

海藻玉壶汤加减海藻甘草反药组合通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路减轻甲状腺肿大大鼠肝脏氧化应激

张继文, 廖文勇, 吴英豪, 徐向楠, 吴美晶, 刘晓庆, 陈绍红, 柳海艳,
于雪, 修琳琳*, 钟赣生*
(北京中医药大学, 北京 100029)

【摘要】 目的:探讨海藻-甘草反药组合于海藻玉壶汤中加减配伍应用对甲状腺肿大模型大鼠肝脏的保护作用及分子机制。方法:将128只雄性Wistar大鼠随机分为空白组、模型组、优甲乐组(20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、海藻玉壶汤(HYT)组(12.06 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、海藻玉壶汤加减海藻甘草组(去海藻组HYT-H、去甘草组HYT-G、去海藻甘草组HYT-HG)(9.90、10.26、8.10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、海藻甘草(HG)组(3.96 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)共8组,每组16只。除空白组外,其余各组连续14 d灌胃丙硫氧嘧啶(PTU)以构建甲状腺肿大病理模型,随后连续14 d给予相应药液进行治疗,以左甲状腺素钠片(优甲乐)为阳性药物进行灌胃处理。空白组给予去离子水灌胃。检测各组大鼠血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平;肝脏组织中活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)的水平;苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏病理学变化;透射电子显微镜观察肝细胞超微结构;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、磷酸化(p)-AMPK、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR、UNC-51样激酶1(ULK1)、p-ULK1蛋白表达情况。结果:与空白组比较,模型组大鼠血清AST、ALT水平显著升高($P<0.01$),肝脏组织中GSH/GSSG比例显著降低($P<0.01$),ROS、MDA含量显著升高($P<0.01$),p-ULK1/ULK1表达水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,HYT组大鼠血清AST、ALT水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),肝脏组织中GSH/GSSG比例显著升高($P<0.01$),ROS、MDA含量显著降低($P<0.01$);HE染色和透射电子显微镜观察肝组织形态学趋于正常;p-AMPK/AMPK明显升高($P<0.05$),p-mTOR/mTOR显著降低($P<0.01$),p-ULK1/ULK1显著升高($P<0.01$)。结论:含海藻和甘草的海藻玉壶汤对甲状腺肿大模型大鼠肝脏起到了一定的保护作用,效果优于各拆方组及海藻甘草组,其作用机制可能与激活AMPK/mTOR/ULK1信号通路诱导自噬,清除受损的细胞器和过氧化产物,并抑制ROS和MDA的生成,恢复氧化还原稳态有关。

【关键词】 海藻玉壶汤;海藻甘草反药组合;甲状腺肿大;肝脏氧化应激;腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/UNC-51样激酶1(ULK1)信号通路

[中图分类号] R277;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)12-0085-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260339

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260205.1030.001>

[网络出版日期] 2026-02-05 10:35:43



Haizao Yuhutang Modified with Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Incompatible Pair Alleviates Oxidative Stress in Liver of Goiter Rats via AMPK/mTOR/ULK1 Pathway

ZHANG Jiwen, LIAO Wenyong, WU Yinghao, XU Xiangnan, WU Meijing, LIU Xiaoqing,
CHEN Shaohong, LIU Haiyan, YU Xue, XIU Linlin*, ZHONG Gansheng*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 **Objective:** To investigate the protective effects and molecular mechanisms of the Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma incompatible herb pair within modified Haizao Yuhutang (HYT) on the liver of goiter model rats. **Methods:** A total of 128 male Wistar rats were randomly divided into eight groups ($n=16$ per group): blank group, model group, Euthyrox

[收稿日期] 2025-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274118)

[第一作者] 张继文,在读硕士,从事中药药性理论与临床应用研究,E-mail:jiwenz@outlook.com

[通信作者] *修琳琳,博士,副教授,硕士生导师,从事中药药性理论与临床应用研究,E-mail:xiulinlin@bucm.edu.cn;

*钟赣生,硕士,教授,博士生导师,从事中药药性理论与临床应用研究,E-mail:1206284369@qq.com

group ($20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), HYT group ($12.06 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), HYT-H group (de-Sargassum, $9.90 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), HYT-G group (de-Glycyrrhizae, $10.26 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), HYT-HG group (de-Sargassum and de-Glycyrrhizae, $8.10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and HG group ($3.96 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Except for the blank group, all rats were administered propylthiouracil (PTU) by gavage for 14 consecutive days to establish a goiter model, followed by 14 days of corresponding drug intervention. Levothyroxine sodium tablets (Euthyrox) were used as the positive control. The blank group received deionized water by gavage. Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured. Levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and oxidized glutathione (GSSG) in liver tissue were determined. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe histopathological changes in the liver, and transmission electron microscopy (TEM) was used to examine hepatocyte ultrastructure. Western blot was performed to detect the expression of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK (p-AMPK), mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR (p-mTOR), UNC-51-like kinase 1 (ULK1), and phosphorylated ULK1 (p-ULK1) in liver tissue. **Results:** Compared with the blank group, the model group showed significantly increased serum AST and ALT levels ($P<0.01$), a significantly decreased GSH/GSSG ratio in liver tissue ($P<0.01$), significantly increased ROS and MDA levels ($P<0.01$), and a significantly decreased p-ULK1/ULK1 ratio ($P<0.05$). Compared with the model group, the HYT group showed significantly decreased serum AST and ALT levels ($P<0.05$, $P<0.01$), a significantly increased GSH/GSSG ratio in liver tissue ($P<0.01$), and significantly decreased ROS and MDA levels ($P<0.01$). HE staining and TEM showed that liver morphology tended to return toward normal. In addition, the p-AMPK/AMPK ratio was significantly increased ($P<0.05$), the p-mTOR/mTOR ratio was significantly decreased ($P<0.01$), and the p-ULK1/ULK1 ratio was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion:** HYT containing Sargassum and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma exerts protective effects on the liver of goiter model rats, with superior efficacy compared with the component-deleted and HG groups. Its mechanisms may be related to activation of the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway, thereby inducing autophagy, promoting the clearance of damaged organelles and oxidative products, inhibiting ROS and MDA production, and restoring redox homeostasis.

