

## 柴胡疏肝散对情志应激致小鼠肝损伤的保护作用

周青青<sup>1,2</sup>, 吴燕萍<sup>1,2</sup>, 栗原博<sup>1,2</sup>, 李怡芳<sup>1,2</sup>, 梁磊<sup>1,2\*</sup>, 何蓉蓉<sup>1,2\*</sup>

(1. 暨南大学药学院, 中药与天然药物研究所, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学中医学院, 广东省疾病易感性与中医药研发工程技术研究中心, 广东 广州 510632)

**摘要:**“情志致病”是中医理论的重要组成部分, 强烈的情志刺激会影响机体阴阳气血平衡, 导致各种疾病的发生。柴胡疏肝散是治疗“肝气郁结”的经典名方, 本研究旨在研究柴胡疏肝散对小鼠应激性肝损伤的保护作用及其可能的作用机制。实验方案经暨南大学动物实验伦理委员会批准, 所有程序均严格按照动物使用和护理的伦理原则进行。实验采用急性拘束应激诱导小鼠急性肝损伤模型, 使用柴胡疏肝散进行保护, 检测小鼠肝损伤指标和脂质过氧化等相关指标。结果表明, 柴胡疏肝散能显著改善急性拘束应激导致的小鼠肝损伤, 降低血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平, 改善小鼠肝脏组织病理学状况和炎症浸润等情况。进一步检测脂质过氧化和生物节律因子, 发现柴胡疏肝散可降低脂质过氧化产物丙二醛和4-羟基-壬烯醛的水平, 同时增加谷胱甘肽的水平, 改善急性拘束应激小鼠肝脏的氧化应激水平, 还可以降低生物节律因子BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein-1) 的表达, 改善急性拘束应激引起的节律变化。本研究表明, 柴胡疏肝散对急性拘束应激所致肝损伤的保护作用可能与其改善脂质过氧化以及调控生物节律因子等有关, 为阐明柴胡疏肝散的疏肝解郁作用的科学内涵提供了实验基础, 为疏肝解郁中药/复方辅助治疗肝损伤的应用和推广提供了实验依据。

**关键词:** 柴胡疏肝散; 拘束应激; 肝损伤; 脂质过氧化; BMAL1

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)11-2968-09

## Protective effect of Chaihu Shugan San on emotional stress-induced liver injury

ZHOU Qing-qing<sup>1,2</sup>, WU Yan-ping<sup>1,2</sup>, HIROSHI Kurihara<sup>1,2</sup>, LI Yi-fang<sup>1,2</sup>, LIANG Lei<sup>1,2\*</sup>, HE Rong-rong<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangdong Engineering Research Center of Chinese Medicine and Disease Susceptibility, School of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Chaihu Shugan San (CHSGS), a classic traditional Chinese medicinal formula, has been widely used in clinics for emotional disease. Here the protective effect and possible mechanisms of Chaihu Shugan San in stress-induced liver injury were investigated. The animal experimental protocol has been reviewed and approved by Laboratory Animal Ethics Committee of Jinan University, in compliance with the Institutional Animal Care Guidelines. Mice were administered CHSGS for 7 days and subjected to 18-h acute stress before being killed. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and malondialdehyde (MDA) levels in serum were measured with commercial kits. Histomorphology of the liver was analyzed by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry. Glutathione (GSH) content, 4-hydroxynonenal (4-HNE), brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) and arachidonate 15-lipoxygenase (ALOX15) protein were detected by LC-MS and Western blot, respectively. The results showed that CHSGS ameliorated acute stress-induced liver damage by reducing ALT

收稿日期: 2021-06-30; 修回日期: 2021-07-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973718, 82004231); 广东省自然科学基金资助项目 (2021A1515011297).

\*通讯作者 Tel: 86-20-85227791, E-mail: rongronghe@jnu.edu.cn; leiliang@jnu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0970

and AST levels in serum and inflammatory infiltration in liver tissue. Network pharmacology analysis showed that CHSGS was associated with lipid peroxidation. Further analysis confirmed that MDA and 4-HNE levels declined and GSH level increased in livers of stressed mice after CHSGS administration. CHSGS also lowered BMAL1 expression, a pivotal factor in circadian rhythm, in livers of stressed mice. In conclusion, CHSGS ameliorated stress-induced liver injury by repressing lipid peroxidation and regulating circadian rhythm. Our studies implicate that CHSGS is promising as a therapy for stress-induced liver injury, and lay foundation for designing novel prophylactic and therapeutic strategies for stress-induced liver injury.

**Key words:** Chaihu Shugan San; restraint stress; liver injury; lipid peroxidation; BMAL1

中医理论中,认为情志应激变化影响机体阴阳失调而产生的疾病,称之为情志致病。情志致病是中医病因学的重要组成部分,是中医临床诊治的重要指导原则之一<sup>[1]</sup>。关于情志应激与肝损伤的关系,中医理论认为肝在志为怒,“怒伤肝”,过激的情绪最容易导致“肝”系统发生紊乱,导致各种病变<sup>[2]</sup>。中医学中的“肝”是指根据五行理论归类的具有疏泄和藏血的功能系统,也部分包括现代解剖学上肝脏的概念。肝脏是人体重要的解毒器官,容易受外界因素的影响而引起损伤。中国2014年的报告显示大约有3亿人正受到肝脏疾病的影响<sup>[3]</sup>,其中,长期性的慢性压力刺激是导致肝损伤的重要因素,会导致肝脏发生脂肪病变,促进非酒精性脂肪肝的发生<sup>[4]</sup>。已有研究表明,以剥夺身体自由活动和拘束制动刺激为应激原的拘束应激和人的心理应激反应最为接近,可重复性好,在药理学、生理学及病理学等方面的研究中被广泛应用<sup>[5]</sup>。拘束应激模型与中医七情学说在认识上也存在着共同点,可以模拟人类情志致病,在此基础上探讨中药对情志致病的作用具有重要的意义<sup>[6]</sup>。据报道,在啮齿动物中,急性拘束应激压力增加了对外来刺激物的敏感性,抑制脂质和糖的代谢,也会导致肝损伤<sup>[7,8]</sup>。肝损伤是一种具有致命性的临床综合征,预后不良,死亡率极高。因此,随着社会生活的压力越来越大,情志应激诱导肝损伤也越来越引起人们的关注,寻找有效的中药防治肝损伤也是人们迫切关注的问题。

