

基于线粒体动力学探究白芍多糖防治肝纤维化肝阴虚证大鼠的作用机制

王瑞博¹, 李 丽¹, 华姑安¹, 邵丹玥¹, 金振辉¹, 董俐琰¹, 林颖焘¹, 贾 岚¹, 李 伟¹, 范晓旭^{1,2*}, 王景霞^{1*}

1. 北京中医药大学, 北京 102488

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 基于线粒体动力学探讨白芍多糖对肝纤维化肝阴虚证大鼠的保护作用及机制。**方法** 雄性 SD 大鼠按照体重随机分为对照组、模型组、水飞蓟宾 (42 mg/kg) 组、知柏地黄丸 (408 mg/kg) 组和白芍多糖低、高剂量 (169、338 mg/kg) 组, 每组 8 只。连续给药干预 6 周, 从给药第 2 周开始, 除对照组外, 其余大鼠采用 ip 20% 四氯化碳橄榄油溶液联合 ig 甲状腺片 (30 mg/kg) 建立肝纤维化肝阴虚证模型。检测大鼠体征评分、体质量、摄食量、摄水量、舌面干湿度和肛温; 采用 ELISA 法检测大鼠血清环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 水平并计算比值; 采用比色法测定血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性及总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和 Masson 染色观察肝脏病理变化及肝纤维化程度; 采用透射电镜观察肝脏线粒体超微结构; 采用免疫荧光法检测肝脏活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 通过试剂盒测定肝脏三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 水平; 采用 Western blotting 检测大鼠肝脏纤连蛋白 1 (fibronectin 1, FN1)、I 型胶原蛋白 (collagen I, COL-I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、p-ERK、p38、p-p38、线粒体裂变蛋白 1 (fission 1, Fis1)、线粒体动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1)、p-Drp1、视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, Opa1) 和线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2) 表达水平。**结果** 与模型组比较, 白芍多糖组大鼠体质量、大便评分、舌面干湿度显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 精神状态评分、毛发评分、小便评分、总体体征评分、肛温、摄食和饮水量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 血清中 cAMP 水平降低且 cGMP 水平升高 ($P < 0.001$), cAMP/cGMP 值显著降低 ($P < 0.001$), 肝功能相关指标均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 肝组织病理损伤有所改善, 胶原纤维面积显著降低 ($P < 0.001$), 肝纤维化蛋白 α -SMA、COL-I 和 FN1 表达水平均明显下降 ($P < 0.01$ 、 0.001), 肝脏线粒体形态结构有所改善, 肝脏 ROS 水平降低且 ATP 水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 肝脏 p-ERK/ERK、p-p38/p38、Fis1 和 p-Drp1/Drp1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), Opa1 和 Mfn2 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。**结论** 白芍多糖对肝纤维化肝阴虚证大鼠具有保护作用, 其作用机制可能与抑制 ERK/p38 MAPK 通路调控线粒体动力学稳态有关。

关键词: 白芍多糖; 肝纤维化; 肝阴虚证; 线粒体动力学; ERK/p38 MAPK 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)17-6820-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.014

Mechanism of *Paeonia lactiflora* polysaccharides in preventing and treating liver fibrosis with liver yin deficiency syndrome in rats based on mitochondrial dynamics

WANG Ruibo¹, LI Li¹, HUA Ji'an¹, SHAO Danyue¹, JIN Zhenhui¹, DONG Lilong¹, LIN Yingtao¹, JIA Lan¹, LI Wei¹, FAN Xiaoxu^{1,2}, WANG Jingxia¹

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

收稿日期: 2026-02-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074036)

作者简介: 王瑞博, 博士研究生, 研究方向为中医基础理论。E-mail: wrbo1005@163.com

*通信作者: 王景霞, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药性理论研究。E-mail: wjx20131210@163.com

范晓旭, 博士, 讲师, 从事中药药性理论研究。E-mail: a15628927603@163.com

Abstract: Objective To study the protective effect and mechanism of *Paeonia lactiflora* polysaccharides on liver fibrosis with liver *yin* deficiency syndrome in rats based on mitochondrial dynamics. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group, model group, silybin (42 mg/kg) group, Zhibai Dihuang Wan (知柏地黄丸, 408 mg/kg) group and *P. lactiflora* polysaccharide low-, high-dose (169, 338 mg/kg) groups, with eight rats in each group. Drugs were continuously intervened for six weeks, starting from the second week of administration, except for the control group, all other rats were treated with an ip 20% carbon tetrachloride olive oil solution combined with ig thyroid tablets (30 mg/kg) to establish a liver fibrosis with liver *yin* deficiency syndrome model. Sign score, body weight, food intake, water intake, tongue surface moisture level and rectal temperature of rats were detected. Levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in serum were measured using ELISA, and ratio was calculated. Activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyl transferase (γ -GT), alkaline phosphatase (ALP) and levels of total bilirubin (TBIL), total bile acids (TBA) in serum were measured using colorimetric assays. Hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining were used to observe the pathological changes and degree of liver fibrosis. Transmission electron microscopy was used to observe mitochondrial ultrastructure in liver. Immunofluorescence was used to detect reactive oxygen species (ROS) level in liver. Adenosine triphosphate (ATP) level was measured to using a kit. Western blotting was used to detect fibronectin 1 (FN1), collagen I (COL-I), α -smooth muscle actin (α -SMA), extracellular regulated protein kinases (ERK), p-ERK, p38, p-p38, fission 1 (Fis1), dynamin-related protein 1 (Drp1), p- Drp1, optic atrophy 1 (Opa1) and mitofusin 2 (Mfn2) protein expression levels in liver of rats. **Results** Compared with model group, the body weight, fecal consistency score and tongue surface moisture of rats in *P. lactiflora* polysaccharides group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while mental state, coat luster, urine score, overall physical condition score, rectal temperature, food and water intake were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), cAMP level was decreased and cGMP level in serum was increased ($P < 0.001$), and cAMP/cGMP value was significantly reduced ($P < 0.001$), liver function related indicators were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), liver tissue pathological damage was improved, the collagen fiber area was significantly reduced ($P < 0.001$), and the expression levels of liver fibrosis proteins α -SMA, COL-I and FN1 were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$), the morphology and structure of mitochondria in liver were improved, ROS level in liver was decreased and ATP level was increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), expression levels of p-ERK/ERK, p-p38/p38, Fis1 and p-Drp1/Drp1 proteins were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while the expression levels of Opa1 and Mfn2 proteins were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** *P. lactiflora* polysaccharides have a protective effect on liver fibrosis in rats with liver *yin* deficiency syndrome, and its mechanism may be related to the inhibition of ERK/p38 MAPK pathway to regulate mitochondrial dynamic homeostasis.

