

白芍总苷对大鼠化学性肝损伤与肝阴虚证结合模型的影响和机制研究

贾 岚, 王蕾蕾, 孟 靓, 华娟安, 魏益谦, 孟智睿, 高学敏, 王景霞*

北京中医药大学, 北京 100029

摘要: **目的** 研究白芍总苷对大鼠化学性肝损伤肝阴虚证候模型的影响和作用机制。**方法** SPF 级雄性 SD 大鼠适应性喂养后, 随机分为对照组、模型组、一贯煎组和白芍总苷组。除对照组外, 其余各组大鼠 ip 20% CCl₄ 橄榄油溶液, 后期 ig 给予附子、干姜、肉桂温中药复方制备化学性肝损伤肝阴虚证模型。一贯煎组、白芍总苷组造模同时给药, 1 次/d, 连续 6 周。6 周后测定大鼠体质量、肛温, 观察其一般状态; 测定血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP)、6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α})、血浆血栓素 B₂ (TXB₂)、层黏连蛋白 (LN)、透明质酸 (HA) 水平及肝组织白细胞介素-6 (IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 水平; 检测肝脏磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) mRNA、蛋白激酶 B (Akt) mRNA 和蛋白表达水平, 并取肝脏进行 HE 病理切片检查。**结果** 与模型组比较, 白芍总苷组大鼠体质量评分有明显改善 ($P < 0.05$), 体质量显著升高 ($P < 0.05$), 血清 ALT、AST 水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$), cAMP/cGMP 显著升高 ($P < 0.01$), LN、HA 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.001$), 肝组织 TNF-α、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.001$), Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), PI3K、Akt mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.001$), 同时肝脏病理损伤有所改善。**结论** 白芍总苷具有保护化学性肝损伤肝阴虚证的功效, 可能是白芍养肝阴的物质基础, 其作用机制可能与抗炎、减轻微循环障碍、通过抑制 PI3K-Akt 通路来调节细胞因子 IL-6 和 IL-10 平衡有关。

关键词: 白芍总苷; 化学性肝损伤; 肝阴虚证; 丙氨酸转氨酶; 天冬氨酸转氨酶; 环磷酸腺苷; 环磷酸鸟苷; 6-酮-前列腺素 F_{1α}; 血浆血栓素 B₂; 层黏连蛋白; 透明质酸; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子-α; PI3K-Akt

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)07-1885-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.025

Effect and mechanism of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on combined model of chemical liver injury and liver *yin* deficiency syndrome in rats

JIA Lan, WANG Lei-lei, MENG Liang, HUA Ji-an, WEI Yi-qian, MENG Zhi-rui, GAO Xue-min, WANG Jing-xia
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** Based on the establishment of experimental model of liver *yin* deficiency syndrome, the effects of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on the syndrome model of liver *yin* deficiency syndrome in rats with chemical liver injury were studied. **Methods** SPF male Sprague-Dawley rats weighing (200 ± 20) g, after adaptive feeding, were randomly divided into control group, model group, Yi Guan Jian group, and total glycosides of *Paeoniae Radix Alba* group. Except the control group, the rats in the other groups were intraperitoneally injected with 20% CCl₄ olive oil solution, and then ig treated with *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, *Zingiberis Rhizoma* and *Cinnamomi Cortex* to establish liver *yin* deficiency syndrome model. The Yi Guan Jian group and the total glucoside of *Paeoniae Radix Alba* group were administered at the same time, once a day for 6 weeks. After 6 weeks, the body weight and anal temperature of the rats were measured, and the general state was observed. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), 6-keto-prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}), plasma thrombosis content of B₂ (TXB₂), laminin (LN) and hyaluronic acid (HA) were measured, and the activity of liver tissue interleukin-6 (IL-6), IL-10, and tumor necrosis factor (TNF-α) were measured. The expression levels of phosphatidylinositol kinase (PI3K) mRNA, protein kinase B (Akt) mRNA and protein were determined and livers were taken for pathological examination of HE. **Results** Compared with the model group, the scores of the total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* group were significantly increased ($P < 0.05$), the body weight was significantly increased ($P < 0.05$), and the serum ALT and AST levels were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). The cAMP/cGMP ratio was increased

收稿日期: 2019-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673617); 国家中医药管理局中医药行业科研专项 (201507004)

作者简介: 贾 岚, 女, 在读硕士生。Tel: 15210378258

*通信作者 王景霞, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药性理论。E-mail: wjx20131210@163.com

significantly ($P < 0.01$). The LN and HA of the liver tissue of the total glycosides group were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.001). The content of TNF- α and IL-6 was decreased significantly ($P < 0.001$), the expression level of Akt protein was decreased significantly ($P < 0.05$), the expression of PI3K and Akt mRNA was decreased significantly ($P < 0.05$, 0.001), and liver pathological sections were improved. **Conclusion** The extract of *Paeoniae Radix Alba* has the effect of protecting liver injury with *yin* deficiency syndrome, which may be the material basis of supplement liver *yin* of *Paeoniae Radix Alba*. Its mechanism of action may be related to anti-inflammatory, alleviate microcirculatory disorders, and regulate the balance of cytokines IL-6 and IL-10 by inhibiting the PI3K-Akt pathway.

