

[药 理]

壮药火钱胶囊对 D-GalN/LPS 所致急性肝衰竭小鼠的保护作用

王冰冰，朱华^{*}，谢凤凤^{*}，许立拔，韦安达，余秀琪

(广西中医药大学，广西壮瑶药重点实验室，壮瑶药协同创新中心，广西壮族自治区民族药资源与应用工程研究中心，广西南宁 530200)

摘要：目的 研究壮药火钱胶囊对 D-氨基半乳糖/脂多糖 (D-GalN/LPS) 所致急性肝衰竭小鼠的保护作用。方法 小鼠随机分为正常组、模型组、水飞蓟宾组 (100 mg/kg) 和火钱胶囊低、中、高剂量组 (365、730、1 460 mg/kg)，每组 25 只。预防性灌胃给药 10 d 后，采用单次腹腔注射给予 D-GalN (700 mg/kg) 和 LPS (10 μg/kg) 建立肝衰竭模型。检测小鼠存活率；计算肝指数；检测血清 AST、ALT、IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 水平，肝组织 MDA、NO、IL-1β、IL-6、TNF-α 水平和 SOD 活性；HE 染色观察肝组织病理学改变，RT-qPCR 法检测肝组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS、NF-κB、IkBα、TLR4 mRNA 表达；Western blot 法检测肝组织 Bax、Bcl-2、Bcl-xL、p-p38、p-p65 蛋白表达。结果 与模型组比较，水飞蓟宾组和火钱胶囊各剂量组小鼠存活率提高，肝指数、血清 AST、ALT、IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 和肝组织 MDA、NO、IL-1β、IL-6、TNF-α 水平降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)，肝组织 SOD 活性升高 ($P < 0.01$)，肝组织病理损伤减轻；水飞蓟宾组和火钱胶囊高剂量组小鼠肝组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS、NF-κB、IkBα、TLR4 mRNA 和 Bax、p-p38、p-p65 蛋白表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 火钱胶囊对 D-GalN/LPS 所致急性肝衰竭小鼠具有保护作用，其机制可能与抑制肝细胞炎症和凋亡有关。

关键词：火钱胶囊；急性肝衰竭；水飞蓟宾；D-GalN/LPS；细胞凋亡；炎症反应

中图分类号：R285.5

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2026)01-0049-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.01.008

Protective effects of Zhuang-medicine Huoqian Capsules on D-GalN/LPS-induced acute liver failure in mice

WANG Bing-bing, ZHU Hua^{*}, XIE Feng-feng^{*}, XU Li-ba, WEI An-da, YU Xiu-qi

(Guangxi Key Laboratory for Zhuang and Yao Medicines, Collaborative Innovation Center for Zhuang and Yao Medicines, Guangxi Zhuang Autonomous Regional Engineering Research Center for Ethnic Medicine Resource and Application, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the protective effects of Zhuang-medicine Huoqian Capsules on acute liver failure (ALF) induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide (D-GalN/LPS) in mice. **METHODS** The mice were randomly divided into the normal group, the model group, the silibinin group (100 mg/kg) and the low-dose, medium-dose and high-dose Huoqian Capsules groups (365, 730, 1 460 mg/kg), with 25 mice in each group. After 10 days preventive intragastric administration of the corresponding drug, single intraperitoneal injection of D-GalN (700 mg/kg) and LPS (10 μg/kg) was conducted to establish the mouse model of ALF. The mice had their survival rate examined; their liver index calculated; their serum levels of AST, ALT, IL-1β, IL-6, TNF-α and MCP-1 and hepatic levels of MDA, NO, IL-1β, IL-6 and TNF-α and SOD activity measured; their liver histopathological changed examined by HE staining; their hepatic mRNA expressions of IL-1β, IL-6, TNF-α, iNOS, NF-κB, IkBα and TLR4 measured by RT-qPCR; and their hepatic protein expressions of Bax, Bcl-2, Bcl-

收稿日期：2024-03-18

基金项目：广西重点研发计划项目（桂科 AB21196016）；广西科技基地和人才专项（桂科 AD21238031）；广西中医药重点学科壮药学（GZKX-Z-20-64）；广西一流学科中药学（民族药学）（桂教科研〔2018〕12号）

作者简介：王冰冰（1999—），女，硕士生，从事中药和民族药鉴定、开发研究。E-mail：1572842931@qq.com

*通信作者：朱华（1957—），男，博士，二级教授，从事中药品种、质量及其资源开发研究。E-mail：zhuhuagx@163.com

谢凤凤（1989—），女（壮族），博士，助理研究员，从事中药和民族药药效物质及其活性研究。E-mail：15177143553@163.com

xL, p-p38 and p-p65 measured by Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, the groups intervened with either silibinin or Huoqian Capsules displayed increased survival rate; decreased levels of liver index, serum AST, ALT, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 and hepatic MDA, NO, IL-1 β , IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$, $P < 0.01$) ; increased hepatic SOD activity ($P < 0.01$) ; and alleviated pathological damage of the liver tissue. Additionally, the silibinin and high-dose Huoqian Capsules groups shared decreased hepatic expressions of *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *iNOS*, *NF- κ B*, *I κ B α* , *TLR4* mRNA and Bax, p-p38, p-p65 proteins ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

CONCLUSION With their good hepatoprotective effects on the *D*-GalN/LPS-induced mouse model of ALF, Huoqian Capsules may inhibit the hepatocytic inflammation and apoptosis.