柴胡疏肝散(Chaihu Shugan San, CHSGS)来源于《景岳全书》,是根据中医“疏肝解郁”的治疗原则,由四逆散进一步发展而来的经典名方。柴胡疏肝散是由陈皮、柴胡、川芎、香附、枳壳、芍药、甘草共7味药组成,具有治疗抑郁症<sup>[9]</sup>、功能性消化不良<sup>[10]</sup>和急性胰腺炎<sup>[11]</sup>等多种药理作用。有研究报道,CHSGS可以改善非酒精性脂肪肝的肝脏病理性的病变<sup>[12]</sup>,也能改善肝组织中的脂质代谢水平,对非酒精性肝脂肪病变具有保护作用<sup>[13]</sup>。本研究拟探讨CHSGS对情志应激致小鼠肝损伤的保护作用及其可能的作用机制,丰富中医情志致病理论,为临床上采用疏肝解郁中药/复方辅助治疗

肝损伤的应用和推广提供实验基础。

## 材料与方法

**药品与试剂** 柴胡疏肝散各味中药颗粒购自暨南大学附属第一医院(华润三九医药股份有限公司);水飞蓟素(silymarin,货号S0292),美国Sigma公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT,货号C009-2)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST,货号C010-2),南京建成生物科技有限公司;苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色试剂盒(货号C0105)、丙二醛(MDA)试剂盒(货号S0131)、RIPA细胞裂解液(强)(货号P0013B),碧云天生物技术有限公司;反转录试剂盒和SYBR Green Mix(货号AQ141-01),北京全式金生物技术有限公司;4-羟基-壬烯醛单克隆抗体(4-hydroxynonenal monoclonal antibody, 4-HNE,货号MA5-27570)、BCA蛋白定量试剂盒(货号SLZ60212),美国Thermo Fisher Scientific公司;生物节律因子BMAL1(brain and muscle Arnt-like protein-1)单克隆抗体(货号HY14020),美国Cell Signaling Technology公司;Trizol裂解液(货号DP424),北京天根生化科技公司;蛋白5×loading buffer(货号FD002)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(货号FDR007)、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG(货号FDM007),杭州弗德生物科技有限公司。

**实验仪器** 全自动快速研磨仪(型号:JXFSTPRP-24),上海净信实业发展有限公司;超声粉碎机(型号:JY92-IIV),宁波新芝生物科技有限公司;多功能酶标仪(型号:MK-3),Labsystem公司;天能发光工作站(型号:Tanon 5200),上海天能科技公司;扫描显微镜(型号:Precipoint M8),Precipoint公司;高速冷冻离心机(型号:D-16C),Satorius公司;垂直电泳仪(型号:DY CZ-25E),北京六一生物科技有限公司;超微量紫外分光光度计(型号:NanoPhotometer N50),Nanotech公司;q-PCR仪(型号:CFX Connect System),美国Bio-Rad公司;高效液相色谱-质谱联用仪(型号:4.80112.2500),美国赛默飞世尔科技有限公司。

**实验动物** 实验方案经暨南大学动物实验伦理委员会批准, 所有程序均严格按照动物使用和护理的伦理原则进行。5~7周龄雄性昆明小鼠, 购自南方医科大学动物中心, 实验动物许可证编号: SCXK (粤) 2016-0041, 饲养温度为 25 °C, 相对湿度为 55%, 12 h 明暗交替环境, 标准饲料和水喂养。小鼠适应性喂养一周后进行实验。

**药物配制** 三九中药 1 g 配方颗粒相当于 10 g 生药量, 根据柴胡疏肝散临床患者服用剂量 (54 g·d<sup>-1</sup>), 采用人与小鼠的体表面积换算系数计算出小鼠的给药剂量, 设定低剂量组设为 3.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 按人体等效剂量的 2 倍; 高剂量组设为 7 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 按人体等效剂量的 4 倍。使用前将中药配方颗粒用蒸馏水溶解, 现配现用。阳性药物选用水飞蓟素, 参照实验论文选用剂量<sup>[14]</sup>, 给予 150 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。

**动物实验** 30 只小鼠随机分为正常对照组 (Control)、急性拘束模型组 (Stress)、低剂量柴胡疏肝散组 (CHSGS-L)、高剂量柴胡疏肝散组 (CHSGS-H)、阳性药对照水飞蓟素组 (silymarin, Sily), 每组 6 只。给药组小鼠通过灌胃给药的方式分别给予低、高剂量的柴胡疏肝散 (3.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>、7.0 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 水飞蓟素 (150 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 正常组和模型组给予等量的蒸馏水, 连续给药 7 天。最后一天给药后 2 h, 除正常对照组外, 对其他组小鼠进行一次急性拘束应激, 拘束时间为当日 15:00 至次日 9:00, 正常对照组同时禁食禁水, 第二天早上九点麻醉取材, 取全血和肝脏用于后续实验分析。

