

柴胡疏肝颗粒调控 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路改善四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤

黄海锋^{1,2}, 庞晓妍¹, 戴卫波¹, 黄曼婷¹, 曾聪彦^{1*} (1. 广州中医药大学附属中山中医院, 广东 中山 528400; 2. 广东江门中医药职业学院, 广东 江门 529000)

摘要:目的 探讨柴胡疏肝颗粒对小鼠急性肝损伤的保护作用及可能机制。方法 将柴胡疏肝颗粒按低、中、高(生药量: 11.4、22.8、45.6 g·kg⁻¹) 3个剂量连续给药7 d, 末次给药2 h后, 除正常对照组外, 用体积分数0.2% 四氯化碳(tetrachloromethane, CCl₄)溶液造模, 12 h后, 收集小鼠的血清和肝组织, 制作肝组织病理切片。测定血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和肝组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α), 以及活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)含量; 转录组学获得肝脏组织差异表达 mRNA 并富集与差异表达基因显著相关的通路; 代谢组学研究肝组织中内源性代谢物变化并进行通路富集分析; 免疫组织化学及 Western blot 法检测肝组织中 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MARK)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)表达及定位情况。结果 与模型组比较, 柴胡疏肝颗粒能显著降低小鼠血清 ALT、AST 和肝组织 MDA、IL-6、TNF-α 及 ROS 水平(P < 0.05 或 P < 0.01), 显著升高肝组织中 SOD 水平(P < 0.01), 明显减轻肝细胞坏死及炎症浸润程度; 上调 Nqo1 基因, 上调醌氧化还原酶 1[NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1]表达; 下调 Ccl2 基因, 下调单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)表达, 且代谢物中有机酸类显著下调, 糖类显著上调。肝组织中 JNK、p38 MARK、Keap1 表达均显著下调(P < 0.05 或 P < 0.01), Nrf2、HO-1 表达显著上调(P < 0.01)。结论 柴胡疏肝颗粒可能通过激活 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路, 对 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤具有保护作用。

关键词:柴胡疏肝颗粒; 急性肝损伤; 氧化应激; Kelch 样 ECH 关联蛋白-核因子 E1/血红素加氧酶-1 信号通路

doi:10.11669/cpj.2024.08.006 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)08-0703-10

Chaihu Shugan Granules Improve Tetrachloromethane-Induced Acute Liver Injury in Mice through Regulating the Keap1-Nrf2/HO-1 Signal Pathway

HUANG Haifeng^{1,2}, PANG Xiaoyan¹, DAI Weibo¹, HUANG Manting¹, ZENG Congyan^{1*} (1. Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China; 2. Guangdong Jiangmen Chinese Medicine College, Jiangmen 529000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect and possible mechanism of Chaihu Shugan Granules on acute liver injury in mice. **METHODS** Chaihu Shugan Granules was administered to mice at low, medium and high dosages (crude drug dose: 11.4, 22.8, 45.6 g·kg⁻¹) continuously for 7 d. Two hours after the last administration, the animal model was made with 0.2% tetrachloromethane (CCl₄) solution except the control group. The serum and liver tissues were collected after 12 h. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF-α) and reactive oxygen species (ROS) in liver tissues were measured by ELISA. HE staining was conducted to reveal the histopathological changes in liver. Transcriptomics was used to obtain differentially expressed mRNA in liver tissues and enrich differentially expressed pathways, while metabolomics was used to obtain changes in liver endogenous metabolites and enriches pathways of differential metabolites using KEGG database. The expression and location of c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MARK), kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in liver tissues were measured by immunohistochemistry and Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, the serum levels of ALT, AST and MDA, IL-6, TNF-α and ROS in liver

基金项目:国家自然科学基金青年项目资助(82305119);广东省自然科学基金面上项目资助(2023A1515011699);广东省医学科研基金资助(A2022479);全国中药特色技术传承人才培养项目资助(国中医药人教函[2023]96号)

作者简介:黄海锋,男,硕士研究生 研究方向:中药临床药理 * **通讯作者:**曾聪彦,男,主任药师,硕士生导师 研究方向:药材研究与制剂开发 Tel:(0760)89980213

tissues of mice in each group of Chaihu Shugan Granules decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the level of SOD in liver tissues increased significantly ($P < 0.01$). The degree of necrosis and inflammatory infiltration in liver cells decreased significantly. *Nqo1* gene and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) expression were up-regulated while *Ccl2* gene and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression were down-regulated. Organic acids were significantly down-regulated and carbohydrate was significantly up-regulated, the expressions of JNK, p38 MARK and Keap1 in liver tissues were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expressions of Nrf2 and HO-1 were significantly increased ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Chaihu Shugan Granules might have protective effect on CCl_4 -induced acute liver injury in mice by activating the Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway.

KEY WORDS: Chaihu Shugan Granules; acute liver injury; oxidative stress; Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway

肝脏是调节体内代谢和解毒的重要器官,极易受药物或环境等外界因素影响造成肝损伤,严重的发展成肝癌,危害人类健康。肝病目前已经成为影响人类健康的最常见疾病之一,寻找有效的防治药物来应对因各种原因所致的肝损伤,也成为目前研究的热点。近年来中医药在肝损伤防治研究方面取得很多进展,研究表明中药可通过抗氧自由基损伤、抑制脂质过氧化反应、降低炎症反应和凋亡介质产生等方面改善肝损伤^[1-3]。

柴胡疏肝颗粒为广州中医药大学附属中山中医院院内制剂(粤药制字 Z20130011),由柴胡、当归、白芍、茯苓等 10 味中药组成,具有疏肝解郁、养血健脾、散结止痛的功效,临床研究证实其对肝郁气滞、血虚脾弱所致的良性乳腺疾病、月经不调等有良好的疗效^[4],但有关其药效机制尚不明确。本研究通过四氯化碳(tetrachloromethane, CCl_4)诱导的急性肝损伤模型探讨柴胡疏肝颗粒对急性肝损伤的保护作用,并揭示其可能的作用机制,为其临床应用和制剂的进一步研究开发提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 60 只,5 周龄, (18 ± 0.5)g, 购于广东省医学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(粤)2018-0002,动物质量合格证号:No. 44822700002481。饲养于中山市中医院中药药理实验室 SPF 级动物实验室,实验动物使用许可证 SYXK(粤)2020-0109,饲养室温控制在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 $(50 \pm 5)\%$,给予 SPF 级标准饲料和无菌饮用水。本实验经中山市中医院实验动物伦理委员会批准,审批号:AEWC-2020028,本实验遵守国家有关实验动物保护与使用准则。

1.2 药物及试剂

水飞蓟宾(批号:C13425764)、 CCl_4 (批号:C11588428)(上海麦克林生化科技股份有限公司);羧甲基纤维素钠(批号:R008134,上海易恩

