

# 柴胡多糖对急性肝损伤小鼠的保护作用及机制研究<sup>Δ</sup>

陈雨婵<sup>1\*</sup>, 彭东辉<sup>1</sup>, 孙延平<sup>1</sup>, 王秋红<sup>2</sup>, 匡海学<sup>1#</sup>(1. 黑龙江中医药大学教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150040; 2. 广东药科大学中药学院, 广州 510006)

中图分类号 R965; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)19-2352-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.19.06



**摘要** **目的** 研究柴胡多糖对急性肝损伤(ALI)小鼠的保护作用及机制。**方法** 将40只小鼠按体重随机分为正常组、模型组、阳性对照组(护肝片, 550 mg/kg)和柴胡多糖高、低剂量组(400、100 mg/kg), 每组8只, 每天灌胃给药1次, 连续7 d。末次给药1 h后, 除正常组外, 其余各组小鼠均尾静脉注射20 mg/kg刀豆蛋白A溶液建立ALI模型。注射刀豆蛋白A溶液12 h后, 测定小鼠肝脾指数, 观察其肝脾组织病理学变化; 检测小鼠血清中天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH), 肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平; 检测小鼠血清和肝组织中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6(IL-6)、IL-1 $\beta$ 水平以及肝组织中核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、Toll样受体4(TLR4)、核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)和血红素加氧酶1(HO-1)的蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织大量坏死、炎症细胞浸润, 脾脏增大、出血增多、淋巴细胞减少, 肝脾指数均显著升高( $P < 0.01$ ); 血清中AST、ALT、LDH水平, 血清和肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平, 肝组织中MDA水平和TLR4、NF- $\kappa$ B、HO-1蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 肝组织中SOD水平和Nrf2蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 柴胡多糖高、低剂量组小鼠肝脾组织病理损伤减轻, 肝脾指数、血清和肝组织中上述指标水平大部分被显著逆转( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论** 柴胡多糖对ALI小鼠具有保护作用, 其作用机制可能与抑制TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路和激活Nrf2/HO-1信号通路有关。**关键词** 柴胡多糖; 急性肝损伤; TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路; Nrf2/HO-1信号通路

## Study on protective effect and mechanism of *Bupleurum chinense* polysaccharides on acute liver injury in mice

CHEN Yuchan<sup>1</sup>, PENG Donghui<sup>1</sup>, SUN Yanping<sup>1</sup>, WANG Qiuhong<sup>2</sup>, KUANG Haixue<sup>1</sup>(1. Key Laboratory of Basic and Applied Research of Northern Medicine of Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. College of Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the protective effect and mechanism of *Bupleurum chinense* polysaccharides (BCP) on acute liver injury (ALI) in mice. **METHODS** Overall 40 mice were randomly divided into normal group, model group, positive control group (Baogan tablet, 550 mg/kg), BCP high-dose and low-dose groups (400, 100 mg/kg), with 8 mice in each group. The drug was administered intragastrical once a day for 7 days. One hour after the last administration, except for the normal group, mice in other groups were injected with 20 mg/kg concanavalin A solution through the tail vein to establish ALI model. After injection of concanavalin A solution for 12 h, the liver and spleen indexes of mice were measured, and the pathological changes of liver and spleen tissue were observed; the serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected, and the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in liver tissue were detected. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 $\beta$  in serum and liver tissue of mice were determined, as well as the protein expression levels of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in liver tissue were also detected. **RESULTS** Compared with the normal group, the liver tissue of mice in the model group was necrotic and infiltrated with inflammatory cells; spleen

**Δ 基金项目** 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程——岐黄工程首席科学家项目(No. 国中医药人教函[2021]7号); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者支持项目(No. 国中医药人教函[2018]284号); 黑龙江省“头雁”团队支持项目(No. [2019]5号)