Key words: total glucosides of *Paeoniae Radix Alba*; chemical liver injury; liver *yin* deficiency syndrome; ALT; AST; cAMP; cGMP; 6-keto-PGF $_{1\alpha}$; TXB $_2$; LN; HA; IL-6; TNF- α ; PI3K-Akt

肝阴虚证为中医阴虚证常见证候之一,其主要病因包括饮食所伤、房事所伤、情志所伤,病机为肝之阴阳失衡^[1],表现为眩晕、眼目干涩、潮热盗汗、五心烦热等。肝阴虚证可出现在临床的很多疾病中,分布广泛。相关的以方测证的证候研究已表明 CCl $_4$ 所致的化学性肝损伤中存在阴虚证的可能,并且伴有瘀血阻络的中医证候特点^[2-3]。

白芍最早记载于《神农本草经》,为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,味苦、酸,性微寒,具有养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳的作用^[4-5]。白芍是历代医家用以滋养肝阴的经典药物,能养肝阴、扶阴抑阳,使其阴平阳秘,达到恢复肝脏正常生理功能的目的。现代研究表明,白芍具有抗慢性肝纤维化和非酒精性脂肪肝等保肝作用^[6-7]。研究显示白芍总苷是白芍发挥保肝作用的有效部位,具有抗急性肝损伤、慢性肝纤维化、肝癌等多种作用^[8]。

本实验基于化学性肝损伤肝阴虚证候大鼠模型,探究白芍总苷对肝阴虚证的保护作用及从抗炎、改善微循环障碍 2 方面探究白芍总苷保护化学性肝损伤肝阴虚证的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 (200 $\pm$ 20) g,北京斯贝福有限公司提供,动物许可证号 SCXK (京) 2018-0006,饲养于北京中医药大学屏障系统中,室温 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 40%~60%,正常饮水,自由饮食。

1.2 药物与试剂

附子、干姜、肉桂配方颗粒,批号 20180623,购于北京康仁堂药业有限公司;白芍饮片,批号 20180801,购于北京本草方源药业集团有限公司;北沙参 9 g、麦冬 9 g、当归 9 g、生地黄 20 g、枸杞子 12 g、川楝子 4.5 g (一贯煎原方药物剂量和比例),

批号 20180715,购于北京中医药大学国医堂。药材均经北京中医药大学临床中药学教研室李伟实验师鉴定为正品。

CCl $_4$ (批号 20170710)、橄榄油 (批号 20180508),购于北京百诺威生物科技有限公司;丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 试剂盒均购于长春汇力生物技术有限公司;苏木素-伊红染液购于谷歌生物科技有限公司;层粘连蛋白 (LN)、环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP) ELISA 试剂盒购于武汉优尔生科技股份有限公司;透明质酸酶 (HA) ELISA 试剂盒购于华美生物工程有限公司;人血栓素 B $_2$ (TXB $_2$)、6-酮-前列腺素 F $_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$) 试剂盒均购于北京华英生物技术有限公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;白细胞介素-6 (IL-6)、IL-10 ELISA 试剂盒购于杭州联科生物技术有限公司;三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇均购于国药集团化学试剂有限公司;RNA 提取液、RIPA 裂解液、50 $\times$ cooktail、PMSF (100 mmol/L)、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量检测试剂盒、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、 β -actin 抗体、HRP 标记山羊抗兔二抗、HRP 标记驴抗山羊二抗、HRP 标记山羊抗小鼠二抗、HRP 标记山羊抗大鼠二抗均购于 Servicebio 公司;蛋白 Marker 购于 Therm 公司;PVDF 膜 0.45 μm 购于 Millipore 公司;聚山梨酯 20 购于 Solarbio 公司。磷脂酰肌醇激酶 (PI3k) 抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;蛋白激酶 B (Akt) 抗体购于 Bioss 公司。

1.3 仪器

Chemray 240 全自动生化分析仪购于深圳雷杜生命科学股份有限公司;Epoch 酶标检测仪购于 BioTeK 公司;TL-420D 水浴锅购于姜堰市天力医疗器械厂有限公司;JJ-12J 脱水机、JB-P5 包埋机、JB-L5 冷冻台均购于武汉俊杰电子有限公司;

