

## 川产道地药材蓬莪术醋制入肝调控“肠-肝轴”的增效机制研究

高天慧, 林丽婷, 陈元惠, 徐李缘, 卿莹, 郭亭君, 廖婉\*

成都中医药大学, 西南特色中药资源国家重点实验室, 药学院/现代中药产业学院, 四川 成都 611137

**摘要:**目的 基于“肠-肝轴”学说,从“肝保护”及“肠屏障”角度表征蓬莪术醋制后对肝、肠的调节效应,揭示蓬莪术醋制增效机制。方法 将昆明小鼠随机分为对照组、模型组、阳性药(0.06 g/kg)组及蓬莪术生、醋品水煎液高、中、低剂量(3、2、1 g/kg)组,各组ig给药(10 mL/kg),1次/d,连续给药4 d。末次给药1 h后,除对照组外,其余各组小鼠ip硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA, 100 mg/kg)建立肝损伤模型。测定小鼠肝脏指数;采用试剂盒检测血清中天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)水平,检测肝脏组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 $\beta$ 、IL-10以及肠道IL-17A和分泌型免疫球蛋白A(secretory immunoglobulin A, sIgA)的含量;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肝脏及回肠组织形态;免疫组织化学法检测回肠组织紧密连接蛋白1(zonula occludens proteins-1, ZO-1)、咬合蛋白(occludin)的表达;16S rDNA基因测序分析小鼠肠道菌群变化;Western blotting检测Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MYD88)及核因子- $\kappa$ B-p65(nuclear factor kappa-B-p65, NF- $\kappa$ B-p65)蛋白的表达。结果 蓬莪术醋制前后均可改善肝损伤小鼠的肝脏炎症细胞浸润、肝细胞肿胀变大等变化,且醋制后显著降低肝脏指数、ALT、AST及MDA水平( $P<0.05$ 、 $0.001$ ),显著升高SOD水平( $P<0.001$ );蓬莪术醋制前后均可缓解肝损伤小鼠回肠绒毛萎缩、上皮细胞紧密连接间隙增宽等变化,且醋制后显著升高occludin的蛋白表达( $P<0.05$ ),显著逆转由肝损伤引起的厚壁菌门丰度升高( $P<0.05$ )、拟杆菌门丰度的降低( $P<0.05$ )以及厚壁菌门与拟杆菌门比值的升高( $P<0.05$ );蓬莪术醋制前后均可升高肝损伤小鼠回肠内IL-17A( $P<0.01$ )和sIgA水平( $P<0.001$ ),降低TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平( $P<0.05$ ),同时抑制TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B通路上关键蛋白MyD88、NF- $\kappa$ B-p65和TLR4( $P<0.05$ )的表达,且醋制后显著升高IL-10水平( $P<0.05$ ),降低LPS水平( $P<0.01$ ),抑制TLR4( $P<0.05$ )蛋白表达。结论 蓬莪术醋制后通过保护肠道机械屏障、调节肠道生物屏障、修复肠道免疫屏障,抑制“肠-肝轴”TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B通路,可更好地发挥肝保护作用、改善肝损伤。

**关键词:** 蓬莪术; 醋制入肝; 肠-肝轴; TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B通路; 肠道屏障; 保肝作用; 双去氧基姜黄素; 吉马酮

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0133-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.014

## Synergistic mechanism of *Curcuma phaeocaulis* genuine regional materia medica from Sichuan Province processing with vinegar to invade liver via “gut-liver axis”

GAO Tianhui, LIN Liting, CHEN Yuanhui, XU Liyuan, QING Ying, GUO Tingjun, LIAO Wan

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy/College of Modern Chinese Medicine Industry, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** Based on “gut-liver axis” theory, the regulatory effects of raw and vinegar-processed *Curcuma phaeocaulis* on liver and intestine were studied from the perspectives of “liver protective effect” and “intestinal barrier effect”, in order to study the processing synergistic mechanism of vinegar-processed *C. phaeocaulis* leading into liver. **Method** Kunming mice were randomly divided into the control group, model group, positive group (0.06 g/kg), high-dose, medium-dose and low-dose groups (3, 2, 1 g/kg) of raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* decoction, with 10 mice in each group. Each group was administered intragastrically once

收稿日期: 2024-09-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82274099); 四川省科技厅面上项目(24NSFSC1101); 成都市科学技术局2025年第一批重点研发项目(2024-YF05-01999-SN)

作者简介: 高天慧,女,博士,研究方向为中药制剂新技术、新剂型和炮制研究。E-mail: tianhuigao@stu.cdutcm.edu.cn

\*通信作者: 廖婉,女,博士,教授,硕士生导师,主要从事中药炮制工艺与机制、中药药剂研究。E-mail: liaowan@cdutcm.edu.cn

a day for four consecutive days (10 mL/kg). One hour after administration on the 4th day, except for the control group, all groups were intraperitoneally injected with thioacetamide (TAA) at a dose of 100 mg/kg to establish the liver injury model. The liver wet weight and liver index of mice were detected. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), lipopolysaccharide (LPS) and the contents of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-17A and secretory immunoglobulin A (sIgA) were detected by biochemical kits. The morphology of liver and ileum tissues was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expressions of zonula occludens proteins-1 (ZO-1) and occludin in ileum tissues were detected by immunohistochemistry. 16S rDNA gene sequencing was used to analyze the changes of intestinal flora in mice. The expressions of Toll-like receptor4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and nuclear factor kappa-B-p65 (NF- $\kappa$ B-p65) proteins were detected by Western blotting. **Results** After treatment with *C. phaeocaulis*, the liver inflammatory cell infiltration and swelling of liver cells were improved, and the liver index, ALT, AST and MDA were significantly decreased ( $P < 0.05, 0.001$ ) while SOD was significantly increased ( $P < 0.001$ ) after treatment with vinegar-processed *C. phaeocaulis*. After treatment with *C. phaeocaulis*, the changes of ileum villus atrophy and tight junction gap widening of epithelial cells were alleviated in mice with liver injury, and the expression of occludin ( $P < 0.05$ ) was significantly increased after treatment with vinegar-processed *C. phaeocaulis*. 16S rDNA sequencing analysis showed that vinegar-processed *C. phaeocaulis* could significantly reverse the increase of Firmicutes abundance ( $P < 0.05$ ), the decrease of Bacteroidetes abundance ( $P < 0.05$ ) and the increase of Firmicutes/Bacteroidetes ratio ( $P < 0.05$ ) caused by liver injury. The levels of IL-17A and sIgA were increased ( $P < 0.01, 0.001$ ), and the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 were decreased ( $P < 0.05$ ). The expression of key proteins MyD88, NF- $\kappa$ B-p65 and TLR4 ( $P < 0.05$ ) in the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway were inhibited to varying degrees in all drug administration groups. In vinegar-processed *C. phaeocaulis* groups, the levels of IL-10 were increased ( $P < 0.05$ ), the LPS levels were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the TLR4 protein expression was significantly inhibited ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The vinegar-processing *C. phaeocaulis* can play a better role in liver protection. It can regulate the three intestinal barriers by inhibiting the key pathway TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B of “gut-liver axis”, so as to play the synergistic effect of vinegar-processing *C. phaeocaulis* leading into liver to alleviate liver injury based on “gut-liver axis”.