化学技术有限公司);橄榄油(国药集团化学试剂有限公司);丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT, 批号:20210817)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST, 批号:20210816)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, 批号:535220730)、丙二醛(malondialdehyde, MDA, 批号:417220730)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6, 批号:385220730)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α , 批号:569220224)、活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS, 批号:653210224)ELISA 检测试剂盒(天津安诺瑞康生物技术有限公司);兔抗鼠一抗 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 1/2/3(批号:51n7087)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MARK, 批号:10y0837)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1, 批号:AF5393)、 β -actin(批号:AF7018)抗体(美国 Affinity 公司);Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)抗体[批号:D199574,生工生物工程(上海)股份有限公司];核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)抗体(批号:A0674,武汉爱博泰克生物科技有限公司);辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗(批号:7074P2,美国 CST 公司)。

1.3 药物配制

柴胡疏肝颗粒组方:柴胡 10 g、当归 10 g、白芍 10 g、云苓 15 g、白术 10 g、川芎 10 g、郁金 10 g、薄荷 3 g、炮姜 5 g、甘草 5 g,粉碎成粗粉加水煮沸,煎煮液用纱布过滤,滤液浓缩至 $1.14、2.28、4.56 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (按生药量计)分别作为低、中、高剂量。水飞蓟宾用质量分数 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液。

1.4 仪器

JA-1203 型电子天平(上海天平仪器厂);

BS224 S型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);F6/10 型手持式超细匀浆器(德国 FLUKO 公司);MULTISKAN FC 型酶标仪(美国 Thermo 公司);化学发光成像系统、Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);2015-RM 型切片机(德国 Leica 公司);2-16R 型高速冷冻离心机(湖南恒诺设备仪器有限公司);Eclipse Ci-L 正置显微镜(日本 Nikon 公司);TS-1 型脱色摇床(江苏其林贝尔公司)。

2 实验方法

2.1 实验动物分组及处理

将 60 只小鼠随机分为正常对照组、模型组、水飞蓟宾组($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和柴胡疏肝颗粒低、中、高剂量组(11.4 、 22.8 、 $45.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,按照人和小鼠体表面积换算,等效于成人临床剂量的 1、2、4 倍),每组 10 只,每组动物体质量差异不超过平均体质量的 20%。实验前作 1 周的动物健康观察,并测定动物体质量。各给药组小鼠给予相应药物,每日 2 次,连续给药 7 d,灌胃体积均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常对照组和模型组小鼠灌胃等体积质量分数 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。末次给药结束 2 h 后,模型组和各药物组小鼠均腹腔注射以橄榄油稀释的体积分数 0.2% CCl_4 溶液,注射体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;正常对照组小鼠腹腔注射等体积橄榄油。

2.2 样品采集与检测

2.2.1 小鼠的一般状态观察 给药期间观察小鼠的毛色及生活状态,每日称量小鼠的体质量。造模 12 h 后,摘眼球取血,脱颈处死小鼠后,取各组小鼠的肝组织,生理盐水清洗干净,使用滤纸吸干水分后,称定肝质量。

2.2.2 血清肝功能酶检测 造模 12 h 后,各组动物摘眼球取血后, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上层血清,按照试剂盒说明书步骤检测血清中 ALT、AST 的含量。

2.2.3 肝组织生化指标及病理检测 取肝左叶组织,制备组织匀浆,根据试剂盒说明书步骤操作,检测 SOD、MDA、IL-6、TNF- α 及 ROS 水平。切取肝右叶组织,使用体积分数 10% 中性甲醛固定、石蜡包埋、切片后,进行苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色,观察肝组织中肝细胞肿胀坏死、炎性浸润等病理变化;组织切片进行免疫组织化学染色,检测组织中 JNK、p38 MARK、Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达情况,阳性表达为棕黄色或棕色,通过 Image J 图像分析软件计算平均光密度(optical density,

OD)值。

2.2.4 肝组织相关蛋白表达检测 使用总蛋白提取试剂盒提取肝组织蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定提取蛋白的浓度。取等量蛋白上样,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶电泳,并转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。阻断非特异性结合位点后,将膜与一抗 Keap1 (1:1 000)、Nrf2 (1:1 000)、HO-1 (1:1 000)、 β -actin (1:1 000) 抗体于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline and tween 20, PBST)溶液洗涤 3 次,每次 5 min,将膜转移至二抗羊抗兔 IgG (1:2 000) 中,室温孵育 3 h,再用 PBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min,用化学发光液在显影仪中进行显影。

2.2.5 转录组学与代谢组学研究 取正常对照组、模型组、水飞蓟宾组以及柴胡疏肝颗粒中剂量组动物肝组织快速漂洗,并分别剪切成约 50 和 100 mg 两份样品,液氮速冻 0.5 h,转至 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存,干冰覆盖寄往上海美吉生物医药科技有限公司进行分析。

2.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Tamhane's T2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 柴胡疏肝颗粒对 CCl_4 致肝损伤小鼠一般状态的影响

造模前各组动物毛色、饮食、活动正常,造模前 7 d 各组小鼠体质量持续增长。造模后,除正常对照组外,其余各组动物状态均发生较明显变化,如毛色暗淡、饮食减少、活动减少、体质量下降,以及尿液黄色加深等。

3.2 柴胡疏肝颗粒对 CCl_4 致肝损伤小鼠血清肝功能酶及肝组织生化指标的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠血清 ALT、AST 含量显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),肝组织中 SOD 水平显著降低($P < 0.05$),MDA、IL-6、TNF- α 及 ROS 水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,柴胡疏肝颗粒各剂量组小鼠血清 ALT、AST 含量均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),肝组织中 MDA、

TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。柴胡疏肝颗粒低、中剂量组小鼠肝组织中 SOD 水平显著升高 ($P < 0.01$)。柴胡疏肝颗粒中、高剂量组小鼠肝

组织中 ROS 水平均显著低于模型组 ($P < 0.01$)；高剂量组小鼠肝组织中 IL-6 水平显著低于模型组 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 柴胡疏肝颗粒对四氯化碳 (CCl₄) 致肝损伤小鼠肝损伤相关生化指标水平的影响。n = 10, $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 Effects of Chaihu Shugan Granules on biochemical indexes in mice with liver injury induced by CCl₄. n = 10, $\bar{x} \pm s$

