

基于非酒精性脂肪性肝炎模型及主成分分析的柴胡拆分组分引经药性归属探讨

洪菲惠^{1,2}, 陈洁欣², 陈雨婵¹, 李慧敏², 彭东辉¹, 沈志滨², 夏永刚¹, 王秋红^{1,2}, 匡海学^{1*}
(1. 黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040; 2. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立非酒精性脂肪性肝炎(NASH)模型,对逍遥散方剂配伍柴胡化学拆分组分,探究柴胡化学拆分归肝经作用强弱,并结合主成分分析明确柴胡归肝经药性物质基础。方法:采用80只SPF级雄性C57BL/6小鼠随机分为8组,每组10只,除正常组喂食蛋氨酸胆碱正常含量(MCS)饲料外,其余小鼠喂养蛋氨酸胆碱缺乏(MCD)模型饲料4周建立的NASH模型。苏木素-伊红(HE)染色证实模型建立后,分别灌胃给药4周,1次/d:逍遥散组2.874 g·kg⁻¹、逍遥散-柴胡组2.445 g·kg⁻¹、逍遥散-柴胡+挥发油组、逍遥散-柴胡+多糖组、逍遥散-柴胡+黄酮组、逍遥散-柴胡+皂苷组于逍遥散-柴胡组基础上分别加入柴胡各拆分组分:挥发油0.163 mg·kg⁻¹、多糖24.067 mg·kg⁻¹、黄酮2.241 mg·kg⁻¹、皂苷2.746 mg·kg⁻¹;模型组及正常组同体积生理盐水灌胃。末次灌胃给药后处死小鼠取血及肝脏组织,通过HE染色和油红O染色观察各组小鼠肝脏病理形态变化,酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)及肝脏丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平考察其作用强弱;运用SPSS Statistics 23数据分析软件进行主成分分析,对逍遥散配伍柴胡不同拆分组分进行综合评价,确定柴胡归肝经药性物质基础。结果:与正常组比较,模型组小鼠肝细胞肿胀,脂肪空泡增多,有多处炎性细胞;血清ALT、AST、TG、TC、LDL含量升高,HDL含量降低($P<0.01$);肝组织MDA含量升高,SOD、CAT及GSH-Px水平降低($P<0.01$)。与模型组比较,逍遥散及其配伍柴胡不同拆分组分均可改善小鼠肝组织病理变化;各给药组血清ALT、AST水平明显降低($P<0.05$),逍遥散及其配伍柴胡不同拆分组分对小鼠血脂指标均有不同程度的改善($P<0.05$);逍遥散及其配伍柴胡不同拆分组分对小鼠肝氧化损伤均有不同程度的改善($P<0.05$);不同给药组的功效药理学评价系统综合评分结果为逍遥散组>逍遥散-柴胡+皂苷组>逍遥散-柴胡+黄酮组>逍遥散-柴胡+多糖组>逍遥散-柴胡+挥发油组>逍遥散-柴胡组,在柴胡不同化学拆分组分中,以皂苷组分为佳。结论:柴胡皂苷组分通过减轻血脂水平,改善肝脏脂质代谢异常,缓解肝脏氧化损伤,是柴胡发挥“引药入肝”药性的物质基础。

[关键词] 柴胡; 化学拆分组分; 逍遥散; 归经药性理论; 非酒精性脂肪性肝炎; 主成分分析

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0053-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221208

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220513.1654.016.html>

[网络出版日期] 2022-05-17 8:47

Meridian Tropism of Components in Bupleuri Radix Based on Nonalcoholic Steatohepatitis Model and Principal Component Analysis

HONG Feihui^{1,2}, CHEN Jiexin², CHEN Yuchan¹, LI Huimin², PENG Donghui¹, SHEN Zhibin²,
XIA Yonggang¹, WANG Qihong^{1,2}, KUANG Haixue^{1*}

(1. Key Laboratory of Basic and Application Research of Beiyao, Ministry of Education, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Pharmacodynamic Material Base,

[收稿日期] 2022-03-19

[基金项目] 国家重点研发计划—中医药现代化研究项目(2019YFC1708801);国家重点研发计划项目(2018YFC1707100);广东省重点领域研发计划(2020B1111120002);黑龙江省“头雁”团队支持项目(黑龙江省头雁行动领导小组文件[2019]5号)

