kg·d) 灌胃, 其中中剂量为临床等效剂量。实际灌胃操作中, 将浓缩液按相应比例稀释后, 每日灌胃体积统一为 0.3 ml。模型组及对照组于相同时间灌胃 0.3 ml 生理盐水, 各组连续灌胃 8 周。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 超声成像检测肝脏硬度值 最后 1 次给药后次日, 各组采用随机数字表法选取 5 只小鼠麻醉后, 使用 Resona 9 超声诊断仪及其配备的硬度成像模式进行检测, 同一区域连续测量 3 次获取肝脏硬度值, 最终结果取 3 次测量的算术平均数。

1.5.2 原子力显微镜检测肝脏杨氏模量 采用随机数字表法选取超声检测的 4 只小鼠, 取肝脏组织保存于 -80℃ 冰箱中。将保存的肝组织样本进行冰冻切片 (5 mm), 切片经玻片吸附后, 使用 PBS 清洗, 并于含 1% 蛋白酶抑制剂的 H-DMEM 培养液中保存待测。使用原子力显微镜进行检测, 每个样本随机选取至少 20 个部位, 通过微悬臂探针与肝脏冰冻切片组织表面的相互作用力检测肝组织杨氏模量以观察肝脏组织硬度。

1.5.3 HE 染色法检测肝脏组织病理形态 取超声检测的 5 只小鼠的肝脏组织用 10% 多聚甲醛固定后, 依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后, 制备 4 μm 连续切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后, 苏木素染色 5 min, 1% 盐酸乙醇分化, 饱和碳酸锂溶液返蓝, 流水冲洗后伊红复染 1 min, 再经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封固。采用光学显微镜观察肝脏组织病理形态。

1.5.4 天狼猩红染色检测肝脏组织胶原沉积情况 取 HE 染色的 5 只小鼠肝组织石蜡切片用于天狼猩红染色。经脱蜡至水后, 用天狼猩红染液浸染, 酸性溶液分化, 脱水透明, 中性树胶封固。采用光学显微镜观察肝脏组织胶原沉积情况, 使用 Image J 1.52 软件分析肝脏组织胶原纤维沉积比例。

1.5.5 全自动生化分析仪检测血清肝功能、肝纤维化四项水平 选取肝脏杨氏模量检测的 4 只小鼠, 通过眼眶静脉丛采血 1.5 ml 分离血清, 利用全自动生化分析仪检测血清肝功能指标 ALT、AST、

直接胆红素 (DBIL)、总胆红素 (TBIL) 和肝纤维化四项透明质酸 (HA)、层粘连蛋白 (LN)、IV 型胶原 (C-IV)、III 型前胶原 (PC-III) 水平。

1.5.6 流式细胞术检测肝脏组织 M1/M2 比值 选取各组剩余的 5 只小鼠, 分离其肝脏组织, 即刻机械研磨后, 加入红细胞裂解液 4℃ 孵育 10~15 min, 采用 800×g、4℃ 离心 10 min, 收集细胞沉淀, 经 PBS 清洗后, 分别加入 FITC-CD45 抗体、PE-F4/80 抗体、PerCP-CD80 抗体、APC-CD206 抗体, 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗涤后加入流式细胞固定液室温孵育 1 h, 用细胞染色缓冲液转移至流式管中。使用流式细胞仪检测荧光信号, 通过 Flow Jo 10.8.1 软件分析 CD80⁺、CD206⁺ 阳性细胞群比例, 计算 M1/M2 比值。

1.5.7 实时荧光定量 PCR 法检测肝脏组织转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原 (collagen-I)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、精氨酸酶 1 (Arg-1)、CD206 mRNA 表达 采用随机数字表法选取流式细胞术的 3 只小鼠用于实时荧光定量 PCR 测定。将小鼠肝组织保存于液氮中, 按照 RNA 提取试剂盒说明书步骤操作, 提取小鼠肝脏组织总 RNA, 采用反转录试剂盒进行反转录反应, 合成 cDNA, 然后进行 PCR 扩增反应。反应体系: 20 μl, 反应条件: 95℃、10 min 预变性, 95℃、15 s 变性, 60℃、1 min 退火, 共 40 个循环, 扩增反应后进行熔解曲线分析, 计算 Ct 值。以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的 mRNA 的相对表达量。引物由北京基石医学技术公司合成, 引物序列见表 1。

1.5.8 Western Blot 法检测肝脏组织 Piezo1、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 蛋白水平 采用随机数字表法选取流式细胞术的 3 只小鼠用于 Western Blot 测定。取 100 mg 肝脏组织加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液匀浆, 4℃ 裂解 30 min 后, 15 000×g 离心 15 min 收集上清。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后, 取 50 μg 蛋白与 5× 上样缓冲液混合, 95℃ 变性 10 min。样品经 10% SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜。快速封闭 15 min 后, 分别与特异性一抗 (Piezo1 1:800、PI3K 1:800、AKT 1:800、p-PI3K 1:800、p-AKT 1:800、GAPDH 1:5000) 4℃ 孵育过夜, Piezo1 与兔二抗 (1:5000), PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT 与鼠二抗 (1:5000) 室温孵育 2 h。经 TBST 洗涤后, ECL 显影检测目标条带。使用 Image J 1.52 软件分析, 测量各蛋白条带及内参 GAPDH 条带的灰