RM2016 病理切片机购于上海徕卡仪器有限公司; KD-P 组织摊片机购于浙江省金华市科迪仪器设备有限公司; DGX-9003B 烤箱购于上海慧泰仪器制造有限公司; 90i 正置光学显微镜购于日本尼康公司; PL-203 电子天平购于梅特勒-托利多仪器有限公司; Neofuge 15R 台式高速冷冻离心机购于 Heal Force 公司; KH-III 全自动研磨仪购于武汉赛维尔生物科技有限公司; DW-86L626 超低温冰箱购于海尔集团; DYCZ-24DN 双垂直电泳仪、DYCZ-40D 转印电泳仪购于北京六一仪器厂; D3024R 台式高速冷冻型微量离心机购于 DragonLab 公司; 荧光定量 PCR 仪购于 ABI 公司; NanoDrop2000 超微量分光光度计购于 Thermo 公司; JY92-IIIn 超声细胞粉碎机购于宁波新芝生物科技股份有限公司。

2 方法

2.1 药品制备

2.1.1 白芍总苷制备 白芍饮片加水浸泡 1 h, 煎煮提取 2 次, 每次 1.5 h, 加水量 12、10 倍, 合并水煎液, 通过 D-101 型大孔吸附树脂柱 (饮片-大孔树脂 1:1), 70%乙醇洗脱, 收集洗脱液, 回收乙醇, 减压浓缩、干燥, 得白芍总苷提取物 (出膏率 3.45%, 芍药苷质量分数 44.2%)。

2.1.2 一贯煎制备 将一贯煎原方饮片按比例置于煎煮容器内, 加相当于药材量 6 倍的冷水浸泡 2 h, 煮沸 30 min, 滤过。药渣加 3 倍量水继续煎煮, 煮沸 20 min, 滤过, 合并 2 次滤液 (生药质量浓度 0.635 g/mL)。冷却后置 4 °C 冰箱保存备用。

2.1.3 附子、干姜、肉桂温热中药复方制备 取附子、干姜、肉桂配方颗粒, 用前以蒸馏水配制成 1:1:1 的温热中药复方溶液 (1.2 g/mL)。

2.2 分组、模型制备与给药

将雄性 SD 大鼠适应性喂养后, 按体质量随机区组法分为对照组、模型组、阳性药一贯煎组和白芍总苷组, 共 4 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠均 ip 20% CCl₄ 橄榄油溶液, 剂量为 1.5 mL/kg, 每周 2 次 (周一、周四), 连续 6 周, 第 5、6 周开始同时 ig 给予附子、干姜、肉桂温热中药复方制备化学性肝损伤肝阴虚证模型, 1 次/d, 剂量 18 g/kg, 对照组大鼠 ip 等剂量的橄榄油溶液^[9]。造模期间, 对照组、模型组大鼠 ig 给予生理盐水, 阳性药组大鼠 ig 一贯煎水提液 6.35 g/kg, 白芍总苷组大鼠 ig 白芍总苷提取物 3 g/kg (临床一贯煎成人用

量 63.5 g/d^[10], 白芍总苷成人用量 30 g/d^[11], 动物系数按照 7 倍计算, 成人体质量按照 70 kg 计算), 每天 1 次, 连续 6 周。

2.3 样本采集

6 周后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 采用 3 mL/kg 水合氯醛麻醉, 麻醉后腹主动脉取血, 取肝脏组织冻存, 固定, 检测相关指标。

2.4 一般观察

实验 6 周后, 大鼠禁食 12 h, 测量体质量、肛温, 观察其易激惹程度、毛发光泽度、小便颜色、大便颜色质地。具体评分标准参考文献方法^[9-10,12], 要求至少有 2 人观察, 1 人记录, 对于评分标准, 如果出现意见不统一, 则由第 3 人确定, 并记录。

2.5 血清生化指标和酶活性检测

严格按照试剂盒说明书, 应用全自动生化分析仪检测大鼠血清 ALT、AST、6-keto-PGF_{1α}、TXB₂ 水平, 应用酶标仪采用 ELISA 法检测血清 LN、HA、cAMP、cGMP 水平。

2.6 肝脏细胞因子水平检测

严格按照试剂盒说明书, 应用酶标仪采用 ELISA 法检测肝组织匀浆 IL-6、IL-10、TNF-α 水平。

2.7 qRT-PCR 检测肝脏 PI3K、Akt mRNA 表达

大鼠剖腹腹主动脉取血后, 将肝左叶迅速放入冻存管, 在液氮中保存后转移至 -70 °C 冰箱备用。

剪取 100 mg 肝脏组织, 先 Trizol 法提取总 RNA。通过研磨、离心、抽提出总 RNA, 再加入 15 μL 无 RNA 酶的水溶解 RNA, 55 °C 孵育 5 min, 再检测 RNA 浓度及纯度。接着反转录为 cDNA。qRT-PCR 反应体系为 2×qRT-PCR Mix 12.5 μL, 7.5 μmol/L 基因引物 2.0 mL、反转录产物 2.5 μL、ddH₂O 8.0 μL。引物序列见表 1。反应程序为预变性 95 °C、10 min; 95 °C、15 s→60 °C、60 s, 循环 (40 次); 熔解曲线 60 °C→95 °C, 每 15 秒升温 0.3 °C。以 2^{-ΔΔC_t} 法计算目的基因相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列 (5'→3')
GAPDH	正向: CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
	反向: GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT
PI3K	正向: GGTGAGGAACGAAGAATGGC
	反向: TCCGAGGCAAGACAGGGATA
Akt	正向: TGAGACCGACACCAGGTATTTTG
	反向: GCTGAGTAGGAGAAGTGGGGAAA

