

白花蛇舌草对 ANIT 诱导的胆汁淤积大鼠保肝作用研究

钟艳花^{1,2}, 李颖仪², 林重¹, 钟映芹¹, 唐东晖¹, 郭洁文³, 刘昌辉²(1. 广州市荔湾区中医医院, 广东 广州 510140; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 3. 广州市中医院, 广东 广州 510130)

摘要: **目的** 研究白花蛇舌草对 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)诱导的胆汁淤积肝病大鼠的保肝作用及机制。**方法** 将 48 只 SD 大鼠随机分为正常对照组, 模型组, 白花蛇舌草高、中、低剂量组(1、0.5、0.25 g·kg⁻¹), 熊去氧胆酸组(100 mg·kg⁻¹), 每组 8 只, 均连续灌胃给予相应药物 5 d。其中第 3 天除正常对照组外, 其他各组采用灌胃给予 ANIT(65 mg·kg⁻¹)制备 ANIT 诱导胆汁淤积肝病大鼠模型。检测各组大鼠血清肝功指标谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP), 血清黄疸指数总胆汁酸(TBA)、总胆红素(TBIL)及肝脏抗氧化应激因子谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)水平; 测定各组大鼠胆汁流量以及胆汁中 TBIL 和 TBA 的含量; 采用 HE 染色检测肝脏病理变化; Real-time PCR 法检测肝脏组织中胆汁酸合成、转运、排泄和重吸收等相关基因的表达水平。**结果** 与正常对照组大鼠相比, 模型组大鼠血清的 ALT、AST、ALP、TBA、TBIL 水平显著增加, 而胆汁流量和胆汁中 TBA 和 TBIL 的排泄则显著降低, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$); 胆汁酸合成与转运的主要核受体(FXR、SHP)、胆汁酸顶腔侧膜转运体(BSEP、MRP2、MDR2)、胆汁酸合成酶(CYP7A1、CYP8B1、CYP27A1)和胆汁酸重吸收转运体(NTCP、OATP1A1、OATP1A2)的 mRNA 表达水平显著降低, 而胆汁酸基底侧膜转运体(MRP3、MRP4、OST α 、OST β)的 mRNA 表达水平则显著升高, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比, 白花蛇舌草组大鼠血清的 ALT、AST、ALP、TBA、TBIL 水平显著降低($P < 0.01$), 而大鼠胆汁流量和胆汁中 TBA 和 TBIL 的排泄量则显著升高($P < 0.01$); 肝脏组织病理损伤显著改善; 胆汁酸核受体(FXR、SHP)、胆汁酸顶腔侧膜转运体(BSEP、MRP2、MDR2)和胆汁酸基底侧膜转运体(MRP3、MRP4、OST α 、OST β)的 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而胆汁酸合成酶(CYP7A1)和胆汁酸重吸收转运体(NTCP、OATP1A1)的 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 白花蛇舌草具有改善胆汁淤积肝损伤作用, 其机制可能通过激活 FXR-SHP 轴的表达, 从而促进胆汁酸外排, 减少胆汁酸合成与重吸收作用有关。

关键词: 白花蛇舌草; 胆汁淤积; α -萘异硫氰酸酯; 胆汁酸; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)07-0952-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.07.008

Study on Hepatoprotective Effect of Hedyotis diffusae Herba on ANIT-induced Cholestasis in Rats

ZHONG Yanhua^{1,2}, LI Yingyi², LIN Zhong¹, ZHONG Yingqin¹, TANG Donghui¹, GUO Jiewen³, LIU Changhui²
(1. Guangzhou Liwan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510140 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510130 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the hepatoprotective effect and mechanism of Hedyotis diffusae herba(HHD) on α -naphthyl isothiocyanate(ANIT) induced cholestatic liver injury in rats. **Methods** The cholestatic liver injury rat model was induced by intragastric administration of ANIT(65 mg·kg⁻¹). Rats were randomly divided into control group, ANIT group, HHD high, medium and low dose groups(1, 0.5, 0.25 g·kg⁻¹) and UDCA group(100 mg·kg⁻¹).

收稿日期: 2021-03-07

作者简介: 钟艳花, 女, 硕士, 副主任中医师, 研究方向: 中医药防治代谢性疾病研究。Email: 281700518@qq.com。通信作者: 刘昌辉, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中医药防治胆汁淤积肝病研究。Email: liuchanghui@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81773936; 81102883); 广州市科技计划民生科技重点项目(202002020032)。