Key words: *Paeonia lactiflora* polysaccharides; liver fibrosis; liver *yin* deficiency syndrome; mitochondrial dynamics; ERK/p38 MAPK pathway

肝纤维化是肝脏对慢性损伤的病理性修复反应，其病理特征为肝脏细胞外基质（extracellular matrix, ECM）弥漫性过度沉积与异常分布。中医对肝脏疾病的治疗具有悠久历史和独特理论体系，能够辨病辨证相结合，标本兼治，在调和脏腑气血、恢复阴阳平衡方面具有显著优势。肝纤维化隶属中医“胁痛”“臌胀”“黄疸”和“积聚”等范畴，临床多表现为多个证型，其中肝阴虚证多见于疾病中后期，对肝损伤疾病的预后和转归有重要意义。

肝纤维化肝阴虚证的基本病机为邪毒内侵，耗损肝阴，肝阴不足，阴阳失衡。中医治疗肝阴虚证以滋阴养肝为主，而白芍具有滋养肝阴、平抑肝阳的功效，为治疗肝阴虚证的常见中药^[1]。白芍中的重要活性成分白芍总苷治疗化学性肝损伤的作用机制已得到广泛阐释。课题组前期研究发现，白芍总苷通过磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-

kinase, PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B, Akt）/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）通路和核因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）/信号转导和转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）通路调控促炎因子和抗炎因子水平，从而发挥对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠的保护作用^[2-3]。白芍总苷对转化生长因子- β 1（transforming growth factor- β 1, TGF- β 1）诱导肝星状细胞（hepatic stellate cells, HSCs）纤维化的作用机制与 TGF- β /Smad 通路和 Fas/Fas 相关死亡域蛋白（Fas-associated with death domain protein, FADD）通路有关^[4]。白芍多糖作为白芍另一重要活性成分，研究相对较少，课题组前期研究表明其通过调节环核苷酸、内分泌和能量代谢水平，对肝阴虚证化学性肝损伤发挥保护作用^[5]。但其深层次分子机制尚不清晰，仍需进一步探究。

线粒体动力学异常与肝纤维化发病密切相关^[6]。有学者根据融合和分裂在机体中的不同生物学功能效应,结合中医阴阳特征,定义融合为阴,分裂为阳^[7]。当线粒体过度融合或分裂时会发生阴阳失衡,而细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)/p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路是维持线粒体动力学稳态的重要信号通路^[8-9]。因此,本研究从线粒体动力学“阴-阳”平衡角度出发,探讨白芍多糖防治肝纤维化肝阴虚证大鼠的作用机制,从现代分子生物学角度揭示肝阴虚证的证候本质,为阐释白芍养肝阴的科学内涵提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,8 周龄,体质量 180~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2021-0011,动物质量合格证号 NO.202109070036。所有大鼠饲养于北京中医药大学动物实验中心,环境温度为 20~24 ℃,相对湿度为 60%~70%,12 h 明暗循环,自由进食饮水。动物实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 BUCM-4-2023121902-4224)。

1.2 药材

白芍(批号 20240915)购自安徽省亳州市中药材专业市场,经北京中医药大学中药教研室李伟高级实验师鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

甲状腺片(国药准字 H37020075,批号 211101)购自山东惠诺药业有限公司;知柏地黄丸(国药准字 Z34020230,批号 13003080844)购自上海华源制药安徽广生药业有限公司;水飞蓟宾胶囊(国药准字 H20040299,批号 350800002)购自天津天士力圣特制药有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)试剂盒(批号分别为 C009-2-1、C010-2-1、C017-2-1、A059-2-2、E003-2-1、E003-2-1)购自南京建成生物工程研究所;四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄, 批号 C11554349)、橄榄油(批号 A331D011)

购自北京百诺威生物技术有限公司;环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP) ELISA 试剂盒(批号分别为 E-EL-0056c、E-EL-0083c)购自北京永泰兴成商贸有限公司;二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)试剂盒(批号 S0063)购自上海碧云天生物技术有限公司;三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒(批号 BC0305)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 G1120)、Masson 染色试剂盒(批号 G1340)购自北京索莱宝科技有限公司;纤连蛋白 1(fibronectin 1, FN1)抗体(批号 15613-1-AP)、I 型胶原蛋白(collagen I, COL-I)抗体(批号 66761-1-Ig)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 10494-1-AP)、p38 抗体(批号 14064-1-AP)、p-p38 抗体(批号 28796-1-AP)、线粒体裂变蛋白 1(fission 1, Fis1)抗体(批号 10956-1-AP)、视神经萎缩蛋白 1(optic atrophy 1, Opa1)抗体(批号 27733-1-AP)、山羊抗兔二抗(批号 SA00001-2)、山羊抗小鼠二抗(批号 SA00001-1)购自武汉三鹰生物技术有限公司;ERK 抗体(批号 YM8336)、p-ERK 抗体(批号 YP0101)、线粒体动力相关蛋白(dynammin-related protein 1, Drp1)抗体(批号 YM8049)、p-Drp1 抗体(批号 YM8563)、线粒体融合蛋白 2(mitofusin 2, Mfn2)抗体(批号 YM8351)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(批号 YM0011)、 β -actin 抗体(批号 YM3028)购自美国 Immunoway 公司;标准品葡萄糖(批号 B21882, 质量分数为 98%)、半乳糖(批号 B23767, 质量分数为 98%)、木糖(批号 B21880, 质量分数为 99%)、葡萄糖醛酸(批号 B25302, 质量分数为 98%)、鼠李糖(批号 B21172, 质量分数为 98%)、岩藻糖(批号 B25303, 质量分数为 98%)购自上海源叶生物科技有限公司;半乳糖醛酸标准品(批号 77375, 质量分数为 98%)购自美国 Stanford Chemicals 公司;标准品阿拉伯糖(批号 78253, 质量分数为 99.9%)、甘露糖(批号 76505, 质量分数为 98%)购自江苏坛墨质检科技股份有限公司;古罗糖醛酸标准品(批号 SAG01, 质量分数为 98%)购自青岛博智汇力生物科技有限公司。

1.4 仪器

NIKON DS-U3 型荧光显微镜(日本尼康公

司); Zeiss Gemini 300 型透射电子显微镜(郑州泛锐云智科技有限公司); AS-2450 型全自动生化分析仪(上海蓝怡科技有限公司); Invitrogen iBright 型凝胶成像系统、X1 Pro 型冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司); AUW220 型电子天平(上海仪天科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 白芍多糖的提取

取 500 g 白芍饮片, 加入 20 倍量蒸馏水, 于 90 °C 水浴锅中提取 3 h, 重复提取 2 次。合并 2 次提取液, 逐渐加入 95% 乙醇均匀搅拌, 直至混合液中的乙醇体积分数为 80%。将混合液置于 4 °C 冰箱中静置过夜, 离心收集沉淀, 沉淀用超纯水复溶配制成 1% 的溶液, 加入 1.5% H_2O_2 , 置于 37 °C 培养箱过夜以除去色素。再次进行醇沉并冻干处理, 获得白芍多糖提取物, 出膏率为 11.28%。

2.2 白芍多糖的成分分析

2.2.1 单糖组成和含量测定

(1) 标准品溶液的制备: 精密称取各单糖标准品适量, 加入适量蒸馏水溶解, 制成单糖混合标准品溶液。取该溶液适量进行衍生化即得单糖衍生化混合标准品溶液。取单糖衍生化混合标准品溶液适量, 逐级稀释, 即得系列混合标准品溶液。

(2) 样品溶液的制备: 称取样品 0.0149 g 于水解管中, 加 1 mL 72% 硫酸, 30 °C 水浴 60 min, 用水定容至 10 mL, 充氮, 110 °C 烘箱中水解 2 h, 取出后冷却至室温, 取 0.5 mL 于 4 mL 离心管中, 调 pH 至中性, 定容至 1 mL; 加入 0.2 mL 0.3 mol/L NaOH 和 0.4 mL PMP 甲醇溶液, 充氮, 70 °C 水浴 60 min, 取出后冷却至室温, 加入 0.2 mL 0.3 mol/L HCl, 加水定容至 2 mL, 加 1.5 mL 氯仿, 振荡摇匀后静置分层, 弃去下层氯仿, 萃取 3 次, 水层过 0.45 μm 滤膜, 上机测定。