2.8 Western blotting 检测肝脏 PI3K、Akt 蛋白表达

取肝脏组织, PBS 洗涤 2~3 次, 加入蛋白酶抑制剂, 匀浆。冰浴 30 min 待裂解充分。12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 即为总蛋白溶液。采用 BCA 法测蛋白浓度。蛋白按 4:1 加入 5×蛋白上样缓冲液, 沸水浴变性 15 min。冷却后, 将样品加入电泳孔中, 浓缩胶电压 75 V, 分离胶电压 120 V 进行 SDS-PAGE 电泳。将蛋白湿法转至 PVDF 膜, 将转好的膜于室温下脱色, 使用 5%脱脂奶粉 (0.5% TBST 配制), 放于摇床上封闭 1 h。加入一抗, 4 ℃ 孵育过夜, 加入 TBST 于室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 5 min。加入二抗室温孵育 30 min, 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 5 min。ECL 显影后将胶片进行扫描存档, PhotoShop 整理去色, Alpha 软件处理系统分析目标带的灰度值, 以 β -actin 为内参计算蛋白相对表达量。

2.9 肝脏病理切片观察

用 HE 法染色肝脏组织, 切片, 观察肝脏的病理变化。

2.10 统计方法

所有数据经 SAS 9.2 统计软件进行分析, 计算结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较方差齐采用 LSD 法, 方差不齐采用非参数检验。

3 结果

3.1 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠证候评分和肛温的影响

经过评分可见, 与对照组比较, 模型组大鼠精神状态、毛发、小便评分显著升高, 大便评分显著降低 ($P < 0.05$)。模型组大鼠符合其一般情况中描述的狂躁易激惹, 活动多, 抓时有叫声, ig 给药时反抗剧烈, 毛发干枯无光泽, 大便干、质地硬, 小便色深黄的特征。与模型组比较, 一贯煎组和白芍总苷组大鼠各项指标有明显改善 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组比较, 模型组大鼠肛温显著升高 ($P < 0.001$), 与模型组比较, 一贯煎组、白芍总苷组大鼠肛温显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), 见表 2。

表 2 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠证候评分和肛温的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on syndrome score and anal temperature in rats with liver yin deficiency syndrome due to chemical liver injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	证候评分				肛温/℃
		精神状态	毛发	大便	小便	
对照	—	1.75 ± 0.88	1.50 ± 0.53	1.87 ± 0.35	1.75 ± 0.46	33.78 ± 1.13
模型	—	2.50 ± 0.67 [#]	2.33 ± 0.88 [#]	1.25 ± 0.45 [#]	2.58 ± 0.51 [#]	35.97 ± 1.16 ^{###}
一贯煎	6.35	1.41 ± 0.79	1.66 ± 0.65 [*]	1.91 ± 0.66 [*]	2.08 ± 0.90	34.80 ± 0.93 [*]
白芍总苷	3.00	1.83 ± 0.83 [*]	1.33 ± 0.49 ^{**}	2.00 ± 0.85 ^{**}	1.91 ± 0.66 [*]	34.58 ± 0.73 ^{***}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 表 3 同

[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as table 3

3.2 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠体质量的影响

与对照组比较, 模型组大鼠体质量显著下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 白芍总苷组大鼠体质量显著升高 ($P < 0.05$), 一贯煎组大鼠体质量升高, 但无显著差异, 见表 3。

3.3 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠血清 ALT、AST、LN、HA 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 ALT、AST、LN、HA 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与模型组比较, 一贯煎组大鼠 ALT、AST、LN 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 白芍总苷组大鼠 ALT、AST、

表 3 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on body weight of rats with liver yin deficiency syndrome due to chemical liver injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g
对照	—	460.42 ± 21.54
模型	—	428.91 ± 23.29 [#]
一贯煎	6.35	432.60 ± 19.92
白芍总苷	3.00	451.00 ± 23.00 [*]

LN、HA 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。见表 4。

表 4 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠血清 ALT、AST、LN、HA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effects of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on serum ALT, AST, LN and HA levels in rats with liver *yin* deficiency syndrome due to chemical liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	LN/(ng·mL ⁻¹)	HA/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	37.49 ± 5.13	119.30 ± 17.60	476.90 ± 140.79	2.00 ± 0.35
模型	—	99.63 ± 18.95 ^{###}	271.27 ± 67.44 ^{###}	674.21 ± 135.12 ^{##}	2.91 ± 0.76 ^{##}
一贯煎	6.35	34.50 ± 6.40 ^{**}	96.75 ± 24.11 ^{**}	237.30 ± 117.21 ^{***}	2.48 ± 0.69
白芍总苷	3.00	39.06 ± 12.19 ^{***}	120.98 ± 25.60 ^{**}	239.77 ± 74.83 ^{***}	2.22 ± 0.34 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 表 5 同^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as table 5