[第一作者] 洪菲惠,在读博士,从事中药及其复方的药效物质基础研究,E-mail:13922474813@163.com

[通信作者] *匡海学,教授,博士生导师,从事中药性味理论及中药药效物质基础,E-mail:hxkuang56@163.com

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2. School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the meridian tropism of components in Bupleuri Radix (Chaihu, CH) based on the model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and clarify the substance basis of the meridian tropism of CH in Xiaoyaosan (XYS) by means of principal component analysis. **Method:** Eighty SPF male C57BL/6 mice were randomly assigned into 8 groups, with 10 mice in each group. Except that the blank group was fed with the methionine choline-sufficient (MCS) diet, the other mice were fed with methionine choline-deficient (MCD) diet for 4 weeks to establish the nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model. After the established model was confirmed by hematoxylin-eosin (HE) staining, the mice were administrated with corresponding drugs by gavage once a day for 4 weeks. Specifically, the 8 groups were YYS group ($2.874 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), YYS-CH group ($2.445 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), YYS-CH+volatile oils (Vol, $0.163 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, YYS-CH+polysaccharides (Pol, $24.067 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, YYS-CH+flavones (Fla, $2.241 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and YYS-CH+saponins (Sap, $2.746 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group. The model group and the blank group were administrated with the same volume of normal saline. After the last administration, the mice were sacrificed for the collection of blood and liver tissue. The pathological changes of liver were observed by HE staining and oil red O staining. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to determine the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), and low-density lipoprotein (LDL) in serum as well as malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver. SPSS Statistics 23 was used for principal component analysis and comprehensive evaluation to determine the substance basis of the meridian tropism of CH in NASH mice. **Result:** Compared with the blank control group, the modeling led to hepatocyte swelling, increased fat vacuoles, and appearance of inflammatory cells. Further, the modeling elevated the levels of ALT, AST, TG, TC, and LDL and lowered the HDL level in serum, and it increased the MDA level and decreased the SOD, CAT, and GSH-Px levels in liver. Compared with the model group, the administration of YYS and YYS-CH in combination with the components of CH alleviated the oxidative damage in liver ($P < 0.05$). The comprehensive score of the pharmacological efficacy was in a descending order as follows: YYS > YYS-CH+Sap > YYS-CH+Fla > YYS-CH+Pol > YYS-CH+Vol > YYS-CH. Among the chemical components of CH, Sap had the best effect. **Conclusion:** Sap lowers the blood lipid level, regulates the abnormal lipid metabolism, and alleviates the oxidative damage of liver, which is the substance basis for CH to exert the meridian tropism in liver.

[Keywords] Bupleuri Radix; chemical components; Xiaoyaosan; meridian tropism; nonalcoholic steatohepatitis; principal component analysis

中药引经药性理论是以归经理论为基础,以临床治疗疾病疗效为依据,经过历代医药学家长期实践总结而成的一种特殊用药经验^[1]。引经中药一般是对所引之脏腑经络疾病疗效最显著的药物,因其加入可明显增强整个方剂的疗效。目前,国内学者对引经中药的实验研究主要集中于单味中药的吸收、代谢和分布,认为药效的强弱与药物在靶器官的分布浓度密切相关,无系统地从方剂整体考察引经中药对方剂药效的作用,忽略了成分之间的相互作用,更不能有效诠释中药引经的药性物质基础。

本课题组前期对麻黄^[2]、知母^[3]、牛膝^[4]等中药的寒热药性进行了系统性研究,证实了中药药性可拆分性、可组合性研究方法的可行性,并提出了一组具有较高创新性的、与中药性味理论研究相关的新概念^[5]。

逍遥散出自宋代《太平惠民和剂局方》,具有调和肝脾,疏肝解郁之功效,方中柴胡疏肝解郁,使肝气条达,兼为肝经引经药^[6]。非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是非酒精性脂肪肝(NAFLD)的炎症亚型,常伴有脂肪变性、肝细胞损伤(气球样变)和炎症等

症状^[7]。本研究基于中药药性理论研究,通过现代技术手段,将柴胡拆分为不同的化学组分,建立NASH模型,探讨柴胡不同化学组分对逍遥散抗NASH作用的影响,从而对柴胡拆分组分的引经药性进行归属,为阐释柴胡引经药性的科学内涵提供依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性C57BL/6小鼠,体质量14~16 g,购自于广东省医学实验动物中心,生产合格证号SCXK(粤)2022-0002,饲养于广东省医学实验动物中心,通过广东省医学实验动物中心动物伦理委员会审查,伦理编号为C202205-2,符合实验动物伦理委员会规定。

1.2 药物 逍遥散:柴胡、当归、白术、白芍、茯苓、生姜、炙甘草、薄荷组成,购自广州采芝林药业,经广东药科大学中药学院刘基柱教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》相关标准。

1.3 试剂 D101大孔树脂(南开大学,批号H0023-1-1-0);蛋氨酸胆碱缺乏(MCD)模型饲料、蛋氨酸胆碱正常含量(MCS)对照饲料(南通特洛菲饲料科技有限公司,批号分别为TP3005G、TP3005GS);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、油红O染色试剂盒(索莱宝公司,批号分别为G1004、G1016);甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(泉州睿信生物科技有限公司,批号分别为RXWB0011-96、RXWB0294-96、RX203034M、RX202596M、RX202924M、RX202979M、RXJ203032M、RX203017M、RX202903M、RX202182M)。

1.4 仪器 JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司),SCIENTZ-48L型冷冻型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司),JY92-IIN型高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机有限公司),Epoch酶标检测仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 柴胡化学拆分组分的制备^[8] 取柴胡1 kg,加入10倍量水浸泡1 h,加热回流提取2 h,重复2次,用挥发油提取器收集挥发油,得挥发油组分,提取率为0.038%;过滤合并水煎液,减压浓缩至浸膏,缓慢加入乙醇并不断搅拌,反复醇沉2次,得到下层醇沉组分,即为多糖组分,提取率为5.612%;上层经减