KEY WORDS: Huoqian Capsules; acute liver failure; silibinin; *D*-GalN/LPS; cell apoptosis; inflammatory reaction

急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF) 是一种以肝功能急剧下降和肝细胞弥漫性坏死为表现的严重肝病综合征，其病情发展迅速，短期致死率高，目前尚无特效药物，肝移植是唯一有效的治疗手段，说明毒在肝，肝换则毒解^[1-2]。炎性反应是ALF的关键因素，致炎因子蓄积超出肝组织代谢和排泄的能力，可导致肝组织可逆或不可逆损伤^[3]。ALF壮医病因为“蛊”毒蕴肝，治疗当“调气、补虚、祛毒”，治“蛊”以祛毒为先^[4]。壮药火钱胶囊是在壮医药验方火炭母胶囊和拳卷地钱胶囊的基础上，由广西壮瑶药重点实验室自主开发的复方制剂，由火炭母、拳卷地钱、白背三七、美丽胡枝子、锡叶藤、犁头草、蝙蝠草、青钱柳8味壮药组成，有解毒消肿、清热化湿功效，主要用于瘰疬、疔疮、痈肿、癰瘤和急慢性肝炎、肝硬化、肝癌早期的辅助治疗，方中火炭母^[5-6]、拳卷地钱^[7-9]、蝙蝠草^[2]、白背三七^[10]和犁头草^[11-12]均有良好的抗肝炎或抗炎作用，但该方是否可拮抗 *D*-GalN/LPS 诱导的小鼠肝衰竭尚不明确。本研究通过 *D*-GalN/LPS 诱导建立小鼠急性肝衰竭模型，观察火钱胶囊对小鼠肝衰竭的作用及潜在机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性昆明 (KM) 种小鼠，体质量 18~22 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004]，饲养于广西中医药大学屏障环境 [实验动物使用许可证号 SYXK (桂) 2019-0001]，适应性饲养 3 d。动物实验通过广西中医药大学伦理委员会审查批准 (批准号 DW20230620-129)，符合 3R 原则。

1.2 药物 火钱胶囊由火炭母 6 g、拳卷地钱 6 g、白背三七 8 g、美丽胡枝子 4 g、蝙蝠草 3 g、犁头草 3 g、锡叶藤 4 g、青钱柳 2 g 组成，前 6 味药采

集地分别为桂林市临桂区上宅村、来宾市金秀镇六拉冲村、东兴市望姑岭、三江县古宜镇文大村、平南县马练乡和鹿寨县拉钩乡，用药部位均为全草；锡叶藤采自东兴市望姑岭，用药部位为根部；青钱柳采自三江县古宜镇文大村，用药部位为叶片，经广西中医药大学中药鉴定教研室滕建北教授鉴定为药材正品，由广西壮瑶药重点实验室研制，广西中医药大学现代中药制剂工程技术研究中心制备 (批号 20230513011)，干膏得率为 12.78%，每 1 g 相当于 7.83 g 原药材，胶囊内容物装填量 0.4 g/粒，其中提取物干膏粉末 0.38 g/粒，辅料为 0.02 g 微晶纤维粉末，临床拟用量每天 3 次，每次 4 粒，即人最大日服用量为 4.8 g。参照我国成年人标准体质量 60 kg，人临床剂量为 80 mg/kg，按体表面积 (9.1 倍) 折算小鼠给药剂量为 728 mg/kg^[13]，故中剂量设定为 730 mg/kg (略大于等效剂量)。

1.3 试剂 水飞蓟宾、羧甲基纤维素钠 (上海麦克林生化科技股份有限公司，批号 C14554655、C14834490)；*D*-氨基半乳糖 (*D*-GalN) (山东西亚化学有限公司，批号 20230420)；LPS (北京索莱宝科技有限公司，批号 1031Q0312)；谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、一氧化氮 (NO)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、总蛋白定量测定试剂盒 (BCA 法) (南京建成生物工程研究所有限公司，批号 20230914、20230923、20231013、20230925、20231013、20231016)；白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司，批号 202309)；RIPA 细胞裂解液 (上海碧云天生物技术股份有限公司，批号 072823231017)；5× SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (合肥白鲨生物科技有

限公司，批号EZ6470EE3A)；Immobilon-PSQ PVDF膜(美国Sigma-Aldrich公司，批号0000232509)；脱脂奶粉(武汉赛维尔生物科技有限公司，批号GC2308003)；ECL发光液(苏州四正柏生物科技有限公司，批号M23M)；山羊抗兔二抗(常州市祥泰生物技术有限公司，批号56j9958)； β -actin、Bax、Bcl-2抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司，批号9100026001、4000003545、4000000173)；Bcl-xL、p-MAPK p38、NF- κ B p65抗体[艾柏森(北京)生物科技有限公司，批号00103343、00105889、23002541]。