表1 小鼠肝脏组织 *TGF-β1*、*α-SMA*、*Collagen-I*、*iNOS*、*TNF-α*、*Arg-1*、*CD206*、*GAPDH* 引物序列

Table 1 Primer sequences of *TGF-β1*、*α-SMA*、*Collagen-I*、*iNOS*、*TNF-α*、*Arg-1*、*CD206*、*GAPDH* in mouse liver tissue

引物名称	引物序列 (5'→3')	长度/bp
<i>TGF-β1</i>	上游: CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	133
	下游: GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG	
<i>α-SMA</i>	上游: GGCACCACTGAACCTAAGG	136
	下游: ACAATACCAGTTGTACGTCCAGA	
<i>Collagen-I</i>	上游: GCTCCTCTTAGGGCCACT	103
	下游: CCACGTCTCACCATTGGGG	
<i>iNOS</i>	上游: CGGCAAACATGACTTCAGGC	158
	下游: GCACATCAAAGCGGCCATAG	
<i>TNF-α</i>	上游: GGTGCCTATGTCTCAGCCTC	121
	下游: GGGAGGCCATTTGGGAAGCTT	
<i>Arg-1</i>	上游: AATGAAGAGCTGGCTGCTGT	105
	下游: GTGGCCAGAGATGCTTCCAA	
<i>CD206</i>	上游: CTCTGTTTCAGCTATTGGACGC	132
	下游: CGGAATTTCTGGGATTCAGCTTC	
<i>GAPDH</i>	上游: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	123
	下游: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

注: *TGF-β1*, 转化生长因子β1; *α-SMA*, α-平滑肌肌动蛋白; *collagen-I*, I型胶原; *iNOS*, 诱导型一氧化氮合酶; *TNF-α*, 肿瘤坏死因子α; *Arg-1*, 精氨酸酶1; *CD206*, 甘露糖受体; *GAPDH*, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

度值。以GAPDH的灰度值为基准,对目的蛋白条带灰度值进行标准化。

1.6 统计学方法

采用Graph Pad Prism 9 软件进行统计学分析。计量资料均符合正态分布且方差齐,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)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。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肝脏硬度值比较

表2示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏硬度值升高($P < 0.01$);与模型组比较,茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量小鼠肝脏硬度值降低($P < 0.01$);茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组比较,肝脏硬度值随剂量升高而降低($P < 0.01$)。

2.2 各组小鼠肝脏杨氏模量比较

表3示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏杨氏模量升高($P < 0.01$);与模型组比较,茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量小鼠肝脏杨氏模量降低($P < 0.01$);与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较,茵芪三

表2 各组小鼠肝脏硬度值比较

Tale 2 Comparison of liver stiffness values in each group of mice (kPa, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肝脏硬度值
对照组	5	4.73±0.19
模型组	5	11.13±0.67 ^{a)}
茵芪三黄解毒汤低剂量组	5	9.00±0.42 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤中剂量组	5	7.54±0.46 ^{b) c)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	5	6.85±0.32 ^{b) c) d)}

注: a) 与对照组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较, $P < 0.01$; d) 与茵芪三黄解毒汤中剂量组比较, $P < 0.01$ 。

黄解毒汤高剂量组杨氏模量降低($P < 0.01$)。

表3 各组小鼠肝脏杨氏模量比较

Table 3 Comparison of liver tissue Young's modulus among mouse groups (kPa, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肝脏杨氏模量
对照组	4	0.581±0.021
模型组	4	1.333±0.164 ^{a)}
茵芪三黄解毒汤低剂量组	4	0.942±0.069 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤中剂量组	4	0.747±0.067 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	4	0.700±0.108 ^{b) c)}

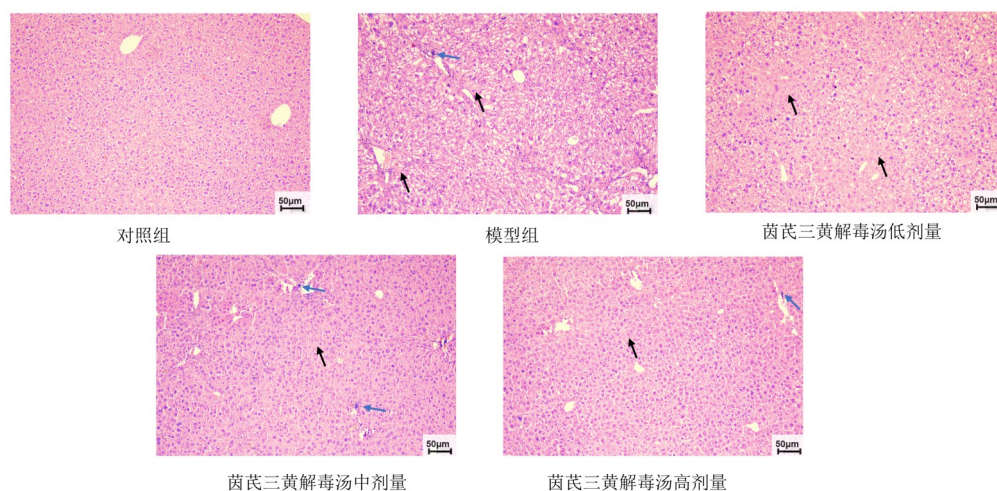
注: a) 与对照组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 各组小鼠肝脏组织病理形态比较

