

# 护肝布祖热方对大鼠肝内胆汁淤积性肝损伤的影响及机制<sup>△</sup>

阿依孜巴·图尔洪<sup>1\*</sup>, 杨建华<sup>2</sup>, 王晓梅<sup>1</sup>, 王新玲<sup>1</sup>, 胡君萍<sup>1#</sup>(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)16-1943-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.16.05



**摘要** **目的** 研究护肝布祖热方(HBF)对大鼠肝内胆汁淤积性肝损伤的影响及潜在机制。**方法** 将大鼠随机分为对照组(control组)、模型组(model组)、熊去氧胆酸(UDCA)组(阳性对照, 60 mg/kg)和HBF低、中、高剂量组(HBF-L、HBF-M、HBF-H组, 0.4、0.8、1.6 g/kg), 每组6只。各药物组大鼠每天灌胃相应药液1次, 连续7 d; control组和model组大鼠灌胃等体积水。实验第5天, 除control组外, 其余各组大鼠均单次灌胃 $\alpha$ -异硫氰酸萘酯橄榄油溶液(100 mg/kg)建模。造模48 h后, 检测大鼠血清中肝功能指标(天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、总胆汁酸、总胆红素、直接胆红素)含量和氧化应激指标[丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶]水平, 观察肝组织病理形态变化, 检测肝组织中炎症相关因子[肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )]和法尼酯X受体(FXR)信号通路相关因子[FXR、小异源二聚体伴侣受体(SHP)、多药耐药蛋白2(MRP2)、胆盐输出泵转运蛋白(BSEP)、钠离子依赖性牛磺胆酸共转运蛋白(NTCP)、有机阴离子转运多肽2(OATP2)和胆固醇7 $\alpha$ 羟化酶(CYP7A1)] mRNA, 以及FXR信号通路相关蛋白(FXR、MRP2、BSEP、NTCP)和核因子 $\kappa$ B p65(NF- $\kappa$ B p65)蛋白的表达情况。**结果** 与model组比较, HBF-H组大鼠血清中上述肝功能指标含量和MDA水平, 肝组织中上述炎症相关因子mRNA、CYP7A1 mRNA的表达水平以及NF- $\kappa$ B p65蛋白的相对表达量均显著降低, 血清中GSH水平和肝组织中FXR、SHP、MRP2、BSEP、NTCP、OATP2 mRNA的表达水平以及FXR、MRP2、BSEP、NTCP蛋白的相对表达量均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 肝组织病理改变明显好转; HBF-L组、HBF-M组、UDCA组大鼠均只有部分指标显著逆转( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论** HBF可预防大鼠肝内胆汁淤积性肝损伤, 此作用可能与激活FXR信号通路、减轻炎症和氧化应激有关。

**关键词** 护肝布祖热方; 肝内胆汁淤积性肝损伤; 法尼酯X受体信号通路; 炎症反应; 氧化应激

## Effects and mechanism of Hupan buzure formula on intrahepatic cholestatic liver injury in rats

Ayiziba·Tuerhong<sup>1</sup>, YANG Jianhua<sup>2</sup>, WANG Xiaomei<sup>1</sup>, WANG Xinling<sup>1</sup>, HU Junping<sup>1</sup>(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the effects of Hupan buzure formula (HBF) on intrahepatic cholestatic liver injury in rats and its potential mechanism. **METHODS** Rats were randomly divided into control group, model group, ursodeoxycholic acid (UDCA) group (positive control, 60 mg/kg) and HBF low-dose, middle-dose and high-dose groups (HBF-L, HBF-M, HBF-H groups, 0.4, 0.8, 1.6 g/kg), with 6 rats in each group. The rats in each drug group were given the corresponding drug solution intragastrically, once a day, for 7 consecutive days. The rats in the control group and the model group were given equal volumes of water intragastrically. On the 5th day, except for the control group, the rats in other groups were single intragastrically administered with alpha-naphthyl isothiocyanate olive oil solution (100 mg/kg) to establish the model. After 48 h of modeling, the contents of liver function indexes (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, total bile acid, total bilirubin, direct bilirubin) and oxidative stress indexes [malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), superoxide dismutase] in serum of rats were detected; the pathological changes of liver tissue were observed. The mRNA expressions of inflammation-related factors [tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )] and farnesoid X receptor (FXR) signaling pathway-related factors [FXR, small heterodimer partner (SHP), multidrug resistance protein 2 (MRP2), bile salt export pump (BSEP), Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), organic anion-transporting polypeptide 2 (OATP2) and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)], the expressions of FXR signaling pathway-related proteins (FXR, MRP2, BSEP, NTCP) and nuclear factor- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) in liver tissue were detected.

