

四逆散改善 *Mdr2*^{-/-}小鼠胆汁淤积性肝纤维化作用

范桂芳, 蔡雅洁, 李方红, 李宇飞, 刘闰平*

北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 研究四逆散对 *Mdr2* (*Abcb4*) 基因缺陷 (*Mdr2*^{-/-}) 小鼠胆汁淤积性肝纤维化的缓解作用, 并探究其作用机制。方法 C57BL/6J 小鼠作为对照组; C57BL/6J 背景的 *Mdr2*^{-/-} 小鼠作为模型小鼠, 设模型组和四逆散低、高剂量(按生药量计为 3.12、6.24 g·kg⁻¹) 组。四逆散组连续 3 周 ig 给予四逆散水提物, 每天 1 次, 对照组给予纯水。试剂盒法检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆汁酸水平; 取肝脏、脾脏称质量, 计算肝脏、脾脏系数; 结合小鼠肝组织 HE 染色, Masson 染色, 纤连蛋白(Fibronectin)、细胞角蛋白 19 (CK19) 的免疫组化染色, 明确四逆散对 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝纤维化及胆汁淤积的影响。基于小鼠肝脏转录组学测序技术, 挖掘四逆散改善 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝损伤的作用靶点, 并通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测肝纤维化 [fibronectin (*Fn1*)、胶原蛋白 1 (*Col1a1*)、角蛋白 19 (*krt19*)]、炎症 [白细胞介素-1β (*Il1β*)、*Il6*、肿瘤坏死因子-α (*Tnfa*)、一氧化氮合成酶(*Inos*)]、细胞焦亡 [凋亡相关斑点样蛋白 (*Pycard*)、*Il18*]、胆汁酸合成 [细胞色素 P450 家族成员 7A1 (*Cyp7a1*)] 及转运 [胆盐输出泵 (*Abcb11*)、ATP 结合盒转运蛋白 (*Abcc3*)、钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白 (*Slc10a1*)] 相关基因的转录水平。结果 与模型组比较, 四逆散高剂量显著降低血清总胆汁酸的水平 ($P < 0.05$); 明显缓解了 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝脏中央静脉及胆管周围炎性细胞的浸润和胶原纤维的沉积, 并显著抑制胆管反应的发生。转录组学及 qRT-PCR 结果共同表明, 四逆散下调 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝纤维化、炎症、细胞焦亡相关基因的转录 ($P < 0.05$); 同时, 四逆散下调胆汁酸合成关键限速酶调控基因 *Cyp7a1* 和调控胆汁酸向肝内转运的基因 *Slc10a1* 的转录, 并上调调控胆汁酸外排的基因 *Abcb11*、*Abcc3* 的转录。结论 四逆散能缓解 *Mdr2*^{-/-} 小鼠胆汁淤积性肝纤维化, 机制可能与其调控炎症反应、细胞焦亡以及胆汁酸的合成和转运有关。

关键词: 四逆散; 胆汁淤积性肝纤维化; 转录组学; 炎症; 细胞焦亡; 胆汁酸代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 02-0291-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.02.008

Effect of Sini San on improving cholestatic liver fibrosis in *Mdr2*^{-/-} mice

FAN Guifang, CAI Yajie, LI Fanghong, LI Yufei, LIU Runping

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To clarify the ameliorative effects of the aqueous extract of Sini San (SNS) on cholestatic hepatic fibrosis in *Mdr2* gene-deficient (*Mdr2*^{-/-}) mice and to ulteriorly explore its mechanism of action. **Methods** C57BL/6J mice were used as the control group, *Mdr2*^{-/-} mice with C57BL/6J background were used as model mice, and were divided into a model group and a low and high dose group of SNS (calculated as 3.12 and 6.24 g·kg⁻¹ according to the dosage of raw materials). The SNS group was given an ig of SNS water extract for three consecutive weeks, once a day, while the control group was given pure water. The reagent kit method was used to detect serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and total bile acid levels. Take the mass of the liver and spleen, and calculate the liver and spleen coefficients. By combining H&E staining, Masson staining, immunohistochemical staining for Fibronectin, CK19 of liver section and the detection of serum total bile acid level, the effects of SNS on hepatic fibrosis and cholestasis in *Mdr2*^{-/-} mice were clarified. Besides, based on the transcriptomic sequencing, the potential targets of SNS to ameliorate liver injury in *Mdr2*^{-/-} mice were excavated. The genes expression related to liver fibrosis [Fibronectin (*Fn1*), Collagen-1 (*Col1a1*), Keratin-19 (*krt19*)], inflammation [Interleukin-1β (*Il1β*), *Il6*, tumor necrosis factor-α (*Tnfa*)], nitric oxide synthase (*Inos*)], pyroptosis [apoptosis associated spot like proteins (*Pycard*), *Il18*], bile acid synthesis [cytochrome P450 family member 7A1 (*Cyp7a1*)], and transport [bile salt efflux pump (*Abcb11*), ATP binding cassette transporter (*Abcc3*), and sodium

收稿日期: 2023-10-02

基金项目: 青年科学基金项目(82004029)

第一作者: 范桂芳, 硕士研究生, 研究方向为天然产物防治肝胆疾病。E-mail: guifangfan99@163.com

*通信作者: 刘闰平, 教授, 博士生导师。E-mail: runping.liu@bucm.edu.cn

taurocholic acid cotransporter (*Slc10a1*)] were quantified via real time PCR (qRT-PCR). **Results** Compared with the model group, high doses of SNS significantly reduced the level of serum total bile acids ($P < 0.05$). SNS significantly alleviated the infiltration of inflammatory cells and deposition of collagen fibers around the central vein and bile ducts, simultaneously inhibited the occurrence of bile duct reactions in the liver of *Mdr2*^{-/-} mice. Results of qRT-PCR and transcriptomics showed that SNS greatly down-regulated the transcription of genes related to hepatic inflammation and pyroptosis in *Mdr2*^{-/-} mice liver ($P < 0.05$), and decreased the gene expression of *Cyp7a1*, the key rate-limiting enzyme regulatory gene for bile acid synthesis. Furthermore, SNS also regulated bile acid transport in *Mdr2*^{-/-} mice liver which was characterized by down-regulated *Slc10a1*, *Slc10b2* genes (responsible for the transport of bile acid into liver) expression and up-regulated *Abcb11*, *Abcc3* genes (responsible for the excretion of bile acids from liver) expression, which remarkably relieving the pressure of cholestasis of *Mdr2*^{-/-} mice. **Conclusion** SNS alleviated hepatic injury, hepatic fibrosis and cholestasis in *Mdr2*^{-/-} mice which may be related to its modulation on inflammatory response, pyroptosis, bile acid synthesis and transport.