1.4 仪器 实时荧光定量仪、热循环仪(型号QuantStudioTM 3、TCA0096，美国Thermo Fisher Scientific公司)；高速低温组织研磨仪、数显水平摇床(型号KZ-III-F、DS-H200，武汉赛维尔生物科技有限公司)；低温离心机(型号H2050R，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)；漩涡混合器(型号XH-B，江苏康健医疗用品有限公司)；电子天平(感量1 mg，型号ES2220M，瑞士Precisa公司)；高速冷冻离心机(型号5810R，德国Eppendorf公司)；全波长酶标仪(型号Epoch2，美国BioTek公司)；超低温冰箱(型号MDF-U74V，日本Panasonic公司)；超纯水仪(型号Direct-Q 5 UV-R，美国Merck Millipore公司)；高级荧光生物正置显微镜(型号ECLIPSE Ni-U，日本Nikon公司)；垂直电泳槽(型号JY-SCZ4+，北京君意东方电泳设备有限公司)；荧光图像分析系统(型号5200 Multi，上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 提取物干膏、药液制备 取组方药材共10.8 kg，粉碎，过2号筛，置于300 L提取浓缩机中，提取溶剂75%乙醇，料液比1:15，提取温度75 °C，回流提取2次，每次2 h，合并提取液，减压浓缩成流浸膏，挥干溶剂，即得1.38 kg干膏。称取胶囊内容物1 460 mg，加入0.5%CMC-Na至20 mL，充分匀浆，即得高剂量药液(73 mg/mL)，同法分别制备低、中剂量药液(18.25、36.5 mg/mL)，临用现配。

2.2 分组及给药 取小鼠150只，随机分为正常组、模型组、水飞蓟宾组(100 mg/kg)^[14]和火钱胶囊低、中、高剂量组(365、730、1 460 mg/kg)，每组25只。正常组和模型组小鼠灌胃0.5%CMC-Na，其余各组小鼠灌胃相应剂量水飞蓟宾或火钱胶囊药液，给药体积20 mL/kg，每天1次，连续

10 d。末次给药前禁食不禁水14~16 h，给药后1 h正常组小鼠腹腔注射生理盐水(10 mL/kg)，其余各组小鼠腹腔注射D-GalN(700 mg/kg)和LPS(10 μ g/kg)混合液(10 mL/kg)^[14]。

2.3 小鼠存活率观察 每组取小鼠15只，进行72 h存活观察。造模后8 h内(1 h/次)和12 h后(12 h/次)记录各组小鼠存活数，直至72 h，计算存活率，公式^[15]为存活率=(小鼠72 h存活数/小鼠总数)×100%。

2.4 血清ALT、AST、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1水平检测 取剩余小鼠10只，造模6 h后眼眶后静脉丛采血，3 000 r/min离心10 min，分离血清，按试剂盒说明书检测ALT、AST、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1水平。

2.5 肝指数及肝组织MDA、NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平和SOD活性检测 处死小鼠，迅速剥离肝脏，称定肝质量，计算肝指数，公式为肝指数=(小鼠肝质量/小鼠体质量)×100%。取肝组织约200 mg，加9倍量冰生理盐水匀浆，3 000 r/min离心10 min，取上清液，先采用BCA法检测上清液蛋白浓度，再按试剂盒说明书检测肝组织MDA、NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平和SOD活性^[14,16-17]。

2.6 HE染色观察肝组织病理变化 取肝左上叶，4%多聚甲醛固定，经脱水、包埋、切片、摊片、脱蜡后进行常规苏木素-伊红(HE)染色，在光学显微镜下观察肝组织病理变化。

2.7 RT-qPCR法检测肝组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS、NF- κ B、I κ B α 、TLR4 mRNA表达 取肝组织约20 mg，加入350 μ L LB裂解液，匀浆，DNA清除/RNA吸附通用柱反复提纯7次，获取RNA溶液，热循环仪上42 °C处理2 min，除去基因组DNA，放入逆转录反应体系热循环仪中，设置程序37 °C 15 min，85 °C 5 s，反转录获取cDNA。按试剂盒说明书制备20 μ L扩增体系，在PCR仪上进行反应，条件为95 °C预变性30 s，95 °C变性5 s，55 °C退火30 s，72 °C充分延伸30 s，共45个循环。以 β -actin为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因mRNA表达^[14,16-17]。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成，序列见表1。

2.8 Western blot法检测肝组织Bax、Bcl-2、Bcl-xL、p38、p65蛋白表达 取肝组织约20 mg，置于2 mL研磨管中，按1:10比例添加RIPA裂解液，高速低温组织研磨仪研磨4次，置于冰箱中冷藏30 min，4 °C、12 000 r/min离心10 min，收集