**RESULTS** Compared with the model group, the contents of liver function indexes and the level of MDA in serum, the mRNA expressions of the above inflammation-related factors

<sup>△</sup>基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81860745);新疆医科大学研究生科研创新项目(No.CXCX2022039)

\*第一作者 硕士。研究方向: 中药复方肝保护作用及机制。E-mail: 1595527349@qq.com

#通信作者 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 新疆特色药用植物资源开发利用。E-mail: hjp-yft@163.com

and CYP7A1, and the relative expression of NF- $\kappa$ B p65 in liver tissue were significantly decreased; the levels of GSH in serum, the mRNA expressions of FXR, SHP, MRP2, BSEP, NTCP and OATP2, and the relative expressions of FXR, MRP2, BSEP and NTCP in liver tissue were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the pathological changes of liver tissue were significantly improved. Only some indexes in HBF-L group, HBF-M group and UDCA group were significantly reversed ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSIONS** HBF can prevent intrahepatic cholestatic liver injury in rats, and the effects may be related to the activation of FXR signaling pathway and the reduction of inflammation and oxidative stress.

**KEYWORDS** Hugan buzure formula; intrahepatic cholestatic liver injury; farnesoid X receptor signaling pathway; inflammatory reaction; oxidative stress

胆汁淤积是多种肝胆疾病常见的基本病理改变<sup>[1]</sup>。作为一种进行性肝病,该症与肝外胆管、肝内胆管梗阻或肝细胞分泌胆汁方式改变所致胆汁流中断有关,表现为有毒胆汁成分(包括胆汁酸、胆固醇和胆红素等)在肝脏内过度蓄积,从而损害肝细胞,最终引发肝脏炎症、肝纤维化甚至肝硬化<sup>[2]</sup>。WHO 统计数据显示,肝硬化是中低收入国家人群第八大死亡原因,且对于终末期肝病患者而言,唯一可用的治疗方法是肝移植<sup>[3]</sup>。由于目前缺乏治疗胆汁淤积性肝病的有效药物,因此中医药治疗胆汁淤积的疗效及其作用机制研究备受学界关注。

护肝布祖热方(Hugan buzure formula, HBF)是保肝护肝的经典方之一,由菊苣根、菊苣子、芹菜根、芹菜子、茴香根皮、小茴香、菟丝子 7 味药材组成,具有补益肝胃、散气止痛、利胆、利水的功效,用于临床治疗急慢性乙型肝炎、黄疸性肝炎、急慢性胆囊炎、胆管炎等肝胆疾病,其成方制剂为护肝布祖热颗粒。本课题组前期研究表明,HBF 对四氯化碳诱导的人肝星状细胞损伤和大鼠急性肝损伤、肝纤维化均具有良好的改善作用<sup>[4-6]</sup>,但其是否具有体内抗胆汁淤积作用尚不清楚。有文献报道,该方主要活性成分芹菜素可通过影响法尼酯 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)信号通路对胆汁淤积性肝病发挥改善作用<sup>[7]</sup>,由毛菊苣加工制成的单味制剂清热卡森颗粒可通过调控该通路而改善大鼠的肝内胆汁淤积<sup>[8]</sup>。此外,FXR 受体在抑制胆汁酸合成酶、抑制肝摄取转运体、诱导胆汁外流转运体、促进肝脏胆汁酸代谢等方面也发挥着重要的调节作用,因此被称为“胆盐受体”,是目前肝内胆汁淤积的关键治疗靶点<sup>[9]</sup>。基于此,本文研究了 HBF 对大鼠肝内胆汁淤积性肝损伤的影响,并从 FXR 信号通路角度初步探讨了其潜在机制,旨在为拓展该方的临床用途提供依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本文所用主要仪器有 Multiskan GO 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、Eclipse Ni-U 型显微镜(日本 Nikon 公司)、QuantStudio™ 6 Flex 型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Life Technologies 公

司)、FluorChem E 0723 型超灵敏全自动成像分析系统(美国 ProteinSimple 公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

菊苣根(批号 JJZ-YP-200527)、菊苣子(批号 JJZ-YP-191209)、茴香根皮(批号 HXGP-YP-210115)均购自新疆宝康药业有限公司,芹菜根(批号 Z30142203)、芹菜子(批号 G30131002)均购自新疆维吾尔自治区维吾尔医医院,小茴香(批号 XHX-YP-170803)、菟丝子(批号 150701)均购自新疆和济中药饮片有限公司,以上药材经新疆医科大学药学院胡君萍教授鉴定均为真品。