[Keywords] Haizao Yuhutang; Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma incompatible pair; goiter; oxidative stress in the liver; adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/UNC-51-like kinase 1 (ULK1) signaling pathway

海藻-甘草配伍为“十八反”反药组合之一,属配伍禁忌,自北宋流传至今一直为医药从业者熟记,2025年版《中华人民共和国药典》一部中也注明二者不可同用。但“十八反”中仅有海藻、甘草均属于无毒中药,且二者配伍在临床中的应用广泛而有效^[1]。针对这一争议,课题组对海藻-甘草反药组合的量-毒-效关系进行了研究,结果显示在病理条件下,海藻-甘草反药组合在复方海藻玉壶汤中配伍应用并不完全表现出“相反”的特性^[2-3]。

人体是一个有机整体,肝脏与甲状腺在生理病理上存在密切的关联,甲状腺功能异常常继发肝脏代谢紊乱及氧化损伤^[4],由于肝脏含有丰富的线粒体,是活性氧(ROS)攻击的主要器官,因此氧化应激与肝脏疾病的发生发展密切相关^[5]。然而,现有研究多聚焦于海藻玉壶汤对甲状腺的作用,关于其是否通过干预肝脏发挥系统性调节作用及具体作用机制,目前尚缺乏深入探讨。课题组初步探索了其对于肝脏的生物学效应,发现该方不仅能纠正甲状腺功能减退引起的甲状腺肿,还对肝脏氧化抗氧化失衡有一定程度的纠正作用^[6-7]。其对肝脏的保护作用机制可能与激活核因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路以减轻肝脏氧化应激,抑制p53/胱天蛋白酶-3(Caspase-3)信号通路以减少肝细胞凋亡有关^[7]。

但单纯的抗氧化机制不足以完全阐释其复杂的调控作用。自噬作为一种细胞内的保护机制,能清除受损的细胞器和过氧化产物,从而减轻肝细胞的代谢负担和氧化应激,保护他们免受进一步的损害^[8]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和UNC-51样激酶1(ULK1)是细胞能量代谢的核心调控因子,三者形成动态调控网络,使细胞能快速响应能量波动,通过自噬和线粒体质量控制维持氧化还原稳态^[9]。过量的ROS能通过激活AMPK调节抗氧化物质的表达,从而抑制mTOR复合物,激活ULK1,促进自噬来发挥保护作用^[10]。基于此,本研究拟在前期工作基础上,聚焦AMPK/mTOR/ULK1信号通路,深入探讨海藻玉壶汤加减海藻-甘草反药组合是否通过激活自噬来减轻肝脏氧化应激损伤,并通过拆方对比,验证该反药组合于全方配伍的必要性,为临床安全用药提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 本实验选取128只SPF级Wistar品系雄性大鼠,体质量180~220 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司供应[实验动物合格证号SCXK(京)2024-0001,实验动物质量合格证编号No.110324241106780573]。所有实验动物均饲养于北京中医药大学实验动物中心[许可证号SYXK

(京)2023-0011]。饲养环境:温度(20±2)℃,相对湿度60%~70%。依据GB/T14924.3-2010国家标准,为其提供符合清洁级标准的专用饲料及去离子水,自由采食饮水。正式实验启动前,所有大鼠进行7 d适应性饲养。

