

胆淤方对胆汁淤积小鼠胆汁酸代谢的影响

郝娟^{1,2}, 黄恺³, 高国瑗¹, 杨涛³, 陶艳艳¹, 杨全军⁴, 吴坚², 刘成海^{1,3,5*}

1. 上海中医药大学附属曙光医院 肝病研究所, 上海 201203

2. 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院 内分泌代谢病科, 上海 200082

3. 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203

4. 上海市第六人民医院 药剂科, 上海 200233

5. 上海中医药大学 肝肾疾病病症教育部重点实验室, 上海 201203

摘要:目的 探讨胆淤方对1, 4-二氢-2, 4, 6-三甲基-3, 5-吡啶二甲酸二乙酯(DDC)诱导胆汁淤积小鼠血清胆汁酸代谢的影响。方法 40只雄性C57BL/6J小鼠随机分为4组:对照(N)组、DDC模型(M)组、奥贝胆酸(O)组、胆淤方(D)组,每组10只。N组小鼠用普通饲料喂养, M、O和D组小鼠用DDC饲料喂养, 连续6周。造模第3周开始药物干预, O组ig予奥贝胆酸溶液(0.03 g·kg⁻¹), D组ig予胆淤方药液(33 g·kg⁻¹), M组和N组予相同体积的双蒸水。干预4周, 收集小鼠血清和肝组织, 试剂盒检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)和总胆汁酸(TBA)水平, HE染色观察肝组织炎症反应, CK19染色观察胆管增生反应, 天狼猩红染色观察纤维化, 采用液质联用技术检测血清胆汁酸谱。结果 O组和D组ALT、AST、ALP、TBA、TBIL水平较M组显著下降($P<0.05$); D组ALT、AST水平较O组显著下降($P<0.05$)。D组小鼠肝组织炎症反应、纤维化及胆管增生较M组减轻。D组血清初级胆汁酸胆酸(CA)和 ω -鼠胆酸(ω -MCA)水平较M组显著下降($P<0.001$); D组血清次级胆汁酸甘氨酸胆酸(GCA)、牛磺胆酸(TCA)、牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)、牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)、牛磺去氧胆酸(TDCA)、牛磺猪去氧胆酸(THDCA)较M组显著下降($P<0.05$ 、0.01、0.001), O组的CA、 ω -MCA、TCDCA、GCA和TCA水平较M组显著下降($P<0.001$), D组血清TUDCA水平较O组下降更加显著($P<0.05$)。热图分析显示13种胆汁酸可将M与N组、O与M组、D与M组、D与O组血清胆汁酸谱两两区分。结论 胆淤方可改善肝内炎症反应, 具有广泛的降胆汁酸作用。

关键词:胆汁淤积; 胆淤方; 胆汁酸; 液质联用; 代谢组学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)08-1566-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.014

Effect of Danyu Recipe on bile acid metabolism in cholestasis mice

HAO Juan^{1,2}, HUANG Kai³, GAO Guoyuan¹, YANG Tao³, TAO Yanyan¹, YANG Quanjun⁴, WU Jian², LIU Chenghai^{1,3,5}

1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Department of Endocrine Metabolic Diseases, Shanghai Traditional Chinese Medicine Integrated Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China

3. Shanghai Key Laboratory of Clinical Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

4. Department of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

5. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Danyu Recipe on the serum bile acid metabolism in mice with cholestasis induced by DDC. **Methods** 40 male C57BL/6J mice were randomly divided into four groups, 10 normal group (N), 10 model group (M), 10 obeticholic acid group (O), and 10 Danyu Recipe group (D). The mice in group N were fed with normal feed. Mice in the M, O and

收稿日期: 2022-02-16

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81803874)

第一作者: 郝娟, 主治医师, 研究方向为中西医结合治疗慢性肝病。Tel: 15821803056 E-mail: haojuan11111@163.com

*通信作者: 刘成海, 博士生导师, 教授, 研究方向为中西医结合治疗慢性肝病。E-mail: chenghailiu@hotmail.com

D groups were fed with DDC feed. Modeling was continued for six weeks. Drug intervention was started in the 3rd week of modeling. The O group was orally administered with Obeticholic acid $0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and the D group was orally administered with Danyu decoction $33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The mice in group M and group N were given the same volume of double distilled water by gavage. Mice were treated after four weeks of intervention, and mouse serum and liver tissue were collected. The serum bile acid profile of four groups was detected by liquid chromatography-mass spectrometry. **Results** The levels of ALT, AST, ALP, TBA and TBIL in O group and D group were significantly lower than those in M group ($P < 0.05$). The levels of ALT and AST in group D were significantly lower than those in group O ($P < 0.05$). There was no significant difference in the levels of ALP, TBA and TBIL in group D and group O. The intrahepatic inflammatory reaction, fibrosis and hyperplasia of small bile ducts in group D were less than those in group M. Serum primary bile acid CA and ω -MCA levels in group D were significantly lower than those in group M ($P < 0.05$). The levels of serum secondary bile acids GCA, TCA, TUDCA, TCDCA, TDCA, and THDCA in group D were significantly lower than those in group M ($P < 0.05$). The levels of GCA and TCA in group O were significantly lower than those in group M ($P < 0.05$). However, the level of serum TUDCA in group D was more significantly lower than that in group O ($P < 0.05$). Heat map analysis showed that 13 kinds of bile acids could distinguish the serum bile acid profiles of M and N groups, O and M groups, D and M groups, and D and O groups. **Conclusion** Danyu Recipe can improve the inflammatory response in the liver and has a more extensive effect on lowering serum bile acid.