压浓缩后,上D101大孔吸附树脂柱,依次用水、30%乙醇、70%乙醇洗脱。其中30%乙醇洗脱液经减压浓缩、干燥得到黄酮组分,提取率为0.522%;70%乙醇洗脱液经减压浓缩、干燥得到皂苷组分,提取率为0.103%。采用GC-MS及HPLC-PDA等方法对柴胡拆分组分进行定性表征,挥发油组分主要为2-壬烯醛、2-甲氧基-4-甲基-1-(甲基乙基)苯、2,4-癸二烯醛、十二烷二元醇、1-癸醇等;多糖组分总糖含量为58.01%,糖醛酸含量为30.62%;黄酮组分主要为槲皮苷、异槲皮苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、芦丁、黄芩苷等;皂苷组分主要为柴胡皂苷a、柴胡皂苷c、柴胡皂苷d、scorzoneroid C、bupleuroside V、bupleuroside XII等。

2.2 逍遥散及逍遥散-柴胡水煎液的制备 取柴胡、当归、白术、白芍、茯苓、炙甘草、生姜、薄荷按6:6:6:6:6:3:2:2的比例投料,加10倍量去离子水,浸泡30 min,煎煮2 h,重复2次,过滤合并水煎液,减压浓缩,得到含生药量 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 逍遥散水煎液,同理,原方除去柴胡,按上述煎煮方法,得到含生药量 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 逍遥散-柴胡水煎液。

2.3 动物分组、造模及给药 C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组、逍遥散组、逍遥散-柴胡组、逍遥散-柴胡+挥发油组、逍遥散-柴胡+多糖组、逍遥散-柴胡+黄酮组、逍遥散-柴胡+皂苷组,每组10只,正常组给予MCS对照饲料喂养,其余各组给予MCD模型饲料喂养^[9],实验周期共8周。肝组织HE染色证实第4周末模型小鼠出现NASH改变。第5周开始,模型组及正常组给予等体积生理盐水,实验小鼠给药用量及方法参照《现代医学实验动物学》中的标准方程及组分提取率进行计算,逍遥散组给予逍遥散 $2.874 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,逍遥散-柴胡组给予逍遥散-柴胡 $2.445 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,逍遥散-柴胡+挥发油组、逍遥散-柴胡+多糖组、逍遥散-柴胡+黄酮组、逍遥散-柴胡+皂苷组于逍遥散-柴胡组基础上分别加入柴胡各拆分组分:挥发油 $0.163 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、多糖 $24.067 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、黄酮 $2.241 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、皂苷 $0.442 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,连续4周。

2.4 动物处理及取材 于末次给药后,小鼠禁食不禁水,麻醉后眼眶取血,分离血浆和血清,置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存;取肝左叶切取 1 mm^3 组织,于4%多聚甲醛固定,其余置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

2.5 观察及检测指标

2.5.1 体质量及脏器指数 称定小鼠体质量,给药结束后,取小鼠肝组织称质量,计算脏器指数。

2.5.2 HE染色观察肝脏病理形态学编号 将4%多聚甲醛固定的肝组织,脱水,石蜡包埋,切片并染色,于光镜下观察肝脏组织病变,进行NAFLD活动度积分(NAS)评分^[10],见表1。其中总积分 ≥ 5 分,即可诊断为NASH, < 3 分者,可排除NASH,介于二者之间则为NASH可能。油红O染色:将冰冻切片固定,油红O染液浸染10 min,60%异丙醇分化,水洗,苏木素复染,蒸馏水洗,甘油封片,光镜下观察脂肪变性情况。

表1 NAFLD活动度评分标准

Table 1 Scoring criteria for NAFLD activity

积分/分	肝细胞脂肪变/%	小叶内炎症/个(20倍镜计数坏死灶)	肝细胞气球样变
0	<5	无	无
1	5~33	<2	少见
2	34~66	2~4	多见
3	>66	>4	

2.5.3 血清ALT、AST、TG、TC、HDL、LDL的检测

取-80℃血清样本,按照ELISA试剂盒说明书检测血清TG、TC、ALT、AST、HDL、LDL。

2.5.4 肝脏MDA、SOD、CAT、GSH-Px的检测

取-80℃肝脏样本,按照ELISA试剂盒说明书测定肝脏MDA、SOD、CAT、GSH-Px。

2.6 主成分分析 利用SPSS Statistics 23统计软件对4类系统各指标结果进行主成分分析,计算主成分特征值、累计贡献率及主成分得分等。

2.7 统计学分析 采用SPSS Statistics 23软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据采用单因素方差分析,两组间数据采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对NASH小鼠体质量及脏器指数的影响 与正常组比较,模型组小鼠体质量和脏器指数显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,逍遥散-柴胡组小鼠体质量明显升高($P < 0.05$),其余各组与模型组差异无统计学意义。见表2。

3.2 对NASH小鼠肝组织病理变化的影响 HE染色结果显示,正常组小鼠肝组织细胞形态正常,肝小叶结构完整,无脂肪和炎症细胞浸润;模型组小鼠肝组织细胞肿胀,胞浆可见脂肪空泡,肝小叶可见多处炎性细胞浸润,并有少量淡黄色透明物质沉着;与模型组比较,各给药组小鼠肝组织病变均有不同程度的改善,肝细胞脂肪变性减少,炎症浸润