$\alpha$ -异硫氰酸萘酯(alpha-naphthyl isothiocyanate, ANIT)对照品(货号 551-06-4,纯度 98%)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)胶囊(阳性对照,货号 L20237A,规格 250 mg)购自德国 Losan Pharma 公司;天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号分别为 20210708、20210708、20210708、20210707、20210709、20210618、20210709、20210708、20210709)均购自南京建成生物工程研究所;苏木精-伊红(HE)染色试剂(批号 G1003)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;反转录试剂盒、扩增试剂盒(批号分别为 AL50946A、AL51019A)均购自日本 Takara 公司;兔源 FXR 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 二抗(货号分别为 25055-1-AP、SA00001-1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源胆盐输出泵转运蛋白(bile salt export pump, BSEP)、多药耐药蛋白 2(multi-drug resistance protein 2, MRP2)抗体和鼠源 $\beta$ -微管蛋白( $\beta$ -tubulin)抗体(货号分别为 AF7593、DF3873、AF7018)均购自美国 Affinity 公司;鼠源钠离子依赖性牛磺胆酸共转运蛋白( $\text{Na}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)抗体(货号 YT5372)购自苏州睿瀛生物技术有限

公司;兔源核因子  $\kappa$ B p65 (nuclear factor kappa B p65, NF- $\kappa$ B p65)抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(货号分别为 8242T、7074S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

### 1.3 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重(200±20)g,购自新疆医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号为 SCXK(新)2018-0002。所有大鼠均饲养于受控环境(温度 23~24 °C,相对湿度 50%~60%,光照/黑暗循环 12 h)中,适应性喂养 1 周开始后续实验。本实验方案经新疆医科大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准,批准号为 IACUC-20180222-62。

## 2 方法

### 2.1 HBF 药液的制备

参照 HBF 原方组成,称取芹菜根、菊苣子、茴香根皮各 212 g,芹菜子、菊苣根、小茴香各 106 g,菟丝子 53 g,粉碎,混合,加水煎煮 3 次,煎煮时间分别为 2、1.5、1 h;合并 3 次煎液,浓缩得到干浸膏 233.2 g,得率为 23.16%。给药前,用水溶解,制成不同浓度的 HBF 药液,备用。

### 2.2 分组、给药与造模

将大鼠随机分为对照组(control 组)、模型组(model 组)、UDCA 组(阳性对照,60 mg/kg)和 HBF 低、中、高剂量组[HBFL、HBF-M、HBF-H 组,0.4、0.8、1.6 g/kg(按生药总量计)],每组 6 只。UDCA 的剂量参考相关文献<sup>[10]</sup>设置;HBF 的临床人用剂量为 18 g/d,折算得大鼠中剂量为 0.8 g/kg,再以此为基础得低、高剂量分别为 0.4、1.6 g/kg。各药物组大鼠每天灌胃相应药液 1 次,连续 7 d;control 组和 model 组大鼠灌胃等体积水。所有大鼠在造模前均禁食不禁水 12 h;实验第 5 天,除 control 组大鼠灌胃等体积橄榄油外,其余各组大鼠均单次灌胃 ANIT 橄榄油溶液(100 mg/kg)建立肝内胆汁淤积性肝损伤模型<sup>[2,11]</sup>。

### 2.3 大鼠生理状况观察

实验期间,每天记录各组大鼠的死亡情况,以及尿色、脱毛、精神状态等生理状况的变化情况。

### 2.4 标本采集与处理

实验第 7 天末次给药(即 ANIT 造模 48 h)后,麻醉大鼠并于腹主动脉取血,以 3 000 r/min 离心 10 min,收集上层血清,于-80 °C 下保存,用于血清生化指标的检测。随后,处死各组大鼠,取一部分肝组织固定在 4% 多聚甲醛中,用于组织病理形态观察;其余肝组织立即冻存于液氮中,于-80 °C 下保存,用于相关蛋白及 mRNA 的检测。

### 2.5 大鼠血清生化指标检测

取-80 °C 下保存的血清样品,按相关试剂盒说明书操作,以酶标仪检测各组大鼠血清中肝功能指标(AST、ALT、ALP、TBA、DBIL、TBIL)含量和氧化应激指标(MDA、GSH、SOD)水平。

### 2.6 大鼠肝组织病理形态观察

取固定于 4% 多聚甲醛中的肝组织适量,脱水,常规石蜡包埋,切片(厚度 4~5  $\mu$ m),经 HE 染色后,置于显微镜下观察各组大鼠肝组织的病理形态变化。

### 2.7 大鼠肝组织中炎症和 FXR 信号通路相关因子 mRNA 表达检测

采用实时定量 PCR 法进行检测。取-80 °C 下保存的肝组织适量,用 Trizol 试剂提取总 RNA(50 mg)并将其反转录为 cDNA;以上述 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应体系(20  $\mu$ L)包括:正、反引物各 0.8  $\mu$ L, TB Green Premix Ex Taq(2 $\times$ )10  $\mu$ L, ROX Reference Dye 2(50 $\times$ )0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, 灭菌水 6  $\mu$ L。反应程序为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算各组大鼠肝组织中炎症相关因子[肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )]和 FXR 信号通路相关因子[FXR、小异源二聚体伴侣受体(small heterodimer partner, SHP)、NTCP、有机阴离子转运多肽 2(organic anion-transporting polypeptide 2, OATP2)、BSEP、MRP2、胆固醇 7 $\alpha$  羟化酶(cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, CYP7A1)]mRNA 的表达水平,结果以 control 组为参照进行归一化处理。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成,引物序列及产物长度见表 1。

