基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003592

基于网络药理学和动物实验探讨苦黄颗粒抗肝内胆汁淤积的作用机制

黄　娟[1]，方　伟[2]，肖亚平[2]，杜　彪[2]

（1.川北医学院药学院，南充　637000；2.重庆大学附属三峡医院药学部，重庆　404000）

【摘　要】目的：通过整合动物实验和网络药理学的方法，探讨苦黄颗粒抗肝内胆汁淤积的潜在作用机制。**方法：**评估苦黄颗粒对α-萘异硫氰酸酯（alpha-naphthyl isothiocyanate，ANIT）诱导的胆汁淤积性肝损伤小鼠的保肝作用，考察肝体比、血清学指标、氧化应激等生化指标及肝脏病理特征。结合网络药理学和生物信息学挖掘苦黄颗粒治疗肝内胆汁淤积的潜在靶点和关键通路。通过western blot验证相关关键通路。**结果：**动物实验表明，与空白组相比，模型组肝体比、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AKP）、丙氨酸转氨酶（alanine transaminase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）、直接胆红素（direct bilirubin，DBIL）、总胆红素（total bilirubin，TBIL）、总胆汁酸（total bile acid，TBA）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、胆固醇7α-羟化酶（cholesterol 7α-hydroxylase，CYP7A1）蛋白表达水平均升高（$P<0.05$）；而体质量、超氧化物歧化酶（super oxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽-过氧化氢酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）、法尼醇X受体（farnesoid X receptor，FXR）、小异二聚体伴侣（small heterodimer partner，SHP）抗体、胆盐输出泵（bile salt export pump，BSEP）和多药耐药相关蛋白2（multidrug resistance-associated protein 2，MRP2）蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）。与模型组比较，苦黄颗粒各剂量组和联苯双酯组肝体比、TBIL、DBIL、TBA、ALT、AST、AKP、MDA、CYP7A1的水平均下降（$P<0.05$）；同时体质量、SOD、GSH-Px、FXR、SHP、BSEP和MRP2升高（$P<0.05$）。网络药理学分析表明，苦黄颗粒可能通过调控肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、核因子-κB1（nclear factor kappa b subunit1，NF-κB1）、法尼醇X受体（farnesoid x receptor，FXR）和药耐受性相关蛋白2（multidrug resistance-associated protein 2，MRP2）等靶点影响胆汁酸的分泌减轻胆汁淤积肝损伤。**结论：**苦黄颗粒可能通过激活FXR通路相关靶点，减少胆汁酸合成，促进胆汁酸排泄，从而减轻胆汁淤积肝损伤。

【关键词】苦黄颗粒；胆汁淤积；肝损伤；网络药理学；FXR通路

【中图分类号】R285.5　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-11-30

Investigation of mechanism of action of Kuhuang Granules against intrahepatic cholestasis through the integration of network pharmacology and animal experiments

Huang Juan[1]，*Fang Wei*[2]，*Xiao Yaping*[2]，*Du Biao*[2]

（*1. School of Pharmacy，North Sichuan Medical College；2. Department of Pharmacy，Chongqing University Three Gorges Hospital*）

【Abstract】*Objective*：To elucidate the potential mechanism of action of Kuhuang Granules against intrahepatic cholestasis by employing a comprehensive approach that combines animal experiments with network pharmacology. ***Methods*：**We assessed the hepatoprotective effect of Kuhuang Granules in mice with cholestatic liver injury induced by alpha-naphthyl isothiocyanate by evaluating the liver-to-body ratio，serological indicators，oxidative stress，and other blood biochemical parameters，and pathological characteristics of the liver. The potential targets and key pathways of Kuhuang Granules in the treatment of intrahepatic cholestasis were uncovered through the integration of network pharmacology and bioinformatics. The identified key pathways were validated through Western blot analysis. ***Results*：**Animal experiments showed that，compared with the blank group，the model group exhibited significantly increased levels of liver-to-body ratio，alkaline phosphatase（AKP），alanine transaminase（ALT），aspartate aminotransferase（AST），direct bilirubin（DBil），total bilirubin（TBil），total bile acid（TBA），malondialde-

作者介绍：黄　娟，Email：406395334@qq.com，研究方向：药理学。

通信作者：杜　彪，Email：1449615818@qq.com。

基金项目：重庆市科技局技术创新与应用项目（乡村振兴项目）（编号：2023TIAD-ZXX0013）；重庆市自然科学基金博士后项目（编号：CSTB2022NSCQ-BHX0709）；重庆市万州区博士“直通车”科研资助项目（编号：wzstc-20220124）。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240926.1056.028（2024-09-27）

hyde（MDA），and cholesterol 7α-hydroxylase（CYP7A1）protein expression（all $P<0.05$）；the body mass，superoxide dismutase（SOD），glutathione peroxidase（GSH-Px），farnesoid X receptor（FXR），small heterodimer partner（SHP）antibodies，bile salt export pump（BSEP），and multidrug resistance-associated protein 2（MRP2）expression levels were significantly decreased（all $P<0.05$）. Compared with the model group，the Kuhuang Granules groups and bifendate group showed significantly decreased levels of liver-to-body ratio，TBil，DBil，TBA，ALT，AST，AKP，MDA，and CYP7A1（all $P<0.05$）；meanwhile，the body mass，SOD，GSH-Px，FXR，SHP，BSEP，and MRP2 were significantly increased（all $P<0.05$）. Network pharmacology analysis indicated that Kuhuang Granules may alleviate cholestatic liver injury by affecting bile acid secretion through regulating targets such as tumor necrosis factor，nuclear factor kappa b subunit 1，FXR，and MRP2. ***Conclusion***：Kuhuang Granules may alleviate cholestatic liver injury by activating targets associated with the FXR pathway，reducing bile acid synthesis，and enhancing bile acid excretion.