Key words: Sini San; cholestatic liver fibrosis; transcriptomics; inflammasome; pyroptosis; bile acid metabolism

胆道系统对于肝脏代谢、排泄以及正常生理功能的维持和发挥至关重要。胆管损伤主要包括原发性胆管损伤如原发性胆汁性胆管炎(PBC)、原发性硬化性胆管炎(PSC)等,以及继发性胆管损伤如药物诱导、感染及休克等,损伤通常触及肝脏,严重影响人类身体健康^[1]。其中PBC和PSC作为主要的自身免疫性肝病,也属于常见的慢性胆汁淤积性肝病,通常诱导胆汁淤积、胆管炎症和肝纤维化^[2];病情呈进行性发展,能导致终末期肝病,如肝硬化和或肝功能衰竭^[3]。熊去氧胆酸(UDCA)是PBC的一线治疗药物^[4],但其仍对40%的患者无效^[5];针对PSC的治疗主要使用阴离子交换树脂胆胺、PXR激动剂利福平及选择性血清素再摄取抑制剂舍曲林等,而这些药物的疗效或耐受都是有限的^[6]。对于肝功能衰竭的患者,除了进行肝移植外无有效治疗方法。因此,探究慢性胆管疾病的发病机制、寻找新的有效的治疗药物和治疗靶点具有重要的意义。

《伤寒杂病论》第318条记载道:“少阴病,四逆,其人或咳,或悸,或小便不利,或腹中痛,或泄利下重者,四逆散主之”。四逆散是调节肝、脾功能的传统中药方剂,被认为是疏肝理气行脾之祖方,由柴胡、枳实、白芍和甘草4味药组成。中医认为胆汁淤积证的病因包括肝郁气滞、气血失调、湿邪蕴脾、运化失职、胆汁泛溢从而引发黄疸^[7]。四逆散具有疏肝健脾、行气活血的功效,对胆汁淤积和肝纤维化有显著的改善作用。现代研究表明,四逆散能够通过调节蛋白激酶B(AKT)、SMAD、转化生长因子-β(TGF-β)等通路改善胆汁淤积和肝纤维化^[8-10],但四逆散治疗慢性胆管疾病的具体作用机制仍不清楚。

*Mdr2*基因,其在人类的同源基因为*Mdr3*,能编码一种重要的脂质转运蛋白人多药耐药蛋白

3(MDR3),将胆汁中的磷脂酰胆碱(PC)从胆管膜的内侧转移至外侧。*Mdr3*基因的敲除导致PC无法分泌到胆汁中,从而导致胆汁中PC的缺乏,使得胆固醇和胆盐无法与之形成混合胶束,引起胆盐的游离和胆管细胞的损伤,最终导致胆汁淤积^[11]。也有文献报道,小鼠*Mdr2*基因的缺失导致胆管炎症和肝纤维化,并不断进展为肝硬化甚至肝癌^[12]。目前*Mdr2*基因敲除(*Mdr2*^{-/-})小鼠不仅用于其人类同源基因*Mdr3*的研究,同时还作为PSC、肝纤维化、进行性家族性肝内胆管淤积、肝癌等多种肝病的动物模型而被广泛使用^[13]。因此,本研究以*Mdr2*^{-/-}小鼠为主要研究对象,通过免疫组化、Masson染色和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)等技术分析了四逆散对*Mdr2*^{-/-}小鼠胆汁淤积和肝纤维化的影响;并采用肝脏转录组测序技术,深入挖掘其作用机制。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

柴胡、白芍、枳实、甘草4味药材购自中国北京同仁堂(集团)有限责任公司,经北京中医药大学中药学院中药化学系徐冰教授鉴定为正品饮片,符合《中国药典》2020年版饮片性状规定,为伞形科植物柴胡*Bupleurum chinense* DC.的干燥根、毛茛科植物芍药*Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根、芸香科植物酸橙*Citrus aurantium* L.的干燥幼果、豆科植物甘草*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根和根茎。根据实验室以往的制备方法进行四逆散水提物的制备:等量取上述4味药各12 g并将其研碎,加8倍量蒸馏水浸泡1 h,冷凝回流法煎煮2次,1次2 h,将水煎液合并,旋转蒸发浓缩至75 mL,即其终质量浓度约0.64 g·mL⁻¹,滤过,分装放置-20℃保存,避免反复冻融。所得的四逆散水提物的质量控制在课题组前期研究中已报道^[14],超高效液相色谱(UHPLC)联

用四极轨道阱高分辨率质谱技术结果表明所制备的四逆散中柴胡、芍药、枳实和甘草相关20种代表性化合物均在ESI⁺模式下得到了表征,证明了制备方法的可行性。

丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆汁酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司);细胞角蛋白19(Cytokeratin 19, CK19) (10712-1-AP, proteintech)、纤连蛋白(Fibronectin, 15613-1-AP, proteintech)抗体均购自北京百诺威生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

Aperio Versa超分辨成像仪(德国Leica公司); 5424R g高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司); Spectramax i3x酶标仪(美国Molecular Devices公司); Real-Time PCR System (Quant StudioTM 6 Flex); Agilent 2100 bioanalyzer(美国Agilent公司); AMPure XP系统(美国Beverly公司)。

1.3 实验动物

C57BL/6J的7周龄小鼠购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0010; C57BL/6J背景的*Mdr2*^{-/-}小鼠购自上海南方模式生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2019-0002, *Mdr2*^{-/-}的C57BL/6J小鼠由*Mdr2*杂合子小鼠配对生育,并进行基因型的鉴定。饲养期间,小鼠常规饮食,全天自由饮用湿热灭菌超纯水,全程保持恒温恒湿饲养,温度在24.6℃左右,湿度在55.5%左右,采用人工光照,尽量保证每天白昼和黑夜各12 h,实验全程都严格遵循动物实验“3R原则”。

所有动物研究和程序均经北京中医药大学机构动物保护和使用委员会批准(动物伦理号为BUCM-4-2020121003-4190),并遵守所有指导方针和法规。

2 方法

2.1 动物分组及给药

C57BL/6J小鼠作为对照组; C57BL/6J背景的*Mdr2*^{-/-}小鼠作为模型小鼠,设模型组和四逆散低、高剂量(按生药量计为3.12、6.24 g·kg⁻¹)组。每组6只,雌雄各半。

四逆散组连续3周给予四逆散水提物ig处理,每天1次,对照组给予纯水。末次给予四逆散后的次日取材,取材前禁食3 h。用异氟烷麻醉后,下腔静脉取血,血液室温静置2 h后,4℃、4 000×g离心10 min,取上层血清,按照试剂盒说明书进行血清