Group	Dose	ALT	AST	SOD	MDA	IL-6	TNF- α	ROS
		/U · L ⁻¹	/U · L ⁻¹	/U · mg ⁻¹	/nmol · mg ⁻¹	/pg · mg ⁻¹	/pg · mg ⁻¹	/pg · mg ⁻¹
Control		13.45 ± 3.31 ⁴⁾	42.02 ± 5.40 ³⁾	2.03 ± 0.17 ³⁾	9.34 ± 1.99 ⁴⁾	14.92 ± 1.68 ⁴⁾	21.07 ± 3.40 ⁴⁾	0.74 ± 0.07 ⁴⁾
Model		148.47 ± 10.35 ²⁾	61.82 ± 8.07 ¹⁾	1.66 ± 0.17 ¹⁾	13.66 ± 2.42 ²⁾	25.46 ± 3.67 ²⁾	40.97 ± 5.27 ²⁾	1.26 ± 0.16 ²⁾
Silybin	100 mg · kg ⁻¹	94.72 ± 20.20	43.92 ± 9.98 ³⁾	2.60 ± 0.45 ³⁾	11.39 ± 0.90 ³⁾	20.90 ± 3.81	34.27 ± 0.98 ⁴⁾	1.12 ± 0.07
Chaihu	11.4 g · kg ⁻¹	64.69 ± 10.31 ⁴⁾	42.85 ± 8.86 ³⁾	2.53 ± 0.27 ⁴⁾	11.58 ± 1.03 ³⁾	21.34 ± 1.99	32.02 ± 0.44 ³⁾	1.16 ± 0.17
Shugan	22.8 g · kg ⁻¹	67.19 ± 8.78 ⁴⁾	43.64 ± 9.95 ³⁾	2.35 ± 0.16 ⁴⁾	10.93 ± 1.17 ⁴⁾	19.72 ± 2.95	30.52 ± 0.92 ⁴⁾	0.99 ± 0.15 ⁴⁾
Granules	45.6 g · kg ⁻¹	63.03 ± 8.59 ⁴⁾	33.88 ± 7.43 ⁴⁾	2.17 ± 0.40	10.90 ± 1.00 ⁴⁾	17.63 ± 1.44 ⁴⁾	26.94 ± 0.88 ⁴⁾	0.92 ± 0.16 ⁴⁾

注：与正常对照组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ，²⁾ $P < 0.01$ ；与模型组比较，³⁾ $P < 0.05$ ，⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, vs model group.

3.3 柴胡疏肝颗粒对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织病理学的影响

正常对照组肝组织细胞结构清晰，排列整齐规则，细胞饱满未见损伤；模型组肝组织大量炎性细胞浸润，肝小叶内中央静脉和汇管区肝细胞肿胀，可见

明显的肝细胞坏死及弥漫性炎细胞浸润；水飞蓟宾组和柴胡疏肝颗粒各剂量组肝组织炎性细胞浸润明显减轻，肝小叶汇管区附近肝细胞坏死程度明显减轻，肝小叶中肝细胞水肿、气球样变减轻。结果见图 1。

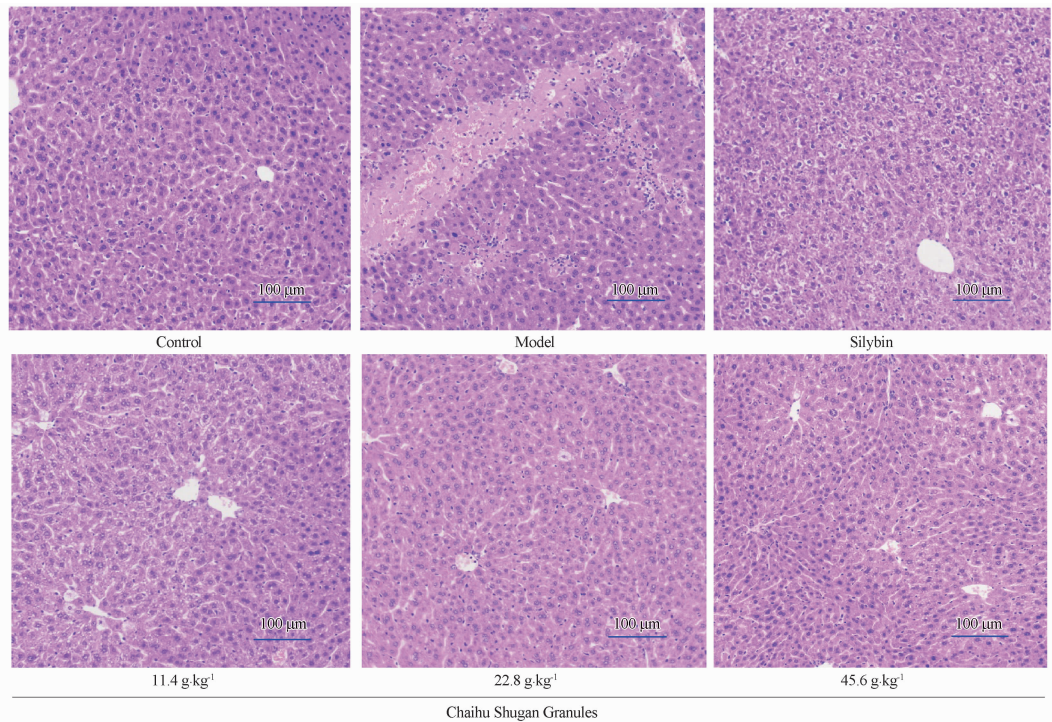


图 1 柴胡疏肝颗粒对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织病理学的影响 (HE 染色, $\times 200$, 标尺 = 100 μm)

Fig. 1 Effects of Chaihu Shugan Granules on pathological change of liver in mice with liver injury induced by CCl₄ (HE staining, $\times 200$, scale bar = 100 μm)

3.4 柴胡疏肝颗粒对 CCl₄ 致肝损伤小鼠的转录组与代谢组研究

3.4.1 转录组数据评估 各样品有效数据 (clean

data) 均达到 6.03 Gb 以上, Q30 碱基百分比在 95.24% 以上, 说明数据质量较高。分别将各样品的高质量序列 (clean reads) 与指定的参考基因组进行

序列比对,比率为 95.84% ~ 96.76%。

3.4.2 差异表达基因统计分析 基于表达量定量结果进行组间差异基因分析,获得两组间的差异表达基

因。差异分析软件为 DESeq2, P 值多重检验校正方法为 Benjamini-Hochberg (BH),筛选阈值为 $|\log_2 FC| \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 。结果见表 2。

表 2 柴胡疏肝颗粒对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织差异表达 mRNA 分析结果统计. $n = 3$

Tab. 2 Effects of Chaihu Shugan Granules on differential mRNA expressions in liver tissues of mice with liver injury induced by CCl₄.