**Key words:** *Curcuma phaeocaulis* Val.; processing with vinegar to invade liver; gut-liver axis; TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signal pathway; intestinal barrier; hepatoprotective effects; bisdemethoxycurcumin; germacrone

蓬莪术为姜科植物 *Curcuma phaeocaulis* Val. 的干燥根茎<sup>[1]</sup>, 为川产道地药材, 是“破血消癥”要药, 归肝、脾经, 临床常用醋制品。现代研究表明, 中药经醋炮制后对肝的选择性作用增强<sup>[2]</sup>, 蓬莪术经醋炮制后, 可引药入肝, 增破血消癥之效, 然而蓬莪术醋制增效机制尚不明晰。医圣张仲景在《金匱要略》中提出“肝脾同治”的中医经典理论, 认为肝郁犯脾、土虚木乘, 肝脾之病常常互为因果而成肝脾同病之疾。“肝脾同治”亦表现为肝脏与肠道在生理病理上的相关, 形成类似现代医学“肠-肝轴”中发生的病理循环。

多种肝病的早期常常表现为肝损伤症状, 中医学对“肝损伤”无明确记载, 按病因可归属为“胁痛”“癥积”“痞证”“黄疸”等范畴, 病机关键为肝失疏泄、脾失健运, 当以活血化瘀, 肝脾同治为治则<sup>[3]</sup>。蓬莪术具有行气破血, 消积止痛的功效, 被广泛用于临床上防治各类肝脏疾病<sup>[4]</sup>。前期研究发现, 蓬莪术醋制后可改变小肠对其中多种成分的吸收<sup>[5-6]</sup>, 表明醋制后蓬莪术可同时对肝、肠 2 个器官

发挥调节作用。因此, 本研究基于“醋制入肝”理论, 从“肠-肝轴”入手, 通过建立肝损伤动物模型, 观察肠道的改变以表征肝脏病理改善情况, 为蓬莪术醋制增效机制的研究提供一种新思路。

## 1 材料与仪器

### 1.1 动物

SPF 级雄性昆明种小鼠, 90 只, 体质量 (20 ± 2) g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2024-0001。实验动物在湿度 (45 ± 5) %、温度 (21 ± 3) °C 条件下, 适应性饲养 3 d, 期间小鼠自由进食饮水, 手术实验前小鼠禁食 12 h, 自由饮水, 本研究动物实验获得成都中医药大学实验动物福利伦理委员会批准 (批准号 2023071)。

### 1.2 药品与试剂

蓬莪术饮片 (批号 1903041) 购于四川省新荷花中药饮片有限公司, 经溯源采集自四川省成都市双流区舟渡村, 由成都中医药大学标本中心鉴定为姜科植物蓬莪术 *C. phaeocaulis* Val. 的干燥根茎。

丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase,

ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号分别为20230706、20230707)购自深圳雷杜生命科学股份有限公司;总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号分别为20230905、20230908)购自南京建成生物有限公司;紧密连接蛋白(zonula occludens proteins-1, ZO-1)、咬合蛋白(occludin)抗体(批号分别为21773-1-AP、27260-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-10、IL-17 ELISA试剂盒、 $\beta$ -肌动蛋白(beta-actin,  $\beta$ -actin)、Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MYD88)、核因子- $\kappa$ B-p65(nuclear factor kappa-B-p65, NF- $\kappa$ B-p65)抗体(批号分别为RRDC2308003、RRDC2311008、RRDC2311002、RRDC2309001、RRDC2311004、GB15003、GB11519、GB111554、GB11997)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;分泌型免疫球蛋白A分泌型免疫球蛋白A(secretory immunoglobulin A, SIgA)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)ELISA试剂盒(批号分别为202401、YJ180392)购自上海源桔生物科技公司;水飞蓟宾葡甲胺片(批号20220029, 国药准字H43021882)购自湖南千金协力药业有限公司;硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA, 批号2023051601, 质量分数 $\geq$ 99.0%)成都市科隆化学品有限公司。

### 1.3 仪器

Chemray 800型全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技);STP420 ES型快速组织脱水机、Applied Biosystems 9700型PCR仪(美国赛默飞世尔科技公司);G6100型免疫组化笔、SVE-2型电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);PANNORAMICDESK/250型全景切片扫描仪(斯瑞缔数字医疗有限公司);F200型多功能酶标仪(瑞士帝肯集团有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 溶液制备

采用课题组前期蓬莪术醋制专利方法(专利号ZL 2013 1 0400255.2),取蓬莪术生品,按1:5加入9°米醋及3倍量水,浸润3 h后,煮沸,调至文火1 h后取出,120 °C烘制30 min,取出晾干,即

得醋莪术饮片。取生、醋品蓬莪术饮片适量,分别加15倍量水,浸泡30 min,煎煮2次,每次0.5 h,趁热滤过,合并煎液,50 °C减压浓缩,即得质量浓度为1 g/mL(生药量)生、醋品蓬莪术水煎液。经HPLC测定,蓬莪术水煎液中双去甲氧基姜黄素的质量浓度为0.163 mg/mL、吉马酮的质量浓度为0.350 mg/mL;醋蓬莪术水煎液中双去甲氧基姜黄素的质量浓度为0.374 mg/mL、吉马酮的质量浓度为0.259 mg/mL。分别取生、醋品蓬莪术水煎液于量瓶中,用超纯水定容稀释至0.3、0.2、0.1 g/mL质量浓度,超声充分混匀后,备用。精密称取TAA,充分溶解于生理盐水,配制成质量浓度为10 mg/mL的溶液,备用。精密称取水飞蓟宾葡甲胺片,充分溶解于生理盐水,配制成质量浓度为6 mg/mL的溶液,备用。

### 2.2 动物分组、造模及给药

昆明种小鼠随机分为对照组、模型组、水飞蓟宾葡甲胺片(0.06 g/kg)组及蓬莪术生品水煎液高、中、低(3、2、1 g/kg)剂量组和蓬莪术醋品水煎液高、中、低剂量(3、2、1 g/kg)组,每组10只。各给药组ig给药(10 mL/kg),1次/d,连续4 d,对照组和模型组给予等体积生理盐水,每日称定各组小鼠体质量。第4天给药1 h后,除对照组外,其余各组小鼠参照文献<sup>[7]</sup>方法,ip TAA(100 mg/kg)建立肝损伤模型。各组小鼠给药剂量根据《中国药典》2020年版<sup>[1]</sup>中规定的莪术项下“用法与用量”进行换算,并基于前期预实验结果调整后确定。

### 2.3 组织采集及处理

末次给药后,采用应激排便法收集各组小鼠粪便,置于无菌冻存管内,于-80 °C保存备用。末次给药禁食不禁水12 h后,摘眼球取血,静置后于4 °C、3 000 r/min离心20 min,取上清,分装后于-80 °C保存备用。剖取完整肝脏及回肠组织,观察肝脏外观并称定肝脏质量,一部分组织置于4%多聚甲醛固定,剩余部分置于-80 °C保存备用。上述过程严格按照无菌操作,避免污染。

### 2.4 肝脏外观形态与肝脏指数

称定各组小鼠末次体质量,并取出小鼠完整肝脏组织,观察外观形态。以肝脏组织大小、表面颜色、质地、触感、硬度及内部有无细小颗粒等为观察要点,进行记录。称量肝脏质量,计算肝脏指数。

肝脏指数 = 肝脏质量 / 末次体质量

## 2.5 血清肝功能及内毒素指标检测

取血清，按照试剂盒说明书测定 AST、ALT、SOD 和 MDA 含量；ELISA 法检测 LPS 含量。

## 2.6 肝脏炎症因子指标和回肠 IL-17A 和 sIgA 水平检测

取肝脏、回肠组织，加入预冷生理盐水匀浆，取上清。ELISA 法分别检测肝脏、回肠组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10，以及 IL-17A 和 sIgA 含量。

## 2.7 肝脏和回肠组织 HE 染色

取适量小鼠肝脏、回肠组织浸没于 4%多聚甲醛 24 h 后，将固定好的材料取出并修整使切面平整，后采用脱水、包埋、切片、染色等处理方法。最后采用显微镜镜检，并对图像采集分析。

## 2.8 免疫组织化学法检测 occludin 和 ZO-1 蛋白表达

将回肠组织切片进行逐级脱蜡后，进行抗原修复，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；放入 3%双氧水溶液室温避光孵育 25 min 以阻断内源性过氧化物酶，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。免疫组化笔圈出标本后，滴加 3%BSA 均匀覆盖组织，室温封闭 30 min；后分别滴加 occludin、ZO-1 一抗，4  $^{\circ}$ C 孵育过夜；滴加山羊抗兔二抗，室温孵育 50 min 后 PBS 冲洗 3 次；滴加新鲜配制的 DAB 显色液，自来水冲洗切片终止显色。再用苏木素复染 3 min，自来水冲洗，苏木素分化液分化数秒，自来水冲洗，苏木素返蓝液返蓝，自来水冲洗，梯度乙醇脱水以及二甲苯透明后，中性树脂封固。在白光显微镜下观察随机选取视野进行拍照记录。采用基于人工智能学习的 Aipathwell 数字病理图像分析软件，通过循迹、选色、运算、分析的步骤，将每张切片内阳性细胞比率及其染色强度转化为相应的数值，数值越大说明阳性强度越强。

