

# 加味茵陈蒿汤对大鼠胆汁淤积性肝病的治疗作用

李婉华<sup>1</sup>, 张桂贤<sup>2</sup>, 聂卫<sup>2</sup>, 沈洪昇<sup>2</sup>, 刘大卫<sup>2</sup>, 赵秀梅<sup>2</sup>, 张一<sup>3</sup>, 李东华<sup>3</sup>, 刘洪斌<sup>2\*</sup>

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津市医药科学研究所, 天津 300020;  
3. 天津市南开医院, 天津 300100)

**[摘要]** **目的:** 探讨加味茵陈蒿汤对  $\alpha$ -异硫氰酸萘酯 (ANIT) 诱导胆汁淤积性肝病 (CSLD) 大鼠模型的治疗作用。**方法:** 将 56 只大鼠随机分为 7 组, 分别为空白组, 模型组, 复方甘草酸苷胶囊组 (22.5, 45 mg·kg<sup>-1</sup>), 加味茵陈蒿汤低、中、高剂量组 (4.1, 8.1, 16.2 g·kg<sup>-1</sup>)。以 ANIT (100 mg·kg<sup>-1</sup>) 灌胃 1 次, 制备胆汁淤积性肝损伤模型。复方甘草酸苷胶囊及加味茵陈蒿汤在造模第 2 天开始灌胃给药, 连续 4 d。第 5 天进行胆管插管手术测量大鼠胆汁流速, 取血清检测各组总胆红素 (TBIL), 直接胆红素 (DBIL), 间接胆红素 (IBIL), 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和总胆汁酸 (TBA) 等血清学指标。采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理变化。采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠肝组织中 G 蛋白偶联胆汁酸受体 (TGR5), 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3), 半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 蛋白表达情况。**结果:** 与空白组比较, 模型组胆汁流速显著降低 ( $P < 0.01$ ), 各血清学指标均显著增高 ( $P < 0.01$ ), 肝组织病变严重, 且肝组织中 TGR5, Caspase-1 蛋白表达显著增强 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 复方甘草酸苷胶囊组对于胆汁流速和血清学指标无显著影响, 加味茵陈蒿汤高剂量组胆汁流速增快 ( $P < 0.05$ ), 各血清学指标均降低 ( $P < 0.05$ ), 复方甘草酸苷胶囊组和加味茵陈蒿汤组大鼠肝组织病变均有不同程度地改善, 且肝组织中 TGR5, Caspase-1 蛋白表达均明显降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 加味茵陈蒿汤可有效治疗大鼠 CSLD, 其机制可能与胆汁酸分子及胆汁酸受体 TGR5 介导的炎症因子有关。

**[关键词]** 胆汁淤积性肝病; 加味茵陈蒿汤;  $\alpha$ -异硫氰酸萘酯; G 蛋白偶联胆汁酸受体; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3; 半胱氨酸蛋白酶-1

**[中图分类号]** R2-0; R289; R285.5; R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0029-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200436

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191106.1454.003.html>

**[网络出版时间]** 2019-11-06 16:50

## Therapeutic Effect of Modified Yinchenhao Tang on Cholestatic Liver Disease in Rats

LI Wan-hua<sup>1</sup>, ZHANG Gui-xian<sup>2</sup>, NIE Wei<sup>2</sup>, SHEN Hong-sheng<sup>2</sup>, LIU Da-wei<sup>2</sup>,

ZHAO Xiu-mei<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>3</sup>, LI Dong-hua<sup>3</sup>, LIU Hong-bin<sup>2\*</sup>

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

2. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China;

3. Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of modified Yinchenhao Tang on  $\alpha$ -isothiocyanate (ANIT) -induced cholestatic liver disease (CSLD). **Method:** Wistar rats were randomly divided into 7 groups: blank control group, model control group, compound Glycyrrhizin capsules group (22.5, 45 mg·kg<sup>-1</sup>), modified Yinchenhao Tang low, middle and high dose groups (4.1, 8.1, 16.2 g·kg<sup>-1</sup>). A model of cholestatic liver injury was prepared by intragastric administration of ANIT (100 mg·kg<sup>-1</sup>). Glycyrrhizin

