

竹节参多糖通过 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路对急性肝损伤大鼠的影响

宋添力^{1,2}, 唐浪¹, 王一民¹, 吴广阳^{1,3}, 刘绪¹, 黄胜^{1,2*}

(1. 湖北民族大学 医学部, 湖北 恩施 445000; 2. 湖北民族大学 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000; 3. 湖北恩施学院, 湖北 恩施 445000)

摘要: 以竹节参 (*Panax japonicus*) 为原料, 经水提醇沉法制备了竹节参多糖 (PSPJ), 通过观察和记录大鼠一般情况及肝脏指数 (肝脏质量/体质量) 探讨了 PSPJ 通过 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路干预 CCl₄ 诱导的急性肝损伤 (ALI) 大鼠的作用机制; 采用苏木素-伊红 (H&E) 染色法评价了 PSPJ 对肝组织病理变化的改善作用; 采用免疫组织化学 (IHC) 染色检测了肝组织 NF- κ B 的表达情况; 通过蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测考察了 PSPJ 对 ALI 大鼠肝脏 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路相关蛋白及炎症指标的表达水平。结果表明, 与空白对照组相比, 模型组的体质量、肝脏质量和肝脏指数均显著上升 ($P < 0.05$, 表示差异有统计学意义, 下同), 模型组出现大量肝组织炎症浸润, 用药组肝脏病理变化明显缓解; 与空白对照组比较, 模型组大鼠肝组织 p-PI3K 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$), PI3K、p-AKT、p-NF- κ B、IL-1 β 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 药物组 p-PI3K 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$), p-AKT、IL-1 β 蛋白表达显著下降 (分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。PSPJ 通过 PI3K/AKT/NF- κ B 通路信号中的相关关键蛋白表达减轻了 CCl₄ 诱导的大鼠 ALI 症状。

关键词: 竹节参多糖; PI3K/AKT/NF- κ B; 急性肝损伤; 抗氧化; 抗炎; 中药现代化技术

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 11-2472-08

Effect of *Panax japonicus* polysaccharide on acute liver injury rats via PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway

SONG Tianli^{1,2}, TANG Lang¹, WANG Yiming¹, WU Guangyang^{1,3}, LIU Xu¹, HUANG Sheng^{1,2*}

(1. Medical School, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China; 2. Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China; 3. Hubei Enshi College, Enshi 445000, Hubei, China)

Abstract: *Panax japonicus* polysaccharide (PSPJ), prepared via water extraction and alcohol precipitation, was used for treatment of rats with CCl₄-induced acute liver injury (ALI). The mechanism of PSPJ's intervention on the injury through PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway was analyzed by observing and recording the general condition and liver index (liver mass/body mass) of rats. The effects of PSPJ on the pathological changes of liver tissue were evaluated by hematoxylin-eosin (H&E) staining, immunohistochemical (IHC) staining for the liver NF- κ B expression, and protein immunoblotting (Western blot) analysis on the expression levels of PSPJ on PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway related proteins and inflammatory indexes in ALI rats. The results showed that compared with the blank control group, the model group exhibited significant increment in the body mass, liver mass as well as liver index ($P < 0.05$, indicating statistical significance, the same below), and a large number of liver tissue inflammatory infiltration, while the drug treated group displayed obvious relief in the liver pathological changes. Compared with the blank control group, the protein expression of p-PI3K in liver tissue of model group was significantly decreased ($P < 0.01$), while the protein expressions of PI3K, p-AKT, p-NF- κ B and IL-1 β were

收稿日期: 2023-08-21; 定用日期: 2023-09-28; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230697

基金项目: 湖北省自然科学基金青年项目 (2019CFB358); 国家自然科学基金青年基金项目 (81801979)

作者简介: 宋添力 (1998—), 男, 硕士生, E-mail: stl15234839197@163.com。联系人: 黄胜 (1987—), 男, 讲师, E-mail: hs19870604@163.com。

significantly increased ($P < 0.05$). In drug treated group, the expression of P-PI3K protein was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression of p-AKT and IL-1 β protein was significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Therefore, PSPJ alleviated CCl₄-induced ALI symptoms in rats through the expression of related key proteins in the PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway.

Key words: *Panax japonicus* polysaccharide; PI3K/AKT/NF- κ B; acute liver injury; oxidation resistance; anti-inflammatory; modernization technology of traditional Chinese medicines

肝脏作为人体最大的实体器官, 在物质代谢、血容量调节、内分泌控制、脂质维持和胆固醇稳态以及免疫系统支持中起着重要的作用^[1-2]。然而, 病毒、药物、酒精、免疫损伤等多种肝毒性因素可引发肝细胞损伤和死亡^[3-4]。急性肝损伤 (ALI) 是指短时间内引发肝细胞受损的一种疾病, 包括药物性肝损伤、急性病毒性肝炎、急性酒精性肝损伤、急性创伤等, 严重情况下可迅速发展为急性肝衰竭 (ALF), 严重威胁着人体健康^[5]。研究表明, 大多数的 ALF 是由于药物及细菌耐药性引起的肝损伤进一步发展而成, 其发病率和死亡率都很高, 临床上肝移植才能有效治疗和缓解 ALF 中末期^[6-8]。目前, ALF 尚缺乏特效的治疗药物, 一般是病因治疗、抗炎、抗病毒、降酶、退黄以及免疫调节治疗, 严重者则需要进行肝移植、人工肝等^[9]。迄今为止, 肝移植是治疗 ALF 最有效的方法^[10-11]。然而, 由于肝源稀缺和肝移植技术的局限性, 肝移植手术的成功率较低, 对症治疗只能暂时缓解症状, 仍影响患者的生活质量; 手术疗法则费用较高、适配性较小, 预后极差。因此, ALI 已成为世界范围内的公共卫生问题^[12], 研究开发预防或治疗 ALI 的有效药物对于缓解肝病及重症具有重要意义。

