DOI:10.16016/j.2097-0927.202112271

α-酮戊二酸对小鼠胆汁淤积性肝损伤的缓解作用

谢雨虹[1,2],唐 波[3],范崇熙[2],李白容[2],孙 涛[2],宁守斌[1,2] 230032 合肥,安徽医科大学空军临床学院[1];100142 北京,空军特色医学中心消化内科[2];400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院消化内科[3]

[摘要] **目的** 探讨 α-酮戊二酸(alpha-ketoglutarate,AKG)对小鼠胆管结扎(bile duct ligation,BDL)所致胆汁淤积性肝损伤的缓解作用及其机制。**方法** 32 只 C57BL/6 雄性小鼠按随机数字表法分为 4 组(每组 8 只):假手术(Sham)组、假手术+AKG(Sham+AKG)组、胆管结扎(BDL)组、胆管结扎+AKG(BDL+AKG)组,所有小鼠均于术后 7 d 取材。检测血清 ALT、AST、TBIL、TBA、ALP 水平,HE 染色评估各组肝组织损伤程度,免疫组化检测肝组织 F4/80、MPO 的表达水平,qRT-PCR 检测肝组织促炎细胞因子 mRNA 表达水平,TUNEL 染色观察肝细胞凋亡。**结果** 与 BDL 组相比,BDL+AKG 组小鼠血清 ALT、AST、TBIL、TBA、ALP 水平均明显降低($P<0.05$),肝组织损伤程度明显减轻($P<0.05$),F4/80、MPO 表达减少($P<0.05$),肝组织促炎细胞因子 mRNA 表达明显减少($P<0.05$),TUNEL 阳性肝细胞数目明显减少($P<0.05$)。**结论** α-酮戊二酸对小鼠胆管结扎所致胆汁淤积性肝损伤具有缓解作用,其机制可能与其抑制炎症反应和减少肝细胞凋亡有关。

[关键词] α-酮戊二酸;胆汁淤积性肝损伤;炎症反应;细胞凋亡;小鼠
[中图法分类号] R575.05;R963;R977.4 [文献标志码] A

Alpha-ketoglutarate alleviates cholestatic liver injury in mice

XIE Yuhong[1,2], TANG Bo[3], FAN Chongxi[2], LI Bairong[2], SUN Tao[2], NING Shoubin[1,2] [1]Air Force Clinical College, Anhui Medical University, Hefei, Anhui Province, 230032; [2]Department of Gastroenterology, Air Force Medical Center of PLA, Beijing, 100142; [3]Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the alleviating effects of alpha-ketoglutarate (AKG) on bile duct ligation (BDL)-induced cholestatic liver injury in mice and its possible mechanism. **Methods** Thirty-two C57BL/6 male mice were randomly assigned to 4 groups ($n=8$): sham operation group (Sham), sham operation+AKG group (Sham+AKG), BDL group and BDL+AKG group. Liver and blood samples were collected from all groups in 7 d after operation, and the serum levels of ALT, AST, TBIL, TBA and ALP were measured. HE staining and immunohistochemistry were used to detect the severity of liver injury and the expression of F4/80 and myeloperoxidase (MPO) in each group, respectively. qRT-PCR was adopted to determine the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines. Hepatocyte apoptosis was evaluated by TUNEL assay. **Results** As compared with the BDL group, the BDL+AKG group showed significantly lower concentrations of ALT, AST, TBIL, TBA and ALP ($P<0.05$), obviously relieved liver histologic injury ($P<0.05$), reduced expression levels of F4/80 and MPO as well as pro-inflammatory cytokines ($P<0.05$), and decreased number of TUNEL positive hepatocytes ($P<0.05$). **Conclusion** AKG alleviates hepatic injury in BDL-induced cholestasis model mice, and its mechanism is possibly related to the inhibition of inflammatory response and hepatic cell apoptosis.

[**Key words**] alpha-ketoglutarate; cholestatic liver injury; inflammatory response; apoptosis; mice

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81873562) and the Project of Air Force Medical Center of PLA (2021JX006). Corresponding author: NING Shoubin, E-mail: ning-shoubin@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873562);空军特色医学中心院级项目(2021JX006)
[通信作者] 宁守斌,E-mail:ning-shoubin@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

肝脏作为人体最大的器官,在代谢过程中发挥着重要作用,包括物质合成、葡萄糖稳态、胆汁生成/失活、解毒以及免疫反应调节。肝脏疾病包括肝炎、阻塞性黄疸或胆汁淤积、肝硬化、酒精性和非酒精性脂肪肝以及肝癌等[1]。胆汁淤积(cholestasis)是由各种原因导致胆道系统功能失调、代谢产物蓄积而诱发的一类临床综合征,分为肝内胆汁淤积和肝外胆汁淤积[2-3]。病理表现为疏水性胆汁酸长期在肝脏内蓄积,加速细胞死亡、炎症及纤维化,最终发展为肝硬化甚至肝癌[4]。目前针对胆汁淤积性肝病的药物治疗方法比较有限,而肝移植作为最后选择也存在着诸如供体不足、并发症多及术后复发率高等缺点[5]。因此,探索针对胆汁淤积性肝病的新型有效药物具有重要意义。