表 1 PCR 扩增引物序列及产物长度

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
TNF- $\alpha$	上游:GACTGGCGTGTTCATCCG	180
	下游:TCTGAGCATCGTAGTTGTTGG	
IL-1 $\beta$	上游:TGATGACGACCTGCTAGTGTG	124
	下游:TCCATTGAGGTGGAGAGCTT	
FXR	上游:AACCCGATGTTTGTCTTCT	129
	下游:TCCACTGCCTCTCTAICCTT	
SHP	上游:CTCGGTTTGACATACAGTGTGTC	75
	下游:GCATATTGGCTGGAGGTTTT	
NTCP	上游:CCACTTTTCTTCTTCTCTCTCTCT	124
	下游:GGTCCTTTGGAGGCTTGATTT	
OATP2	上游:TGTGATGACCGTTGATAAATTTCCA	81
	下游:TTCTCCACATATAGTTGGTGTGAA	
BSEP	上游:TGGTTTCAAGGCAATGTTAGG	99
	下游:TGGGAAGCATCTGTAGCAAG	
MRP2	上游:TTGGTCGTCTCTGTCTCC	150
	下游:AAATGTTGGTCTCTGTCTCTG	
CYP7A1	上游:CACTTGTTCAAGACCGCACA	189
	下游:TGCTTGAGATGCCAGAGAA	
GAPDH	上游:GTGCCAGCTCTCTCATAG	98
	下游:GAACTTGGCCGTGGGTAGAT	

## 2.8 大鼠肝组织中 FXR 信号通路相关蛋白和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达检测

采用 Western blot 法进行检测。取  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存的肝组织适量,经裂解、研磨、静置后,以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测定蛋白浓度后煮沸变性;取变性蛋白样品适量,经电泳分离后转膜,封闭;加入 FXR、MRP2、BSEP、NTCP、 $\beta$ -tubulin 和 NF- $\kappa$ B p65 一抗(稀释比例分别为 1:4 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:5 000、1:1 000),于  $4^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例 1:2 000),于室温下孵育 1 h;以化学发光法显色,使用全自动成像分析系统成像。以  $\beta$ -tubulin 为内参,计算目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值,用以表示目的蛋白的相对表达量。

## 2.9 统计学方法

采用 SPSS 25 软件对数据进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  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- $t$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 HBF 对大鼠一般生理状况的影响

造模前,各组大鼠的精神状态、活动、尿色、毛发等生理状况均正常。造模后,与 control 组比较,其余各组大鼠均出现不同程度的活动减少、皮肤瘙痒、尿黄等;与 model 组比较,各药物组大鼠的上述生理状况均有一定程度的改善。各组大鼠均未死亡。

### 3.2 HBF 对大鼠血清中肝功能指标的影响

与 control 组比较,model 组大鼠血清中 AST、ALT、ALP、TBA、DBIL、TBIL 含量均显著升高( $P<0.01$ )。与 model 组比较,HBF-H 组大鼠上述指标均显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),而 HBF-L 组、HBF-M 组、UDCA 组大鼠均只有部分指标显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结果见表 2。

表 2 HBF 对大鼠血清中肝功能指标的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	AST/(U/L)	ALT/(U/L)	ALP/(U/L)	TBA/( $\mu\text{mol/L}$ )	DBIL/( $\mu\text{mol/L}$ )	TBIL/( $\mu\text{mol/L}$ )
control 组	42.12 $\pm$ 5.61	33.28 $\pm$ 5.85	167.89 $\pm$ 60.66	13.70 $\pm$ 3.97	0.84 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.20
model 组	58.95 $\pm$ 5.95 <sup>a</sup>	108.06 $\pm$ 16.3 <sup>a</sup>	776.37 $\pm$ 118.52 <sup>a</sup>	315.20 $\pm$ 16.39 <sup>a</sup>	29.43 $\pm$ 9.37 <sup>a</sup>	61.90 $\pm$ 7.97 <sup>a</sup>
UDCA 组	38.59 $\pm$ 9.53 <sup>b</sup>	107.80 $\pm$ 7.90	556.58 $\pm$ 90.79 <sup>b</sup>	276.66 $\pm$ 22.59 <sup>b</sup>	21.73 $\pm$ 6.76	60.64 $\pm$ 11.43
HBF-L 组	71.11 $\pm$ 7.43	106.60 $\pm$ 19.55	619.04 $\pm$ 117.93 <sup>b</sup>	295.18 $\pm$ 12.90	24.88 $\pm$ 13.04	63.06 $\pm$ 11.15
HBF-M 组	58.45 $\pm$ 10.70	106.49 $\pm$ 24.67	546.78 $\pm$ 53.39 <sup>b</sup>	272.62 $\pm$ 26.22 <sup>b</sup>	18.88 $\pm$ 5.89 <sup>b</sup>	51.17 $\pm$ 8.27
HBF-H 组	47.94 $\pm$ 13.96 <sup>c</sup>	88.83 $\pm$ 6.71 <sup>c</sup>	505.55 $\pm$ 127.52 <sup>b</sup>	229.86 $\pm$ 34.31 <sup>b</sup>	16.40 $\pm$ 4.68 <sup>b</sup>	43.51 $\pm$ 11.80 <sup>b</sup>