$n = 3$

Group	Total numbers	Up-regulated numbers	Down-regulated numbers
Model vs Control	2 465	1 370	1 095
Chaihu Shugan Granules(22.8 g · kg ⁻¹) vs Model	338	223	115
Chaihu Shugan Granules(22.8 g · kg ⁻¹) vs Control	2 658	1 525	1 133
Silybin vs Model	86	48	38
Silybin vs Control	1 523	1 147	376
Silybin vs Chaihu Shugan Granules(22.8 g · kg ⁻¹)	37	13	24

与模型组比较,柴胡疏肝颗粒中剂量组 223 个基因表达上调,包括表达醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1] 的 *Nqo1* 等,115 个基因表达下调,包括表达单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 的 *Ccl2* 等。正常对照组、模型组、柴胡疏肝颗粒中剂量组共有的差异表达基因有 124 个,其中 47 个基因先上调后下调,包括 *Mthfr*、*Guc1a*、*Gdf9*、*Mcrip1*、*Pmepa1*、*Slc25a30*、*Ahcyl*、*Aldh1l2*、*Ccl2* 等,72 个基因先下调后上调,包括 *Cyp2c54*、*Retreg1*、*Cdip1*、*Adhfe1*、*Zfp966*、*Slc1a2*、*Znrf3*、*Ahr*、*Nr1d1* 等。结果见图 2A。

3.4.3 差异表达基因功能分析 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析结果见图 2B、C。柴胡疏肝颗粒中剂量组差异表达 mRNA 显著富集于 15 项细胞组分,46 项分子功能和 281 项生物学过程。正常对照组、模型组、柴胡疏肝颗粒中剂量组共有的差异表达 mRNA 显著富集于 2 项细胞组分和 2 项生物学过程。

京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析结果见图 2D、E。柴胡疏肝颗粒中剂量组差异表达 mRNA 富集于 219 条 KEGG 通路,显著富集于 30 条通路 ($P < 0.05$)。正常对照组、模型组、柴胡疏肝颗粒中剂量组共有的差异表达 mRNA 富集于 154 条 KEGG 通路,显著富集于 5 条通路 ($P < 0.05$)。

3.4.4 代谢轮廓分析 偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 表明,组间样本分离明显,组内聚集良好,质控样本紧密聚集,表明该系统稳定性高。置换检验表明, R^2 和 Q^2

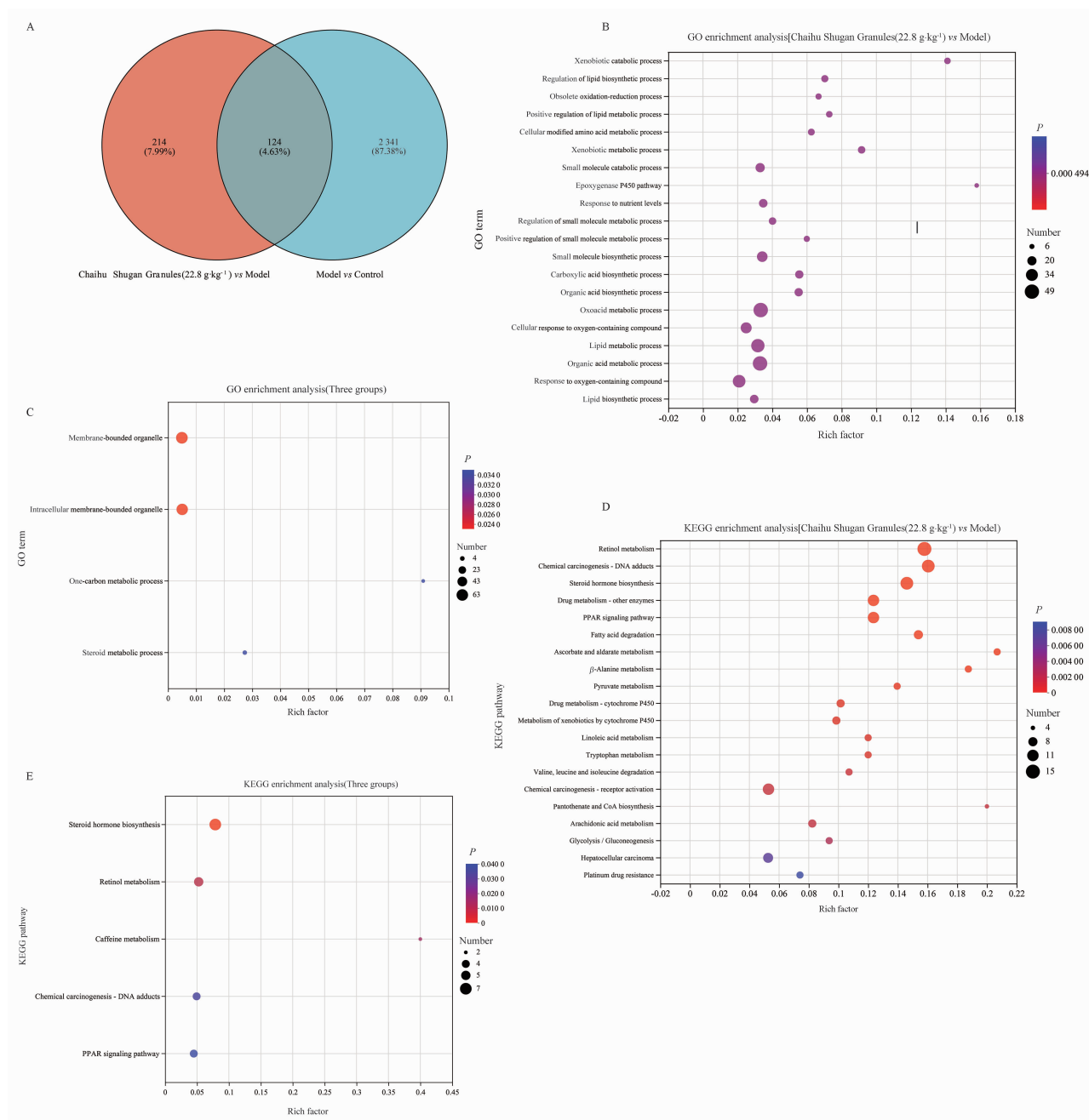
的置换值均小于原始值,且数值均接近 1,表明模型可靠。结果见图 3。

3.4.5 差异代谢物的鉴定结果 按照 $P < 0.05$ 且 $VIP > 1$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ 筛选差异显著代谢物,与正常对照组比较,模型组共有 206 个差异代谢物,其中,上调代谢物 108 个,下调代谢物 98 个,经柴胡疏肝颗粒治疗后 24 个代谢物显著回调,52 个代谢物如 L-半乳糖、甘露聚糖、糖原、水苏糖等显著上调且向正常对照组转归。与模型组比较,柴胡疏肝颗粒中剂量组共有 159 个差异代谢物,其中 99 个上调,60 个下调,有机酸类如脱氧胆酸、胆汁酸、胆酸等显著下调。结果见图 4。