**[收稿日期]** 20190829(011)

**[基金项目]** 天津医科大学“十三五”综合投资学科建设项目(11601502-XK0135);天津市卫生健康委、天津市中医药管理局中医、中西医结合科研课题(2019106)

**[第一作者]** 李婉华, 在读硕士, 从事胆汁淤积性肝病药理学研究, Tel:022-58077666, E-mail:lw0609@hotmail.com

**[通信作者]** \*刘洪斌, 博士, 研究员, 从事中西医结合治疗肝胆胰疾病的药理学研究, Tel:022-58077666, E-mail:jtss@sina.com

capsules and modified Yinchenhao Tang were administered intragastrically on the second day of modeling for 4 consecutive days. And bile duct intubation was performed on the fifth day to measure the bile flow rate of the rats, and serum was taken to test the total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), indirect bilirubin (IBIL), alanine aminotransferase (ALT) and total bile acid (TBA) serological indicators of each group. Pathological changes of liver tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression levels of G protein-coupled bile acid receptor (TGR5), nucleotide binding oligomerization domain-like receptor 3 (NLRP3) and cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1) proteins in the liver tissues were detected by Western blot.

**Result:** Compared with the blank control group, bile flow rate in the model group decreased significantly ( $P < 0.01$ ). TBIL, DBIL, IBIL, ALT and TBA level in serum were significantly increased ( $P < 0.01$ ), liver tissue lesions were severe, and significantly increased the expression of liver tissue TGR5 and Caspase-1. Compare with model group, the compound Glycyrrhizin capsules group had no significant effect on bile flow rate and TBIL, DBIL, IBIL, ALT and TBA level in serum. Bile flow rate increased and TBIL, DBIL, IBIL, ALT and TBA level in serum decreased significantly in modified Yinchenhao Tang high dose group. The compound Glycyrrhizin capsules group and modified Yinchenhao Tang group have different extents of improvement the pathological changes of the lung tissues, and the protein expression of TGR5 and Caspase-1 were significantly decreased in the liver tissue ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Modified Yinchenhao Tang can effectively treat CSLD in rats, and its mechanism may be related to bile acid and bile acid receptor TGR5-mediated inflammatory factors.

[**Key words**] cholestatic liver disease; modified Yinchenhao Tang;  $\alpha$ -isothiocyanate; G protein-coupled bile acid receptor 1; nucleotide binding oligomerization domain-like receptor 3; cysteinyl aspartate specific proteinase-1

胆汁淤积是一种由多种原因引起的胆汁分泌和/或排泄障碍的临床症状,患者常表现为皮肤瘙痒,大便色浅,尿色加深,乏力及黄疸等,重者可演变为胆汁淤积性肝硬化和肝衰竭<sup>[1]</sup>。引起胆汁淤积的病因主要有病毒,药物,酒精,结石和肿瘤等,持续的胆汁淤积使胆汁流入十二指肠受阻,导致肝内胆汁淤积,肠道胆汁缺乏和血中胆汁成分增多,从而导致胆汁淤积性肝病(CSLD)以及相应的全身症状<sup>[2]</sup>。目前临床上尚无疗效确切且稳定的治疗药物<sup>[3]</sup>。在中医学中,CSLD属“黄疸”范畴<sup>[4]</sup>,中药治疗黄疸历史由来已久,尤其对于治疗顽固性黄疸有一定的优势<sup>[5-6]</sup>。加味茵陈蒿汤(活血清解灵)是由吴咸中院士研制已应用于临床数十年的经验方,现为天津市南开医院院内制剂,方由茵陈、丹参、大黄、白头翁、败酱草、炙甘草 6 味中药组成。本方由伤寒论中的经典方剂茵陈蒿汤加减而来,多用于以湿热证为主的胆道系统感染,方中重用茵陈,清利湿热,利胆退黄,去栀子弱其清热泻火之功,加丹参增强其活血凉血,祛瘀止痛之效,二者合用,共为君药。以大黄为臣,降瘀泻热,通利大便,以白头翁和败酱草为佐,清热解毒,消痈排脓,以甘草为使,取其益气和中,调和诸药之用,在诸多苦寒药中发挥其和脾胃,以防苦寒伤中之效<sup>[7]</sup>。