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列
IL-1 β	正向 5'-TCGCAGCAGCACATCAACAAG-3' 反向 5'-TCCACGGGAAAGACACA GGTAG-3'
IL-6	正向 5'-CTCCCAACAGACCTGTCTATAC-3' 反向 5'-CCATTGCACAACTCTTTCTCA-3'
TNF- α	正向 5'-ATGCTCAGCCTCTCTCATTC-3' 反向 5'-GCTGTCACTCGAATTTGAGA-3'
iNOS	正向 5'-TCACTCAGCCAAGCCCTCAC-3' 反向 5'-TCCAATCTCGCCTATCCGCTCTC-3'
NF- κ B	正向 5'-CAAAGACAAAGAGGAAGTGAA-3' 反向 5'-GATGGAATGTAATCCCACCGTA-3'
I κ B α	正向 5'-CTGGTTCGCTCTTGTGAAAT-3' 反向 5'-GGGTAGCATCTGGAGATTTC-3'
TLR4	正向 5'-GCCATCATTATGAGTGCAATT-3' 反向 5'-AGGGATAAGAACGCTGAGAATT-3'
β -actin	正向 5'-CTACCTCATGAAGATCCCTGACC-3' 反向 5'-CACAGCTCTCTTGATGTCAC-3'

上清液，采用 BCA 法测定蛋白浓度，上清液加入适量 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，充分混匀，热循环仪上 95 ℃ 高温裂解变性 15 min，经 SDS-PAGE 电泳分离后 PVDF 膜转印，置于孵育盒中，5% 脱脂牛奶封闭 2 h，将 PVDF 膜置于一抗 Bax (1 :

表2 火钱胶囊对小鼠存活率的影响
Tab. 2 Effect of Huoqian Capsules on mouse survival rate

组别	存活数/只							
	0 h	1 h ~ 5 h	6 h	7 h	8 h	12 h	24 h ~ 72 h	存活率/%
正常组	15	15	15	15	15	15	15	100.00
模型组	15	15	10	6	2	2	0	0**
水飞蓟宾组	15	15	13	12	9	4	2	13.33##
火钱胶囊低剂量组	15	15	14	9	6	5	2	13.33##
火钱胶囊中剂量组	15	15	14	9	8	4	3	20.00##
火钱胶囊高剂量组	15	15	15	10	8	4	3	20.00##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

3.2 火钱胶囊对小鼠肝指数和血清 ALT、AST 水平的影响 与正常组比较，模型组小鼠肝指数和血清 ALT、AST 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，水飞蓟宾组和火钱胶囊各剂量组小鼠肝指数和血清 ALT、AST 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见表 3。

3.3 火钱胶囊对小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 水平的影响 与正常组比较，模型组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，水飞蓟宾组和火钱胶囊各剂量组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见表 4。

3.4 火钱胶囊对小鼠肝组织 MDA、NO 水平和 SOD 活性的影响 与正常组比较，模型组小鼠肝

2 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、Bcl-xL (1 : 2 000)、p38 (1 : 1 000)、p-p38 (1 : 2 000)、p65 (1 : 2 000)、p-p65 (1 : 2 000)、 β -actin (1 : 50 000) 溶液中，摇床上 4 ℃ 孵育过夜，TBST 室温避光洗膜 3 次，加山羊抗兔二抗 (1 : 5 000)，摇床上室温孵育 2 h，TBST 室温避光洗膜 3 次，ECL 化学发光显影和定影，Tanon 荧光图像分析系统曝光条带，Gel-Pro analyzer 4 软件扫描，获取蛋白积分光密度 (IOD) 值。以 β -actin 为内参，分析目的蛋白相对表达^[14,17]。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 17.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法；存活率数据采用卡方检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 火钱胶囊对小鼠存活率的影响 与正常组比较，模型组小鼠存活率降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，水飞蓟宾组和火钱胶囊各剂量组小鼠存活率升高 ($P<0.01$)，见表 2。

组织 MDA、NO 水平升高 ($P<0.01$)，SOD 活力降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，水飞蓟宾组和火钱胶囊各剂量组小鼠肝组织 MDA、NO 水平降低 ($P<0.01$)，SOD 活力升高 ($P<0.01$)，见表 5。

3.5 火钱胶囊对小鼠肝组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响 与正常组比较，模型组小鼠肝组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，水飞蓟宾组和火钱胶囊各剂量组小鼠肝组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)，见表 6。

3.6 火钱胶囊对小鼠肝组织病理变化的影响 正常组小鼠肝细胞结构轮廓清晰，呈紫红色均匀分布，排列规则有序，肝索放射状排列，细胞核大而圆，位于细胞中央；模型组小鼠肝细胞结构轮

表3 火钱胶囊对小鼠肝指数和血清 ALT、AST 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 Effects of Huoqian Capsules on mouse liver index and serum ALT, AST levels ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	肝指数/%	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)
正常组	10	4.727±0.426	31.19±17.47	36.55±18.06
模型组	8	6.179±0.449 **	167.31±23.00 **	184.61±41.40 **
水飞蓟宾组	9	5.211±0.620 ##	122.30±29.48 ##	127.85±13.89 #
火钱胶囊低剂量组	9	5.299±0.228 ##	132.09±29.26 ##	141.54±28.37 #
火钱胶囊中剂量组	10	5.478±0.442 ##	123.48±32.63 ##	129.03±9.16 ##
火钱胶囊高剂量组	9	5.156±0.311 ##	110.33±37.04 ##	114.69±27.45 ##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