α-酮戊二酸(alpha-ketoglutarate,AKG,图1A)是三羧酸循环的关键中间代谢产物,也是谷氨酸、谷氨酰胺和脯氨酸等氨基酸、维生素和有机酸的合成前体,具有生物利用度高、易于合成等特点[6]。既往研究发现,动物饮食中添加 AKG 可以刺激生物合成过程并有助于组织恢复[7],补充 AKG 可以维持老年动物的氧化还原稳态,改善细胞能量代谢,从而保持血管弹性[8];同时还能减少自由基,防止缺血导致的大脑氧化应激损伤[9];此外,AKG 具有减弱氨毒性的作用[10],也是氰化物的有效解毒剂[11]。近年来 AKG 已被证明对酒精性肝损伤[12]、药物性肝损伤[13]及 LPS 诱导的肝损伤[14]具有一定的保护作用,然而,AKG 在胆汁淤积性肝病中的作用却尚少见报道[15]。

本研究通过胆总管结扎(bile duct ligation,BDL)建立胆汁淤积性肝损伤小鼠模型,评价该模型的病理学特征,同时研究饮食补充 AKG 对上述小鼠肝损伤的缓解作用及其可能涉及的分子机制,最终为开发新型抗胆汁淤积性肝损伤药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 32 只雄性 C57BL/6 小鼠(6~8 周,体质量 20~25 g)购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号 SCXK(京)2021-0011,饲养于陆军军医大学第二附属医院实验动物房,环境温度 20~25 ℃,相对湿度(50±5)%,光照周期 12 h/12 h,自由进食饲料和水,预适应环境 7 d。

1.1.2 试剂 α-酮戊二酸钙盐(英国 Carbosynth 公司),AIN-93G 标准饲料(深圳睿迪生物科技公司),异氟烷(深圳瑞沃德公司),总 RNA 提取试剂盒、反转录反应试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),qRT-PCR 引物(上海生物工程公司),F4/80 一抗(美国 BIO-RAD 公司),MPO 一抗(美国 Abcam 公司),TUNEL 检测试剂盒(英国 Roche 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模及分组 采用随机数字表法将 32 只小鼠分为假手术(Sham)组、假手术+AKG(Sham+AKG)组、胆管结扎(BDL)组和胆管结扎+AKG(BDL+AKG)组,每组 8 只。考虑到 α-酮戊二酸是一种具有胃肠道腐蚀性的强酸[16],选用其钙盐化合物,可以有效模拟单体 α-酮戊二酸在体内的药理学作用[17],以 AIN-93G 标准饲料为基础添加 2%(质量分数)α-酮戊二酸钙盐(实验饲料)进行实验,Sham+AKG 组和 BDL+AKG 组小鼠自由进食实验饲料,其余两组正常进食标准饲料,直至 14 d 实验结束。进食实验饲料 7 d,BDL 组和 BDL+AKG 组小鼠按文献[18]所述行 BDL 手术:小鼠开腹后轻轻剥开肝脏,在与肝门静脉伴行的一条透明胆管上用 4-0 手术线行两次结扎,肝脏复位后关腹;其余两组动物接受剖腹手术分离胆管但不进行结扎。术后存活 7 d 的小鼠被纳入研究,如早期死亡则归因于外科手术。实验结束后,小鼠称重,经异氟烷吸入性麻醉,下腔静脉采血后颈椎脱位实施安乐死,收集肝脏组织,分别用 4% 多聚甲醛固定及 -80 ℃ 冰箱保存。

1.2.2 肝脏指数 小鼠处死后快速分离整个肝脏并称重,计算肝脏质量与体质量之比,即肝脏指数。肝脏指数=肝脏质量(mg)/体质量(g)。

1.2.3 血清生化指标检测 小鼠血液置于室温下 4 h,在 4 ℃、3 000 r/min 条件下离心 10 min,收集血清,全自动生化分析仪测定血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、总胆汁酸(TBA)及碱性磷酸酶(ALP)水平,由陆军军医大学第二附属医院检验科检测。

1.2.4 HE 染色 小鼠肝右叶经 4% 多聚甲醛固定,梯度酒精脱水及二甲苯透明处理后,石蜡包埋并用组织切片机进行组织切片。用苏木精-伊红行组织染色,光学显微镜下观察病理改变。病理诊断由两位资深病理医师担任,读片后揭盲。使用 Image J 软件(1.8.0)对胆汁性损伤面积进行统计。

1.2.5 TUNEL 染色 肝组织切片滴加 4% 多聚甲

醛,室温固定 10 min,弃去甲醛,用 PBS 洗 2 次,每次 5 min;滴加 3%过氧化氢-甲醇,室温孵育 10 min,消除内源性过氧化物酶干扰后弃去,PBS 洗 2 次,每次 5 min;滴加 100 μL 由 PBS 配制的 0.2% Triton X-100,于湿盒中室温孵育 5 min,弃去通透液,PBS 洗 2 次,每次 5 min;按照 TUNEL 试剂盒说明书配制好标记反应体系,滴加 50 μL 标记反应混合物,避光孵育 30 min,PBS 洗 2 次,每次 10 min;滴加 50 μL 转化剂 POD,避光反应 30 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min;滴加现配的 DAB 工作液,结合显微镜下观察背景颜色变化,控制显色时间,载玻片放入蒸馏水切片缸内,水洗终止显色;苏木精复染;光学显微镜观察凋亡细胞数量。

1.2.6　免疫组化检测肝组织 F4/80 及 MPO　　将肝组织石蜡切片与 F4/80(1∶100 稀释)、MPO(1∶50 稀释)一抗和生物素化二抗(1∶200 稀释)孵育适当时间,DAB 显色,在光学显微镜下观察所有切片,使用 Image J 软件(1.8.0)对免疫组化染色阳性细胞进行统计。