胆汁淤积伴随胆汁酸浓度增高,而胆汁酸的毒性作用会导致胆管和肝实质的损伤<sup>[8]</sup>。同时由于胆汁淤积时活性氧的释放,引起促炎因子的生成从而引起肝脏的炎性反应<sup>[9]</sup>。在过往研究中,已有文献探讨过 CSLD 相关炎症反应的机制,药物通过下调炎症因子从而治疗 CSLD<sup>[10]</sup>。而值得注意的是,近年来,有研究显示胆汁酸受体 G 蛋白偶联胆汁酸受体(TGR5)对炎症小体 NLRP3 的调控机制可视作疾病潜在的治疗靶点<sup>[11]</sup>。因此,本文从胆汁淤积与继发炎症反应的角度探讨胆汁酸受体 TGR5 对相关炎症因子活性的影响,进而探讨加味茵陈蒿汤对促进胆汁酸排泄的利胆作用及抗炎作用,亦为此方的临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 Wistar 雄性大鼠 56 只,体质量(220 ± 20) g,北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养环境 12 h 光照与黑暗交替循环,温度(22 ± 3) °C,相对湿度(50 ± 10)%,正常饲料喂养,自由进食饲料和水,实验前适应性喂养 1 周,本动物实验经天津市医药科学研究所动物伦理委员会批准进行(编号 IMPS-EAEP-Q-131TD-02)。

**1.2 药物与试剂** 加味茵陈蒿汤配方颗粒由茵陈、丹参、大黄、白头翁、败酱草、炙甘草组成(北京康仁

堂药业有限公司,批号分别为 18000671,18016391,18004941,18018071,18004621,18014211); $\alpha$ -异硫氰酸萘酯 (ANIT, 美国 Alfa Aesar 公司,批号 10205233);复方甘草酸苷胶囊 (瑞阳制药有限公司,批号 H20110056);苏木素染色液,伊红染色液 (北京雷根生物技术公司,批号分别为 DH0001, DH0044);核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3) 抗体,G 蛋白偶联胆汁酸受体 5 (TGR5) 抗体,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔二抗 (美国 Abcam 公司,批号分别为 GR3191281-14, GR3240620-3, GR3234362-4);半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 抗体 (美国 Novus 公司,批号 NB100-56565);甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠二抗 (美国 Proteintech 公司,批号分别为 10004185, 20000002);总胆红素 (TBIL),直接胆红素 (DBIL),间接胆红素 (IBIL),丙氨酸氨基转移酶 (ALT),总胆汁酸 (TBA) (中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为 190921, 190921, 190921, 190821, 190811)。

**1.3 仪器** TBA2000-FR 型全自动生化分析仪 (日本东芝公司);KHBST-36 型酶标仪 (上海科华公司);HH-2 型数显恒温水浴锅 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);Kubota3500 型冷冻离心机 (日本久保田公司);MiNi Proteom 3 Cell 型电泳仪及转膜仪,ChemiDocXRS 型化学发光分析仪 (美国 Bio-Rad 公司);EG1150H 型包埋机, RM2235/2245 型切片机,ASP300 型脱水机,DM400B 型荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模及给药** 将 56 只雄性 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为 7 组,分别为空白组,模型组,复方甘草酸苷胶囊低、高剂量 ( $22.5, 45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组,加味茵陈蒿汤低、中、高剂量 ( $4.1, 8.1, 16.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组。复方甘草酸苷胶囊作为治疗肝病常用药,过往动物实验中无一致的有效剂量,因此为保证药物治疗效果本文选用高、低 2 个剂量进行对照实验<sup>[12-14]</sup>。用生理盐水将复方甘草酸苷胶囊及加味茵陈蒿汤配方颗粒按体质量换算为临床等效剂量后溶解为相应浓度<sup>[15]</sup>,在造模第 2 天开始灌胃给药,连续 4 d。ANIT 用橄榄油溶解,以 ANIT ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 灌胃 1 次,灌胃体积为  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,血清中 TBIL, TBA 水平增高表明胆汁淤积性肝损伤模型成功<sup>[16]</sup>。