表2 逍遥散及其配伍柴胡拆分组分对NASH小鼠体质量及脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

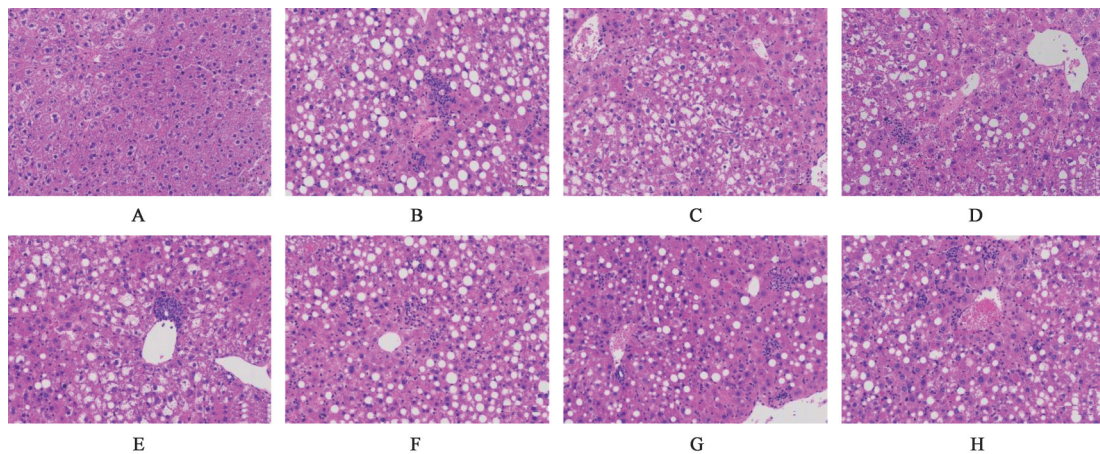
Table 2 Effect of Xiaoyaosan and its combined components of Bupleuri Radix (XBR) on body weight and organ coefficient in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	体质量/g	脏器指数/%
正常组		27.54 \pm 1.77	4.82 \pm 0.89
模型组		15.29 \pm 0.82 ¹⁾	3.52 \pm 0.48 ¹⁾
逍遥散组	2.874	15.61 \pm 0.60	3.59 \pm 0.48
逍遥散-柴胡组	2.445	16.28 \pm 1.16 ²⁾	3.34 \pm 0.25
逍遥散-柴胡+挥发油组	2.445+1.63 $\times 10^{-4}$	15.86 \pm 1.04	3.28 \pm 0.61
逍遥散-柴胡+多糖组	2.445+0.024 067	15.69 \pm 0.77	3.48 \pm 0.41
逍遥散-柴胡+黄酮组	2.445+2.241 $\times 10^{-3}$	15.79 \pm 0.79	3.32 \pm 0.60
逍遥散-柴胡+皂苷组	2.445+4.42 $\times 10^{-4}$	14.62 \pm 0.81	3.43 \pm 0.41

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表3-表5同)

程度减轻。油红O染色结果表明,正常组小鼠肝组织未见明显红色脂滴;模型组小鼠肝组织可见明显大片红色脂滴,在视野内,脂滴散在分布;与模型组比较,各给药组小鼠肝组织脂滴可见不同程度减少,颜色减弱,表明各给药组肝细胞脂肪变性均有不同程度的改善。NAS组织学积分结果,模型组NAS积分 > 5 分,较正常组显著升高($P < 0.01$),说明模型建立成功;与模型组比较,各给药组均明显降低NAS积分($P < 0.05$)。见图1和图2、表3。

3.3 对NASH小鼠血清ALT、AST、TG、TC、HDL、LDL水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清ALT、AST水平显著升高,TG、TC、LDL含量显著升高,HDL含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,逍遥散组小鼠血清ALT、AST水平明显降低,TG、TC、LDL含量明显降低,HDL含量明显升高($P < 0.05$),逍遥散-柴胡组小鼠血清ALT、AST水平明显降低,TC含量明显降低,HDL含量明显升高($P < 0.05$),逍遥散-柴胡+挥发油组小鼠血清ALT、AST水平明显降低,TG、TC含量明显降低,HDL含量明显升高($P < 0.05$),逍遥散-柴胡+多糖组小鼠血清ALT、AST水平明显降低,TG、TC含量明显降低,HDL含量明显升高($P < 0.05$),逍遥散-柴胡+黄酮组小鼠血清ALT、AST水平明显降低,TC含量明显降低($P < 0.05$),逍遥散-柴胡+皂苷组小鼠血清ALT、AST水平明显降低,TG、TC、LDL含量明显降低,HDL含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 逍遥散组;D. 逍遥散-柴胡组;E. 逍遥散-柴胡+挥发油组;F. 逍遥散-柴胡+多糖组;G. 逍遥散-柴胡+黄酮组;H. 逍遥散-柴胡+皂苷组(图2同)

图1 逍遥散及其配伍柴胡拆分组分对小鼠肝细胞组织病理变化的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of XBR on histopathological changes of hepatocytes in mice (HE, ×200)