3.4.6 差异代谢物的代谢通路分析 按照 $P < 0.05$ 将正常对照组、模型组、柴胡疏肝颗粒中剂量组共有的 83 个差异代谢物作通路分析,显著富集的代谢通路名称、 P 值和影响值 (impact) 等见表 3,主要富集于 5 条代谢通路,即淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、抗坏血酸和醛酸代谢、甘油磷脂代谢,以及花生四烯酸代谢。

3.5 免疫组化检测柴胡疏肝颗粒对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织 JNK、p38MARK、Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织 JNK、p38 MARK、Keap1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$),且集中在肝细胞坏死组织附近;Nrf2、HO-1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,柴胡疏肝颗粒各剂量组小鼠肝组织 JNK、p38 MARK、Keap1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Nrf2、HO-1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$)。结果见图 5。



A - 目标基因 Venn 分析; B - 柴胡疏肝颗粒组 ($22.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 与模型组基因本体 (GO) 分析 (前 20); C - 正常对照组、模型组、柴胡疏肝颗粒组 ($22.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) GO 分析; D - 柴胡疏肝颗粒组 ($22.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 与模型组京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 分析 (前 20); E - 正常对照组、模型组、柴胡疏肝颗粒组 ($22.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) KEGG 分析。

A - Venn analysis of target genes; B - gene ontology (GO) enrichment result between Chaihu Shugan Granules ($22.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and model group (top 20); C - GO enrichment result among control, model and Chaihu Shugan Granules ($22.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group; D - Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment result between Chaihu Shugan Granules ($22.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and model group (top 20); E - KEGG enrichment result among control, model and Chaihu Shugan Granules ($22.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group.

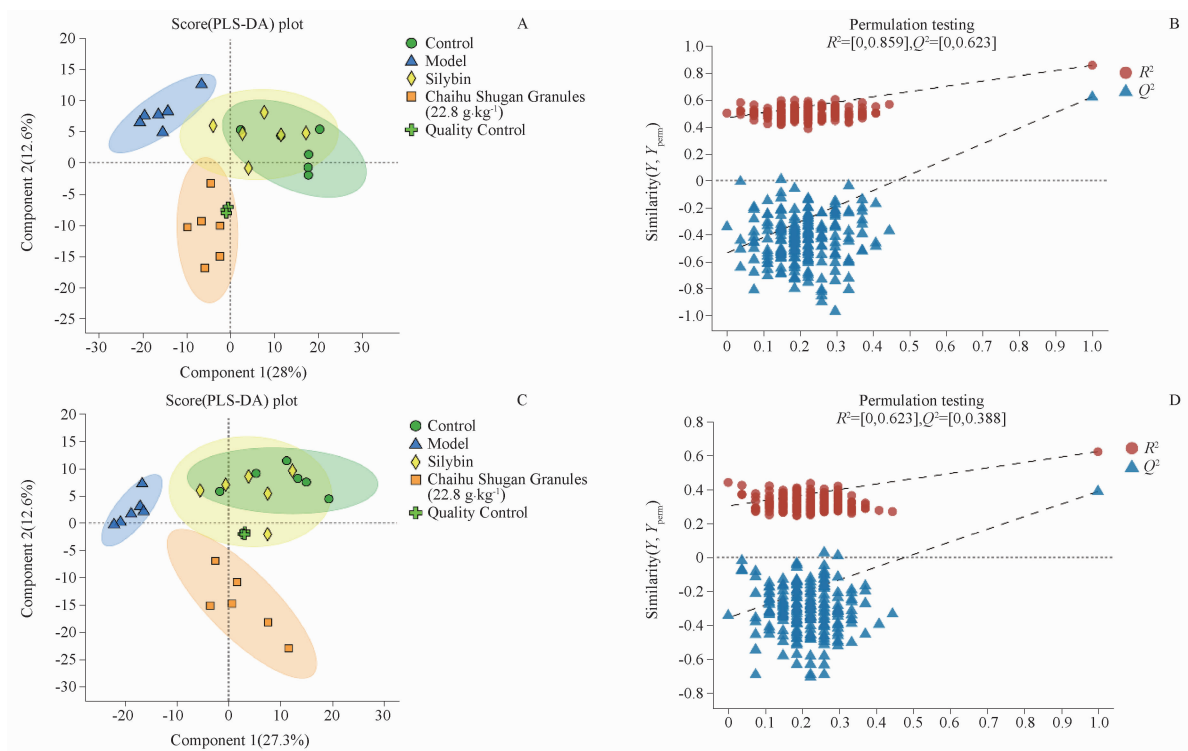
图 2 柴胡疏肝颗粒对 CCl_4 致肝损伤小鼠肝组织表达 mRNA 分析的影响. $n = 3$

Fig. 2 Analysis of effect of Chaihu Shugan granules on mRNA expressions in liver tissues of mice with liver injury induced by CCl_4 . $n = 3$

3.6 Western blot 检测柴胡疏肝颗粒对 CCl_4 致肝损伤小鼠肝组织 Keap1、Nrf2、HO-1 相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠肝组织 Keap1 蛋白表达显著升高, Nrf2、HO-1 蛋白表达

显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 柴胡疏肝颗粒各剂量组小鼠肝组织 Keap1 蛋白表达均显著降低, Nrf2、HO-1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$)。结果见图 6。