1.2.7　qRT-PCR 法检测基因 mRNA 表达水平　TRIzol 法提取细胞总 RNA,经 TaKaRa 反转录酶试剂盒逆转录得到 cDNA,按说明书使用 TaKaRa 的 SYBR Ⅱ试剂检测基因 mRNA 水平,PCR 反应体系为 20 μL。β-actin 作为内参,引物序列见表 1,数据分析采用 $-2^{\Delta\Delta Ct}$ 法。

1.3　统计学分析

各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理及统计分析,多组间差异使用单因素方差分析,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

表 1　引物序列及扩增片段长度

基因名称	引物序列(5′→3′)	扩增片段长度/bp
β-actin	上游:GTGACGTTGACATCCGTAAAGA 下游:GCCGGACTCATCGTACTCC	245
IL-6	上游:CCTCTCTGCAAGAGACTTCCAT 下游:AGTCTCCTCTCCGGACTTGT	95
IL-1β	上游:AACCTGCTGGTGTGTGACGTTC 下游:CAGCACGAGGCTTTTTTGTTGT	78
TNF-α	上游:CAGGCGGTGCCTATGTCTC 下游:CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG	89
MCP-1	上游:CCAAAGAAGCTGTGATCTTCAA 下游:TGGAATCCTGAACCCACTTC	81

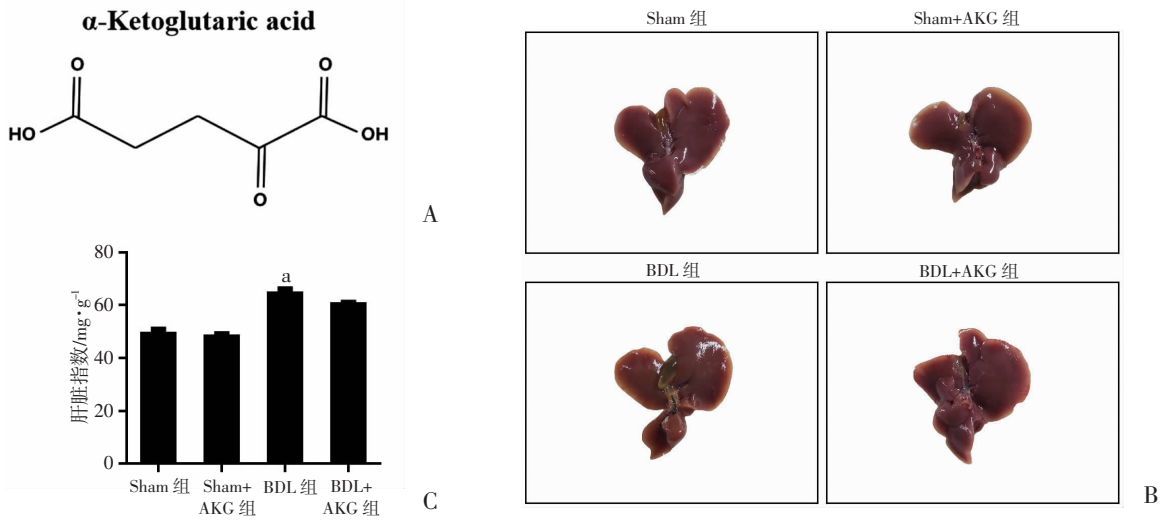
2　结果

2.1　一般情况和肝脏指数

实验期间 Sham 组和 Sham+AKG 组小鼠精神状态良好,活动无明显异常,无皮毛掉落现象。BDL 组和 BDL+AKG 组小鼠活动性减弱,精神状态变差,皮毛变暗,抓取易掉毛,黏膜黄染,粪便颜色变浅,尿液呈金黄色。各组小鼠均未出现死亡。

肝脏大体显示(图 1B),Sham 组和 Sham+AKG 组小鼠肝脏柔润,外观呈红褐色,大小正常,表面平滑有光泽。BDL 组小鼠肝脏肿大,光泽较暗,表面出现白色结节,增大的胆囊中充满大量墨绿色胆汁。BDL+AKG 组小鼠胆囊与 BDL 组相比略有减小,肝脏表面结节有所减少,但与 Sham 组形态学上仍存在一定差异。

称重结果显示(图 1C),与 Sham 组相比,BDL 组肝脏指数显著增加($P<0.01$),AKG 处理后有减小趋势,但无统计学差异。

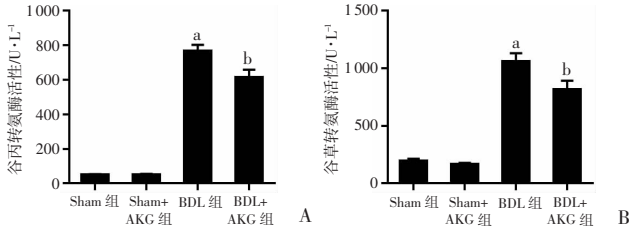


A:AKG 的化学结构式;B:各组小鼠肝脏大体;C:AKG 对 BDL 小鼠肝脏指数的影响;a:$P<0.01$,与 Sham 组比较

图 1　AKG 对 BDL 小鼠肝脏指数的影响

2.2　AKG 对 BDL 小鼠血清转氨酶水平的影响

BDL 组 ALT 和 AST 显著高于 Sham 组($P<0.01$),BDL+AKG 组血清 ALT 和 AST 明显低于 BDL 组($P<0.05$),Sham+AKG 组与 Sham 组无统计学差异。见图 2。