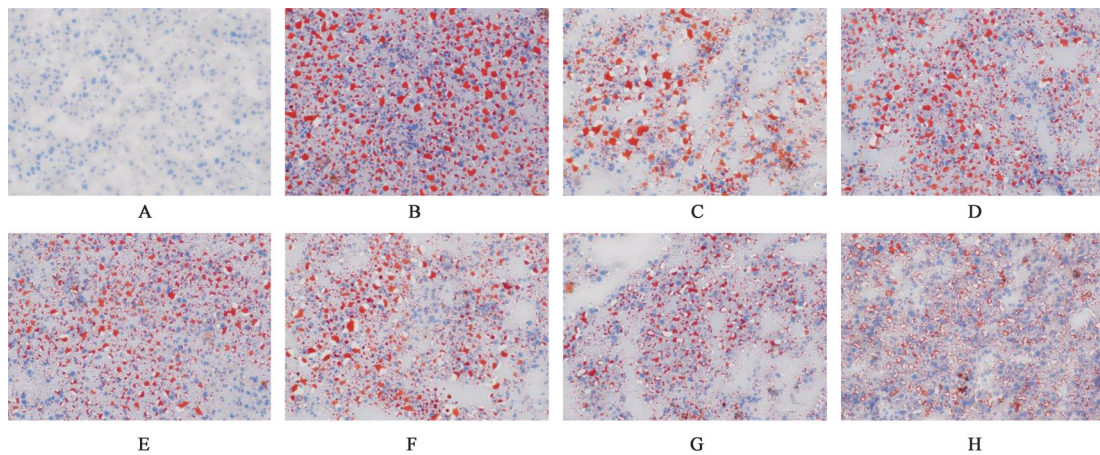


图2 逍遥散及其配伍柴胡拆分组分对小鼠肝细胞组织病理变化的影响(油红O, ×200)

Fig. 2 Effect of XBR on histopathological changes of hepatocytes in mice (oil red O, ×200)

表3 逍遥散及其配伍柴胡拆分组分对小鼠肝组织NAS积分的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of XBR on NAS scores of mice liver tissue ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脂肪变性	炎症	气球样变性	总分
正常组		0.00±0.00	0.00±0.00	0.60±0.52	0.60±0.41
模型组		2.20±0.42 ¹⁾	2.10±0.74 ¹⁾	1.50±0.53 ¹⁾	5.80±0.71 ¹⁾
逍遥散组	2.874	1.00±0.00 ²⁾	0.70±0.48 ²⁾	1.30±0.48	3.00±0.45 ²⁾
逍遥散-柴胡组	2.445	1.10±0.32 ²⁾	1.90±0.32	0.70±0.48 ²⁾	3.70±0.63 ²⁾
逍遥散-柴胡+挥发油组	2.445+1.63×10 ⁻⁴	1.00±0.00 ²⁾	1.10±0.32 ²⁾	1.30±0.48	3.40±0.35 ²⁾
逍遥散-柴胡+多糖组	2.445+0.024 067	1.00±0.00 ²⁾	1.60±0.52 ²⁾	0.70±0.48 ²⁾	3.30±0.55 ²⁾
逍遥散-柴胡+黄酮组	2.445+2.241×10 ⁻³	1.00±0.00 ²⁾	1.30±0.67 ²⁾	0.60±0.84 ²⁾	2.90±0.67 ²⁾
逍遥散-柴胡+皂苷组	2.445+4.42×10 ⁻⁴	1.00±0.00 ²⁾	1.50±0.53 ²⁾	1.20±0.63	3.70±0.50 ²⁾

3.4 对NASH小鼠肝组织MDA、SOD、CAT及GSH-Px的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织MDA含量显著升高,SOD、CAT及GSH-Px水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,逍遥散组小鼠肝组织MDA含量明显降低,SOD、CAT及GSH-Px水

平明显升高($P<0.05$),逍遥散-柴胡组小鼠肝组织MDA含量明显降低($P<0.05$),逍遥散-柴胡+挥发油组小鼠肝组织MDA含量明显降低($P<0.05$),逍遥散-柴胡+多糖组小鼠肝组织MDA含量明显降低,SOD活性明显升高($P<0.05$),逍遥散-柴胡+黄酮组