表4 火钱胶囊对小鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 4 Effects of Huoqian Capsules on mouse serum IL-1β, IL-6, TNF-α and MCP-1 levels ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	MCP-1/(pg·mL ⁻¹)
正常组	10	46.06±26.66	35.52±16.73	395.03±50.43	137.03±9.76
模型组	8	177.99±18.05 **	107.46±9.20 **	669.92±83.31 **	187.68±10.45 **
水飞蓟宾组	9	147.51±14.25 ##	93.00±6.45 #	543.54±65.24 ##	172.11±8.16 ##
火钱胶囊低剂量组	9	151.89±14.53 #	95.00±7.96 #	556.21±73.20 ##	173.63±8.43 ##
火钱胶囊中剂量组	10	150.32±19.97 #	93.70±10.15 #	551.99±83.02 ##	172.66±9.80 ##
火钱胶囊高剂量组	9	136.17±35.28 ##	86.63±16.92 ##	519.12±63.24 ##	167.52±12.44 ##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

表5 火钱胶囊对小鼠肝组织 MDA、NO 水平和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 5 Effects of Huoqian Capsules on mouse hepatic MDA, NO levels and SOD activity ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	SOD/(U·mg prot ⁻¹)	MDA/(nmol·mg prot ⁻¹)	NO/(nmol·mg prot ⁻¹)
正常组	10	282.20±23.02	3.50±1.17	2.64±0.58
模型组	8	195.20±31.69 **	12.18±3.25 **	8.46±2.02 **
水飞蓟宾组	9	233.49±12.08 ##	7.74±1.12 ##	6.01±1.01 ##
火钱胶囊低剂量组	9	223.40±17.53 ##	8.25±1.02 ##	6.17±0.52 ##
火钱胶囊中剂量组	10	238.28±14.98 ##	8.07±1.42 ##	6.31±0.72 ##
火钱胶囊高剂量组	9	232.92±18.70 ##	8.13±2.03 ##	5.99±1.87 ##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

表6 火钱胶囊对小鼠肝组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 6 Effects of Huoqian Capsules on mouse hepatic IL-1β, IL-6 and TNF-α levels ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	IL-1β/(pg·mg prot ⁻¹)	IL-6/(pg·mg prot ⁻¹)	TNF-α/(pg·mg prot ⁻¹)
正常组	10	13.01±3.14	14.23±2.57	83.89±32.42
模型组	8	30.35±7.35 **	32.02±8.28 **	318.11±84.22 **
水飞蓟宾组	9	19.32±3.78 ##	20.70±3.36 ##	188.04±50.36 ##
火钱胶囊低剂量组	9	20.14±1.58 ##	20.88±2.28 ##	215.01±21.51 ##
火钱胶囊中剂量组	10	22.82±5.59 ##	21.89±2.09 ##	209.53±37.47 ##
火钱胶囊高剂量组	9	20.94±6.42 ##	20.65±3.24 ##	191.64±80.34 ##

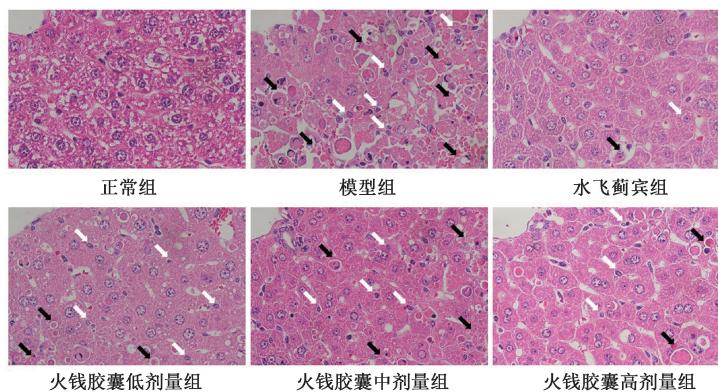
注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

廓模糊，肝索排列失序，肝细胞呈弥漫性坏死，细胞间可见大量血红细胞分布，细胞核固缩或消失；与模型组比较，水飞蓟宾组和火钱胶囊各剂量组小鼠肝组织病理损伤明显减轻，坏死面积明显缩小，肝细胞结构轮廓明显清晰，肝索排列明显有序，肝细胞排列明显规则，见图1。

3.7 火钱胶囊对小鼠肝组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS、NF-κB、IkBα、TLR4 mRNA 表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠肝组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS、NF-κB、IkBα、TLR4 mRNA 表达升

高 ($P<0.01$)；与模型组比较，水飞蓟宾组小鼠肝组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS、NF-κB、IkBα、TLR4 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)，火钱胶囊中、高剂量组小鼠肝组织 IL-1β、TNF-α、NF-κB、IkBα、TLR4 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，火钱胶囊高剂量组小鼠肝组织 IL-6、iNOS mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见表7。

3.8 火钱胶囊对小鼠肝组织 Bax、Bcl-2、Bcl-xL、p-p38、p-p65 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠肝组织 Bax、p-p38、p-p65 蛋白表达升高



注：白色箭头指示肝组织坏死，黑色箭头指示肝细胞核固缩。

图1 各组小鼠肝组织HE染色(×400)

Fig. 1 HE staining of mouse liver tissue in each group (×400)