\* 第一作者 博士研究生。研究方向: 中药药效物质基础。E-mail: 747223077@qq.com

# 通信作者 教授, 博士生导师。研究方向: 中药性味理论及中药药效物质基础。E-mail: hxkuang@hljucm.net

enlargement, increased bleeding and decreased lymphocytes were observed, liver and spleen indexes were increased significantly ( $P < 0.01$ ); the serum levels of AST, ALT and LDH, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in serum and liver tissue, as well as the MDA level, protein expressions of TLR4, NF- $\kappa$ B and HO-1 in liver tissue were all increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The levels of SOD and protein expression of Nrf2 in liver tissue were all decreased

significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the pathological damages of the liver and the spleen tissues in mice alleviated in BCP high-dose and low-dose groups, and most of liver and spleen indexes, the above indexes of serum and liver tissue were reversed significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **CONCLUSIONS** BCP has a protective effect on ALI, the mechanism of which may be related to the inhibition of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway and the activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

**KEYWORDS** *Bupleurum chinense* polysaccharides; acute liver injury; TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway; Nrf2/HO-1 signaling pathway

急性肝损伤(acute liver injury, ALI)是一种常见的全球性肝脏疾病,多与病毒感染、过度饮酒、自身免疫性疾病以及某些药物的滥用有关<sup>[1]</sup>,其特征为转氨酶和免疫球蛋白G水平显著升高、血清自身抗体阳性、浆细胞浸润等<sup>[2]</sup>。ALI发病机制复杂,而治疗ALI的临床药物十分匮乏。因此,开发有效、安全的保肝药物具有重要的意义和价值。

中药治疗疾病具有多靶点、多途径的特点,在治疗肝脏疾病方面显示出独特的优势。柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzoneri-folium* Willd. 的干燥根,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的功效<sup>[3]</sup>。柴胡含有皂苷、黄酮、多糖及挥发油等化学成分,其中多糖是柴胡的主要活性成分之一<sup>[4]</sup>。相关研究发现,柴胡多糖对肝损伤小鼠具有一定的保护作用<sup>[5]</sup>,但具体作用机制尚不明确。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是机体重要的炎症通路,可调节肝细胞的生长、凋亡和炎症反应,进而缓解肝组织病理损伤<sup>[6]</sup>。研究显示,氧化应激反应与肝损伤密切相关,核转录因子红系2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)是调控氧化应激进而缓解肝损伤的重要通路<sup>[7]</sup>。鉴于此,本研究基于上述两条信号通路,探讨柴胡多糖对ALI小鼠的保护作用及机制,以期为柴胡多糖的临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有SCIENTZ-48L型冷冻型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技有限公司)、MX-F型涡旋器(美国Scilogex公司)、H1750R型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、Epoch 2型酶标仪(美国BioTek公司)、DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、QuickChemi 5200型化学发光成像系统[莫纳(苏州)生物科技有限公司]等。

### 1.2 主要药品与试剂

柴胡多糖由本课题组自制(得率为5.35%),其中总糖含量为(58.01 ± 1.65)%、醛酸含量为(30.62 ± 0.89)%、蛋白质含量为(3.95 ± 0.50)%。刀豆蛋白A(批号C2010)购自美国Sigma Aldrich公司;护肝片(批号Z44021877,规格0.35 g/片)购自广东省惠州市中药厂有

限公司;肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 $\beta$ 的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为RX202412M、RX203063M、RX203049M)均购自泉州市睿信生物科技有限公司;丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号分别为C009-2-1、C010-2-1、A020-2-2、A001-3-2、A003-1-2)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;苏木精-伊红(HE)染液(批号G1101)购于武汉塞维尔生物科技有限公司;兔源Nrf2、HO-1抗体(批号分别为AF0639、AF5393)均购自江苏亲科生物研究中心有限公司;兔源TLR4、NF- $\kappa$ B、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(批号分别为AF1234、AF8187、AF5003、AF0246)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级雄性BALB/c小鼠,共40只,体重20~22 g,购于广东省医学实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK(粤)2018-0002。所有动物均饲养于温度25℃、相对湿度(50 ± 10)%的环境中,自由饮水进食,经适应性饲养7 d后进行实验。本研究动物实验在广东省医学实验动物中心完成,且经该单位动物伦理委员会审查批准,伦理审批号为C202301-1。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模与给药