图1示,对照组小鼠肝脏结构整齐,肝细胞形态正常,肝小叶结构正常,汇管区结构显露清晰,无炎症细胞浸润。模型组小鼠肝脏结构紊乱,肝细胞变性坏死伴炎性细胞浸润,纤维样结缔组织增加。茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组小鼠可见肝脏结构较模型组改善,肝细胞炎症性浸润较少,肝小叶和汇管区形态均有改善;随着给药剂量增加,炎症性浸润逐渐减少,肝脏结构逐渐恢复正常,以高剂量组改善最佳。

2.4 各组小鼠肝脏组织胶原纤维沉积情况比较

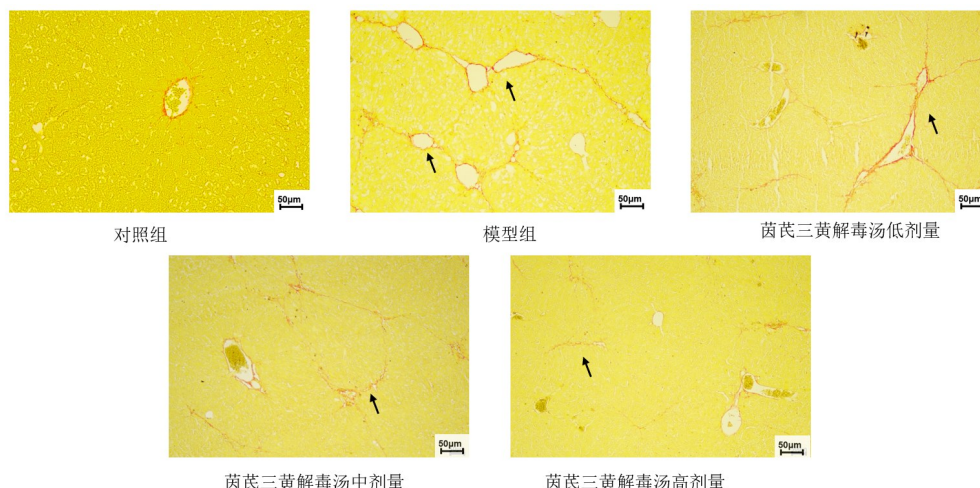
天狼猩红染色(图2)示,对照组小鼠肝脏仅有少量胶原纤维,局限于汇管区;模型组可见大量红染胶原纤维沉积;茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组小鼠肝脏胶原纤维沉积不同程度减少,其中茵芪三黄解毒汤高剂量组改善最明显。表4示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏组织胶原纤维沉积比例升高($P < 0.01$);与模型组比较,茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量小鼠肝脏组织胶原纤维沉积比例降低($P < 0.01$);与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较,茵芪三黄解毒汤中、高剂量组小鼠胶原纤维沉积比例降低($P < 0.01$)。



注：黑色箭头示肝细胞坏死，蓝色箭头示炎症细胞。

图1 各组小鼠肝脏组织病理形态比较 (HE 染色, ×400)

Figure1 Histopathological changes of liver tissue in each group of mice (HE staining, ×400)



注：箭头处代表胶原纤维沉积阳性区域。

图2 各组小鼠肝脏组织胶原纤维沉积分布 (天狼猩红染色, ×400)

Figure 2 Collagen fiber deposition in the liver of mice in each group (Sirius Red, ×400)

表4 各组小鼠肝脏组织胶原纤维沉积比例比较

Table 4 Percentage of collagen fibers in each group of mice
(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	胶原纤维沉积比例
对照组	5	0.18±0.05
模型组	5	8.35±0.51 ^{a)}
茵芪三黄解毒汤低剂量组	5	2.81±0.82 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤中剂量组	5	1.41±0.16 ^{b)} ^{c)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	5	1.24±0.47 ^{b)} ^{c)}

注：a) 与对照组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

2.5 各组小鼠血清肝功能指标水平比较

表5示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清ALT、AST、TBIL、DBIL水平升高 ($P < 0.01$); 与

模型组比较, 茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组小鼠ALT、AST、TBIL、DBIL水平降低 ($P < 0.01$); 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较, 茵芪三黄解毒汤中、高剂量组小鼠ALT、DBIL水平降低 ($P < 0.01$); 与茵芪三黄解毒汤中剂量组比较, 茵芪三黄解毒汤高剂量组小鼠ALT、DBIL水平降低 ($P < 0.01$)。

2.6 各组小鼠血清肝纤维化四项水平比较

表6示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清HA、PC-Ⅲ水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组小鼠HA、PC-Ⅲ水平降低 ($P < 0.01$); 茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组比较, HA、PC-Ⅲ水平随剂量升高而降低 ($P < 0.01$)。LN、C-Ⅳ各组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 5 各组小鼠血清肝功能指标水平比较

Table 5 Comparison of ALT, AST, TBIL, and DBIL levels in each group of mice (x̄±s)