**2.2 标本采集及处理** 给药第 5 天,3% 戊巴比妥 ( $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 麻醉,大鼠取仰卧位固定,开腹,胆管插

管取胆汁,腹主动脉取血,离心取血清备用,取肝组织于中性甲醛中固定,另取部分肝组织冻存于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

**2.3 胆管插管手术法检测胆汁流速** 大鼠腹腔麻醉后取仰卧位固定开腹,经胆总管行胆管插管手术,留取胆汁 1 h,通过监测胆汁容积与时间,计算流速。

**2.4 全自动生化仪检测血清肝功能** 经腹主动脉取血,静置凝固后  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清检测 TBIL, DBIL, IBIL, ALT 和 TBA 的含量,进样量分别为 14.3, 14.3, 14.3, 25, 7  $\mu\text{L}$ ,酶标仪检测波长分别为 451, 451, 451, 340, 410 nm,实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。

**2.5 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理学变化** 肝组织于中性甲醛中固定 48 h 后取出,常规脱水,石蜡包埋,切片,  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  烤片 1 h,二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,苏木素染色,流水冲洗 15 min,伊红染色,流水冲洗多余染料,脱水透明,中性树脂封片,在显微镜下观察肝组织形态变化。

**2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肝组织中 NLRP3, Caspase-1 及 TGR5 蛋白表达** 取肝组织称质量,加入蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂,在冰上进行超声破碎,  $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 取上清,重复 2 次,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,用 loading buffer 配平蛋白提取液并在  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  金属浴中加热 15 min,每个孔蛋白上样量为 50  $\mu\text{g}$ ,蛋白用 SDA-PAGE 电泳分离,转膜,室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,各条带分别孵育一抗 NLRP3 (1:1 000), Caspase-1 (1:1 000), TGR5 (1:600) 及 GAPDH (1:5 000)  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜,洗膜,室温下分别孵育羊抗兔二抗 (1:8 000),羊抗鼠二抗 (1:1 000) 1.5 h,洗膜,加入 ECL 发光液于化学发光分析仪中曝光。以 GAPDH 为标准化参考物,用 Image J 软件测量各条带灰度值。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计处理,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用单因素方差分析进行统计检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对大鼠胆汁流速影响** 与空白组比较,模型组胆汁流速显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方甘草酸苷胶囊组与加味茵陈蒿汤低、中剂量组对于胆汁流速影响不明显,加味茵陈蒿汤高剂量组大鼠胆汁流速明显增高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.2 对大鼠 TBIL, IBIL, DBIL, ALT, TBA 影响** 与空白组比较,模型组大鼠血清学各项数值均显著

表 1 加味茵陈蒿汤对 CSLD 大鼠胆汁流速影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of modified Yinchenhao Tang on bile flow rate in CSLD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	胆汁流速/ $\mu L \cdot min^{-1}$
空白	-	19.24 ± 1.71
模型	-	5.17 ± 1.28 <sup>1)</sup>
复方甘草酸苷胶囊	0.023	7.77 ± 1.79
	0.045	5.15 ± 1.35
加味茵陈蒿汤	4.1	9.51 ± 1.58
	8.1	8.08 ± 1.37
	16.2	11.95 ± 2.15 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与加味茵陈蒿汤高剂量组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