## 2.9 16S rDNA 扩增测序

采用粪便 DNA 提取试剂盒按说明书进行样本 genomic DNA (gDNA) 的提取和纯化，使用 0.8%琼脂糖电泳检测 gDNA 完整性，随后检测核酸浓度。根据测序区域，合成带有索引序列的特异引物对样本的 16S rDNA V4 区域进行扩增，扩增引物序列为 515F (5'-GTGYCAGCMG CCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')；扩增体系为 5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR Buffer for KOD-Plus-Neo, 5  $\mu$ L 2mmol/L dNTPS, 3  $\mu$ L 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 1.5  $\mu$ L U515F, 1.5  $\mu$ L U806R, 1  $\mu$ L 1U/ $\mu$ L

KOD-Plus-Neo, 2  $\mu$ L 模板 DNA, 31  $\mu$ L H<sub>2</sub>O。Illumina PE 250 测序得到有效数据，使用 QIIME2 (2020.2 版) 软件开展后续生物信息学操作，进行操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 分析、基于 OTUs 进行差异物种分析、 $\alpha$  和  $\beta$  多样性、主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA)、线性判别 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 分析。

## 2.10 Western blotting 检测 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B-p65 蛋白的表达

取冻存肝组织，加入裂解液和 PMSF 混合液，充分均浆，离心取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度，配平后放入 -20  $^{\circ}$ C 冻存。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜、封闭、4  $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜，二抗室温孵育 1 h，显影测定灰度值。

## 2.11 统计学分析

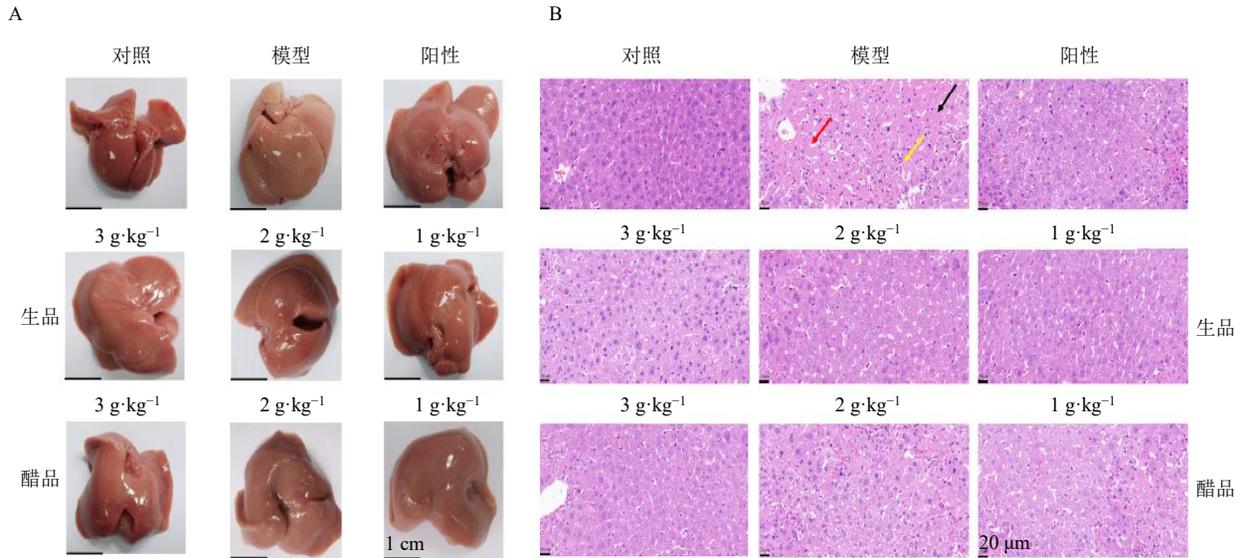
使用 GraphPad Prism 9.4.1 和 SPSS 29.0 软件进行数据统计分析。使用 *t* 检验及方差分析进行组间比较，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

### 3.1 对肝损伤小鼠模型的肝脏保护作用研究

**3.1.1 肝脏外观形态、病理结构观察与肝脏指数的测定** 与对照组比较，模型组小鼠肝脏体积较对照组略增大，颜色变浅，表面粗糙且布满深红色的细小颗粒，病理切片结果显示肝小叶结构受损，肝细胞和肝血窦不规则排列，肝组织可见大量以中央静脉为中心灶性坏死灶，坏死灶中坏死肝细胞胞核碎裂、溶解，伴有大量的炎性细胞浸润，细胞核变形，且胞质嗜酸性增强，肝脏指数显著上升 ( $P < 0.001$ )；与模型组比较，阳性药组及各给药组小鼠肝脏上述病理形态有较明显改善，肝小叶结构较为清晰完整、少见肝细胞肿胀变大、未见明显炎症细胞浸润，蓬莪术醋品水煎液高剂量组小鼠肝脏指数显著降低 ( $P < 0.01$ )；其中，与蓬莪术生品水煎液各组比较，蓬莪术醋品水煎液高剂量组小鼠肝脏切片结果与对照组最为接近，蓬莪术醋品水煎液各组的肝脏指数更趋近于对照组的水平，表现出了更好的改善肝损伤的能力。结果表明，蓬莪术醋制前后水煎液均可缓解 TAA 诱导的小鼠肝损伤外观病理变化，对 TAA 诱导的肝损伤小鼠起到肝保护的作用，且蓬莪术醋制后肝保护的作用更强，见图 1 和表 1。

**3.1.2 血清肝功及肝内抗氧化指标测定** 与对照组比较，模型组的 ALT 和 AST 水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、



A-小鼠肝脏形态图; B-HE 染色病理切片图 (HE, ×100); 黑色箭头代表中心灶性坏死灶; 黄色箭头代表炎性细胞浸润; 红色箭头代表胞质嗜酸性增强。

A-liver morphology map; B-HE stained pathological section (HE, × 100); black arrow represents central focal necrosis; yellow arrow represents inflammatory cell infiltration; red arrow represents cytoplasmic eosinophilic enhancement.

图 1 各组小鼠肝脏形态外观及病理结果比较

Fig. 1 Comparison of liver morphology and histological staining of liver tissues in mice of each group

表 1 对小鼠肝脏指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect on liver index in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	肝脏指数/%
对照	—	4.43 ± 0.21
模型	—	5.98 ± 0.29***
阳性	0.06	5.32 ± 0.24 <sup>#</sup>
蓬莪术生品	3.00	5.82 ± 0.23
	2.00	5.85 ± 0.39
	1.00	5.81 ± 0.51
蓬莪术醋品	3.00	5.22 ± 0.29 <sup>##</sup>
	2.00	5.56 ± 0.42
	1.00	5.74 ± 0.36

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与等剂量蓬莪术生品组比较: <sup>△</sup> $P < 0.01$ , 下同。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.01$  vs equal-dose *C. phaeocaulis* Val. raw product group, same as below.