Key words: cholestasis; Danyu Recipe; bile acid; liquid chromatography-mass spectrometry; metabonomics

胆汁淤积是指各种原因引起胆汁形成、分泌和排泄出现障碍,胆汁流不能正常排入十二指肠而入血的一种病理状态^[1]。其病因主要包括原发性胆汁性胆管炎、病毒性肝炎、药物性肝病等^[2]。胆汁淤积性肝病临床表现无特异性,多表现为疲劳、乏力及瘙痒等。其血清学特征为碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和(或) γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyltranspeptidase, γ -GT)升高,严重者出现胆红素水平升高。目前临床上尚无疗效确切的治疗药物^[3]。熊去氧胆酸和S-腺苷蛋氨酸可选择使用,目的在于减轻临床症状和肝损伤^[4]。多项临床研究显示在熊去氧胆酸或S-腺苷蛋氨酸治疗基础上联合中医辨证论治,可显著提高生化应答率、改善临床不适症状和减轻药物不良反应^[5-9]。

中医学可根据胆汁淤积性肝病的临床表现辨证为“胆胀”“虚劳”“黄疸”等范畴。胆淤方是上海中医药大学肝病研究所刘成海教授临床用于治疗原发性胆汁性胆管炎的经验方。方中黄芪为君,益气固表,利水消肿;女贞子为臣,补肾滋阴,养肝明目;佐以党参、白术、茯苓益气健脾;墨旱莲补肝肾;当归、红花、鸡血藤补血活血;龙胆草清热燥湿利胆;炙甘草为使,益气补中、缓急止痛、调和药性。全方重在补脾胃之气、滋肝肾之阴,同时兼顾补血活血、燥湿利胆等功效。临床研究观察到胆淤方联合熊去氧胆酸治疗原发性胆汁性胆管炎(脾肾两虚证)患者,临床症状得以改善,血清 γ -GT水平下降幅度优于单纯熊去氧胆酸治疗^[10]。动物实验显示胆淤方具有减轻1,4-二氢-2,4,6-三甲基-3,5-吡啶二

甲酸二乙酯(3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine, DDC)诱导胆汁淤积小鼠胆管周围炎和减轻肝内胆汁淤积的作用^[11],但作用机制未明。

本研究检测胆淤方干预DDC诱导胆汁淤积小鼠的血清胆汁酸谱,为研究胆淤方改善肝内胆汁淤积的药理机制提供思路。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠40只,6周龄,体重25 g左右,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCKY(京)2019-0009,饲养于上海中医药大学实验动物中心,湿度50%~60%,温度25℃,自由饮水。动物实验经过伦理委员会批准并按照动物福利和伦理要求操作(批准号PZSHUTCM201225001)。

1.2 实验方剂及主要试剂

黄芪150 g、党参150 g、炒白术150 g、茯苓150 g、女贞子150 g、墨旱莲150 g、当归150 g、龙胆草150 g、红花150 g、鸡血藤150 g、炙甘草90 g,饮片购于上海中医药大学附属曙光医院中药房,并由中药房副主任药师庄俊嵘老师确认用量,由临床药师审方通过调剂。上述中药材混合均匀后,先浸泡16 h,然后加入8倍体积水,煎煮2 h,分取提取液;药渣再次加入6倍量水煎煮1 h,分取提取液;合并2次提取液,浓缩得到 $2.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胆淤方标准提取液,标准提取液经过高效液相色谱在紫外检测器256 nm检测,形成标准谱图库。

DDC 购于 Sigma-Aldrich 公司, CAS 632-93-9, Cat 137030; DDC 饲料制备: 将 DDC 与正常饲料按质量比 1:1 000 混匀, 由上海普路腾生物科技有限公司制作。奥贝胆酸购于 Medchem Express (Cat HY-12222, 美国); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、ALP、总胆红素 (TBIL) 和总胆汁酸 (TBA) 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所; CK19 抗体购于 Abcam 公司, 兔单克隆抗体 EP1580Y, Cat ab52625; 山羊抗兔多克隆抗体 IgG, 购于武汉博士德生物工程有限公司, Cat SA1022; 色谱级甲醇购于 Tedia 公司; 超纯水由 Millipore Direct-Q3 纯化系统制备; 色谱级醋酸铵和甲酸均购自中国医药集团上海化学试剂公司。

1.3 胆汁酸标准品

胆酸 (CA)、去氧胆酸 (DCA)、鹅去氧胆酸 (CDCA)、熊去氧胆酸 (UDCA)、猪去氧胆酸 (HDCA)、石胆酸 (LCA)、 α -鼠胆酸 (α -MCA)、 ω -鼠胆酸 (ω -MCA)、牛磺胆酸 (TCA)、牛磺去氧胆酸 (TDCA)、牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA)、牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA)、牛磺猪去氧胆酸 (THDCA)、牛磺石胆酸 (TLCA)、甘氨酸胆酸 (GCA)、甘氨酸去氧胆酸 (GDCA)、甘氨酸鹅去氧胆酸 (GCDCA)、甘氨酸熊去氧胆酸 (GUDCA)、甘氨酸石胆酸 (GLCA) 及甘氨酸猪去氧胆酸 (GHDCA) 20 种胆汁酸的标准品均购于 Sigma-Aldrich 公司。

1.4 主要仪器

超高效液相色谱串联四级杆轨道阱质谱 UHPLC-Q/Exactive (Thermo Scientific, 美国); 离心机 (Eppendorf centrifuge 5427 R, 美国); VDRTEX-5 旋涡振荡器 (QILINBEIER QL-866, 江苏)。