将小鼠按体重随机分为正常组、模型组、阳性对照组、柴胡多糖低剂量组、柴胡多糖高剂量组,每组8只。根据前期预实验结果和相关文献确定给药剂量,柴胡多糖高剂量组和柴胡多糖低剂量组小鼠分别灌胃400、100 mg/kg柴胡多糖<sup>[5,8]</sup>;阳性对照组小鼠灌胃550 mg/kg护肝片(根据临床等效剂量换算而得);正常组和模型组小鼠灌胃等体积纯水。各组小鼠每天灌胃给药1次,连续7 d。末次给药1 h后,除正常组外,其余各组小鼠均尾静脉注射刀豆蛋白A溶液(20 mg/kg,临用时以生理盐水溶解)建立ALI模型<sup>[9]</sup>,正常组小鼠注射等体积生理盐水。

## 2.2 取材和脏器指数的计算

注射刀豆蛋白A溶液12 h后,采用戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉小鼠,摘眼球取血后处死。血样以4 000 r/min离心15 min,取上层血清用于肝功能指标及炎症因子水平的测定;收集小鼠肝脾组织,分别称质量,再计算肝脾指数(肝脾指数=脏器质量/体重×100%)。取一部分肝组织以4%多聚甲醛固定,用于病理学形态观察,余下肝组织和血清均保存于-80 °C冰箱,用于后续实验。

## 2.3 小鼠肝脾组织病理学形态观察

每组随机取3只小鼠的肝脾组织适量,以4%多聚甲醛固定,经脱水、石蜡包埋、切片后,采用HE染色,然后置于光学显微镜下观察,并对小鼠肝脾损伤程度进行评分,具体如下<sup>[10]</sup>——(1)肝损伤评分标准:肝细胞正常无坏死,计0分;肝细胞轻微肿胀,个别肝细胞坏死,计1分;肝小叶不超过1/3的肝细胞坏死,出现聚集性炎症细胞浸润,计2分;肝小叶1/3~1/2肝细胞坏死,出现大量炎症细胞浸润,计3分;肝小叶超过1/2肝细胞坏死,出现大量炎症细胞浸润,计4分。(2)脾损伤评分标准:脾细胞正常无坏死,计0分;脾细胞轻度充血或出血,计1分;脾细胞轻度充血或出血,少许淋巴细胞减少,计2分;脾细胞中度充血或出血,大量淋巴细胞减少,计3分;脾细胞严重充血或出血,大量淋巴细胞减少,计4分。

## 2.4 小鼠血清中肝功能指标水平检测

取“2.2”项下各组小鼠的血清样品适量,按照试剂盒说明书方法操作,检测小鼠血清中ALT、AST、LDH的水平。

## 2.5 小鼠肝组织中氧化应激指标水平检测

取各组小鼠肝组织适量,加入生理盐水进行匀浆,然后以12 000 r/min离心10 min;取上清液适量(剩余部分保存备用),按试剂盒说明书方法操作,检测小鼠肝组织中SOD、MDA水平。

## 2.6 小鼠血清和肝组织中炎症因子水平的检测

取“2.2”项下各组小鼠的血清样品和“2.5”项下剩余肝组织匀浆上清液,按照试剂盒说明书操作,检测小鼠血清和肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 的水平。

## 2.7 小鼠肝组织中通路相关蛋白表达水平的检测

采用Western blot法检测。各组取3只小鼠的肝组

织适量,提取总蛋白,采用BCA蛋白试剂盒检测样品的蛋白浓度;调整浓度,放入沸水中煮10 min,使蛋白变性。将制备好的凝胶玻璃板安装在电泳槽中,倒入1×电泳缓冲液,在上样孔中加入10  $\mu$ L蛋白样品,于110 V电压下电泳90 min,转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭2 h;加入TLR4、NF- $\kappa$ B、Nrf2、HO-1和 $\beta$ -actin蛋白一抗(稀释比例均为1:1 000),在4 °C下孵育过夜;用TBST洗膜3次,加入相应二抗,在室温下孵育1 h;用TBST洗膜3次,加入ECL显影,曝光,拍照。采用Image J软件计算蛋白条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白 $\beta$ -actin的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