0.001), SOD 活性显著下降 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 各给药组的 ALT、AST、SOD 和 MDA ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001) 水平均有不同程度的逆转, 且呈剂量相关性。其中, 与等剂量蓬莪术生品水煎液各组比较, 蓬莪术醋品水煎液的 ALT ( $P < 0.05$ )、AST、SOD 及 MDA 与对照组水平更接近, 表现出了对氧化损伤更好的干预能力。结果表明,

蓬莪术醋制前后水煎液均可对 TAA 诱导的肝损伤小鼠起到肝保护作用, 且蓬莪术醋制后抗氧化损伤药效更佳, 见图 2 和表 2。

### 3.2 对肝损伤小鼠模型的肠道机械屏障作用研究

**3.2.1 回肠组织 HE 染色病理学评估** 与对照组比较, 模型组回肠损伤较重, 绒毛萎缩, 缺损断裂, 组织结构被破坏, 上皮细胞紧密连接间隙增宽, 肠上皮细胞坏死脱落, 局部可见炎性细胞浸润, 上皮层与固有层分离。各给药组中, 回肠的损伤均得到了不同程度的缓解, 以蓬莪术醋品水煎液高剂量组的回肠切片结果与正常水平最为趋近。结果表明, 蓬莪术醋制前后水煎液均可改善 TAA 诱导的肝损伤小鼠的回肠病理变化, 其中蓬莪术醋制后改善效果更佳, 对回肠结构具有更好的保护作用, 见图 3。

**3.2.2 免疫组化检测回肠组织 occludin 和 ZO-1 的表达** 与对照组比较, 模型组 occludin 和 ZO-1 ( $P < 0.001$ ) 蛋白表达显著降低。与模型组比较, 各给药组对 occludin 和 ZO-1 ( $P < 0.05$ ) 蛋白表达均有不同程度地升高。与等剂量蓬莪术生品水煎液比较, 蓬莪术醋品水煎液更具升高 occludin 和 ZO-1 蛋白表达的趋势; 其中, 蓬莪术醋品水煎液高剂量组可显著升高 occludin 的蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 表明蓬莪术醋制后对肝损伤小鼠的回肠保护作用更明显, 见图 4。

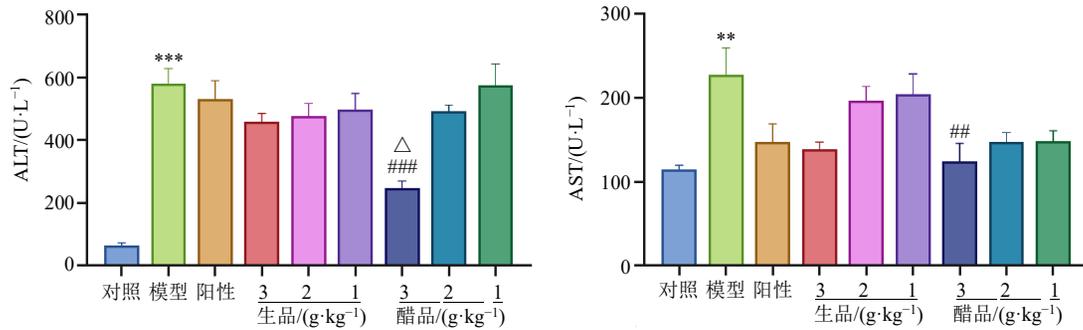


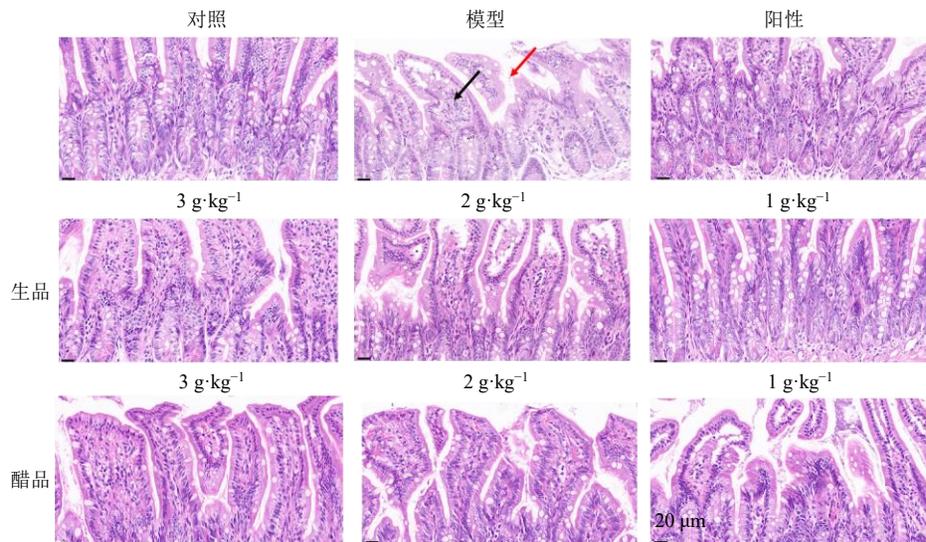
图2 血清中 ALT、AST 表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Expression levels of ALT and AST in serum ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

表2 各组小鼠肝脏中 SOD 及 MDA 的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of *C. phaeocaulis* on levels of SOD and MDA in liver ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	622.75 ± 30.88	7.08 ± 0.84
模型	—	327.84 ± 39.10***	8.40 ± 1.57
阳性	0.06	574.91 ± 43.71###	6.79 ± 0.92
蓬莪术生品	3.00	605.03 ± 30.36###	6.85 ± 0.68
	2.00	589.08 ± 46.03###	7.67 ± 1.30
	1.00	553.53 ± 42.27###	7.92 ± 1.21
蓬莪术醋品	3.00	619.94 ± 54.13###	6.62 ± 1.24#
	2.00	607.28 ± 61.57###	7.49 ± 0.86
	1.00	554.09 ± 70.30###	7.56 ± 0.75



红色箭头代表肠上皮细胞坏死脱落, 黑色箭头代表局部可见炎性细胞浸润。

Red arrow represents necrosis and shedding of intestinal epithelial cells, black arrow represents local inflammatory cell infiltration.

图3 各组小鼠回肠组织 HE 染色病理结果 (HE, ×400)

Fig. 3 Pathological results of HE staining of ileal tissues in mice of each group (HE, ×400)

### 3.3 对肝损伤小鼠模型的肠道生物屏障作用研究

#### 3.3.1 小鼠粪便中菌群群落组成及差异物种分析 比较各组小鼠粪便中门分类水平的细菌比例, 与对

照组比较, 模型组的拟杆菌门丰度显著下降 ( $P < 0.001$ ), 厚壁菌门丰度显著升高 ( $P < 0.001$ ), 厚壁菌门/拟杆菌门比值显著升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组

比较, 各给药组的拟杆菌门丰度 ( $P < 0.01$ ) 和厚壁菌门丰度 ( $P < 0.001$ ) 均有不同程度的逆转, 厚壁菌门/拟杆菌门比值均显著降低 ( $P < 0.001$ ), 且蓬莪