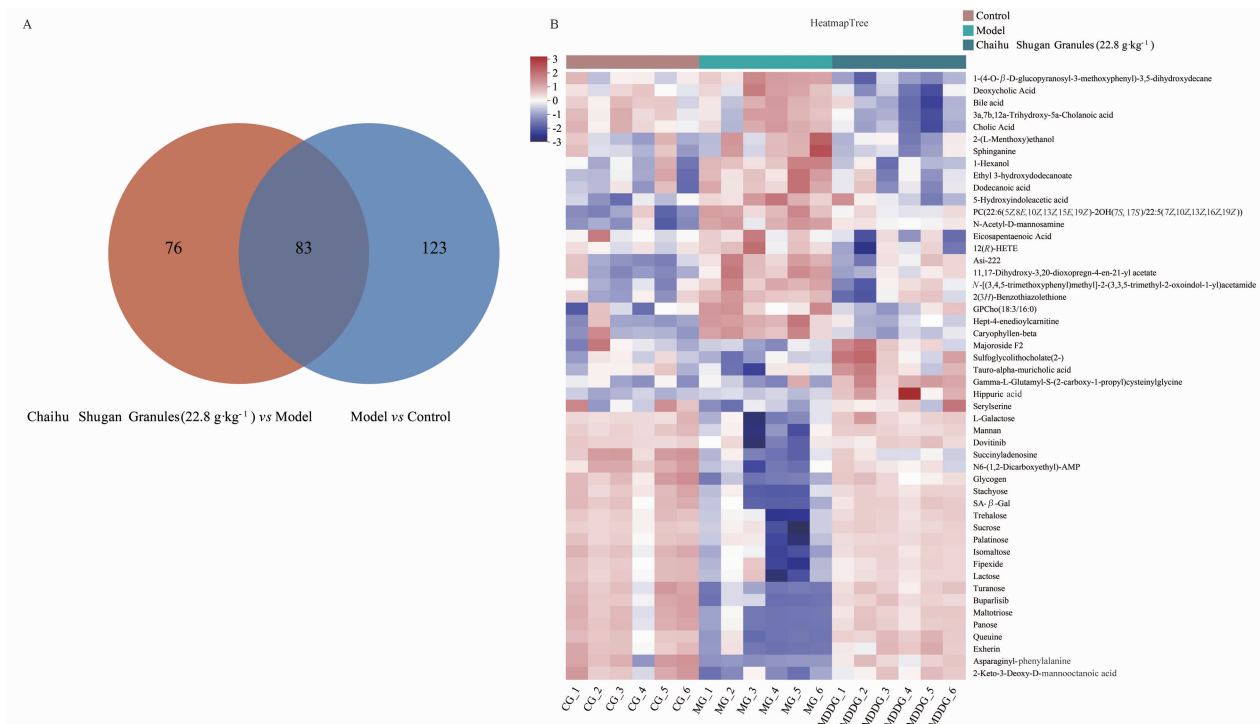


A, C - 不同组小鼠肝组织数据偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 得分图 (ESI⁺, ESI⁻); B, D - 不同组小鼠肝组织数据置换检验图 (ESI⁺, ESI⁻)。

A, C - PLS-DA result of different groups in ESI⁺ and ESI⁻, respectively; B, D - permutation testing of different groups in ESI⁺ and ESI⁻, respectively.

图3 柴胡疏肝颗粒对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织代谢组学数据统计分析. $n = 6$

Fig. 3 Statistical analysis of effects of Chaihu Shugan Granules on the metabolomics in liver tissues of mice with liver injury induced by CCl₄. $n = 6$



A - 代谢集 Venn 分析; B - 柴胡疏肝颗粒组 (22.8 g·kg⁻¹) 与模型组聚类分析 (前 50)。

A - Venn analysis of metabolite collection; B - cluster analysis between Chaihu Shugan Granules (22.8 g·kg⁻¹) and model group (top 50).

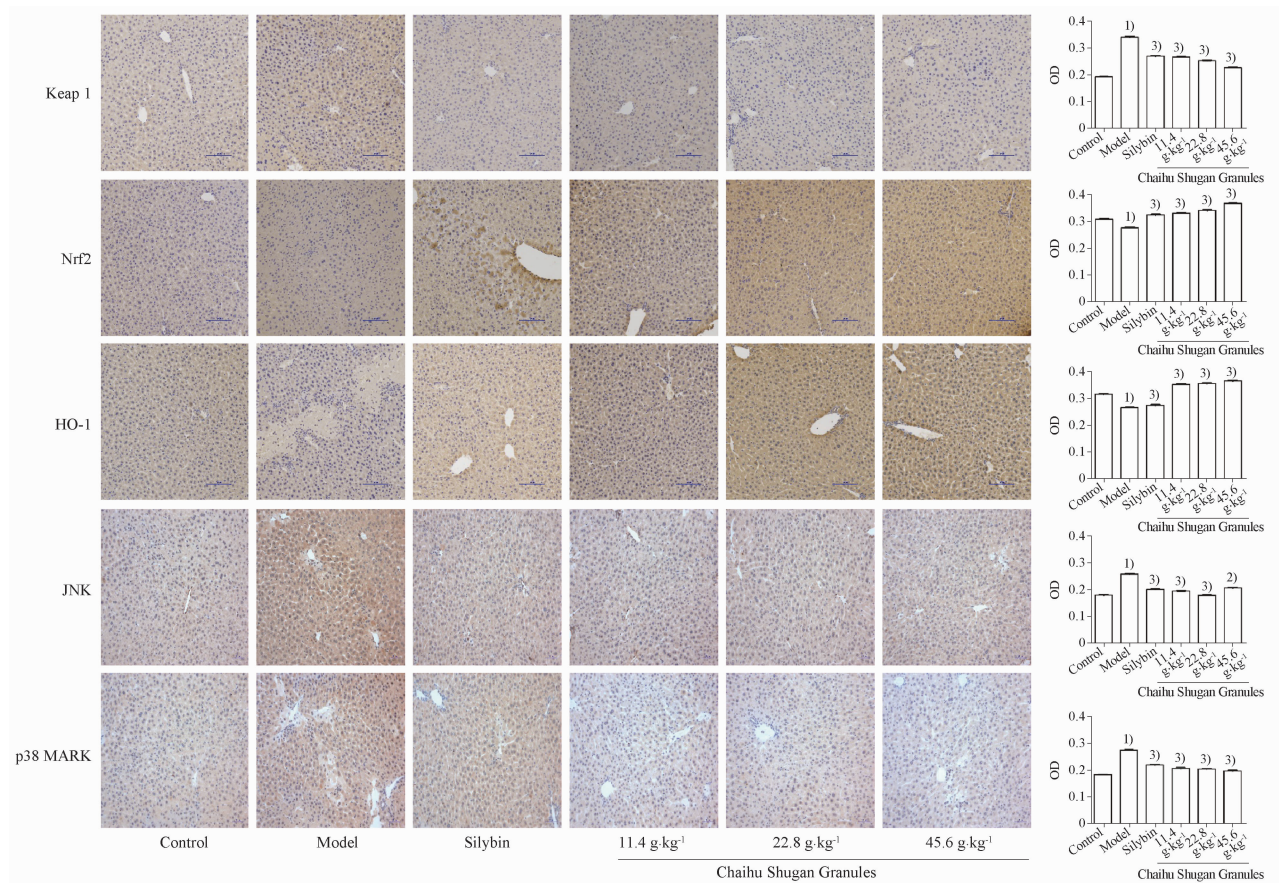
图4 柴胡疏肝颗粒对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织差异代谢物分析. $n = 6$

Fig. 4 Effects of Chaihu Shugan Granules on the differential metabolites in liver tissues of mice with liver injury induced by CCl₄. $n = 6$

表3 柴胡疏肝颗粒对 CCl₄致肝损伤小鼠肝组织差异代谢物代谢通路分析结果. *n* = 6

Tab.3 Effects of Chaihu Shugan Granules on metabolic pathways in liver tissues of mice with liver injury induced by CCl₄. *n* = 6