**血清生化指标检测** 全血在常温下静置 2 h 后, 采用 3 500 ×g 的转速在 4 °C 下离心 20 min, 分离得到上层血清, 使用试剂盒检测 ALT 和 AST。

**肝脏病理学检查** 取适当大小的小鼠肝脏组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 进行石蜡组织包埋、切片、H&E 染色后, 用扫描显微镜进行扫描观察小鼠肝脏损伤情况。

**肝脏组织 MDA 含量测定** 称取小鼠肝脏组织约 20 mg, 使用试剂盒测定小鼠肝脏中的 MDA 含量。

**肝脏组织谷胱甘肽 (GSH) 含量测定** 称取小鼠

肝脏组织约 20 mg, 采用赛默飞 (Thermo Fisher Scientific) 双三元高效液相色谱 (DGLC) 串联四极杆轨道阱高分辨质谱仪 (Q-Exactive) 进行 LC-MS/MS 分析。液相采用反相系统分离, 以 0.1% 甲酸水为洗脱 A 相, 乙腈为洗脱 B 相。色谱柱型号为 (HSS T3 1.8 μm, C18, 100 mm × 2.1 mm, Waters Acquity)。洗脱程序如下: 0 min: 2% B; 2 min: 2% B; 3 min: 60% B; 3.5 min: 90% B; 7.5 min: 90% B; 8 min: 2% B; 15 min: 2% B。流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 35 °C, 进样量 2 μL。质谱扫描模式为正、负离子切换全扫。一级质谱扫描质量范围为 200~800 m/z, 分辨率为 35 000, 最大注射时间 100 ms; MS2 扫描分辨率为 17 500, 最大注射时间 50 ms, 碰撞能 25、30、40 eV, 扫描隔离窗口设置为 2 m/z。正、负离子毛细管喷雾电压均设定为 3.0 kV, 毛细管温度为 320 °C, 辅助器加热温度为 350 °C。S-lens Rf 设置为 60 进行测定 GSH 的含量。

**蛋白免疫印迹检测** 称取小鼠肝脏组织约 30 mg, 用 RIPA 强效裂解液提取总蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。与上样缓冲液混合、蛋白变性、30 μg 蛋白上样、进行 SDS-PAGE 电泳, 湿法转膜 60 min。抗体配制比例如下: 4-HNE 鼠单克隆抗体 (1:1 000)、BMAL1 兔单克隆抗体 (1:1 000) 及 GAPDH 兔单克隆抗体 (1:3 000)。用 Image J 软件对图像进行分析, 结果以目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 的光密度比值表示。

**逆转录-聚合酶链式反应分析** 称取小鼠肝脏组织约 20 mg 进行裂解, 按照试剂盒的方法提取小鼠肝脏组织样本中总 RNA, 定量并检测样品 RNA 浓度。将提取的 RNA 按照逆转录试剂盒步骤逆转录成 cDNA, 使用实时定量 PCR 系统 (qRT-PCR) 进行扩增, 以 18s (鼠源) 作为内参基因对各基因进行归一化处理, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算基因的相对表达量, 引物序列见表 1。

**免疫组化检测** 取适当大小的小鼠肝脏组织 (约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm) 于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 进行石蜡组织包埋、切片、脱蜡与水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、打孔和封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、苏木素染色、脱水和封片后, 用扫

**Table 1** The primer sequences for real-time quantitative PCR. Alox15: Arachidonate 15-lipoxygenase; Bmal1: Brain and muscle Arnt-like protein-1; 18s: Ribosomal protein 18

Gene	Species		Sequence (5'-3')
<i>Bmal1</i>	Mouse	Forward primer	CTCCAGGAGGCAAGAAGATTC
		Reverse primer	ATAGTCCAGTGGAAGGAATG
<i>Alox15</i>	Mouse	Forward primer	ACCCCACCGCCGATTTT
		Reverse primer	AGCTTCGGACCCAGCATTT
<i>18s</i>	Mouse	Forward primer	CGGACAGGATTGACAGATTGATAGC
		Reverse primer	TGCCAGAGTCTCGTTTCGTTATCG

描显微镜进行扫描观察小鼠肝脏组织炎性浸润情况, NC组为阴性对照组, 排除假阳性结果。

**统计学分析** 实验数据均以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 GraphPad Prism 7.0 软件, 单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计分析,  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 实验结果

### 1 CHSGS改善急性拘束应激致小鼠肝损伤

小鼠在给药期间状态良好, 无明显行为异常, 但是拘束 18 h 后, 出现毛发湿黏、肢体震颤等行为改变。由图 1A~C 可知, 急性拘束应激小鼠的肝重比显著高于正常对照组 ( $P < 0.001$ ), 且血清 ALT 和 AST 活性均显著升高 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ), 而高剂量 CHSGS 组较模型组肝重比、ALT 和 AST 明显下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ )。病理组织切片染色结果 (图 1D) 显示, 正常组小鼠肝细胞排列整齐, 细胞核清晰可见, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状; 与正常组小鼠对比, 急性拘束应激组小鼠肝组织切片显示肝细胞排列不规则, 部分细胞核消失, 肝细胞围绕中央静脉放射状消失; 而高剂量 CHSGS 能改善急性拘束应激小鼠引起的肝细胞紊乱、细胞核消失和放射状消失的现象, 缓解肝损伤。