A:ALT 水平;B:AST 水平;a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 BDL 组比较

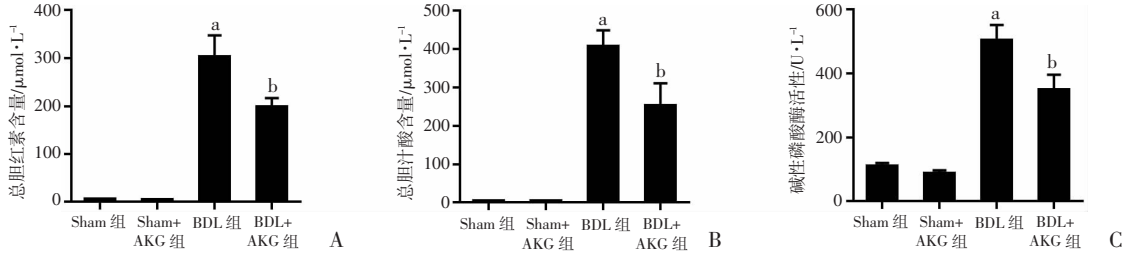
图 2　AKG 对 BDL 小鼠血清转氨酶水平的影响

2.3　AKG 对 BDL 小鼠血清总胆红素、总胆汁酸及碱性磷酸酶水平的影响

与 Sham 组相比,BDL 组血清 TBIL、TBA、ALP 水平明显增高($P<0.01$),而 BDL+AKG 组 TBIL、TBA、ALP 水平较 BDL 组明显降低($P<0.05$)。见图 3。

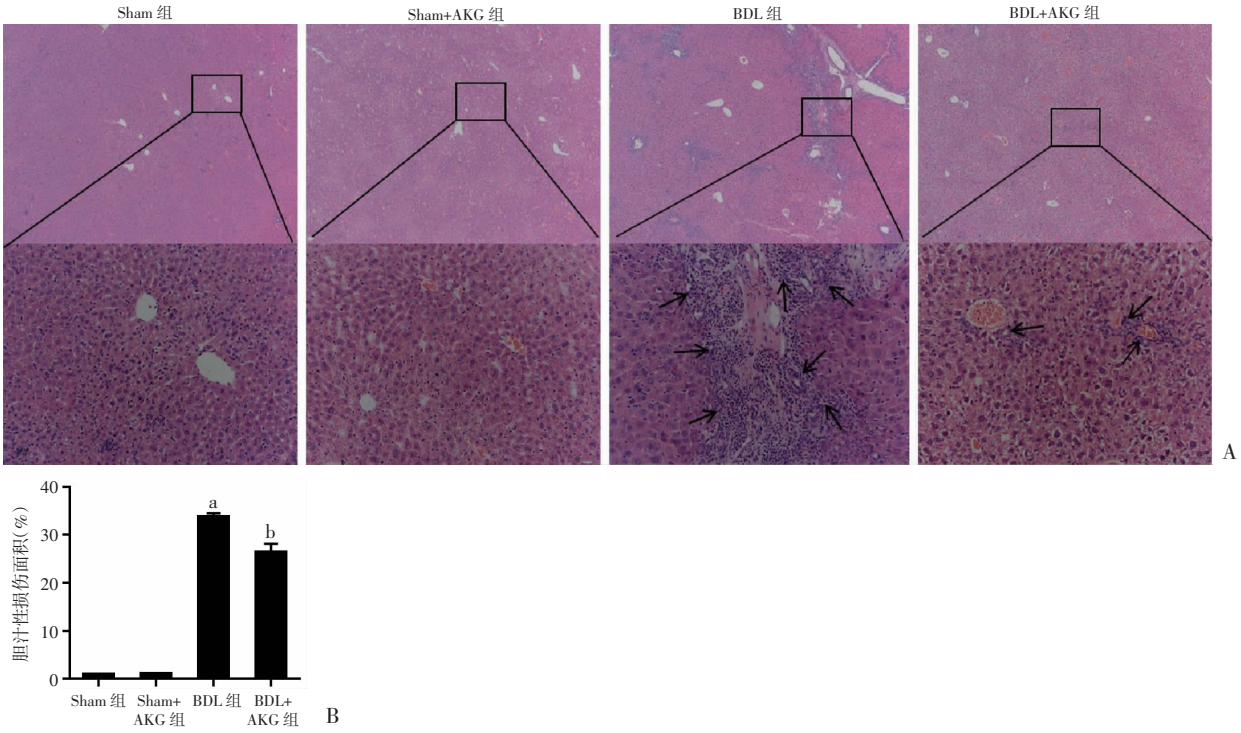
2.4　AKG 对 BDL 小鼠肝脏组织学的影响

肝组织 HE 染色结果显示(图 4A),Sham 组可见一定数量的肝细胞和细胞核结构,肝小叶结构清晰,无炎性细胞浸润,而 BDL 组中肝细胞肿胀且排列紊乱,可见大量炎性细胞浸润,肝细胞散在变性、坏死,胆管增生,部分肝小叶中可见淤积的红细胞。与 BDL 组相比,BDL+AKG 组小鼠肝细胞坏死及炎性细胞浸润情况明显减轻,胆汁性损伤面积明显减少($P<0.01$,图 4B)。



A:TBIL 水平;B:TBA 水平;C:ALP 水平;a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 BDL 组比较

图 3　AKG 对 BDL 小鼠血清总胆红素、胆汁酸及碱性磷酸酶水平的影响



A:各组小鼠肝脏 HE 染色(上排 ×40,下排 ×200)　箭头示严重肝坏死和炎症细胞浸润区;B:胆汁性损伤面积的定量分析;a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 BDL 组比较