The serum liver function indexes(ALT, AST and ALP), serum jaundice indexes(TBA, TBIL) and liver antioxidant stress factors(GSH, SOD) were detected. The bile flow and the contents of bilirubin(TBIL) and bile acid(TBA) in bile were determined. The pathological changes of liver were detected by HE staining. The mRNA expression of genes involved in bile acid synthesis, transport, excretion and reabsorption were detected by real-time PCR. **Result** Compared with the control group, the serum levels of ALT, AST, ALP, TBA and TBIL of rats in ANIT group were significantly increased, while the bile flow and the excretion of TBA and TBIL in bile were significantly decreased($P<0.01$); the mRNA expression levels of the main nuclear receptors associated with bile acid synthesis and transport (FXR, SHP), bile acid apical membrane transporters (BSEP, MRP2, MDR2), bile acid synthase(CYP7A1, CYP8B1, CYP27A1) and bile acid reabsorption transporters(NTCP, OATP 1A1, OATP1A2) were significantly decreased, while the mRNA expression levels of bile acid basolateral membrane transporters(MRP3, MRP4, OST α , OST β) were significantly increased($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with ANIT group, the levels of ALT, AST, ALP, TBA and TBIL in serum of rats in Hedyotidis diffusae herba treated group were significantly decreased ($P<0.01$), while the bile flow and the excretion of TBA and TBIL in bile were significantly increased ($P<0.01$). The pathological damage of liver tissue was significantly improved; the mRNA expression levels of bile acid nuclear receptor(FXR, SHP), bile acid apical membrane transporter(BSEP, MRP2, MDR2) and bile acid basolateral membrane transporters (MRP3, MRP4, OST α , OST β) were significantly increased($P<0.05$, $P<0.01$), while the mRNA expression levels of bile acid synthase(CYP7A1) and bile acid reabsorption transporters (NTCP, OATP1A1) were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Hedyotidis diffusae herba can improve cholestatic liver injury, and its mechanism may be related to the activation of FXR-SHP axis gene expression, thus promoting bile acid efflux and reducing synthesis and reabsorption.

Keywords: Hedyotidis diffusae herba; cholestasis; α -naphthyl isothiocyanate(ANIT); bile acid; rats

白花蛇舌草具有清热解毒、利湿通淋之功效, 切中胆汁淤积肝病的病机, 临床上广泛用于湿热黄疸和炎症相关疾病(湿热型肝炎、肠炎等)的治疗。白花蛇舌草主要含有环烯醚萜苷类(车叶草苷、京尼平苷酸、鸡屎藤次苷等)、三萜类(熊果酸、齐墩果酸)、蒽醌类(2-甲基-3-羟基蒽醌、2-甲基-3-甲氧基蒽醌)、黄酮类(山柰酚、槲皮素)等化学成分。药理研究^[1-6]表明, 白花蛇舌草所含活性成分具有较好的降脂、保肝、抗炎、抗氧化等作用。然而, 目前有关白花蛇舌草抗胆汁淤积肝病的作用及机制报道较少。本课题拟通过研究白花蛇舌草对 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)诱导的胆汁淤积模型大鼠的肝损伤指标、黄疸指标、抗氧化应激作用、胆汁流量、胆汁酸排泄、肝脏病理变化以及胆汁酸合成、转运、重吸收相关基因表达水平的影响, 探讨白花蛇舌草改善急性胆汁淤积的作用及机制。

1 材料与仪器

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量(280 ± 20)g, 购于广东省医学实验动物中心, 动物许可证号:

SCXK(粤)2013-0002。动物在实验室环境适应性饲养 1 周(温度: 25℃, 湿度: 60%), 正常饮食和喂水。

1.2 药品与试剂 白花蛇舌草(批号: 20110907)购于广州中医药大学第一附属医院药房, 由广州中医药大学中药学院林颖副教授鉴定为茜草科耳草属白花蛇舌草(Herba Hedyotidis Diffusae, HHD)正品; α -萘异硫氰酸酯(ANIT, 批号: STBC5577V)、熊去氧胆酸(UDCA, 批号: 20120621), 阿拉丁试剂公司; 总胆汁酸(TBA, 批号: 120321)、总胆红素试剂盒(TBIL, 批号: 120428)、谷丙转氨酶试剂盒(ALT, 批号: 20120342)、谷草转氨酶试剂盒(AST, 批号: 20120422)、碱性磷酸酶试剂盒(ALP, 批号: 20120822)、谷胱甘肽试剂盒(GSH, 批号: 20120615)和超氧化物歧化酶试剂盒(SOD, 批号: 20120645), 南京建成生物工程研究所; PE10 导管, 英国 Smith Medical 公司; 总 RNA 提取试剂盒(批号: 120805), 宝生物工程(大连)有限公司; 逆转录试剂盒(批号: 20130731)、TaqMan® Gene Expression Master Mix 的 Real-time PCR 反应

液(批号: 20120813)、TaqMan[®]探针: FXR 探针(批号: Rn00572658_m1)、SHP 探针(批号: Rn00589173_m1)、BSEP 探针(批号: Rn01515444_m1)、MDR2 探针(批号: Rn01529224_m1)、MRP2 探针(批号: Rn00563231_m1)、MRP3 探针(批号: Rn01452854_m1)、MRP4 探针(批号: Rn01465702_m1)、OST α 探针(批号: Rn01763289_m1)、OST β 探针(批号: Rn01767005_m1)、NTCP 探针(批号: Rn00566894_m1)、OATP1A1 探针(批号: Rn00755148_m1)、OATP1A2 探针(批号: Rn00756233_m1)、CYP7A1 探针(批号: Rn00564065_m1)、CYP8B1 探针(批号: Rn01445029_s1)、CYP27A1 探针(批号: Rn01401086_m1)和 GAPDH 探针(批号: Rn01775763_g1), 美国 ABI 公司。