ALT、AST和总胆汁酸水平的检测;取肝、脾,称质量,计算肝脏、脾脏系数;并将肝组织立即投入液氮,并转至-80℃保存,用于后续实验。

2.2 肝组织苏木素-伊红(HE)染色

取小鼠肝组织肝大叶边长为1 mm的正方体组织块,采用4%多聚甲醛进行固定,随后经过固定-梯度脱水-二甲苯透明-包埋等步骤得到石蜡组织块。石蜡组织块制备为4.5 μm石蜡切片,切片经过脱蜡-水化等,进行HE染色,最后采用中性树脂封片以备后续观察。所得肝脏组织病理切片采用Aperio Versa超分辨成像仪进行图像获取。

2.3 免疫组织化学染色

将肝组织石蜡切片,用二甲苯脱蜡,乙醇脱水,然后用EDTA回收抗原,用0.3%的H₂O₂阻断内源性过氧化物酶,用10%的山羊血清阻断非特异性结合位点。随后,切片分别用兔抗CK19抗体、兔抗Fibronectin抗体4℃孵育过夜,DAB染色,苏木精复染。最后,切片再次脱水后用中性树脂封闭。所得肝脏组织切片采用Aperio Versa超分辨成像仪进行图像获取。

2.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)实验

取肝大叶组织块,使用700 mL的Trizol试剂进行匀浆。随后依次加入氯仿、异丙醇、75%乙醇进行肝脏组织RNA提取。依据Vazyme逆转录和扩增试剂盒说明书,将RNA逆转录为cDNA。以HPRT1为内参进行qRT-PCR检测,引物序列见表1。

2.5 肝组织转录组学测序(mRNA-Seq)分析

提取对照组、模型组、四逆散高剂量组小鼠肝组织RNA,使用Agilent 2100 bioanalyzer精确检测RNA完整性和总量。用Oligo(dT)磁珠富集含polyA尾的mRNA,随后用二价阳离子在高温下将其破碎。然后依次合成第一链和第二链cDNA。用AMPure XP系统筛选cDNA并进行后续的PCR扩增和纯化,最终获得文库。对上述文库片段进行质检后在Illumina Novaseq平台上测序,并生成150 bp配对末端读数。接着,对上述测序数据进行生物信息分析,主要包括数据质控、序列对比、新转录本预测、基因表达水平的定量、差异基因分析、聚类-热图分析(R studio 4.3.1)、基因本体(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析、基因集富集分析(GSEA 4.3.2)等。

2.6 统计学分析

实验数据采用GraphPad Prism 8.3.2软件进行分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用One-way-

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequence

基因	引物序列(5'-3')	
<i>HPRT1</i> (内参)	F-CCGAGGATTGGA AAAAGTGTT	R-CATCTCCTTCATGACATCTCGA
fibronectin1(<i>Fn1</i>)	F-CTATAGGATTGGAGACACGTGG	R-CTGAAGCACTTTGTAGAGCATG
胶原蛋白1(Collagen-1, <i>Col1a1</i>)	F-TGAACGTGGTGTACAAGGTC	R-CCATCTTTACCAGGAGAACCAT
角蛋白 19(<i>krt19</i>)	F-GAGCAGATCCAGATAAGCAAGA	R-GTGACAGCTGGACTCCATAAC
<i>Tgfb</i>	F-GACCTCAAGAGCTCTAACATCC	R-GTCATCCACAGACAGAGTAGG
白细胞介素-1β(<i>Il1β</i>)	F-AATCTCACAGCAGCACATC	R-AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG
一氧化氮合成酶(<i>Inos</i>)	F-ACTCAGCCAAGCCCTCACCTAC	R-TCCAATCTCTGCCTATCCGTCTCG
<i>Il6</i>	F-TCTGCAAGAGACTTCCATCCAG	R-ATAGACAGGTCTGTTGGGAGTG
肿瘤坏死因子-α(<i>Tnfa</i>)	F-GTCCCCAAAGGGATGAGAAGT	R-TTTGCTACGACGTGGGCTAC
凋亡相关斑点样蛋白(<i>Pycard</i>)	F-ACAATGACTGTGCTTAGAGACA	R-CACAGCTCCAGACTCTTCTTTA
<i>Il18</i>	F-AGACCTGGAATCAGACAACCTTT	R-TCAGTCATATCCTCGAACACAG
细胞色素 P450 家族成员 7A1(<i>Cyp7a1</i>)	F-CAGAAGCATAGACCCAAGTG	R-GTAGCAGAAGGCATACATCC
胆盐输出泵(<i>Abcb11</i>)	F-TTCTGTTCTCCACCACTATCG	R-TTGCTTCTGACCACCACTC
ATP 结合盒转运蛋白 3(<i>Abcc3</i>)	F-CCCTGCGTATGAACCTAGATC	R-CTGCCTCTGGCCAACACTG
钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(<i>Slc10a1</i>)	F-TCTCCCTCTCTGTGGCTGTC	R-TGCTGATGGTGCGTCTGC

ANOVA 分析。

3 结果

3.1 四逆散减轻 *Mdr2*^{-/-} 小鼠的胆汁淤积

如图 1 所示,与对照组肝组织比较,模型组小鼠肝组织中央静脉及胆管周围出现明显的炎性细胞浸润,这种变化在给予低、高剂量四逆散水提物处理后均得到明显改善。与对照组小鼠相比,模型组小鼠肝、脾系数及血清总胆汁酸含量均显

著上调($P<0.05$ 、 0.001);与模型组相比,四逆散处理不影响 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝脾系数的上调,而四逆散高剂量处理显著降低血清总胆汁酸的水平($P<0.05$),低剂量处理呈现血清总胆汁酸降低的趋势。

与对照组小鼠相比,模型组小鼠血清 ALT、AST 水平显著上调($P<0.001$);与模型组比较,四逆散给药有降低其水平的趋势,但并无显著性意义,这可能是由于四逆散对模型小鼠肝细胞损伤的保护不