竹节参, 又称为“竹节人参”、“白三七”或“七叶子”, 五加科人参属植物竹节参 (*Panax japonicus* C. A. Mey) 的干燥根茎, 始载于赵学楷所撰的《百草镜》, 其性温, 味甘、微苦, 归肝、脾、肺经, 具有散瘀止血, 消肿止痛、滋补强壮、祛风除湿的功效, 主要分布在湖北、贵州及四川等地, 其中, 湖北恩施最为丰富, 是恩施道地药材, 土家珍稀名贵的“七”类药材之一^[13]。周静等^[14]研究表明, 竹节参的主要活性成分为糖类、皂苷类、核苷类、氨基酸类、挥发油类及无机盐类等, 具有保肝、促进消化、镇静、抗疲劳、降血脂、改善睡眠、保护心脑血管、调节免疫、抗炎镇痛、抗肿瘤等作用。本课题组前期研究发现^[15], 以竹节参为主药的道地中成药复方竹节参片对于肝损伤具有潜在的治疗靶点, 并预测了其潜在活性成分对于 PI3K/AKT 通路和 NF- κ B 信号通路上的关键蛋白尤为敏感, 为复方竹节参片治疗肝损伤提供了一定的理论参考。

本课题组前期研究表明^[16], 氧化应激和炎症反

应是肝损伤的主要致病因素, 竹节参多糖 (PSPJ) 可以通过激活 Nrf2-ARE 信号通路增强抗氧化酶的活力而发挥抗氧化作用, 进而改善肝损伤症状。PI3K/AKT/NF- κ B 信号传导与氧化应激和炎症反应密切相关^[17]。然而, PSPJ 是否对肝损伤治疗中的 PI3K/AKT/NF- κ B 信号传导发挥抗炎和抗氧化作用仍然未知。因此, 本研究旨在探讨 PSPJ 对 CCl₄ 诱导的 ALI 的改善作用, 并从 PI3K/AKT/NF- κ B 角度探讨其作用机制, 为临床上开发天然药物治疗 ALI 提供深入的理论依据和可靠的实验数据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

竹节参, 湖北省宣恩县椿木营竹节参培育种植基地, 经湖北民族大学文德鉴副教授鉴定为五加科植物竹节参的干燥根茎; CCl₄, 化学纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 多聚甲醛, 分析纯, 北京兰杰柯科技有限公司; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体、H&E 染色试剂盒、牛血清白蛋白 (BSA)、枸橼酸盐、BCA 蛋白质试剂盒、一抗稀释液、二抗稀释液, 上海碧云天生物技术有限公司; IHC 试剂盒、SABC-POD 试剂盒 (1/2KIT)、DAB 显色试剂盒、磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2), 武汉博士德生物工程有限公司; 联苯双酯滴丸, 北京协和药厂; 双蒸水, 恩施州华圩科技有限公司; 二甲苯, 分析纯, 南京化学试剂股份有限公司; 无水乙醇 (分析纯)、乌拉坦 (分析纯)、TBST 缓冲液, 默克生命科学有限公司; PI3K 抗体、GAPDH 抗体, 美国界面蛋白质技术公司; 磷酸化 PI3K (p-PI3K) 抗体, 美国 CST 公司; AKT 抗体, 美国 SAB 公司; 磷酸化 AKT 抗体、NF- κ B 抗体、磷酸化 NF- κ B 抗体、IL-1 β 抗体, 沈阳万类生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、ELC 发光液, 武汉科瑞科技有限公司。

1510-01611C 型全波长酶标仪、A44116 型凝胶成像系统、Fluor Chem E 凝胶成像系统, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; VT1200S 型石蜡切片机, 德国 Leica Biosystems 公司; E100 型正置光学显微镜, 日本 Nikon 公司; B212AT04E 型电泳及转膜系统,

美国 Bio-Rad 公司; BT25S 型高精度天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 5811 型高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 PSPJ 制备及质量分数测定

将竹节参置于 37 °C 烘箱中干燥 6 h, 然后用中药粉碎机进行粉碎, 取 20 g 粉碎后竹节参室温下用 400 mL 体积分数 95% 乙醇浸泡 48 h, 其中固液比(g : mL) 为 1 : 20; 接着, 将其加热回流 2 h, 过滤, 取滤渣; 然后, 重复以上回流步骤, 分别在 400 mL 体积分数 80% 乙醇及 400 mL 双蒸水下回流, 收集滤液, 将滤液或经旋转蒸发器浓缩(50 °C) 至体积为滤液体积的 50% (或 20%) 后, 用氯仿-异戊醇(体积比 24 : 1) 溶液脱蛋白 [$V(\text{滤液或浓缩液}) : V(\text{氯仿-异戊醇}) = 5 : 1$] 充分混合、高速冷冻离心机离心(4 °C, 12000 r/min, 10 min); 脱蛋白离心结束后, 小心吸取上清液, 将其缓慢加入到快速搅拌下的 4 倍体积的体积分数 80% 乙醇中进行醇沉; 然后, 置于 4 °C 冰柜中放置 12 h; 过滤、收集沉淀, 将沉淀在 37 °C 下干燥 60 min, 即得 1.462 g PSPJ, 提取率为 7.31% (提取率/% = 提取物质量/生药用量 \times 100)。运用苯酚-硫酸法测定 PSPJ 质量分数^[18]: 配制质量浓度为 0.0758 g/L 的 PSPJ 待测液, 经葡萄糖标准线性回归方程 $y = 3.39x + 0.004$ ($R^2 = 0.9976$) 计算得 PSPJ 待测液中糖质量浓度为 0.0696 g/L, 即得 PSPJ 的中性多糖的质量分数为 91.8% (质量分数/% = 测定的待测液质量浓度/配制的待测液质量浓度 \times 100)。

1.2.2 ALI 大鼠分组、造模与给药

目前, 常用的 ALI 动物模型有 CCl₄、对乙酰氨基酚 (APAP)、 α -萘异硫氰酸酯 (ANIT)、D-氨基半乳糖/脂多糖 (D-GalN/LPS) 和 3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢-2,4,6-三甲基吡啶 (DDC) 5 种动物模型。CCl₄ 诱导 ALI 模型简便易操作、可重复性好、死亡率较低, 与人类肝脏疾病在病理生理方面上相似度更高, 是经典的化学性肝损伤模型, 因此, 本文采用 CCl₄ 诱导法进行造模^[19-20]。