1.2 伦理 实验方案已通过北京中医药大学动物伦理委员会审批,符合我国实验动物伦理审查标准,伦理批准编号为BUCM-2024111202-4128。

1.3 药物 海藻-甘草反药组合根据课题组前期研究选取2025年版《中华人民共和国药典》规定剂量高限的2倍^[11]。海藻玉壶汤的处方组成及各药材用量如下:海藻24 g、甘草20 g(乌拉尔甘草)、当归9 g、浙贝母9 g、川芎9 g、醋青皮9 g、陈皮9 g、昆布9 g、独活9 g、连翘9 g、法半夏9 g(批号分别为2104024、JZ2003052、2302019、2104080、2210019、2212032、2212003、2208049、2209050、2107028、73010511),其中法半夏由国药集团北京华邈药业有限公司提供,其余饮片由北京双桥燕京中药饮片厂提供。所有药材均由北京中医药大学中医学院中药教研室高级实验师李伟依据2025年版《中华人民共和国药典》鉴定为合格饮片。以6.3作为成人与大鼠间给药剂量的标准换算系数,结合成人及大鼠的标准体质量参数,完成各组等效给药剂量的计算。等效剂量分别为海藻玉壶汤12.06 g·kg⁻¹、海藻玉壶汤去海藻9.90 g·kg⁻¹、海藻玉壶汤去甘草10.26 g·kg⁻¹、海藻玉壶汤去海藻甘草8.10 g·kg⁻¹、海藻甘草3.96 g·kg⁻¹。各组对应的中药饮片加入10倍药量去离子水室温浸泡30 min,煮沸后文火煎煮2 h,过滤后收集。再加入8倍药量去离子水,煮沸后文火煎煮1 h,过滤后收集。将2次药液合并,水浴锅加热浓缩。浓缩后的生药浓度分别为海藻玉壶汤1.206 g·mL⁻¹、海藻玉壶汤去海藻0.990 g·mL⁻¹、海藻玉壶汤去甘草1.026 g·mL⁻¹、海藻玉壶汤去海藻甘草0.810 g·mL⁻¹、海藻甘草0.396 g·mL⁻¹。室温放凉后4℃冰箱保存备用。造模药物选用丙硫氧嘧啶片(PTU,上海朝晖药业有限公司,批号2208N12),阳性药选用左甲状腺素钠片(优甲乐,德国Merck KGaA公司,批号C10008832,规格50 μg/片);临用前,将上述药物分别充分溶解于去离子水中,配制成质量浓度分别为1 g·L⁻¹和2 mg·L⁻¹的溶液备用。

1.4 试剂 丙二醛(MDA)、ROS、谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒

(北京华英生物技术研究所,批号分别为20241216、20241217、20241218、20241220、241202、241202);苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1005);β-肌动蛋白(β-actin)蛋白抗体、ULK1抗体、磷酸化(p)-ULK1抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记亲和纯化羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为16396-1-AP、20986-1-AP、80218-1-RR、SA00001-2);AMPK抗体(英国Abcam公司,货号ab207442);p-AMPK抗体、mTOR抗体、p-mTOR抗体(美国CST公司,货号分别为2535、2983、2448);超敏化学发光检测试剂盒(北京百瑞极生物科技有限公司,货号BN16009)。

1.5 仪器 M400型冷冻混合球磨仪(德国Retsch公司);5424R型离心机(德国Eppendorf公司);Epoch型酶标仪(美国BioTek公司);BS-420型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);Mupid-2plus型电泳槽(日本Mupid公司);C600型成像系统(美国Azure Biosystems公司);Eclipse E100型正置光学显微镜(日本尼康公司);HT7800/HT7700型透射电子显微镜(日本日立公司)。

2 方法

2.1 动物造模及给药 根据体质量将大鼠随机分为空白组、模型组、优甲乐组、海藻玉壶汤(HYT)组、海藻玉壶汤去海藻(HYT-H)组、海藻玉壶汤去甘草(HYT-G)组、海藻玉壶汤去海藻甘草(HYT-HG)组、海藻甘草(HG)组,共计8组,每组16只。模型复制采用硫脲类抗甲状腺药PTU,除空白组外,其余各组灌服PTU,给药剂量为10 mg·kg⁻¹,连续造模14 d。造模第14天,取空白组16只与造模组中随机抽取的21只大鼠,进行眼眶取血,检测血清三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、促甲状腺素(TSH)水平,检测造模是否成功。造模第15天开始给药,各组给药剂量分别为:空白组生理盐水10 mL·kg⁻¹、优甲乐组20 μg·kg⁻¹、海藻玉壶汤12.06 g·kg⁻¹、HYT-H组海藻玉壶汤去海藻9.90 g·kg⁻¹、HYT-G组海藻玉壶汤去甘草10.26 g·kg⁻¹、HYT-HG组海藻玉壶汤去海藻甘草8.10 g·kg⁻¹、海藻甘草3.96 g·kg⁻¹。在给药期间,为了稳定模型,模型组与各给药组隔日灌服PTU,剂量同造模期。

2.2 样本采集 末次给药后,动物禁食不禁水12 h,使用异氟烷(4%用于诱导,2%用于维持)对大鼠进行麻醉,从腹主动脉抽血,静置4 h后,在4℃条件下、3 000 r·min⁻¹离心15 min,离心半径为8.4 cm(下同),留取上清并分装,于-80℃冷冻保存,待检

相关指标。迅速取出肝脏,一部分肝脏组织用预冷的多聚甲醛固定,进行病理学观察。取1 mm³大小肝脏组织用预冷的电镜固定液固定,用于透射电子显微镜观察。将剩余的肝脏组织取部分置于无RNA酶的冻存管中,于-80 °C冷冻保存,用于相关分子指标的检测。

2.3 检测指标

2.3.1 称重法计算肝脏系数 样本采集前称定大鼠最终体质量,迅速取出肝脏后称取肝脏质量,依据公式(肝脏系数=肝脏质量/大鼠最终体质量×100%)计算肝脏系数。

2.3.2 比色法及微量酶标法检测血清与肝组织生化指标 采集大鼠血清样本,采用比色法测定AST和ALT水平。制备肝脏组织匀浆,采用比色法测定MDA、ROS及GSH水平,采用微量酶标法测定GSSG水平。以上生化分析均由北京华英生物技术研究所完成。

2.3.3 HE染色观察肝组织病理形态 肝组织样品首先在4%多聚甲醛溶液中固定24 h,继而通过标准程序进行梯度乙醇脱水、石蜡包埋并制备成切片。切片经HE染色后,于光学显微镜下进行系统观察(放大倍率为×400),并同步完成图像采集。病理学评估主要针对肝小叶结构的完整性、肝细胞形态学变化及炎症细胞浸润程度等关键特征。