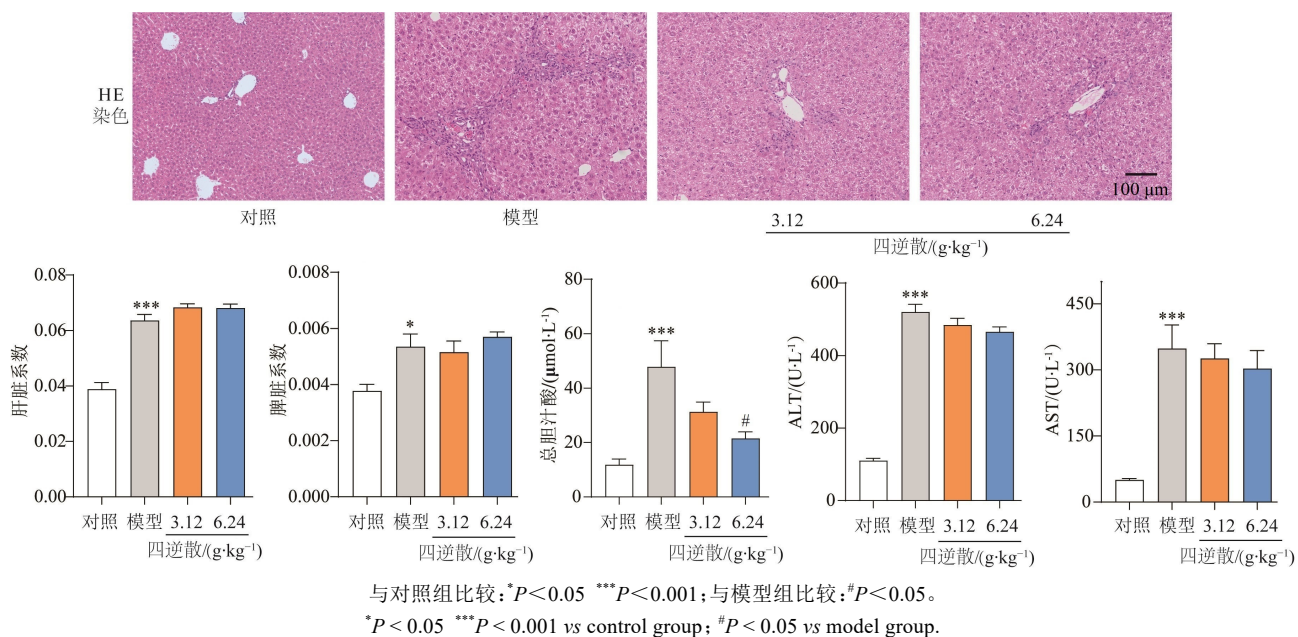


图 1 四逆散减轻 *Mdr2*^{-/-} 小鼠的肝损伤和胆汁淤积 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 1 Alleviates effect of SNS on liver injury and cholestasis in *Mdr2*^{-/-} mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

足。结果表明,四逆散处理改善了 $Mdr2^{-/-}$ 小鼠的胆汁淤积。

3.2 四逆散缓解 $Mdr2^{-/-}$ 小鼠的肝纤维化

如图2所示,采用 Masson 三色染法分析四逆散对 $Mdr2^{-/-}$ 小鼠肝组织胶原纤维(呈蓝色)沉积的影响,与对照组小鼠相比,模型组小鼠肝组织中央静脉及胆管周围出现明显的胶原沉积,而这种现象在给予低、高剂量的四逆散处理后,得到显著的改善。类似地,细胞外基质 Fibronectin 的免疫组化染色结果表明,四逆散处理减少了 $Mdr2^{-/-}$ 小鼠肝组织中央静脉及胆管周围 Fibronectin 的累积;同时, $Mdr2$ 基因缺失诱导的肝组织 CK19(胆管细胞标志)的累积也在四逆散处理后被缓解。

qRT-PCR 结果显示,与对照组小鼠相比,模型组小鼠肝组织 *Fnl*、*Coll1a1*、*Krt19*、*Tgfb* 的转录水平

显著上调($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001);而在给予高剂量的四逆散处理后,与模型组比较,除基因 *Tgfb* 外,上述基因的转录均被显著降低($P<0.05$)。

结果表明,四逆散减轻了 $Mdr2$ 基因缺陷所导致的小鼠肝组织胶原纤维沉积和胆管反应。

3.3 小鼠肝脏转录组学测序分析

Venn 图显示(图3-A), $Mdr2^{-/-}$ 和对照组之间有 853 个差异表达基因,四逆散高剂量组与模型组之间有 5 682 个差异表达基因。选择两部分交集的 405 个基因进行聚类-热图分析(图3-B),结果表明,上述差异表达基因主要分为 4 类,第 1 类是在模型组中上调,而四逆散处理后进一步上调,如 *Abcc12*、*Cdc20* 等;第 2 类是在模型组中上调,而四逆散处理后下调,如 *Mmp7*、*Casp4* 等;第 3 类是在模型组中下调,而四逆散处理后进一步下调,如 *Gm28437*、