【Key words】Kuhuang Granules；cholestasis；liver injury；network pharmacology；FXR pathway

胆汁淤积是由于胆汁形成、分泌和排泄异常，导致胆汁酸过度蓄积，进而引起肝损伤。该病症主要表现为肝功能异常、黄疸和皮肤瘙痒等症状，最终可能演变为肝细胞凋亡、肝纤维化，甚至肝衰竭[1-2]。鉴于胆汁淤积的发病机制极为复杂，目前治疗该病的药物选择相当有限。在临床上，通常采用熊去氧胆酸、奥贝胆酸和糖皮质激素等药物进行治疗。然而，这些药物存在着价格昂贵、部分患者治疗反应不佳或无法耐受，以及可能引发皮肤瘙痒等副作用[3-4]。因此，开发针对抗胆汁淤积性肝损伤的新药物具有重要意义。

传统中医药理论将胆汁淤积归入“黄疸”范畴，《金匮要略》指出黄疸病“从湿得之”，清热利湿退黄是治疗黄疸的基本法则。苦黄颗粒源于《伤寒论》中的“茵陈蒿汤”，经后世改良开发所得，主要由苦参、大黄、茵陈、柴胡和大青叶五味中药组成，具有清热利湿、疏肝退黄的功效[5]。研究表明，苦黄颗粒具有改善黄疸型病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝病和急性药物性肝损伤等多种保肝作用[6-8]。然而，苦黄颗粒是否具有减轻胆汁淤积肝损伤的作用及其潜在机制尚不明确。

为揭示苦黄颗粒对胆汁淤积的治疗作用和分子机制，本研究综合了动物实验、网络药理学、生物信息学和分子生物学等系统药理学方法，初步探讨了苦黄颗粒治疗胆汁淤积的关键靶点和潜在通路，旨在为苦黄颗粒在抗胆汁淤积的临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 化学品与试剂

苦黄颗粒（批号：VC14009），购于雷允上药业集团有限公司；α-萘异硫氰酸酯（alpha-naphthyl isothiocyanate，ANIT，批号：140018），购于美国 Sigma 公司；联苯双酯滴丸（批号：H33021305），购于万邦德公司；碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AKP，批号：20230308）、丙氨酸转氨酶（alanine transaminase，ALT，批号：20230307）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST，批号：20230308）、直接胆红素（direct bilirubin，DBIL，批号：20230308）、总胆红素（total bilirubin，TBIL，批号：20230307）、总胆汁酸（total bile acid，TBA，批号：20230308）、超氧化物歧化酶（super oxide dismutase，SOD，批号：20230409）、丙二醛（malondialdehyde，MDA，批号：20230409）、谷胱甘肽-过氧化氢酶（glutathione peroxidase，GSH-Px，批号：202304092）均购于南京建成生物工程研究所。法尼醇 X 受体（farnesoid X receptor，FXR）抗体（批号：001013007）购于武汉 Proteintech 公司；小异二聚体伴侣（small heterodimer partner，SHP）抗体（批号：5500000677）购于 ABclonal 公司；胆固醇 7α-羟化酶（cholesterol 7α-hydroxylase，CYP7A1）抗体（批号：BB09278963）购于 Bioss 公司；胆盐输出泵（bile salt export pump，BSEP）抗体（批号：B07RC23）和多药耐药相关蛋白 2（multidrug resistance-associated protein 2，MRP2）抗体（批号：B4001）均购于 immunoway 公司。

1.2 实验动物造模及分组

雄性 C57BL/6J 小鼠（SPF 级，18～22 g，8 周），购自北京斯贝福生物技术有限公司[生产许可证号 SCXK（京）2019-0010]，所有实验动物均按照 SPF 级标准在动物房中进行标准饲养。实验设计、实验程序以及动物处死方法均获得了重庆大学附属三峡医院伦理委员会的审核和批准（批准编号：SXYYDW2023-007）。

适应性饲养 7 d 后，将小鼠随机分为 6 组，每组 8 只，分别为空白组（Blank 组）、模型组（Model 组）、苦黄颗粒低剂量组（KH-L 组，0.50 g/kg）、苦黄颗粒中剂量组（KH-M 组，1.00 g/kg）和苦黄颗粒高剂量组（KH-H 组，2.00 g/kg）、联苯双酯组（LBSZ 组，0.15 g/kg）。其中苦黄颗粒临床用量为 18 g/d，生物等效量为 2.34 g/kg，结合前期预实验，最终设置 KH-L、KH-M、KH-H 组为生物等效剂量 0.25∶0.50∶1.00 倍。参考文献造模[9]，各药物组小鼠灌胃对应药物，Blank 组与 Model 组

灌胃相应体积的生理盐水，每天 1 次，连续 7 d。在第 5 天，Blank 组灌胃橄榄油，其余各组均给予 60 mg/kg ANIT 橄榄油溶液进行模型制备。给药结束后，进行眼眶采血，收集血清。同时，将肝脏置于冰上称重，分别存放于 4% 多聚甲醛溶液中和-80 ℃冰箱待测。

1.3 *方法*

1.3.1 肝功能和胆汁酸水平检测 按照试剂盒的使用说明书，检测小鼠血清中 ALT、AST、AKP、DBIL、TBIL 和 TBA 的含量。

1.3.2 肝组织病理形态学分析 将固定好的肝脏组织进行石蜡包埋，石蜡切片脱蜡至水、染色、脱水封片等步骤，通过光学显微镜镜检观察各组肝组织的病理学变化。

1.3.3 肝组织氧化应激水平检测 按试剂盒的使用说明书，检测各组小鼠肝组织匀浆中 SOD、MDA 和 GSH-Px 的含量。

1.3.4 苦黄颗粒成分及靶点的筛选 通过 TCMSP 数据库（https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php）和文献检索苦黄颗粒中的五味中药，然后根据 TCMSP 数据库“口服吸收度（oral bioavailability，OB）≥ 30% 和类药性（drug-like properties，DL）≥ 0.18”的筛选规则收集苦黄颗粒活性成分及其相关靶点，并从 ETCM 数据库（http://www.tcmip.cn/ETCM/）收集上述药物的靶点进行补充。借助 UniProt 数据库（https://www.uniprot.org）将靶点蛋白进行均一化处理后，进行合并和去重。