## 2.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- $t$ 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 柴胡多糖对ALI小鼠肝脾指数的影响

与正常组比较,模型组小鼠肝脾指数均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,柴胡多糖高剂量组小鼠肝脾指数均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见表1。

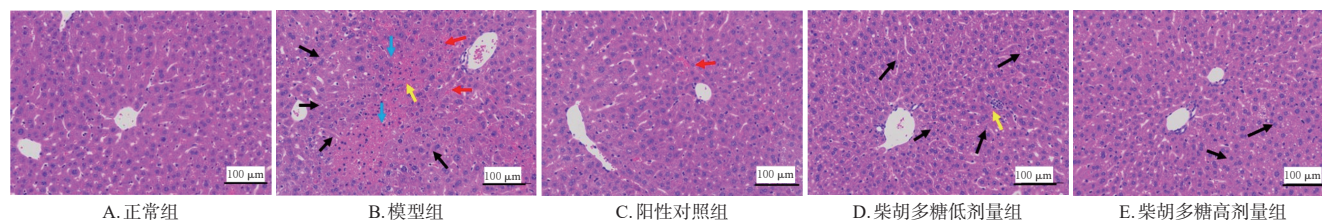
表1 各组小鼠肝脾指数的比较( $\bar{x} \pm s, n=8, \%$ )

组别	肝指数	脾指数
正常组	4.48 $\pm$ 0.22	0.35 $\pm$ 0.04
模型组	5.27 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
阳性对照组	5.09 $\pm$ 0.15	0.46 $\pm$ 0.09
柴胡多糖低剂量组	5.02 $\pm$ 0.18	0.45 $\pm$ 0.04
柴胡多糖高剂量组	4.87 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	0.43 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>

a:与正常组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.01$ ;c:与模型组比较, $P<0.05$ 。

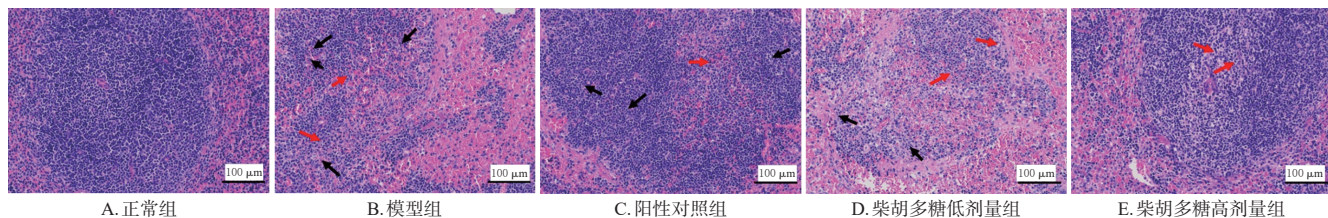
### 3.2 柴胡多糖对ALI小鼠肝脾组织病理学的影响

正常组小鼠肝细胞排列紧密、界限清晰,细胞质丰富、着色均匀,细胞核大小正常;脾细胞形态正常,淋巴细胞排列紧密。模型组小鼠肝细胞空泡变性或明显坏死,并出现大量炎症细胞浸润;脾细胞体积增大、严重充血并有出血现象,且淋巴细胞大量减少。与模型组比较,各给药组小鼠肝脾组织病理损伤均有所缓解,且阳性对照组和柴胡多糖高剂量组小鼠肝、脾损伤评分均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见图1、图2、表2。



注:黑色箭头所指为肝细胞空泡,红色箭头所指为出血和渗血,黄色箭头所指为炎症细胞浸润,蓝色箭头所指为肝细胞坏死。

图1 各组小鼠肝组织病理学形态观察结果(HE染色)



注:黑色箭头所指为脾细胞充血或出血,红色箭头所指为淋巴细胞减少。

图2 各组小鼠脾组织病理学形态观察结果(HE染色)

表2 各组小鼠肝脾组织病理损伤评分的比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ ,分)