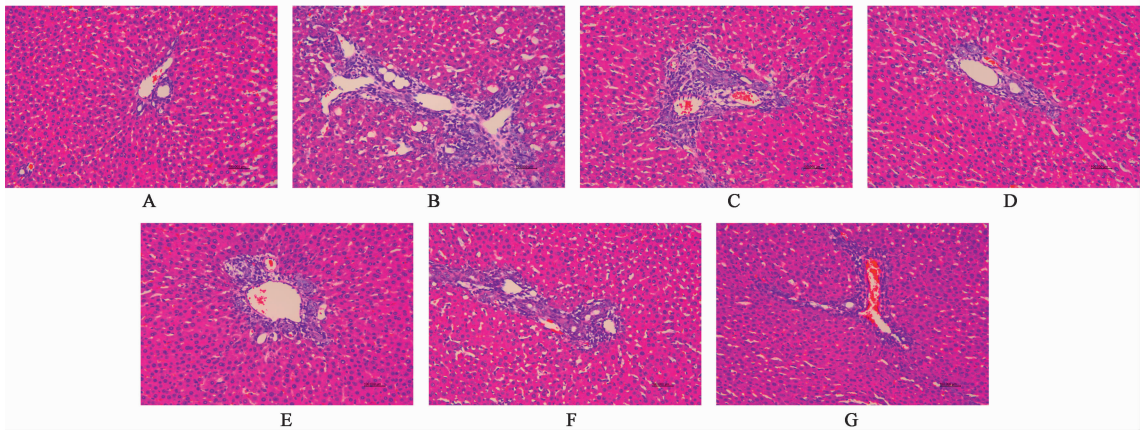
表 2 加味茵陈蒿汤对 CSLD 大鼠血清学影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of modified Yinchenhao Tang on serology of CSLD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	DBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	IBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	TBA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
空白	-	3.11 ± 0.41	0.67 ± 0.12	2.44 ± 0.35	60.84 ± 7.54	38.31 ± 9.38
模型	-	167.33 ± 13.10 <sup>1)</sup>	111.80 ± 8.45 <sup>1)</sup>	55.53 ± 4.69 <sup>1)</sup>	567.80 ± 60.97 <sup>1)</sup>	244.17 ± 13.79 <sup>1)</sup>
复方甘草酸苷胶囊	0.023	122.71 ± 13.53	83.48 ± 9.82	39.24 ± 3.90	458.11 ± 57.08	204.86 ± 17.44 <sup>4)</sup>
	0.045	147.95 ± 12.76	96.71 ± 7.51	51.24 ± 5.46	453.14 ± 62.35	219.86 ± 12.35 <sup>4)</sup>
加味茵陈蒿汤	4.1	109.26 ± 16.76	72.68 ± 11.26	36.59 ± 5.58	460.03 ± 40.90	225.16 ± 22.23 <sup>4)</sup>
	8.1	104.60 ± 17.41	70.95 ± 12.18	33.65 ± 5.33	388.65 ± 40.80 <sup>2)</sup>	174.30 ± 22.07 <sup>2)</sup>
	16.2	86.54 ± 15.00 <sup>2)</sup>	55.84 ± 10.79 <sup>2)</sup>	30.70 ± 4.30 <sup>2)</sup>	453.56 ± 52.08	131.70 ± 19.02 <sup>2)</sup>

增高 ( $P < 0.01$ ),与模型组比较,复方甘草酸苷胶囊组对于血清学指标无明显影响,加味茵陈蒿汤高剂量组各项血清学指标均明显降低 ( $P < 0.05$ ),与加味茵陈蒿汤高剂量组比较,TBA 明显低于复方甘草酸苷胶囊组及加味茵陈蒿汤低剂量组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.3 对大鼠肝组织病理学影响** 空白组肝组织结构完整,肝小叶结构清晰,肝细胞与胆管区均无显著异常,模型组胆管增生扩张明显,肝细胞颗粒变性,大量炎细胞浸润。复方甘草酸苷胶囊组和加味茵陈蒿汤组肝组织上述病变均有不同程度地改善,尤其加味茵陈蒿汤高剂量组胆管区增生明显减少,肝组织炎性病变更减轻,炎细胞减少。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 复方甘草酸苷胶囊低剂量组;D. 复方甘草酸苷胶囊高剂量组;E. 加味茵陈蒿汤低剂量组;F. 加味茵陈蒿汤中剂量组;G. 加味茵陈蒿汤高剂量组(图 2 同)

图 1 加味茵陈蒿汤对 CSLD 大鼠肝脏病理形态的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of modified Yinchenhao Tang on pathological morphology of liver in CSLD rats (HE, ×200)