3.4 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠血清 cAMP、cGMP 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 cAMP 水平显著升高 ($P < 0.05$), cAMP/cGMP 显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 一贯煎组和白芍总苷组大鼠血清 cAMP 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 各组 cGMP 含量无显著变化, 白芍总苷组 cAMP/cGMP 显著降低 ($P < 0.01$), 见图 1。

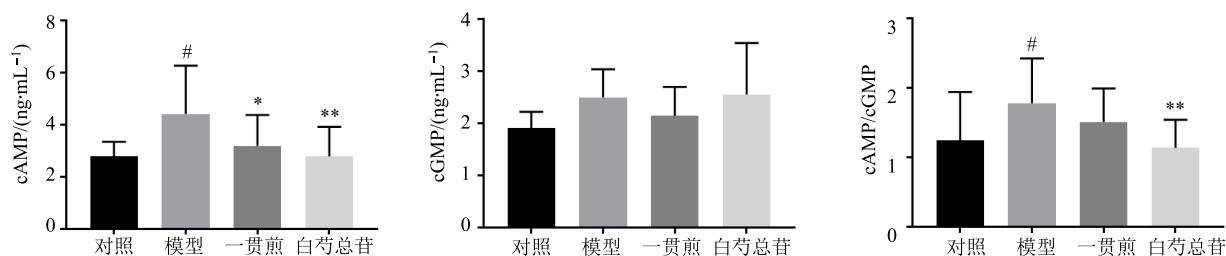
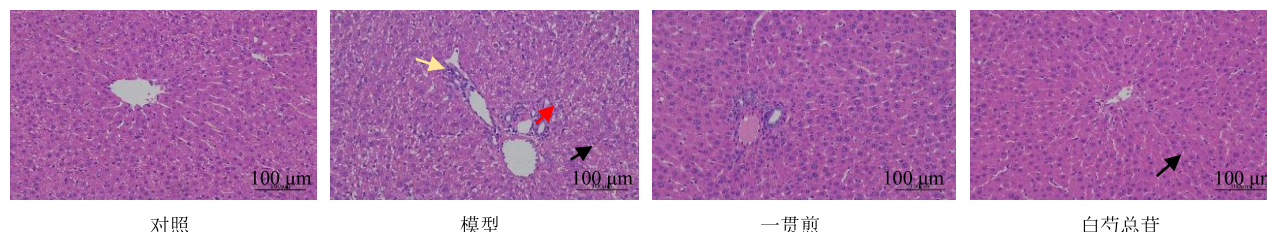
3.5 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠肝脏病理学的影响

对照组大鼠肝脏 HE 病理切片肝细胞无变性坏死, 肝板排列整齐, 汇管区结构完整。模型组大鼠

的肝脏 HE 病理切片显示较多肝细胞出现脂肪变性, 胞质内可见微小的圆形脂肪空泡 (黑色箭头); 局部可见肝细胞灶性坏死, 胞核碎裂溶解, 胞质分界不清, 嗜酸性增强, 呈均质状 (红色箭头), 并伴有少量粒细胞等炎性细胞浸润 (黄色箭头)。阳性药组大鼠未见其他明显异常。白芍总苷组大鼠广泛可见肝细胞胞质疏松, 并伴有脂肪变性, 胞质内可见微小的圆形脂肪空泡 (黑色箭头), 未见其他明显异常。具体见图 2。

3.6 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠肝脏 IL-6、IL-10、TNF- α 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肝脏中 TNF- α 、IL-6

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ [#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group图 1 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠血清 cAMP、cGMP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 1 Effect of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on serum cAMP and cGMP levels in rats with liver *yin* deficiency syndrome due to chemical liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

对照

模型

一贯煎

白芍总苷

图 2 各组大鼠肝脏 HE 染色病理切片 (×200)

Fig. 2 HE staining pathological section of rat liver in each group (×200)

水平显著升高 ($P < 0.05$), IL-10 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 一贯煎组大鼠肝脏中 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$), IL-10 水平显著升高 ($P < 0.01$), 白芍总苷组大鼠肝脏中 TNF- α 、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.001$), 见图 3。

3.7 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠血清 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 TXB₂ 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 白芍总苷组血清中的 TXB₂ 显著下降 ($P < 0.01$)。各组大鼠血清

6-keto-PGF_{1 α} 水平差异不显著, 见表 5。

3.8 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠肝组织 PI3K-Akt 通路 mRNA 及蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肝组织中 PI3K、Akt mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001)。与模型组比较, 一贯煎组大鼠肝组织中 Akt mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$), 白芍总苷组大鼠肝组织中 PI3K、Akt mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001), Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见表 6 和图 4。