组别	肝损伤评分	脾损伤评分
正常组	0	0
模型组	9.67 ± 0.47 <sup>a</sup>	9.67 ± 0.47 <sup>a</sup>
阳性对照组	6.33 ± 0.94 <sup>b</sup>	7.00 ± 0.82 <sup>b</sup>
柴胡多糖低剂量组	6.67 ± 1.25	7.33 ± 1.25
柴胡多糖高剂量组	5.67 ± 1.25 <sup>c</sup>	6.00 ± 0.82 <sup>c</sup>

a:与正常组比较, $P < 0.01$ ;b:与模型组比较, $P < 0.05$ ;c:与模型组比较, $P < 0.01$ 。

### 3.3 柴胡多糖对ALI小鼠肝功能的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST、LDH水平均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,阳性对照组和柴胡多糖各剂量组小鼠血清中ALT、AST、LDH(阳性对照组除外)水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见表3。

表3 各组小鼠肝功能指标水平的比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ ,U/L)

组别	AST	ALT	LDH
正常组	28.34 ± 7.82	9.38 ± 5.21	3 027.54 ± 385.07
模型组	110.16 ± 18.32 <sup>a</sup>	60.60 ± 6.33 <sup>a</sup>	6 954.10 ± 1 119.73 <sup>a</sup>
阳性对照组	88.31 ± 15.08 <sup>b</sup>	30.86 ± 8.81 <sup>b</sup>	5 901.84 ± 1 498.09
柴胡多糖低剂量组	87.16 ± 13.05 <sup>b</sup>	50.86 ± 10.19 <sup>b</sup>	5 010.59 ± 1 445.34 <sup>b</sup>
柴胡多糖高剂量组	66.89 ± 10.64 <sup>c</sup>	23.16 ± 9.72 <sup>c</sup>	4 584.75 ± 1 230.83 <sup>c</sup>

a:与正常组比较, $P < 0.01$ ;b:与模型组比较, $P < 0.05$ ;c:与模型组比较, $P < 0.01$ 。

### 3.4 柴胡多糖对ALI小鼠氧化应激的影响

与正常组比较,模型组小鼠肝组织中MDA水平显著升高,SOD水平显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较,柴胡多糖高剂量组小鼠肝组织中MDA水平显著降低,SOD水平显著升高( $P < 0.05$ );阳性对照组小鼠肝组织中SOD水平显著升高( $P < 0.05$ )。结果见表4。

表4 各组小鼠肝组织中氧化应激指标水平的比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

组别	MDA/(nmol/mg prot)	SOD/(U/mg prot)
正常组	1.20 ± 0.41	150.59 ± 33.59
模型组	2.12 ± 0.92 <sup>a</sup>	89.38 ± 10.64 <sup>a</sup>
阳性对照组	1.61 ± 0.72	132.13 ± 10.61 <sup>b</sup>
柴胡多糖低剂量组	1.78 ± 0.84	124.94 ± 22.04
柴胡多糖高剂量组	1.25 ± 0.35 <sup>b</sup>	132.88 ± 17.17 <sup>b</sup>

a:与正常组比较, $P < 0.05$ ;b:与模型组比较, $P < 0.05$ 。

### 3.5 柴胡多糖对ALI小鼠炎症因子的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清和肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比

较,阳性对照组和柴胡多糖各剂量组小鼠血清和肝组织中上述大部分指标水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见表5。

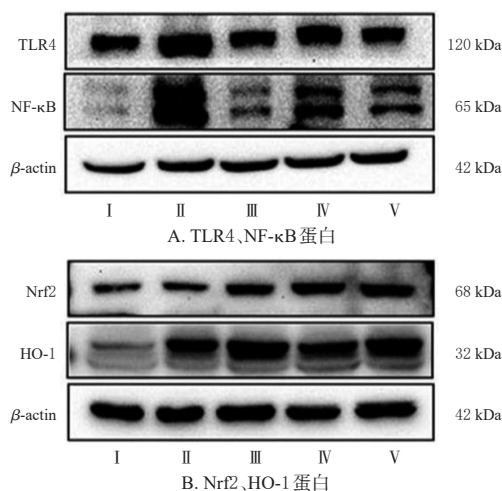
表5 各组小鼠血清和肝组织中炎症因子水平的比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ ,pg/mL)