(3) 检测条件: Agilent 1200- C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 15% 乙腈 (乙腈经 0.05 mol/L KH_2PO_4 稀释, pH=6.8), B 为 40% 乙腈 (乙腈经 0.05 mol/L KH_2PO_4 稀释, pH=6.8), 梯度洗脱: 0~10 min, 100%~92% A; 10~40 min, 92%~63% A; 40~45 min, 63% A; 45~50 min, 63%~100% A; 50~55 min, 100% A。体积流量为 1 mL/min; 进样量为 20 μL ; 柱温为 25 °C; 检测器为紫外检测器; 检测波长为 254 nm。

2.2.2 总糖含量测定 采用苯酚-硫酸法测定总糖

含量。称取样品 0.213 6 g 于 250 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 水和 15 mL 浓盐酸, 装上冷凝回流装置, 置于 100 °C 水浴中水解 3 h, 冷却至室温后滤过, 再用蒸馏水洗涤滤渣, 合并滤液及洗液, 用水定容至 250 mL, 即为待测液。避光条件下精密称取苯酚 5 g, 加水溶解后置于 100 mL 棕色量瓶中定容。按标准操作体系梯度显色, 室温静置 10 min, 于 490 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 以葡萄糖质量浓度为横坐标 (x), A 值为纵坐标 (y), 绘制标准曲线。准确吸取 0.2 mL 待测液于 10 mL 具塞试管, 用蒸馏水补至 1 mL, 按标准曲线配制步骤测定 A 值, 代入标准曲线方程, 计算样品总糖含量。

2.2.3 相对分子质量测定 采用凝胶渗透色谱 (gel permeation chromatography, GPC) 法测定白芍多糖相对分子质量。取样品适量, 用四氢呋喃溶解, 配制成 2 mg/mL 溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。色谱条件: Agilent 1260 Infinity II MDS 检测器, 示差检测器、双角度激光散射检测器; PL aquagel-OH Mixed-H 色谱柱 (300 mm $\times$ 7.5 mm, 8 μm); 流动相为四氢呋喃; 等度洗脱; 柱温 40 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 100 μL 。使用 GPC 软件拟合计算样品相对分子质量。

2.3 分组、给药与造模

大鼠适应性饲养 1 周后, 按体质量随机分为对照组、模型组、知柏地黄丸 (408 mg/kg, 临床等效剂量) 组、水飞蓟宾 (42 mg/kg, 临床等效剂量) 组和白芍多糖低、高剂量 (169、338 mg/kg, 分别相当于临床等效剂量的 1、2 倍) 组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 6 周。大鼠采用 ip 20% CCl_4 橄榄油溶液联合 ig 甲状腺片 (30 mg/kg) 构建肝纤维化肝阴虚证模型。从给药第 2 周开始, 除对照组外, 其余大鼠每周二和周六 ip 20% CCl_4 橄榄油溶液 (1.5 mL/kg), 同时每日 ig 甲状腺片混悬液 (30 mg/kg), 连续造模 5 周。

2.4 取材

大鼠 ip 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 腹主动脉取血后处死大鼠。剪取部分肝脏于 4% 多聚甲醛中固定; 肝大叶分装入冻存管中, 放至液氮, 最后保存至 -80 °C 冰箱中。

2.5 指标检测

2.5.1 体征评分测定 大鼠体征评分标准参照文献方法^[10], 具体见表 1。采用双盲法进行体征评分,

由 2 名培训过的实验人员评分, 确保其对评分细则的理解一致; 评分过程中, 对分组信息进行遮盖, 降低主观偏倚。精神状态、毛发光泽度、大便质地、小便颜色和总体体征评分的 Kappa 值分别为 0.92、0.89、0.91、0.88 和 0.93, 均 >0.8 , 且 $P<0.001$, 评分者间具有一致性。

总体体征评分 = (精神状态评分 + 毛发评分 + 大便评分 + 小便评分) / 4

表 1 大鼠体征评分

Table 1 Signs and symptoms score for rats

体征指标	评分细则	分值
精神状态	狂躁易怒: 还未对其进行抓拿, 大鼠即出现喊叫, 以及警惕状态	3 分
	轻度易怒: 进行抓拿等动作, 挣扎剧烈, 叫声	2 分
	正常: 进行抓拿等动作, 出现轻度或不挣扎, 无叫声或轻度	1 分
毛发	无光泽: 毛发干枯, 易掉, 色黯, 无光泽	3 分
	轻微干燥无光泽: 毛发干枯, 易折, 色暗, 无光泽	2 分
	正常: 毛发韧性正常, 不干枯, 有光泽	1 分
大便	大便稀: 大便表面湿, 质软	3 分
	正常: 大便表面正常, 质地正常	2 分
	大便干: 大便表面干燥, 质地硬	1 分
小便	小便色黄	3 分
	小便淡黄 (正常)	2 分
	小便浅黄 (较正常淡黄更浅)	1 分

2.5.2 体质量、摄食量、饮水量、肛温及舌面干湿度测定 取材前 1 d, 测定各组大鼠体质量、24 h 摄食量和饮水量。肛温检测时, 将涂抹凡士林的电子体温计探头轻柔地插入肛门约 2 cm, 待计数稳定后记录数据。舌面干湿度检测时, 麻醉大鼠后用镊子轻轻夹出舌头, 由同一实验人员用镊子以恒定轻压力 (约 5 g) 将 pH 试纸贴于舌面中前部, 严格控制接触时间为 20 s。接触时间结束后, 立即用精密电子天平称量试纸质量^[2], 计算舌面干湿度。

舌面干湿度 = pH 试纸湿质量 - pH 试纸干质量

2.5.3 血清 cAMP 和 cGMP 水平检测 血液于室温静置 3 h, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 分离上清液。采用 ELISA 试剂盒检测血清中 cAMP 和 cGMP 水平, 并计算 cAMP/cGMP 值。cAMP/cGMP 值为中医阴虚证经典客观评价指标, 阴虚状态下常表现为 cAMP 水平升高、cGMP 水平降低、cAMP/cGMP 值显著升高, 本研究以 cAMP/cGMP 值作为肝阴虚证的判定依据之一。

2.5.4 血清肝功能检测 采用全自动生化仪检测

各组大鼠血清中 ALT、AST、 γ -GT、ALP 活性及 TBIL、TBA 水平。

2.5.5 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和 Masson 染色观察肝脏病理变化及纤维化程度 大鼠肝脏经常规脱水、石蜡包埋后切成 5 μ m 厚的切片, 脱蜡、水洗后, 分别进行 HE 染色和 Masson 染色, 于光学显微镜下观察并拍照。采用 Image J 软件定量胶原面积百分比, 胶原面积百分比为胶原纤维面积占整个视野面积的百分比。

2.5.6 透射电子显微镜观察肝脏线粒体超微结构 取新鲜肝脏组织, 剪成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 的组织块, 置于戊二醛中固定 3 h。漂洗后于 1% 锇酸中固定 2 h, 随后经过脱水、渗透、包埋、切片、染色处理, 采用透射电子显微镜观察肝脏线粒体超微结构。

2.5.7 肝脏内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平检测 取肝脏组织冰冻切片复温, 在 PBS 稀释的 DHE 探针溶液 (1:1 000) 中避光孵育 30 min。用 PBS 在摇床上避光洗涤 3 次, 每次 5 min。切片甩干后, 滴加 DAPI 染液, 室温避光染核 10 min, 洗涤后封片, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.5.8 肝脏中 ATP 水平检测 按照 ATP 试剂盒说明书进行操作, 检测各组大鼠肝脏中 ATP 水平。