1.3.5 肝内胆汁淤积靶点的收集 通过 GEO 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）获取 GSE79850 数据集，该数据集对 8 名健康志愿者和 9 名高危原发性胆汁性胆管炎（Primary biliary cholangitis，PBC）患者的肝脏进行了基因测序。使用 R 软件的 limma 软件包研究 mRNA 的差异表达，获取潜在疾病靶点。在 GeneCards（https://www.genecards.org）、OMIM（https://omim.org）和 DisGeNET（https://www.disgenet.org）数据库中，以“intrahepatic cholestasis”为检索词，进一步收集肝内胆汁淤积相关疾病靶点。最后，将上述数据库靶点进行合并去重。

1.3.6 苦黄颗粒治疗肝内胆汁淤积靶点的收集和 PPI 网络构建 苦黄颗粒活性成分和肝内胆汁淤积相互映射，做韦恩图，从而获得苦黄颗粒治疗肝内胆汁淤积的潜在靶点。将潜在靶点输入到 String 数据库（https://cn.string-db.org/）中，以获取蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interactions，PPI）的相关信息。接下来，采用 Cytoscape 软件构建可视化的 PPI 网络，计算各个节点的 Degree 值，获得 PPI 网络中关键靶点。

1.3.7 GO 和 KEGG 通路富集分析 将苦黄颗粒治疗肝内胆汁淤积的潜在靶点导入 Metascape 数据库中，进行 GO 和 KEGG 的富集分析。P<0.01 为参考阈值进行检索，借助微生信网站（http://www.bioinformatics.com.cn）对分析结果进行可视化处理。

1.3.8 Western blot 法检测 FXR 相关通路蛋白表达水平 根据文献提供的实验方法[10]，本研究采用 Western blot 技术检测 FXR、SHP、CYP7A1、BSEP 和 MRP2 蛋白的表达情况。简而言之，首先从肝组织中提取总蛋白，并在 100 ℃下进行蛋白灭活。随后进行电泳、转膜和封闭等步骤。接下来，将膜放入稀释后的 FXR、SHP、CYP7A1、BSEP 和 MRP2 等一抗（1∶1 000）中，在 4 ℃孵育过夜。随后，用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 10 min，并与相应的二抗（1∶5 000）在室温孵育 2 h。最后，通过化学发光的方式使蛋白条带可视化。

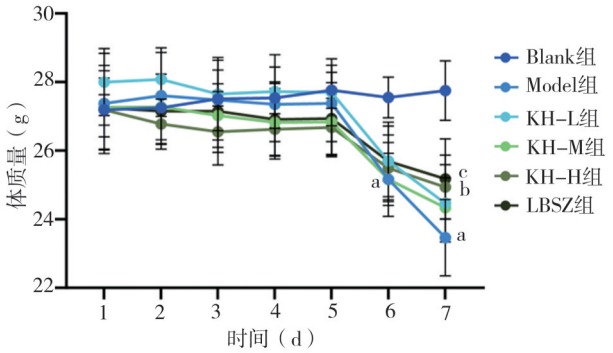
1.4 *统计学方法*

采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析，多组间比较选用单因素方差分析，所有结果均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 *苦黄颗粒对 ANIT 所致小鼠体重和肝体比的影响*

造模前，各组小鼠的精神状态、活动水平、饮食习性和尿液颜色等生理状况均未显示明显差异。如图 1 所示，给药结束后，Model 组小鼠体质量低于 Blank 组（P=0.000）。如表 1 所示，Model 组肝体比高于 Blank 组（P=0.000）；KH-H 组及 LBSZ 组小鼠的肝体比低于 Model 组（P=0.000，P=0.001）；KH-L、KH-M 组肝体比与 Model 组相比差异无统计学意义（P=0.408，P=0.063）。采用单因素方差进行统计学分析，差异有统计学意义（$F_{肝体比}$=13.358，$P_{肝体比}$=0.000）。



注：a，与 Blank 组比较，P<0.01；b，与 Model 组比较，P<0.05；c，与 Model 组比较，P<0.01

图 1 苦黄颗粒对体质量的影响（$\bar{x} \pm s$，n=8）

表 1 苦黄颗粒对肝体比的影响（$\bar{x} \pm s$，n=8）

组别	剂量（g/kg）	肝体比（%）
Blank 组	-	3.71 ± 0.19
Model 组	-	4.98 ± 0.45[a]
KH-L 组	0.50	4.71 ± 0.28
KH-M 组	1.00	4.54 ± 0.37
KH-H 组	2.00	4.16 ± 0.34[b]
LBSZ 组	0.15	4.28 ± 0.21[b]
F 值		13.358
P 值		0.000

注：a，与 Blank 组比较，P < 0.01；b，与 Model 组比较，P < 0.01

2.2 苦黄颗粒对ANIT所致小鼠血清肝功能指标的影响

为了评估苦黄颗粒对胆汁淤积性肝损伤的保护作用，本研究检测了与肝损伤和胆汁淤积相关的血清生化指标。如表2所示，Model组DBIL、TBA、TBIL、ALT、AST、AKP水平高于Blank组（均 P=0.000）；KH-L组DBIL、TBA、ALT、AST、AKP水平低于Model组（除 P_{DBIL}=0.015外，其余 P=0.000），而TBIL水平无明显差异（P=0.066）；KH-M、KH-H及LBSZ组DBIL、TBA、TBIL、ALT、AST、AKP水平低于Model组（P=0.000）。采用单因素方差进行统计学分析，差异有统计学意义（F_{DBIL}=351.412，P_{DBIL}=0.000；F_{TBA}=466.695，P_{TBA}=0.000；F_{TBIL}=362.094，P_{TBIL}=0.000；F_{ALT}=450.647，P_{ALT}=0.000；F_{AST}=334.411，P_{AST}=0.000；F_{AKP}=321.428，P_{AKP}=0.000），表明苦黄颗粒可改善模型小鼠的肝功能。此外，KH-H组和LBSZ组在TBIL（94.04 ± 6.19 vs. 97.60 ± 10.84）、DBIL（87.04 ± 7.58 vs. 90.84 ± 9.85）2组指标中比较，说明苦黄颗粒降低胆红素方面强于联苯双酯。