表 4 逍遥散及其配伍柴胡拆分组分对小鼠血清肝酶及血脂水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of XBR on level of liver enzymes and serum lipids in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	HDL/mg·dL ⁻¹	LDL/mmol·L ⁻¹
正常组		50.79±10.36	191.65±51.10	0.77±0.05	2.66±0.84	143.03±20.80	5.31±1.60
模型组		130.36±15.19 ¹⁾	391.93±25.51 ¹⁾	1.32±0.20 ¹⁾	4.51±0.71 ¹⁾	71.06±21.41 ¹⁾	11.40±2.76 ¹⁾
逍遥散组	2.874	87.90±10.01 ²⁾	305.07±27.23 ²⁾	0.94±0.13 ²⁾	3.23±0.19 ²⁾	127.97±19.18 ²⁾	8.93±0.78 ²⁾
逍遥散-柴胡组	2.445	84.32±8.67 ²⁾	299.33±22.86 ²⁾	1.13±0.18	3.43±0.12 ²⁾	114.95±9.01 ²⁾	10.21±1.97
逍遥散-柴胡+挥发油组	2.445+1.63×10 ⁻⁴	88.22±9.28 ²⁾	346.76±13.53 ²⁾	1.04±0.08 ²⁾	3.28±0.57 ²⁾	116.75±13.34 ²⁾	9.89±2.59
逍遥散-柴胡+多糖组	2.445+0.024 067	92.72±12.54 ²⁾	328.83±60.14 ²⁾	1.07±0.20 ²⁾	3.46±0.14 ²⁾	116.85±5.42 ²⁾	10.73±2.12
逍遥散-柴胡+黄酮组	2.445+2.241×10 ⁻³	93.51±15.55 ²⁾	289.34±44.16 ²⁾	1.18±0.16	3.63±0.68 ²⁾	93.14±29.99	9.39±0.47
逍遥散-柴胡+皂苷组	2.445+4.42×10 ⁻⁴	82.08±16.30 ²⁾	300.06±31.12 ²⁾	1.00±0.28 ²⁾	3.34±0.59 ²⁾	106.91±22.41 ²⁾	8.99±0.56 ²⁾

小鼠肝组织 MDA 含量明显降低, CAT 含量明显升高 ($P<0.05$), 逍遥散-柴胡+皂苷组小鼠肝组织 MDA 含量明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 5。

表 5 逍遥散及其配伍柴胡拆分组分对小鼠肝脏氧化损伤的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of XBR on oxidative damage of liver in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	CAT/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·g ⁻¹
正常组		0.72±0.13	33.47±1.84	8.14±0.46	24.89±2.26
模型组		1.64±0.37 ¹⁾	24.84±3.11 ¹⁾	6.51±0.54 ¹⁾	18.40±3.02 ¹⁾
逍遥散组	2.874	1.08±0.14 ²⁾	29.57±2.35 ²⁾	7.52±0.52 ²⁾	22.71±3.84 ²⁾
逍遥散-柴胡组	2.445	1.06±0.22 ²⁾	27.99±1.73	7.16±1.01	20.76±1.17
逍遥散-柴胡+挥发油组	2.445+1.63×10 ⁻⁴	1.05±0.08 ²⁾	26.15±3.44	7.17±1.47	21.29±3.62
逍遥散-柴胡+多糖组	2.445+0.024 067	1.15±0.43 ²⁾	28.96±5.30 ²⁾	7.32±0.29	20.64±3.53
逍遥散-柴胡+黄酮组	2.445+2.241×10 ⁻³	1.05±0.08 ²⁾	27.90±4.57	7.45±0.99 ²⁾	20.95±2.60
逍遥散-柴胡+皂苷组	2.445+4.42×10 ⁻⁴	1.12±0.32 ²⁾	28.62±1.93	7.28±0.42	21.44±1.52

3.5 主成分分析 采用 SPSS Statistics 23 软件对 4 类系统 13 个指标进行数据标准化处理从而进行主成分分析, 得到各组抗 NASH 指标的主成分的特征值、方差贡献率及累计贡献率, 结果如表 6 所示。由表 6 总方差解释可知, 特征值 $\lambda_1=8.729$ 、 $\lambda_2=1.889$, 2 个特征值各自贡献率分别为 67.145%、14.533%, 累积贡献率达 81.678%。在 SPSS 主成分分析的降维过程中, 认为特征值 ≥ 1 或累计方差贡献率 $>85\%$ 的主成分具有一定代表性^[11], 故提取二者为主成分。根据 2 个主成分系数, 得到 Y_1 、 Y_2 的线性组合。

$$Y_1=0.049X_1-0.05X_2+0.297X_3+0.31X_4+0.275X_5+0.286X_6+0.321X_7+0.292X_8+0.275X_9+0.312X_{10}+0.285X_{11}+0.323X_{12}+0.326X_{13}$$

$$Y_2=-0.571X_1+0.621X_2-0.13X_3-0.079X_4-0.081X_5+0.294X_6-0.017X_7+0.011X_8+0.201X_9-0.276X_{10}+0.21X_{11}-0.008X_{12}+0.11X_{13}$$

根据主成分方程计算得到的主成分得分和综合得分如表 7 所示, 可知不同给药组抗 NASH 功效药理学评价系统综合评分结果为逍遥散组 > 逍遥散-

柴胡+皂苷组 > 逍遥散-柴胡+黄酮组 > 逍遥散-柴胡+多糖组 > 逍遥散-柴胡+挥发油组 > 逍遥散-柴胡组 > 模型组。

表 6 总方差解释

Table 6 Total variance explained

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比	累积贡献率%	合计	方差百分比	累积贡献率%
1	8.729	67.145	67.145	8.729	67.145	67.145
2	1.889	14.533	81.678	1.889	14.533	81.678

4 讨论

中药的引经药性是以中药的归经理论为基础, 历代医家经临床实践的经验总结, 但因传统中医对复方中引经作用的难辨识性及研究思路的局限性, 现代研究多侧重于各类药物的体内分布代谢研究^[12-14], 对引经药性缺乏科学认识, 极大限制了中医药的发展。中药的引经药性与其化学成分密切相关, 本项目首席科学家黑龙江中医药大学夏永刚