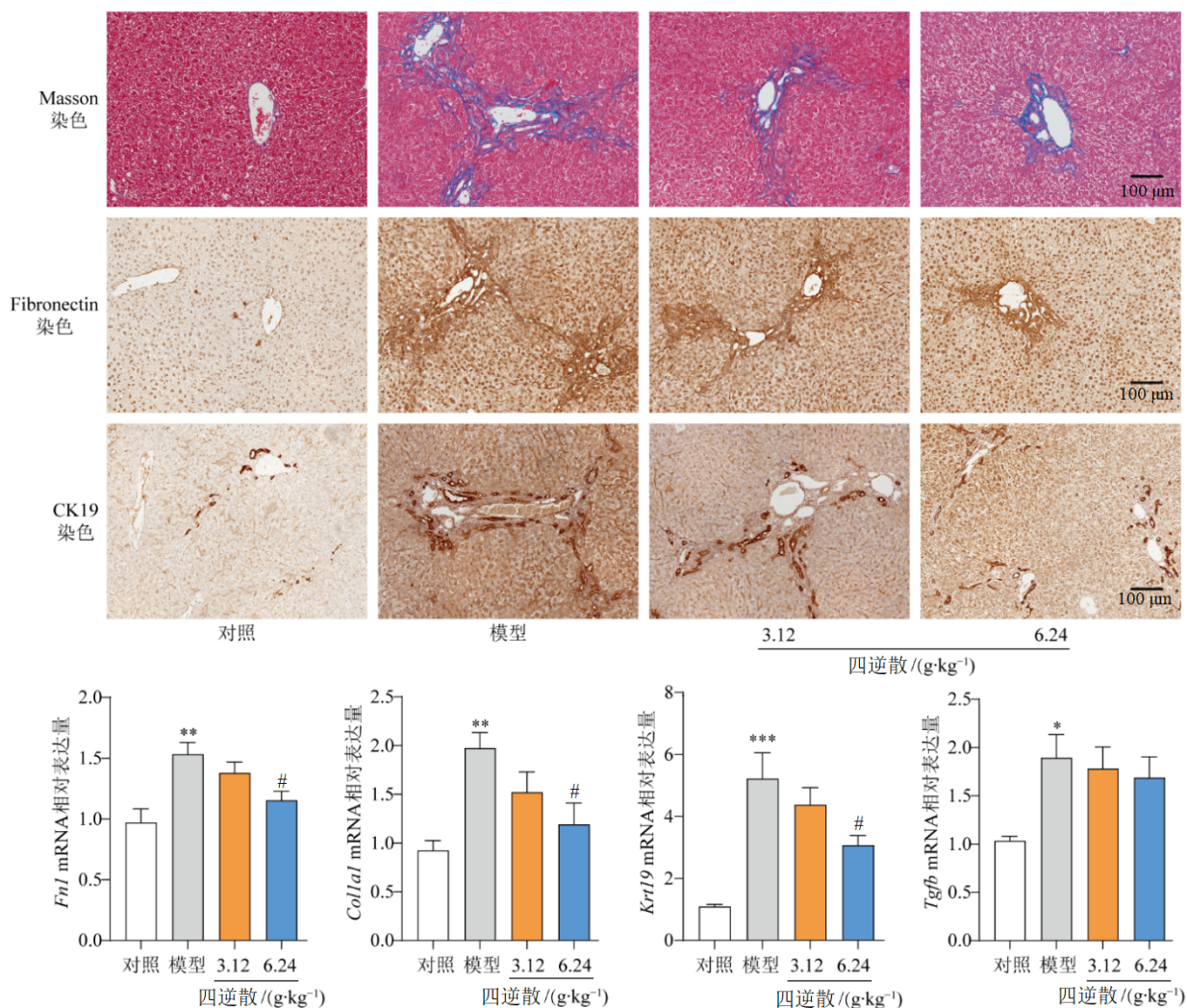
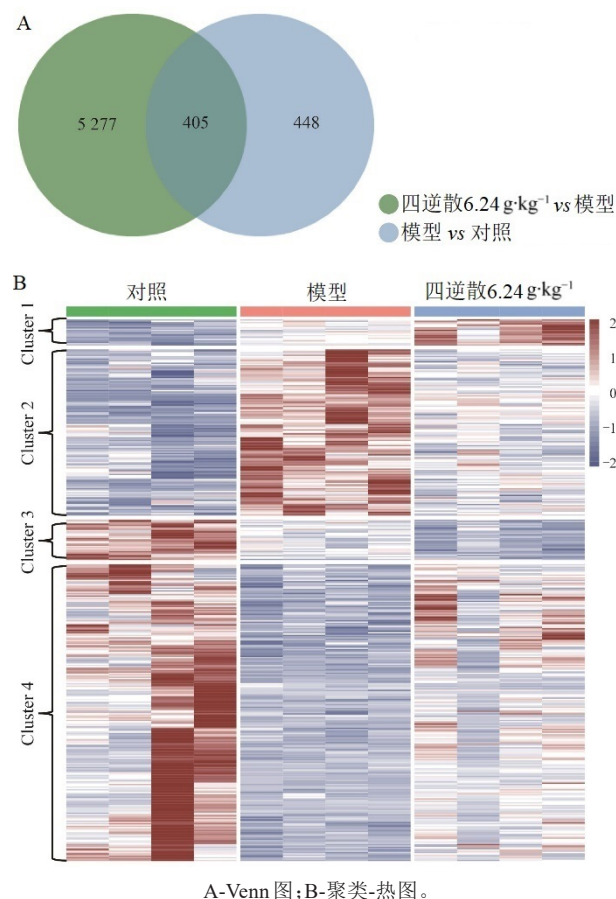


图2 四逆散缓解 $Mdr2^{-/-}$ 小鼠的肝纤维化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Alleviate effect of SNS on liver fibrosis in $Mdr2^{-/-}$ mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)



A-Venn图; B-聚类-热图。

A-Venn diagram; B-cluster heat map.

图3 小鼠肝脏转录组测序分析

Fig. 3 Transcriptomic sequencing of mouse liver

*Clec2d*等;第4类是在模型组中下调,而四逆散处理后上调,如*Insig2*、*Babaml*等。

3.4 小鼠肝脏差异表达基因的GO和KEGG富集分析

如图4所示,差异基因的KEGG通路富集分析结果显示,在模型组vs对照组和四逆散高剂量组vs模型组中,差异基因主要富集在与胆酸代谢(包括胆酸合成和转运)、纤维化、糖脂代谢、炎症以及泛凋亡调控相关的通路。GO富集分析同样显示,差异基因在胆酸代谢相关通路如胆固醇代谢、胆酸转运,纤维化相关的通路如细胞外基质调节、成纤维细胞增殖以及Collagen代谢等,炎症相关通路如IL-1 β 分泌、NLRP3炎症小体的组装等以及细胞焦亡等通路中富集。

3.5 四逆散缓解*Mdr2*^{-/-}小鼠肝脏炎症及细胞焦亡

基于上述差异基因的GO和KEGG富集分析结果,进一步分析在*Mdr2*^{-/-}小鼠中,四逆散对肝脏炎症及细胞焦亡的作用。首先,基于转录组学数据,进行GSEA分析,如图5-A、B所示,与对照组相比,炎