2 方法

2.1 实验动物分组、造模、给药

动物随机分为 4 组: 对照 (N) 组、DDC 模型 (M) 组、奥贝胆酸 (O) 组、胆淤方 (D) 组, 每组 10 只。造模简要步骤为: 动物适应性饲养 1 周后, 模型组和各给药组动物饲料换成 DDC 饲料^[11], 对照组给予正常饲料, 自由饮水, 共饲养 6 周。第 3 周开始, O 组在 DDC 造模基础上给予 0.03 g·kg⁻¹ 的奥贝胆酸, D 组在 DDC 造模基础上给予胆淤方标准提取液, 剂量参考人常用剂量的体表面积换算, 为 33 g·kg⁻¹, N 组和 M 组每只动物予等体积双蒸水处理, 均干预 4 周。

2.2 生化指标检测

干预 4 周后麻醉小鼠, 经腹腔静脉取血, 4 °C 冰箱静置 2 h, 以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血

清, -80 °C 保存以备生化检测。试剂盒法检测 ALT、AST、ALP、TBA、TBIL 水平。

2.3 肝组织病理检查

取血结束后, 脱颈椎处死小鼠, 摘取肝脏, 取最大叶肝组织 1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm, 10% 福尔马林固定, 梯度乙醇脱水, 包埋, 切片, 烤片, 脱蜡脱水, 进行组织病理染色, 包括 HE 染色、天狼猩红染色和免疫组织化学的 CK19 染色。每组取 5 个不同位置的样本用于组织病理分析。

2.4 代谢组学数据采集

2.4.1 血清样品制备 精密吸取 N 组、M 组、O 组和 D 组血清各 100 μ L, 分别加入乙腈-甲醇 (1:1) 混合溶液 400 μ L, 涡旋振荡 1 min, 4 °C、20 000×g 离心 15 min, 得到上清液 A; 取上清液 A 300 μ L 并氮气吹干 (35 °C), 残渣用 100 μ L 的初始流动相复溶, 涡旋振荡 1 min, 4 °C、20 000×g 离心 10 min, 吸取 70 μ L 上清液 B, 用于 UHPLC-Q/Exactive 胆汁酸相对浓度测定。

2.4.2 标准溶液的配制 分别精密称量各个胆汁酸标准品, 置于不同的量瓶里, 用甲醇溶解制成质量浓度为 2 mg·mL⁻¹ 的单标储备液。分别吸取各胆汁酸标准品储备液适量, 配制成质量浓度为 3 μ g·mL⁻¹ 的工作液。再用甲醇逐级稀释制成 3、1、0.3、0.1、0.03、0.01、0.003、0.001、0.000 3、0.000 1、0.000 03 μ g·mL⁻¹ 溶液, 用于标准曲线的绘制。所有标准溶液均在 4 °C 保存。

2.4.3 胆汁酸空白血清的制备 5 mL 大鼠血清与 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钾盐缓冲液 5 mL (pH=7.0), 加入 2.5 g 活性炭混合搅匀。1 000×g 离心 10 min, 收集上清液 3.5 mL, 使用 0.22 μ m 滤膜滤过, 收集滤液作为空白血清。加入适量的胆汁酸混合标准液于空白血清中, 用于校准标准和质量控制。

2.4.4 蛋白沉淀法处理样本 分别吸取胆汁酸空白血清 50 μ L 放入 9 个 1.5 mL 的 EP 管中, 分别加入 10 μ L 的内标 (熊去氧胆酸-D4 标准液), 涡旋 1 min, 每管加入已稀释好的胆汁酸标准溶液各 140 μ L, 涡旋 2 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上清液 160 μ L, 分别加入超纯水 40 μ L, 涡旋混匀后转移至液相小瓶中, 每个 200 μ L, 分析前 4 °C 保存。

2.4.5 分析条件 采用 UHPLC-Q/Exactive 进行分析, 具体条件包括: 色谱柱: Hypersil Gold Dim (100 mm×2.1 mm, 1.9 μ m, USA); 流动相: A 为甲醇, B 为 0.1% 甲酸水溶液; 体积流量 0.3 mL·min⁻¹; 柱温 45 °C; 梯度洗脱程序: 0~1 min (55% A), 1.0~2.6 min (55%~62% A), 2.6~11.4 min (62%~

80% A), 11.4~13.0 min (80%~95% A), 13.0~15.0 min (95%~55% A)。

质谱条件:Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪;离子模式:电喷雾正负离子模式;雾化温度 300 °C;离子传输管温度 320 °C;鞘气体积流量 35 arb;辅助气体流量 10 arb;扫描模式:Full MS-SIM/负离子扫描;质谱扫描范围 100~700 m/z ;质谱分辨率 35 000。

2.5 代谢组学数据处理

采用 Xcalibur 工作软件分析代谢物信息,并进行相对定量数据分析,导出代谢物相对定量数据后,采用 MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行代谢组学数据分析。

2.6 数据处理

采用 Graphpad Prism 7.0 软件中单因素方差分析进行比较。

3 结果

3.1 胆淤方对DDC诱导胆汁淤积小鼠体质量的影响

造模 2~6 周 M 组小鼠体质量较 N 组显著下降 ($P<0.05$),造模 6 周后 O 组小鼠体质量较 M 组显著增加 ($P<0.05$),而 D 组小鼠体质量与 M 组比较无显著上升。结果见表 1,结果表明胆淤方对 DDC 小鼠体质量有恢复趋势,但不显著。M 组、O 组和 D 组小鼠均有死亡,考虑可能与 DDC 诱导的急性肝损害有关。