表7 主成分得分和综合得分

Table 7 Principal component score and comprehensive score

组别	剂量/g·kg ⁻¹	主成分 Y ₁ 得分	主成分 Y ₂ 得分	综合 得分	排名
模型组		-6.37	0.71	-4.17	7
逍遥散组		2.95	1.62	2.22	1
逍遥散-柴胡组	2.874	0.56	-1.58	0.14	6
逍遥散-柴胡+挥发油组	2.445	0.50	-1.28	0.15	5
逍遥散-柴胡+多糖组	2.445+1.63×10 ⁻⁴	0.24	0.20	0.19	4
逍遥散-柴胡+黄酮组	2.445+0.024 067	0.75	-1.24	0.32	3
逍遥散-柴胡+皂苷组	2.445+2.241×10 ⁻³	1.38	1.57	1.15	2

教授提出基于引经药性理论假说：“引经中药一般是对所引之脏腑经络疾病疗效最显著的药物，因其加入可明显增强整个方剂的疗效，其物质基础是可拆分、可组合的”。基于此假说，本文对柴胡进行化学组分拆分，将药物作用强弱与引经理论进行关联性分析，为阐明柴胡“入肝经”的物质基础提供科学依据。

NASH是一类慢性进行性肝病，以肝细胞脂质积累、炎症反应肝细胞氧化应激及纤维化为特征的临床综合征^[15]，其发病机制尚不明确，现学术界广泛认同的发病机制包括“二次打击”学说^[16]及“多重打击”学说^[17]。传统中医学根据NASH的发病特点及症候，将其归为肝郁脾虚证、痰浊内阻证、湿热蕴结证及痰瘀互结证等^[18]，现中医多采用针灸及中药复方等措施对其进行治疗^[19-20]。

逍遥散出自《太平惠民和剂局方》，具有疏肝养血，健脾和中之功，临床上常用于肝郁血虚，脾胃不和。现代药理学研究表明，逍遥散可通过上调Toll样受体4(TLR4)基因甲基化水平，进而下调其TLR4 mRNA的表达，从而达到改善非酒精性脂肪性肝炎的作用^[21]；逍遥散可减少CCl₄诱导的大鼠肝纤维化模型中肝脏纤维化程度，其机制可能与调节酪氨酸激酶(JAK)、转录因子(STAT)和磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、叉头转录因子O(FoxO)信号通路有关^[22]，LU等^[23]应用动态网络生物标志物分析和系统药理学方法，发现逍遥散可通过调节巨噬细胞集落刺激因子1(CSF1)、白细胞介素-7受体(IL-7R)、增强子结合蛋白(CEBPA)表达，从而改善肝硬化，缓解肝纤维化，改善肝功能等作用；以上研究说明逍遥散对肝炎及肝纤维化具有明

显的改善作用。

逍遥散方中柴胡疏肝解郁，使肝气条达，《古今名医方论》云：“木郁达之，柴胡其要矣”^[24]。本文通过对逍遥散方剂中柴胡化学组分进行拆分和组合，研究其对NASH模型小鼠的肝脏形态、肝酶、血脂和氧化损伤相关指标的变化，分析作用强弱，明确柴胡发挥引药入肝药性的物质基础。结果表明，逍遥散配伍柴胡不同化学拆分组均能改善NASH小鼠肝组织病理变化，缓解脂质积累，减少炎症反应；逍遥散-柴胡+皂苷、逍遥散-柴胡+多糖、逍遥散-柴胡+挥发油能有效减少NASH小鼠血脂水平；逍遥散-柴胡+黄酮、逍遥散-柴胡+多糖可改善NASH小鼠肝脏氧化应激反应，减轻氧化损伤。主成分分析综合评价结果显示，不同给药组抗NASH功效药理学评价系统综合评分结果为逍遥散-柴胡+皂苷组>逍遥散-柴胡+黄酮组>逍遥散-柴胡+多糖组>逍遥散-柴胡+挥发油组，提示柴胡皂苷组分是柴胡发挥“引药入肝”药性的物质基础。在传统经典方剂中，柴胡不仅作为君药，还可作为肝经引经药，用于增强肝病的治疗作用^[25-28]。现代药理研究表明柴胡皂苷具有显著的保肝作用，柴胡中含有的皂苷类成分结构为五环三萜烯醇衍生物，主要活性成分为柴胡皂苷a和柴胡皂苷d^[29]。柴胡皂苷及柴胡皂苷元柴胡皂苷d可通过抑制炎症反应及氧化应激反应而对硫代乙酰胺(TAA)诱导的肝损伤小鼠具有显著的保肝作用^[30]；柴胡皂苷a可改善脂多糖和D-半乳糖胺(LPS/D-GalN)诱导的小鼠肝损伤程度，其机制可能与肝X受体α(LXRα)表达增加有关^[31]；LI等^[32]发现柴胡皂苷a和柴胡皂苷d可显著改善NAFLD小鼠的肝脂肪变性及肝损伤，采用脂质组学结合转录组学研究显示柴胡皂苷a和柴胡皂苷d通过调节参与脂质代谢的转录因子基因的表达，抑制甘油三酯积累，促进脂肪酸降解，从而改善肝脏脂质水平。