2.3 苦黄颗粒对ANIT所致小鼠肝脏组织病理学的影响

肝脏组织病理学显示，Blank组小鼠肝脏呈粉、绛红色，表面光滑，无明显胆汁淤积；肝脏组织结构正常，肝细胞核大而圆，核膜明显。而ANIT处理组小鼠肝脏肿大，色泽黄变，颜色加深、胆汁淤积明显；肝组织可见明显炎症浸润、小叶间管破坏、肝坏死。KH-L、KH-M、KH-H组和LBSZ组小鼠肝脏胆汁淤积明显改善；炎症细胞浸润、破坏性小叶间导管和坏死明显减少。上述结果表明，苦黄颗粒可明显减轻ANIT引起的胆汁淤积性肝损伤（图2）。

2.4 苦黄颗粒对肝组织氧化应激水平的影响

有毒胆汁酸的积累会导致氧化应激，进而引起肝损伤，谷胱甘肽（GSH）可以通过消除活性氧来缓解这种损伤。如表3所示，Model组肝组织匀浆中SOD和GSH-Px水平低于Blank组（均 P=0.000），而MDA水平高于Blank组（P=0.000）；KH-M组MDA水平低于Model组（P=0.000），而GSH-Px水平高于Model组（P=0.000），SOD水平差异无统计学意义（P=0.769）；KH-H组和LBSZ组SOD和GSH-Px水平高于Model组（P=0.000），MDA水平低于Model组（P=0.000），采用单因素方差进行统计学分析，差异有统计学意义（F_{SOD}=72.263，P_{SOD}=0.000；F_{GSH-Px}=143.519，P_{GSH-Px}=0.000；F_{MDA}=321.422，P_{MDA}=0.000），表明苦黄颗粒可改善模型小鼠氧化应激水平。

2.5 苦黄颗粒活性成分和靶点

根据TCMSP数据库筛选规则收集苦黄颗粒的活性成分及其相关靶点，并剔除相关无靶点成分。结合文献和ETCM数据库收集靶点，经合并去重后，共获得626个潜在靶点，见表4。

2.6 肝内胆汁淤积疾病靶点的筛选

通过R语言分析发现GSE79850数据集中共有763个差异基因，以 P<0.05和|logFC|≥2为筛选条件，绘制火山图和热图，共获得392个差异基因，其中308个基因上调，84个基因下调，见图3。然后将Genecards、OMIM、Disgenet和GEO数据库获得的靶点合并、删除重复项后共获得512个治疗肝内胆汁淤积的潜在靶点。

表2 苦黄颗粒对血清生化指标含量的影响（$\bar{x} \pm s$，n=8）

组别	剂量（g/kg）	AST（U/L）	ALT（U/L）	AKP（U/L）	TBA（μmol/L）	TBIL（μmol/L）	DBIL（μmol/L）
Blank组	–	83.83 ± 8.60	28.30 ± 6.39	116.27 ± 15.58	4.70 ± 2.11	0.94 ± 0.27	0.77 ± 0.28
Model组	–	414.44 ± 16.66[a]	489.94 ± 13.44[a]	695.88 ± 35.27[a]	370.75 ± 19.45[a]	146.39 ± 7.74[a]	143.58 ± 7.24[a]
KH-L组	0.50	339.85 ± 21.77[c]	403.00 ± 25.88[c]	663.23 ± 20.89[c]	305.98 ± 24.61[c]	138.45 ± 8.28	132.45 ± 8.63[b]
KH-M组	1.00	239.71 ± 27.56[c]	337.57 ± 19.18[c]	592.37 ± 38.96[c]	200.90 ± 17.40[c]	122.65 ± 9.41[c]	115.15 ± 9.19[c]
KH-H组	2.00	205.17 ± 13.13[c]	292.92 ± 33.09[c]	584.78 ± 56.57[c]	178.54 ± 14.68[c]	94.04 ± 6.19[c]	87.04 ± 7.58[c]
LBSZ组	0.15	197.32 ± 17.92[c]	280.87 ± 19.27[c]	523.22 ± 28.63[c]	180.29 ± 16.54[c]	97.60 ± 10.84[c]	90.84 ± 9.85[c]
F值		334.411	450.647	321.428	466.695	362.094	351.412
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，与Blank组比较，P<0.01；b，与Model组比较，P<0.05；c，与Model组比较，P<0.01

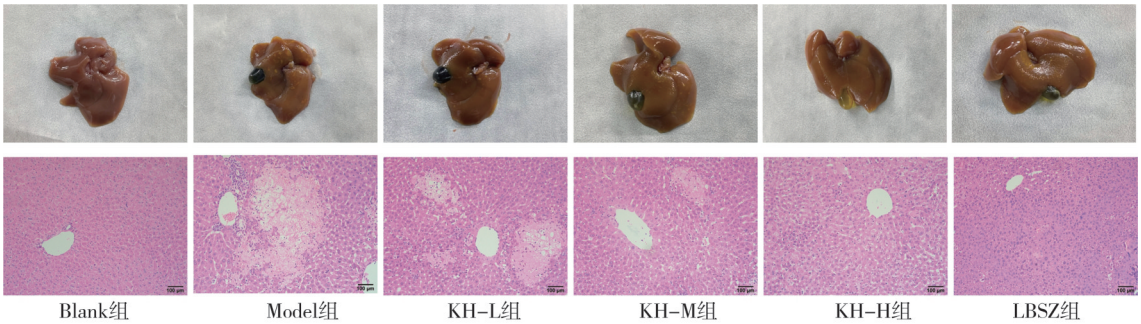


图2 苦黄颗粒对肝脏组织病理学的影响（HE，200×）

表3 苦黄颗粒对肝组织氧化应激水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	剂量（g/kg）	SOD（U/mg）	MDA（μmol/g）	GSH-Px（mg/g）
Blank组	-	342.88 ± 27.74	2.57 ± 0.22	100.68 ± 10.45
Model组	-	185.21 ± 18.80[a]	7.45 ± 0.43[a]	41.16 ± 5.28[a]
KH-L组	0.50	191.35 ± 19.37	7.12 ± 0.35	42.83 ± 3.64
KH-M组	1.00	196.00 ± 15.69	6.76 ± 0.23[b]	55.09 ± 5.65[b]
KH-H组	2.00	232.13 ± 21.44[b]	6.69 ± 0.18[b]	59.57 ± 3.28[b]
LBSZ组	0.15	288.71 ± 21.39[b]	4.64 ± 0.28[b]	76.70 ± 5.26[b]
F值		73.263	321.422	143.519
P值		0.000	0.000	0.000

