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Δ

阿依孜巴·图尔洪[1*]，杨建华[2]，王晓梅[1]，王新玲[1]，胡君萍[1#]（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α-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α（TNF-α）和白细胞介素1β（IL-1β）]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7α羟化酶（CYP7A1）]mRNA，以及FXR信号通路相关蛋白（FXR、MRP2、BSEP、NTCP）和核因子κB p65（NF-κB 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-κB 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 Hugan buzure formula on intrahepatic cholestatic liver injury in rats

Ayiziba·Tuerhong[1], YANG Jianhua[2], WANG Xiaomei[1], WANG Xinling[1], HU Junping[1]（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 Hugan 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-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β)] 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^+-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), organic anion-transporting polypeptide 2 (OATP2) and cholesterol 7α-hydroxylase (CYP7A1)], the expressions of FXR signaling pathway-related proteins (FXR, MRP2, BSEP, NTCP) and nuclear factor-κB p65 (NF-κB 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

Δ**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.CXCY2022039）

＊**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-κB 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[1]。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[2]。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[3]。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[4-6]，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[7]，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[8]。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[9]。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。

α-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（multidrug resistance protein 2，MRP2）抗体和鼠源β-微管蛋白（β-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（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κB p65（nuclear factor kappa B p65，NF-κB 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 ℃，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[HBF-L、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[10]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[2,11]。

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 ℃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 ℃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 ℃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 μm），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 ℃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 μL）包括：正、反引物各0.8 μL，TB Green Premix Ex Taq（2×）10 μL，ROX Reference Dye 2（50×）0.4 μL，cDNA模板2 μL，灭菌水6 μL。反应程序为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，72 ℃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$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各组大鼠肝组织中炎症相关因子[肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）]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7α羟化酶（cholesterol 7α-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-α	上游：GACTGGCGTGTTCATCCG	180
	下游：TCTGAGCATCGTAGTTGTTGG	
IL-1β	上游：TGATGACGACCTGCTAGTGTG	124
	下游：TCCATTGAGGTGGAGAGCTT	
FXR	上游：AACCCCGATGTTTAGTTTCT	129
	下游：TCCACTGCCTCTCTATCCTT	
SHP	上游：CTCGGTTTGCATACAGTGTTTGC	75
	下游：GCATATTGGCCTGGAGGTTTT	
NTCP	上游：CCACTTTTCTTCTTTCCTCTCCTCT	124
	下游：GGTCCTTTGGAGGCTTGATTT	
OATP2	上游：TGTGATGACCGTTGATAATTTTCCA	81
	下游：TTCTCCACATATAGTTGGTGCTGAA	
BSEP	上游：TGGTTTCAAGGCAATGTTAGG	99
	下游：TGGGAAGCATCTGTAGCAAG	
MRP2	上游：TTGGTCGTCTTCTGTTCC	150
	下游：AATGTTGGTCTCTGCTTCTG	
CYP7A1	上游：CACTTGTTCAAGACCGCACA	189
	下游：TGCTTGAGATGCCCAGAGAA	
GAPDH	上游：GTGCCAGCCTCGTCTCATAG	98
	下游：GAACTTGCCGTGGGTAGAGT	

2.8 大鼠肝组织中FXR信号通路相关蛋白和NF-κB p65蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取－80 ℃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、β-tubulin和NF-κB 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 ℃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β-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/(μmol/L)	DBIL/(μmol/L)	TBIL/(μmol/L)
control组	42.12±5.61	33.28±5.85	167.89±60.66	13.70±3.97	0.84±0.06	0.57±0.20
model组	58.95±5.95[a]	108.06±16.3[a]	776.37±118.52[a]	315.20±16.39[a]	29.43±9.37[a]	61.90±7.97[a]
UDCA组	38.59±9.53[b]	107.80±7.90	556.58±90.79[b]	276.66±22.59[b]	21.73±6.76	60.64±11.43
HBF-L组	71.11±7.43	106.60±19.55	619.04±117.93[b]	295.18±12.90	24.88±13.04	63.06±11.15
HBF-M组	58.45±10.70	106.49±24.67	546.78±53.39[b]	272.62±26.22[b]	18.88±5.89[c]	51.17±8.27
HBF-H组	47.94±13.96[c]	88.83±6.71[c]	505.55±127.52[b]	229.86±34.31[b]	16.40±4.68[b]	43.51±11.80[b]