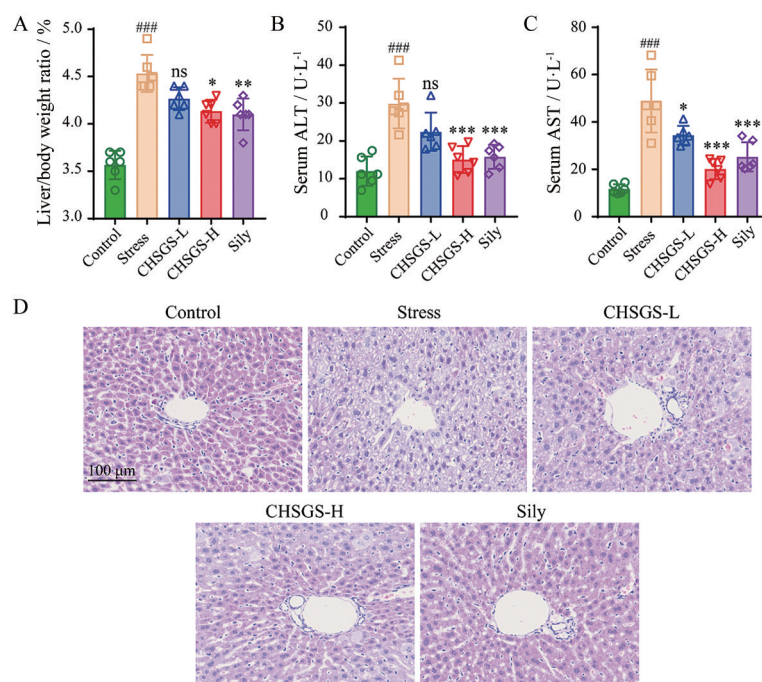
### 2 CHSGS减少急性拘束应激小鼠肝组织中的炎性浸润

为了探究 CHSGS 对急性拘束应激小鼠肝脏组织炎性浸润的影响, 本研究采用免疫组化的方法对小鼠肝脏组织炎性标记物<sup>[15]</sup>巨噬细胞 (F4/80) 进行标记。由图 2 可知, 与正常小鼠相比, 急性拘束应激小鼠肝脏组织中的巨噬细胞浸润现象增加; 而与模型组小鼠相比, 柴胡疏肝散能够减少应激小鼠肝脏组织中的炎性浸润。以上结果说明, 柴胡疏肝散能够缓解急性拘束应激导致的小鼠肝损伤。

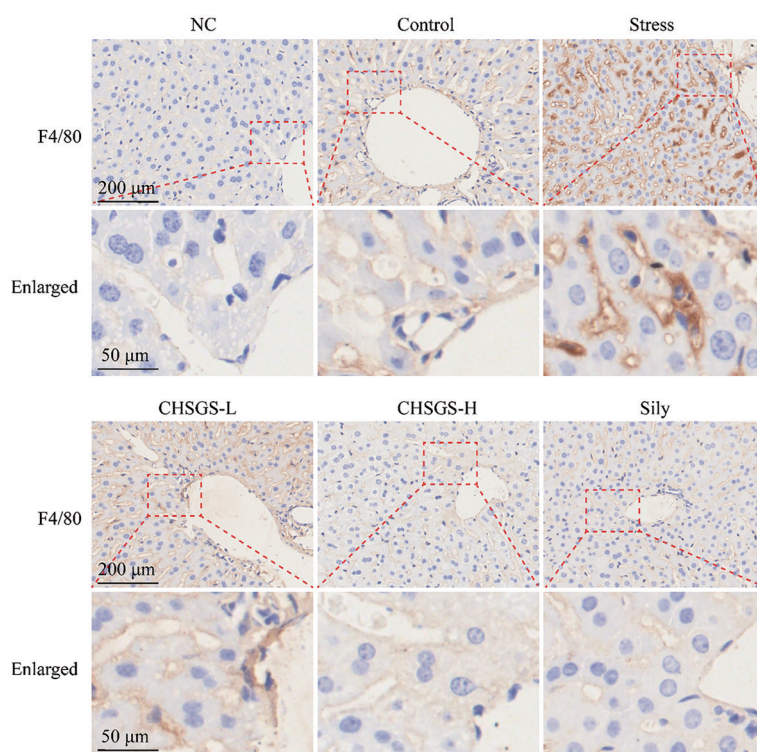
### 3 柴胡疏肝散复方中存在调节脂质过氧化相关靶点

利用 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 检索柴胡疏肝散复方中主要的 6 味中药柴胡 (CH)、川芎 (CX)、枳壳 (ZQ)、陈皮 (CP)、香附 (XF)、白芍 (BS) 中的活性化合物。同时采用 TCMSP 获取所有活性化合物对应的蛋白靶点信息, 利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 将蛋白质靶点信息转化为基因靶点信息; 最后使用 Cytoscape 进行作图, 构建柴胡疏肝散复方成分-靶点网络。

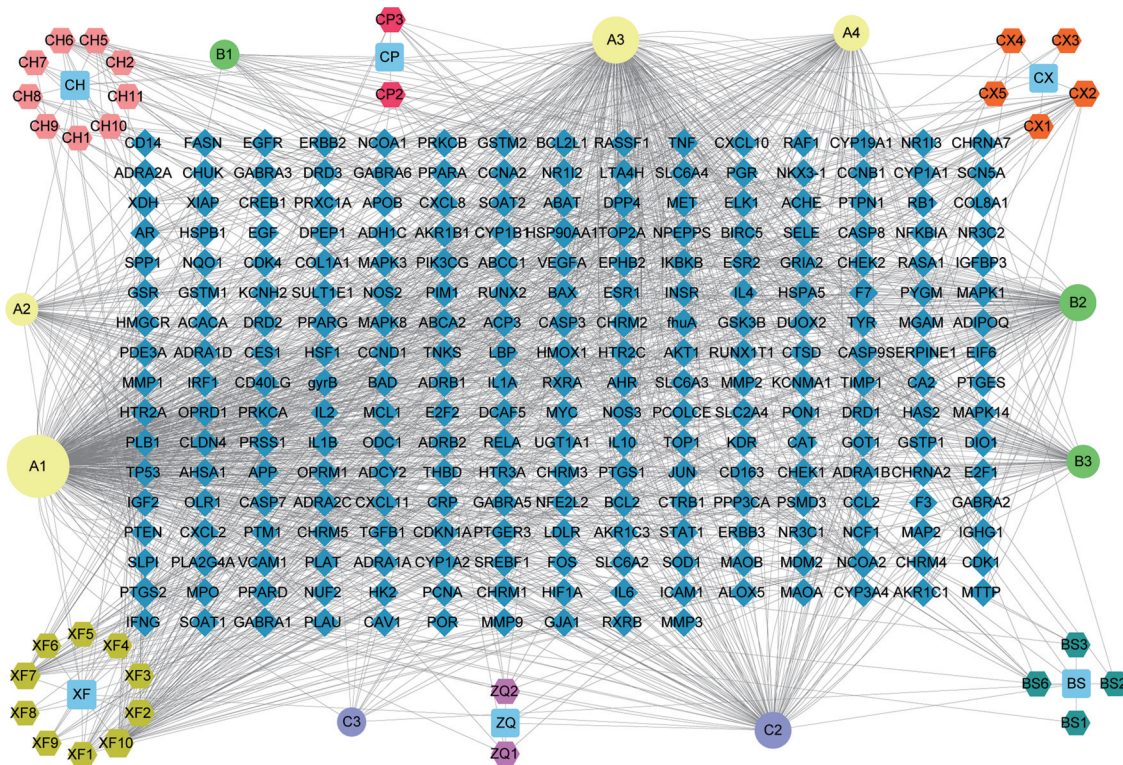
结果如图 3 所示, 筛选出 41 个代表活性化合物, 250 个相关的靶点基因。周围不同颜色的六边形代表不同中药中存在的活性化合物, 不同颜色的圆形代表不同中药之间所共有的活性成分, 圆圈越大则代表所