1.3 仪器与设备 PowerPac HC 电泳仪、GC-800 光密度扫描仪, 美国 Bio Rad 公司; DDY-III 型水浴式电转印槽, 北京六一仪器厂; StepOne Plus Real-time 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; BDU-700 核酸蛋白分析仪, 美国 Beckman 公司; KDC-120HR 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科技仪器有限公司; BT3000 全自动生化分析仪, 意大利爱康公司; M1000 FLUOR plus 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; TP1020 生物组织自动脱水机、EG1140 石蜡包埋机、RM2235 全自动轮转石蜡切片机、Leica TP 1020 型全自动脱水机, 德国莱卡公司; Olympus BX-51 型病理图像采集系统, 日本奥林巴斯公司。

1.4 白花蛇舌草醇提物的制备 精密称取 2 kg 白花蛇舌草, 剪碎, 加 10 倍量的 80%乙醇浸泡过夜, 回流提取 2 次(10 倍量, 每次 2 h), 合并回流液, 过滤, 减压回收乙醇, 浓缩至密度为 1.05 g·mL⁻¹的浓缩液, 混匀, 置于-80℃冰箱备用。

1.5 动物造模与给药 48 只 SD 大鼠随机分为 6 组(每组 8 只): 分别为正常对照组, 模型组, 白花蛇舌草醇提物(HHD)低、中、高剂量组, 熊去氧胆酸(UDCA)组。HHD 低、中、高剂量组和 UDCA 组分别灌胃 HHD(0.25、0.5 和 1 g·kg⁻¹)和 UDCA(100 mg·kg⁻¹), 正常对照组和模型组灌胃生理盐水, 给药体积 10 mL·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续给药 5 d。其中第 3 天除正常对照组外其他各组灌胃给予 ANIT(65 mg·kg⁻¹)造模, 正常对照组灌胃给予等量花生油。造模 48 h 后, 各组大鼠末次药后 30 min, 收集胆汁、血清和肝脏标本, 进行各项指标的检测。

1.6 胆汁流量测定 经腹腔注射 20%乌拉坦(1.0 g·kg⁻¹)麻醉大鼠, 取仰卧位, 沿腹中线打开腹腔, 在接近

十二指肠开口, 将胆汁引流管插入胆总管约 1 cm, 结扎固定, 稳定 10 min 后, 开始计时。用已称质量的 EP 管收集 0~15 min、15~30 min、30~45 min、45~60 min、60~75 min、75~90 min 的胆汁, 置于 4℃冰箱中遮光保存备用。胆汁流量的计算公式: 胆汁流量($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$)=(总质量-EP 管质量)/体质量 $\times 15$ 。

1.7 血清/肝脏生化指标检测 腹主动脉采血, 在室温下以 3 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液。采用全自动生化分析仪测定血清中 ALT、AST、ALP、TBA 和 TBIL 的含量; 采用酶标仪微量酶标法测定肝脏中 GSH 和 SOD 的含量。

1.8 肝脏病理组织学观察 大鼠肝脏用 10%中性甲醛固定, 石蜡包埋, 4~5 μm 切片, 进行常规 HE 染色。具体步骤: 二甲苯脱蜡 5 min; 无水乙醇洗脱二甲苯 2 次, 每次 1 min; 95% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 85%酒精洗脱各 1 min; 蒸馏水浸洗 1 min; 苏木素染色 5 min, 水洗 5 min; 1%盐酸酒精分化 30 s; 水洗 5 min; 伊红溶液染色 1 min, 水冲洗 5 min; 常规脱水, 透明, 中性树胶封片, 在显微镜下观察肝组织切片的病理形态学变化, 并采用 Olympus BX-51 型病理图像采集系统分析图片。肝组织坏死程度按 Rudich 等^[7]的研究进行评估和评分。坏死评分显示每个视野($\times 400$)的坏死病灶数, 每个玻片至少 5 个视野。

1.9 Real-time PCR 法测定肝脏中胆汁酸合成、转运、排泄相关基因 mRNA 表达水平 取大约 100 mg 肝脏组织进行匀浆, 采用 Trizol 试剂提取、纯化肝脏组织总 mRNA, 并测定其浓度及纯度。采用大连宝成 TAKARA 公司的 cDNA 逆转录试剂盒进行逆转录, 采用 StepOne Plus Real-time 实时荧光定量反应, 测定肝脏中 FXR、SHP、BSEP、MDR2、MRP2、MRP3、MRP4、OST α 、OST β 、NTCP、OATP1A1、OATP1A2、CYP7A1、CYP8B1 和 CYP27A1 的 mRNA 相对表达量。Real-time PCR 反应体系: cDNA 模板 5 μL , TaqMan 1 μL , ddH₂O 4 μL , TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 μL , 总体积 20 μL 。用 ABI 荧光定量分析仪进行扩增反应, 反应条件: 95℃ 2 min; 95℃ 5 s、60℃ 30 s, 40 个循环。记录各组样品扩增反应的 Ct 值, 以 GAPDH 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量。