组别	鼠数	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹	DBIL/μmol·L ⁻¹
对照组	4	111.62±21.86	117.29±15.90	591.01±20.71	379.16±22.67
模型组	4	416.90±56.51 ^{a)}	218.73±25.93 ^{a)}	867.37±77.05 ^{a)}	592.11±29.81 ^{a)}
茵芪三黄解毒汤低剂量组	4	209.09±20.91 ^{b)}	111.83±2.36 ^{b)}	747.84±29.44 ^{b)}	452.96±39.04 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤中剂量组	4	170.47±12.50 ^{b) c)}	109.40±5.07 ^{b)}	735.34±35.50 ^{b)}	411.32±36.83 ^{b) c)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	4	153.29±32.20 ^{b) c) d)}	110.60±11.44 ^{b)}	696.08±42.31 ^{b)}	382.17±23.35 ^{b) c) d)}

注：ALT，丙氨酸氨基转移酶；AST，天冬氨酸氨基转移酶；TBIL，总胆红素；DBIL，直接胆红素。

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较， $P<0.01$ ；d) 与茵芪三黄解毒汤中剂量组比较， $P<0.01$ 。

表 6 各组小鼠血清肝纤维化四项水平比较

Table 6 Comparison of HA, LN, PC-Ⅲ, and C-Ⅳ levels among groups (ng·ml⁻¹, x̄±s)

组别	鼠数	HA	LN	PC-Ⅲ	C-Ⅳ
对照组	4	565.21±167.12	90.08±2.61	15.22±0.96	28.09±0.95
模型组	4	1776.99±289.95 ^{a)}	89.29±1.46	36.63±1.80 ^{a)}	34.72±2.79
茵芪三黄解毒汤低剂量组	4	1266.24±36.87 ^{b)}	80.02±1.35	22.83±0.53 ^{b)}	29.54±1.60
茵芪三黄解毒汤中剂量组	4	1002.36±97.56 ^{b) c)}	79.27±1.25	19.95±1.48 ^{b) c)}	30.37±0.18
茵芪三黄解毒汤高剂量组	4	555.03±72.41 ^{b) c) d)}	81.55±1.31	16.31±0.76 ^{b) c) d)}	32.67±2.01

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

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较， $P<0.01$ ；d) 与茵芪三黄解毒汤中剂量组比较， $P<0.01$ 。

2.7 各组小鼠肝脏组织巨噬细胞 M1/M2 比值比较

表 7 示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏组织巨噬细胞 M1/M2 比值升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组小鼠肝脏组织 M1/M2 比值降低 ($P<0.01$)；与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较，茵芪三黄解毒汤高剂量组小鼠 M1/M2 比值降低 ($P<0.01$)。

表 7 各组小鼠肝脏组织巨噬细胞 M1/M2 比值比较

Figure 7 Ratio of M1/M2 macrophages in liver tissue of mice

in each group		(x̄±s)
组别	鼠数	M1/M2 比值
对照组	5	0.32±0.12
模型组	5	5.72±0.53 ^{a)}
茵芪三黄解毒汤低剂量组	5	1.62±0.34 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤中剂量组	5	1.17±0.30 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	5	0.75±0.25 ^{b) c)}

注：a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较， $P<0.01$ 。

2.8 各组小鼠肝脏组织 *TGF-β1*、*α-SMA*、*collagen-I*、*iNOS*、*TNF-α*、*Arg1*、*CD206* mRNA 表达比较

表 8 示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏组织 *TGF-β1*、*α-SMA*、*collagen-I*、*iNOS*、*TNF-α* mRNA 表达升高，*Arg1*、*CD206* mRNA 表达降低 ($P<$

0.01)；与模型组比较，茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组小鼠 *TGF-β1*、*α-SMA*、*collagen-I*、*iNOS*、*TNF-α* mRNA 表达降低，*Arg1*、*CD206* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)；与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较，茵芪三黄解毒汤中、高剂量组小鼠 *TGF-β1*、*α-SMA*、*collagen-I*、*TNF-α* mRNA 表达降低，*Arg1*、*CD206* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)；与茵芪三黄解毒汤中剂量组比较，茵芪三黄解毒汤高剂量组小鼠 *collagen-I* 表达降低 ($P<0.01$)。

2.9 各组小鼠肝脏组织 Piezo1、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 蛋白表达比较

表 9 示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏组织 Piezo1、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组小鼠 Piezo1、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较，茵芪三黄解毒汤中、高剂量组小鼠肝脏组织 Piezo1、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与茵芪三黄解毒汤中剂量组比较，茵芪三黄解毒汤高剂量组小鼠肝脏组织 Piezo1、p-AKT 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。各组小鼠肝脏组织 Piezo1、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 蛋白电泳图见图 3。

表 8 各组小鼠肝脏组织 *TGF-β1*、*α-SMA*、*collagen-I*、*iNOS*、*TNF-α*、*Arg1*、*CD206* mRNA 表达比较

Table 8 Comparison of mRNA expression levels of *TGF-β1*, *α-SMA*, *Collagen-I*, *iNOS*, *TNF-α*, *Arg1*, and *CD206* in liver tissue of mice in each group