**Figure 1** Chaihu Shugan San (CHSGS) relieved acute stress-induced liver injury in mice. A: Liver weight ratio of mice from different groups was recorded on the 7<sup>th</sup> day; B, C: Serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST); D: Histopathology change in liver of mice was analyzed by hematoxylin and eosin (H&E) staining.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ####  $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs stress group. Stress: Restraint stress model; CHSGS-L: Chaihu Shugan San low dosage  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ; CHSGS-H: Chaihu Shugan San high dosage  $7.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ; Sily: Silymarin  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$



**Figure 2** CHSGS reduced inflammatory infiltration on acute stress-induced liver injury in mice. F4/80 was recognized as a macrophage marker and detected by IHC staining. Scale bar = 200 μm and bar = 50 μm. NC: Negative control

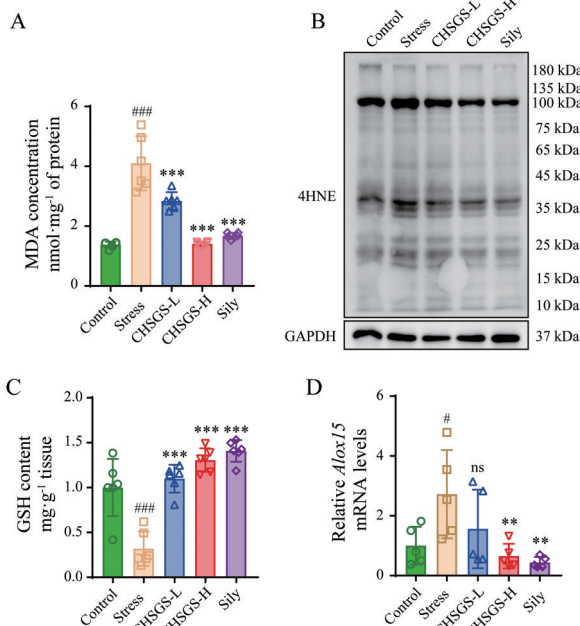


**Figure 3** Network map of CHSGS compound components and gene targets. The hexagons with different colors represent active compounds in different traditional Chinese medicines, the circles with different colors represent active components among different traditional Chinese medicines, and the blue diamonds in the middle correspond to the gene targets screened by active compounds. CH: Chaihu, *Bupleurum chinense* DC.; CX: Chuanxiong, *Ligusticum chuanriong* Hort.; ZQ: Zhiqiao, *Citrus aurantium* L.; CP: Chenpi, *Citrus reticulata* Blanco.; XF: Xiangfu, *Cyperus rotundus* L.; BS: Baishao, *Paeonia lactiflora* Pall.

含该化合物的中药种类越多; 中间蓝色的菱形对应活性化合物筛选出的基因靶标。从图中可知, 柴胡疏肝散的靶点基因中存在有脂质过氧化通路、炎症相关通路等相关的基因, 提示柴胡疏肝散复方可能通过调节机体的脂质过氧化水平实现缓解肝损伤。

#### 4 柴胡疏肝散减轻急性拘束应激致小鼠肝脏脂质过氧化

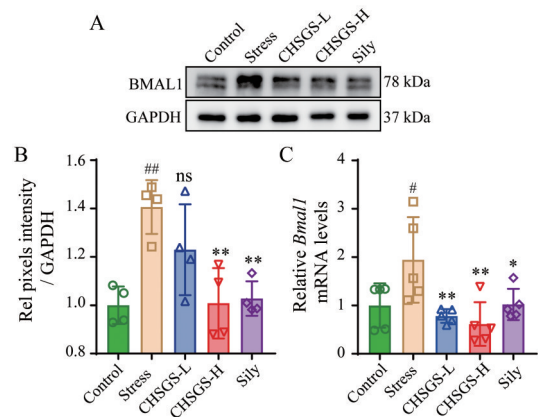
为了进一步探究柴胡疏肝散是否能减轻急性拘束应激诱导肝损伤所引起的脂质过氧化, 本研究采用试剂盒和 Western blot 法检测脂质过氧化产物 MDA 含量和 4-HNE 水平。如图 4A、B 所示, 与正常组小鼠相比, 模型组小鼠肝脏组织中 MDA 水平和 4-HNE 水平明显增加; 给药组中, 肝脏组织 MDA 含量和 4-HNE 水平较模型组显著降低。GSH 是机体抗氧化酶 GPX4 (glutathione peroxidase 4) 的辅助因子, 它能够催化脂质过氧化的还原, 保护细胞膜免于被氧化。如图 4C 所示, 高剂量给药组可升高急性拘束应激致肝损伤小鼠的肝脏中的 GSH 水平 ( $P < 0.001$ )。Alox15 是脂质过氧化通路中重要的调节基因<sup>[16]</sup>, 其表达在急性拘束应激模型组中也显著上调, 图 4D 结果显示高剂量柴胡疏肝散给药组能够显著降低小鼠肝脏组织中 Alox15 的表达 ( $P < 0.01$ )。



**Figure 4** CHSGS decreased lipid peroxidation on acute stress-induced liver injury in mice. A: Malondialdehyde (MDA) concentration in liver tissue ( $n = 6$ ); B: Protein expression of 4-hydroxynonenal (4-HNE) ( $n = 3$ ); C: Glutathione (GSH) concentration in liver tissue ( $n = 6$ ); D: mRNA expression of arachidonate 15-lipoxygenase (Alox15) ( $n = 5$ ).  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs stress group; ns:  $P > 0.05$  vs stress group