实验动物为 SPF 级 SD 雄性大鼠 50 只, 6 周龄 (辽宁长生生物技术股份有限公司), 体质量(200 \pm 20) g, 适应性喂养 7 d 后开始实验。饲养在温度(24 \pm 2) °C、相对湿度 55%~65%、12 h 光照/12 h 黑暗的环境中, 自由饮水进食。动物实验设计得到湖北民族大学伦理委员会批准 [(2021) 57]。

将 SD 大鼠随机分为 6 组: 空白对照组、模型组 (CCl₄ 诱导, 未用药)、联苯双酯 (LBSZ, 100 mg/kg, 以 SD 大鼠体质量为基准, 下同) 组、PSPJ 低剂量 (50 mg/kg) 组、PSPJ 中剂量 (100 mg/kg)

组、PSPJ 高剂量 (200 mg/kg) 组, 每组 5 只。根据《中国药典》^[18] 中竹节参成人药剂量 (6~9 g) 与“实验动物与人的体表面积换算关系”进行计算, 最终按照 1 : 2 : 4 给药量分为 PSPJ 低剂量组 50 mg/kg、中剂量组 100 mg/kg、高剂量组 200 mg/kg。空白对照组腹腔注射生理盐水, 其余 5 组大鼠在第 1、4、7 d 注射质量分数为 12% 的 CCl₄ 生理盐水溶液, 注射量为 5 mL/kg。除空白对照组和模型组大鼠灌胃生活饮用水外, 其余 4 组大鼠灌胃相应浓度的药物, 灌胃体积为 5 mL/kg, 每天 2 次。第 7 d 给药结束后, 晚上禁食不禁水 > 12 h, 次日麻醉收集大鼠肝脏组织。

1.2.3 样本的采集及处理

称大鼠的体质量并记录, 按照 6 mL/kg 的剂量腹腔注射质量浓度 200 g/L 乌拉坦水溶液对大鼠进行麻醉后收集血液, 离心(4 °C, 4000 r/min, 15 min), 分离血清进行检测。取出肝脏组织, 用滤纸吸干后称其质量, 作为肝脏质量。

1.2.4 大鼠行为学变化

观察各组大鼠的行为学变化以及一般情况, 如饮食、大小便、毛发、运动量、精神状态等。

1.2.5 大鼠体质量及肝脏指数计算

每天对大鼠进行称重并记录其体质量变化, 按式 (1) 计算肝脏指数:

$$I/\% = m_1/m_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: I 为肝脏指数, %; m_1 为肝脏质量, g; m_0 为大鼠体质量, g。

1.2.6 苏木素-伊红 (H&E) 染色

取大鼠肝组织用多聚甲醛固定 24 h, 大鼠肝组织的体质量分数为 4%, 经脱水、透明、浸蜡、包埋后用石蜡切片机制成厚度 5 μ m 左右的切片, 然后 H&E 染色, 最后用中性树脂胶封片, 在正置光学显微镜下观察肝脏组织的病理变化并采集病理图片。

1.2.7 免疫组织化学 (IHC) 染色检测

肝组织脱水: 脱水用的乙醇体积分数从 70% \rightarrow 75% \rightarrow 80% \rightarrow 90% \rightarrow 95% (各 1 h) \rightarrow 无水乙醇 (30 min) \rightarrow 无水乙醇 (30 min), 即由低体积分数逐步到高体积分数包埋后制成蜡块, 将包埋组织的蜡块固定在切片机上, 修块, 切片 (厚度 5 μ m), 经二甲苯脱蜡 3 次, 每次 5 min。然后经过无水乙醇 (体积分数 95%、85%、75%) 复水, 每梯度 1 min, 双蒸馏水浸泡 1 min, 用 PBS 洗涤后, 用 SABC-POD 试剂盒淬灭失活组织内源性过氧化物酶, 再经枸橼酸盐进行抗原修复, 质量分数 5% 的牛血清白蛋白抗原封闭; 一抗、二抗孵育, DAB 显色试剂盒显色后进行苏木素复染, 同上步骤经梯度乙醇、二甲苯脱水, 中性树脂封片后正置光学显微镜下观察拍照。

1.2.8 蛋白免疫印迹检测

蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、NF- κ B、p-NF- κ B、IL-1 β 蛋白的表达水平。

将大鼠肝组织通过匀浆、变性和超声提取样本总蛋白, 用 BCA 蛋白质试剂盒测量蛋白质浓度以确定上样量。配制聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶, 并对蛋白质进行上样、电泳、转膜、封闭, 然后将膜与用一抗稀释液稀释好的一抗 (检测蛋白的抗体) 在 4 °C 孵育 12 h, 一抗包括 PI3K (体积比 1 : 1000)、p-PI3K (体积比 1 : 1000)、AKT (体积比 1 : 1000)、p-AKT (体积比 1 : 500)、NF- κ B (体积比 1 : 2000)、p-NF- κ B (体积比 1 : 2000)、IL-1 β (体积比 1 : 1000) 和 GAPDH (体积比 1 : 2000); 将膜与用二抗稀释液稀释好二抗 (体积比 1 : 10000) 在室温下孵育 1 h, 再次用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 吸干多余水分; 用化学发光试剂检测抗原-抗体复合物, Fluor Chem E 凝胶成像系统捕获图像, 并使用 Image J 软件进行凝胶图像分析。

1.2.9 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计数据并分析结果, 计量数据以均数 \pm 标准差 ($\pm s$) 表示, 样品数 $n=5$; 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验, 若不符合正态分布采用非参数检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。利用 Origin 2022 软件进行制图。

2 结果与讨论

2.1 PSPJ 对 ALI 大鼠一般情况和体征的影响

实验期间, 空白对照组大鼠毛色光滑, 动作灵敏, 反应迅速, 食欲佳, 大便正常, 无异常反应出现; 而模型组大鼠在造模后出现精神萎靡, 活动减少, 毛色杂乱泛黄无光泽, 经常出现弓背现象; 空白对照组大鼠反应迅速, 动作灵敏, 皮毛整洁有光泽; 模型组大鼠活动较少, 皮毛油腻; LBSZ 组和 PSPJ 各剂量给药组相对模型组一般情况均有不同程度缓解和好转, 其中, LBSZ 组和 PSPJ 高剂量组干预后观察到上述体征改善最为明显。