a: 与 control 组比较,  $P<0.01$ ; b: 与 model 组比较,  $P<0.01$ ; c: 与 model 组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.3 HBF 对大鼠血清中氧化应激指标的影响

与 control 组比较,model 组大鼠血清中 MDA 水平显著升高,GSH、SOD 水平均显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与 model 组比较,HBF-M 组、HBF-H 组、UDCA

组大鼠血清中 MDA、GSH 水平均显著逆转( $P<0.05$ ), HBF-L 组大鼠血清中仅 MDA 水平显著逆转( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结果见表 3。

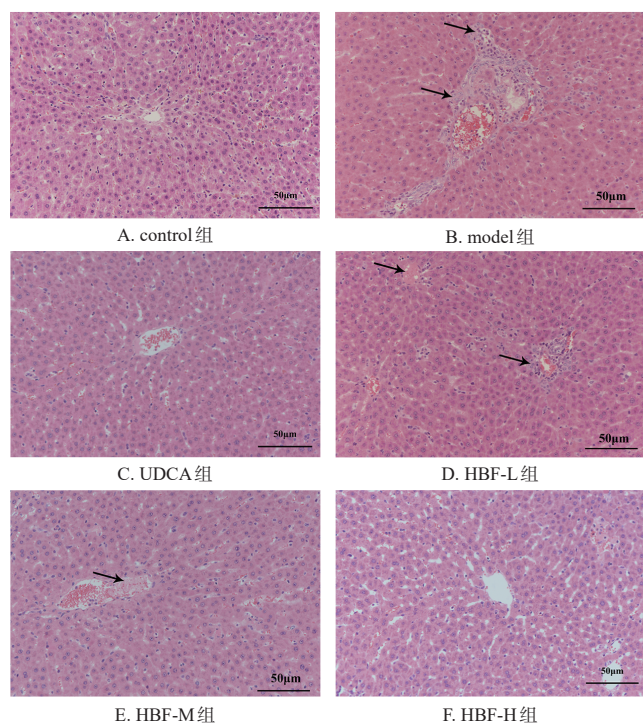
表 3 HBF 对大鼠血清中氧化应激指标的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	MDA/( $\mu\text{mol/L}$ )	GSH/( $\mu\text{mol/L}$ )	SOD/(U/mL)
control 组	3.93 $\pm$ 0.26	13.64 $\pm$ 1.97	269.43 $\pm$ 17.21
model 组	16.87 $\pm$ 2.29 <sup>a</sup>	6.67 $\pm$ 5.03 <sup>a</sup>	247.49 $\pm$ 9.91 <sup>b</sup>
UDCA 组	13.53 $\pm$ 1.93 <sup>c</sup>	17.60 $\pm$ 4.21 <sup>d</sup>	239.36 $\pm$ 19.33
HBF-L 组	12.58 $\pm$ 2.69 <sup>d</sup>	10.62 $\pm$ 3.78	242.49 $\pm$ 18.38
HBF-M 组	12.37 $\pm$ 2.80 <sup>d</sup>	11.56 $\pm$ 4.18 <sup>c</sup>	242.65 $\pm$ 15.76
HBF-H 组	12.12 $\pm$ 3.28 <sup>d</sup>	13.42 $\pm$ 2.71 <sup>d</sup>	254.78 $\pm$ 10.75

a: 与 control 组比较,  $P<0.01$ ; b: 与 control 组比较,  $P<0.05$ ; c: 与 model 组比较,  $P<0.05$ ; d: 与 model 组比较,  $P<0.01$ 。