#### 5 柴胡疏肝散调控生物节律因子 BMAL1 的表达

有研究表明<sup>[17,18]</sup>, 生物节律系统在维持肝脏的生理代谢等的平衡中具有重要作用, 且在肝损伤和肝纤维化中发现有生物节律紊乱。为了进一步探究急性拘束应激肝损伤中是否存在生物节律的改变, 采用急性拘束应激小鼠肝脏组织检测生物节律核心因子 BMAL1 的表达情况。如图 5 所示, 与正常组小鼠相比, 急性拘束应激小鼠肝脏组织中 BMAL1 的 mRNA 及蛋白水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 经 CHSGS 给药后其 mRNA 和蛋白的表达水平显著下降 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )。



**Figure 5** CHSGS decreased the hepatic expression of brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1). A, B: Hepatic protein expression of BMAL1 ( $n = 4$ ); C: Hepatic mRNA expression of *Bmal1* ( $n = 5$ ).  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs stress group

#### 讨论

肝病在全球范围内普遍存在, 并且长期的临床治疗结果不佳。包括乙型肝炎、丙型肝炎、酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD)、非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 和肝硬化、肝癌等, 已经导致严重的公共卫生问题<sup>[3]</sup>。据报告, 在我国普通成年人中, ALD 和 NAFLD 的患病率分别为 7.4% 和 20%~30%<sup>[19,20]</sup>, 对全球性肝脏疾病负担产生重要的影响。Joung 等<sup>[21]</sup>分析发现心理应激与多种病理条件相关, 并且可以通过多个系统对肝脏造成损伤, 即日益增加的生活压力会影响肝损伤的发生发展。有研究报道<sup>[22]</sup>, 肝损伤中炎症性的 Gr1<sup>+</sup> 单核细胞 (肝脏巨噬细胞的前体) 会募集到受损的肝脏, 促进肝纤维化的进展, 导致不可逆的严重后果。而柴胡疏肝散是中医临床上常用来治疗“肝气郁结”的经典名方。有研究报道, 柴胡疏肝散能够调节大鼠肝脏中磷脂酸和胆汁酸的代谢, 改善不可预测性慢性应激引起的肝损伤<sup>[23]</sup>。但是关于柴胡疏肝散是如何缓解情志应激诱导的肝损

伤的作用机制尚不清楚。因此,本研究建立了急性拘束应激诱导肝损伤的小鼠动物模型,评价柴胡疏肝散的药效并初步探究急性拘束应激引起肝损伤的机制。

本研究在对小鼠一次性拘束18 h后检测小鼠血清中ALT和AST的水平,发现柴胡疏肝散能显著降低急性拘束应激诱导的肝损伤小鼠血清中ALT和AST的含量;同时,病理组织切片H&E染色结果和免疫组化结果显示,柴胡疏肝散能够改善急性拘束应激引起的小鼠肝脏组织损伤和炎性浸润。有文献报道<sup>[21]</sup>,由应激引起的肝损伤会产生氧化损伤,产生大量的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),从而加速氧化应激并引发炎症和肝坏死;这种损伤可能与促进炎症因子IL-6或改变炎症因子IL-6和TNF- $\alpha$ 的水平有关<sup>[24,25]</sup>。同时有研究表明<sup>[26,27]</sup>,在肝脏各型疾病如肝纤维化、肝癌和急性肝损伤中,均发现ROS的累积,ROS的累积会攻击细胞膜脂质,破坏细胞膜结构的完整性,引起肝细胞损伤。

氧化应激发生的主要原因是氧化-抗氧化系统之间的平衡被破坏,抗氧化物GSH含量降低,而脂质过氧化产物4-HNE和MDA发生累积,会引起肝组织损伤<sup>[28]</sup>。已有研究发现,在人类肝脏脂肪变性中的脂质过氧化与纤维化的发生发展存在着密切的联系<sup>[29]</sup>。同时,抗氧化蛋白酶谷胱甘肽-S-转移酶A3(GSTA3)能够减少肝组织中过量的ROS和脂质过氧化的累积,进而抑制肝纤维化<sup>[30]</sup>。本研究发现柴胡疏肝散能够显著降低急性拘束应激小鼠肝脏组织中的MDA和4-HNE水平;同时LC-MS结果显示,柴胡疏肝散可显著增加急性拘束应激小鼠肝脏中GSH含量,提示柴胡疏肝散可调节急性拘束应激引起的小鼠肝损伤中的氧化平衡。此外,有研究报道<sup>[31]</sup>,在载脂蛋白基因缺陷的ApoE<sup>-/-</sup>高脂血症小鼠模型中,花生四烯酸15-脂加氧酶Alox15基因的缺失会减轻小鼠肝脏组织中的脂肪变性、炎症和细胞损伤,这表明Alox15在肝损伤中发挥了重要的作用,可能成为治疗肝损伤的一个靶标。在本研究中,柴胡疏肝散显著降低肝损伤小鼠肝脏中Alox15的表达水平。进一步采用数据库对柴胡疏肝散复方成分及靶点进行分析,结果显示,在柴胡疏肝散靶点基因中确实存在调节脂质过氧化相关的基因。以上结果均提示,柴胡疏肝散可调节脂质过氧化,改善急性拘束应激引起的肝损伤。

研究报道,急性和亚急性或者心理的刺激都会影响生物节律系统,影响生物节律相关因子相位的变化<sup>[32]</sup>,而生物节律系统在维持肝脏生理代谢等功能中具有非常重要的作用<sup>[33]</sup>,肝脏的生物钟循环系统中节律基因的表达能够驱动脂质、葡萄糖和胆固醇代谢等多种代