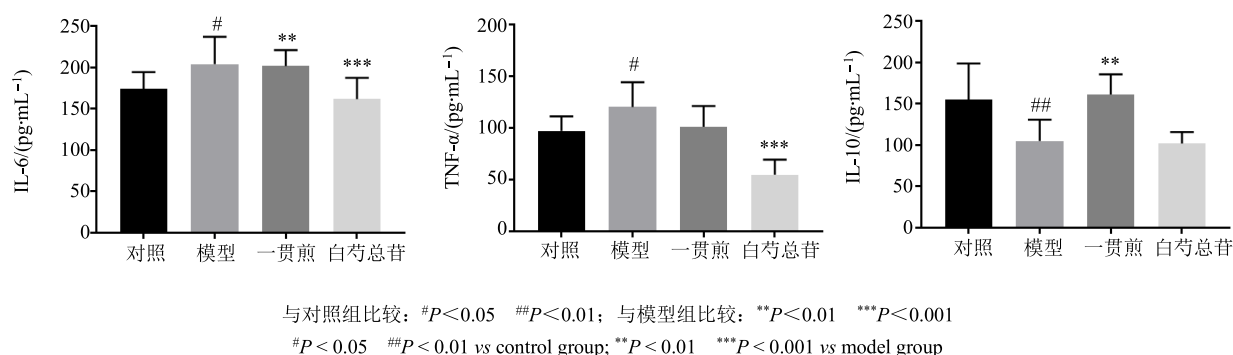


图 3 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠肝脏 IL-6、IL-10、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on IL-6, IL-10 and TNF- α levels in liver of rats with liver yin deficiency syndrome due to chemical liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 5 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠血清 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on serum TXB₂ and 6-keto-PGF_{1 α} levels in rats with liver yin deficiency syndrome due to chemical liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	TXB ₂ /(pg·mL ⁻¹)	6-keto-PGF _{1α} / (pg·mL ⁻¹)
对照	—	99.12 ± 20.65	109.91 ± 37.21
模型	—	125.88 ± 22.18 ^{##}	107.68 ± 28.15
一贯煎	6.35	113.96 ± 21.29	98.81 ± 35.43
白芍总苷	3.00	96.96 ± 20.89 ^{**}	98.06 ± 31.04

表 6 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠肝组织 PI3K-Akt 通路 mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effects of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on PI3K-Akt pathway mRNA and protein expression in liver tissue of rats with liver yin deficiency syndrome due to chemical liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		蛋白相对表达量	
		PI3K	Akt	PI3K	Akt
对照	—	1.04 ± 0.17	2.46 ± 2.23	0.33 ± 0.16	0.18 ± 0.45
模型	—	1.44 ± 0.25 [#]	9.55 ± 0.88 ^{###}	0.91 ± 0.18 [#]	1.84 ± 0.29 [#]
一贯煎	6.35	1.25 ± 0.06	2.96 ± 1.47 ^{***}	0.60 ± 0.30	1.46 ± 0.31
白芍总苷	3.00	1.22 ± 0.12 [*]	4.06 ± 1.96 ^{***}	0.58 ± 0.32	1.08 ± 0.50 [*]

与对照组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

$P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group

4 讨论

中医学认为, 肝为刚脏, 体阴而用阳, 若药毒、酒毒、化学及环境毒物等因素侵袭肝脏, 毒性燥烈, 首先耗损肝阴, 就会导致肝脏阴阳失衡, 出现一系列病理改变。CCl₄ 具有肝毒性, 能较好地反映肝脏损伤后肝细胞形态学变化, 是化学性肝损伤常用的造模化学试剂^[13]。中医理论认为温热中药易耗损人体阴津, 故本研究参考文献方法^[9,14-15], 在 CCl₄ 诱导肝损伤的基础上, 结合附子、干姜、肉桂等温热中药, 制备病证结合的肝损伤肝阴虚证动物模型,

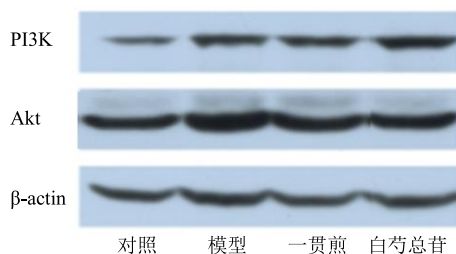


图 4 白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠肝组织 PI3K-Akt 通路蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of total glucosides of *Paeoniae Radix Alba* on PI3K-Akt pathway protein expression in liver tissue of rats with liver *yin* deficiency syndrome due to chemical liver injury