2.5.9 Western blotting 检测肝脏 FN1、COL-I、 α -SMA、p-p38、p-ERK、Fis1、Drp1、Opa1 和 Mfn2 蛋白表达 采用 RIPA 裂解液提取肝脏蛋白, 测定蛋白浓度并制备上样样品。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, 室温封闭 2 h 后, 分别加入 FN1 (1:5 000)、COL-I (1:4 000)、 α -SMA (1:50 000)、p-p38 (1:3 000)、p38 (1:10 000)、p-ERK (1:2 000)、ERK (1:5 000)、Fis1 (1:10 000)、p-Drp1 (1:3 000)、Drp1 (1:5 000)、Opa1 (1:20 000)、Mfn2 (1:5 000) 一抗, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜后, 加入二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h; TBST 洗膜, 采用凝胶成像系统曝光并用 Image J 软件分析条带灰度值, 以目的蛋白与内参灰度值的比值表示蛋白相对表达量。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 20 软件进行数据统计, 并采用 GraphPad Prism 9 软件作图。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有计量资料先进行正态性检验 (Shapiro-Wilk 检验) 与方差齐性检验 (Levene 检验)。符合正态分布且方差齐性的数据, 多组间比较采用单因素方

差分析(One-way ANOVA), 事后两两比较采用 LSD 法; 符合正态分布但方差不齐的数据, 多组间比较采用 Dunnett's *T*3 检验。

3 结果

3.1 白芍多糖的单糖组成、总糖含量及相对分子质量分析

采用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法测定白芍多糖中的单糖组成。如图 1 所示, 白芍多糖主要由葡萄糖、半乳糖醛酸、阿拉伯糖、半乳糖组成, 物质的量比为 29.8:21:14:10。采用苯酚硫酸法测定总糖含量, 标准曲线的回归方程为 $y=6.3957x+0.001$, $R^2=0.9988$, 计算得到总糖质量分数为 24%。采用 GPC 法对白芍多糖进行相对分子质量测定, 如图 2 所示, 白芍多糖在 12.7 min 显示 1 个相对分子质量为 8.203×10^4 的主峰。

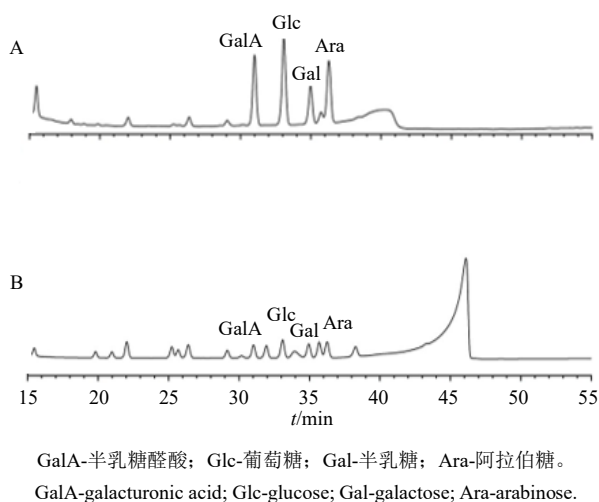


图 1 供试品溶液 (A) 和对照品溶液 (B) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of test solution (A) and reference solution (B)

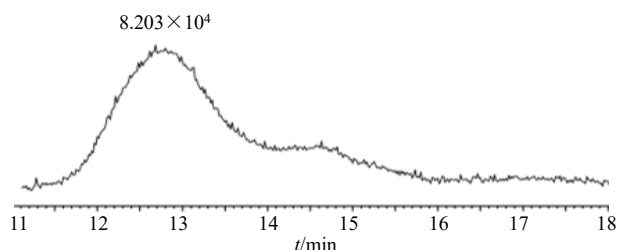


图 2 相对分子质量分布图

Fig. 2 Relative molecular weight distribution graph

3.2 各组大鼠体征变化

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠精神状态、毛发、小便及总体体征评分均明显升高 ($P<0.05$ 、 0.001), 大便评分明显下降 ($P<0.05$)。与模型组比较, 水飞蓟宾组大鼠精神状态、毛发、小便及总体体征评分均明显下降 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 大便评分升高但无显著差异; 知柏地黄丸组大鼠毛发、小便及总体体征评分均显著下降 ($P<0.001$), 大便评分显著升高 ($P<0.05$), 精神状态下降但无显著差异; 白芍多糖各剂量组大鼠精神状态、毛发、小便及总体体征评分均明显下降 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 大便评分显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。与知柏地黄丸组比较, 白芍多糖各剂量组大鼠精神状态、毛发、大便和小便评分均无显著性差异, 而白芍多糖低剂量组总体体征评分显著升高 ($P<0.05$)。

3.3 各组大鼠体质量、摄食量、饮水量、肛温和舌面干湿度变化

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠体质量和舌面干湿度明显下降 ($P<0.001$), 摄食量、饮水量和肛温显著上升 ($P<0.001$)。与模型组比较, 各给药组大鼠体质量和舌面干湿度均明显升高 ($P<0.05$ 、 0.001), 知柏地黄丸和白芍多糖各剂量组肛温显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 各给药组饮水

表 2 各组大鼠体征变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Changes in physical signs of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	精神状态评分	毛发评分	大便评分	小便评分	总体体征评分
对照	—	1.00±0.00	1.13±0.35	1.75±0.46	2.00±0.00	1.47±0.16
模型	—	2.38±0.74*	2.63±0.74***	1.00±0.00*	2.88±0.35***	2.22±0.25***
水飞蓟宾	42	1.25±0.46#	1.50±0.54###	1.88±0.84	2.00±0.54###	1.69±0.22###
知柏地黄丸	408	1.38±0.52	1.25±0.46###	1.75±0.46#	2.13±0.35###	1.44±0.12###
白芍多糖	169	1.25±0.46#	1.50±0.54###	1.75±0.46#	2.25±0.46#	1.69±0.22###△
	338	1.00±0.00#	1.25±0.46###	1.88±0.35###	2.13±0.35###	1.47±0.16###

与对照组比较: * $P<0.05$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ### $P<0.01$ ### $P<0.001$; 与知柏地黄丸组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ △△△ $P<0.001$, 表 3、4 同。

* $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ### $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group; △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ △△△ $P<0.001$ vs Zhibai Dihuang Wan group, same as tables 3, 4.

表3 各组大鼠体质量、摄食量、饮水量、肛温和舌面干湿度变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 3 Changes in body weight, food intake, water intake, rectal temperature and tongue surface moisture of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g	摄食量/g	饮水量/mL	肛温/℃	舌面干湿度/mg
对照	—	392.63±12.69	24.72±0.57	41.19±3.07	35.86±0.12	29.63±4.60
模型	—	307.48±21.52***	28.51±0.59***	66.77±6.02***	37.85±0.45***	16.88±5.14***
水飞蓟宾	42	325.52±12.61 [#]	27.90±0.65	43.79±5.78 ^{###}	37.30±0.29	23.63±9.62 [#]
知柏地黄丸	408	339.46±11.55 ^{###}	27.40±1.16	53.45±3.57 [#]	36.28±0.23 ^{###}	29.50±6.44 ^{###}
白芍多糖	169	324.64±12.78 ^{#Δ}	27.07±0.86	43.61±7.97 ^{###}	37.18±0.10 ^{#ΔΔΔ}	25.00±3.89 [#]
	338	342.48±8.58 ^{###}	25.68±0.85 ^{#Δ}	52.15±5.64 [#]	36.63±0.41 [#]	31.13±6.24 ^{###}

量显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)，白芍多糖高剂量组摄食量显著下降 ($P<0.01$)。与知柏地黄丸组比较，白芍多糖低剂量组体质量显著降低 ($P<0.05$)，肛温显著升高 ($P<0.001$)，白芍多糖高剂量组摄食量显著降低 ($P<0.05$)。