谢相关基因的表达<sup>[34]</sup>。昼夜节律的破坏也会促进肝脏脂肪变性、炎症及癌症的发生与发展<sup>[35]</sup>。目前已有研究表明,骨髓细胞中关键节律因子BMAL1缺失可延缓动脉粥样硬化的发生,抑制腹主动脉瘤的形成,是炎症性心血管疾病的潜在治疗靶点<sup>[36]</sup>。在乳腺癌细胞中过表达BMAL1会使核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)的抑制蛋白(inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B)磷酸化增强,激活NF- $\kappa$ B信号通路,进而增加促细胞生长因子MMP9(matrix metalloproteinase 9)的表达,促进肿瘤的迁移和转移<sup>[37]</sup>。而在星形胶质细胞中特异性地敲除BMAL1会改变机体的能量代谢能力、葡萄糖的稳态水平,并会缩短机体的寿命<sup>[38]</sup>。由此可知,BMAL1在机体的不同部位发生过表达或缺失均会导致机体相应器官组织等发生变化,因此BMAL1等生物节律的稳态在维持机体生理代谢等具有非常重要的作用。

在肝脏相关疾病中,BMAL1可通过AKT(protein kinase B)/脂肪生成等相关通路保护肝脏免受酒精性脂肪肝的影响<sup>[39]</sup>。BMAL1也可通过IDH1/ $\alpha$ KG(isocitrate dehydrogenase 1/ $\alpha$ -ketoglutarate)介导的糖酵解途径抑制肝纤维化,可能是治疗纤维化的新靶点<sup>[40]</sup>。除此之外,在未经治疗的结直肠癌患者的临床样本中进行基因分析发现,高表达BMAL1和低表达Per2(period 2)都会促进肝转移的发生<sup>[41]</sup>。本研究通过检测应激小鼠肝脏组织中的主生物节律基因*Bmal1*,结果发现,急性拘束应激会明显增加生物系统的主要生物钟调控基因*Bmal1*的mRNA和蛋白的水平,而柴胡疏肝散能够显著降低由急性拘束应激增加的*Bmal1*表达水平。BMAL1、REV-ERBs(nuclear receptor subfamily 1, group D member 1)、PERs(periods)及CRYs(cryptochromes)等共同构成了复杂的时钟基因调控网络,其相互影响的转录反馈回路对于维持准确的昼夜节律具有非常重要的作用<sup>[42,43]</sup>。BMAL1作为主要的生物钟调控基因,会通过转录-翻译反馈环与下游基因启动子序列上的E-BOX反应元件结合,调控下游PER及CRY等相关时钟因子的表达,从而破坏机体的生物节律系统的平衡,影响机体的能量代谢等的稳态<sup>[44]</sup>。本研究结果提示柴胡疏肝散可能通过影响生物节律系统,从而缓解肝损伤,发挥护肝作用。研究显示生物节律系统会调控细胞氧化还原的稳态,而细胞中的氧化还原状态的变化也会影响生物节律系统,表明氧化应激和生物节律系统具有相互关联性<sup>[45]</sup>。在*Bmal1*<sup>-/-</sup>小鼠的不同组织中,ROS的水平明显增加,并且会出现过早衰老的现象<sup>[46]</sup>。同时,有研究报道<sup>[47]</sup>夜间值班的工人其抗氧化能力降低,氧化应激水平增加。这些结果均提示,机体的氧化还原系统和生物节律系统之间

存在密切的联系, 因此生物节律相关基因可能调控机体的氧化平衡, 调控脂质过氧化的相关进程。

综上所述, 经典中药复方柴胡疏肝散对急性拘束应激诱导小鼠肝损伤具有明显的保护作用, 其作用机制可能与调节脂质过氧化以及生物节律相关因子有关。本研究结果为进一步使用现代生物学基础解释中医情志致病理论以及采用疏肝解郁中药/复方辅助治疗肝损伤的应用和推广提供了实验基础。