2.3.4 透射电子显微镜观察肝脏超微结构 取1 mm³肝组织于4 °C电镜固定液保存,随后用1%锇酸避光室温固定2 h。用磷酸缓冲液漂洗后,依次加入不同浓度乙醇进行梯度脱水,每次20 min,100%丙酮2次,每次15 min。随后进行渗透包埋、聚合处理,最终制成60~80 nm超薄切片。切片经醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色和枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色,室温干燥过夜。在透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达量 在冰上取适量肝脏组织加入预冷的放射免疫沉淀法(RIPA)裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂混合液,在4 °C条件下研磨破碎2 min。待组织充分裂解后,于4 °C、3 000 r·min⁻¹离心10 min,收集上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。向蛋白样品中加入上样缓冲液,在100 °C条件下变性15 min。依次完成上样、电泳、电转操作后,用5%脱脂奶粉封闭2 h;随后加入一抗(β -actin, 1:20 000; AMPK, 1:5 000; p-AMPK, 1:1 000; mTOR, 1:1 000; p-mTOR, 1:1 000; ULK1, 1:1 000;

p-ULK1, 1:5 000),于4 °C条件下孵育过夜。回收一抗,经TBST缓冲液洗膜后,加入相应二抗(1:10 000),孵育2 h。洗膜后滴加增强化学发光法(ECL)化学发光液,在专用仪器上进行显影。采用Image J软件分析条带灰度值,据此计算目标蛋白的相对表达量。

2.4 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件对实验数据进行分析。数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 呈现。多组间数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。后续两两比较中,若数据满足方差齐性条件,选用最小显著性差异法(LSD);若方差不齐,则采用Dunnett's T3法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模型验证 造模14 d后,与空白组比较,造模组大鼠血清T₃、T₄显著降低($P < 0.01$),TSH水平显著升高($P < 0.01$),提示模型复制成功。见表1。

表1 空白组与造模组血清T₃、T₄、TSH水平比较

Table 1 Comparison of serum T₃, T₄, and TSH levels between blank group and modeling group

组别	大鼠数量	T ₃ /μg·L ⁻¹	T ₄ /μg·L ⁻¹	TSH/mU·L ⁻¹
空白组	16	0.58±0.06	56.12±5.42	3.72±0.36
造模组	21	0.31±0.08 ²⁾	39.13±2.34 ²⁾	7.77±1.21 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

3.2 对大鼠肝脏系数的影响 结果显示,与空白组比较,模型组、优甲乐组、HYT-H、HYT-G组及HG组肝脏系数明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,HYT组、HYT-H组、HYT-HG组、优甲乐组肝脏系数明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);进一步比较全方与拆方组发现,与HYT组比较,各拆方组及HG组无显著差异。见表2。

表2 海藻玉壶汤及其加减方对大鼠肝脏重量、体质量及肝脏系数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=16$)

Table 2 Effect of Haizao Yuhutang and its modified formulas on liver weight, body weight, and liver coefficient in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=16$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝脏质量/g	体质量/g	肝脏系数/%
空白组		10.83±0.95	386.36±41.03	2.82±0.28
模型组		6.50±0.56	279.04±19.88	2.33±0.08 ²⁾
优甲乐组	2×10 ⁻⁵	7.90±0.74	309.67±21.83	2.55±0.10 ^{1,4)}
HYT组	12.06	7.36±0.56	288.28±19.34	2.56±0.17 ⁴⁾
HYT-H组	9.9	7.31±0.82	289.40±13.79	2.52±0.22 ^{1,3)}
HYT-G组	10.26	6.94±0.82	282.41±23.32	2.46±0.19 ²⁾
HYT-HG组	8.1	7.29±0.79	287.78±21.14	2.53±0.15 ⁴⁾
HG组	3.96	6.76±0.90	281.26±27.23	2.40±0.20 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与HYT组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表3-表5同)

3.3 对大鼠血清 ALT、AST 水平的影响 结果显示,与空白组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,HYT 组及各给药组 AST 水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),HYT 组、HYT-H 组、HG 组 ALT 水平明显降低($P<0.05, P<0.01$);进一步比较全方与拆方组,与 HYT 组比较,各拆方组及 HG 组 ALT 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 3。