图 4　AKG 对 BDL 小鼠肝脏组织学的影响

2.5 AKG 对 BDL 小鼠肝脏炎症反应的影响

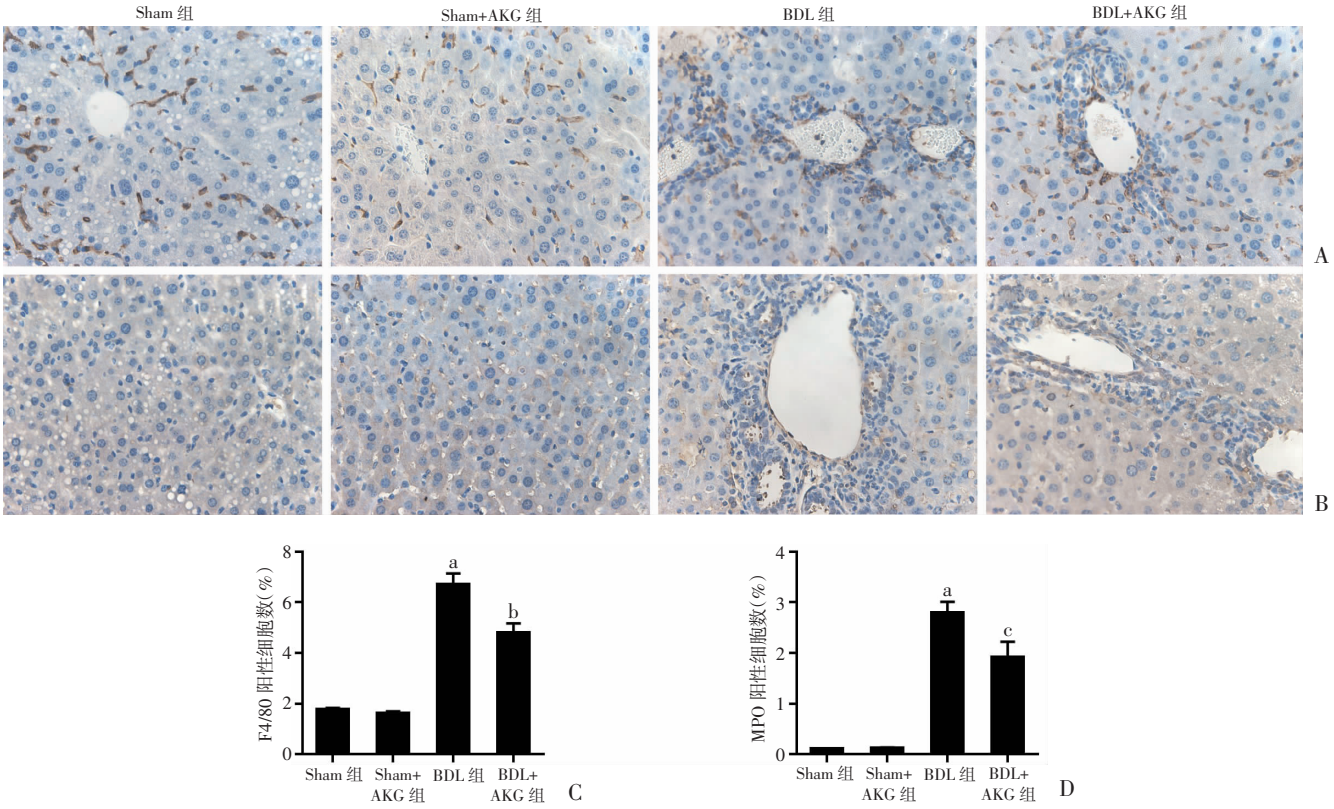
免疫组化结果显示(图 5),与 BDL 组相比,补充 AKG 可明显减少巨噬细胞标记物 F4/80 以及中性粒细胞标记物 MPO 的表达,减轻 BDL 诱导的炎症细胞浸润,表明 AKG 对 BDL 诱导的肝脏炎症具有抑制作用。

2.6 AKG 对 BDL 小鼠肝脏炎症因子基因表达水平的影响

为了研究 AKG 是否具有抗炎作用,通过实时荧光定量 PCR 检测肝组织中促炎细胞因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 MCP-1 mRNA 表达水平。结果显示(图 6),BDL 组小鼠肝组织 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 MCP-1 mRNA 水平较 Sham 组显著上调($P<0.01$);与 BDL 组比较,BDL+AKG 组上述促炎细胞因子 mRNA 水平明显下调($P<0.05$),说明 AKG 能抑制炎症因子基因表达水平。

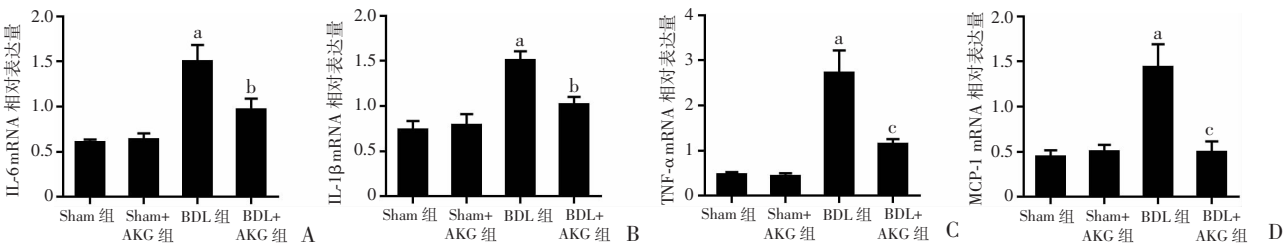
2.7 AKG 对 BDL 小鼠肝细胞凋亡的影响

Sham 组及 Sham+AKG 组之间仅有极少量棕黄色 TUNEL 阳性细胞,BDL 组中 TUNEL 阳性细胞数量显著增加($P<0.05$),而 BDL+AKG 组其数量明显少于 BDL 组($P<0.01$)。结果表明,AKG 使 BDL 诱导的胆汁淤积模型的肝细胞凋亡情况有所缓解。见图 7。