**作者贡献:** 何蓉蓉、梁磊负责实验设计和指导; 周青青进行论文的整体实验、数据分析和撰写论文; 吴燕萍、梁磊、李怡芳、栗原博和何蓉蓉对实验进行具体指导和论文修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Zhu SR, Luo X, Li YF, et al. Emotional stress-induced Shanghuo syndrome increases disease susceptibility [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2018, 43: 1529-1535.
- [2] Qin ZP, Zhao HH, Zhan XH. Research progress on the theory of rage impairing liver in modern times [J]. *Chin Med Mod Dis Educ China* (中国中医药现代远程教育), 2020, 18: 121-124.
- [3] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China [J]. *Hepatology*, 2014, 60: 2099-2108.
- [4] Cheng F, Ma C, Wang X, et al. Effect of traditional Chinese medicine formula Sinisan on chronic restraint stress-induced nonalcoholic fatty liver disease: a rat study [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 203.
- [5] He RR, Yao XS, Hiroshi K. The review on animal model of restraint stress [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2008, 11: 80-83.
- [6] Tang SH. The Propective Effects of Schisandra Lignans Extract on Stressed-evoked Hepatic Injury and Metastases in Mice (五味子标准提取物对应激性肝损伤和肝癌转移的作用研究) [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2010.
- [7] Sha J, Feng X, Chen Y, et al. Dexmedetomidine improves acute stress-induced liver injury in rats by regulating MKP-1, inhibiting NF-kappaB pathway and cell apoptosis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 14068-14078.
- [8] Sanchez O, Arnau A, Pareja M, et al. Acute stress-induced tissue injury in mice: differences between emotional and social stress [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2002, 7: 36-46.
- [9] Zhou J, Huang F, Wu XJ. Research progress on anti-depression chemical constituents and pharmacological effects of Chaihushugan San [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2019, 35: 174-179.
- [10] He X. Chaihu Shugan Powder in the treatment of liver-qi depression and spleen-deficiency function dyspepsia for 30 cases [J]. *Chin Med Mod Dis Educ China* (中国中医药现代远程教育), 2021, 19: 116-117.
- [11] Cao YY, Chen Y, Zhou H, et al. Study on the mechanism of Chaihu Shugan San in treating acute pancreatitis based on network pharmacology [J]. *Shanxi J Tradit Chin Med* (陕西中医), 2020, 41: 994-998.
- [12] Xie WN, Peng HB, Li Y, et al. Liver with liver stagnation and spleen deficiency syndrome and intestinal microflora [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 129-137.
- [13] Li D, Jiang T, Fan H, et al. Influence of chaihushugan powder on lipid metabolism and liver function in nonalcoholic fatty liver rats [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2013, 29: 8-12.
- [14] Yu HM. The Inhibitory Effects and Mechanism of (+)-Clausenamide on Ferroptosis against APAP-induced Liver Injury ((+)-黄皮酰胺抑制 ferroptosis 保护 APAP 诱导的肝损伤作用及机制研究) [D]. Guangzhou: Jinan University, 2018.
- [15] Melis M, Tang XH, Trasino SE, et al. Effects of AM80 compared to AC261066 in a high fat diet mouse model of liver disease [J]. *PLoS One*, 2019, 14: e0211071.
- [16] Zhang W, Zhong W, Sun Q, et al. Hepatic overproduction of 13-HODE due to ALOX15 upregulation contributes to alcohol-induced liver injury in mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 8976.
- [17] Mukherji A, Bailey SM, Staels B, et al. The circadian clock and liver function in health and disease [J]. *J Hepatol*, 2019, 71: 200-211.
- [18] Zhou D, Wang Y, Chen L, et al. Evolving roles of circadian rhythms in liver homeostasis and pathology [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 8625-8639.
- [19] Rehm J, Samokhvalov AV, Shield KD. Global burden of alcoholic liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2013, 59: 160-168.
- [20] Lazo M, Hernaez R, Bonekamp S, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study [J]. *BMJ*, 2011, 343: d6891.
- [21] Joung JY, Cho JH, Kim YH, et al. A literature review for the mechanisms of stress-induced liver injury [J]. *Brain Behav*, 2019, 9: e01235.
- [22] Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1<sup>+</sup> monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis [J]. *Hepatology*, 2009, 50: 261-274.
- [23] Jia HM, Yu M, Ma LY, et al. Chaihu-Shu-Gan-San regulates phospholipids and bile acid metabolism against hepatic injury induced by chronic unpredictable stress in rat [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1064: 14-21.
- [24] Kitamura H, Konno A, Morimatsu M, et al. Immobilization stress increases hepatic IL-6 expression in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238: 707-711.
- [25] Tjandra K, Sharkey KA, Swain MG. Progressive development of a Th1-type hepatic cytokine profile in rats with experimental cholangitis [J]. *Hepatology*, 2000, 31: 280-290.

- [26] Li S, Li H, Xu X, et al. Nanocarrier-mediated antioxidant delivery for liver diseases [J]. *Theranostics*, 2020, 10: 1262-1280.
- [27] Zhou Y, Fan X, Jiao T, et al. SIRT6 as a key event linking P53 and NRF2 counteracts APAP-induced hepatotoxicity through inhibiting oxidative stress and promoting hepatocyte proliferation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 89-99.
- [28] Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T, et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87: 223-229.
- [29] Macdonald GA, Bridle KR, Ward PJ, et al. Lipid peroxidation in hepatic steatosis in humans is associated with hepatic fibrosis and occurs predominately in acinar zone 3 [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16: 599-606.
- [30] Chen H, Gan Q, Yang C, et al. A novel role of glutathione S-transferase A3 in inhibiting hepatic stellate cell activation and rat hepatic fibrosis [J]. *J Transl Med*, 2019, 17: 280.
- [31] Martinez-Clemente M, Ferre N, Titos E, et al. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene (Alox15) protects hyperlipidemic mice from nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2010, 52: 1980-1991.
- [32] Tahara Y, Aoyama S, Shibata S. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise [J]. *J Physiol Sci*, 2017, 67: 1-10.
- [33] Ferrell JM, Chiang JY. Circadian rhythms in liver metabolism and disease [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 113-122.
- [34] Asher G, Sassone-Corsi P. Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock [J]. *Cell*, 2015, 161: 84-92.
- [35] Sato K, Meng F, Francis H, et al. Melatonin and circadian rhythms in liver diseases: functional roles and potential therapies [J]. *J Pineal Res*, 2020, 68: e12639.
- [36] Yang G, Zhang J, Jiang T, et al. Bmal1 deletion in myeloid cells attenuates atherosclerotic lesion development and restrains abdominal aortic aneurysm formation in hyperlipidemic mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40: 1523-1532.
- [37] Wang J, Li S, Li X, et al. Circadian protein BMAL1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by up-regulating matrix metalloproteinase9 expression [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 182.
- [38] Barca-Mayo O, Boender AJ, Armirotti A, et al. Deletion of astrocytic BMAL1 results in metabolic imbalance and shorter lifespan in mice [J]. *Glia*, 2020, 68: 1131-1147.
- [39] Zhang D, Tong X, Nelson BB, et al. The hepatic BMAL1/AKT/lipogenesis axis protects against alcoholic liver disease in mice via promoting PPARalpha pathway [J]. *Hepatology*, 2018, 68: 883-896.
- [40] Xu L, Yang TY, Zhou YW, et al. Bmal1 inhibits phenotypic transformation of hepatic stellate cells in liver fibrosis via IDH1/alpha-KG-mediated glycolysis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021. DOI: 10.1038/s41401-021-00658-9.
- [41] Oshima T, Takenoshita S, Akaike M, et al. Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25: 1439-1446.
- [42] Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, et al. Circadian clock proteins and immunity [J]. *Immunity*, 2014, 40: 178-186.
- [43] Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24: 90-99.
- [44] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks [J]. *Cell*, 1999, 96: 271-290.
- [45] Man AWC, Xia N, Li H. Circadian rhythm in adipose tissue: novel antioxidant target for metabolic and cardiovascular diseases [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9: 968.
- [46] Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock [J]. *Genes Dev*, 2006, 20: 1868-1873.
- [47] Teixeira KRC, Dos Santos CP, De Medeiros LA, et al. Night workers have lower levels of antioxidant defenses and higher levels of oxidative stress damage when compared to day workers [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 4455.