注：a，与Blank组比较，$P<0.01$；b，与Model组比较，$P<0.01$

表4 苦黄颗粒“中药-化合物-活性成分-潜在靶点”信息表

中药名	化合物	活性成分	潜在靶点
茵陈	53	13	314
柴胡	350	13	352
大青叶	45	10	371
大黄	92	10	181
苦参	131	24	231

2.7 苦黄颗粒治疗肝内胆汁淤积潜在靶点的筛选与PPI网络构建

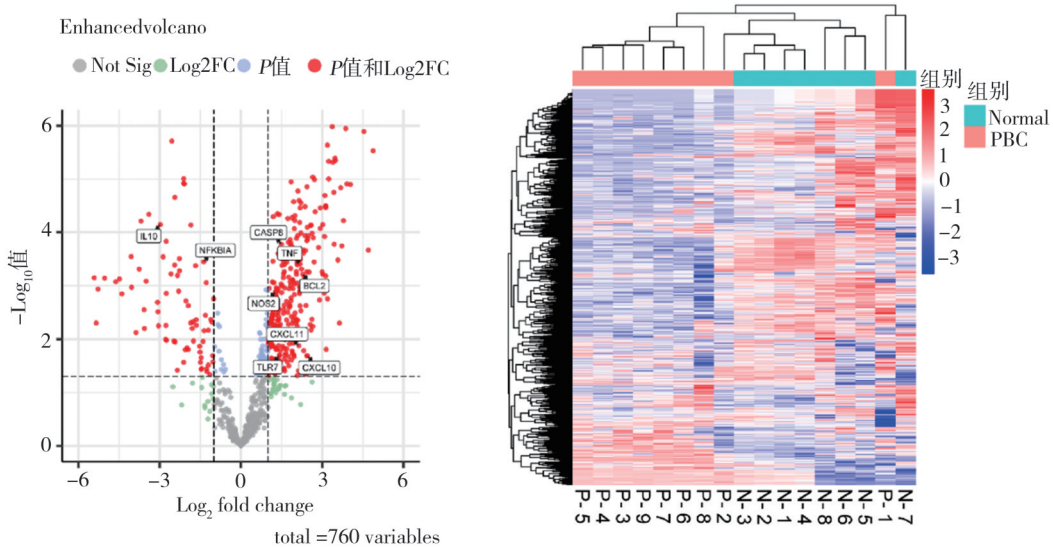
如图4所示，苦黄颗粒的活性成分与肝内胆汁淤积共有55个交集靶点，构建上述交集靶点的PPI图，节点的大小和颜色反映Degree值的大小。根据Degree值的排序，TNF、NFKB1、NR1H4（FXR）和ABCC2（MRP2）等可能是苦黄颗粒改善肝内胆汁淤积的关键靶点，表明苦黄颗粒可能通过调控其胆汁酸代谢，减轻肝内胆汁淤积患者的炎症，来减轻肝脏损伤。

2.8 苦黄颗粒治疗肝内胆汁淤积潜在靶点的富集分析

使用Metascape对上述55个潜在治疗靶点进行GO和KEGG通路分析。图5A的GO富集分析表明苦黄颗粒治疗胆汁淤积主要与细胞对脂质的反应、炎症反应和炎症反应的调节等生物进程；与细胞膜、受体复合物和顶端质膜等细胞成分；与核受体活性、细胞因子受体结合和类固醇结合等分子功能有关。根据P值大小对KEGG富集通路进行分析，苦黄颗粒可能通过调控肿瘤坏死因子信号通路和胆汁分泌等信号通路改善胆汁淤积，主要涉及炎症反应、胆汁酸分泌等相关生物进程，见图5B。

2.9 苦黄颗粒对FXR通路相关蛋白的影响

为了验证网络药理学预测的准确性，本研究使用Western blot来检测苦黄颗粒对FXR通路相关蛋白的影响。如图6和表5所示，Model组小鼠的肝组织中FXR、SHP、BSEP和MRP2的蛋白表达水平低于Blank组（P=0.000、P=0.003、P=0.001、P=0.005），CYP7A1蛋白表达水平高于Blank组（P=0.010）；KH-M组FXR、SHP、BSEP和MRP2蛋白表达水平高于Model组（P=0.021、P=0.034、P=0.021、P=0.333、P=0.013），CYP7A1蛋白表达水平低于Model组（P=0.037）；KH-H组FXR、SHP、BSEP和MRP2蛋白表达水平高于Model组（P=0.006、P=0.007、P=0.000、P=0.000），CYP7A1



A. 差异基因的火山图　　B. 差异基因的聚类热图

图3 肝内胆汁淤积相关芯片的差异基因表达图

蛋白表达水平低于 Model 组（P=0.009）；LBSZ 组 FXR、SHP、BSEP 和 MRP2 蛋白表达水平高于 Model 组（P=0.005、P=0.016、0.008、P=0.001），CYP7A1 蛋白表达水平低于 Model 组（P=0.012）。采用单因素方差进行统计学分析，差异均具有统计学意义（F_{FXR}=9.899；P_{FXR}=0.000；F_{SHP}=6.293，P_{SHP}=0.000；F_{BSEP}=8.312，P_{BSEP}=0.000；F_{MRP2}=9.115，P_{MRP2}=0.000；F_{CYP7A1}=4.936，P_{CYP7A1}=0.000），上述结果表明，苦黄颗粒通过加速胆汁酸的排泄和转运、维持胆汁酸稳态来保护肝细胞。