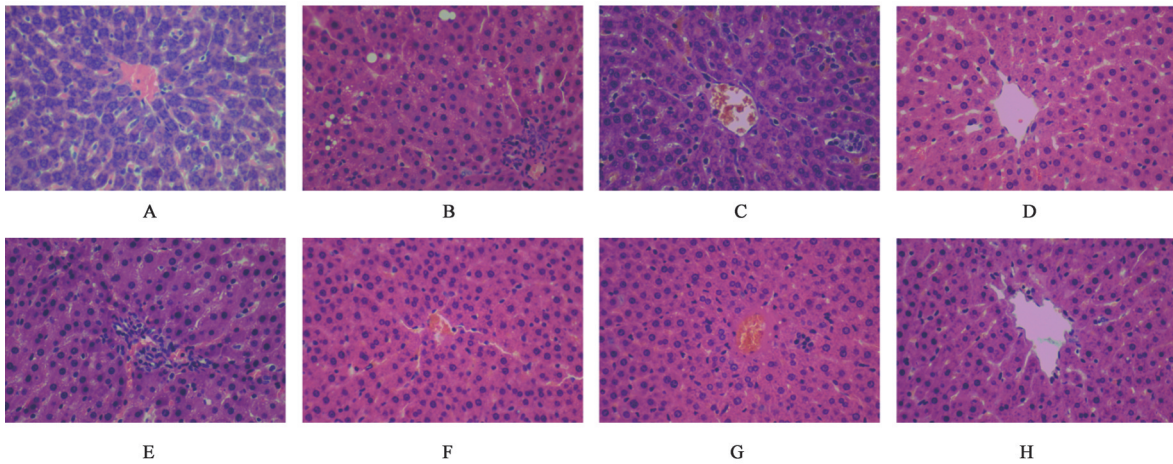
3.4 对大鼠肝脏病理形态的影响 HE 染色结果显示,正常组大鼠肝小叶形态清晰、结构完整。肝细胞呈多角形、放射状单层排列,门管区三联体结构清晰,未见炎症、坏死或纤维化等病理改变。模型组大鼠肝组织肝索排列明显紊乱,肝细胞普遍出现肿胀,肝窦因受压而明显变窄;汇管区可见炎细胞浸润,且肝细胞内出现大小不一的脂肪空泡,提示脂肪变性发生。各给药组干预后,与模型组比较均呈现病理改善趋势:脂肪空

表 3 海藻玉壶汤及其加减方对大鼠血清 ALT、AST 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=16$)

Table 3 Effect of Haizao Yuhutang and its modified formulas on serum ALT and AST levels in rats ($\bar{x}\pm s, n=16$) U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AST	ALT
空白组		159.12±29.77 ³⁾	49.14±12.17 ⁴⁾
模型组		195.25±44.34 ¹⁾	99.16±26.19 ²⁾
优甲乐组	2×10 ⁻⁵	165.51±35.16 ^{3,5)}	78.46±37.07 ⁶⁾
HYT 组	12.06	133.77±26.28 ⁴⁾	41.25±7.38 ⁴⁾
HYT-H 组	9.9	144.75±65.01 ⁴⁾	58.63±10.52 ^{4,6)}
HYT-G 组	10.26	159.92±20.10 ³⁾	82.17±23.47 ^{1,6)}
HYT-HG 组	8.1	144.01±24.69 ⁴⁾	71.64±15.04 ^{1,6)}
HG 组	3.96	159.19±29.21 ³⁾	59.98±14.05 ^{3,6)}

泡数量减少、炎细胞浸润程度减轻;其中 HYT 组与 HG 组的改善更为突出,肝细胞肿胀程度明显减轻,细胞排列更趋整齐。见图 1。



注:A.空白组;B.模型组;C.优甲乐组;D.HYT 组;E.HYT-H 组;F.HYT-G 组;G.HYT-HG 组;H.HG 组(图 2、图 3 同)

图 1 海藻玉壶汤及其加减方对大鼠肝组织病理形态的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Haizao Yuhutang and its modified formulas on pathological morphology of liver tissues in rats (HE,×400)

3.5 对大鼠肝组织超微结构的影响 透射电子显微镜下观察,正常组大鼠可见丰富的线粒体且形态正常,核大而圆,内质网清晰、分布均匀;模型组线粒体肿胀,基质溶解,空泡化严重,嵴减少或消失,内质网扩张,部分细胞核固缩,脂滴异常增多;HYT 组、HG 组治疗后,线粒体结构完整,基质均匀,电子显微镜下呈现均匀的灰色结构,核光滑圆润,脂滴减少,内质网形态恢复,其中 HYT 组可见较多自噬溶酶体;其余组线粒体形态有所恢复,与模型组比自噬溶酶体增多,但仍有部分线粒体肿胀、基质溶解,以及核固缩的现象。见图 2。

3.6 对大鼠肝脏氧化应激的影响 与空白组比较,模型组、优甲乐组、各拆方组及 HG 组 ROS 荧光强

度、MDA 水平明显升高($P<0.05, P<0.01$),模型组 GSH/GSSG 比例显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组 ROS 荧光强度、MDA 水平显著降低($P<0.01$),HYT 组、优甲乐组、HYT-G 组、HG 组 GSH/GSSG 比例显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);进一步比较全方与拆方组发现,与 HYT 组比较,优甲乐组、各拆方组及 HG 组 ROS 荧光强度、MDA 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表 4。

3.7 对大鼠肝脏 AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、ULK1、p-ULK1 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,与空白组比较,模型组 p-ULK1/ULK1 值明显降低($P<0.05$);与模型组比