3.2 胆淤方对DDC诱导胆汁淤积小鼠生化指标的影响

M 组 ALT、AST、ALP、TBA 和 TBIL 均较 N 组显著升高 ($P<0.05$);经过药物干预后,O 组和 D 组 ALT、AST、ALP、TBA、TBIL 水平均较 M 组显著下降 ($P<0.05$);D 组 ALT、AST 水平较 O 组显著下降 ($P<0.05$)。结果见表 2,结果表明胆淤方降低 ALT 和 AST 作用优于奥贝胆酸,降低 ALP、TBA 和 TBIL 作用与奥贝胆酸无统计学差异。

3.3 胆淤方对DDC诱导胆汁淤积小鼠肝组织病理的影响

HE 染色:N 组小鼠肝脏汇管区无炎症细胞浸润,M 组汇管区及肝实质内大量炎性细胞浸润,O 组和 D 组汇管区炎性细胞浸润均较 M 组减轻。天狼猩红染色:N 组小鼠肝脏汇管区仅有少量胶原纤维沉积,M 组汇管区及肝实质内大量胶原纤维沉积,O 组和 D 组汇管区胶原纤维沉积均较 M 组减少。CK19 染色:N 组小鼠肝脏汇管区有正常胆管,M 组汇管区及肝实质内大量细胆管增生,O 组和 D 组汇管区细胆管增生均较 M 组减轻。结果表明,胆淤方具有减轻肝内炎症反应、纤维化和细胆管增生作用。结果见图 1。

3.4 胆淤方对DDC诱导胆汁淤积小鼠血清初级胆汁酸水平的影响

M 组小鼠血清 CA、 ω -MCA、 α -MCA 水平较 N

表 1 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Changes in body weight of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n/只	体质量/g			
		造模前	造模 2 周	造模 4 周	造模 6 周
N	10	24.08±0.81	27.31±1.48	28.11±1.23	29.75±1.96
M	8	24.80±0.99	19.46±1.18 [#]	20.84±2.28 [#]	21.69±1.56 [#]
O	7	24.49±1.34	19.00±1.22 [#]	19.88±2.39 [#]	24.11±2.97 ^{#*}
D	7	23.54±1.10	18.92±1.17 [#]	20.51±1.78 [#]	22.43±2.25 [#]

与 N 组比较: [#] $P<0.05$; 与 M 组比较: ^{*} $P<0.05$

[#] $P<0.05$ vs N group; ^{*} $P<0.05$ vs M group

表 2 各组小鼠生化指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of biochemical indexes of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n/只	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(IU·L ⁻¹)	TBA/(μ mol·L ⁻¹)	TBIL/(μ mol·L ⁻¹)
N	10	16.75±5.54	27.86±7.51	14.71±1.64	6.07±2.62	1.88±1.25
M	8	258.09±47.35 [#]	123.86±28.73 [#]	60.59±2.97 [#]	131.31±55.40 [#]	6.58±2.54 [#]
O	7	109.81±31.68 [*]	46.73±11.68 [*]	37.05±10.07 [*]	10.62±3.12 [*]	2.41±0.65 [*]
D	7	64.91±14.16 ^{*△}	30.61±2.98 ^{*△}	46.26±9.81 [*]	20.28±5.82 [*]	2.59±0.43 [*]