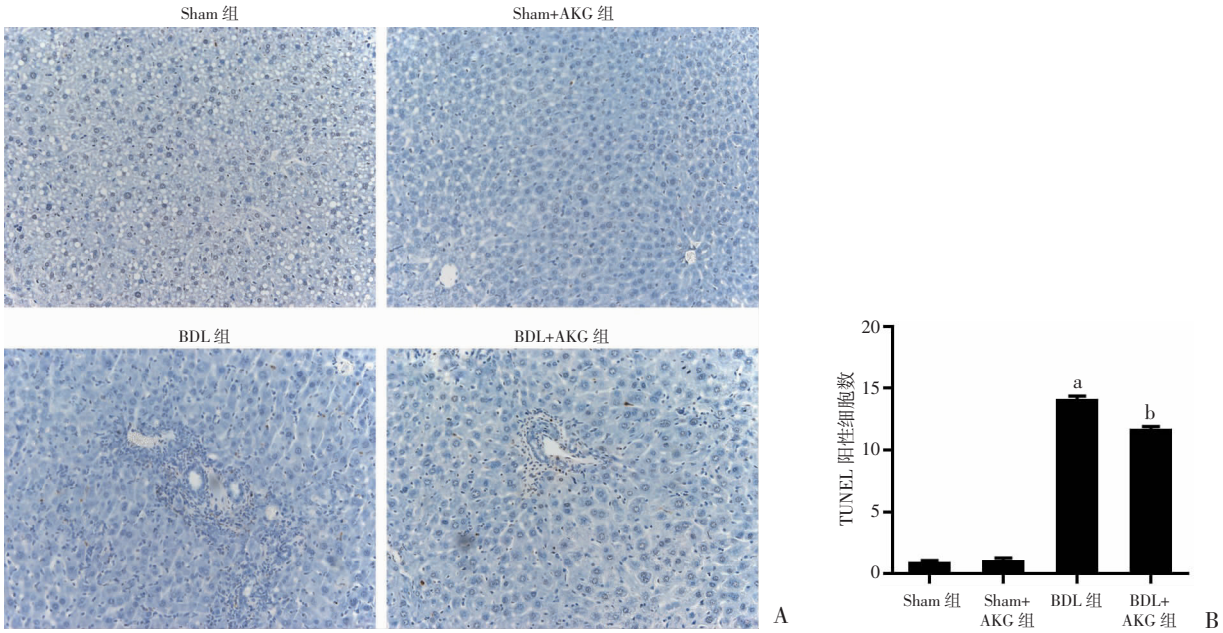
A:免疫组化染色观察 AKG 对肝脏内 F4/80 阳性表达细胞的影响(×400);B:免疫组化染色观察 AKG 对肝脏内 MPO 阳性表达细胞的影响(×400);C:F4/80 阳性表达细胞的定量分析;D:MPO 阳性表达细胞的定量分析;a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 BDL 组比较

图 5 AKG 对 BDL 小鼠肝脏炎症反应的影响



A:IL-6 mRNA 表达;B:IL-1β mRNA 表达;C:TNF-α mRNA 表达;D:MCP-1 mRNA 表达;a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 BDL 组比较

图 6 AKG 对 BDL 小鼠肝脏炎症因子基因表达水平的影响



A:AKG 改善 BDL 诱导的肝细胞凋亡(×200);B:TUNEL 阳性细胞计数;a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 BDL 组比较

图 7 AKG 对 BDL 小鼠肝细胞凋亡的影响

3 讨论

胆汁淤积性肝损伤是由于胆汁从肝脏到小肠的自然流出道受损,胆汁形成、分泌或排泄障碍,有毒的胆汁酸在肝脏内蓄积,从而导致炎症、细胞凋亡、纤维化,最终进展为肝硬化甚至肝癌。胆汁淤积可由多种不同的原发病因引起,也可以是许多慢性肝病的继发病变。成人胆汁淤积的主要病因是原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis,PBC)和原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis,PSC)。治疗 PBC 的药物仅限于熊去氧胆酸(UDCA),以及最近获得作为二线药物许可的奥贝胆酸(OCA)。尽管如此,仍有部分患者对药物治疗无反应;而对于 PSC 而言,目前尚无有效的治疗药物。因此,寻找治疗胆汁淤积性肝病的新型药物显得非常重要。

随着对胆汁淤积性肝病治疗的需求越来越高,利用动物模型来进行肝病的相关研究已十分广泛。啮齿动物的胆管结扎是研究胆汁淤积性肝病的经典实验模型[19-20]。小鼠胆管结扎后,由于胆汁不能正常分泌至十二指肠,胆汁的有害成分大量蓄积在肝组织中并反流入血,造成黄疸和机体损伤,类似于人类胆汁淤积症的病理生理过程[21]。本实验对小鼠胆总管结扎,肝脏明显充血肿胀,表面出现白色结节欠光泽,胆囊肿大呈墨绿色,肝脏指数明显增加,肝脏病理及血生化均提示肝功能异常,表明造模成功。