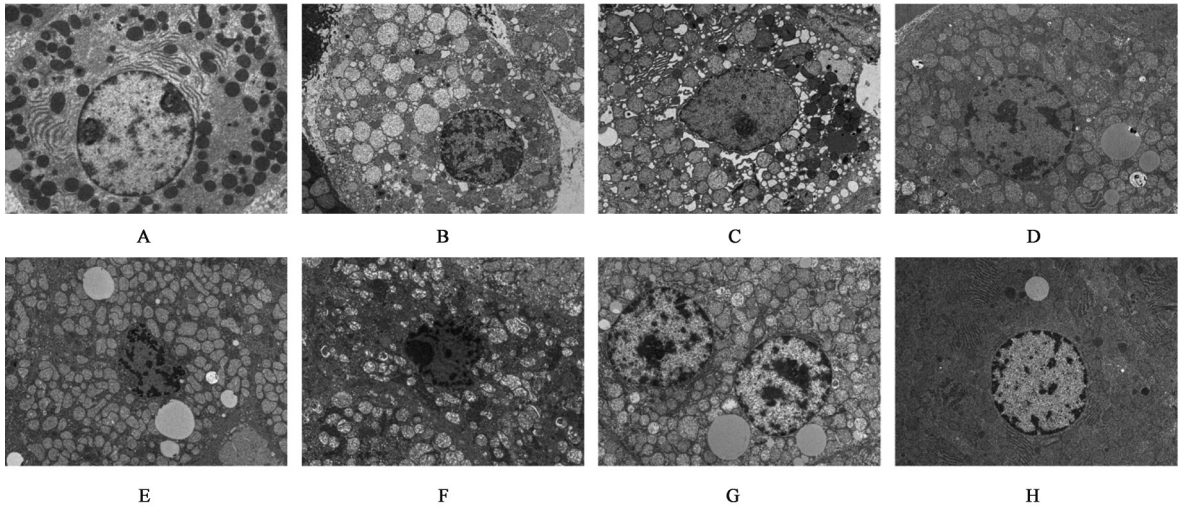


图2 海藻玉壶汤及其加减方对大鼠肝组织超微结构的影响(透射电镜, ×2 500)

Fig. 2 Effect of Haizao Yuhutang and its modified formulas on ultrastructure of liver tissues in rats (TEM, ×2 500)

表4 海藻玉壶汤及其加减方对大鼠肝组织ROS、MDA、GSH、GSSG及GSH/GSSG水平的影响(̄x±s, n=16)

Table 4 Effect of Haizao Yuhutang and its modified formulas on levels of ROS, MDA, GSH, GSSG, and GSH/GSSG in liver tissues of rats (̄x±s, n=16)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ROS荧光强度/mL	MDA/μmol·L ⁻¹	GSH/μmol·L ⁻¹	GSSG/μmol·L ⁻¹	GSH/GSSG
空白组		250.24±10.89	0.58±0.08	7.79±0.70	0.70±0.11	11.53±2.34
模型组		572.86±32.23 ²⁾	1.34±0.09 ²⁾	2.65±0.34	0.30±0.03	8.86±1.54 ²⁾
优甲乐组	2×10 ⁻⁵	313.42±14.13 ^{2,4,6)}	0.65±0.02 ^{1,4,6)}	6.23±0.66	0.54±0.03	11.61±1.33 ⁴⁾
HYT组	12.06	268.10±25.60 ⁴⁾	0.59±0.11 ⁴⁾	4.56±0.46	0.37±0.06	12.67±2.28 ⁴⁾
HYT-H组	9.9	358.47±22.28 ^{2,4,6)}	0.78±0.09 ^{2,4,6)}	6.82±0.93	0.65±0.07	10.78±2.56
HYT-G组	10.26	483.43±28.78 ^{2,4,6)}	1.10±0.16 ^{2,4,6)}	5.50±0.58	0.48±0.05	11.62±1.35 ⁴⁾
HYT-HG组	8.1	464.18±22.10 ^{2,4,6)}	1.00±0.12 ^{2,4,6)}	3.24±0.58	0.34±0.06	9.88±2.86
HG组	3.96	329.52±13.07 ^{2,4,6)}	0.70±0.04 ^{2,4,5)}	4.76±0.70	0.41±0.03	11.56±2.02 ⁴⁾

较, HYT组 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 值明显升高($P<0.05, P<0.01$), p-mTOR/mTOR 值显著降低($P<0.01$); 进一步比较全方与拆方组发现, 与HYT组比较, 各拆方组及HG组 p-AMPK/AMPK 值显著降低($P<0.01$), HYT-G组及HG组 p-mTOR/mTOR 值明显

升高($P<0.05, P<0.01$), HYT-G组及HYT-HG组 p-ULK1/ULK1 值明显降低($P<0.05$)。见表5、图3。

4 讨论

“藻戟芫遂俱战草”虽属配伍禁忌, 但海藻-甘草于海藻玉壶汤中的配伍应用在临床实践与既往实

表5 海藻玉壶汤及其加减方对大鼠肝组织p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR及p-ULK1/ULK1蛋白表达的影响(̄x±s, n=3)

Table 5 Effect of Haizao Yuhutang and its modified formulas on protein expression ratios of p-AMPK/AMPK, p-mTOR/mTOR, and p-ULK1/ULK1 in liver tissues of rats (̄x±s, n=3)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR	p-ULK1/ULK1
空白组		0.93±0.15	0.97±0.01	0.97±0.14
模型组		0.87±0.23	1.15±0.18	0.73±0.08 ¹⁾
优甲乐组	2×10 ⁻⁵	0.93±0.36	1.01±0.16 ⁵⁾	0.79±0.07
HYT组	12.06	1.23±0.29 ³⁾	0.57±0.21 ^{1,4)}	1.20±0.14 ^{1,4)}
HYT-H组	9.9	0.71±0.03 ⁶⁾	0.83±0.24 ⁴⁾	1.00±0.15 ³⁾
HYT-G组	10.26	0.49±0.19 ^{2,3,6)}	1.02±0.20 ⁵⁾	0.98±0.19 ^{3,5)}
HYT-HG组	8.1	0.58±0.12 ^{1,6)}	0.83±0.26	0.87±0.19 ⁵⁾
HG组	3.96	0.65±0.13 ⁶⁾	1.03±0.35 ⁶⁾	1.06±0.14 ⁴⁾