与 N 组比较: [#] $P<0.05$; 与 M 组比较: ^{*} $P<0.05$; 与 O 组比较: [△] $P<0.05$

[#] $P<0.05$ vs N group; ^{*} $P<0.05$ vs M group; [△] $P<0.05$ vs O group

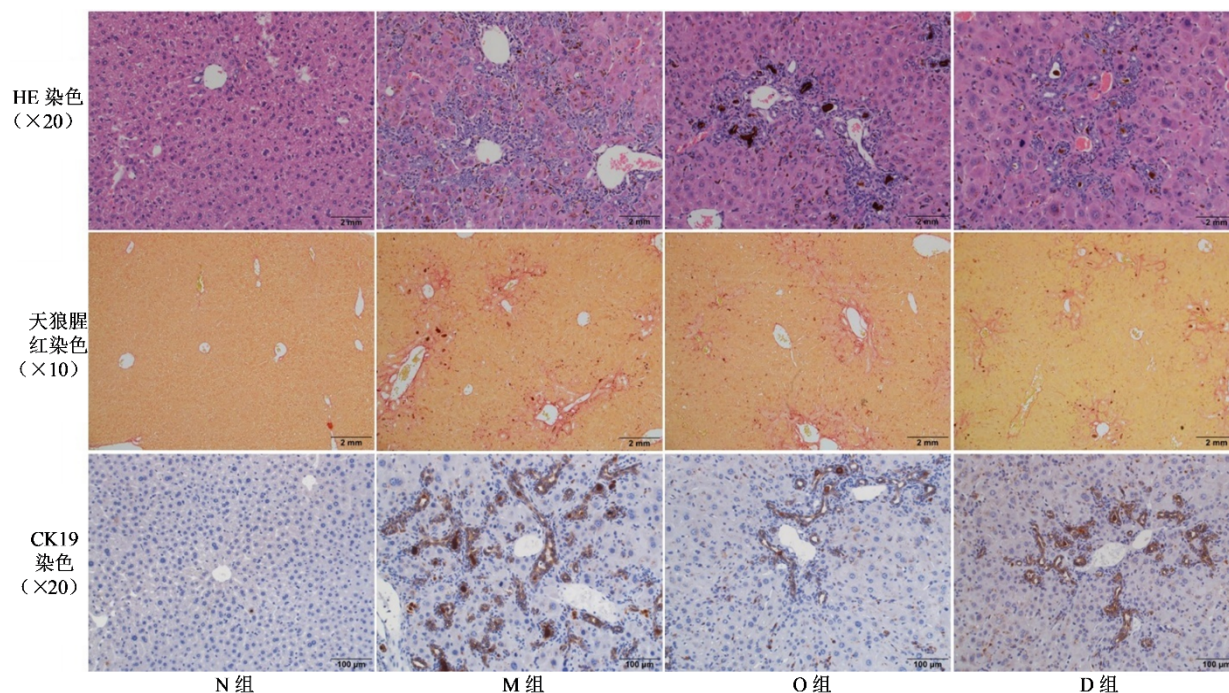


图1 胆淤方对DDC诱导胆汁淤积小鼠肝内炎症反应、纤维化及细胆管增生的影响

Fig. 1 Effect of Danyu Recipe on intrahepatic inflammatory response, fibrosis and bile duct hyperplasia in mice with DDC-induced cholestasis

组显著升高($P<0.05, 0.001$);经药物干预后,O和D组血清CA、 ω -MCA水平较M组显著下降($P<0.001$)。结果见图2。结果表明,胆淤方有降低血清初级胆汁酸的作用。

3.5 胆淤方对DDC诱导胆汁淤积小鼠血清次级胆汁酸水平的影响

M组TCDCA、GCA、TCA、TUDCA、THDCA水平较N组显著升高($P<0.05, 0.001$)。经药物干预后,O组TCDCA、GCA、TCA水平较M组显著下降($P<0.001$),D组GCA、TCA、TUDCA、TCDCA、TDCA、THDCA较M组显著下降($P<0.05, 0.01, 0.001$),D组TUDCA水平较O组下降更加显著($P<0.05$),其他胆汁酸与O组比较无统计学差异(图3)。结果表明胆淤方较奥贝胆酸具有更广泛降低血清次级胆汁酸的效果。

3.6 4组小鼠血清胆汁酸谱的差异区分

为了显示出总体差异,采用偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)分析4组样本的差异性,结果发现M组和N组明显分布于不同区域,提示M组具有显著不同于N组的代谢差异,O组和D组虽然与M组具有重叠,但也具有显著不同于M组的代谢特征(图4-A)。为了总体显示4组样本间胆汁酸关系,继续采用随机森林(图4-B),结果显示TUDCA等13种代谢物可显著区分各组,且M组与N组具有显著不同的胆汁酸分布差异。热图分析结果显示,图5-A显示N组与M组血清胆汁酸谱存在明显差异;图5-B显示O组与M组血清胆汁酸谱存在明显差异;图5-C显示D组与M组小鼠胆汁酸谱存在明显差异;图5-D显示D组与O组血清胆汁酸谱存在明显差异。

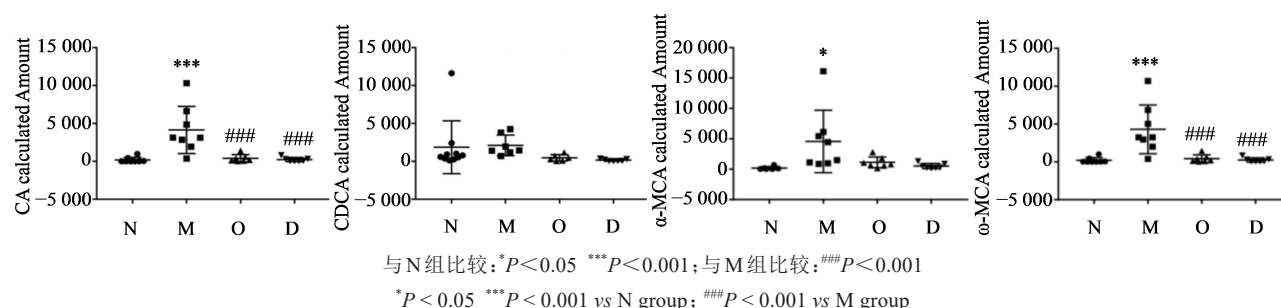
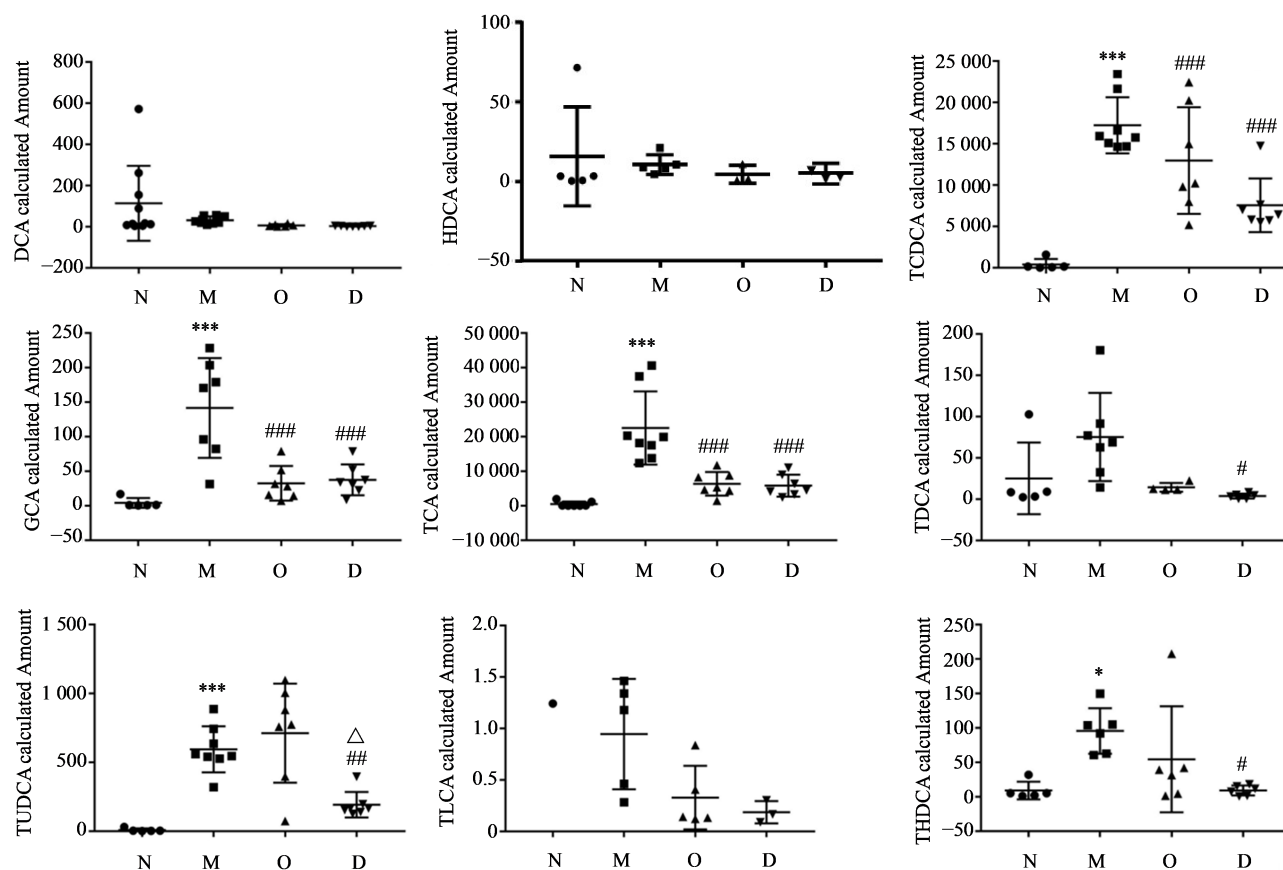