性小体及细胞焦亡相关基因在模型组中富集,而四逆散的处理逆转了这种富集。

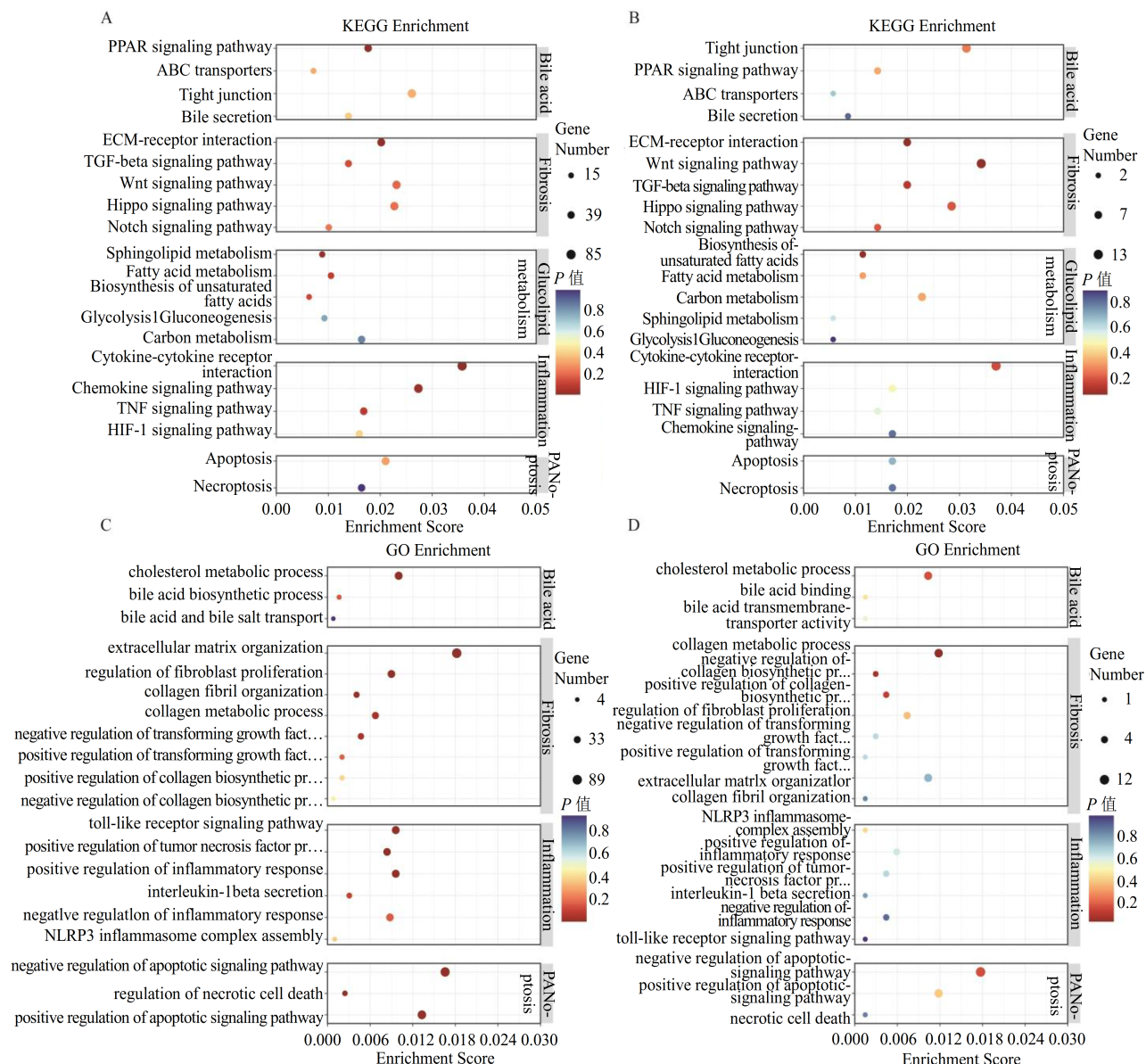
同时,对GSEA分析中显著变化的基因进行聚类-热图分析(图5-C),结果表明,在*Mdr2*^{-/-}小鼠中显著上调的*Pycard*、*Bcl2l1*、*Aim2*等炎症相关基因以及*Casp1*、*Casp4*、*Gsdme*等细胞焦亡相关基因的表达均在四逆散处理后被逆转。

qRT-PCR结果(图5-D)也显示,与对照组小鼠相比,模型组小鼠肝组织炎症相关基因*Il1b*、*Il6*、*Tnfa*、*Inos*以及细胞焦亡相关基因*Pycard*和*Il18*的mRNA水平显著上调($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001);同时,与模型组小鼠相比,高剂量的四逆散处理显著下调了*Il1b*、*Il6*、*Inos*和*Pycard*基因的表达($P < 0.05$),*Tnfa*和*Il18*基因的转录也在四逆散处理后呈降低趋势(图5-D)。结果表明四逆散改善了*Mdr2*^{-/-}小鼠的肝脏炎症和细胞焦亡。

3.6 四逆散调控*Mdr2*^{-/-}小鼠肝脏胆汁酸合成及转运

差异基因的GO和KEGG富集分析结果显示,肝脏胆汁酸合成及转运相关通路在四逆散组小鼠中富集。因此,基于转录组学数据,以基因的fpkm值为指标,分析了在*Mdr2*^{-/-}小鼠中,四逆散对小鼠肝脏胆酸代谢相关基因转录的影响。四逆散对小鼠肝脏胆酸代谢的影响。如图6-A所示,与模型组相比,四逆散给药下调了胆汁酸向肝内转运的相关转运体蛋白钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(NTCP,由*Slc10a1*编码)和有机阴离子转运多肽(OATP1,由*Slc10a1*编码)调控基因的表达,同时上调了重要的胆盐输出泵(BSEP)(由*Abcb11*编码)以及胆汁酸外排转运蛋白多药耐药相关蛋白(MRP3)和MRP4(分别由*Abcc3*和*Abcc4*编码)调控基因的表达。另外,四逆散抑制了*Mdr2*^{-/-}小鼠肝组织胆汁酸合成限速酶CYP7A1(由*Cyp7a1*编码)调控基因的表达。上述胆酸合成和转运相关关键蛋白的调控基因的表达如图6-B所示。

qRT-PCR结果(图6-C)进一步显示,与对照组小鼠相比,模型组小鼠肝组织*Cyp7a1*、*Abcc3* mRNA水平显著上调,*Abcb11*、*Slc10a1* mRNA水平显著下调;与模型组比较,高剂量的四逆散处理显著抑制*Mdr2*^{-/-}小鼠肝组织*Cyp7a1* mRNA水平的上调($P < 0.05$)。同时,四逆散高剂量处理进一步促进了*Mdr2*^{-/-}小鼠*Abcc3*基因的上调($P < 0.05$);*Abcb11*和*Slc10a1*基因的转录在不同剂量的四逆散处理后分别呈上调和下调趋势。结果表明,四逆散



模型组对比对照组(A)和四逆散高剂量组对比模型组(B)肝脏差异表达基因的KEGG通路富集分析;模型组对比对照组(C)和四逆散高剂量组对比模型组(D)肝脏差异表达基因的GO富集分析。

KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in model group vs control group (A), and SNS high dose group vs model group (B); GO enrichment analysis of differentially expressed genes in model group vs control group (C), and SNS high dose group vs model group (D).