组别	血清			肝组织		
	IL-6	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
正常组	89.84 ± 1.44	47.63 ± 9.85	394.49 ± 58.10	26.55 ± 4.73	26.52 ± 5.80	166.06 ± 31.27
模型组	153.31 ± 13.04 <sup>a</sup>	88.03 ± 12.99 <sup>a</sup>	665.10 ± 84.13 <sup>a</sup>	46.69 ± 8.55 <sup>a</sup>	49.98 ± 10.27 <sup>a</sup>	252.14 ± 32.10 <sup>a</sup>
阳性对照组	125.31 ± 8.86 <sup>b</sup>	65.72 ± 21.49 <sup>b</sup>	483.70 ± 73.84 <sup>b</sup>	34.15 ± 8.76 <sup>b</sup>	33.67 ± 8.08 <sup>b</sup>	206.45 ± 33.16 <sup>b</sup>
柴胡多糖低剂量组	127.78 ± 12.81 <sup>b</sup>	74.07 ± 14.69 <sup>b</sup>	568.12 ± 62.23 <sup>b</sup>	39.69 ± 7.05 <sup>b</sup>	39.25 ± 10.18 <sup>b</sup>	212.94 ± 32.64 <sup>b</sup>
柴胡多糖高剂量组	119.88 ± 10.90 <sup>c</sup>	68.56 ± 14.05 <sup>c</sup>	540.26 ± 69.48 <sup>c</sup>	37.44 ± 4.18 <sup>c</sup>	37.07 ± 7.33 <sup>c</sup>	210.20 ± 32.69 <sup>c</sup>

a:与正常组比较, $P < 0.01$ ;b:与模型组比较, $P < 0.01$ ;c:与模型组比较, $P < 0.05$ 。

### 3.6 柴胡多糖对ALI小鼠肝组织中通路相关蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠肝组织中TLR4、NF- $\kappa$ B、HO-1蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),Nrf2蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,阳性对照组和柴胡多糖高、低剂量组小鼠肝组织中TLR4、NF- $\kappa$ B蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),Nrf2(柴胡多糖低剂量组除外)、HO-1蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见图3、表6。



I:正常组;II:模型组;III:阳性对照组;IV:柴胡多糖低剂量组;V:柴胡多糖高剂量组。

图3 各组小鼠肝组织中TLR4、NF- $\kappa$ B、Nrf2、HO-1蛋白表达的电泳图

表6 各组小鼠肝组织中TLR4、NF-κB、Nrf2、HO-1蛋白表达水平的比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	TLR4/ $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin	Nrf2/ $\beta$ -actin	HO-1/ $\beta$ -actin
正常组	0.79 ± 0.09	0.25 ± 0.15	0.64 ± 0.07	0.34 ± 0.06
模型组	1.40 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.11 <sup>b</sup>
阳性对照组	0.81 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.56 ± 0.22 <sup>d</sup>	0.83 ± 0.10 <sup>d</sup>	1.15 ± 0.15 <sup>d</sup>
柴胡多糖低剂量组	0.92 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.78 ± 0.10 <sup>d</sup>	0.72 ± 0.15	0.95 ± 0.23 <sup>d</sup>
柴胡多糖高剂量组	0.80 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.55 ± 0.16 <sup>d</sup>	1.12 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.12 ± 0.10 <sup>d</sup>

a:与正常组比较, $P<0.01$ ;b:与正常组比较, $P<0.05$ ;c:与模型组比较, $P<0.01$ ;d:与模型组比较, $P<0.05$ 。

#### 4 讨论

研究表明,肝损伤与炎症反应、氧化应激反应密切相关<sup>[11]</sup>。ALT、AST、LDH是评价肝功能的关键指标<sup>[12]</sup>,MDA和SOD水平可反映自由基对机体造成氧化损伤的程度<sup>[13]</sup>,TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 是炎症相关因子,其水平随着肝损伤的发生而升高<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝脾指数均显著升高,肝脾组织病理损伤严重,且血清中ALT、AST和LDH水平均显著升高,表明ALI模型构建成功。与模型组比较,柴胡多糖各剂量组小鼠血清中ALT、AST、LDH水平,肝组织中MDA水平,血清和肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平均降低,而肝组织中SOD水平升高,这表明柴胡多糖可能通过抑制炎症因子表达、缓解氧化应激反应,从而减轻ALI小鼠的肝损伤。

TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路是重要的炎症通路之一,其中TLR4作为TLRs家族的重要成员,广泛存在于Kupffer细胞、肝树突状细胞、肝中性粒细胞等多种肝细胞中,在机体免疫调节方面具有重要作用;NF- $\kappa$ B是炎症反应和免疫反应的重要调节因子,可调节多种炎症因子的水平;当机体受到外部刺激时,TLR4和NF- $\kappa$ B被激活,引发肝脏严重的炎症反应,促进TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 等炎症因子的表达,从而进一步加重肝脏的炎症损伤<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,柴胡多糖各剂量组小鼠肝组织中TLR4、NF- $\kappa$ B蛋白表达水平均降低,这表明柴胡多糖对ALI小鼠肝损伤的保护作用可能与抑制TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路有关。

Nrf2蛋白是氧化还原稳态的重要调控因子,在应激条件下,Nrf2与Keap1蛋白解偶联并转移至细胞核,然后Nrf2与抗氧化反应元件结合,启动下游因子(如HO-1、SOD)的转录和表达,从而提高机体的抗氧化应激水平<sup>[16-17]</sup>。有研究发现,高脂肪、高胆固醇饮食可上调肝脏中HO-1基因表达,这属于病理应激反应,尚未发挥抗氧化应激作用;而经运动干预后,HO-1蛋白表达水平升高,这提示上调HO-1蛋白表达可改善肝脏氧化应激反应<sup>[18]</sup>。本研究结果发现,模型组小鼠肝组织中Nrf2蛋白表达水平降低,HO-1蛋白表达水平升高,表明小鼠机体

处于病理应激状态;而经柴胡多糖干预后,小鼠肝组织中Nrf2、HO-1蛋白表达水平均升高,这表明柴胡多糖可能通过激活Nrf2/HO-1信号通路,从而改善ALI小鼠的肝损伤。

综上所述,柴胡多糖对ALI小鼠具有保护作用,其作用机制可能与抑制TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路和激活Nrf2/HO-1信号通路有关。本研究初步探究了柴胡多糖的保肝作用及机制,后续拟对柴胡多糖进一步分离纯化,并解析其化学结构,以期柴胡保肝新药的研究提供参考。

#### 参考文献

- 王桂秋,刘雪萍,邓书武,等. 中药治疗急性肝损伤作用机制研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2023, 40(11): 1921-1927.  
WANG G Q, LIU X P, DENG S W, et al. Research progress on the mechanism of traditional Chinese medicine against acute liver injury[J]. J Guangxi Med Univ, 2023, 40(11): 1921-1927.
- JANIK M K, KEMPIŃSKA-PODHORODECKA A, RASZEJA-WYSZOMIRSKA J, et al. Previous hepatitis E virus infection is associated with increased liver stiffness in patients with autoimmune hepatitis[J]. Pol Arch Intern Med, 2024, 134(5): 16733.
- 李力恒,陈丽萍,胡晓阳,等. 柴胡的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医学报, 2023, 51(2): 109-112.  
LI L H, CHEN L P, HU X Y, et al. Research progress on chemical components and pharmacological effects of Radix Bupleuri[J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2023, 51(2): 109-112.
- 吕晓慧,孙宗喜,苏瑞强,等. 柴胡及其活性成分药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(12): 105-107.  
LYU X H, SUN Z X, SU R Q, et al. Advances in pharmacological research of *Bupleurum chinense* and its active components[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2012, 19(12): 105-107.
- ZHAO W, LI J J, YUE S Q, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of a polysaccharide from *Beichaihu (Bupleurum chinense DC.)*[J]. Carbohydr Polym, 2012, 89(2): 448-452.
- 刘莲,孟宪群,包璇,等. 芍药多糖对小鼠急性肝损伤的保护与机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(4): 518-522.  
LIU L, MENG X Q, BAO X, et al. Protective mechanism of *Paeonia lactiflora* polysaccharide against acute liver injury in mice[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(4): 518-522.
- 罗美美,朱星宇,胡乐涛,等. 基于Nrf2/HO-1信号通路