表7 火钱胶囊对小鼠肝组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS、NF- κ B、I κ B α 、TLR4 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)Tab. 7 Effects of Huoqian Capsules on mouse hepatic IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS, NF- κ B, I κ B α and TLR4 mRNA expressions ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α	iNOS	NF- κ B	I κ B α	TLR4
正常组	1.00±0.04	1.01±0.20	1.01±0.17	1.03±0.29	1.02±0.27	1.01±0.14	1.04±0.34
模型组	4.33±0.59 **	3.16±0.25 **	4.95±0.94 **	4.47±1.88 **	3.80±0.12 **	4.23±0.95 **	6.45±2.15 **
水飞薑宾组	1.13±0.71 ##	1.40±0.28 ##	1.25±0.23 ##	1.11±0.70 ##	1.17±0.60 ##	1.54±0.11 ##	1.39±0.35 ##
火钱胶囊低剂量组	3.13±0.92	3.04±1.00	3.70±0.69	4.02±1.54	3.29±0.53	3.29±0.77	5.97±2.62
火钱胶囊中剂量组	2.46±1.48 #	2.40±0.57	3.42±1.34 #	2.71±1.57	2.71±0.57 #	2.68±0.76 #	2.76±1.31 #
火钱胶囊高剂量组	1.67±0.86 ##	1.64±0.26 ##	1.98±0.84 ##	1.92±1.17 #	1.36±0.53 ##	2.15±0.54 ##	2.67±1.23 #

注：与正常组比较，** P<0.01；与模型组比较，#P<0.05, ##P<0.01。

(P<0.01), Bcl-2、Bcl-xL蛋白表达降低(P<0.01)；与模型组比较，水飞薑宾组小鼠肝组织Bax、p-p38、p-p65蛋白表达降低(P<0.01)，Bcl-2、Bcl-xL蛋白表达升高(P<0.05)，火钱胶囊中、高剂

量组小鼠肝组织Bax、p-p65蛋白表达降低(P<0.05, P<0.01)，火钱胶囊高剂量组小鼠肝组织p-p38蛋白表达降低(P<0.05)，见表8、图2。

表8 火钱胶囊对小鼠肝组织Bax、Bcl-2、Bcl-xL、p-p38、p-p65蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)Tab. 8 Effects of Huoqian Capsules on mouse hepatic Bax, Bcl-2, Bcl-xL, p-p38 and p-p65 protein expressions ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bcl-xL/β-actin	p-p38/p38	p-p65/p65
正常组	1.00±0.54	1.00±0.33	1.00±0.39	1.02±0.38	1.01±0.57
模型组	3.41±0.43 **	0.10±0.03 **	0.26±0.12 **	3.70±0.99 **	5.74±0.79 **
水飞薑宾组	0.82±0.48 ##	0.50±0.19 #	0.73±0.25 #	1.05±0.19 ##	1.74±0.25 ##
火钱胶囊低剂量组	2.72±0.25	0.19±0.06	0.30±0.09	2.72±0.39	4.39±0.92
火钱胶囊中剂量组	2.48±0.46 #	0.26±0.09	0.36±0.10	2.69±1.40	2.81±1.32 ##
火钱胶囊高剂量组	1.48±0.23 ##	0.39±0.18	0.47±0.13	1.78±1.10 #	1.77±0.91 ##

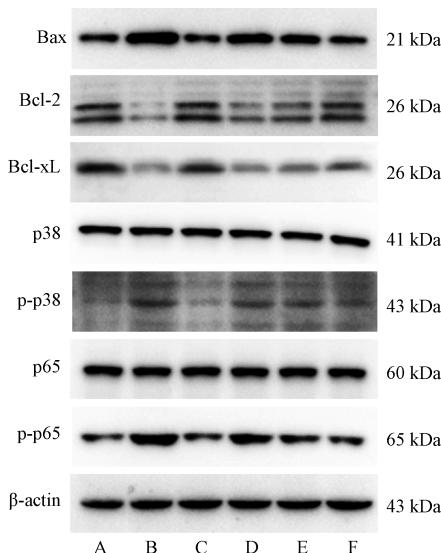
注：与正常组比较，** P<0.01；与模型组比较，#P<0.05, ##P<0.01。

4 讨论

ALF归属于壮医“蛊”“咪叠蛊”症^[2]，认为LPS属于火毒，经龙路(血脉)和火路(传感之道)传变^[18]。火钱胶囊组方理念符合壮医治“蛊”以祛毒为先的原则，火炭母、拳卷地钱为君药，有除风、热、湿、蛊毒及保肝之功^[19-20]；白

背三七、蝙蝠草和美丽胡枝子为臣药，可通调龙路、火路、气道，谷道和水道，解毒保肝；佐以锡叶藤、青钱柳和犁头草，可活血祛瘀，排毒消肝肿^[19-20]。

ALF典型的病理特征是爆发性肝细胞炎症、剧烈性氧化应激损伤、弥漫性肝细胞坏死等^[21-22]。



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为水飞蓟宾组, D~F 分别为火钱胶囊低、中、高剂量组。

图2 各组小鼠肝组织 Bax、Bcl-2、Bcl-xL、p-p38、p-p65 蛋白条带

Fig. 2 Mouse hepatic protein bands of Bax, Bcl-2, Bcl-xL, p-p38 and p-p65 in each group