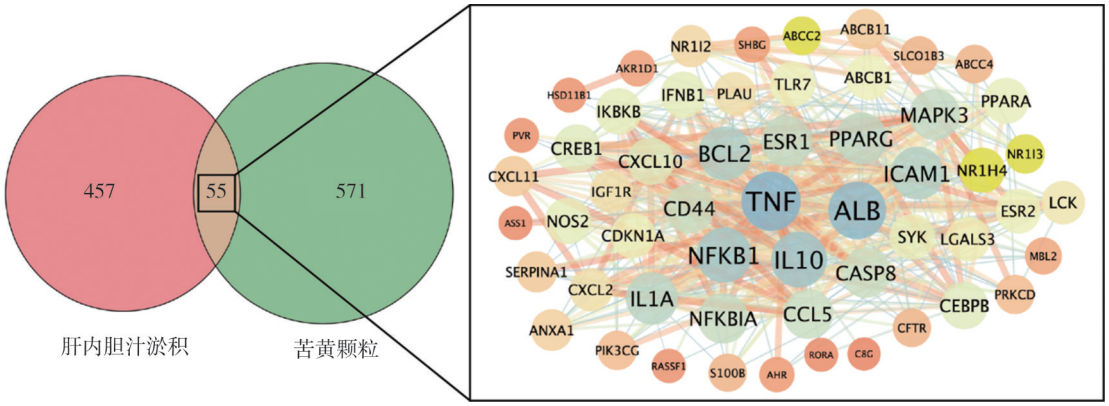
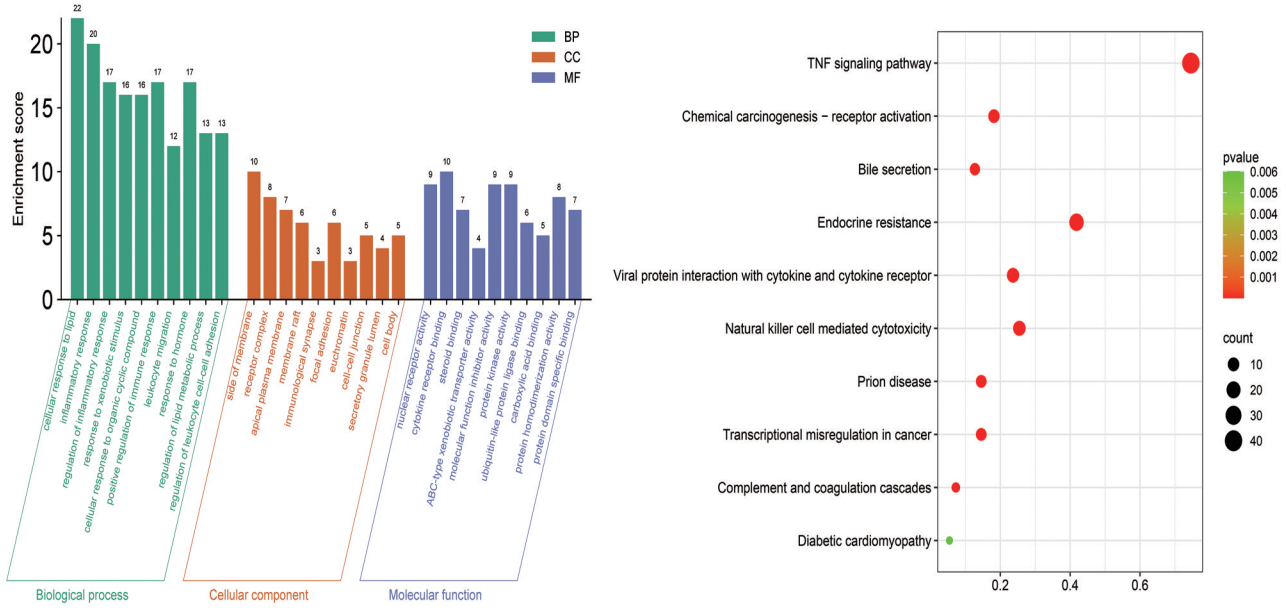