**3.4 对大鼠肝组织 TGR5, NLRP3, Caspase-1 蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组 NLRP3 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ),TGR5 与 Caspase-1 表达显著增高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,加味茵陈蒿汤中、高剂量组

NLRP3 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ),复方甘草酸苷胶囊低、高剂量组及加味茵陈蒿汤中、高剂量组 Caspase-1 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ),加味茵陈蒿汤高剂量组 TGR5 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 2,表 3。

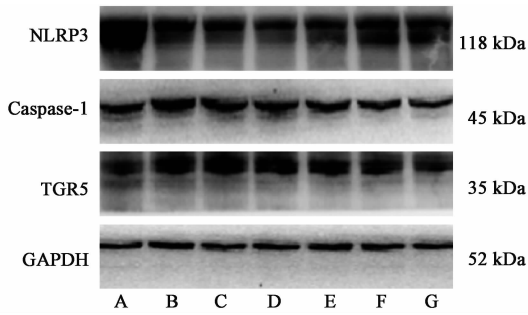


图 2 大鼠肝组织中 NLRP3, Caspase-1 及 TGR5 蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of NLRP3, Caspase-1 and TGR5 protein expression in liver tissue of rats

表 3 加味茵陈蒿汤对 CSLD 大鼠肝组织中 NLRP3, Caspase-1 及 TGR5 蛋白表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of modified Yinchenhao Tang on expression of NLRP3, Caspase-1 and TGR5 protein in liver tissue of CSLD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	NLRP3/GAPDH	Caspase-1/GAPDH	TGR5/GAPDH
模型	-	$0.64 \pm 0.04^{1)}$	$2.06 \pm 0.21^{1)}$	$2.85 \pm 0.40^{1)}$
复方甘草酸苷胶囊	0.023	$0.67 \pm 0.03$	$1.57 \pm 0.15^{2,5)}$	$2.21 \pm 0.46$
	0.045	$0.60 \pm 0.04$	$1.58 \pm 0.15^{2,5)}$	$2.24 \pm 0.43$
加味茵陈蒿汤	4.1	$0.83 \pm 0.09$	$1.72 \pm 0.12^{4)}$	$2.76 \pm 0.53^{5)}$
	8.1	$0.90 \pm 0.11^{2)}$	$1.67 \pm 0.24^{2,5)}$	$2.22 \pm 0.38$
	16.2	$0.94 \pm 0.11^{2)}$	$1.28 \pm 0.20^{2)}$	$1.70 \pm 0.30^{2)}$

注: 设空白组各蛋白含量均为 1。

生态失衡和肠道胆汁酸缺乏引起的细菌和内毒素 (LPS) 易位率的增加<sup>[23]</sup>, 故而本方中这两味药的配伍对于胆汁淤积引起的全身症状也起到了一定的治疗作用。

本文采用 ANIT 刺激肝脏以模拟肝内胆汁淤积的病理状态。ANIT 由肝细胞代谢, 其与谷胱甘肽 (GSH) 结合后, 通过多药耐药相关蛋白 2 (MRP2) 分泌到胆汁中, 对胆管细胞产生毒性作用。另一方面, 由于 ANIT-GSH 复合物在胆汁中不稳定, 游离的 ANIT 会经历吸收和代谢循环, 导致胆汁浓度逐渐升高, 从而对肝细胞产生毒性引起炎症反应<sup>[24]</sup>。这一模型与临床胆汁淤积的病理生理过程极为相近<sup>[25]</sup>。本实验中模型组 TBIL, ALT, TBA 水平显著增高, 肝脏病理结果显示胆管增生明显, 肝细胞炎性浸润, 说明模型成功模拟了肝内胆汁淤积的病理状态。

近年来研究发现, 胆汁酸在胆汁淤积性肝病中起到了关键作用<sup>[26]</sup>, 胆汁酸膜受体 TGR5 是由初级和次级胆汁酸激活的 G 蛋白偶联受体, 其在肝脏的不同非实质细胞中表达。在肝脏中, TGR5 调节微循环, 炎症, 再生, 胆汁分泌和增殖以及胆囊充盈。由于 TGR5 在单核细胞和巨噬细胞中的抗炎作用, 以及在胆汁酸肝肠循环中的重要作用, 可通过激活