3.4 各组大鼠血清中 cAMP、cGMP 水平及 cAMP/cGMP 值

如表4所示，与对照组比较，模型组大鼠血清中 cAMP 水平明显升高 ($P<0.001$)，cGMP 水平显著降低 ($P<0.001$)，cAMP/cGMP 值显著升高 ($P<0.001$)。与模型组比较，各给药组大鼠血清中 cAMP 水平显著降低 ($P<0.001$)，cGMP 水平明显升高 ($P<0.001$)，cAMP/cGMP 值显著降低 ($P<0.001$)。与知柏地黄丸组比较，白芍多糖低剂量组 cAMP 水平显著降低 ($P<0.01$)，白芍多糖各剂量组 cAMP/cGMP 值显著降低 ($P<0.05$)。

3.5 各组大鼠肝功能水平

如表5所示，与对照组比较，模型组大鼠血清

中 ALT、AST、ALP、 γ -GT 活性及 TBA、TBIL 水平平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.001)。与模型组比较，各给药组大鼠血清中 ALT、AST、ALP、 γ -GT 活性及 TBA、TBIL 水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与水飞蓟宾组比较，白芍多糖高剂量组 AST 活性显著降低 ($P<0.05$)。

3.6 各组大鼠肝脏病理损伤情况

HE 染色结果 (图3) 显示，与对照组比较，模型组肝小叶结构严重破坏，较多肝细胞发生脂肪变性，部分肝细胞出现气球样变性，表现为肝细胞体积明显增大，呈空泡状，细胞核相对缩小，核染色质分布不均，部分细胞可见核固缩现象；可见大量炎性细胞浸润。与模型组比较，各给药组肝脏病理变化均有不同程度的改善。

Masson 染色结果 (图3) 显示，与对照组比较，模型组肝小叶结构严重破坏，肝索排列紊乱、断裂，肝细胞出现不同程度的变性；肝组织内蓝色胶原纤维显著增多，胶原纤维在汇管区大量堆积、扩大，

表4 各组大鼠血清中 cAMP、cGMP 水平及 cAMP/cGMP 值 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 4 cAMP, cGMP levels and cAMP/cGMP value in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	cAMP/(pmol·mL ⁻¹)	cGMP/(pmol·mL ⁻¹)	cAMP/cGMP
对照	—	15.61±2.71	5.14±0.60	3.06±0.61
模型	—	36.48±3.29***	2.67±0.24***	13.71±1.36***
水飞蓟宾	42	24.00±1.46 ^{###}	4.09±0.71 ^{###}	6.03±1.14 ^{###}
知柏地黄丸	408	27.64±3.00 ^{###}	3.96±0.53 ^{###}	7.14±1.35 ^{###}
白芍多糖	169	23.84±2.10 ^{###ΔΔ}	4.20±0.47 ^{###}	5.75±0.91 ^{###Δ}
	338	25.49±1.82 ^{###}	4.30±0.32 ^{###}	5.96±0.67 ^{###Δ}

表5 各组大鼠肝功能水平 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 5 Liver function levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	TBA/(μmol·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)	γ -GT/(U·L ⁻¹)
对照	—	21.22±4.26	9.88±3.83	50.40±6.84	10.82±14.39	28.63±17.05	14.81±5.63
模型	—	74.92±16.16***	67.75±17.74***	161.00±29.16***	43.51±16.15***	43.06±15.66*	21.37±7.67*
水飞蓟宾	42	33.69±16.50 ^{##}	36.89±14.43 [#]	55.39±5.14 ^{###}	16.59±8.47 ^{###}	23.60±12.90 ^{##}	7.19±4.77 ^{###}
知柏地黄丸	408	16.28±7.21 ^{###}	13.86±3.40 ^{##}	59.59±17.86 ^{###}	8.41±3.24 ^{###}	11.57±10.18 ^{###}	10.58±4.77 ^{###}
白芍多糖	169	25.25±11.96 ^{###}	19.56±12.78 ^{###}	52.59±7.31 ^{###}	17.79±13.11 ^{###}	28.85±7.49 [#]	10.15±5.72 ^{###}
	338	27.43±10.78 ^{###}	12.87±10.72 ^{###■}	53.73±6.09 ^{###}	13.70±10.60 ^{###}	20.10±9.19 ^{##}	5.50±2.35 ^{###}

与对照组比较：* $P<0.05$ *** $P<0.001$ ；与模型组比较：[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ ；与水飞蓟宾组比较：[■] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group；[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs model group；[■] $P<0.05$ vs silybin group。

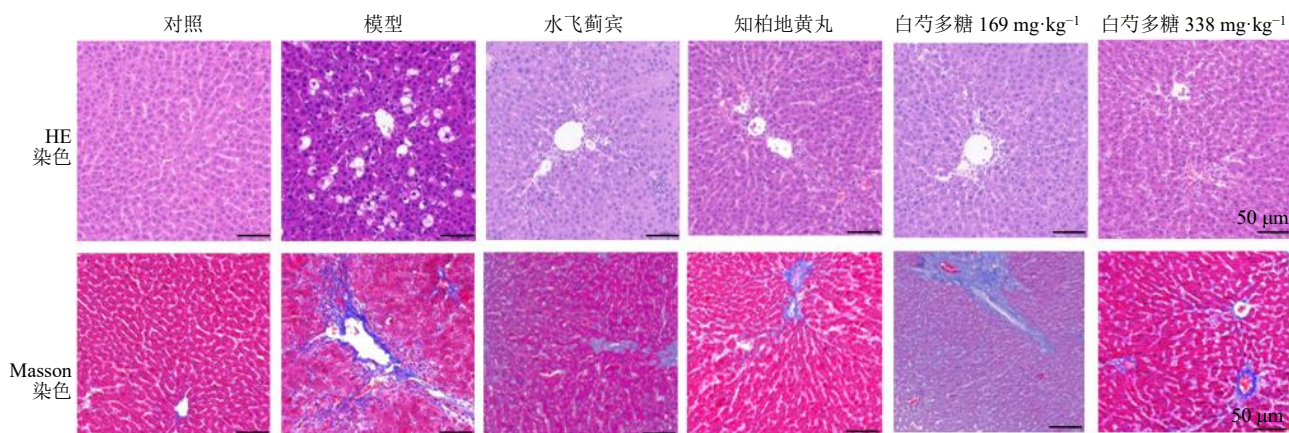


图 3 各组大鼠肝脏损伤情况 (×200)

Fig. 3 Liver damage in rats of each group (× 200)

出现明显的胶原纤维增生与沉积。与模型组比较, 各给药组蓝色胶原纤维沉积量减少。胶原纤维面积半定量结果 (表 6) 显示, 各给药组的胶原纤维面积百分比明显低于模型组 ($P<0.001$)。

3.7 各组大鼠肝脏线粒体超微结构

如图 4 所示, 对照组线粒体呈长椭圆形, 嵴结构完整且排列有序, 无明显空泡化。模型组线粒体萎缩变小, 分裂、融合异常, 线粒体出现空泡化、膜内基质变淡, 嵴断裂、消失, 整体结构完整性被破坏。白芍多糖高剂量组肝脏线粒体较模型组明显改善, 线粒体肿胀程度明显减轻, 嵴结构较清晰。

3.8 各组大鼠肝脏 ROS 水平

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组红色荧光显著增强, 提示 ROS 水平明显上升; 白芍多糖高剂量组红色荧光较模型组明显减弱。半定量结果 (表 7) 显示, 与对照组比较, 模型组 ROS 平均 A 值显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 白芍多糖高剂量组 ROS 平均 A 值显著降低 ($P<0.001$)。

表 6 各组大鼠肝脏胶原面积百分比 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Percentage of liver collagen area of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	胶原面积占比/%
对照	—	1.03±0.23
模型	—	12.27±0.86***
水飞蓟宾	42	3.73±0.86###
知柏地黄丸	408	2.73±0.55###
白芍多糖	169	8.41±1.64###
	338	4.17±0.38###

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$, 表 8~10 同。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group, same as below tables 8—10.