2.2 PSPJ 对 ALI 大鼠体质量及肝脏指数的影响

图 1 为 6 组大鼠体质量随时间的变化趋势。由图 1 可知, 空白对照组大鼠在正常喂养条件下, 体质量相对稳定; 模型组大鼠由于体内炎症及腹水的不断增多, 体质量大体上持续上升。PSPJ 中、高剂量组及 LBSZ 组大鼠体质量先有所增加, 后又恢复正常, 可能是由于用药之后身体炎症及腹水减轻所致。由于天然多糖具有较高的生物安全性、生物降解性及多种生物活性, 可以通过相关的信号通路来

调节炎症^[21], 如铁皮石斛多糖^[22]可以抑制 NLRP3 炎症小体的表达, 降低促炎细胞因子 (IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6) 的表达; 黄芪多糖^[23]可以降低促炎细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 的表达。

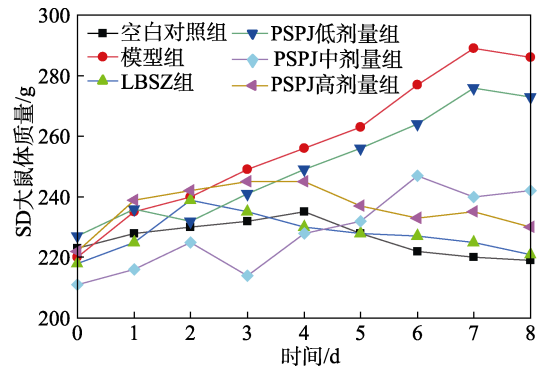


图 1 6 组大鼠体质量随时间的变化趋势

Fig. 1 Trend of body mass change of rats with time in six groups

PSPJ 是通过抑制丙二醛的产生、降低一氧化氮水平、增加超氧化物歧化酶的数量达到抑制炎症的作用^[24]。

表 1 6 组大鼠的肝脏指数比较

Table 1 Comparison of liver index of rats in six groups

组别	m_0/g	m_1/g	$I/\%$
空白对照组	220.00 \pm 1.00	5.63 \pm 0.59	0.025 \pm 0.002
模型组	291.33 \pm 4.72 ^①	8.98 \pm 0.24 ^①	0.031 \pm 0.001 ^①
LBSZ 组	232.33 \pm 15.50	6.12 \pm 0.77	0.026 \pm 0.001
PSPJ 低剂量组	274.67 \pm 9.06	7.84 \pm 0.18	0.028 \pm 0
PSPJ 中剂量组	244.67 \pm 10.26	6.32 \pm 0.65	0.026 \pm 0.002
PSPJ 高剂量组	222.00 \pm 7.00 ^②	5.60 \pm 0.53 ^②	0.025 \pm 0.001 ^②

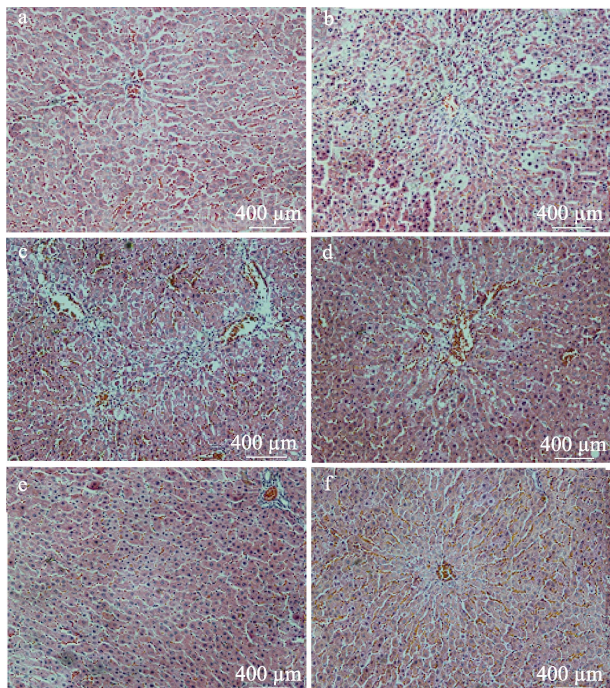
①与空白对照组相比, $P<0.05$; ②与模型组相比, $P<0.05$ 。

由表 1 可知, 与空白对照组相比, 模型组体质量、肝脏质量和肝脏指数均显著上升 ($P<0.05$), 证明模型的有效性。这是由于 CCl_4 作为一种肝毒性化学试剂, 影响 DNA 和细胞膜, 导致脂质氧化降解, 激发肝组织的氧化应激, 刺激肝细胞分泌大量炎症因子, 进而刺激免疫相关细胞产生大量介质诱导局部炎症反应, 激活半胱氨酸吸入蛋白酶, 并导致细胞凋亡, 所以出现大量腹水及炎症^[25-26]; 与模型组比较, PSPJ 低剂量组、PSPJ 中剂量组、PSPJ 高剂量组体质量、肝脏质量和肝脏指数均降低, 表明 PSPJ 通过降低氧化应激, 增强抗氧化能力, 从而达到抑制肝脏炎症反应, 对急性肝炎有一定的治疗效果。尤其是 PSPJ 高剂量组和 LBSZ 组体质量、肝脏质量和肝脏指数水平显著降低, 具有统计学意义。此外, PSPJ 高剂量组效果接近于 LBSZ 组。LBSZ

作为治疗肝炎的降酶药物，可以通过诱导低黑色素 P450 酶系活性升高以降低 CCl₄ 代谢过程中还原性辅助酶及氧分子的消耗，达到保护肝细胞生物膜的结构和功能，减轻肝损伤^[27]。