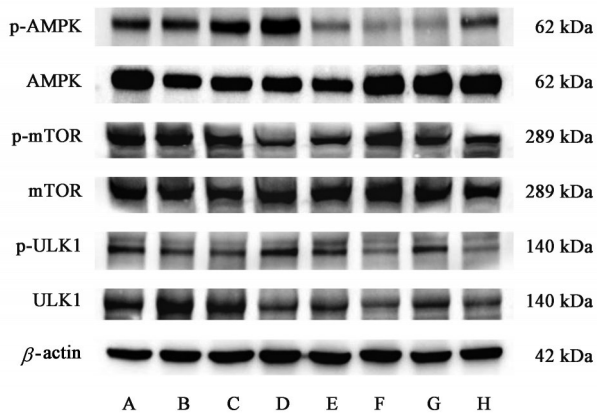


图3 大鼠肝组织 AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、ULK1、p-ULK1 相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, ULK1, p-ULK1 related proteins expression in liver tissues of rats

验研究中都取得了确切疗效,因此其反药组合的配伍效应尚存争议。本研究采用PTU诱导构建甲状腺功能减退伴甲状腺肿大鼠模型,模型组大鼠表现出显著的下丘脑-垂体-甲状腺轴功能紊乱,血清 T_3 、 T_4 水平显著降低,并伴随因负反馈调节导致的TSH水平代偿性升高,证实模型构建成功。甲状腺功能减退常伴随肝脏脂质代谢异常及氧消耗增加,导致肝脏相对缺氧并引发氧化应激^[4,12-13]。本研究中,模型组AST、ALT显著升高,GSH/GSSG值显著降低且ROS、MDA堆积,HE染色可见大量脂肪空泡及炎细胞浸润。提示该模型下的大鼠出现了肝损伤及氧化抗氧化失衡。HYT组及其拆方组均不同程度回调了上述指标,改善肝组织病理形态。值得注意的是,全方组在维持氧化还原稳态方面的效果显著优于各拆方组及药对组,这再次印证了在全方配伍的条件下,海藻-甘草反药组合发挥了不可替代的协同保肝作用。

肝脏含有丰富的线粒体,是对氧化损伤反应敏感的器官,受损的肝细胞产生的过量ROS及过氧化产物如MDA等,在肝病的发生发展中起着重要作用^[5]。课题组前期研究已证实,海藻玉壶汤能有效激活Nrf2/HO-1信号通路对抗氧化应激。但维持细胞内的氧化还原稳态是一个复杂的过程,既依赖于抗氧化物质对ROS的清除,也需要通过自噬途径抑制内源性ROS的产生。ROS蓄积及GSH过度消耗可作为自噬激活的信号^[14]。AMPK/mTOR/ULK1信号通路是调控自噬启动的核心枢纽:AMPK不仅能直接磷酸化启动自噬的关键因子ULK1,还能通过抑制自噬负调控因子mTOR的活性,解除其对ULK1的抑制,从而启动自噬^[15-17]。此外,AMPK-

ULK1轴的缺失会导致受损线粒体积聚,表明该通路对选择性清除受损线粒体具有特殊意义^[18]。本研究结果显示,模型组大鼠ULK1磷酸化被抑制,透射电子显微镜下线粒体基质溶解,损伤严重。而HYT可作用于AMPK/mTOR/ULK1信号通路,显著提高p-AMPK/AMPK的表达水平,下调p-mTOR/mTOR的表达水平,恢复ULK1的磷酸化,同时透射电子显微镜下可见自噬溶酶体增多及线粒体结构恢复,表明HYT通过作用于该信号通路,激活自噬以清除受损线粒体,进而减少ROS生成。与HYT组比较,各拆方组及HG组对AMPK/mTOR/ULK1的调节效应显著减弱,且去海藻甘草的HYT-HG组p-ULK1/ULK1水平显著降低。结果说明,虽然HG组表现出一定调节作用,但只有在全方配伍的条件下才能最大程度地激活AMPK/mTOR/ULK1信号通路。由此可见,海藻-甘草反药组合是海藻玉壶汤促进自噬,发挥肝脏保护作用过程中不可或缺的部分。

本研究初步证实含海藻甘草反药组合的海藻玉壶汤对肝脏的保护效应与调节自噬起始环节密切相关,但存在一些局限。首先,虽然甲状腺功能减退会对肝脏氧化抗氧化稳态产生影响,但造模药PTU的活性代谢物也会通过攻击细胞内关键蛋白与线粒体、破坏解毒防御机制,引发线粒体损伤与氧化应激,最终导致肝细胞损伤^[19-20]。因此本研究中模型大鼠的肝损伤可能是甲状腺功能减退与PTU的双重作用,后续可通过进一步实验排除PTU的干扰。其次,自噬受多靶点、多信号通路构成的复杂网络调控,HYT激活AMPK/mTOR/ULK1信号通路与其他相关通路如何进行交互调控,对下游信号分子及自噬不同阶段的具体靶点如何进行调控,仍需后续研究进一步阐明。