LPS 是诱导炎症反应的经典试剂, 而 *D*-GalN 消耗肝脏三磷酸尿苷, 强效抑制肝 RNA 合成^[23], 故 *D*-GalN/LPS 致小鼠 ALF 模型是一种经典的动物模型^[24-25]。*D*-GalN/LPS 致小鼠肝衰竭模型与临床肝衰竭临床特点相似, 均发病迅猛, 死亡快, 死亡率高, 病理可见弥漫性肝细胞坏死^[26]。本研究结果显示, *D*-GalN/LPS 致小鼠死亡时间主要集中在造模后 5~12 h, 72 h 死亡率高达 100%; 肝组织结构变化主要表现为大面积坏死, 肝索结构破坏严重, 大量肝细胞凋亡; 火钱胶囊可提高模型小鼠存活率, 改善肝组织结构。

肝指数及血清 ALT、AST 水平是评价肝功能损伤的重要指标^[27-28]。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子水平与肝细胞炎症反应剧烈程度呈正相关^[21-22,29]。TNF- α 可促进其他炎症介质释放, 如 IL-1 β 、IL-6 等, 加重肝脏炎症反应^[30]。MCP-1 是继发性炎症介质, 是脓毒症治疗药物疗效评价及预后的重要预测指标^[31]。本研究结果显示, 火钱胶囊可降低血清 AST、ALT 水平和肝指数, 血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 水平, 以及肝组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平及其 mRNA 表达。

剧烈性氧化应激可导致肝细胞 DNA 损伤, 调控细胞凋亡蛋白酶合成和释放, 导致肝细胞凋亡^[32-33]。MDA 水平反映氧化损伤程度, SOD 活性

反映抗氧化应激损伤的能力^[34]。iNOS 可刺激诱导 NO 释放, 而后者是氧化损伤自由基, 被认为是肝脏损伤的重要预测指标^[35]。本研究结果显示, 火钱胶囊有良好的抗氧化应激作用, 可降低肝组织 MDA、NO 水平, 升高 SOD 活性, 下调 iNOS mRNA 表达。

p38 MAPK/NF- κ B 是最经典的信号通路, 参与肝脏等组织器官的细胞炎症和凋亡^[36]。p38 MAPK 蛋白磷酸化可激活 NF- κ B 信号通路, 引起 NF- κ B p65 磷酸化活化, 促进炎症细胞因子释放, 爆发炎症反应^[34,36]。Bcl-2 家族成员 Bax 是细胞凋亡促进基因, 通过线粒体依赖途径对肝组织的修复产生负向调控, 抑制肝细胞增殖, 并促进其凋亡, 而 Bcl-2 和 Bcl-xL 是凋亡抑制基因^[37-38]。本研究结果显示, 火钱胶囊可抑制肝组织 p-p38、p-p65 蛋白表达, 并降低 Bax 蛋白表达, 下调 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS、NF- κ B、I κ B α 、TLR4 mRNA 表达。

综上所述, 火钱胶囊可提高小鼠存活率, 有良好的抗炎、保肝、抗氧化作用, 其机制可能与抑制肝细胞炎症反应和凋亡有关。

参考文献:

- [1] Dong V, Nanchal R, Karvellas C J. Pathophysiology of acute liver failure[J]. *Nutr Clin Pract*, 2020, 35(1): 24-29.
- [2] 杨雯琪, 朱华, 罗静, 等. 蝙蝠草醇提物对 D-GalN/LPS 所致小鼠急性肝功能衰竭的影响[J]. 中成药, 2023, 45(6): 2002-2006.
- [3] 蒲翠琪, 蓝毓营. 壮医药虚致病学说的研究述评[J]. 中医药导报, 2023, 29(5): 71-75.
- [4] 罗艺微, 吴姗姗, 王振常, 等. 壮方壮肝逐瘀煎联合骨髓间充质干细胞移植对 CCl₄ 大鼠肝纤维化的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(3): 443-449.
- [5] 高雅, 朱华. 火炭母醇提物对大鼠急性肝损伤的保护作用研究[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(3): 283-284.
- [6] 董雪静, 许立拔, 王颖, 等. 火炭母胶囊对四氯化碳所致大鼠肝纤维化的作用研究[J]. 壮瑶药研究, 2021(1): 96-106; 187.
- [7] 梁爽, 朱华, 黄健军, 等. 拳卷地钱总黄酮抗小鼠肝纤维的作用及机制研究[J]. 中国药房, 2021, 32(19): 2363-2370.
- [8] 李平凤, 黎理, 谢凤凤, 等. 拳卷地钱乙醇提取物 HPLC 指纹图谱与其抗急性肝损伤的谱效关系[J]. 中成药, 2021, 43(2): 524-527.
- [9] 王跃峰, 张可锋, 周雨晴, 等. 拳卷地钱总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用及其作用机制[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 277-279.
- [10] 金铁峰. 基于 SIRT1/FoxO1 通路研究白背三七总黄酮对糖尿病肝损伤大鼠的保护作用[J]. 浙江中医杂志, 2019,