#### 4 讨论

CSLD 病因复杂, 常见的 CSLD 包括原发性胆汁性胆管炎 (PBC), 原发性硬化性胆管炎 (PSC), 自身免疫性肝病和药物性胆汁淤积等, 其中以 PBC 与 PSC 最为常见。目前临床上尚无疗效确切且稳定的治疗药物<sup>[3]</sup>。加味茵陈蒿汤方由茵陈, 丹参, 大黄, 白头翁, 败酱草, 甘草 6 味组成, 茵陈中的绿原酸<sup>[17-19]</sup>, 滨蒿内酯<sup>[20]</sup>, 丹参中的丹参酮<sup>[21]</sup>, 甘草中的甘草酸, 甘草苷, 异甘草素<sup>[22]</sup> 等均为经实验验证的保肝利胆成分。白头翁和败酱草, 中医常用其配伍治疗肠痈, 而胆汁淤积症通常伴随着肠道微生物

TGR5 从而有效改善肝脏炎症<sup>[27]</sup>。炎性小体在机体的病理生理过程中起到重要的调控作用<sup>[28]</sup>。NLRP1, NLRP3, NLRC4 等 NLR 家族成员是炎症小体的重要组成部分, 炎性小体通过介导 Caspase-1 的激活促进炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌<sup>[29]</sup>。本实验模型组中, 肝脏 TGR5 和 Caspase-1 表达显著增高, 说明由于胆汁淤积时胆汁酸代谢障碍, 导致胆汁酸受体在肝脏中表达增高, 同时由于胆汁酸对肝细胞的毒性作用导致肝内炎性因子累积, 从而并发肝炎。已有研究发现胆汁酸分子及其膜受体 TGR5 可抑制 NLRP3 的表达。由此, 可以假设在依赖于 NLRP3 激活 Caspase-1 的炎症中, 通过激活胆汁酸和 TGR5 可有效抑制炎症因子的释放。而本实验结果表明, 在模型组中 TGR5 的高表达抑制了 NLRP3 的表达, 但并未影响 Caspase-1 的高表达, 说明在 CSLD 中, Caspase-1 的激活并不完全依赖于 NLRP3, 对于这一假设还需进一步的证实。并且模型组中 TGR5 的高表达并未对 CSLD 中的肝脏炎症起到积极的作用, 在经过加味茵陈蒿汤治疗后, 肝脏 TGR5 的表达与血中胆汁酸水平同时出现下降, 因此对于胆汁酸受体 TGR5 调节胆汁淤积的相关机制推测更侧重于促进体内胆汁酸的代谢, 对于 TGR5

调节胆汁淤积引起的炎症反应的具体机制仍有待进一步研究。

综上所述,加味茵陈蒿汤可通过改善血清学中各肝功能指标,抗炎,降低炎性小体的表达,促进胆汁酸排泄和下调胆汁酸受体蛋白的表达等方面有效治疗 CSLD,其作用机制之一可能是通过抑制胆汁酸受体 TGR5,进一步调节相关炎症因子,从而调节肝内胆汁酸代谢和炎性反应。

[参考文献]

[1] 于乐成,陈成伟.胆汁淤积性肝病的诊治现状及研究方向[J].临床肝胆病杂志,2019,35(2):241-246.

[2] 申弘,胡萌,魏泽辉,等.胆汁的生成、分泌、排泄及胆汁淤积发生机制[J].临床肝胆病杂志,2019,35(2):431-437.

[3] 郭濛濛,谢雯.胆汁淤积性肝病的治疗靶点及药物应用前景[J].临床肝胆病杂志,2019,35(2):262-265.

[4] 徐亚沙,吴芹,熊庭旺,等.清胰 II 号对小鼠胆汁淤积性肝损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(8):166-170.

[5] 蒋丽.顽固性黄疸的中西医结合治疗现状及展望[D].广州:广州中医药大学,2006.

[6] 杜宏波,王宪波.顽固性黄疸的中西医诊疗思路[J].中医杂志,2014,55(24):2087-2090.