图2 胆淤方对DDC诱导胆汁淤积小鼠血清初级胆汁酸相对水平的影响

Fig. 2 Effect of Danyu Recipe on serum primary bile acid levels in mice with DDC-induced cholestasis.



与N组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与M组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与O组比较: Δ $P < 0.05$
 * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs N group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ ### $P < 0.05$ vs M group; Δ $P < 0.05$ vs O group

图3 胆淤方对DDC诱导胆汁淤积小鼠血清次级胆汁酸相对水平的影响

Fig. 3 Effects of Danyu Recipe on serum secondary bile acid levels in DDC-induced cholestasis mice

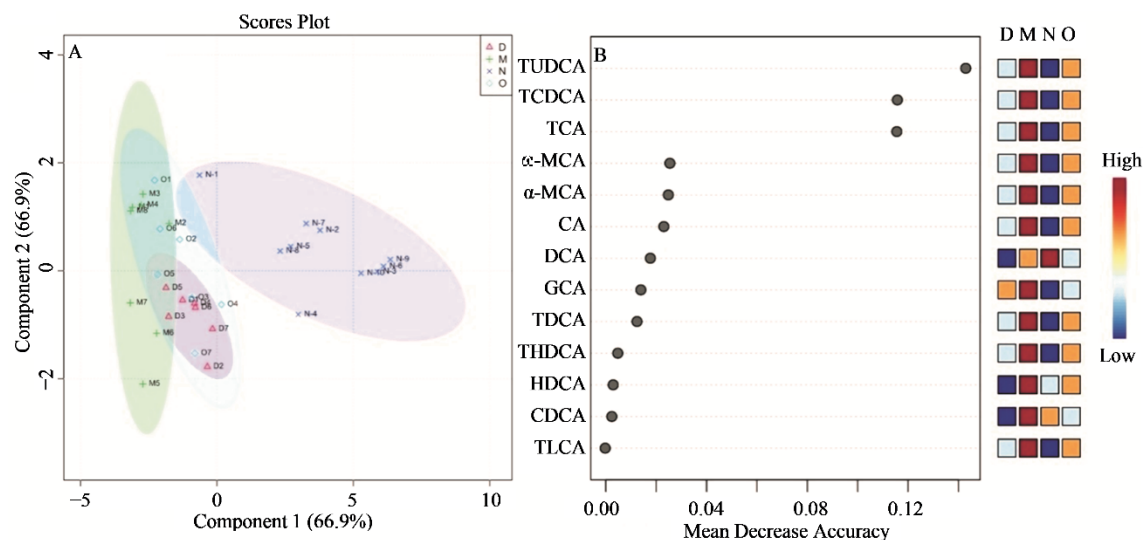


图4 基于PLS-DA的4组样本分析(A)以及基于随机森林的代谢物贡献分析和样本浓度比较(B)

Fig. 4 Analysis of four groups of samples based on PLS-DA (A) and metabolite contribution analysis and sample concentration comparison based on random forest (B)