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>TGF-β1</i>	<i>α-SMA</i>	<i>collagen-I</i>	<i>iNOS</i>	<i>TNF-α</i>	<i>Arg1</i>	<i>CD206</i>
对照组	3	1.00±0.20	1.00±0.09	1.00±0.01	1.03±0.17	1.00±0.11	1.00±0.12	1.00±0.03
模型组	3	4.47±0.53 ^{a)}	15.71±1.21 ^{a)}	12.12±0.41 ^{a)}	6.59±1.56 ^{a)}	4.94±1.24 ^{a)}	0.26±0.02 ^{a)}	0.64±0.05 ^{a)}
茵芪三黄解毒汤低剂量组	3	2.48±0.37 ^{b)}	7.05±0.51 ^{b)}	10.71±0.50 ^{b)}	2.32±0.44 ^{b)}	1.51±0.08 ^{b)}	0.44±0.05 ^{b)}	0.93±0.03 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤中剂量组	3	1.58±0.02 ^{b)c)}	2.28±0.27 ^{b)c)}	6.21±0.58 ^{b)c)}	1.95±0.22 ^{b)}	1.29±0.21 ^{b)c)}	0.74±0.09 ^{b)c)}	1.43±0.13 ^{b)c)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	3	1.30±0.05 ^{b)c)}	2.42±0.60 ^{b)c)}	2.13±0.51 ^{b)c)d)}	1.95±0.09 ^{b)}	0.96±0.12 ^{b)c)}	0.93±0.03 ^{b)c)}	1.25±0.10 ^{b)c)}

注：*TGF-β1*，转化生长因子β1；*α-SMA*，α-平滑肌肌动蛋白；*collagen-I*，I 型胶原；*iNOS*，诱导型一氧化氮合酶；*TNF-α*，肿瘤坏死因子α；*Arg1*，精氨酸酶1；*CD206*，甘露糖受体。

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较， $P<0.01$ ；d) 与茵芪三黄解毒汤中剂量组比较， $P<0.01$ 。

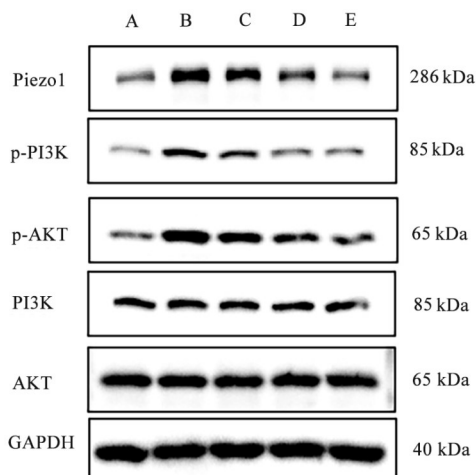
表 9 各组小鼠肝脏组织 Piezo1、p-PI3K、p-AKT、PI3K、AKT 蛋白水平比较

Tabel 9 Comparison of Piezo1, p-PI3K, p-AKT, PI3K and AKT protein expression levels in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Piezo1	p-PI3K	p-AKT	PI3K	AKT
对照组	3	1.00±0.30	1.00±0.22	1.00±0.09	1.00±0.05	1.00±0.02
模型组	3	2.99±0.23 ^{a)}	2.84±0.18 ^{a)}	3.12±0.28 ^{a)}	0.97±0.05	0.98±0.05
茵芪三黄解毒汤低剂量组	3	2.48±0.21 ^{b)}	2.11±0.26 ^{b)}	2.48±0.15 ^{b)}	0.97±0.03	0.94±0.04
茵芪三黄解毒汤中剂量组	3	1.83±0.07 ^{b)c)}	1.59±0.45 ^{b)c)}	2.03±0.32 ^{b)c)}	0.97±0.03	0.93±0.02
茵芪三黄解毒汤高剂量组	3	1.27±0.28 ^{b)c)d)}	1.41±0.33 ^{b)c)}	1.43±0.15 ^{b)c)d)}	0.96±0.02	0.97±0.03

注：Piezo1，机械敏感性离子通道蛋白1；PI3K，磷脂酰肌醇3激酶；AKT，蛋白激酶B；p-PI3K，磷酸化磷脂酰肌醇3激酶；p-AKT，磷酸化蛋白激酶B。

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较， $P<0.01$ ；d) 与茵芪三黄解毒汤中剂量组比较， $P<0.01$ 。



注：Piezo1，机械敏感性离子通道蛋白1；PI3K，磷脂酰肌醇3激酶；AKT，蛋白激酶B；p-PI3K，磷酸化磷脂酰肌醇3激酶；p-AKT，磷酸化蛋白激酶B；A，对照组；B，模型组；C，茵芪三黄解毒汤低剂量组；D，茵芪三黄解毒汤中剂量组；E，茵芪三黄解毒汤高剂量组。

图 3 各组小鼠肝脏组织 Piezo1、p-PI3K、p-AKT、PI3K、AKT 蛋白电泳图

Figure 3 Western Blot analysis of Piezo1, p-PI3K, p-AKT, PI3K, and AKT protein expression levels in liver tissue among groups

3 讨论

肝纤维化是肝脏从慢性肝炎向肝硬化甚至肝癌转变的过渡阶段，干预及时可逆转该进程^[15]。茵芪三黄解毒汤是本团队针对肝纤维化所创制的临床疗效显著的方剂^[10]。方中黄芪作为君药，具有补气功效。臣药茵陈清肝胆湿热；黄芩、黄连及黄柏三药合用，协同清解毒邪。佐药莪术与醋鳖甲活血化瘀、通络散结，焦山楂配伍凌霄花行气活血，白花蛇舌草清热解毒利湿；柴胡引药入肝经，协同芍药柔肝解郁、调气和血；茯苓与麸炒白术具有健脾益气之效。全方针对肝纤维化“气虚络瘀”的核心病机发挥重要作用。