No.	KEGG pathway	Match status	<i>P</i> value	Impact
1	Starch and sucrose metabolism	5/35	2.00 × 10 ⁻⁷	0.303 8
2	Galactose metabolism	4/46	2.95 × 10 ⁻⁵	0.087 9
3	Ascorbate and aldarate metabolism	2/51	0.017 1	0.086 2
4	Glycerophospholipid metabolism	2/52	0.017 8	0.077 1
5	Arachidonic acid metabolism	3/37	0.000 4	0.000 0



JNK - c-Jun 氨基末端激酶; p38 MARK - p38 丝裂原活化蛋白激酶; Keap1 - Kelch 样 ECH 关联蛋白 1; Nrf2 - 核因子 E2 相关因子 2; HO-1 - 血红素加氧酶-1; 与正常对照组比较, ¹⁾*P* < 0.01; 与模型组比较, ²⁾*P* < 0.05, ³⁾*P* < 0.01。

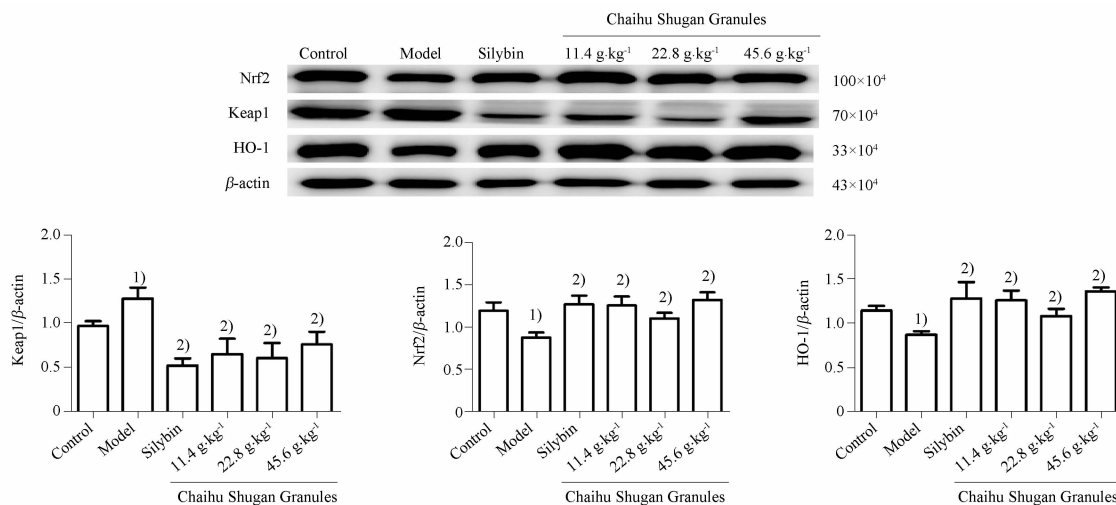
JNK - c-Jun N-terminal kinase; p38 MARK - p38 mitogen-activated protein kinase; Kelch1 - like ECH associated protein1; Nrf2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HO-1 - heme oxygenase-1; ¹⁾*P* < 0.01, *vs* control group; ²⁾*P* < 0.05, ³⁾*P* < 0.01, *vs* model group.

图5 柴胡疏肝颗粒对 CCl₄致肝损伤小鼠肝组织氧化应激相关蛋白表达的影响(免疫组化, ×200, 标尺 = 100 μm). *n* = 6, $\bar{x} \pm s$
Fig.5 Effects of Chaihu Shugan Granules on expressions of oxidative stress-related proteins in liver tissues of mice with liver injury induced by CCl₄ (Immunohistochemistry, ×200, scale bar = 100 μm). *n* = 6, $\bar{x} \pm s$

4 讨论

研究表明, CCl₄ 诱导肝损伤与氧化应激相关。CCl₄ 在体内经肝细胞色素 P450 代谢活化, 生成三氯甲基自由基和氯自由基。自由基促使肝细胞膜上的磷脂分子发生脂质过氧化反应, 产生的氧自由基增多, 与细胞膜的脂质和蛋白质以共价键结合, 破坏细胞膜结构导致功能丧失^[5-6]; 同时, 组织内抗氧化损伤酶(如 SOD 等)活性降低, 降低肝脏抗氧化损伤的

能力, 从而造成肝损伤^[7]。ALT、AST 主要分布在肝细胞内, 当发生炎症损伤时, 肝细胞肿胀破裂释放入血, 因此血清生化指标能较灵敏地反映肝细胞损伤严重程度, 是衡量机体肝功能的重要指标^[8]。本研究建立 CCl₄ 致肝损伤模型, 发现模型组小鼠血清中 ALT、AST 水平与正常对照组比较均明显升高。柴胡疏肝颗粒各剂量组能降低 CCl₄ 诱导肝损伤模型小鼠血清中 ALT、AST 水平。



与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.01$, vs control group; ²⁾ $P < 0.01$, vs model group.

图6 柴胡疏肝颗粒对 CCl_4 致肝损伤小鼠肝组织相关蛋白表达的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Effects of Chaihu Shugan Granules on the expressions of related proteins in liver tissues of mice with liver injury induced by CCl_4 . $n = 6, \bar{x} \pm s$

ROS 可与磷脂、酶、膜受体和核酸的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,该反应改变细胞膜的流动性和渗透性,最终导致细胞结构和功能改变^[9]。SOD 是专一性抗氧化酶,为机体抗氧化应激的首道防线,通过与超氧自由基发生歧化反应,催化其转化为过氧化氢和氧气,从而清除体内的超氧阴离子。MDA 是 ROS 诱导膜脂发生过氧化后的终产物,其与胞质、膜蛋白或酶形成聚合体而损害细胞膜结构,导致肝细胞变性、坏死^[10]。因此,检测肝组织中 SOD 和 MDA 的水平,可反映肝脏氧化损伤的程度。TNF- α 、IL-6、IL-10 均是肝损伤相关的重要炎症介质,加重肝细胞变性坏死的同时,促进炎症因子的释放,进而加剧炎症反应^[11]。本研究表明, CCl_4 诱导小鼠肝损伤后肝组织中 MDA、IL-6、TNF- α 及 ROS 等炎症因子水平显著升高, SOD 水平显著降低, HE 染色结果显示肝小叶汇管区附近肝细胞出现明显坏死,坏死区域可见大量炎性细胞浸润。而柴胡疏肝颗粒可下调 *Ccl2* 基因,逆转 MCP-1 等炎症因子上调,显著升高 SOD 水平,肝组织炎性细胞浸润和坏死程度明显减轻,提示其能缓解肝组织的炎症反应,改善肝组织损伤,对 CCl_4 诱导肝损伤小鼠有一定保护作用。

氧化应激造成的生物分子损伤会破坏正常细胞生理学,影响脂类、碳水化合物等代谢过程。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 是一种核激素受体,可调