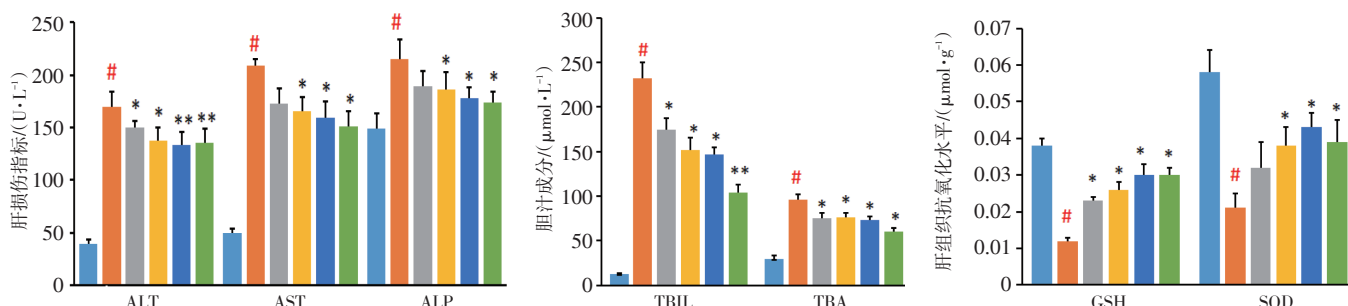
1.10 统计学处理方法 各指标测定结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 Stata 11.0 统计软件进行数据统计, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 白花蛇舌草醇提取物对大鼠血清生化指标的影响

结果见图 1。与正常对照组比较,模型组大鼠血清中肝功能酶学指标(ALT、AST 和 ALP)和黄疸指标(TBIL 和 TBA)均明显升高,而肝脏组织抗氧化因子水平(GSH 和 SOD)则显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$),表明 ANIT 诱导的胆汁淤积大鼠造

模成功。与模型组比较,各给药组肝功能酶学指标(ALT、AST 和 ALP)和黄疸指标(TBIL 和 TBA)均显著降低,肝脏组织抗氧化因子(GSH 和 SOD)的含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明,白花蛇舌草可以显著改善 ANIT 诱导的急性胆汁淤积性肝损伤作用。



注: ■正常对照组; ■模型组; ■HHD 低剂量组; ■HHD 中剂量组; ■HHD 高剂量组; ■UDCA 组。与正常对照组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

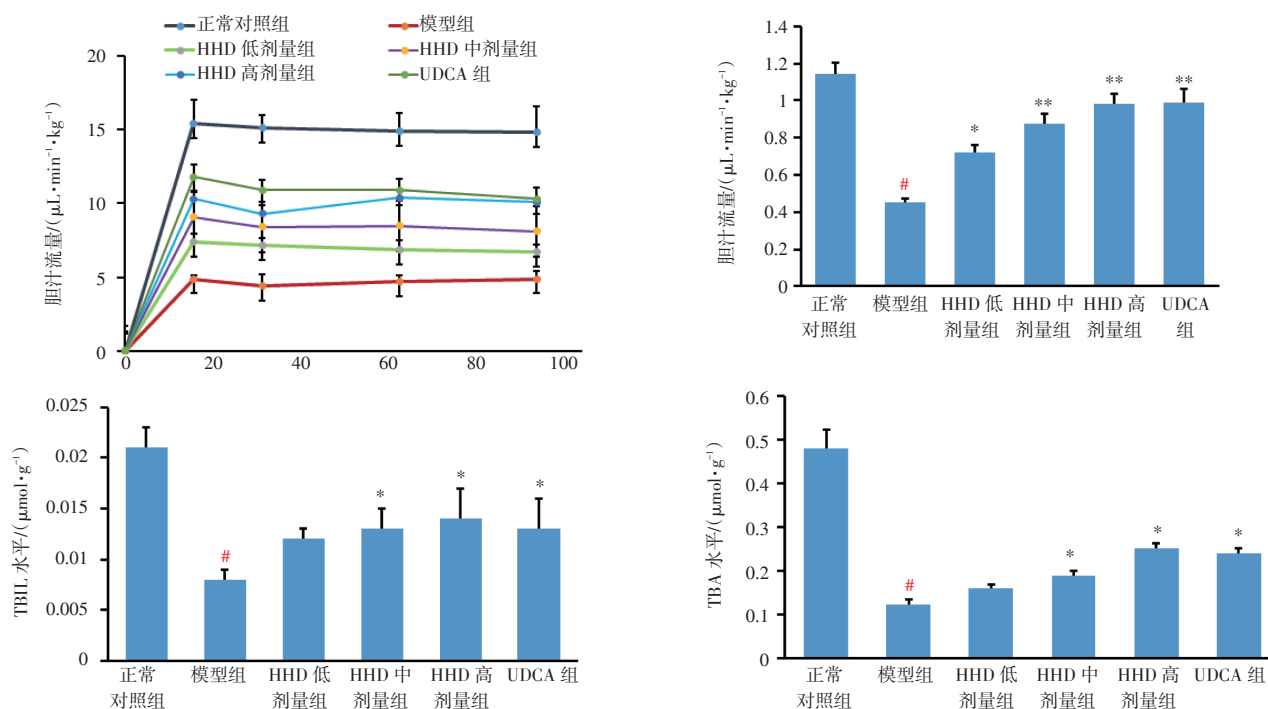
图 1 白花蛇舌草(HHD)对 ANIT 诱导的急性胆汁淤积性肝损伤大鼠血清生化指标影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure 1 The effect of Hedyotis diffusa herba on serum biochemical indexes in ANIT-induced cholestatic liver injury($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.2 白花蛇舌草醇提取物对大鼠胆汁流和胆汁成分的影响