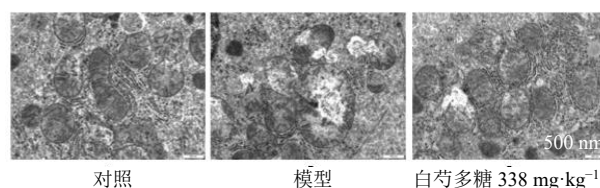


图 4 各组大鼠肝脏线粒体超微结构 (×5 000)

Fig. 4 Ultrastructure of liver mitochondria in rats of each group (× 5 000)

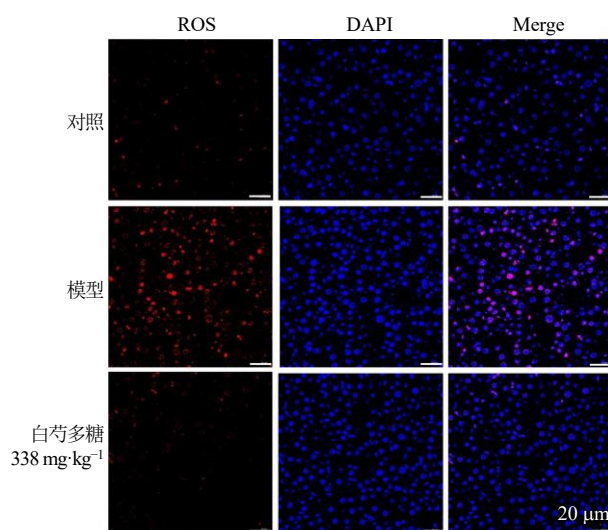


图 5 各组大鼠肝脏内 ROS 水平 (×400)

Fig. 5 ROS level in liver of rats in each group (× 400)

表 7 各组大鼠肝脏内 ROS 平均 A 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Average A value of ROS in liver of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ROS 平均 A 值
对照	—	0.07±0.03
模型	—	0.28±0.10***
白芍多糖	338	0.14±0.04###

3.9 各组大鼠肝脏中 ATP 水平

如表 8 所示,与对照组比较,模型组大鼠肝脏中 ATP 水平显著下降 ($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟宾组和白芍多糖各剂量组大鼠肝脏中 ATP 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01),知柏地黄丸组 ATP 水平升高但无显著差异。

3.10 各组大鼠肝脏 FN1、COL-I 和 α -SMA 蛋白表达

如图 6 和表 9 所示,与对照组比较,模型组大

表 8 各组大鼠肝脏中 ATP 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 8 ATP level in liver of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ATP/(μ mol·g ⁻¹)
对照	—	5.57±2.68
模型	—	2.85±1.10**
水飞蓟宾	42	4.78±0.95 [#]
知柏地黄丸	408	3.99±1.20
白芍多糖	169	4.65±0.66 [#]
	338	5.15±1.94 ^{##}

表 9 各组大鼠肝脏 FN1、COL-I 和 α -SMA 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 9 Expressions of FN1, COL-I and α -SMA proteins in livers of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FN1/ β -actin	COL-I/ β -actin	α -SMA/GAPDH
对照	—	0.87±0.13	0.51±0.17	0.63±0.10
模型	—	1.37±0.37*	1.06±0.04**	1.28±0.07***
水飞蓟宾	42	0.58±0.26 ^{##}	0.58±0.10 ^{##}	0.78±0.10 [#]
知柏地黄丸	408	0.71±0.35 ^{##}	0.72±0.02 ^{##}	0.69±0.15 [#]
白芍多糖	169	0.33±0.10 ^{###}	0.62±0.12 ^{##}	0.65±0.22 ^{##}
	338	0.68±0.06 ^{##}	0.53±0.20 ^{##}	0.66±0.17 ^{###}

3.11 各组大鼠肝脏 p-ERK、ERK、p-p38、p38、Fis1、p-Drp1、Drp1、Opa1 和 Mfn2 蛋白表达

如图 7 和表 10 所示,与对照组比较,模型组大鼠肝脏 p-ERK/ERK、p-p38/p38、Fis1、p-Drp1/Drp1 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$ 、 0.01),Opa1 和 Mfn2 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$)。与模型组比较,各给药组 p-ERK/ERK、p-p38/p38 和 Fis1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001),Opa1 和 Mfn2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),白芍多糖各剂量组 p-Drp1/Drp1 蛋白表达水平显著下降 ($P<0.05$)。

4 讨论

CCl₄ 是诱导肝纤维化常见的化学试剂,仅用 CCl₄ 造模,肝阴虚证的临床表现并不明显,目前常采用复合方式造模以加强动物证候表征。研究表明,动物 ig 甲状腺素后,下丘脑-垂体-甲状腺轴功能紊乱,机体出现类似临床阴虚证患者的表现,如口干舌燥、饮水增多、尿液发黄、大便干结、汗出

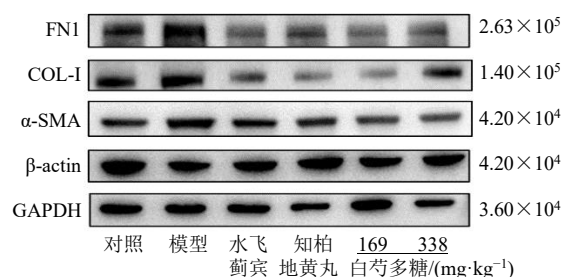


图 6 各组大鼠肝脏 FN1、COL-I 和 α -SMA 蛋白表达
Fig. 6 FN1, COL-I and α -SMA protein expressions in livers of rats in each group

鼠肝脏 FN1、COL-I 和 α -SMA 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与模型组比较,各给药组大鼠肝脏 FN1、COL-I 和 α -SMA 蛋白表达水平均明显下降 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。此外,白芍多糖低剂量组大鼠胶原面积高,但纤维化蛋白下降明显,这可能与取样部位、蛋白表达时空差异有关。

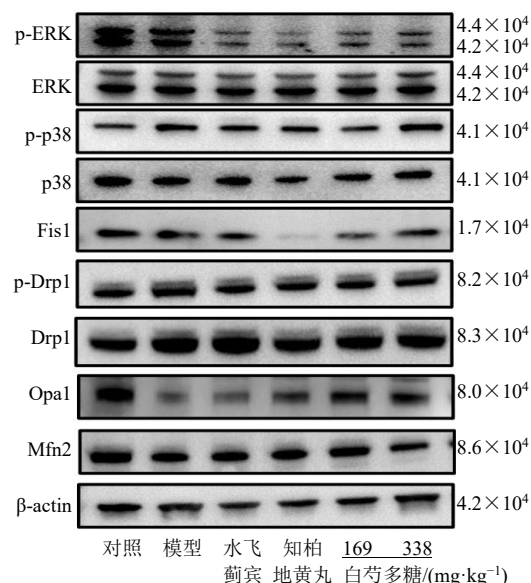


图 7 各组大鼠肝脏 p-ERK、ERK、p-p38、p38、Fis1、p-Drp1、Drp1、Opa1 和 Mfn2 蛋白表达
Fig. 7 Expressions of p-ERK, ERK, p-p38, p38, Fis1, p-Drp1, Drp1, Opa1 and Mfn2 proteins in liver of rats in each group