- 的中药有效成分缓解肝损伤研究进展[J]. 药物评价研究, 2024, 47(7):1638-1644.
- LUO M M, ZHU X Y, HU L T, et al. Research progress on alleviation of liver injury by active ingredients of traditional Chinese medicine based on Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Drug Eval Res, 2024, 47(7):1638-1644.
- [8] SONG X F, REN T, ZHENG Z, et al. Anti-tumor and immunomodulatory activities induced by an alkali-extracted polysaccharide BCAP-1 from *Bupleurum chinense* via NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 95:357-362.
- [9] 刘妙华, 潘源乐, 熊祎, 等. 片仔癀对自身免疫性肝炎小鼠巨噬细胞-肠道菌群交互的调控作用[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(5):2887-2892.
- LIU M H, PAN Y L, XIONG Y, et al. Regulatory effect of Pianzaihuang on the interaction between macrophages and intestinal flora in autoimmune hepatitis mice[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(5):2887-2892.
- [10] 史丛晶, 邓雅方, 张志宏, 等. 胆南星对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国药房, 2022, 33(23):2835-2839.
- SHI C J, DENG Y F, ZHANG Z H, et al. Study on protective effect and mechanism of Arisaema Cum Bile on acute liver injury induced by CCl<sub>4</sub> in mice[J]. China Pharm, 2022, 33(23):2835-2839.
- [11] DING Y, YU Z Q, ZHANG C L. Diallyl trisulfide protects against concanavalin A-induced acute liver injury in mice by inhibiting inflammation, oxidative stress and apoptosis[J]. Life Sci, 2021, 278:119631.
- [12] 闵彤彤, 钟国跃, 张亚梅. 藏药塞北紫堇对小鼠急性肝损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国民族民间医药, 2024, 33(12):29-34.
- MIN T T, ZHONG G Y, ZHANG Y M. Study on the protective effect and mechanism of *Corydalis impatiens* on carbon tetrachloride-induced anti-liver injury in mice[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2024, 33(12):29-34.
- [13] 宋琄, 韦冬晖, 邱蓉丽, 等. 木香乙醇提取物对脂多糖诱导大鼠肝损伤的保护作用研究[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(12):6020-6023.
- SONG S, WEI D H, QIU R L, et al. Study on the protective effect of ethanol extract from Aucklandiae Radix on lipopolysaccharide-induced liver injury[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(12):6020-6023.
- [14] WANG L, YAN F L, ZHANG J F, et al. Cornuside improves murine autoimmune hepatitis through inhibition of inflammatory responses[J]. Phytomedicine, 2023, 120:155077.
- [15] 李子舜, 赵长普, 陈仁伍, 等. 中医药基于NF- $\kappa$ B信号通路治疗肝纤维化的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(23):275-282.
- LI Z S, ZHAO C P, CHEN R W, et al. Traditional Chinese medicine treats hepatic fibrosis via NF- $\kappa$ B signaling pathway: a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(23):275-282.
- [16] ZHANG X, CHEN Y Y, LI H M, et al. Sulforaphane acts through NFE2L2 to prevent hypoxia-induced apoptosis in porcine granulosa cells via activating antioxidant defenses and mitophagy[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(26):8097-8110.
- [17] WANG B L, TANG X, MAO B Y, et al. Anti-aging effects and mechanisms of anthocyanins and their intestinal microflora metabolites[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2024, 64(8):2358-2374.
- [18] 平焯, 张珮雯, 袁馨梦, 等. 运动调节Nrf2/HO-1通路改善HFFC膳食诱导肝细胞氧化应激的作用研究[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(5):566-575.
- PING Y, ZHANG P W, YUAN X M, et al. Effects of exercise regulated the Nrf2/HO-1 pathway on improving HFFC diet-induced oxidative stress in hepatocytes[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2024, 32(5):566-575.

(收稿日期:2024-05-09 修回日期:2024-08-18)

(编辑:唐晓莲)