2.3 PSPJ 对 ALI 大鼠肝脏病理学的影响

图 2 为 6 组大鼠肝脏组织 H&E 染色后的照片。



a—空白对照组；b—模型组；c—PSPJ 低剂量组；d—PSPJ 中剂量组；e—PSPJ 高剂量组；f—LBSZ 组

图 2 6 组大鼠肝脏组织 H&E 染色后照片

Fig. 2 Photos of live tissue after H&E staining of rats in six groups

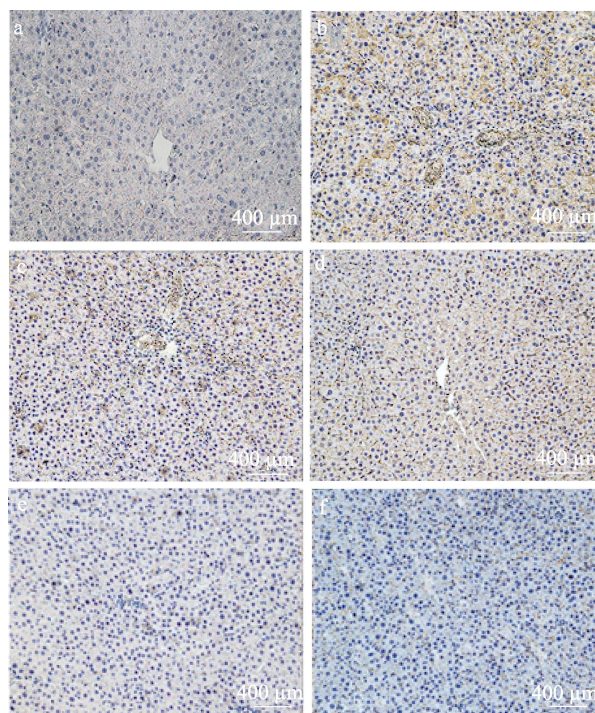
由图 2 可知，空白对照组大鼠肝细胞排列整齐、结构完整，肝窦正常，肝索呈放射状排列，胞浆着色均匀，细胞核清晰（图 2a）；模型组大鼠肝细胞可见肝细胞基本结构消失，表现为肝细胞弥漫性肿胀、碎片状坏死，肝小叶结构不清、中央实质细胞碎片状坏死，肝索排列紊乱，胞浆疏松化、内空泡样变性，肝窦隙狭窄，几近消失（图 2b）。这是由于当肝细胞受到有害因素（CCl₄）刺激时，机体产生过多的高活性自由分子，如活性氧（ROS）、一氧化氮合酶（NOS）等，导致氧化及抗氧化防御系统失调，产生大量的氧化空间体，导致细胞内空泡样变性、炎症浸润，炎症常波及汇管区周围小叶周边区肝细胞，引起碎屑样坏死，并在坏死边缘伴有肿胀变性的多核肝细胞^[28]。与模型组相比，PSPJ 低剂量组和 PSPJ 中剂量组大鼠 1/3 以内肝细胞水肿，汇管区炎细胞浸润和点状坏死灶较模型组显著降低（图 2c、图 2d）。LBSZ 组和 PSPJ 高剂量组肝组织损伤明显减轻（图 2e、图 2f）。LBSZ 组和 PSPJ 高

剂量组形态结构趋近空白对照组。结果表明，PSPJ 能有效保护急性肝损伤大鼠的肝脏组织病理损伤，以 PSPJ 高剂量组效果明显，说明 PSPJ 可以改善 CCl₄ 导致的肝损伤。

2.4 免疫组织化学检测分析

图 3 和图 4 为免疫组化检测肝组织 NF-κB 的阳性表达结果。PI3K/AKT/NF-κB 信号通路的关键炎症蛋白是 NF-κB，而 NF-κB 作为 PI3K/AKT 下游信号分子，通过 IκB 激酶（IKK）链接，AKT 磷酸化后可激活下游 NF-κB 转入核，所以免疫组化检测肝组织 NF-κB 的阳性表达量。

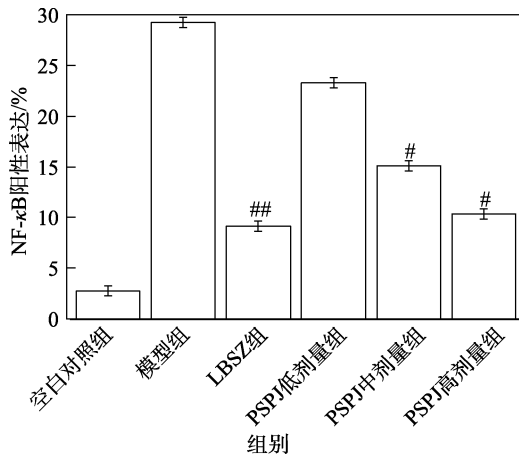
由图 3 和图 4 可知，空白对照组细胞核未见 NF-κB 阳性；与空白对照组相比，模型组和 PSPJ 低剂量组大量肝细胞中 NF-κB 阳性表达升高呈棕色且大多分布在细胞质和细胞核中（ $P < 0.01$ ），说明 CCl₄ 诱导 ALI 大鼠模型的成功；与模型组相比，LBSZ 组阳性表达均显著减少（ $P < 0.01$ ），PSPJ 中剂量组和高剂量组表达减少（ $P < 0.05$ ），说明 PSPJ 可能通过作用于 NF-κB 介导减轻了肝脏细胞炎症，降低 NF-κB 磷酸化活性水平，进而减少下游炎症因子 IL-1β、NF-κB 的表达，减轻 CCl₄ 诱发的急性肝脏炎症反应。从组织病理学和细胞层次说明，PSPJ 可以改变 CCl₄ 大鼠肝脏组织的病理变化。



a—空白对照组；b—模型组；c—PSPJ 低剂量组；d—PSPJ 中剂量组；e—PSPJ 高剂量组；f—LBSZ 组

图 3 6 组大鼠肝脏组织 IHC 染色 NF-κB 的表达

Fig. 3 Expression of NF-κB by IHC staining of liver tissue of rats in six groups



注: #表示与模型组比较, $P < 0.05$; ##表示与模型组比较, $P < 0.01$

图 4 6 组大鼠肝脏组织 IHC 染色 NF- κ B 的表达比较

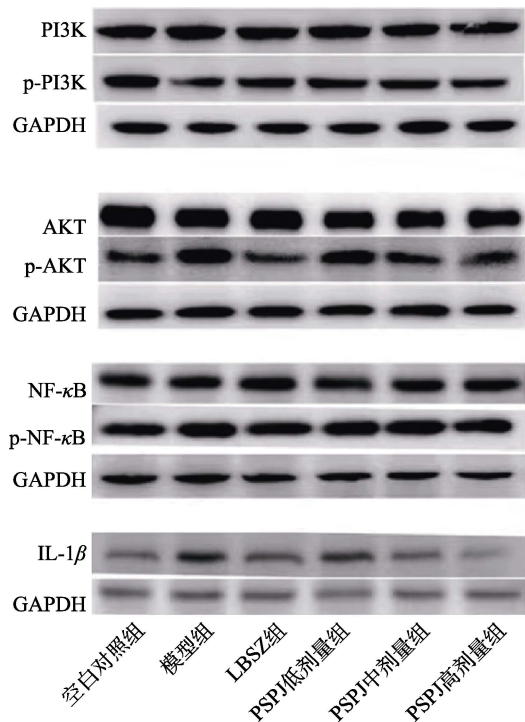
Fig. 4 Comparison of IHC staining of NF- κ B expression in liver tissues of rats in six groups