### 3.4 HBF 对大鼠肝组织病理形态的影响

control 组大鼠肝组织形态结构完整,肝索结构清晰,肝细胞排列紧密,界限清晰且大小正常,未见明显异常;model 组大鼠肝组织受损严重,细胞边界缺失,中央静脉周围可见肝细胞灶性坏死,伴明显的炎症细胞浸润;UDCA 组大鼠肝组织中肝细胞形态结构较为完整,未见明显坏死;HBF-L 组大鼠肝组织形态结构有所好转,但仍伴有少量肝细胞灶性坏死和炎症细胞浸润;HBF-M 组大鼠大部分肝细胞形态结构完整,伴有少量肝细胞灶性坏死和炎症细胞浸润;HBF-H 组大鼠肝组织形态与 control 组相似,肝细胞形态结构保持完整,较 model 组显著好转。结果见图 1。



→: 炎症细胞浸润。

图 1 HBF 对大鼠肝组织病理形态变化影响的显微图(HE 染色)

### 3.5 HBF对大鼠肝组织中炎症相关因子 mRNA 表达的影响

与 control 组比较, model 组大鼠肝组织中促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 的表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与 model 组比较, HBF-H 组大鼠肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 的表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), HBF-M 组大鼠肝组织中仅 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。结果见表 4。

表 4 HBF 对大鼠肝组织中炎症相关因子 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	TNF- $\alpha$ /GAPDH	IL-1 $\beta$ /GAPDH
control 组	1.12 $\pm$ 0.65	1.02 $\pm$ 0.21
model 组	8.12 $\pm$ 2.66 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>
UDCA 组	7.53 $\pm$ 3.42	1.18 $\pm$ 0.31
HBF-L 组	7.80 $\pm$ 2.11	2.38 $\pm$ 0.69
HBF-M 组	4.88 $\pm$ 2.34 <sup>c</sup>	1.52 $\pm$ 0.52
HBF-H 组	2.92 $\pm$ 2.90 <sup>d</sup>	0.96 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>

a: 与 control 组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 control 组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与 model 组比较,  $P < 0.05$ ; d: 与 model 组比较,  $P < 0.01$ 。

### 3.6 HBF对大鼠肝组织中 FXR 信号通路相关因子 mRNA 表达的影响

与 control 组比较, model 组大鼠肝组织中 FXR、SHP、MRP2、BSEP、NTCP、OATP2 mRNA 的表达水平均显著降低, CYP7A1 mRNA 的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与 model 组比较, HBF-H 组大鼠上述指标均显著逆转 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而 HBF-L 组、HBF-M 组、UDCA 组大鼠均只有部分指标显著逆转 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结果见表 5。

表 5 HBF 对大鼠肝组织中 FXR 信号通路相关因子 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	FXR/ GAPDH	SHP/ GAPDH	MRP2/ GAPDH	BSEP/ GAPDH	NTCP/ GAPDH	OATP2/ GAPDH	CYP7A1/ GAPDH
control 组	1.08 $\pm$ 0.44	1.01 $\pm$ 0.12	1.11 $\pm$ 0.47	1.13 $\pm$ 0.70	1.00 $\pm$ 0.07	1.14 $\pm$ 0.61	1.00 $\pm$ 0.08
model 组	0.29 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.58 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	0.24 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.42 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	11.07 $\pm$ 3.87 <sup>b</sup>
UDCA 组	0.54 $\pm$ 0.28	0.49 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	1.19 $\pm$ 0.27 <sup>d</sup>	1.35 $\pm$ 0.41 <sup>c</sup>	0.61 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.74 $\pm$ 0.46	3.07 $\pm$ 1.19 <sup>d</sup>
HBF-L 组	0.41 $\pm$ 0.25	0.34 $\pm$ 0.28	1.28 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>	1.00 $\pm$ 0.48	0.45 $\pm$ 0.26	0.50 $\pm$ 0.21	3.81 $\pm$ 1.19 <sup>d</sup>
HBF-M 组	0.53 $\pm$ 0.26	0.52 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>	1.46 $\pm$ 0.52 <sup>c</sup>	1.41 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>	0.49 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.62 $\pm$ 0.32	3.71 $\pm$ 1.52 <sup>d</sup>
HBF-H 组	0.69 $\pm$ 0.36 <sup>d</sup>	0.68 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	1.51 $\pm$ 0.42 <sup>c</sup>	1.49 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>	1.11 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup>	0.95 $\pm$ 0.45 <sup>d</sup>	2.40 $\pm$ 1.22 <sup>d</sup>

a: 与 control 组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 control 组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与 model 组比较,  $P < 0.01$ ; d: 与 model 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.7 HBF对大鼠肝组织中 FXR 信号通路相关蛋白及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响

与 control 组比较, model 组大鼠肝组织中 FXR、MRP2、BSEP、NTCP 蛋白的相对表达量均显著降低, NF- $\kappa$ B p65 蛋白的相对表达量显著升高 ( $P < 0.01$ )。与 model 组比较, HBF-H 组大鼠上述指标均显著逆转 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而 HBF-L 组、HBF-M 组、UDCA 组大鼠均只有部分指标显著逆转 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结果见图 2、表 6。