综上所述，柴胡皂苷组分能有效改善NASH小鼠肝脏组织病理变化，减少血脂水平，减轻肝脏氧化应激损伤，是柴胡发挥“引药入肝”药性的物质基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 刘树民,王秋月,卢芳,等. 中药引经药性理论溯本寻源与现代研究评述[J]. 中草药, 2020, 51(19): 5099-5104.
- [2] 王艳宏,王秋红,夏永刚,等. 麻黄化学拆分组分的性

- 味药理学评价——麻黄化学拆分组分“辛温”发汗、利水作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(6):489-491.
- [3] 明继阳. 知母性味拆分组分的组合研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2017.
- [4] 郭晶, 孙传鑫, 王秋红, 等. 川牛膝化学拆分组分性味药理学评价—川牛膝化学拆分组分降血脂作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(7):16-19.
- [5] 匡海学, 王艳宏, 王秋红, 等. 基于中药性味可拆分性和可组合性的中药性味理论研究新模式[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(1):25-29.
- [6] 马英华, 高凤清. 柴胡归经溯源[J]. 中医药学报, 2017, 45(4):3-5.
- [7] SHEKA A C, ADEYI O, THOMPSON J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: A review [J]. JAMA, 2020, 323(12):1175-1183.
- [8] 李沛霞, 甘南湘, 晋艳, 等. 大孔树脂分离川麦冬须根中总黄酮和总皂苷的工艺研究[J]. 食品科技, 2020, 45(5):221-227.
- [9] 陈艳珍, 陈成良, 田兴, 等. 基于非酒精性脂肪性肝病机制及治疗的动物模型研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(12):2457-2461.
- [10] KLEINER D E, BRUNT E M, VAN NATTA M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2005, 41(6):1313-1321.
- [11] 赵慧琴. 数据处理技术及SPSS实验教程[M]. 广州:华南理工大学出版社, 2016.
- [12] 梅建伟. 血府逐瘀汤中桔梗、牛膝对正常和血瘀大鼠芍药苷药代动力学影响的研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2014.
- [13] 詹勤. 桔梗在升陷汤中引经作用及其化学成分研究[D]. 上海:第二军医大学, 2012.
- [14] 李娇. 引经药柴胡促姜黄素及纳米粒肝靶向作用研究[D]. 昆明:云南中医药大学, 2020.
- [15] ARAB J P, ARRESE M, TRAUNER M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Annu Rev Pathol, 2018, 13:321-350.
- [16] DAY C P, JAMES O F. Steatohepatitis: A tale of two "hits"?[J]. Gastroenterology, 1998, 114(4):842-845.
- [17] FANG Y L, CHEN H, WANG C L, et al. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model"[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(27):2974-2983.
- [18] 李军祥, 陈諝, 王允亮. 非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(11):805-811.
- [19] 李悦, 刘奇, 屈艳伟, 等. 非酒精性脂肪性肝病中西医结合治疗进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(7):161-164.
- [20] 付勇刚, 杨家耀. 附子理中汤对非酒精性脂肪性肝炎大鼠内毒素及其受体的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(19):2878-2881.
- [21] 徐慧超, 高艳, 陈浩, 等. 逍遥散对非酒精性脂肪性肝炎大鼠 Toll 样受体 4 基因甲基化水平的调节作用[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(5):402-407.
- [22] ZHOU Y, WU R, CAI F F, et al. Development of a novel anti-liver fibrosis formula with luteolin, licochalcone A, aloë-emodin and acacetin by network pharmacology and transcriptomics analysis [J]. Pharm Biol, 2021, 59(1):1594-1606.
- [23] LU Y, LI M, ZHOU Q, et al. Dynamic network biomarker analysis and system pharmacology methods to explore the therapeutic effects and targets of Xiaoyaosan against liver cirrhosis [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 294:115324.
- [24] 张凯崑. 逍遥散沿革与配伍应用的文献研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2018.
- [27] ZHANG Y Y, LI S Q, SONG Y, et al. The therapeutic effect of Chaihu-Shugan-San in fatty liver disease: A meta-analysis randomized controlled trials [J]. Int J Clin Exp Med, 2018, 11(12):12880-12888.
- [28] ZHU F, LI Y M, FENG T T, et al. Freeze-dried Si-Ni-San powder can ameliorate high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(24):3056-3068.
- [29] JIANG H, YANG L, HOU A, et al. Botany, traditional uses, phytochemistry, analytical methods, processing, pharmacology and pharmacokinetics of Bupleuri Radix: A systematic review [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131:110679.
- [30] CHANG G R, LIN W L, LIN T C, et al. The ameliorative effects of saikosaponin in thioacetamide-induced liver injury and non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21):11383.
- [31] ZHU Y, CHEN X, RAO X, et al. Saikosaponin a ameliorates lipopolysaccharide and d-galactosamine-induced liver injury via activating LXR α [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72:131-137.
- [32] LI X J Y, GE J D, LI Y J, et al. Integrative lipidomic and transcriptomic study unravels the therapeutic effects of saikosaponins A and D on non-alcoholic fatty liver disease [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(11):3527-3541.

[责任编辑 周冰冰]