2.5 Western blot 检测分析

图 5 和图 6 为 Western blot 检测的结果。Western blot 检测是通过改变蛋白质的空间构象, 将其变为单链结构后, 进行抗原-抗体免疫反应检测其含量。此方法能准确检测不同肝脏组织样本间蛋白质的含量, 从而揭示蛋白质表达量的变化。

由图 5 和图 6 可知, 与空白对照组比较, 模型组大鼠肝组织 p-PI3K 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$), PI3K、p-AKT、p-NF- κ B、IL-1 β 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 用药组 p-PI3K 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$), p-AKT、IL-1 β 蛋白表达显著下降 (分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 显示 PSPJ 可能通过增加机体的 p-PI3K, 抑制 p-AKT、IL-1 β 等炎症因子的表达, 从而减轻 CCl₄ 诱导的肝脏炎症。一般来说, PI3K 通过活化后的 AKT 激活底物靶蛋白 NF- κ B, 起到调控下游细胞增殖和炎症靶基因表达的作用, PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路是机体炎症反应的重要调节途径, 可以抑制肝损伤后的炎症反应及细胞凋亡, 发挥肝组织的保护作用。王文洲等^[29]通过基于白细胞介素(IL)-23/辅助性 T 细胞 17 (Th17)炎症轴与 PI3K/AKT/NF- κ B 信号轴相关性, 探讨了运脾泻肺化痰汤对幼龄哮喘大鼠气道炎症、黏液高分泌的影响, 结果表明, 经卵清蛋白 (OVA) 诱导后模型组 IL-17 与 p-PI3K、p-AKT 及 p-NF- κ B 蛋白表达升高, 经干预后同时下降, 表明 IL-23/Th17 炎症轴与 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路转导存在联系。因此, Western blot 检测可以从蛋白层面证实, PSPJ 可能通过调节 ALI 大鼠肝 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路相关蛋白 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、NF- κ B、p-NF- κ B 的表达水平以及炎症指标 IL-1 β 的表达水平来减轻 CCl₄ 诱导的大鼠 ALI 症状。

PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路参与激活炎症因子, 可以有效抑制 CCl₄ 诱导的相关纤维增生、细胞因子风暴及炎症反应, 从而改善 CCl₄ 导致大鼠肝脏组织的损伤。PI3K/AKT 信号通路是由磷酸化磷脂酰肌醇-3-羟基的脂类激酶活性的 PI3K 及下游 AKT 组成, AKT 被磷酸化并被激活, 进一步调控下游的靶基因。PI3K/AKT 作为经典的信号转导途径, 参与机体的免疫应答和炎症反应, 对细胞的增殖、凋亡、存活和代谢具有重要意义^[30-31]。PI3K/AKT 作为 ALI 感染期间产生炎症介质的关键因子, 可以调控包括趋化因子 (RANTES)、IL-6、IL-11 等炎症因子。



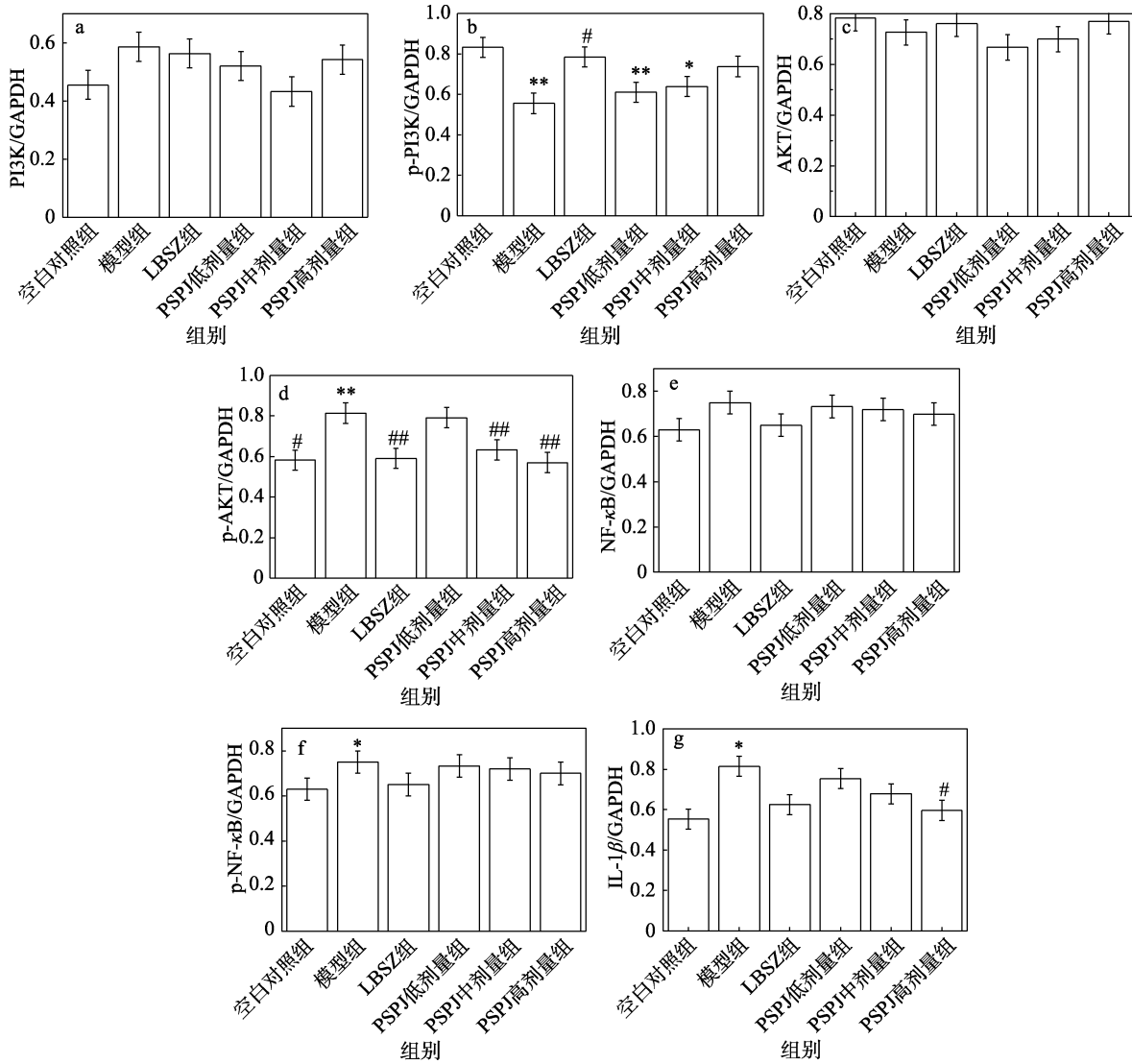
注: GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图 5 6 组大鼠肝脏组织 PI3K/AKT/NF- κ B 通路蛋白印迹图
Fig. 5 Western blot result of PI3K/AKT/NF- κ B pathway in liver tissue of rats in six groups