胆汁酸的蓄积是各种胆汁淤积性肝损伤的重要起始因素,其中肝细胞和胆管上皮细胞都是毒性胆汁酸的损伤靶点。在本实验中,BDL 组小鼠的肝脏组织病理学检查可见明显的胆汁性梗死灶及汇管区大量炎性细胞浸润,以及 ALT、AST、ALP、TBIL、TBA 和 ALP 的升高,均提示胆汁淤积,肝功能明显异常;给予 AKG 后肝脏组织学损伤有所减轻,血清生化指标明显下降,说明 AKG 能减轻胆汁淤积导致的肝细胞炎症损伤。

近年来,以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润在胆汁淤积性肝损伤中的作用日益受到关注。有毒的胆汁酸损伤胆管细胞和肝细胞,并通过募集大量的中性粒细胞产生活性氧,引发肝脏的炎症反应,从而加重胆汁淤积和肝坏死[22]。通过抑制中性粒细胞的浸润可明显减轻胆汁酸对肝脏细胞的损伤。MPO 主要存在于中性粒细胞等髓系细胞中,是中性粒细胞特异性标志分子。外部刺激可导致中性粒细胞聚集并释放 MPO。MPO 不仅能杀灭吞噬侵入机体的微生物,还能破坏机体的正常组织[23]。免疫组化实验显示,BDL 小鼠肝脏中 MPO 阳性细胞数目明显增多,而 AKG 可显著减少 MPO 的表达。同时,研究发现毒性胆汁酸对肝实质细胞造成的损害往往由巨噬细胞激活引起。肝脏巨噬细胞激活后,能发挥调节炎症细胞、缓解组织损伤及细胞杀伤等作用。本实验结果提示 AKG 能抑制巨噬细胞

标志物 F4/80 的表达。此外,qRT-PCR 结果显示,AKG 显著降低了炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 MCP-1 的表达水平,说明 AKG 可以通过抑制 BDL 诱导的炎性细胞聚集、活化,减少促炎细胞因子的过度产生,防止炎症级联放大反应的发生,从而缓解胆汁淤积小鼠的肝脏炎症和肝细胞损伤。

胆汁酸在胆固醇分泌、脂肪吸收、胆固醇胆结石生成等生理过程中发挥重要作用[24]。然而,胆汁酸在肝细胞内的积累也可以导致细胞膜破坏、炎性坏死以及细胞凋亡等一系列组织损害[25]。研究表明,肝细胞内胆汁酸积累导致的细胞凋亡对胆汁淤积过程中肝损伤的进展至关重要[26-27]。细胞凋亡,即细胞的有序死亡,受多种调节分子的控制。过去认为细胞凋亡是胆汁酸介导的肝损伤[28],同时炎症反应也可通过诱导细胞凋亡进一步加重肝损伤[29]。肝脏组织的 TUNEL 染色提示,AKG 处理后肝组织内 TUNEL 阳性凋亡细胞数目明显减少,说明 AKG 对 BDL 诱导的胆汁淤积性肝损伤的缓解作用可能与其抗细胞凋亡有关。

综上所述,本研究建立了模拟临床状态胆汁淤积性肝病的小鼠模型,初步观察了 AKG 对胆汁淤积性肝损伤的缓解作用,结果表明其可通过抑制炎症反应和减少肝细胞凋亡来减轻胆管结扎诱导的肝损伤,为临床上有效治疗胆汁淤积性肝病提供新的分子靶点和治疗策略。

参考文献:

[1] WILLIAMS R. Global challenges in liver disease [J]. Hepatology, 2006, 44(3): 521-526. DOI:10.1002/hep.21347.

[2] DE OLIVEIRA COSTA E L, DE AZEVEDO G M Jr, PETROIANU A. Morphological changes in the liver and kidneys of rats subjected to terminal ileum exclusion during obstructive cholestasis [J]. Acta Cir Bras, 2014, 29(6): 353-358. DOI:10.1590/s0102-86502014000600001.

[3] LIN T K, HUANG L T, HUANG Y H, *et al*. The effect of the red wine polyphenol resveratrol on a rat model of biliary obstructed cholestasis: involvement of anti-apoptotic signalling, mitochondrial biogenesis and the induction of autophagy[J]. Apoptosis, 2012, 17(8): 871-879. DOI:10.1007/s10495-012-0732-3.

[4] BEUERS U, TRAUNER M, JANSEN P, *et al*. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond [J]. J Hepatol, 2015, 62(1 Suppl): S25-S37. DOI:10.1016/j.jhep.2015.02.023.

[5] ALABRABA E, NIGHTINGALE P, GUNSON B, *et al*. A re-evaluation of the risk factors for the recurrence of primary sclerosing cholangitis in liver allografts [J]. Liver Transpl, 2009, 15(3): 330-340. DOI:10.1002/lt.21679.

[6] MEHRA L, RAWAT H, JAIMINI A, *et al*. Alpha-ketoglutarate mediated hepatoprotection against alcohol induced toxicity: *in vivo* functional observation studies in Sprague Dawley rats using gamma scintigraphy [J]. Drug Chem Toxicol, 2020, 43(5): 546-551. DOI:10.1080/01480545.2018.1559183.

[7] BAYLIAK M M, LUSHCHAK V I. Pleiotropic effects of alpha-ketoglutarate as a potential anti-ageing agent [J]. Ageing Res Rev, 2021, 66: 101237. DOI:10.1016/j.arr.2020.101237.

[8] NIEMIEC T, SIKORSKA J, HARRISON A, *et al*. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice [J]. J Physiol Pharmacol, 2011, 62(1): 37-43.