[7] 吴咸中.中西医结合急腹症方药诠释[M].天津:天津科学技术出版社,2001:443-445.

[8] 顾天翊,陆根根.胆汁淤积性肝病“上升”病理生理学模式及用药合理性探讨[J].临床肝胆病杂志,2019,35(2):266-269.

[9] Sato K, Hall C, Glaser S, et al. Pathogenesis of kupffer cells in cholestatic liver injury[J]. Am J Pathol, 2016, 186(9):2238-2247.

[10] 曾惠芬,戴卫波,欧焕娇,等.素馨护肝方对 ANIT 诱导胆汁淤积型肝炎大鼠炎症损伤的保护作用研究[J].中药材,2019,42(2):426-429.

[11] GUO C, XIE S, CHI Z. Bile acids control inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome[J]. Science Foundation in China, 2016, 45(4):802-816.

[12] 邵明园,焦素月,杨强丽,等.肝龙胶囊联合复方甘草酸苷体外抗肝纤维化的作用[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(16):133-138.

[13] 乔兵,周振华,李曼.补肾方对 ConA 诱导的慢性肝损伤小鼠模型肝组织 Th1/Th2 作用的研究[J].中华中医药杂志,2017,32(2):841-844.

[14] 陈冬芸.复方甘草酸苷胶囊在预防抗结核药物引起的药物性肝功能损害中的作用[J].影像研究与医学应用,2017,1(3):171-172.

[15] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:202-203.

[16] Chisholm J W, Dolphin P J. Abnormal lipoproteins in the anit-treated rat; a transient and reversible animal model of intrahepatic cholestasis [J]. J Lipid Res, 1996, 37(5):1086-1098.

[17] ZHENG Z, SHENG Y, LU B, et al. The therapeutic detoxification of chlorogenic acid against acetaminophen-induced liver injury by ameliorating hepatic inflammation [J]. Chem Biol Interact, 2015, 238: 93-101.

[18] SHI H, SHI A, DONG L. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis *in vivo* and *in vitro* through inhibition of oxidative stress [J]. Clin Nutr, 2016, 35(6):1366-1373.

[19] WU D, BAO C, LI L. Chlorogenic acid protects against cholestatic liver injury in rats [J]. J Pharmacol Sci, 2015, 129(3):177-182.

[20] HUANG W, ZHANG J, Moore D D. A traditional herbal medicine enhances bilirubin clearance by activating the nuclear receptor CAR [J]. J Clin Invest, 2004, 113(1):137-143.

[21] ZHANG X, MA Z, LIANG Q. Tanshinone II A exerts protective effects in a LCA-induced cholestatic liver model associated with participation of pregnane X receptor [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 164: 357-367.

[22] LIANG B, GUO X L, JIN J, et al. Glycyrrhizic acid inhibits apoptosis and fibrosis in carbon-tetrachloride-induced rat liver injury [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(17):5271-5280.

[23] GONG Z, ZHOU J, ZHAO S. Chenodeoxycholic acid activates NLRP3 inflammasome and contributes to cholestatic liver fibrosis [J]. Oncotarget, 2016, 7(51):83951-83963.

[24] Mariotti V, Strazzabosco M, Fabris L, et al. Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(4 Pt B):1254-1261.

[25] 陈楚颖,代曼云,徐港铭,等.两种胆汁淤积模型肝毒性及胆汁酸代谢调控模式研究[J].中西医结合肝病杂志,2018,28(4):230-233,258.

[26] 贾昊宇,杨长青.胆汁酸的肝肠循环及肠道微生态在胆汁淤积性肝病发病和治疗中的作用[J].临床肝胆病杂志,2019,35(2):270-274.

[27] LI T, Holmstrom S R, Kir S. The G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, stimulates gallbladder filling [J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(6):1066-1071.

[28] 刘雯,郭文洁,徐强,等. NLRP3 炎症小体调控机制研究进展 [J]. 药学报, 2016, 51(10):1505-1512.

[29] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. Nat Immunol, 2009, 10(3):241-247.

[责任编辑 孙丛丛]