结果见图 2。与正常对照组比较,模型组大鼠胆管胆汁流量和胆汁成分(TBIL 和 TBA)排泄均明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),表明 ANIT

诱导的胆汁淤积模型大鼠肝内胆胆汁酸排泄障碍。与模型组比较,各给药组胆汁流量明显增加,胆汁成分 TBIL 和 TBA 排泄明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明,白花蛇舌草可以显著提



注: UDCA 组: 熊去氧胆酸组。与正常对照组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 白花蛇舌草(HHD)对 ANIT 诱导的急性胆汁淤积大鼠胆汁流量和胆汁成分的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure 2 The effect of Hedyotis diffusa herba on ANIT-induced cholestatic bile flow and bile ingredients of total bile acid and total bilirubin levels($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

高 ANIT 诱导胆汁淤积大鼠的胆汁流量。

2.3 白花蛇舌草醇提物对大鼠肝组织病理损伤作用的影响

结果见图 3。正常对照组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞排列呈索状,肝细胞无变性坏死;汇管区无纤维组织增生;无炎细胞浸润;血管及胆管结构正常。与正常对照组比较,模型组大鼠肝细胞轻度脂肪变性,较多肝细胞内可见脂肪空泡形成;中央静脉周围和汇管区可见炎细胞浸润;胆管上皮明显增生。与模型组比较,白花蛇舌草低剂量组大鼠

仍可见较多肝细胞脂肪变性,中央静脉周围及汇管区可见淋巴细胞浸润,较多胆管上皮增生;而中、高剂量以及 UDCA 组大鼠肝小叶结构基本正常,仅见个别肝细胞脂肪变性,汇管区见少量淋巴细胞浸润,胆管上皮未见明显增生。结果表明白花蛇舌草具有抗 ANIT 诱导的胆汁淤积性肝损伤的作用。