本研究结果显示，茵芪三黄解毒汤各剂量组小鼠血清 AST、ALT、TBIL、DBIL 低于模型组，提示茵芪三黄解毒汤具有保肝降酶的作用。病理染色结果提示茵芪三黄解毒汤可使小鼠肝细胞变性和炎性细胞浸润减轻，肝小叶、汇管区纤维化增生程度减轻，胶原纤维沉积减少，提示茵芪三黄解毒汤可改善肝纤维化。M1 型和 M2 型巨噬细胞之间的不平衡导致了肝纤维化的进展^[16]。M1 型巨噬细胞可分泌

释放 TNF- α 、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 等介质, 这些介质参与肝脏慢性损伤过程; M2 型巨噬细胞表达 Arg-1、白细胞介素 10 (IL-10) 等因子抑制炎症反应, 帮助肝组织修复^[17]。同时, 巨噬细胞可通过分泌血小板衍生生长因子(PDGF)、TGF- β 1、核因子 κ B (NF- κ B) 等激活肝星状细胞, 使其分化为成纤维细胞^[18-19]。本研究结果显示, 与模型组比较, 茵芪三黄解毒汤各剂量组能降低 M1/M2 比值及 M1 型巨噬细胞标记物 *iNOS*、*TNF- α* mRNA 表达, 同时促进 M2 型巨噬细胞标记物 *Arg1*、*CD206* mRNA 表达。此外, 茵芪三黄解毒汤各剂量组中肝星状细胞活化相关基因 *TGF- β 1*、 *α -SMA*、*collagen-I* mRNA 表达也受到抑制。以上结果表明, 茵芪三黄解毒汤可能通过促进巨噬细胞由促炎的 M1 型向抗炎的 M2 型极化, 抑制肝星状细胞活化, 发挥抗肝纤维化作用。

肝纤维化可引起肝脏的力学微环境发生变化, 如流体剪切力增大、组织弹性增大、基底硬度增大等^[20]。ECM 沉积引起的肝组织硬度增加是肝纤维化的主要特点之一^[21]。本实验结果显示, 模型组小鼠肝脏硬度值升高, 经茵芪三黄解毒汤干预后, 肝脏硬度值降低。杨氏模量是表征材料弹性特性的关键物理量, 反映了某一物质抵抗形变的能力, 该参数直接体现材料的刚性程度。原子力显微镜因其纳米级分辨率, 已成为细胞力学研究的重要工具^[22]。本实验结果表明, 茵芪三黄解毒汤各剂量组小鼠肝脏杨氏模量降低, 且具有剂量依赖性, 这与超声测定的肝脏硬度值结果一致。以上结果提示茵芪三黄解毒汤可减少 ECM 的沉积, 从而降低肝脏硬度, 具有剂量依赖性。

肝脏内力学微环境的改变可激活细胞表面机械传感器, 通过机械-生物信号转导机制调控细胞功能^[23]。机械敏感性离子通道 Piezo1 在肝脏巨噬细胞中高表达, 能够特异性感知细胞外基质力学特性的改变, 并促进巨噬细胞向促炎性 M1 表型极化^[24-25]。本研究结果表明, 模型组小鼠肝脏组织中 Piezo1 蛋白水平升高, 茵芪三黄解毒汤能以剂量依赖的方式抑制 Piezo1 蛋白水平。PI3K/AKT 作为 Piezo1 下游的效应通路, 其磷酸化状态与巨噬细胞极化密切相关^[26]。本研究结果显示, 模型组小鼠肝脏组织 p-PI3K、p-AKT 蛋白水平升高, 茵芪三黄解毒汤各剂量组小鼠肝脏组织 p-PI3K、p-AKT 蛋白水平降低。这些结果与既往研究发现的 PI3K/AKT 通路活化可促进巨噬细胞向 M1 表型极化的结论^[8] 相一

致, 提示该复方可能通过抑制 Piezo1/PI3K/AKT 信号通路调控巨噬细胞 M1 极化, 从而改善肝纤维化进程。

综上所述, 茵芪三黄解毒汤可能通过抑制 Piezo1/PI3K/AKT 信号通路调控巨噬细胞极化, 同时减少肝星状细胞活化, 改善小鼠肝纤维化。本实验聚焦于药物干预后的表型与通路蛋白表达变化, 尚未通过基因敲除、条件性敲除或蛋白特异性抑制剂等手段直接验证 Piezo1/PI3K/AKT 通路在茵芪三黄解毒汤抗肝纤维化中的必要性, 在未来的实验中有待进一步确认机制。