术醋品水煎液各组的拟杆菌门丰度及厚壁菌门丰度与对照组水平更接近, 厚壁菌门/拟杆菌门值降低趋势更明显, 见图 5。

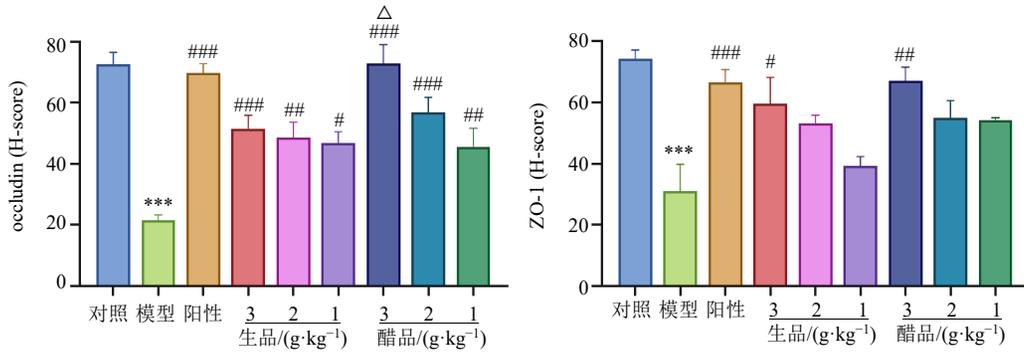
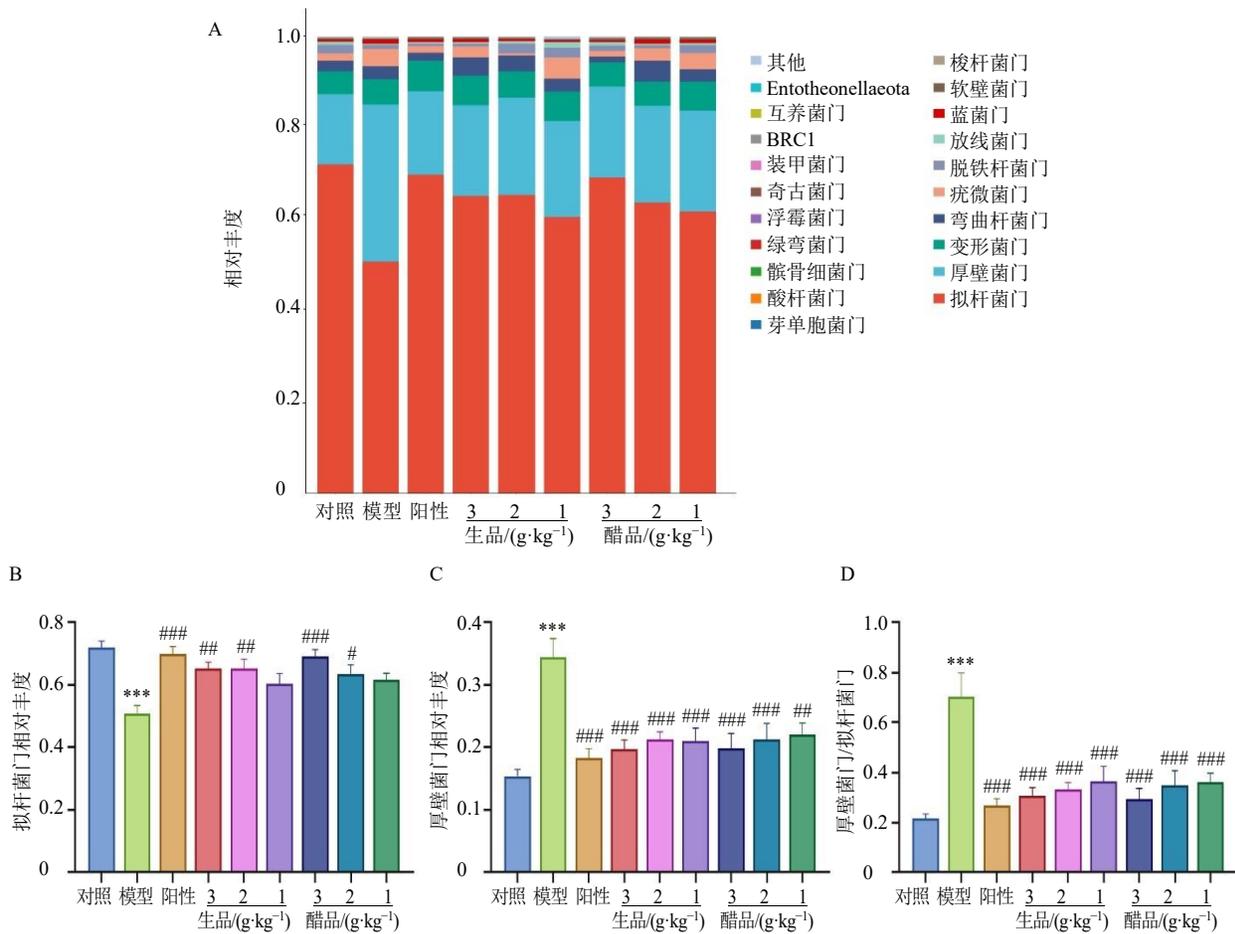


图 4 Occludin 和 ZO-1 在各组回肠黏膜组织中的表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 4 Expression levels of occludin and ZO-1 in ileum ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )



A-各门水平上的堆叠柱状图; B-各组对拟杆菌门相对丰度的影响; C-各组对厚壁菌门相对丰度的影响; D-各组对厚壁菌门/拟杆菌门比值的影响。

A-stacked bar chart at Phylum level; B-effect of each group on relative abundance of Bacteroidetes; C-effect of each group on relative abundance of Firmicutes; D-effect of each group on ratio Firmicutes/Bacteroidetes.

图 5 各组在门水平上的物种组成结构对比

Fig. 5 Effect of each group on relative abundance at Phylum level

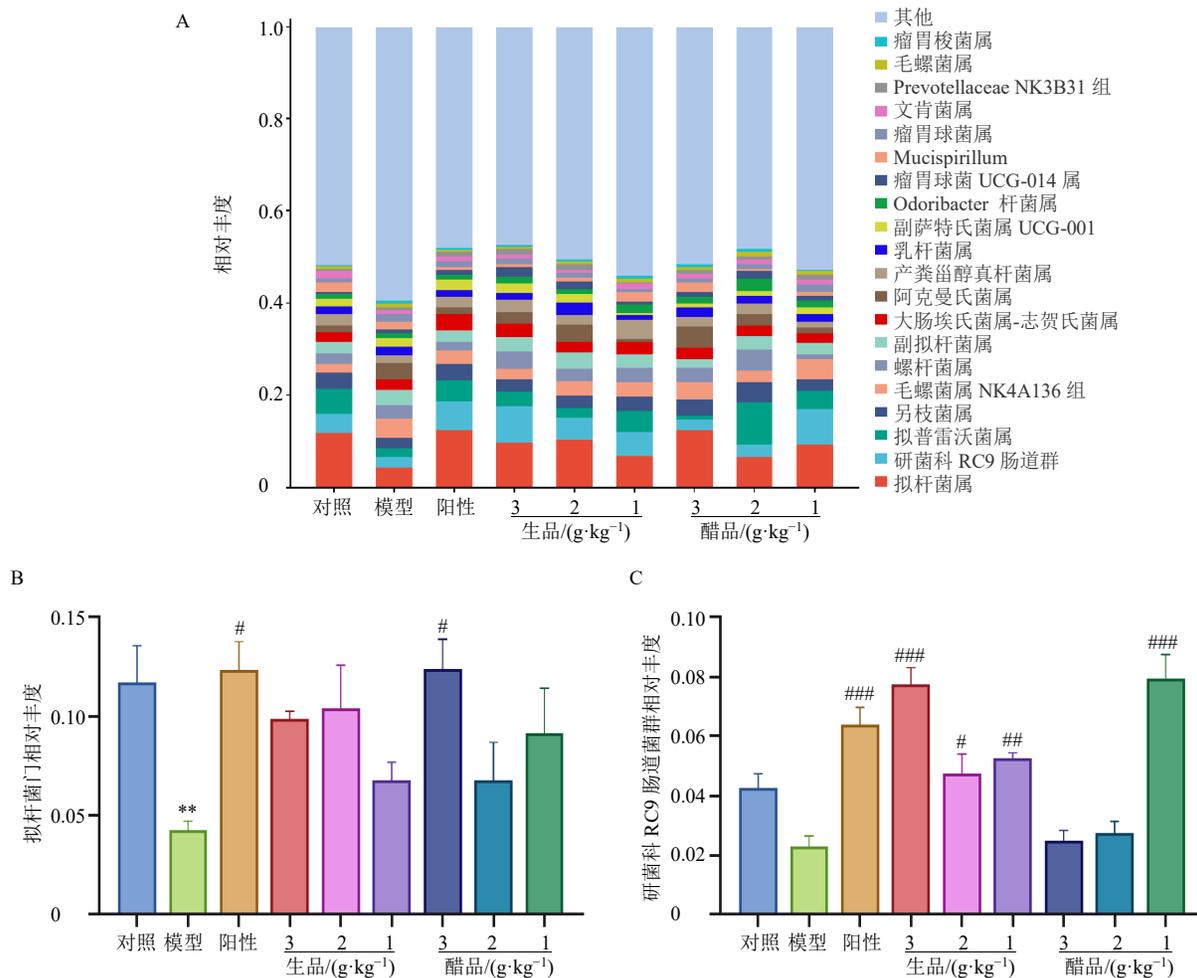
在属水平上,在所有样品中共检测到621个菌属,与对照组比较,模型组的拟杆菌属丰度显著性降低( $P < 0.01$ ),研菌科 RC9 肠道菌群丰度有下降的趋势。与模型组比较,各给药组对拟杆菌属( $P < 0.05$ )和研菌科 RC9 肠道菌群( $P < 0.05$ )的丰度均有不同程度的升高,见图6。