既能够体现中医辨证论治的特色，又能得到西医对疾病明确的病理组织器官变化和诊断评价的支持。

动物模型的证候诊断是建立在人的证候诊断基础上的，虽然动物和人存在很大差异，但是经过大量研究发现，动物的大量症状和体征变化，在一定程度上反映了其证候类型，这些外在表征可以作为证候模型评价的重要指标群^[16-19]。对于阴虚证候的诊断，既往研究主要从皮毛光泽度、行动迟缓程度、体质量（相当于形体消瘦）、体温（相当于身热）、舌的红色程度（相当于五心烦热）、汗出（相当于盗汗）、饮水饮食、大便、小便、烦躁易怒等方面进行判断^[20-22]。本研究参考文献方法，根据肝损伤肝阴虚证的临床表现，选择精神状态、毛发光泽度、大便（反映津液损伤情况）、小便（反映津液损伤情况）、体质量（相当于形体消瘦）、肛温（相当于身热）6 项指标作为判断大鼠阴虚证的证候表征，并设计符合证型特点的评判量表。

美国生物学家 Goldberg 在 1973 年提出细胞功能调节的“阴阳学说”，认为 cAMP 与 cGMP 通常呈拮抗性共同参与细胞反应的调节，认为这种拮抗性调节作用可以用中医“阴”和“阳”来概括。此后的大量研究也得出了支持这一学说的实验结果，测定血浆 cAMP、cGMP 水平及其比值，可以作为帮助判断阴虚、阳虚的客观指标，从而可能对临床中的辨证有一定参考价值^[23]。多数研究结论认为 cAMP/cGMP 升高说明机体处于一种阴虚状态^[24]。申维玺等^[25]提出阴虚证的本质是细胞因子网络失衡（致炎因子 IL-6、TNF- α 等和抗炎因子 IL-10 等），并用现代医学理论阐明了细胞因子紊乱所引起的中医证候相关症状。所以本研究采用证候表征量表、

cAMP/cGMP、细胞因子系统及肝功能等作为判断肝损伤肝阴虚证的综合指标系统。同时以治疗肝阴虚证的代表方一贯煎为对照，“以方测证”佐证该肝阴虚证病证结合大鼠模型的合理性^[26]。

本实验结果显示，模型组大鼠体质量显著减轻、毛发无光泽评分高、大便干硬程度评分高、小便颜色深黄、肛门温度明显升高，提示模型大鼠出现阴虚症状和体征；同时 cAMP/cGMP 升高，炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平显著升高，IL-10 水平显著降低，并且肝阴虚证肝脏的定位症状血清 ALT 和 AST 水平显著升高，肝纤维化因子 LN、HA 水平显著升高。此符合化学性肝损伤肝阴虚证大鼠模型评价标准，可认为成功制备了化学性肝损伤肝阴虚证候大鼠模型。

在本研究中，白芍总苷可显著增加模型大鼠的体质量，降低阴虚证候表征评分、cAMP/cGMP 和炎症因子水平及血清 ALT、AST 水平，降低肝组织 LN、HA 水平，改善肝脏病理改变，说明白芍总苷可以改善模型大鼠的阴虚状态，调节细胞功能与代谢紊乱，减缓肝纤维化进程，对肝损伤肝阴虚证模型大鼠具有一定的保护作用。

另外，马雪柏等^[27]研究揭示了肝阴虚证与微循环瘀证共存的客观现象，发现肝阴虚证与微循环障碍之间有着密切关系。同时有研究显示，肝阴虚患者存在 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 水平显著降低，TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 值显著增高的情况^[28]。本研究结果显示模型组大鼠 TXB₂ 水平升高，可能存在微循环障碍的情况，白芍总苷通过显著降低 TXB₂ 水平，减轻血小板聚集作用，减轻微循环障碍。

PI3K-Akt 信号通路可以通过调节关键的炎症细胞因子活化免疫细胞，调控炎症反应的强度，是调控 2 类细胞因子（致炎细胞因子-抗炎细胞因子）平衡的主要信号通路。PI3K 主要存在于细胞质内，其包括 3 个亚型，分别为 I、II、III 型^[29]。其上游可由多种信号因子激活。Akt 主要存在于细胞浆中，是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，是 PI3K 的下游分子^[30]。相关研究显示中药可通过抑制 PI3K-Akt 信号通路的激活，降低脂多糖（LPS）诱导的心肌细胞炎症反应（IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平）^[31]，以及在炎症反应中，可抑制 PI3K 信号通路，调节 IL-6 分泌，减少促炎因子的释放和增加抗炎因子 IL-10 的分泌^[32]。本实验结果显示白芍总苷可减少 PI3K-Akt 信号通路 mRNA 和蛋白表达，抑制该通路的激活，减轻化学性肝阴虚证致炎因子 IL-6、TNF- α 的释放，增加

IL-10 的分泌。

综上所述,白芍总苷可发挥保护化学性肝损伤肝阴虚证大鼠模型的作用,这可能是白芍养肝阴功效特点的物质基础。白芍总苷可通过改善微循环障碍、抑制 PI3K-Akt 通路来调节细胞因子紊乱,使细胞功能与代谢恢复平衡,发挥保护化学性肝损伤肝阴虚证的作用。