图4　苦黄颗粒治疗肝内胆汁淤积潜在靶点的 PPI 网络



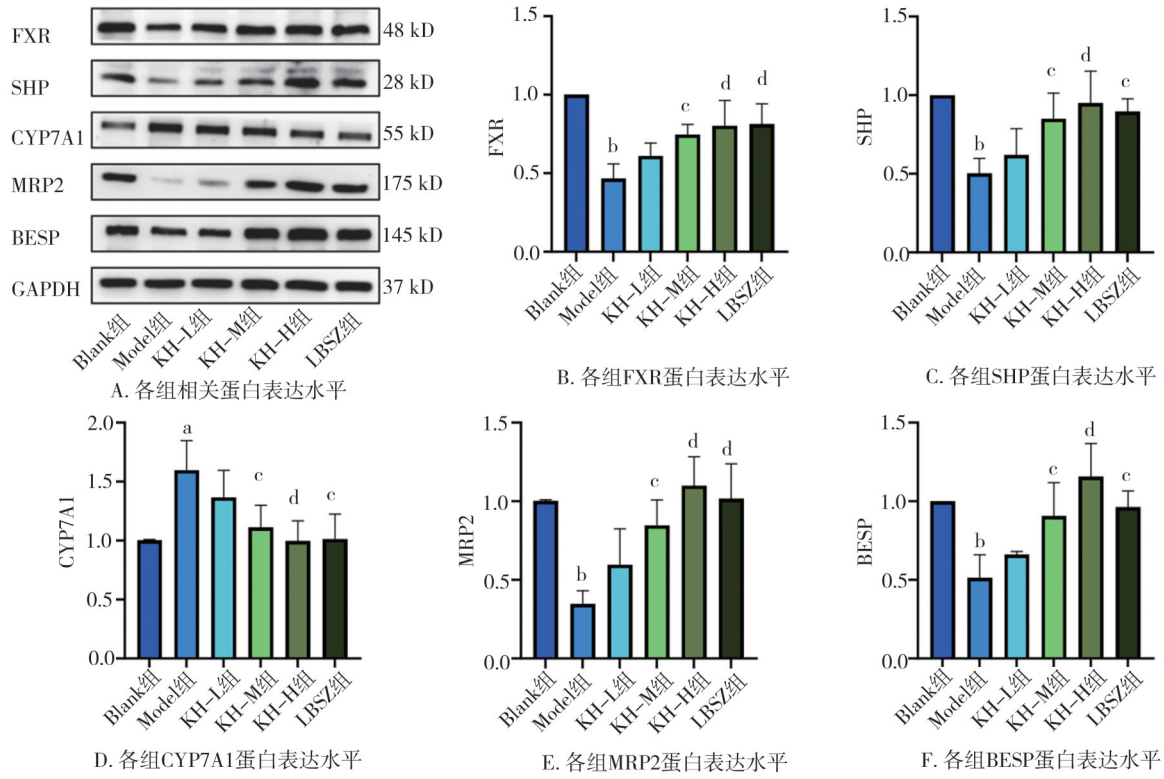
A. GO的富集分析　　B. KEGG的富集分析

图5　苦黄颗粒治疗肝内胆汁淤积潜在靶点 GO 和 KEGG 的富集分析

表5　苦黄颗粒对 FXR 通路相关蛋白的影响（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	剂量（g/kg）	FXR	SHP	CYP7A1	MRP2	BESP
Blank 组	–	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Model 组	–	0.47 ± 0.09[b]	0.50 ± 0.10[b]	1.60 ± 0.25[a]	0.35 ± 0.08[b]	0.51 ± 0.15[b]
KH-L 组	0.50	0.61 ± 0.08	0.62 ± 0.17	1.37 ± 0.23	0.60 ± 0.23	0.66 ± 0.02
KH-M 组	1.00	0.75 ± 0.06[c]	0.85 ± 0.16[c]	1.11 ± 0.19[c]	0.85 ± 0.16[c]	0.91 ± 0.21[c]
KH-H 组	2.00	0.80 ± 0.16[d]	0.95 ± 0.20[d]	1.00 ± 0.17[d]	1.10 ± 0.18[d]	1.16 ± 0.21[d]
LBSZ 组	0.15	0.81 ± 0.13[d]	0.90 ± 0.08[c]	1.01 ± 0.21[c]	1.01 ± 0.22[d]	0.96 ± 0.10[c]
F 值		9.899	6.293	4.936	9.115	8.312
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，与 Blank 组比较，P < 0.05；b，与 Blank 组比较，P < 0.01；c，与 Model 组比较，P < 0.05；d，与 Model 组比较，P < 0.01



注：a，与 Blank 组比较，$P<0.05$；b，与 Blank 组比较，$P<0.01$；c，与 Model 组比较，$P<0.05$；d，与 Model 组比较，$P<0.01$

图6　苦黄颗粒对FXR通路相关蛋白的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3　讨　论

胆汁淤积与肝细胞损伤、进行性肝纤维化、肝硬化以及肝功能衰竭等密切相关。在胆汁淤积中可观察到胆汁酸分泌紊乱、氧化应激和炎症反应等多种反应[11-12]。因此，胆汁酸紊乱被认为是胆汁淤积性损伤发病机制中的决定性因素，而恢复胆汁酸稳态被认为是推荐的治疗策略。

ANIT是一种常用于啮齿动物的肝毒剂，可用于模拟人类肝内胆汁淤积，小鼠摄入ANIT后，会释放大量炎症因子，引起肝脏炎症损伤[13-14]。同时，肝脏内胆汁酸的积累促进细胞内过量ROS的产生，诱发肝脏氧化应激损伤。本研究显示，与空白组相比，模型组小鼠肝损伤和胆汁淤积的标志物显著升高，SOD、GSH-Px等氧化应激指标显著下降，与之前的报道一致[15]。重要的是，苦黄颗粒可降低肝损伤和胆汁淤积的血清标志物，并抑制肝脏SOD、GSH-Px等氧化应激水平的下降。组织病理学评估进一步表明苦黄颗粒可通过减少细胞坏死和炎症细胞浸润，对ANIT诱导的肝内胆汁淤积发挥保肝作用。

网络药理学通过构建基于生物活性化合物、靶点和生物功能的复杂相互作用网络，广泛应用于阐明中药配方的生物学机制[16-17]。根据网络药理学分析TNF、NFKB1、NR1H4（FXR）和ABCC2（MRP2）等可能是苦黄颗粒改善肝内胆汁淤积的关键靶点，大多数与肝脏疾病的进展有关。生物信息学分析炎症相关差异基因在PBC病人肝脏中显著上调，炎症反应会抑制多种参与维持胆汁酸相关转运体的表达和活性，表明抑制炎症反应是防治胆汁淤积的一条潜在途径。有研究表明FXR可以通过抑制相关受体从而抑制多种炎症因子的表达[18]。

为了进一步探索潜在机制，通过GO和KEGG富集分析上述潜在靶点。结合PPI网络分析，选择了FXR信号通路进行进一步研究，重要的是，FXR通路广泛参与TNF信号通路和胆汁分泌等信号通路[19-20]。这些结果表明FXR通路可能是苦黄颗粒抗胆汁淤积关键信号通路。为了更好地揭示苦黄颗粒抗胆汁淤积的潜在作用机制，本研究采用Western bolt对FXR通路相关蛋白进行了验证。结果显示，模型组FXR、SHP、BSEP和MRP2的表达量降低，而苦黄颗粒组这些蛋白的表达显著升高。上述结果

表明，苦黄颗粒通过调控FXR通路加速胆汁酸的排泄和转运、维持胆汁酸稳态来保护肝细胞。

然而，本文仍存在一些局限性：①网络药理学以中药中的化学成分为研究对象；然而，中药药效所涉及的化学物质不一定是单一成分，因为有效物质可能是一组药效成分。由于中药中物质的作用靶点和途径通常是已知的，因此新机制的发现存在局限性。未来，人工智能算法可以与网络药理学结合，以获得更全面、客观的信息。②本研究基于网络药理学的方法将FXR通路确立为苦黄颗粒治疗胆汁淤积的关键通路，因为FXR在黄疸型病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝病这些肝脏疾病的发生和进展中起着核心作用。然而苦黄颗粒是否是直接或间接的FXR激动剂有待进一步研究。

综上所述，本研究发现苦黄颗粒可能通过激活FXR通路缓解急性肝内胆汁淤积并预防胆汁淤积引起的肝损伤，从而为苦黄颗粒治疗胆汁淤积的临床应用提供了科学依据。

参 考 文 献

[1] Zhang RJ, Huang T, Zhang QY, 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.