- 54(5): 368-369.
- [11] 张雷, 郭玉成, 石鑫, 等. 梨头草提取物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的修复作用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(7): 1605-1607.
- [12] 秦慧真, 林思, 张森, 等. 基于NF-κB/Akt信号通路探讨梨头草醇提物对LPS诱导RAW264.7细胞的抗炎作用[J]. 中成药, 2022, 44(12): 3811-3817.
- [13] 郝光荣. 实验动物学[M]. 2版. 上海: 第二军医大学出版社, 2002: 276.
- [14] Wang W, Wu L L, Li Q, et al. Madecassoside prevents acute liver failure in LPS/D-GalN-induced mice by inhibiting p38/NF-κB and activating Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1137-1145.
- [15] Zhang S N, Yang N B, Ni S L, et al. Pretreatment of lipopolysaccharide (LPS) ameliorates D-GalN/LPS induced acute liver failure through TLR4 signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6626-6634.
- [16] Zhao H L, Han Q J, Lu N, et al. HMBOX1 in hepatocytes attenuates LPS/D-GalN-induced liver injury by inhibiting macrophage infiltration and activation[J]. *Mol Immunol*, 2018, 101: 303-311.
- [17] Wang X P, Wu L L, Zhang Q S, et al. Methyl 3, 4-dihydroxybenzoate protects against D-galN/LPS-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis in mice[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(7): 1082-1088.
- [18] 赵湘培, 陈少锋, 黄卫宣, 等. 壮医方白花丹消蛊汤对食蟹猴肝纤维化的干预作用及机制[J]. 医药导报, 2018, 37(4): 434-437.
- [19] 朱华, 戴忠华. 中国壮药图鉴(上)[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2017: 172; 417; 454; 716.
- [20] 朱华, 戴忠华. 中国壮药图鉴(下)[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2020: 461; 785.
- [21] Wang L, Wang X H, Kong L N, et al. Isoliquiritigenin alleviates LPS/ D-GalN-induced acute liver failure by activating the PGC-1α/ Nrf2 pathway to reduce oxidative stress and inflammatory response[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100: 108159.
- [22] Bhattacharya S, Patel K K, Dehari D, et al. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 462(1-2): 133-155.
- [23] 桂颖, 雷欢, 邓琴, 等. 姜黄素通过TLR4/NF-κB/NLRP3信号通路减轻LPS/D-GalN诱导的小鼠急性肝损伤[J]. 武汉轻工大学学报, 2022, 41(2): 26-32; 37.
- [24] Xia Y L, Wang P, Yan N N, et al. Withaferin A alleviates fulminant hepatitis by targeting macrophage and NLRP3[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(2): 174.
- [25] Zhang Y C, Jia H, Jin Y H, et al. Glycine attenuates LPS-induced apoptosis and inflammatory cell infiltration in mouse liver[J]. *J Nutr*, 2020, 150(5): 1116-1125.
- [26] Liu B L, Lu Y Z, Chen X Y, et al. Protective role of shiitake mushroom-derived exosome-like nanoparticles in D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 477.
- [27] 周胜, 王铎. 三黄茵赤汤对大部分肝切除肝衰竭大鼠氧化应激与肝细胞凋亡及再生影响分析[J]. 四川中医, 2019, 37(7): 54-58.
- [28] Thakur R, Sharma A, Lingaraju M C, et al. Ameliorative effect of ursolic acid on renal fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 972-980.
- [29] Juskewitch J E, Knudsen B E, Platt J L, et al. LPS-induced murine systemic inflammation is driven by parenchymal cell activation and exclusively predicted by early MCP-1 plasma levels[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(1): 32-40.
- [30] Liu Y, Wu H, Nie Y C, et al. Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF-κB pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(10): 1606-1612.
- [31] 赵永刚, 龙辉. 重症肺炎相关脓毒症患者CVVHDF治疗前后外周血HMGB1和TLR4及MCP-1水平变化与预后的关系[J]. 热带医学杂志, 2023, 23(4): 516-521.
- [32] Rani V, Deep G, Singh R K, et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies[J]. *Life Sci*, 2016, 148: 183-193.
- [33] Schemmitt E G, Colares J R, Hartmann R M, et al. Effect of glutamine on oxidative stress and inflammation in a rat model of fulminant hepatic failure[J]. *Nutr Hosp*, 2016, 33(2): 210-219.
- [34] 刘丽, 周宇, 李双杰. 黄芪甲苷对急性肝衰竭小鼠抗氧化、抗凋亡机制探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(6): 722-728.
- [35] 侯金秋, 邹楠, 袁今奇, 等. 左旋紫草素抑制NF-κB信号通路保护LPS/D-GalN诱导的小鼠急性肝损伤[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(1): 130-138.
- [36] 韦春昕, 胡亦明, 黄仕琦, 等. 基于p38 MAPK/NF-κB信号通路探讨柴胡加龙骨牡蛎汤干预广泛性焦虑模型大鼠的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 114-123.
- [37] Yu H H, Qiu Y X, Li B, et al. *Kadsura heteroclita* stem ethanol extract protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice via suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113496.
- [38] Nieck G J L, Martijn R H Z, Frank J D. Histone deacetylase 3(HDAC 3) as emerging drug target in NF-κB-mediated inflammation[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 33: 160-168.