**3.3.2  $\alpha$  及  $\beta$  多样性分析**  $\alpha$  多样性分析可以表征小鼠肠道菌群的丰度、均匀性及多样性。与对照组比较,模型组 Chao1 指数明显下降( $P < 0.05$ ),经过醋制前后蓬莪术水煎液给药后,各组肝损伤模型小鼠肠道菌群物种数量及多样性都有不同程度恢复。 $\beta$  多样性分析可表达不同组别之间的微生物差异。模型组与对照组的置信椭圆可明显区分开,说明两组样本肠道群落组成有较大的差异,小鼠肠道菌群发生了

一定的改变。与模型组比较,各给药组对肠道菌群均产生了调整作用,置信椭圆出现重叠,说明蓬莪术治疗后的各组样本生物多样性相似;另外,各给药组与对照组比较置信椭圆也出现了部分重叠,说明经蓬莪术干预后的肠道菌群组成在向对照组小鼠的正常水平靠近,见图7。

**3.4 蓬莪术醋制对肝损伤小鼠模型的肠道免疫屏障作用研究**

**3.4.1 回肠组织中 IL-17A 和 sIgA 水平的测定** 与对照组比较,模型组的 IL-17A ( $P < 0.001$ ) 和 sIgA ( $P < 0.001$ ) 水平显著降低。与模型组比较,各给药组的 IL-17A ( $P < 0.01$ ) 和 sIgA ( $P < 0.001$ ) 表达水平均有不同程度地增加,且呈一定的剂量相关性。如图8所示,与等剂量蓬莪术生品水煎液比较,

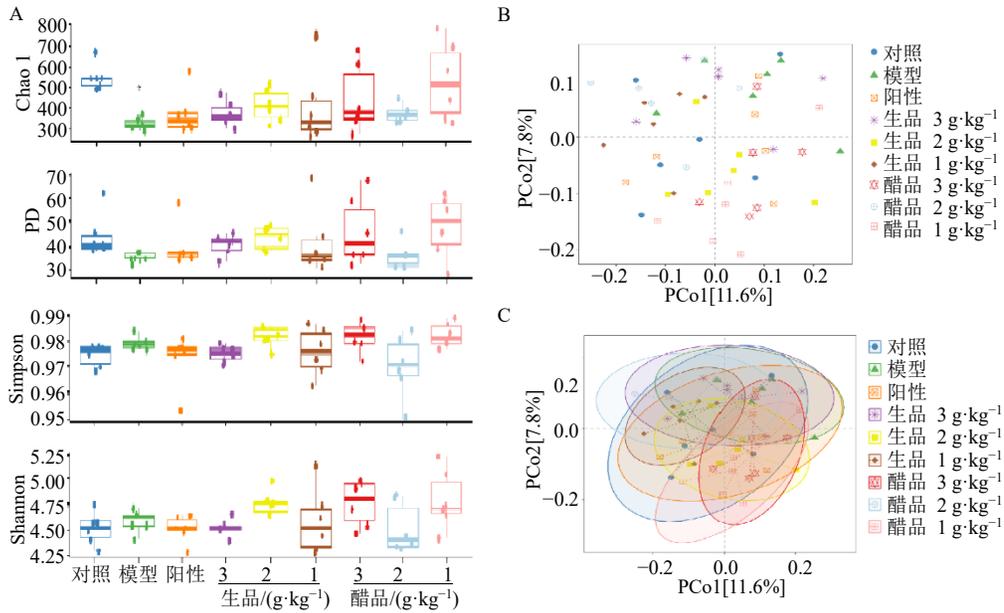


A-各组属水平上的堆叠柱状图; B-各组对拟杆菌属相对丰度的影响; C-各组对研菌科 RC9 肠道菌群相对丰度的影响。

A-stacked bar chart at Genus level; B-effect of each group on relative abundance of Bacteroides; C-effect of each group on relative abundance of Rikenellaceae RC9 gut group.

图6 各组在属水平上的物种组成结构对比图

Fig. 6 Effect of each group on relative abundance at genus level



A-Alpha 多样性指数间差异; B-主坐标分析; C-置信椭圆 PCoA 分析。  
A-boxplot of alpha diversity; B-PCoA analyze; C-PCoA analyze with confidence ellipse.

图 7 Alpha 及 Beta 多样性分析

Fig. 7 Alpha and Beta diversity analysis

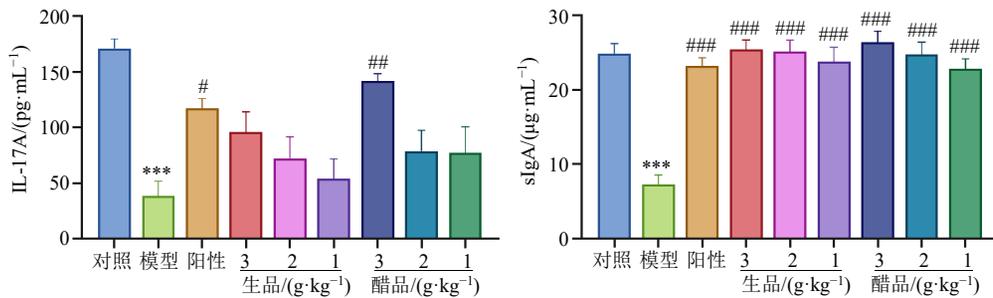


图 8 回肠组织中 IL-17A 和 sIgA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 8 Expression levels of IL-17A and sIgA in ileum ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

蓬莪术醋品水煎液各组 IL-17A 和 sIgA 水平更趋近对照组。结果表明, 蓬莪术醋制前后水煎液可通过恢复回肠中 IL-17A 和 sIgA 的表达而改善肝损伤小鼠的肠道免疫屏障, 且蓬莪术醋制后对保护肠道免疫屏障能力增强。

**3.4.2 肝脏组织内炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 的测定** 与对照组比较, 模型组的小鼠肝脏组织中 TNF- $\alpha$  ( $P < 0.001$ )、IL-1 $\beta$  ( $P < 0.01$ )、IL-6 ( $P < 0.01$ ) 的水平显著升高, IL-10 的水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 各给药组的 TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ )、IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ )、IL-6 ( $P < 0.05$ )、IL-10 表达水平均有逆转, 且呈一定的剂量相关性。与等剂量蓬莪术生品水煎液比较, 蓬莪术醋品水煎液各组的炎性

因子表达结果更趋近于对照组的水平。结果表明, 蓬莪术醋制前后水煎液均可缓解 TAA 诱导的肝损伤小鼠的肝脏炎症反应, 且蓬莪术醋制后抗炎能力增强, 见图 9。

**3.4.3 血清中 LPS 水平的测定** 与对照组比较, 模型组的 LPS 水平显著增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 各给药组均不同程度地降低了 LPS 水平 ( $P < 0.05$ ), 呈剂量相关性。与等剂量蓬莪术生品水煎液比较, 蓬莪术醋品水煎液各组的 LPS 表达结果更趋近于对照组的水平。结果表明, 蓬莪术醋制前后水煎液均可降低 TAA 诱导的肝损伤小鼠血清中 LPS 水平, 且醋制后的降低效果更明显, 见图 10。