当肝脏发生炎症时, PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路中的 NF- κ B 乙酰化, 从而转录下游炎症因子, 导致炎症因子加快释放及炎症介质加快合成。Westron blot 检测结果显示, PSPJ 能降低 p-AKT、IL-1 β 的蛋白表达, 升高 p-PI3K 的蛋白表达, 表明 PSPJ 可能通过去乙酰化修饰基因组蛋白的位点, 尤其是通过 NF- κ B、p-NF- κ B 抑制基因转录, 下调炎症因子的表达, 发挥抗炎的作用。PI3K/AKT/NF- κ B 通路的激活来改善 ALI。QIU 等^[32]研究表明, 竹节参总皂苷在体内和体外通过 p62 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 途径和腺苷酸活化蛋白激酶-乙酰辅酶 A 羧化酶/过氧化物酶体增殖物激活受体 (AMPK-ACC/PPAR) 轴缓解急性酒精性肝氧化应激和肝脂肪变性。DAI 等^[33]研究表明, 竹节参皂苷可通过 NF- κ B/

MAPK 信号通路来抑制脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞的炎症反应, 是预防 ALI 的一种很有潜力的天然药物。吴震英等^[34]从细胞水平考察了铜死亡在脓毒症 ALI 中的作用, 发现小鼠发生脓毒症 ALI 后,

肝脏内铜死亡相关蛋白表达下降, 即铜死亡参与了脓毒症导致的 ALI。徐瑞等^[35]研究表明, PSPJ 可能通过抗氧化和抗炎途径来减缓乙酰氨基酚 (APAP) 诱导的 ALI。



注: *表示与空白对照组比较, $P < 0.05$; **表示与空白对照组比较, $P < 0.01$; #表示与模型组比较, $P < 0.05$; ##表示与模型组比较, $P < 0.01$

图 6 6 各组大鼠 PI3K (a)、p-PI3K (b)、AKT (c)、p-AKT (d)、NF-κB (e)、p-NF-κB (f) 及 IL-1β (g) 蛋白水平比较

Fig. 6 Comparison of PI3K (a), p-PI3K (b), AKT (c), p-AKT (d), NF-κB (e), p-NF-κB (f) and IL-1β (g) protein levels of rats in six groups

3 结论

本研究探讨了 PSPJ 通过 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路对 ALI 大鼠的影响。由 H&E 染色可知, 模型组大鼠肝小叶中心坏死, 肝脏细胞呈现空泡样改变, 炎症细胞浸润, 肝细胞素消失细胞凋亡。用药组肝脏病理变化显示, 肝细胞炎性浸润明显减少, 肝细胞坏死程度较模型组减轻; 通过观测大鼠的一般情

况和体质量, 发现模型组大鼠由于体内炎症及的不断增多, 体质量大体上持续上升 ($P < 0.05$); PSPJ 中、高剂量组及 LBSZ 组大鼠体质量先增加 ($P < 0.05$), 后又恢复正常 ($P < 0.05$)。免疫组化检测结果表明, 用药组阳性表达明显减少 ($P < 0.05$); Western blot 检测表明, 与空白对照组相比, 模型组大鼠肝组织 p-PI3K 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$), PI3K、p-AKT、p-NF-κB、IL-1β 蛋白表达显著升高

($P < 0.05$); 与模型组相比, 用药组 p-PI3K 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$), p-AKT、IL-1 β 蛋白表达显著下降 (分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 表明 PSPJ 可有效抑制 ALI PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路的激活。

综合结果表明, PSPJ 可减轻炎症细胞因子和凋亡蛋白表达, 从而对 ALI 大鼠产生保护作用, 其作用可能与抑制 PI3K/AKT/NF- κ B 通路活化有关: 通过增强氧化应激水平, 降低 p-AKT、IL-1 β 、NF- κ B 等炎症指标, 从而发挥其抗炎、抗氧化的作用。然而, 本研究仍存在一定的不足, 缺少体外实验 (如细胞水平) 的机制研究, 后期将以此为基础, 继续深入系统的研究, 为其临床上开发保肝药提供更多的实验和理论依据。

参考文献:

- ZHENG Y F, CUI B P, SUN W R, *et al.* Potential crosstalk between liver and extra-liver organs in mouse models of acute liver injury[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2020, 16(7): 1166-1179.
- TREFTS E, GANNON M, WASSERMAN D H. The liver[J]. *Current Biology*, 2017, 27(21): 1147-1151.
- KHOURY T, RMEILEH A A, YOSHA L, *et al.* Drug induced liver injury: Review with a focus on genetic factors, tissue diagnosis, and treatment options[J]. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 2015, 3(2): 99-108.
- ZHANG C, SHI X, SU Z P, *et al.* CD36 deficiency ameliorates drug-induced acute liver injury in mice[J]. *Molecular Medicine*, 2021, 27(1): 57.
- FENG X, BAO J Y, SONG C X, *et al.* Functional role of miR-155 in physiological and pathological processes of liver injury (review)[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2021, 24(4): 714.
- MORRIS S M, CHAUHAN A. The role of platelet mediated thromboinflammation in acute liver injury[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1037645.
- ZHANG Y, XUE W L, ZHANG W Q, *et al.* Histone methyltransferase G9a protects against acute liver injury through GSTP1[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2020, 27(4): 1243-1258.
- YANG W C, TAO K X, ZHANG P, *et al.* Maresin 1 protects against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury by inhibiting macrophage pyroptosis and inflammatory response[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 195: 114863.
- WANG X B (王宪波), WANG X J (王晓静), LIU H M (刘慧敏), *et al.* Guidelines for the integrated traditional Chinese and Western medicine diagnosis and treatment of acute-on-chronic liver failure[J]. *Journal of Clinical Hepatobiliary Disease (临床肝胆病杂志)*, 2023, 39(7): 1547-1552.
- VASQUES F, CAVAZZA A, BERNAL W. Acute liver failure[J]. *Current Opinion in Critical Care*, 2022, 28(2): 198-207.
- DONG V, NAN C R, KAR V C. Pathophysiology of acute liver failure[J]. *Nutrition in Clinical Practice*, 2020, 35(1): 24-29.
- WU G, WIN S, THAN T A, *et al.* Gut microbiota and liver injury (I)-acute liver injury[M]. Berlin: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020.
- National Pharmacopoeia Commission. Three Parts of the Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press (中国医药科技出版社), 2020.
- ZHOU J (周静), FU X Y (付先芸), CAI S J (蔡三金), *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Panax japonicus* and predictive analysis on quality markers [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药)*, 2021, 52(9): 2819-2830.
- SONG T L (宋添力), SUN Y Z (孙永章), LI Q (李奇), *et al.* Mechanism of tujia medicine of fufang *Panax japonicus* tablets against liver injury: Based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research (特产研究)*, 2023, 45(4): 57-68.
- TANG L (唐浪), SONG T L (宋添力), WU G Y (吴广阳), *et al.* Anti-oxidative protection of *Panax japonicus* polysaccharide on CCl₄-induced acute liver injury in rats based on Nrf2-ARE signaling pathway[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药)*, 2023, 54(15): 1-9.
- JEON Y D, LEE J H, LEE Y M, *et al.* Puerarin inhibits inflammation and oxidative stress in dextran sulfate sodium induced colitis mice model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109847.
- ZHANG J (张杰), LI C Y (李春艳), LI J P (李劲平), *et al.* Comparative study on the determination of polysaccharide in rhizoma of *Panax japonicus* by anthrone sulfuric acid method phenol sulfuric method[J]. *Zhongnan Pharmacology (中南药学)*, 2012, 10(6): 421-424.
- TAO Y Y (陶艳艳), CHEN G F (陈高峰), LIU C H (刘成海). Evaluation of animal models of acute liver injury and its application in pharmacology of traditional Chinese medicine[J]. *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine (上海中医药杂志)*, 2019, 53(11): 12-19.
- NAN C Y (南彩云), ZHONG G Y (钟国跃), ZHU J X (朱继孝), *et al.* Protective effects of five chemical constituents from *Dianthus caryophyllus* flowers on mice with carbon tetrachloride liver injury[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin (中国药理学通报)*, 2019, 35(2): 255-260.
- YANG Z Q (杨忠奇). Dosage interpretation of proprietary Chinese medicines in the Chinese pharmacopoeia 2020[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press (中国医药科学技术出版社), 2021.
- LIU X X (刘欣欣), ZUO C L (左翠玲), SUN L N (孙丽娜), *et al.* Research progress of natural polysaccharides as nanocarriers for the treatment of inflammatory bowel disease[J]. *Modern Food Science and Technology (现代食品科技)*, 2023, 39: 10-17.
- ZHANG Y, WU Z J, LIU J X, *et al.* Identification of the core active structure of a *Dendrobium officinale* polysaccharide and its protective effect against dextran sulfate sodium-induced colitis via alleviating gut microbiota dysbiosis[J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109641.
- ZHENG H (郑宏), WANG L (王蕾), ZOU H Y (邹海艳). Study on effects of total saponins of *Panacis Japonici Rhizoma* on lipopolysaccharide-induced inflammation in BV2 cells and its mechanism[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine Information (中国中医药信息杂志)*, 2023, 30(08): 106-112.
- SCHOLTEN D, TREBICKA J, LIEDTKE C, *et al.* The carbon tetrachloride model in mice[J]. *Lab Anim*, 2015, 49(S1): 4-11.
- LIU Y (刘宇). Protective effect of α -hederin on CCl₄-induced acute liver injury and mechanism study[D]. Henan University of Science and Technology (河南科技大学), 2022.
- HWA Y L, YOUNG Y, HAN J C. The effects of herbal extracts on CCl₄-induced ROS accumulation and cell death in hepatocytes[J]. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 2018, 18(3): 257-264.
- ZHANG X, ZHANG N F, KAN J, *et al.* Anti-inflammatory activity of alkali-soluble polysaccharides from *Arctium lappa* L. and its effect on gut microbiota of mice with inflammation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 773-787.
- WANG W Z (王文洲), GAO Q Q (高倩倩), CHEN Z (陈竹). Yunpi xiefei huatan decoction alleviates airway inflammation and mucus hypersecretion in young asthmatic rats via inhibiting PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine (中国中西医结合杂志)*, 2023, 43(9): 1108-1116.
- LI D (李多), PENG Z (彭昭), ZHANG Z T (张泽天), *et al.* Reversal of ulcerative colitis in rats by compound cypress liquid via PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Gerontology (中国老年学杂志)*, 2023, 43(9): 2241-2244.
- YAO D B, DONG M, DAI C L, *et al.* Inflammation and inflammatory cytokine contribute to the initiation and development of ulcerative colitis and its associated cancer[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2019, 25(10): 1595-1602.
- QIU L, FENG R B, WU Q S, *et al.* Total saponins from *Panax japonicus* attenuate acute alcoholic liver oxidative stress and hepatosteatosis by p62-related Nrf2 pathway and AMPK-ACC/PPAR axis *in vivo* and *in vitro*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 317: 116785.