节葡萄糖和脂质的稳态以及激活 Nrf2^[12-13]。柴胡疏肝颗粒可能通过激活 PPAR 信号通路,上调下游靶基因,从而调节脂肪酸氧化等过程。本研究发现,柴胡疏肝颗粒能下调肝损伤后肝脏胆酸类和花生四烯酸代谢物 19(S)-羟基二十碳四烯酸等,同时上调肝内糖原归于正常水平,逆转 CCl_4 诱导肝损伤所致的糖代谢紊乱。

研究发现,Keap1-Nrf2-ARE 信号通路是机体抗氧化应激或外源性损伤等的重要信号通路^[14]。Keap1 属于 Kelch 家族,是胞质肌动蛋白细胞骨架上的一种阻遏蛋白,可负性调节 Nrf2^[15]。Nrf2 属于 Cap-n-Collar 调节蛋白家族,是细胞抗氧化应激的关键转录因子。通常 Keap1 与 Nrf2 结合在胞质内,为功能抑制状态;当细胞受到刺激,Nrf2 即与 Keap1 解耦联进入细胞核,并结合到抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 的 DNA 序列上,启动其调控的 II 相解毒酶和抗氧化酶的基因进行表达,如 HO-1、NQO1 等,从而发挥机体抗氧化应激的作用^[16]。HO-1 是血红蛋白加氧酶的氧应激诱导型,当急性肝损伤时大量表达,发挥保护肝细胞的作用^[10]。本研究发现柴胡疏肝颗粒能显著下调肝损伤后肝组织中的 Keap1 蛋白,上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白,上调 *Nqo1* 基因,从而上调 NQO1 蛋白。

MAPK 级联反应的 3 条信号转导通路激活后的生物学作用各不相同,研究表明细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 激活

有助于肝细胞抗氧化应激,而 JNK 和 p38 MAPK 激活常表现为促凋亡,其中 JNK 信号通路是导致肝细胞坏死及凋亡的最主要途径。CCl₄诱导产生的 ROS 和炎症因子的升高,可刺激 p38 MAPK、JNK 磷酸化而激活,激活后又可增加炎症因子的释放^[17]。本研究发现柴胡疏肝颗粒能显著下调肝损伤后肝组织 JNK、p38 MARK 蛋白的表达。

综上所述,柴胡疏肝颗粒能显著降低 CCl₄诱导的肝损伤模型小鼠血清 ALT、AST 水平,显著升高肝损伤组织中 SOD 水平,降低 MDA、IL-6、TNF- α 及 ROS 水平,提升肝组织抗氧化应激作用,抑制炎症因子释放,缓解肝组织的炎性损伤;并能明显减少肝细胞坏死,减轻炎性细胞浸润,改善肝组织病理损伤,发挥一定的肝功能保护作用。柴胡疏肝颗粒能上调肝损伤后肝组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达,下调 Keap1、JNK、p38 MARK 蛋白表达,提示柴胡疏肝颗粒可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路缓解肝损伤模型小鼠的氧化应激损伤,抑制 JNK/p38 MARK 信号通路激活所致炎症反应和肝细胞坏死,从而发挥治疗作用,为临床应用柴胡疏肝颗粒治疗肝损伤提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] LIU S Y, LI Z K, ZHANG H M, *et al.* Study on the treatment of acute liver injury induced by APAP in mice by chaihu shugan powder[J]. *Graz Veter Sci* (畜牧兽医科学), 2022, (2): 19-21.
- [2] RUAN H N, WANG L L, SUN H, *et al.* Research advance of effective components of traditional Chinese medicine on alleviating acetaminophen-induced liver injury[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2019, 54(2): 81-85.
- [3] JIA L, GAO J, MENG Z R, *et al.* Performance and mechanism of *Paeoniae Radix Alba* polysaccharides in treatment of chemical-induced liver injury with syndrome of liver yin deficiency[J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2022, 17(21): 3019-3025.
- [4] XU D, LUO M, SHI C K, *et al.* Observation of curative of chaihu shugan granule on 60 cases of hyperplasia of mammary gland[J]. *Hunan J Tradit Chin Med* (湖南中医杂志), 2018, 34(1): 66-67.
- [5] CHEN P, WANG Z, ZENG L, *et al.* Protective effects of salean against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. *J Appl Toxicol*, 2012, 32(10): 796-803.
- [6] MA Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 401-426.
- [7] CICHOLACH H, MICHALAK A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(25): 8082-8091.
- [8] XU L, YU Y F, SANG R, *et al.* Protective effects of taraxasterol against ethanol-induced liver injury by regulating CYP2E1/Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways in mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 8284107. DOI: 10.1155/2018/8284107.
- [9] LIU J, LUO S, YANG J, *et al.* The protective effect of sheep placental extract on concanavalin A-induced liver injury in mice[J]. *Molecules*, 2019, 24(1): 28. DOI: 10.3390/molecules24010028.
- [10] LIU L P, TAO X F, HAN X, *et al.* Study on the effects of aqueous extract from *Dioscorea nipponica* Makino against carbon tetrachloride-induced mice acute liver injury via regulating Keap1/Nrf2 signal pathway[J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2018, 13(10): 2580-2584.
- [11] DAI W B, LI H N, HE X, *et al.* Protective effect of total polyphenols of *Phyllanthus urinaria* L. on liver injury induced by α -naphthalene isothiocyanate in rats[J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2019, 42(12): 2942-2947.
- [12] LI X Y, NI X X, HUA J. PPAR γ agonists alleviate the high fat-induced oxidative stress and inflammatory response *in vitro* and *in vivo* through Nrf2-mediated antioxidant pathway[J]. *Chin J Gastroenterol* (胃肠病学), 2020, 25(11): 653-659.
- [13] LI F, PENG J, FENG H, *et al.* KLF9 aggravates streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy by inhibiting PPAR γ /Nrf2 signaling[J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3393. DOI: 10.3390/cells11213393.
- [14] LI J, DU J, LIU D, *et al.* Ginsenoside Rh1 potentiates dexamethasone's anti-inflammatory effects for chronic inflammatory disease by reversing dexamethasone-induced resistance[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(3): R106. DOI: 10.1186/ar4556.
- [15] GAO B F, DOAN A, HYBERTSON B M. The clinical potential of influencing Nrf2 signaling in degenerative and immunological disorders[J]. *Clin Pharmacol*, 2014, 6: 19-34.
- [16] KUNDU J K, SURH Y J. Nrf2-Keap1 signaling as a potential target for chemoprevention of inflammation-associated carcinogenesis[J]. *Pharm Res*, 2010, 27(6): 999-1013.
- [17] TIAN J, JIN Q F, LI Z Y, *et al.* Effects of complex yinbai granule on MAPK signaling pathway of acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2016, 34(1): 111-113.

(收稿日期:2023-11-06)