表 10 各组大鼠肝脏 p-ERK、ERK、p-p38、p38、Fis1、p-Drp1、Drp1、Opa1 和 Mfn2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 10 Expressions of p-ERK, ERK, p-p38, p38, Fis1, p-Drp1, Drp1, Opa1 and Mfn2 proteins in liver of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	p-ERK/ERK	p-p38/p38	Fis1/β-actin	p-Drp1/Drp1	Opa1/β-actin	Mfn2/β-actin
对照	—	0.66±0.24	0.77±0.18	0.79±0.13	0.77±0.07	1.06±0.10	1.45±0.27
模型	—	1.10±0.11**	1.26±0.26*	1.44±0.27**	1.22±0.19*	0.44±0.03***	0.61±0.12***
水飞蓟宾	42	0.47±0.02###	0.61±0.14##	0.72±0.27###	0.80±0.27	0.84±0.08##	0.95±0.12#
知柏地黄丸	408	0.57±0.14###	0.68±0.18##	0.20±0.06###	0.91±0.12	0.89±0.06###	1.05±0.11##
白芍多糖	169	0.59±0.08###	0.42±0.14###	0.33±0.20###	0.63±0.23#	0.97±0.15###	1.30±0.26###
	338	0.61±0.09###	0.59±0.22##	0.58±0.18##	0.60±0.11#	0.85±0.12##	1.04±0.11##

等^[11-12]。采用液体酒精饲料联合甲状腺素建立酒精性肝损伤肝阴虚证小鼠模型，模型组出现毛发无光泽、大便发干、小便色黄和烦躁易怒等现象，与临床阴虚证的表征高度相似^[13]。亦有研究采用乙酰氨基酚复合甲状腺素建立急性肝衰竭阴虚证模型，小鼠表现出饮水量升高、自主活动增加、肛温升高等状态^[14]。本研究采用 20% CCl₄ 橄榄油溶液联合甲状腺片构建肝纤维化肝阴虚证病证结合模型，同时设置水飞蓟宾（化学药阳性对照）与知柏地黄丸（中药阳性对照）佐证，通过证候体征、环核苷酸水平、肝功能、肝脏病理及分子指标多维度验证模型的可靠性和白芍多糖干预效果，提高了病证结合模型的论证强度。

本研究基于前期基础，设计了肝纤维化阴虚证评价量表，同时结合体质量、摄食量、饮水量、舌面干湿度和肛温指标评价证候表征。本研究还检测了肝阴虚证的生化指标（cAMP、cGMP）。cAMP 和 cGMP 是细胞内广泛存在的第二信使，主要负责传递外部信号并调控生理活动。环核苷酸水平及比值可作为判断阴虚和阳虚的客观指标，为临床辨证提供参考。研究报道，阴虚证患者 cAMP 水平升高，cAMP/cGMP 值明显升高^[15]。研究发现，与正常大鼠比较，阴虚证糖尿病大鼠血浆中 cAMP 水平升高，cGMP 水平降低，cAMP/cGMP 值增加，表明阴虚证与 cAMP/cGMP 值升高有关^[16]。本研究中，模型组大鼠体质量、大便评分、舌面干湿度降低；精神状态、毛发光泽度、小便评分、总体体征评分、肛温、摄食和饮水量升高；cAMP 升高、cGMP 降低、cAMP/cGMP 值升高，这与临床上肝阴虚证证候表征相符。此外，α-SMA 是 HSCs 激活的标志性蛋白，静息状态下 HSCs 中 α-SMA 不表达或低表达；当肝脏损伤或炎症时，HSCs 被激活转化为肌成纤维细胞，α-SMA 表达升高。COL-I 是肝脏 ECM 的主要成分，由激活的 HSCs 合成与分泌，反映肝组织胶

原沉积程度^[17]。FN1 是一种多功能糖蛋白，参与细胞增殖、分化、迁移，与伤口愈合、组织器官纤维化等疾病密切相关^[18-19]。本研究中，模型组肝功能指标显著升高，病理染色显示肝脏出现严重的肝纤维化病变，α-SMA、COL-I 和 FN1 蛋白表达水平均明显升高，表明成功构建肝纤维化肝阴虚证模型。给予白芍多糖后，以上指标均有不同程度的改善，表明白芍多糖对肝纤维化肝阴虚证大鼠具有保护作用，在保肝的同时也发挥了重要的养肝阴作用。

线粒体动力学异常是肝纤维化发生发展的病理机制之一。研究发现，HSCs 活化过程伴随着线粒体过度融合，通过药物诱导 HSCs 线粒体分裂并抑制其能量代谢，可有效抑制 HSCs 增殖活化从而逆转肝纤维化^[20]。过度的线粒体分裂通过受体相互作用蛋白激酶 1（receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1）/混合谱系激酶结构域样蛋白（mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL）依赖性途径诱导肝细胞死亡，进而激活 HSCs 并促进肝纤维化进展；而抑制线粒体分裂可缓解肝组织纤维化^[21]。因此，调控线粒体动力学平衡对改善肝纤维化具有重要意义。肝阴虚证是肝脏阴液不足，阴不制阳，虚热内扰所表现的证候，其存在阴阳失衡。线粒体的融合与分裂虽属于现代医学范畴，但有阴阳属性。有学者根据融合和分裂在机体中不同生物学功能效应，将融合定义为阴，分裂定义为阳^[7]。正常生理状态下融合与分裂相互制衡，对应机体“阴平阳秘”；病理状态下分裂过度（阳偏亢）、融合不足（阴偏衰），对应肝阴虚证“阴不制阳、阴阳失衡”。本研究中模型组分裂相关蛋白 Fis1、p-Drp1 表达水平显著升高，提示线粒体分裂过度（阳亢）；融合相关蛋白 Opa1、Mfn2 表达水平显著降低，提示线粒体融合不足（阴衰），二者共同构成“阴亏阳亢”的线粒体动力学表型，与肝纤维化肝阴虚证病机符合。而给予白芍多糖干预后，Fis1、p-Drp1 表达下调以

抑阳（抑制过度分裂），Opa1、Mfn2 表达上调以补阴（促进融合恢复），使线粒体动力学向“阴阳平衡”恢复，从细胞器层面阐明了白芍“滋阴养肝、扶阴抑阳、调和阴阳”的作用靶点。

ERK/p38 MAPK 通路在肝纤维化发生发展过程中起重要作用，为肝纤维化治疗提供了新的靶点。ERK/p38 MAPK 通路参与了 HSCs 增殖活化，进而参与肝纤维化。研究表明，TGF- β 1 能够激活下游 MAPK 通路，使得 p38 MAPK 及 ERK 磷酸化增多，激活后的 MAPK 通路可通过调节 HSCs 细胞核中的信号转导，促进 HSCs 活化，从而大量合成和分泌 ECM，进行导致肝纤维化^[22]。研究发现，大黄总蒽醌可改善 CCl₄ 和乙醇诱导的大鼠肝纤维化，其作用机制与抑制 ERK/p38 MAPK 通路有关^[23]。还有研究使用 ERK 或 p38 MAPK 抑制剂，发现能够有效改善纤维化^[24-25]。MAPK 通路也是维持线粒体动力学稳态的关键通路。研究发现，MAPK 通路亚型 ERK 可影响线粒体融合相关蛋白表达，抑制 ERK 激活可增强 Opa1 活性，促进线粒体的融合，这一过程对维持线粒体形态功能、保障细胞能量代谢稳态具有重要意义^[26]。p38 MAPK 在某些情况下也可促进线粒体分裂。已有报道，血红素氧合酶 1（heme oxygenase-1, HO-1）下调可通过激活 p38 MAPK 通路，加剧肺泡巨噬细胞炎症反应与氧化应激水平，并促进线粒体分裂蛋白 Fis1 表达，最终导致线粒体分裂^[27]。因此，ERK 和 p38 MAPK 可通过靶向线粒体融合分裂相关蛋白调控线粒体动力学。本研究中，白芍多糖组肝脏 p-p38、p-ERK、Fis1 和 p-Drp1 蛋白表达水平显著降低，而 Opa1 和 Mfn2 蛋白表达水平显著升高，表明白芍多糖通过抑制 ERK/p38 MAPK 通路调控线粒体动力学稳态。