4 讨论

胆汁淤积性肝病是临床常见且病因复杂的肝病,病情进展可发展为胆汁淤积性肝硬化。临床目

前尚无特效治疗药物。胆汁酸是胆汁的重要组分,是胆固醇的代谢终产物。胆汁酸的合成有2条途径,由肝细胞内质网中的胆固醇7-羟化酶启动经典

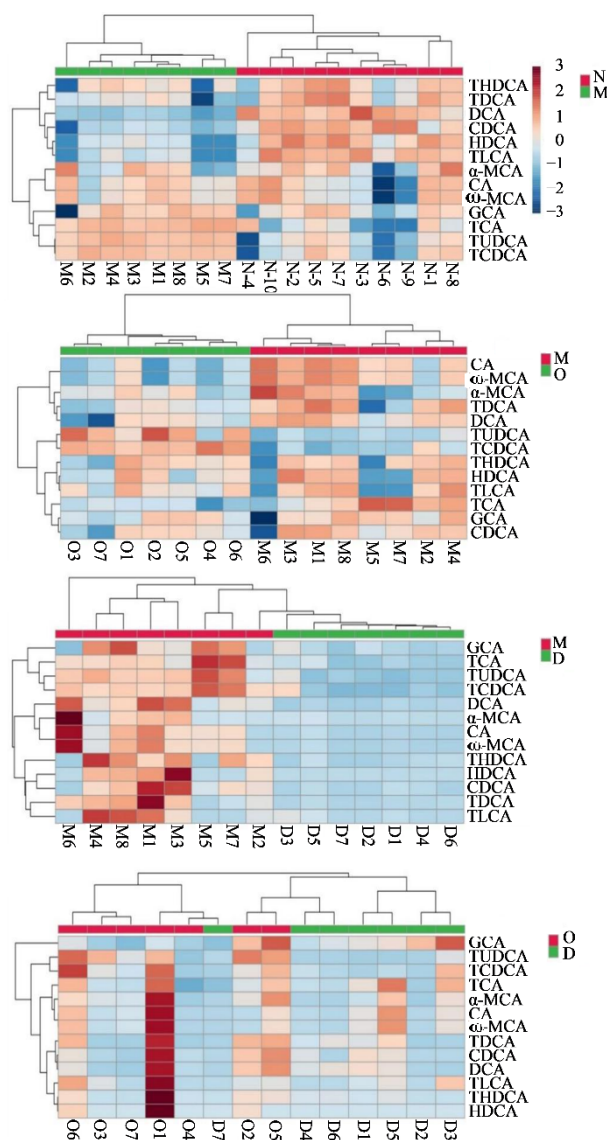


图5 13种胆汁酸可将4组进行两两区分
Fig. 5 Thirteen bile acids can be pairwise distinguished among four groups

途径合成胆酸,由巨噬细胞或其他组织线粒体中的甾醇27A羟化酶启动非经典途径合成鹅去氧胆酸。初级胆汁酸经胆囊排入肠道,在肠道菌群的作用下转化为次级胆汁酸,如DCA、熊去氧胆酸和LCA等。大部分胆汁酸在回肠末端被重吸收回肝脏,这一过程称为胆汁酸的肝肠循环。约有5%胆汁酸(以LCA为主)随粪便排出。胆汁酸具有促进脂类消化吸收、调控肠道菌群组成、维持机体能量代谢平衡和介导生物体内信号传导等作用。研究表明胆汁酸代谢紊乱可引起多种疾病,如肥胖、糖尿病、代谢相关性肝病、炎症肠病及心血管疾病等^[12-14]。

血清胆汁酸测定是临床常用的肝功能指标,其

水平变化与肝病严重程度密切相关。陈旭东等^[15]研究表明血清胆汁酸可在一定程度上反映肝硬化患者肝脏合成及胆红素代谢状况,尤其是在原发性胆汁性肝硬化中具有较高的诊断价值,可反映肝脏的合成、损伤及代谢等多项功能。另有研究显示GCA和TCA与肝脏脂肪变性、小叶和门脉炎症、肝细胞气球样变和肝纤维化严重程度呈正相关^[16]。本研究观察到经DDC造模后,小鼠血清初级胆汁酸CA、ω-MCA、α-MCA水平和次级胆汁酸TCDCA、GCA、TCA、TUDCA、THDCA水平均较N组显著升高;且M组与N组血清胆汁酸谱存在明显差异,13种胆汁酸可将2者很好区分开。可见,DDC诱导的胆汁淤积小鼠出现了显著的胆汁酸代谢紊乱。

肝内胆汁酸浓度升高会诱导肝细胞的凋亡和坏死。胆汁酸毒性对细胞的直接破坏包括质膜损伤、线粒体损伤、活性氧产生和诱导细胞凋亡等^[17-8]。因此,减轻肝内胆汁酸淤积成为治疗胆汁淤积性肝病的主要方法之一。本研究结果显示使用奥贝胆酸和胆淤方进行干预后,O组的CA、ω-MCA、TCDCA、GCA和TCA水平较M组显著下降,D组的CA、ω-MCA、GCA、TCA、TUDCA、TCDCA、THDCA和TDCA水平较M组显著下降;且O组和D组的血清胆汁酸谱存在明显差异,13种胆汁酸可将2者很好区分开。由此可见,胆淤方不仅有降低血清胆汁酸的作用,且降胆汁酸范围更广。