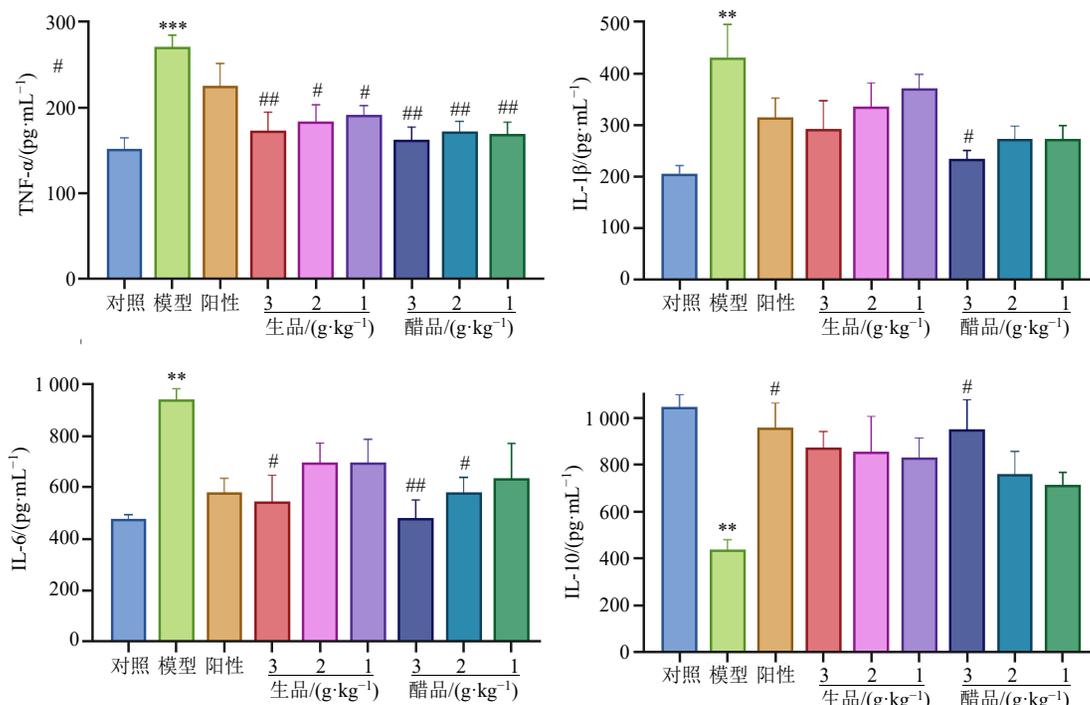


图9 肝脏中 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 的表达水平 (x̄ ± s, n = 10)

Fig. 9 Expression levels of TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 in serum (x̄ ± s, n = 10)

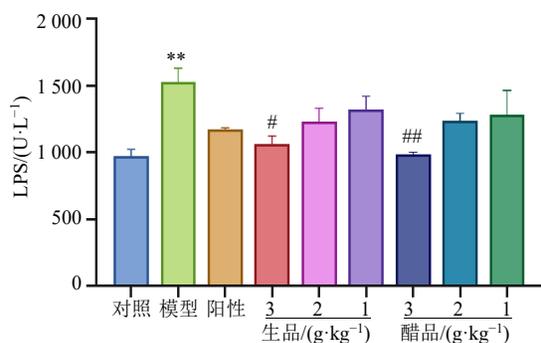


图10 血清中 LPS 表达水平 (x̄ ± s, n = 10)

Fig. 10 Expression levels of LPS in serum (x̄ ± s, n = 10)

**3.4.4 TLR4/MyD88/NF-κB 通路相关蛋白表达的测定** 与对照组比较,模型组肝组织中 MyD88、NF-κB-p65、TLR4 ( $P < 0.01$ ) 蛋白的表达显著升高。与模型组比较,各给药组的 MyD88、NF-κB-p65、TLR4 蛋白的表达量均不同程度降低,且呈剂量相关性。其中,蓬莪术醋品水煎液高剂量组的 TLR4 蛋白表达量显著性降低 ( $P < 0.05$ )。与等剂量蓬莪术生品水煎液比较,蓬莪术醋品水煎液各组的 MyD88、NF-κB-p65、TLR4 蛋白表达更趋近于对照组的正常水平。结果表明,蓬莪术醋制前后水煎液能够抑制

TAA 诱导的肝损伤小鼠中 TLR4/MyD88/NF-κB 通路中关键蛋白 MyD88、NF-κB-p65、TLR4 的表达水平,并且蓬莪术醋制后对 TLR4/MyD88/NF-κB 通路中关键蛋白的抑制能力更强,见图 11。

#### 4 讨论

TAA 是一种典型的肝毒性化合物,进入体内后,可被肝细胞 P450 酶代谢为 TAA-硫氧化物复合物,例如,磺胺-5-甲嘧啶、TAA 硫二氧化物等分子,可以共价结合于肝脏大分子,抑制单核细胞对红细胞的吞噬作用,导致肝脏代谢发生紊乱,导致 LPS 增多,激活肝内单细胞核释放炎症因子,产生大量的自由基和活性氧,触发 NF-κB 转录因子的活化引起一系列的炎症反应,降低酶的活力,造成肝细胞功能紊乱及大量坏死,从而导致肝损伤<sup>[8]</sup>,这与人类急性肝损伤的发病机制相似<sup>[9]</sup>。此外,有研究发现,TAA 在诱导动物急性肝损伤的同时,还会导致动物肠壁黏膜上皮细胞坏死,肠壁黏膜下层充血水肿,黏膜层炎症细胞浸润明显<sup>[10]</sup>,引起胃肠功能紊乱,出现明显的肠道菌群失调,诱发肠源性内毒素血症<sup>[11]</sup>,导致肝损伤进一步加重,是一种典型的伴有胃肠道生物化学、组织结构和功能改变的肝-肠损伤模型。故本研究采用了 TAA 诱导小鼠肝损伤模型,

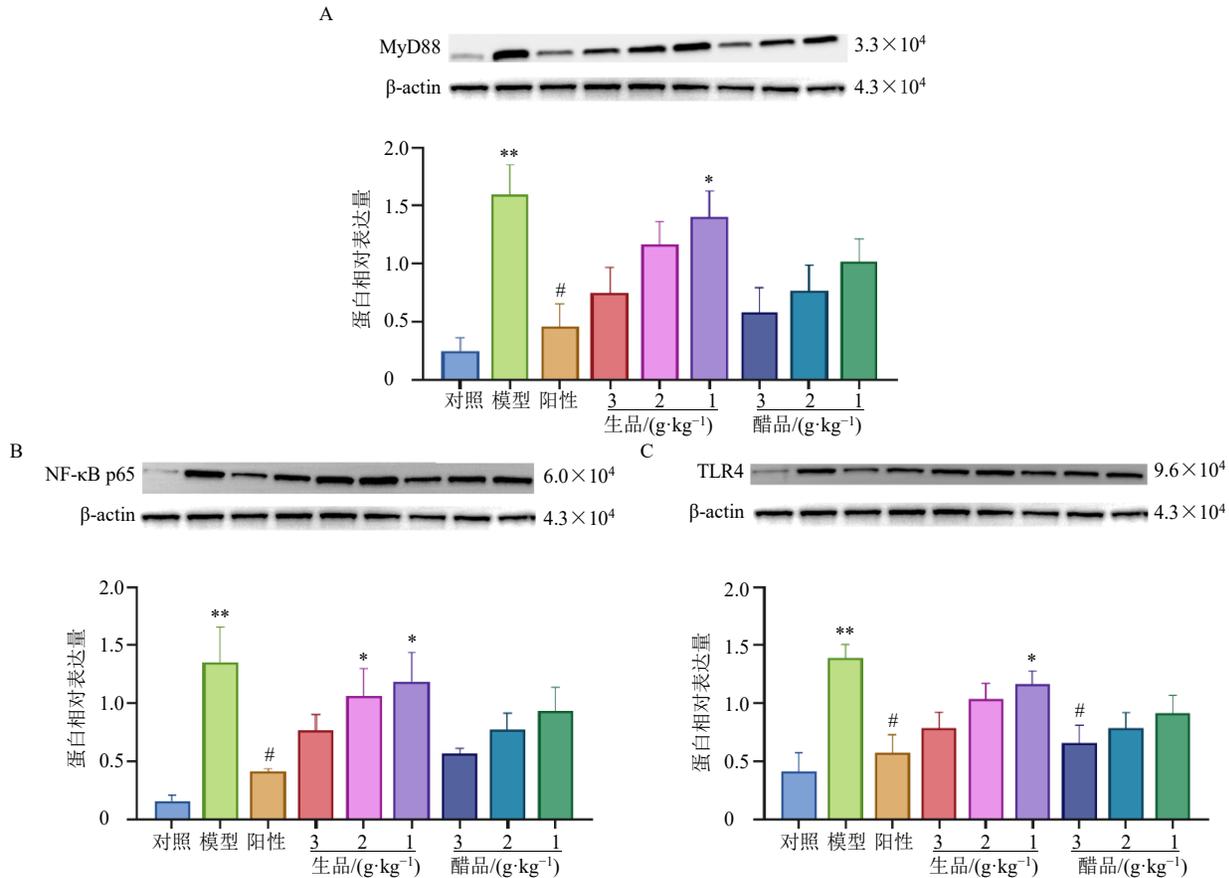


图 11 肝脏中 MyD88 (A)、NF- $\kappa$ B-p65 (B)、TLR4 (C) 的表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
 Fig. 11 Expression levels of MyD88 (A), NF- $\kappa$ B-p65 (B) and TLR4 (C) in live ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