2.4 白花蛇舌草醇提物对大鼠肝胆汁酸合成、转运、重吸收等基因表达的影响 结果见图 4。与正常对照组比较,模型组肝内主要胆汁酸核受体(FXR 和

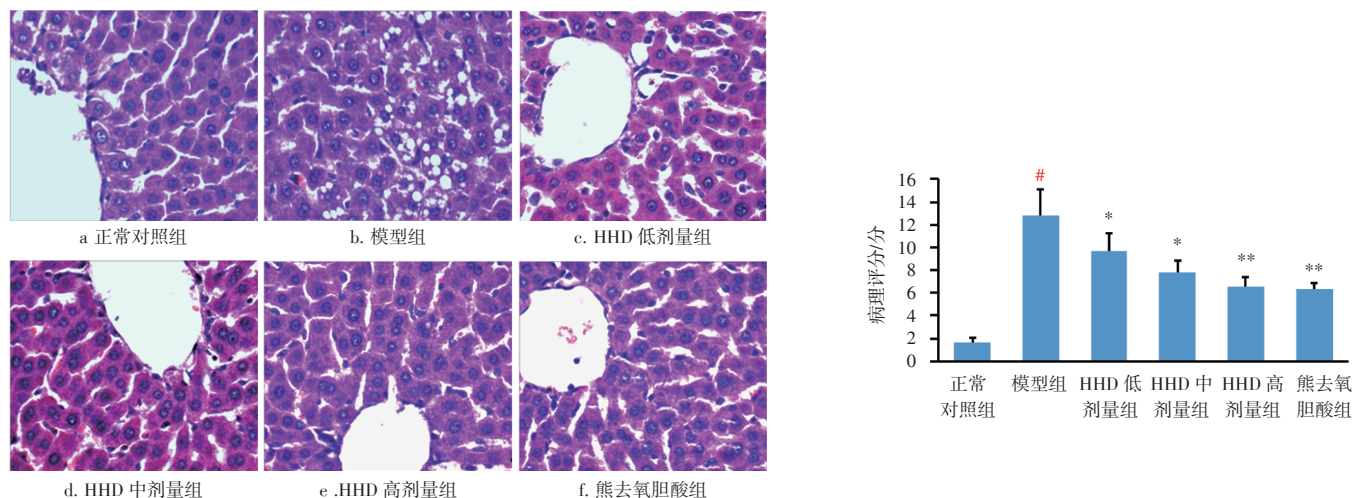
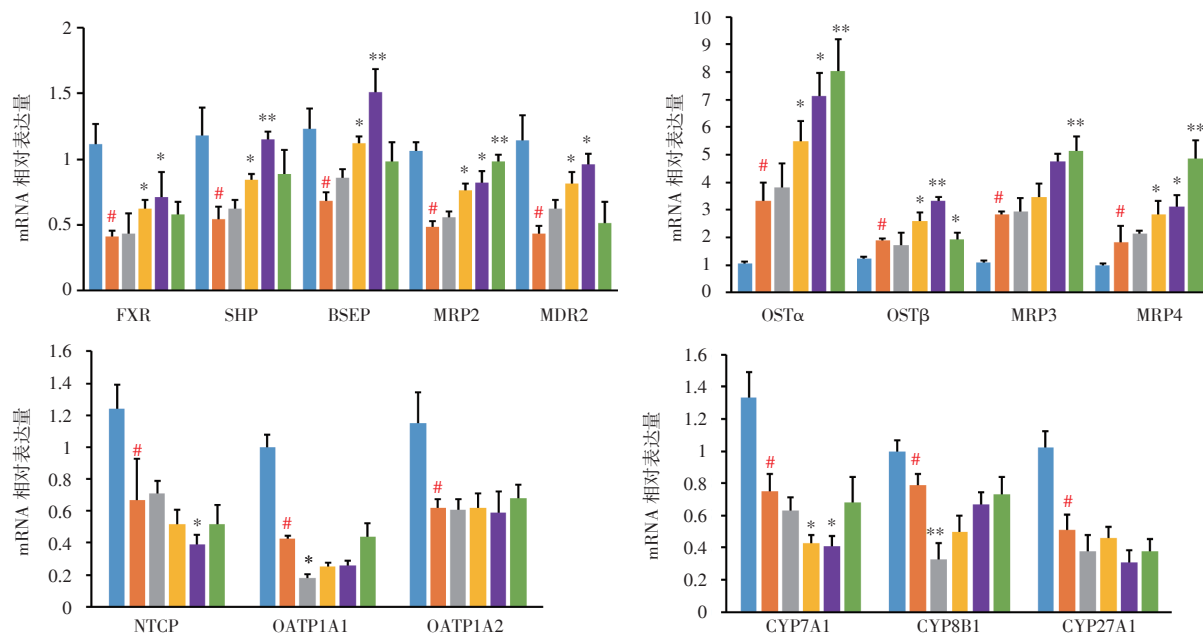


图 3 白花蛇舌草(HHD)对 ANIT 诱导的大鼠肝脏病理变化的影响(HE 染色, ×400)

Figure 3 The effect of Hedyotis diffusa herba on ANIT-induced cholestatic pathological changes of liver tissue(HE staining, ×400)



注: 蓝色: 正常对照组; 橙色: 模型组; 灰色: HHD 低剂量组; 黄色: HHD 中剂量组; 紫色: HHD 高剂量组; 绿色: 熊去氧胆酸组。

与正常对照组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

图 4 白花蛇舌草(HHD)对大鼠肝胆汁酸合成、转运、排泄和重吸收等基因的 mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 4 The effect of Hedyotis diffusa herba on hepatic mRNA level of bile acid synthesis, transport, excretion and reabsorption in ANIT-induced cholestatic rats($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

SHP)、胆汁酸顶腔侧膜外排转运体(BSEP、MRP2 和 MDR2)、胆汁酸重吸收转运体(NTCP、OATP1A1 和 OATP1A2)以及胆汁酸合成酶(CYP7A1、CYP8B1 和 CYP27A1)的 mRNA 表达水平显著降低,而胆汁酸基底侧膜外排转运体(OST α 、OST β 、MRP3 和 MRP4)则显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,白花蛇舌草组胆汁酸核受体 FXR 和 SHP 的表达显著升高,导致胆汁酸顶腔侧膜(BSEP、MRP2 和 MDR2)和基底侧膜外排转运体(OST α 、OST β 、MRP3 和 MRP4)明显提高($P < 0.05$, $P < 0.01$);同时,显著降低胆汁酸重吸收转运体(NTCP 和 OATP1A1)以及胆汁酸合成酶(CYP7A1)的 mRNA 表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明,白花蛇舌草可以上调胆汁酸核受体 FXR-SHP 轴的表达水平,以提高 ANIT 诱导的胆汁酸外排转运基因和进一步抑制胆汁酸合成酶的表达。