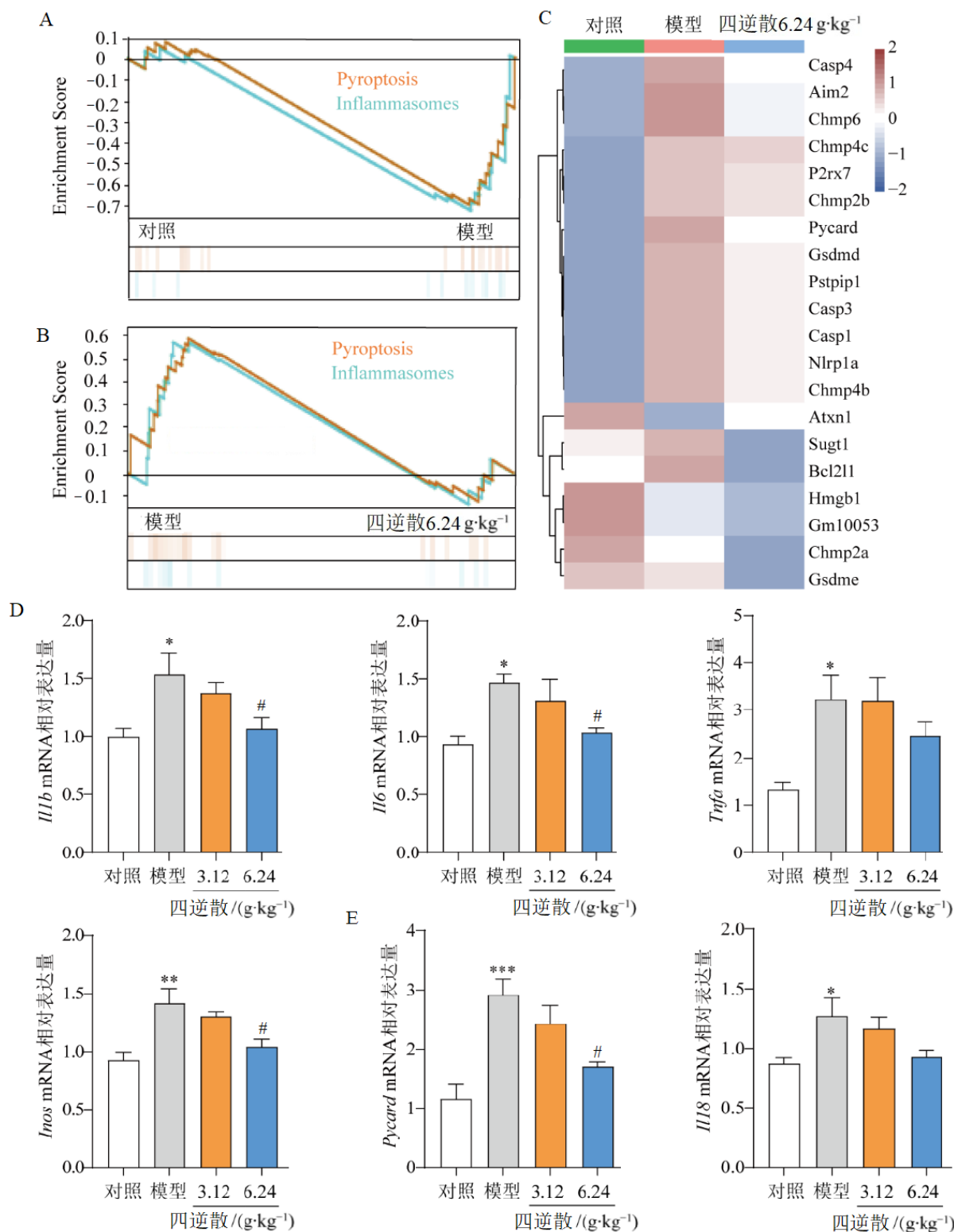
图 4 小鼠肝脏差异表达基因的GO和KEGG富集分析
Fig. 4 GO and KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in mouse liver

通过抑制胆酸的合成、向肝内转运,促进胆汁酸的外排来发挥抗*Mdr2*^{-/-}小鼠胆汁淤积的作用。

4 讨论

胆汁淤积和肝纤维化是2种经常存在于多数肝脏疾病过程中的病理状态,二者通常相互叠加,相互影响,严重威胁人类的健康^[15-16]。对于胆汁淤积性肝纤维化相关病理机制的探究以及药物的开发是亟待解决的问题。胆管细胞作为肝细胞的一个重要亚群,它们表达多种模式识别受体,能对多种内源性和外源性刺激作出反应^[17]。在响应损伤时,

其由静止状态转变成活跃状态,接着参与募集并与免疫细胞、血管细胞和间充质细胞相互作用,进而上调转化生长因子- β (TGF- β)、促炎因子和趋化因子如IL-6、IL-8、TNF- α 等的表达,并促进Notch和Hedgehog等信号级联的激活,释放的分子以自分泌和旁分泌的方式诱导下游相关信号的激活,并最终导致胆管细胞增殖、凋亡及局部血管生成和纤维化^[18]。炎症作为胆汁淤积性疾病的进展的重要推动因素,指导细胞串扰和协调不适应再生机制的延续,进而促进肝纤维化的发生和进展。细胞焦亡作