综上所述,本研究在前期研究证实海藻-甘草配伍有效的基础上,进一步丰富了其保肝机制。含海藻甘草反药组合的海藻玉壶汤能提高GSH/GSSG比例,激活AMPK/mTOR/ULK1信号通路,诱导自噬,清除受损的细胞器和过氧化产物,并抑制ROS和MDA的生成,恢复氧化还原稳态。其效果优于优甲乐组、HG组及各拆方组。海藻甘草反药组合不是绝对的配伍禁忌,可为临床“十八反”用药提供参考。

【利益冲突】 钟贛生是本刊编委,本文遵循期刊标准流程处理,其同行评审工作独立于编委会成员及其研究团队之外。

[参考文献]

- [1] 鲁爽,柳芳,华国栋.海藻配伍甘草的临床应用情况及安全性评价[J].北京中医药,2024,43(12):1441-1443.
LU S, LIU F, HUA G D. Clinical application and safety evaluation of seaweed combined with licorice[J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2024, 43(12):1441-1443.
- [2] 田颀,董肖,刘晓庆,等.海藻玉壶汤加减海藻甘草反药组合对甲状腺肿大鼠p53/p21/Caspase-3通路表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(16):68-75.
TIAN Y, DONG X, LIU X Q, et al. Effect of Haizao Yuhutang combined with modified Sargassum and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on expression of p53/p21/Caspase-3 pathway in rats with goiters[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(16):68-75.
- [3] 李怡文.含海藻与甘草反药组合的海藻玉壶汤应用于甲状腺肿大鼠模型配伍禁忌条件研究[D].北京:北京中医药大学,2013.
LI Y W. Study on the compatibility taboos and suitable conditions of Haizao Yuhu decoction containing incompatible herb pair of Sargassum and Glycyrrhizae in a rat model of goiter[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2013.
- [4] 陈诗,刘庆阳,朱艳.甲状腺功能异常与肝损害相关性研究进展[J].中国实用内科杂志,2023,43(2):165-170.
CHEN S, LIU Q Y, ZHU Y. Research progress in the relationship between thyroid function abnormalities and liver damage [J]. Chin J Pract Intern Med, 2023, 43 (2) : 165-170.
- [5] MOOLI R G R, MUKHI D, RAMAKRISHNAN S K, et al. Oxidative stress and redox signaling in the pathophysiology of liver diseases[J]. Compr Physiol, 2022, 12(2):3167-3192.
- [6] 修琳琳.含反药组合的海藻玉壶汤中海藻不同品种与甘草加减对甲状腺肿大鼠生物效应影响及机制探讨[D].北京:北京中医药大学,2017.
XIU L L. Study on the biological effects and mechanism of different Sargassum species and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in modified Haizao Yuhu decoction containing incompatible herb pair on goiter rats [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2017.
- [7] 董肖,田颀,刘晓庆,等.海藻甘草反药组合在海藻玉壶汤中加减应用对甲状腺肿大鼠肝脏氧化应激的影响[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(14):37-45.
DONG X, TIAN Y, LIU X Q, et al. Effect of Sargassum and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma incompatible pair with Haizao Yuhutang on oxidative stress in liver of goiter rats[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(14):37-45.
- [8] BYRNES K, BAILEY N T, BARAL K, et al. Impaired hepatic autophagy exacerbates hepatotoxin induced liver injury[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1):71.
- [9] SMILES W J, OVENS A J, KEMP B E, et al. New developments in AMPK and mTORC1 cross-talk[J]. Essays Biochem, 2024, 68(3):321-336.
- [10] HERZIG S, SHAW R J. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(2):121-135.
- [11] XIU L, ZHONG G, LIU D, et al. Comparative efficacy and toxicity of different species of Sargassum in Haizao Yuhu decoction in PTU-induced goiter rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017:3526186.
- [12] LIU C, LONG Y, LIU J, et al. Recent advances in anterior pituitary hormones and metabolic-associated fatty liver disease [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2025, 16:1128960.
- [13] PIANTANIDA E. The interplay between thyroid and liver: Implications for clinical practice [J]. J Endocrinol Investig, 2020, 43(Suppl 1):11-18.
- [14] CHEN T H, WANG H C, CHANG C J, et al. Mitochondrial glutathione in cellular redox homeostasis and disease manifestation[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(2):1314.
- [15] KIM J, KUNDU M, VIOLETT B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1 [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(2):132-141.
- [16] FILALI-MOUNCEF Y, HUNTER C, ROCCIO F, et al. The ménage à trois of autophagy, lipid droplets and liver disease [J]. Autophagy, 2022, 18(1):50-72.
- [17] SAIKIA R, JOSEPH J. AMPK: A key regulator of energy stress and calcium-induced autophagy[J]. J Mol Med (Berl), 2021, 99(11):1539-1551.
- [18] EGAN D F, SHACKELFORD D B, MIHAYLOVA M M, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy [J]. Science, 2011, 331(6016):456-461.
- [19] HEIDARI R, NIKNAHAD H, JAMSHIDZADEH A, et al. An overview on the proposed mechanisms of antithyroid drugs-induced liver injury[J]. Adv Pharm Bull, 2015, 5(1):1-11.
- [20] SUZUKI N, NOH J Y, HIRUMA M, et al. Analysis of antithyroid drug-induced severe liver injury in 18,558 newly diagnosed patients with Graves' disease in Japan[J]. Thyroid, 2019, 29(10):1390-1398.

[责任编辑 孙丛丛]