3 讨论

胆汁淤积,也称胆汁淤积综合征,主要由肝内-肝外系统胆汁酸合成、转运及重吸收障碍引起肝脏及体循环胆汁酸肠肝循环受阻,而致胆汁酸、胆红素等胆汁成分过度堆积于肝造成的^[8-9],临床表现为瘙痒、黄疸、黄斑瘤等症状,持续的胆汁淤积将进展为肝纤维化甚至肝硬化^[10-11]。由于胆汁淤积发病机制复杂,国内外对胆汁淤积的发病机制研究尚未取得突破性进展,目前临床仅有 2 个一线药物熊去氧胆酸(UDCA)和奥贝胆酸(OCA)用于胆汁淤积的治疗。因此,找寻新的胆汁淤积治疗药物具有重要的价值。

胆汁淤积属中医“黄疸”范畴,“疸”乃火热之意,火热之邪熏蒸肝胆而致肝失疏泄,导致瘀血内阻,与火热之邪交结,瘀热阻滞,胆汁不循常道而发黄。《张氏医通》云:“以诸黄虽多湿热,然经脉久病,不无瘀血阻滞也”,而且“瘀久化热”。这种血瘀重、里热盛的特点,正是淤胆型肝炎黄疸日渐加深或持久不退的主要原因。因此,中医常用清热利湿法治疗胆汁淤积,且临床疗效显著^[12-13]。白花蛇舌草具有清热利湿、解毒通淋之功效,切中“胆汁淤积”的病机,临床上广泛用于湿热黄疸和炎症相关疾病(湿热型肝炎、肠炎等)的治疗。

本研究结果表明,在灌服 ANIT 48 h 后,大鼠的胆汁流量和胆汁成分(TBA、TBIL)分泌量明显减少,而血清中 TBA 和 TBIL 水平上升显著;同时血清中

ALT、AST 和 ALP 含量明显升高;HE 染色结果亦提示肝细胞脂肪变性、脂肪空泡、坏死明显。以上结果均证明了肝内急性胆汁淤积模型诱导成功,与文献报道^[14]完全一致。本实验结果显示,白花蛇舌草醇提物能增加 ANIT 所致的肝内急性胆汁淤积大鼠胆汁的流量和促进胆汁成分 TBA、TBIL 的排泄,进而降低血清中 TBA 和 TBIL 水平,从而改善肝功能与肝细胞病理损伤。

胆汁正常分泌有赖于肝基底侧膜(窦膜)和顶腔侧膜(毛细胆管膜)上各种合成、转运蛋白的功能正常与否^[15-16],其中肝脏中胆汁酸合成酶(CYP7A1、CYP8B1、CYP27A1 等)主要负责胆汁酸的新生合成;肝细胞顶腔侧膜外排蛋白(BSEP、MRP2、MDR2 等)主要负责将肝内胆汁酸转运至胆汁中,而胆汁酸基底侧膜转运体(MRP3、MRP4、OST α 、OST β 等)主要负责将肝内胆汁酸转运至体循环中,经尿液排出体外。此外,胆汁酸肠肝循环平衡亦依赖于胆汁酸基底侧膜转运体(NTCP、OATP1A1、OATP1A2 等)负责胆汁酸的重吸收作用。当这些蛋白功能正常负责胆汁酸合成、排泄和摄取作用的时候,胆汁流即形成,共同维持胆汁酸的肠肝循环的生理作用。近来研究^[15-16]表明胆汁酸的合成、转运及重吸收作用主要受核受体 FXR 的精密调控。作为胆汁酸的主要核受体,FXR 通过 FXR-SHP-BSEP/MRP2 信号正向调控胆汁酸外排及 FXR-FGF19-CYP7A1/NTCP 信号负反馈调控胆汁酸合成与重吸收,共同维持着肝胆体系胆汁酸稳态^[14-16]。一旦 FXR 表达功能出现障碍,就会导致胆汁酸合成、转运异常,而致胆汁酸过度累积于肝细胞内外,从而诱导发生胆汁淤积。因此,精密调控 FXR 水平在维持胆汁酸肠肝循环稳态中发挥关键的作用。

与研究^[14-16]报道相一致,本研究在灌服 ANIT 48 h 后,大鼠肝内 FXR-SHP 信号、顶腔侧膜外排蛋白(BSEP、MRP2、MDR2 等)、胆汁酸合成酶(CYP7A1、CYP8B1、CYP27A1 等)和胆汁酸基底侧膜转运体(NTCP、OATP1A1、OATP1A2 等)等基因的表达显著降低,而胆汁酸基底侧膜转运体(MRP3、MRP4、OST α 、OST β 等)等基因的表达显著升高,提示在胆汁淤积状态下,肝内胆汁酸合成、转运和重吸收作用异常,导致肝内胆汁酸水平升高。本实验结果显示,白花蛇舌草能显著提高 FXR-SHP 信号、胆汁酸基底侧膜转运体(MRP3、MRP4、OST α 、OST β 等)和顶腔侧膜外排蛋白(BSEP、MRP2、MDR2 等)