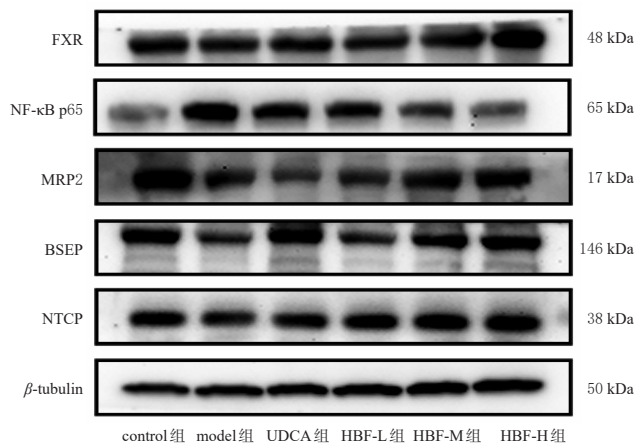


图 2 HBF 对大鼠肝组织中 FXR 信号通路相关蛋白及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达影响的电泳图

表 6 HBF 对大鼠肝组织中 FXR 信号通路相关蛋白及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	FXR/ $\beta$ -tubulin	MRP2/ $\beta$ -tubulin	BSEP/ $\beta$ -tubulin	NTCP/ $\beta$ -tubulin	NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -tubulin
control 组	0.94 $\pm$ 0.12	1.16 $\pm$ 0.20	1.05 $\pm$ 0.19	1.03 $\pm$ 0.16	0.52 $\pm$ 0.09
model 组	0.65 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.80 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
UDCA 组	0.92 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	0.80 $\pm$ 0.19	0.88 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	0.71 $\pm$ 0.16	0.82 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
HBF-L 组	0.81 $\pm$ 0.15	0.71 $\pm$ 0.18	0.61 $\pm$ 0.11	0.71 $\pm$ 0.06	0.83 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
HBF-M 组	1.05 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.84 $\pm$ 0.16	0.85 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	0.86 $\pm$ 0.16	0.73 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
HBF-H 组	1.11 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	0.99 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>

a: 与 control 组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 model 组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与 model 组比较,  $P < 0.05$ 。

## 4 讨论

ANIT 是常用的肝脏毒性物质, 可阻断胆汁流动, 使胆汁酸在肝脏内蓄积, 导致胆汁淤积<sup>[2]</sup>。因此, 本研究采用 ANIT 诱导建立大鼠胆汁淤积性肝损伤模型, 用以探讨 HBF 防治胆汁淤积的作用及潜在机制。AST、ALT、ALP、TBA、DBIL、TBIL 是临床评价胆汁淤积性肝损伤的基本血清生化指标, ANIT 干预后 48 h, 血清中的上述指标均可达到峰值<sup>[1]</sup>。本研究结果显示, model 组大鼠血清中 AST、ALT、ALP、TBA、DBIL、TBIL 含量均显著高于 control 组, 其肝组织受损严重, 可见肝细胞灶性坏死和炎症细胞浸润, 提示 ANIT 致胆汁淤积性肝损伤大鼠模型复制成功。与 model 组比较, HBF 和 UDCA 均能不同程度地逆转上述肝功能指标的升高, 并能不同程度地改善肝组织病理形态变化, 其中 HBF-H 组大鼠上述肝功能指标均显著低于 model 组, 肝组织形态与 control 组相似。

氧化应激在多种肝脏疾病的发生和发展中发挥关键作用。GSH、SOD、MDA 是评估人体抗氧化能力的重要指标。本研究结果显示, 与 model 组比较, HBF-H 组大鼠肝组织中 MDA 水平显著降低, GSH 水平显著升高, 提示高剂量的 HBF 可以缓解大鼠胆汁淤积性肝损伤造成的氧化应激。可见, HBF 对 ANIT 诱导的胆汁淤积性肝损伤有良好的防治作用。