胆汁酸成分复杂,且具有多种生物学功能。胆汁淤积性肝病以肝内胆汁酸淤积为主要病理学特征,减轻肝内胆汁酸淤积,是有效的治疗方案之一。胆淤方是临床治疗原发性胆汁性胆管炎的经验方,有效但机制不明,本研究从胆汁酸代谢角度探讨其作用特征,结果表明胆淤方可改善肝内炎症反应,具有更广泛的降胆汁酸作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陆伦根. 胆汁淤积性肝病的正确认识与科学管理 [J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(5): 754-757.
Lu L G. Cholestatic liver diseases: What we know and how to deal with [J]. J Pract Hepatol, 2019, 22(5): 754-757.
- [2] 沈斐斐, 陆伦根. 胆汁淤积性肝病的病因 [J]. 实用肝病杂志, 2016, 19(6): 644-646.
Shen F F, Lu L G. Etiology of cholestatic liver diseases [J]. J Pract Hepatol, 2016, 19(6): 644-646.
- [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.
- Guo M M, Xie W. New therapeutic targets and drugs for cholestatic liver disease [J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(2): 262-265.
- [4] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 胆汁淤积性肝病诊断和治疗共识(2015) [J]. 肝脏, 2015, 20(12): 950-959.
- Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association, Chinese Society of Gastroenterology, Chinese Medical Association, Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. Consensus on the diagnosis and treatment of cholestasis liver diseases [J]. Chin Hepatol, 2015, 20(12): 950-959.
- [5] 蔡宇, 王孟春, 邱新平, 等. 复方甘草酸苷联合丁二磺酸腺苷蛋氨酸治疗酒精性肝炎伴胆汁淤积患者疗效研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2021, 24(1): 71-74.
- Cai Y, Wang M C, Qiu X P, et al. Improvement of liver function and subsiding jaundice by compound glycyrrhizin and adenosylmethionine succinate in the treatment of patients with alcoholic hepatitis [J]. J Pract Hepatol, 2021, 24(1): 71-74.
- [6] 陈红玲. 活血退黄汤加减治疗婴儿胆汁淤积性肝病临床研究[J]. 新中医, 2021, 53(12): 121-125.
- Chen H L. Clinical study on modified Huoxue Tuihuang Tang for infants with cholestatic liver disease [J]. J New Chin Med, 2021, 53(12): 121-125.
- [7] 王瑛, 袁鹤立, 马向明, 等. 苦黄注射液联合熊去氧胆酸对原发性胆汁性肝硬化患者肝功能、免疫因子及炎症介质水平的影响[J]. 中国药物经济学, 2021, 16(6): 31-34, 43.
- Wang Y, Yuan H L, Ma X M, et al. Effects of kuhuang injection combined with ursodeoxycholic acid on liver function, immune factors and inflammatory mediators in patients with primary biliary cholangitis [J]. China J Pharm Econ, 2021, 16(6): 31-34, 43.
- [8] 王怡群, 张玮, 叶敏超, 等. 中药复方联合熊去氧胆酸治疗原发性胆汁性胆管炎患者的临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2021, 31(5): 398-401.
- Wang Y Q, Zhang W, Ye M C, et al. Clinical efficacy of Chinese herbal compound combined with ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cholangitis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2021, 31(5): 398-401.
- [9] 马燕, 徐强, 宁忠慧, 等. 和血柔肝方联合熊去氧胆酸胶囊治疗原发性胆汁性胆管炎的临床疗效[J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16(7): 1300-1303.
- Ma Y, Xu Q, Ning Z H, et al. Clinical efficacy of Hexue Rougan Decoction combined with ursodeoxycholic acid capsule in the treatment of primary biliary cholangitis [J]. World J Integr Tradit West Med, 2021, 16(7): 1300-1303.
- [10] 潘凯, 雷阳, 赵强, 等. 熊去氧胆酸联合加味健脾补肾方治疗原发性胆汁性肝硬化的疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2016, 23(4): 441-442, 447.
- Pan K, Lei Y, Zhao Q, et al. Observation on the curative effect of ursodeoxycholic acid combined with Jiawei Jianpi Bushen Decoction in the treatment of primary biliary cirrhosis [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2016, 23(4): 441-442, 447.
- [11] 郝娟, 黄恺, 陶艳艳, 等. 胆淤方对胆汁淤积模型小鼠胆管周围炎与FXR1表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2020, 28(10): 776-781.
- Hao J, Huang K, Tao Y Y, et al. Effect of Danyu Decoction on peribiliary inflammation and FXR1 expression in cholestasis model mice [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2020, 28(10): 776-781.
- [12] Wahlström A, Sayin S I, Marschall H U, et al. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism [J]. Cell Metab, 2016, 24(1): 41-50.
- [13] Gadaleta R M, van Erpecum K J, Oldenburg B, et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease [J]. Gut, 2011, 60(4): 463-472.
- [14] Li W Y, Shu S, Cheng L L, et al. Fasting serum total bile acid level is associated with coronary artery disease, myocardial infarction and severity of coronary lesions [J]. Atherosclerosis, 2020, 292: 193-200.
- [15] 陈旭东, 陈佳, 金炜, 等. 血清胆汁酸对不同病因所致肝硬化的诊断价值[J]. 肝脏, 2019, 24(2): 150-153.
- Chen X D, Chen J, Jin W, et al. The diagnostic value of serum bile acids in liver cirrhosis caused by different etiologies [J]. Chin Hepatol, 2019, 24(2): 150-153.
- [16] Puri P, Daita K, Joyce A, et al. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids [J]. Hepatology, 2018, 67(2): 534-548.
- [17] Arab J P, Cabrera D, Arrese M. Bile acids in cholestasis and its treatment [J]. Ann Hepatol, 2017, 16: s53-s57.
- [18] 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.