可以从“肠-肝轴”角度同时探寻蓬莪术醋制入肝改善肝损伤的机制研究。

肠道机械屏障是肠黏膜屏障中最重要的“第一道防线”，紧密连接是肠黏膜机械屏障的重要组成部分<sup>[12-13]</sup>，本研究结果表明，蓬莪术醋制后可显著升高 occludin 和 ZO-1 蛋白的表达，增强对回肠结构的保护作用。此外，广义的肠道机械屏障还包括肠动力的功能，课题组前期研究表明，蓬莪术醋制前后对正常小鼠小肠推进和胃排空均有明显促进作用<sup>[14]</sup>，这也再次证明了蓬莪术可以通过增强肠动力而保护肠道机械屏障的完整性。

肠道生物屏障中的肠道菌群失调也在多种肝病的发生、发展中起重要作用<sup>[15]</sup>。拟杆菌门、厚壁菌门属于优势菌群，约占肠道细菌的 90%<sup>[16]</sup>。厚壁菌门/拟杆菌门的值可用于评估是否存在肠道菌群失调<sup>[17]</sup>。结果显示，蓬莪术可在肠道菌群的门分类水平上显著逆转由肝损伤引起的厚壁菌门丰度升高、拟杆菌门丰度的降低，且醋制后蓬莪术还可显

著降低厚壁菌门/拟杆菌门值，使拟杆菌门丰度及厚壁菌门丰度与对照组更接近；在肠道菌群的属分类水平上，蓬莪术醋制前后可不同程度增加拟杆菌属和研菌科 RC9 肠道群丰度，改善小鼠因肝损伤引起体内肠道菌群紊乱的情况；同时蓬莪术醋制后各组均表达出了显著性差异的菌群物种，分别为葡萄球菌属、葡萄球菌科、芽孢杆菌目、螺杆菌科、螺杆菌属、变形菌门、变形菌纲、弯曲杆菌目和穆里巴库鲁姆菌属，表明蓬莪术醋制后可调整肝损伤引起的小鼠肠道菌群物种组成变化；此外，由 Alpha 和 Beta 多样性分析可知，蓬莪术可恢复小鼠体内肠道菌群物种数量及肠道菌群多样性，并且通过调控遗传信息加工、衰老、耐药、抗肿瘤、复制与修复和鞘糖脂生物合成-神经节系列等多条生物通路发挥保护肠道生物屏障的作用。

CD4<sup>+</sup>T 辅助细胞 (T helper cells, Th) 在维持肠道免疫屏障中发挥关键作用，Th17/调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 之间的平衡是维持肠

道免疫稳态的重要基础<sup>[18]</sup>。本研究中, 蓬莪术醋品水煎液高剂量组可显著恢复肝损伤小鼠回肠中 IL-17A 和 sIgA 因子的表达水平, 增强对肝损伤小鼠的肠道免疫屏障的保护能力。此外, 肝脏也具备免疫防御和免疫调节功能<sup>[16]</sup>, 本研究中, 蓬莪术醋品水煎液高剂量组可显著减少肝损伤小鼠肝脏组织内促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量同时显著增加抗炎因子 IL-10, 缓解 TAA 诱导的肝脏炎症反应; 蓬莪术可以显著降低肝损伤小鼠血清中 LPS 含量, 且与等剂量蓬莪术生品水煎液比较, 蓬莪术醋品水煎液各组 LPS 表达结果更趋近于对照组水平; 同时还可抑制 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路上关键蛋白 MyD88、NF- $\kappa$ B-p65 和 TLR4 的表达, 进而减少下游炎症因子释放, 修复肝脏免疫屏障, 进而发挥抗炎活性改善小鼠肝损伤。后续还可继续采用代谢组学、转录组学、蛋白组学等多组学技术, 整合分析蓬莪术醋制前后药效表达模式和分子机制模式, 更深入揭示蓬莪术醋制入肝调控“肠-肝轴”的炮制增效机制。

综上, 蓬莪术醋制后可通过抑制“肠-肝轴”上 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 关键通路, 增强肝保护作用, 调节三大肠道屏障, 发挥其调控“肠-肝轴”改善肝损伤的醋制增效作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 287.
- [2] 彭新, 陈晓辉, 周浩, 等. 中药醋制入肝减毒、增效现代研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9): 190-194.
- [3] 张梦杰, 杨伟丽, 王茜, 等. 中医药治疗药物性肝损伤的用药规律分析 [J]. 中医药临床杂志, 2023, 35(3): 503-509.
- [4] Gao T H, Liao W, Lin L T, *et al.* Curcumae rhizoma and its major constituents against hepatobiliary disease: Pharmacotherapeutic properties and potential clinical applications [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154090.
- [5] 廖婉, 林美斯, 高天慧, 等. 川产道地药材蓬莪术醋制前后挥发油的大鼠肠吸收差异研究 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4232-4237.
- [6] 高天慧, 袁涛, 朱宗萍, 等. 蓬莪术醋制前后总姜黄素的大鼠肠吸收动力学差异比较 [J]. 中成药, 2021, 43(12): 3397-3403.
- [7] 庞敏, 单宇, 王菲菲, 等. 诸葛菜种子水提物对硫代乙酰胺诱导小鼠急性肝损伤的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1399-1405.
- [8] 张悦, 王佳艺, 刘慧敏, 等. 淫羊藿及其制剂主要化学成分与肝损伤作用研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(21): 7213-7221.
- [9] Chen T M, Subeq Y M, Lee R P, *et al.* Single dose intravenous thioacetamide administration as a model of acute liver damage in rats [J]. *Int J Exp Pathol*, 2008, 89(4): 223-231.
- [10] 潘巧玲, 刘小静, 叶峰, 等. TAA 致大鼠急性肝衰竭的胃肠功能及病理改变 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2008, 29(1): 66-69.
- [11] 王春妍, 杨世忠, 江海艳. 急性肝损伤大鼠肠源性内毒素血症形成机理及其作用的实验研究 [J]. 临床肝胆病杂志, 2007, 23(2): 109-111.
- [12] Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions [J]. *Nihon Chikusan Gakkaiho*, 2020, 91(1): e13357.
- [13] 谷月, 王育民. 脓毒症相关肠黏膜机械屏障损伤机制的研究进展 [J]. 中国临床研究, 2023, 36(10): 1495-1499.
- [14] 甘彦雄, 赵思蕾, 罗妮妮, 等. 蓬莪术醋制前后“行气破血”功效变化对比研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(2): 29-32.
- [15] Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3): 558-577.
- [16] Gan Y X, Zheng S C, Zhao J Q, *et al.* Protein network module-based identification of key pharmacological pathways of *Curcuma phaeocaulis* Val. acting on hepatitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 221: 10-19.
- [17] Takezawa K, Fujita K, Matsushita M, *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human gut microbiota is associated with prostate enlargement [J]. *Prostate*, 2021, 81(16): 1287-1293.
- [18] 李萧纹, 闫福华, 陈文文, 等. 灌胃牙龈卟啉单胞菌对 2 型糖尿病小鼠结肠机械屏障及免疫屏障影响的研究 [J]. 中国全科医学, 2024, 27(18): 2225-2232.

[责任编辑 罗 曦]