肝细胞是具有极性结构的上皮细胞,分为胆小管区和基底外侧区。作为肝细胞的基底侧膜转运体,胆汁酸摄取转运体NTCP和OATP2负责胆汁酸的重吸收,而胆汁酸可负向降低NTCP和OATP2的表达<sup>[13]</sup>。作为胆小管区转运蛋白的BSEP和MRP2能促使胆汁酸、胆盐从肝细胞排泄到胆管<sup>[11]</sup>。此外,CYP7A1是胆汁酸合成的关键酶,FXR的激活会诱导SHP的表达,从而抑制CYP7A1的活性<sup>[14]</sup>。FXR是首个被学界正式确认的核受体,广泛分布于肝脏、肠道、肾脏和肾上腺等器官/组织<sup>[15]</sup>。胆汁酸是天然的FXR配体<sup>[16]</sup>,上述细胞因子均由FXR直接或间接调控,FXR与类视黄醇X受体形成的异源二聚体可通过激活SHP来调节胆汁酸的稳态。在病理状态下,NTCP表达的下调可能导致胆汁酸的摄入减少,从而导致胆汁淤积的发生或现有胆汁淤积性疾病的加重<sup>[15]</sup>。胆汁酸的蓄积可触发肝细胞中促炎因子的产生,从而启动炎症反应<sup>[12]</sup>。NF- $\kappa$ B p65是调节炎症反应的关键转录因子,当胆汁淤积性肝损伤模型大鼠受到炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 刺激时,NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达将会升高,从而进一步加重炎症反应<sup>[17]</sup>。此外,还有研究表明,FXR也可通过与NF- $\kappa$ B亚基结合来抑制NF- $\kappa$ B的活性,从而调节炎症反应<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,高剂量的HBF可显著上调模型大鼠肝组织中FXR、BSEP、MRP2、NTCP mRNA及蛋白的表达,抑制NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达,同时还可上调SHP、OATP2 mRNA的表达,下调CYP7A1和促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA的表达,表明HBF可能通过调控FXR信号通路、抑制炎症反应来预防大鼠胆汁淤积性肝损伤。

综上所述,HBF对大鼠肝内胆汁淤积性肝损伤具有预防作用,此作用可能是通过激活FXR信号通路、减轻炎症和氧化应激来实现的。

## 参考文献

[1] ZOU M Z, WANG A Z, WEI J J, et al. An insight into the mechanism and molecular basis of dysfunctional immune response involved in cholestasis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92: 107328.

[2] ZHANG R J, HUANG T, ZHANG Q Y, et al. Xiaoyan Lidan formula ameliorates  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate-induced intrahepatic cholestatic liver injury in rats as revealed by non-targeted and targeted metabolomics[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 179: 112966.

[3] NIETSCHKE T R, DOTTA G, BARCAUI C B, et al. Cholestatic pruritus: a knowledge update[J]. *An Bras Dermatol*, 2022, 97(3): 332-337.

[4] 杨建华,杨秀娟,赵耀,等. 护肝布祖热对CCl<sub>4</sub>诱导人肝星状细胞LX-2活化的作用及机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(10): 1315-1321.

[5] 杨秀娟,杨建华,何红艳,等. 维吾尔药方护肝布祖热抗大鼠急性肝损伤作用的研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2017, 40(11): 1479-1483, 1491.

[6] 何红艳,杨建华,杨秀娟,等. 维吾尔药护肝布祖热对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(6): 19-22.

[7] 郑士宏. 芹菜素对DDC诱导的胆汁淤积性肝病的保护作用[D]. 合肥:合肥工业大学, 2021.

[8] 李国栋,杨金玉,马小华,等. 清热卡森颗粒对肝内胆汁淤积大鼠模型的治疗作用及机制研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(10): 4038-4046.

[9] MENG F C, ZONG W, WEI X D, et al. *Dolomiaea souliei* ethyl acetate extract protected against  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate-induced acute intrahepatic cholestasis through regulation of farnesoid X receptor-mediated bile acid metabolism[J]. *Phytomedicine*, 2021, 87: 153588.

[10] WANG C, PENG F, ZHONG B H, et al. Metabolomic analysis reveals the therapeutic effects of MBT1805, a novel pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist, on  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 732478.

[11] TELBISZ Á, HOMOLYA L. Recent advances in the exploration of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) function[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(4): 501-514.

[12] YAO H, XU Y W, YIN L H, et al. Dioscin protects ANIT-induced intrahepatic cholestasis through regulating transporters, apoptosis and oxidative stress[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 116.

[13] LI X, LIU R P, YU L X, et al. Alpha-naphthylisothiocyanate impairs bile acid homeostasis through AMPK-FXR pathways in rat primary hepatocytes[J]. *Toxicology*, 2016, 370: 106-115.

[14] XU L L, SHENG T T, LIU X L, et al. Analyzing the hepatoprotective effect of the *Swertia cincta* Burkill extract against ANIT-induced cholestasis in rats by modulating the expression of transporters and metabolic enzymes[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 209: 91-99.

[15] WEI X D, MA Y X, DONG Z Y, et al. Dehydrodiconiferyl alcohol, a lignan from *Herpetospermum pedunculatum*, alleviates cholestasis by activating pathways associated with the farnesoid X receptor[J]. *Phytomedicine*, 2021, 80: 153378.

[16] PANZITT K, ZOLLNER G, MARSCHALL H U, et al. Recent advances on FXR-targeting therapeutics[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 552: 111678.

[17] 连雅君. 清开灵对胆汁淤积性肝炎大鼠证候干预及肝损伤机制的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.

(收稿日期:2023-03-24 修回日期:2023-07-19)

(编辑:邹丽娟)