等基因的表达, 而抑制胆汁酸合成酶 CYP7A1 和重吸收转运体 NTCP 基因的表达, 进而促进胆汁酸排泄, 从而改善胆汁淤积。本课题组前期报道了白花蛇舌草成分京尼平苷酸可通过上调 FXR 表达, 诱导 BSEP/MRP2, 促进胆汁酸排泄, 并增加 GSH、SOD 等抗氧化水平, 改善 ANIT 诱导的胆汁淤积^[17-23]。本研究结果与该文献报道相似。

参考文献:

- [1] LIU J, LU Y, WU Q, et al. Oleanolic acid reprograms the liver to protect against hepatotoxicants, but is hepatotoxic at high doses[J]. *Liver Int*, 2019, 39(3): 427-439.
- [2] GAMEDE M, MABUZA L, NGUBANE P, et al. Plant-derived oleanolic acid ameliorates markers associated with non-alcoholic fatty liver disease in a diet-induced pre-diabetes rat model[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 1953-1962.
- [3] YANG H, YANG T, HENG C, et al. Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(12): 3140-3152.
- [4] CHEN J, XUAN Y, LUO M, et al. Kaempferol alleviates acute alcoholic liver injury in mice by regulating intestinal tight junction proteins and butyrate receptors and transporters[J]. *Toxicology*, 2020, 429: 152338.
- [5] FUJIKAWA T, HIRATA T, HOSOO S, et al. Asperuloside stimulates metabolic function in rats across several organs under high-fat diet conditions, acting like the major ingredient of *Eucommia* leaves with anti-obesity activity[J]. *J Nutr Sci*, 2012, 1: e10.
- [6] LIU F, LI Y, LI M, et al. Study on Mechanism of iridoid glycosides derivatives from fructus gardeniae in Jiangxi Province by network pharmacology[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4062813.
- [7] RUDICH N, ZAMIR G, PAPPO O, et al. Focal liver necrosis appears early after partial hepatectomy and is dependent on T cells and antigen delivery from the gut[J]. *Liver Int*, 2009, 29(8): 1273-1284.
- [8] SHAH R, KOWDLEY K. Current and potential treatments for primary biliary cholangitis[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(3): 306-315.
- [9] BULLI L, THOMPSON R. Progressive familial intrahepatic cholestasis [J]. *Clin Liver Dis*, 2018, 22(4): 657-669.
- [10] AMIRNENI S, HAEP N, GAD M, et al. Molecular overview of progressive familial intrahepatic cholestasis[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(47): 7470-7484.
- [11] LIEO A, LEUNG P, HIRSCHFIELD G, et al. The pathogenesis of primary biliary cholangitis: A comprehensive review[J]. *Semin Liver Dis*, 2020, 40(1): 34-48.
- [12] 胡振斌. 疏肝利胆散治疗肝内胆汁淤积性肝炎40例[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2005, 13(4): 272-273.
- [13] 朱德增. 肝内胆汁淤积的中西医结合治疗[J]. *中西医结合学报*, 2004, 2(6): 412-414.
- [14] LIAO L, SCHNEIDER K, GALVEZ EJ, et al. Intestinal dysbiosis augments liver disease progression via NLRP3 in a murine model of primary sclerosing cholangitis[J]. *Gut*, 2019, 68(8): 1477-1492.
- [15] JETTER A, KULLAK-UBLICK G. Drugs and hepatic transporters: A review [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 154: 104234.
- [16] PANZITT K, JUNGWIRTH E, KRONES E, et al. J FXR-dependent rubicon induction impairs autophagy in models of human cholestasis[J]. *Hepatology*, 2020, 72(6): 1122-1131.
- [17] 李颖仪. 白花蛇舌草醇提物对肝Mrp2和Bsep影响及其利胆作用[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [18] 陈浩. 京尼平苷酸基于FXR抗ANIT诱导胆汁淤积大鼠保肝利胆机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [19] 陈浩, 闵剑斌, 黄小桃, 等. 京尼平苷酸在胆汁淤积型大鼠体内的药动学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(17): 75-78.
- [20] ZHENG X, HUANG X, LI N, et al. Determination of geniposidic acid in rat plasma by LC-MS/MS and its application to in vivo pharmacokinetic studies[J]. *J Chromatogr B*, 2012, 887/888: 138-142.
- [21] LI N, LIU C, MI S, et al. Simultaneous determination of oleanolic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, kaempferol and quercetin in rat plasma by LC-MS-MS and application to a pharmacokinetic study of *Oldenlandia diffusa* extract in rats[J]. *J Chromatogr Sci*, 2012, 50(10): 885-892.
- [22] CHEN H, HUANG X, MIN J, et al. Geniposidic acid protected against ANIT-induced hepatotoxicity and acute intrahepatic cholestasis, due to Fxr-mediated regulation of Bsep and Mrp2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 197-207.
- [23] 陈浩, 石思, 闵剑斌, 等. 京尼平苷酸对siRNA介导BRL-3A细胞中FXR基因沉默后MRP2和BSEP表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(5): 1590-1594.

(编辑: 梁进权)