参考文献

- [1]SCHUSTER R, YOUNESI F, EZZO M, et al. The role of myofibroblasts in physiological and pathological tissue repair[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2023, 15 (1): a041231.
- [2]WANG H, YOU Q, KANG B, et al. Pulling the rug out from under: biomechanical microenvironment remodeling for induction of hepatic stellate cell quiescence [J]. Adv Mater, 2024, 36(49): e2406590.
- [3]CAO C, WU F, NIU X, et al. Cadherin-11 cooperates with inflammatory factors to promote the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in pigmented villonodular synovitis[J]. Theranostics, 2020, 10(23): 10573-1058.
- [4]TACKE F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases[J]. J Hepatol, 2017, 66(6): 1300-1312.
- [5]雷超, 李彦波, 吴东杰, 等. 靶向细胞外基质: 中药调控脏器纤维化新视角[J]. 中草药, 2025, 56(16): 5709-5722.
- [6]SOLIS AG, BIELECKI P, STEACH HR, et al. Author correction: mechanosensation of cyclical force by Piezo1 is essential for innate immunity [J]. Nature, 2019, 575 (7784): E7.
- [7]ZHAN HW, XIE DJ, YAN ZX, et al. Fluid shear stress-mediated Piezo1 alleviates osteocyte apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 730: 150391. doi: 10.1016/j.bbrc. 2024. 150391.
- [8]WU W, AN X, GONG W, et al. ShK-modified UCMSCs inhibit M1-like macrophage polarization and alleviate osteoarthritis progression via PI3K/ Akt axis[J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12(9): e2406822.
- [9]黄健, 宫雪晴, 曾颜, 等. 肝纤维化治疗药物的研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(10): 2141-2148.
- [10]和明扬. 茵芪三黄解毒汤治疗代偿期乙肝相关性肝硬化肝郁脾虚夹湿热证患者的临床研究[D]. 成都: 成都

中医药大学, 2023.

- [11] 王宁, 吕文良, 武庆娟. 茵芪三黄解毒汤对肝纤维化模型小鼠肝脏硬度及上皮间质转化的影响[J]. 中医杂志, 2023, 64(17): 1792-1798.
- [12] 强睿, 姚子昂, 韩东, 等. 基于TMT标记联合LC-MS/MS阐释茵芪三黄解毒汤抗肝纤维化的药效作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(12): 5987-5992.
- [13] 孙竞然, 卢秉久, 郑佳连, 等. 四氯化碳诱导C57BL/6J小鼠肝纤维化模型建立方法及优化[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 743-752.
- [14] 陈奇, 张伯礼. 中药药效研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 833-840.
- [15] ZHANG JW, ZHANG L, YANG XB, et al. Liver fibrosis as a predictor of liver failure and outcome following ALPPS among patients with primary liver cancer[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 15827.
- [16] ZHANG J, LIU Y, CHEN HQ, et al. MyD88 in hepatic stellate cells enhances liver fibrosis via promoting macrophage M1 polarization[J]. Cell Death Dis, 2022, 13: 411. doi: 10.1038/s41419-022-04802-z.
- [17] LIU Y, ZHAI YF, ZHANG Y, et al. High metastatic tumor-derived CXCL16 mediates liver colonization metastasis by inducing Kupffer cell polarization via the PI3K/AKT/FOXO3a pathway[J]. Neoplasia, 2025, 65: 101174. doi: 10.1016/j.neo.2025.101174.
- [18] 张玉姣. 肝星状细胞和枯否细胞在肝纤维化过程中的相互作用[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 19-23.
- [19] OLSEN AL, BLOOMER SA, CHAN EP, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 301(1): G110-G118.
- [20] KANG N. Mechanotransduction in liver diseases[J]. Semin Liver Dis, 2020, 40(1): 84-90.
- [21] LONEKER AE, WELLS RG. Perspective: the mechanobiology of hepatocellular carcinoma[J]. Cancers, 2021, 13(17): 4275.
- [22] 王记增, 何飞, 杨宸栋. 基于原子力显微镜的细胞力学性质的表征、测量和应用[J]. 兰州大学学报(医学版), 2023, 49(9): 1-8, 15.
- [23] 闵子洋, 穆妮热·艾力, 郑耘昊, 等. 细胞外基质力学微环境与细胞间相互作用的机制与特征[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(25): 4034-4045.
- [24] MURTHY SE, DUBIN AE, PATAPOUTIAN A. Piezos thrive under pressure: mechanically activated ion channels in health and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(12): 771-783.
- [25] LI M, ZHANG X, WANG MM, et al. Activation of Piezo1 contributes to matrix stiffness-induced angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Commun (Lond), 2022, 42(11): 1162-1184.
- [26] LAI A, CHEN YC, COX CD, et al. Analyzing the shear-induced sensitization of mechanosensitive ion channel Piezo-1 in human aortic endothelial cells[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(4): 2976-2987.