参考文献

- [1] 石林阶, 欧阳取长. 肝阴虚证研究概况 [J]. 湖南中医学院学报, 1997, 17(4): 70-73.
- [2] 宛瑞杰, 刘慧敏, 王宪波. 病证结合治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的疗效观察 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2012, 22(5): 259-262.
- [3] 陶庆, 孙明瑜, 冯琴, 等. 基于以方测证的四氯化碳所致大鼠肝纤维化模型的证型探讨 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(3): 246-250.
- [4] 刘萍. 芍药、白芍、赤芍的历代本草考证浅析 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5662-5665.
- [5] 朱映黎, 张建军, 黄银峰, 等. 白芍和赤芍对环磷酰胺致血虚小鼠的补血作用及对 IL-3、TNF- α 影响的比较研究 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(4): 1058-1060.
- [6] 李瑞麟, 马勇, 魏伟, 等. 白芍总苷治疗四氯化碳致大鼠肝纤维化的作用与其影响肝星状细胞功能的关系 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(9): 685-689.
- [7] 杨以琳, 郑琳颖, 古伟明, 等. 白芍总苷对非酒精性脂肪性肝病大鼠 HMGB1、RAGE 通路的调控作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(6): 611-616.
- [8] 左志燕, 詹淑玉, 黄嫒, 等. 白芍总苷保肝作用的药动学和药效学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(20): 3860-3865.
- [9] 欧阳取长, 石林阶. 肝阴虚证大鼠模型的初步研究 [J]. 湖南中医学院学报, 1999, 19(2): 26-28.
- [10] 刘文兰, 油红捷, 赵青舟, 等. 肝纤维化大鼠阴虚证表征的观察及一贯煎的干预作用 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(7): 7-10.
- [11] 中国药典 [S]. 2015.
- [12] 吴晏, 韩静, 黄黎明, 等. 糖尿病模型大鼠表征及其证候动态演变研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(11): 2279-2283.
- [13] Abdel-Moneim A M, Al-Kahtani M A, El-Kersh M A, *et al.* Free radical-scavenging, anti-inflammatory/anti-fibrotic and hepatoprotective actions of taurine and silymarin against CCl₄ induced rat liver damage [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e144509.
- [14] 刘中景. 中西医结合药理学 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2013.
- [15] 樊蔚虹, 岳广欣, 李素香, 等. 长期激怒致肝肾阴虚证动物模型研制 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(9): 67-69.
- [16] 林志健, 张冰, 刘小青, 等. 中医证候动物模型评价研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(8): 2217-2221.
- [17] 李晓红, 杨力强. 中医证候动物模型研究述评 [J]. 广西中医学院学报, 2012, 15(18): 78-80.
- [18] 魏盛, 孙鹏, 张惠云. 证候动物模型质量考核的思路与方法 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(10): 2607-2610.
- [19] 张建军, 李艳霞, 王景霞, 等. 辐照结合束缚应激致血虚肝郁大鼠证候模型的建立 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2176-2179.
- [20] 陆宁, 董晶, 史国军, 等. 荷 H22 肝癌阴虚证小鼠病证结合动物模型的研制 [J]. 中国中医药科技, 2012, 19(6): 481-482.
- [21] 卢文丽, 方肇勤, 潘志强, 等. 小鼠气、血、阴、阳、虚等八种模型四诊的比较和评价 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(6): 433-4382.
- [22] 林昌松, 李宁, 徐强, 等. 知柏养阴汤对阴虚模型大鼠脂代谢的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2404-2405.
- [23] 马露, 王俊峰. 基于 cAMP、cGMP 分布和比值探析六经辨证阴阳量化指标 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(27): 4-6.
- [24] 王萍, 王喜军. 肾阴虚证动物模型研究概况 [J]. 中医药信息, 2013, 30(4): 123-125.
- [25] 申维玺, 孙燕, 刘晓燕, 等. 用现代医学理论阐明阴虚证的本质和发病学机理 [J]. 医学与哲学, 2005, 26(13): 67-69.
- [26] 黄兆胜, 赵珍东. 名方一贯煎研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2003, 14(2): 111-113.
- [27] 马雪柏, 毛春林, 张敏. 微循环障碍与肝阴虚证相互关系的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(1): 47-49.
- [28] 石林阶, 陈昌华, 陈国林, 等. 肝阴虚证患者血浆血栓素 A₂、前列环素 I₂ 水平研究 [J]. 湖南中医学院学报, 2001, 21(2): 9-10.
- [29] Engelman J A, Luo J, Cantley L C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism [J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(8): 606-619.
- [30] Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, *et al.* Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for development, homeostasis, and cancer [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17(1): 615-675.
- [31] 朱志扬, 葛然, 杨露露. 人参皂苷 Rb₁ 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路保护脂多糖诱导的心肌细胞炎症反应 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(7): 823-826.
- [32] 嵇莹莹, 龚国清. PI3K/Akt/mTOR 通路在炎症相关疾病中分子机制研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(4): 226-229.