[9] KOVALENKO T N, USHAKOVA G A, OSADCHENKO I, *et al*. The neuroprotective effect of 2-oxoglutarate in the experimental ischemia of hippocampus [J]. J Physiol Pharmacol, 2011, 62(2): 239-246.

[10] DAKSHAYANI K B, SUBRAMANIAN P, MANIVASAGAM T, *et al*. Metabolic normalization of alpha-ketoglutarate against N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in rats [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2006, 20(5): 477-480. DOI:10.1111/j.1472-8206.2006.00422.x.

[11] LONG L, HALLIWELL B. Artefacts in cell culture: α-ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(1): 20-24. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.01.091.

[12] ZHAO J J, PENG L, CUI R B, *et al*. Dimethyl α-ketoglutarate reduces CCl_4-induced liver fibrosis through inhibition of autophagy in hepatic stellate cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 481(1/2): 90-96. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.11.010.

[13] TULSAWANI R K, DEBNATH M, PANT S C, *et al*. Effect of sub-acute oral cyanide administration in rats: protective efficacy of alpha-ketoglutarate and sodium thiosulfate [J]. Chem Biol Interact, 2005, 156(1): 1-12. DOI:10.1016/j.cbi.2005.05.001.

[14] WANG L, HOU Y Q, YI D, *et al*. Dietary supplementation with glutamate precursor α-ketoglutarate attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in young pigs [J]. Amino Acids, 2015, 47(7): 1309-1318. DOI:10.1007/s00726-015-1966-5.

[15] GYANWALI B, LIM Z X, SOH J, *et al*. Alpha-ketoglutarate dietary supplementation to improve health in humans [J]. Trends Endocrinol Metab, 2022, 33(2): 136-146. DOI:10.1016/j.tem.2021.11.003.

[16] PERNA S, ALALWAN T A, ALAALI Z, *et al*. The role of glutamine in the complex interaction between gut microbiota and health: a narrative review[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 5232. DOI:10.3390/ijms20205232.

[17] ASADI SHAHMIRZADI A, EDGAR D, LIAO C Y, *et al*. Alpha-ketoglutarate, an endogenous metabolite, extends lifespan and compresses morbidity in aging mice[J]. Cell Metab, 2020, 32(3): 447-456. e6. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.08.004.

[18] SHARAWY M H, ABDEL-RAHMAN N, MEGAHED N, *et al*. Paclitaxel alleviates liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats: role of TGF-β1, IL-10 and c-Myc[J]. Life Sci, 2018, 211: 245-251. DOI:10.1016/j.lfs.2018.09.037.

[19] GEORGIEV P, JOCHUM W, HEINRICH S, *et al*. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation[J]. Br J Surg, 2008, 95(5): 646-656. DOI:10.1002/bjs.6050.

[20] HEINRICH S, GEORGIEV P, WEBER A, *et al*. Partial bile duct ligation in mice: a novel model of acute cholestasis[J]. Surgery, 2011, 149(3): 445-451. DOI:10.1016/j.surg.2010.07.046.

[21] ABSHAGEN K, KÖNIG M, HOPPE A, *et al*. Pathobiochemical signatures of cholestatic liver disease in bile duct ligated mice[J]. BMC Syst Biol, 2015, 9: 83. DOI:10.1186/s12918-015-0229-0.

[22] CAI S Y, OUYANG X S, CHEN Y L, *et al*. Bile acids initiate cholestatic liver injury by triggering a hepatocyte-specific inflammatory response[J]. JCI Insight, 2017, 2(5): e90780. DOI:10.1172/jci.insight.90780.

[23] SEN A L, OZKAN S, RECEBOVA K, *et al*. Effects of myrtus communis extract treatment in bile duct ligated rats[J]. J Surg Res, 2016, 205(2): 359-367. DOI: 10.1016/j.jss.2016.06.094.

[24] WU J S, LI Y F, LI Y Y, *et al*. Huangqi Decoction alleviates alpha-naphthylisothiocyanate induced intrahepatic cholestasis by reversing disordered bile acid and glutathione homeostasis in mice[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 938. DOI:10.3389/fphar.2017.00938.

[25] WU J S, FANG S, LI W K, *et al*. Metabolomics research on the hepatoprotective effect of cultured bear bile powder in α-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic mice[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1153: 122269. DOI:10.1016/j.jchromb.2020.122269.

[26] GUICCIARDI M E, MALHI H, MOTT J L, *et al*. Apoptosis and necrosis in the liver[J]. Compr Physiol, 2013, 3(2): 977-1010. DOI:10.1002/cphy.c120020.

[27] OGAWA A, TAGAWA T, NISHIMURA H, *et al*. Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas dependent apoptosis in Peyer's patch and the liver at an early stage after bile duct ligation in mice[J]. Gut, 2006, 55(1): 105-113. DOI:10.1136/gut.2005.065318.

[28] ZHOU H Q, LIU W, WANG J, *et al*. Paeoniflorin attenuates ANIT-induced cholestasis by inhibiting apoptosis *in vivo via* mitochondria-dependent pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 696-704. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.02.084.

[29] HAN Y, LUO H N, WANG H, *et al*. SIRT1 induces resistance to apoptosis in human granulosa cells by activating the ERK pathway and inhibiting NF-κB signaling with anti-inflammatory functions[J]. Apoptosis, 2017, 22(10): 1260-1272. DOI:10.1007/s10495-017-1386-y.

(收稿:2021-12-30;修回:2022-03-16)

(编辑 邓强庭)