[2] Zhang LJ, Pan Q, Zhang L, et al. Runt-related transcription factor-1 ameliorates bile acid-induced hepatic inflammation in cholestasis through JAK/STAT3 signaling[J]. Hepatology, 2023, 77(6): 1866-1881.

[3] Liu YS, Guo GY, Zheng LH, et al. Effectiveness of fenofibrate in treatment-naive patients with primary biliary cholangitis: a randomized clinical trial[J]. Am J Gastroenterol, 2023, 118(11): 1973-1979.

[4] Zeng J, Fan JG, Zhou HP. Bile acid-mediated signaling in cholestatic liver diseases[J]. Cell Biosci, 2023, 13(1): 77.

[5] 刘成海，孙明瑜，吕 靖. 苦黄颗粒治疗急慢性肝炎湿热内蕴证的专家共识意见[J]. 中西医结合肝病杂志，2022，32(9)：865-868.
Liu CH, Sun MY, Lv J. Expert consensus on kuhuang granule in treating damp-heat syndrome of acute and chronic hepatitis[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2022, 32(9): 865-868.

[6] 陆 伟，王雁冰，张占卿. 苦黄针剂序贯苦黄颗粒用于治疗急性药物性肝损伤的疗效[J]. 中国药物经济学，2022，17(11)：105-108.
Lu W, Wang YB, Zhang ZQ. Curative effect of kuhuang injection sequential kuhuang granules in the treatment of acute drug induced liver injury[J]. China J Pharm Econ, 2022, 17(11): 105-108.

[7] 陆云飞，陆 伟，王雅俊，等. 苦黄颗粒用于黄疸型病毒性肝炎的网状Meta分析及药物经济学评价[J]. 中国药物经济学，2022，17(8)：5-10.
Lu YF, Lu W, Wang YJ, et al. Net meta-analysis and pharmacoeconomic evaluation of kuhuang granules for jaundice viral hepatitis[J]. China J Pharm Econ, 2022, 17(8): 5-10.

[8] 杨金凤，薛静波，陶艳艳，等. 通过网络药理学和动物实验探讨苦黄颗粒治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制[J]. 中西医结合肝病杂志，2022，32(1)：58-62.
Yang JF, Xue JB, Tao YY, et al. Mechanism of Kuhuang Granules in treating non-alcoholic fatty liver disease based on network pharmacology and experimental validation[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2022, 32(1): 58-62.

[9] Poole LG, Fournier AK, Cline-Fedewa HM, et al. Von Willebrand factor exerts hepatoprotective effects in acute but not chronic cholestatic liver injury in mice[J]. Toxicology, 2021, 463: 152968.

[10] Zhang LZ, Shi JW, Shen Q, et al. *Astragalus* saponins protect against extrahepatic and intrahepatic cholestatic liver fibrosis models by activation of farnesoid X receptor[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt A): 116833.

[11] Chen J, Zhang SJ. The role of inflammation in cholestatic liver injury[J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 4527-4540.

[12] Xu ZQ, Tang W, Xie QL, et al. Dimethyl fumarate attenuates cholestatic liver injury by activating the NRF2 and FXR pathways and suppressing NLRP3/GSDMD signaling in mice[J]. Exp Cell Res, 2023, 432(2): 113781.

[13] Qin SS, Tian JZ, Zhao Y, et al. *Gardenia* extract protects against intrahepatic cholestasis by regulating bile acid enterohepatic circulation [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117083.

[14] Gao QY, Li GD, Zu Y, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates ANIT-induced cholestatic liver injury by inhibiting hepatic inflammation and oxidative stress via SIRT1 activation[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117089.

[15] Zou B, Zhang S, Zhao J, et al. Glycyrrhetinic acid attenuates endoplasmic reticulum stress-induced hepatocyte apoptosis via CHOP/DR5/Caspase 8 pathway in cholestasis[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 961: 176193.

[16] 支 阳，唐洁婷，茅益民. 药物性肝损伤的遗传易感性[J]. 中华肝脏病杂志，2023，31(6)：653-658.
Zhi Y, Tang JT, Mao YM. Genetic susceptibility to drug-induced liver injury[J]. Chin J Hepatol, 2023, 31(6): 653-658.

[17] Li L, Yang LL, Yang LQ, et al. Network pharmacology: a bright guiding light on the way to explore the personalized precise medication of traditional Chinese medicine[J]. Chin Med, 2023, 18(1): 146.

[18] 艾 国，颜耀东，黄正明. 基于调控法尼醇X受体的中药治疗肝内胆汁淤积的研究进展[J]. 中草药，2017，48(19): 4077-4088.
Ai G, Yan YD, Huang ZM. Research progress on traditional Chinese medicine treatment of intrahepatic cholestasis based on the regulation of farnesoid X receptor [J].Chin Tradit Herbal Drugs, 2017, 48(19): 4077-4088.

[19] Bertolini A, Fiorotto R, Strazzabosco M. Bile acids and their receptors: modulators and therapeutic targets in liver inflammation[J]. Semin Immunopathol, 2022, 44(4): 547-564.

[20] Molinaro A, Marschall HU. Bile acid metabolism and FXR-mediated effects in human cholestatic liver disorders[J]. Biochem Soc Trans, 2022, 50(1): 361-373.

（责任编辑：曾 玲）