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。

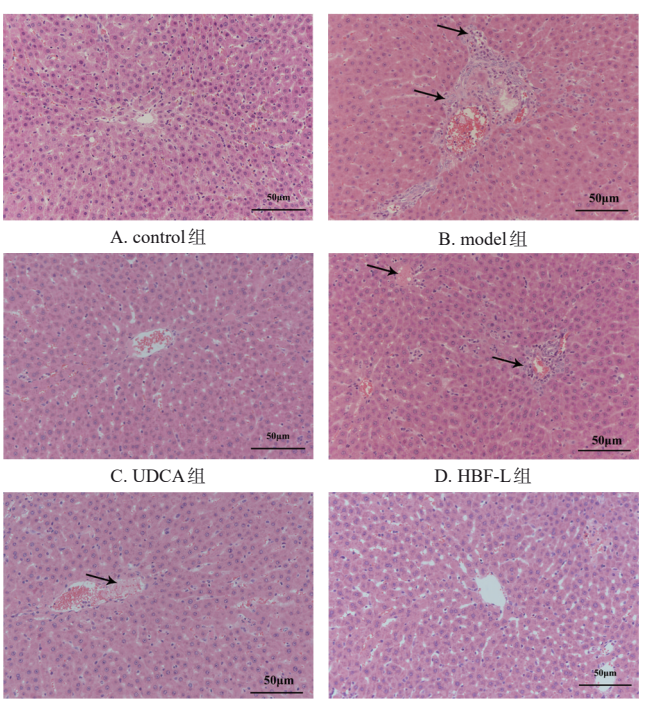
表3 HBF对大鼠血清中氧化应激指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	MDA/(μmol/L)	GSH/(μmol/L)	SOD/(U/mL)
control组	3.93±0.26	13.64±1.97	269.43±17.21
model组	16.87±2.29[a]	6.67±5.03[a]	247.49±9.91[b]
UDCA组	13.53±1.93[c]	17.60±4.21[d]	239.36±19.33
HBF-L组	12.58±2.69[d]	10.62±3.78	242.49±18.38
HBF-M组	12.37±2.80[d]	11.56±4.18[c]	242.65±15.76
HBF-H组	12.12±3.28[d]	13.42±2.71[d]	254.78±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。



A. control组　B. model组　C. UDCA组　D. HBF-L组　E. HBF-M组　F. HBF-H组

→：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-α、IL-1β 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-α、IL-1β 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-α 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-α/GAPDH	IL-1β/GAPDH
control组	1.12±0.65	1.02±0.21
model组	8.12±2.66[a]	1.57±0.20[b]
UDCA组	7.53±3.42	1.18±0.31
HBF-L组	7.80±2.11	2.38±0.69
HBF-M组	4.88±2.34[c]	1.52±0.52
HBF-H组	2.92±2.90[d]	0.96±0.32[c]

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±0.44	1.01±0.12	1.11±0.47	1.13±0.70	1.00±0.07	1.14±0.61	1.00±0.08
model组	0.29±0.14[a]	0.18±0.18[a]	0.58±0.15[b]	0.48±0.25[b]	0.24±0.05[a]	0.42±0.24[a]	11.07±3.87[b]
UDCA组	0.54±0.28	0.49±0.08[c]	1.19±0.27[d]	1.35±0.41[c]	0.61±0.06[c]	0.74±0.46	3.07±1.19[d]
HBF-L组	0.41±0.25	0.34±0.28	1.28±0.32[c]	1.00±0.48	0.45±0.26	0.50±0.21	3.81±1.19[d]
HBF-M组	0.53±0.26	0.52±0.18[c]	1.46±0.52[c]	1.41±0.38[c]	0.49±0.05[c]	0.62±0.32	3.71±1.52[d]
HBF-H组	0.69±0.36[d]	0.68±0.08[c]	1.51±0.42[c]	1.49±0.43[c]	1.11±0.23[c]	0.95±0.45[d]	2.40±1.22[d]

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-κB 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-κB 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。

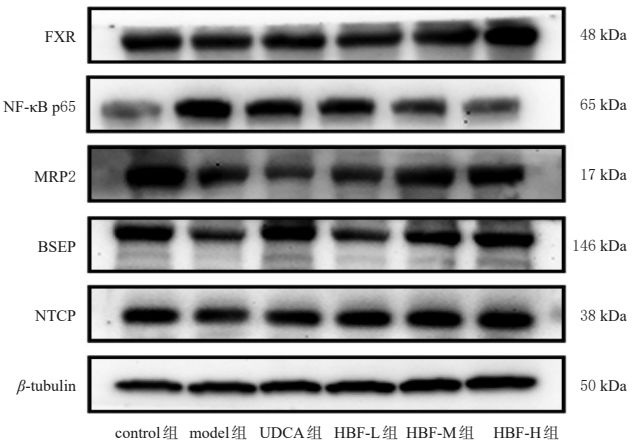


图2 HBF对大鼠肝组织中FXR信号通路相关蛋白及NF-κB p65蛋白表达影响的电泳图

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

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

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[12]。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[11]。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[13]。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[11]。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[14]。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[15]。胆汁酸是天然的FXR配体[16]，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[15]。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[12]。NF-κB 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-α、IL-1β刺激时，NF-κB p65蛋白的表达将会升高，从而进一步加重炎症反应[17]。此外，还有研究表明，FXR也可通过与NF-κB亚基结合来抑制NF-κB的活性，从而调节炎症反应[13]。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-κB 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-α、IL-1β 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 α-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] NIETSCHE 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_4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 α-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 α-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* Burkillextract 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 pedunculosum*, 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）