综上，白芍多糖对肝纤维化肝阴虚证大鼠具有保护作用，可能通过抑制 ERK/p38 MAPK 通路，改善线粒体“分裂亢进（阳亢）、融合不足（阴衰）”的失衡状态，恢复线粒体动力学阴阳平衡，进而减轻肝损伤、抑制胶原沉积与肝纤维化。本研究将线粒体融合-分裂蛋白（Fis1、p-Drp1、Opa1、Mfn2）与中医阴阳属性对应，把白芍滋阴养肝的传统药性具象化为线粒体动力学稳态的分子调控，为阐释白芍养肝阴的科学内涵提供了实验依据，也为肝纤维化肝阴虚证治疗提供了新靶点。本研究仍存在一定局限性：①仅动物实验，尚未进行人体临床试验，结果的临床转化价值有待进一步证实；②未阐明各

单糖组分之间的协同作用关系；同时仅完成多糖的基本理化表征，结构与活性关联性待深入研究；③尚未在 HSC-T6、LX-2 细胞等体外模型中，采用 MAPK 通路抑制剂 U0126、SB203580 验证 ERK/p38 MAPK 通路在白芍多糖调控线粒体动力学中的必要性。后续将采用临床样本并结合体外细胞实验进一步完善机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 贾岚, 王蕾蕾, 孟靓, 等. 白芍对酒精性肝损伤肝阴虚证的保护功效和机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(3): 203-211.
- [2] 李丽, 范晓旭, 华娟安, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠的保护作用及机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(3): 341-351.
- [3] 范晓旭, 姜斯佳, 冯颖童, 等. 基于 NF- κ B 和 STAT3 探讨白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠的作用机制 [J]. 天津中医药, 2024, 41(11): 1445-1451.
- [4] 范晓旭, 刘双巧, 华娟安, 等. 基于 TGF- β /Smad 和 Fas/FADD 信号通路探讨白芍总苷减轻肝纤维化的作用机制 [J]. 天津中医药, 2025, 42(10): 1285-1294.
- [5] 高晶, 范晓旭, 冯颖童, 等. 白芍多糖对肝阴虚证模型大鼠证候表征及内分泌/能量代谢的影响 [J]. 环球中医药, 2024, 17(1): 2-10.
- [6] Ma X W, Wei X L, Niu M W, *et al.* Genetic disruption of mitochondrial dynamics and stasis leads to liver injury and tumorigenesis [J]. *J Clin Invest*, 2025, 136(4): e194441.
- [7] 史有阳, 杨瑞, 韩向晖, 等. 基于“阴阳平衡”理论探讨中医药对相关疾病线粒体融合-分裂的影响 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(3): 132-134.
- [8] 李玉洁, 韩萌, 杨国宁, 等. 芪参益气滴丸对慢性心衰大鼠线粒体分裂-融合及丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶信号通路的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2025, 54(4): 465-469.
- [9] Ding S M, Shi L G, Cao Z P, *et al.* HTR1B regulates mitochondrial homeostasis and mitophagy by activating the ERK/MAPK signalling pathway during human embryonic arrest [J]. *Heliyon*, 2024, 10(12): e33132.
- [10] 孙福慧, 刘文兰. 肝纤维化大鼠阴虚证评价量表的制定和评价 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(11): 91-96.
- [11] 伍庆华, 黄云, 胡珺, 等. 六味地黄丸对甲亢阴虚小鼠肝组织钠钾泵的影响 [J]. 江西中医药, 2017, 48(9): 62-63.
- [12] 温玉莹, 江涛, 陈艳芬, 等. 蒿甲虚热清颗粒对利血平和甲状腺素致阴虚模型小鼠的影响 [J]. 广东药科大

- 学学报, 2018, 34(3): 320-324.
- [13] 冯广旭, 贾岚, 刘佳琪, 等. 酒精性肝损伤肝阴虚证小鼠模型的研究 [J]. 实验动物科学, 2025, 42(3): 80-87.
- [14] 史莹, 过建春, 荀运浩. 急性肝衰竭阴虚证病证结合小鼠模型的建立 [A] // 中国医师协会中西医结合医师分会肝病专业委员会、广东省药学会中医肝病用药专业委员会、广东省保健协会肝病专业委员会 2016 年学术会议论文集 [C]. 广州: 中国医师协会、广东省药学会、广东省保健协会, 2016: 211-217.
- [15] 陈奇. cAMP、cGMP 与中医阴阳学说 [J]. 江西中医药, 1980, 11(2): 12-17.
- [16] Wang X, Du Y, Wu C T, *et al.* UHPLC-MS/MS analysis of cAMP and cGMP in rat plasma as potential biomarkers of Yin-Yang disharmony in traditional Chinese medicine [J]. *J Pharm Anal*, 2021, 11(4): 458-464.
- [17] 雷超, 李彦波, 吴东杰, 等. 靶向细胞外基质: 中药调控脏器纤维化新视角 [J]. 中草药, 2025, 56(16): 5709-5722.
- [18] 王宇飞. 靶向纤维连接蛋白的核酸适配体在肿瘤及纤维化检测中的应用 [D]. 长沙: 湖南大学, 2023.
- [19] 张东臣, 鲍虎豹, 陆莎, 等. 致康胶囊对肝痿术后伤口愈合及血清表皮生长因子、纤维连接蛋白表达的影响 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22(6): 672-675.
- [20] Su Y, Hou C J, Wang M L, *et al.* Metformin induces mitochondrial fission and reduces energy metabolism by targeting respiratory chain complex I in hepatic stellate cells to reverse liver fibrosis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2023, 157: 106375.
- [21] Shan S L, Liu Z D, Wang S, *et al.* Drp1-mediated mitochondrial fission promotes carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in mice [J]. *Toxicol Res*, 2022, 11(3): 486-497.
- [22] Lv Z G, Xu L M. Salvianolic acid B inhibits ERK and p38 MAPK signaling in TGF- β 1-stimulated human hepatic stellate cell line (LX-2) via distinct pathways [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2012, 2012: 960128.
- [23] 江慧, 陈晶, 曾超. 大黄总蒽醌抑制肝纤维化的作用与机制 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2023, 33(11): 989-995.
- [24] Chong S G, Chen G, Dang Z S, *et al.* *Echinococcus multilocularis* drives the polarization of macrophages by regulating the RhoA-MAPK signaling pathway and thus affects liver fibrosis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 8747-8758.
- [25] Wei X L, Li S Y, Li T T, *et al.* Pomegranate peel extract ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats through suppressing p38 MAPK/Nrf2 pathway [J]. *J Funct Foods*, 2020, 65: 103712.
- [26] 高帅. 甲基莲心碱对野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压的影响 [D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
- [27] 康元元. p38 MAPK 介导 HO-1 表达对 LPS 攻击大鼠肺泡巨噬细胞模型中线粒体分裂蛋白的影响 [D]. 天津: 天津医科大学, 2017.

[责任编辑 李亚楠]