Effect of *Yinqi Sanhuang Jiedu Decoction* (茵芪三黄解毒汤) on Macrophage Polarization and the Piezo1/PI3K/AKT Pathway in Liver Tissue of Liver Fibrosis Model Mice

HUANG Bohao^{1,2}, WU Qingjuan¹, WANG Jiuchong¹, LI Yanbo¹, LEI Chao¹, LYU Wenliang¹

1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053; 2. Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the effect and mechanism of *Yinqi Sanhuang Jiedu Decoction* (茵芪三黄解毒汤, YSJD) in improving liver fibrosis based on the mechanosensitive ion channel protein 1 (Piezo1)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway. **Methods** Fifty C57BL/6J mice were randomly divided using a random number table into a control group, a model group, and low-, medium-, and high-dose YSJD groups, with 10 mice in each group. Except for the control group, mice received intraperitoneal injections of 10% CCl₄ twice weekly for 6 weeks to establish the liver fibrosis model. On the day after modeling completion, the low-, medium-, and high-dose YSJD groups were administered YSJD suspension via oral gavage at doses of 3.79, 7.58, and 15.16 ml/(kg·d), respectively, once daily for 8 weeks. The control and model groups received an equal volume of normal saline. On the day after the final administration, liver stiffness was measured by ultrasound imaging; liver tissue Young's modulus was detected by atomic force microscopy; liver histopathological morphology was assessed by HE staining; collagen deposition was evaluated by Sirius red staining; serum liver function, including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL) and four liver fibrosis markers, namely laminin (LN), hyaluronic acid (HA), type III procollagen (PC-III), type IV collagen (C-IV), were analyzed using an automatic biochemical analyzer; the M1/M2 ratio in liver tissue was detected by flow

cytometry; mRNA expression of transforming growth factor- β 1 (*TGF- β 1*), α -smooth muscle actin (α -*SMA*), type I collagen (*collagen-I*), inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), arginase 1 (*Arg-1*), and mannose receptor (*CD206*) in liver tissue was measured by real-time quantitative PCR; protein levels of Piezo1, phosphorylated PI3K (p-PI3K), PI3K, phosphorylated AKT (p-AKT), and AKT were detected by Western Blot. **Results** Compared with the control group, the model group showed increased liver stiffness and Young's modulus ($P < 0.01$), disordered liver structure and increased collagen fiber deposition ratio ($P < 0.01$), elevated serum levels of ALT, AST, TBIL, DBIL, HA, PC-III, and M1/M2 ratio, increased mRNA expression of *TGF- β 1*, α -*SMA*, *collagen-I*, *iNOS*, and *TNF- α* , decreased mRNA expression of *Arg-1* and *CD206*, and increased protein levels of Piezo1, p-PI3K, and p-AKT in liver tissue ($P < 0.01$). Compared with the model group, all groups of YSJD showed significant improvements in the above indicators ($P < 0.01$). The high-dose YSJD group was superior to the low-dose group in improving liver stiffness, liver Young's modulus, collagen fiber deposition ratio, ALT, DBIL, HA, PC-III, M1/M2 ratio, mRNA expression of *TGF- β 1*, α -*SMA*, *collagen-I*, *TNF- α* , *Arg-1*, *CD206*, and protein levels of Piezo1, p-PI3K, and PI3K ($P < 0.01$). **Conclusion** YSJD may exert anti-liver fibrosis effects by inhibiting the Piezo1/PI3K/AKT signaling pathway, thereby promoting macrophage polarization from pro-inflammatory M1-type to anti-inflammatory M2-type.

Keywords liver fibrosis; macrophage polarization; mechanotransduction; liver stiffness; *Yinqi Sanhuang Jiedu Decoction* (茵芪三黄解毒汤)

(收稿日期: 2025-09-01; 修回日期: 2025-11-04)

[编辑: 果 彤, 焦 爽]

(上接第 282 页)

Current Status of Clinical and Basic Research on Traditional Chinese Medicine for Functional Constipation

KE Xiao¹, YUAN Jianye², ZHAO Peilin¹, FANG Wenyi¹, LIU Qihong¹, BIAN Liqun³, REN Yan¹, KE Minhui¹, TANG Xudong³

1. The Second Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350003; 2. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 3. Institute of Spleen-stomach Diseases, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT This paper reviews the literature on the treatment of functional constipation (FC) with traditional Chinese medicine (TCM) to summarize the current status of TCM research in this field. Clinical studies mainly focus on TCM syndrome patterns and therapeutic efficacy. Although research on FC-related TCM syndromes remains limited and lacks high-quality evidence-based medical support, existing evidence indicates that various TCM interventions, including oral herbal medicine, external therapies, acupuncture, acupoint application, acupoint embedding, and tuina massage, can improve FC-related clinical symptoms to varying degrees, with notable therapeutic effects. Moreover, integrative therapies combining TCM and western medicine demonstrate synergistic benefits in FC management. Regarding mechanistic research, one major approach involves animal modeling, including models based on different FC subtypes and combined disease-syndrome models, which serve not only to evaluate therapeutic efficacy and pharmacological mechanisms but also as important tools for exploring the pathophysiology of FC and the biological basis of TCM syndromes. Another approach employs systems biology, network pharmacology, metabolomics, metagenomics, and multi-omics methods to elucidate the molecular targets and signaling pathways of TCM compound formulas, single herbs, and their active components. These studies focus on regulation of the enteric nervous system, improvement of gastrointestinal motility, modulation of fluid metabolism, enhancement of intestinal barrier function, reduction of inflammation, and regulation of gut microbiota and their metabolites, thereby clarifying the pharmacodynamic and pharmacological mechanisms underlying FC treatment. Based on an analysis of the current research landscape, this paper proposes future directions for TCM research on FC.

Keywords functional constipation; traditional Chinese medicine therapy; clinical efficacy; action mechanisms; literature review

(收稿日期: 2025-06-19; 修回日期: 2025-09-07)

[编辑: 邓 媛]