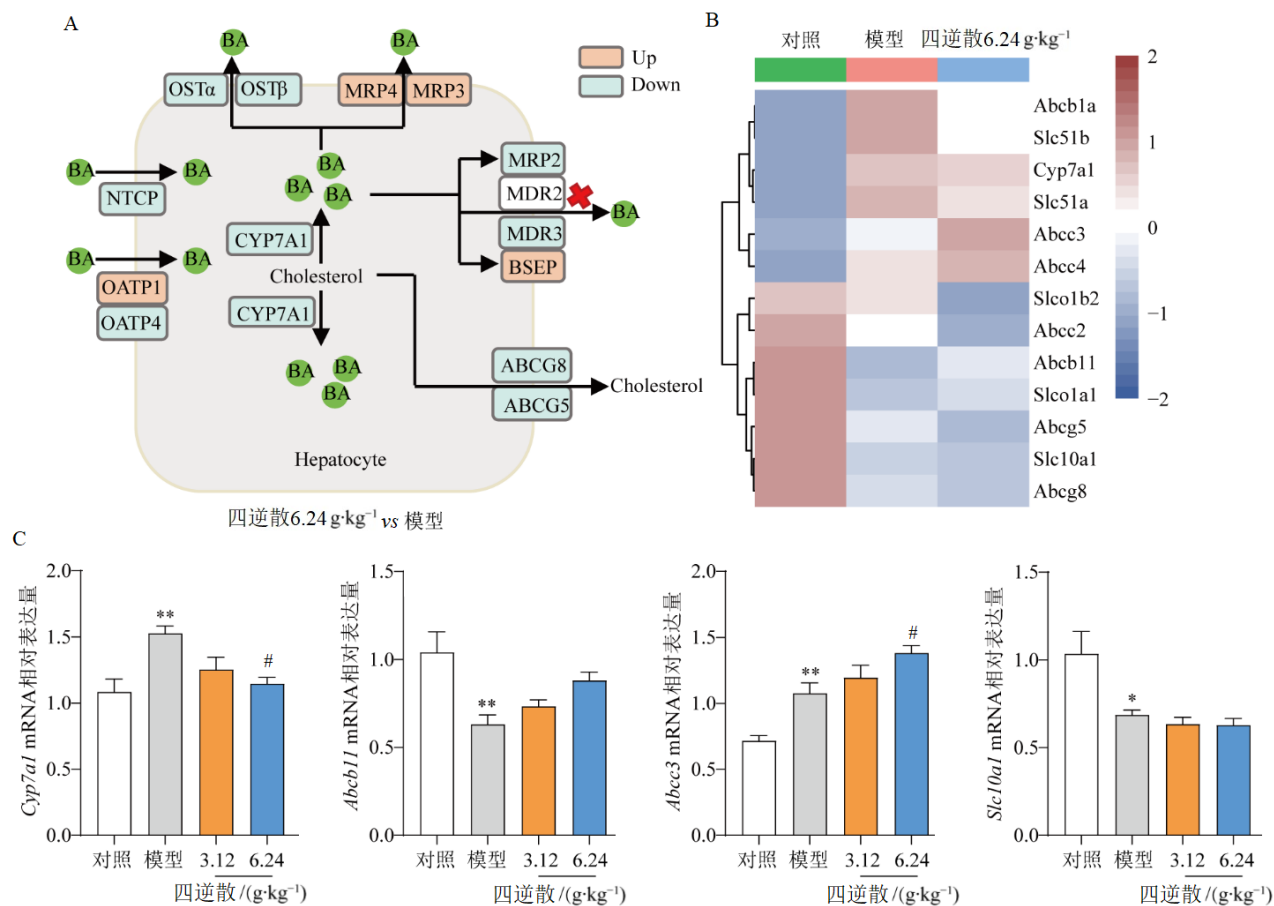
不同组小鼠肝组织细胞焦亡和炎性小体相关基因的GSEA分析(A,B);细胞焦亡和炎性小体相关基因的聚类-热图分析(C);肝组织*Il1b*、*Il6*、*Tnfa*、*Inos*、*Pycard*和*Il18*基因的mRNA水平(D);与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

GSEA enrichment analysis of pyroptosis and inflammasome-related genes in different groups of mouse liver tissue (A and B); Cluster-heat map analysis of pyroptosis and inflammasome-related genes (C); mRNA levels of *Il1b*、*Il6*、*Tnfa*、*Inos*、*Pycard* and *Il18* in liver sections (D); * $P < 0.05$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图5 四逆散缓解*Mdr2*^{-/-}小鼠肝脏炎症及细胞焦亡($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 SNS alleviates liver inflammation and pyroptosis in *Mdr2*^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)



与模型组相比,四逆散对胆汁酸合成及转运影响的示意图(A);胆汁酸合成及转运相关基因的聚类-热图分析(B);肝组织 *Cyp7a1*、*Abcb11*、*Abcc3*、*Slc10a1* 基因的 mRNA 水平(C);与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

Compared with model group, effects of SNS administration on bile acid synthesis and transport was shown as schematic diagram (A); Cluster-heat map analysis of bile acid synthesis and transport-related genes (B); mRNA levels of *Cyp7a1*, *Abcb11*, *Abcc3*, and *Slc10a1* in liver sections (C); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图6 四逆散调控 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝脏胆汁酸合成及转运 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 SNS regulates bile acid synthesis and transport in liver of *Mdr2*^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

作为一种新型的促炎程序性细胞死亡方式,在肝纤维化的过程中也扮演重要的角色。研究表明,NLRP3 炎性小体诱导的细胞焦亡能显著促进肝纤维化中细胞外基质的沉积,而NLRP3的敲除则缓解了四氯化碳以及胆管结扎等导致的肝纤维化的发生^[19]。因此,对细胞焦亡的精准调控,有助于肝脏炎症和纤维化的缓解。本研究结果显示,四逆散给药能显著抑制 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝脏反应性胆管细胞的增殖,下调炎症相关因子的基因转录并抑制炎性小体和细胞相关信号通路基因的表达,进而缓解胆汁淤积并抑制肝纤维化的发生。

胆汁淤积是胆汁淤积性肝纤维化的重要病理现象,胆汁酸过量时具有明显的细胞毒性,因此,对其合成和代谢转运的调控对于肝脏稳态的维持必不可少。胆汁酸作为胆固醇代谢的最终产物,当胆

汁酸合成后,经由BSEP、多药耐药蛋白ABCB1和ABCC2等从肝脏中分泌并到达肠道;而被释放到小肠中的共轭胆汁酸到达远端回肠,并在那里被肠细胞顶端钠依赖转运体(ASBT)重新吸收,并随后通过OSTα/β等基底外侧膜转运体转运到门静脉循环中;随后,胆汁酸通过窦状NTCP和OATP被肝细胞摄取。摄取后,胆汁酸又再一次偶联和分泌进入小管,由此形成一个有效的胆汁酸肝肠循环的过程,以维持代谢和肝胆功能的正常发挥^[20]。转录组学数据也提示,四逆散处理能从不同的角度调控 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝脏多种胆汁酸转运相关基因的转录。一方面,四逆散给药下调了 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝脏 *Slc10a1*、*Slc10b2* 等调控胆汁酸由肝外向肝内转运基因的表达;另一方面,四逆散给药上调了 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝脏调控胆汁酸向肝外转运的基因如 *Abcb11*、

*Abcc3*等的表达。四逆散通过抑制胆汁酸来源,促进其去路2个方向,缓解了 *Mdr2*^{-/-}小鼠肝脏胆汁淤积的压力。

CYP7A1作为胆汁酸合成的关键限速酶,其活性受到核受体FXR以及肠道成纤维细胞生长因子19(FGF19)的双重调控。一方面,肝中胆汁酸能激活肝内FXR,接着FXR上调小异二聚体伴侣(SHP)的表达,进而促进了SHP与核受体肝脏相关同系物LRH结合,SHP-LRH的相互结合抑制了LRH转录激活 *Cyp7a1* 基因功能的发挥;另一方面,肠中的胆汁酸激活回肠肠细胞内的FXR,促进下游FGF19的表达,接着,FGF19进入门静脉循环并与肝细胞表面受体FGFR4/β-klotho结合,抑制CYP7A1的表达,进一步抑制胆汁酸的合成^[21]。肝中FXR和肠中FGF19对肝中CYP7A1表达的负向调控在胆汁淤积过程中发挥着重要的功能,对于胆汁酸代谢稳态的维持至关重要^[22]。本研究结果表明,四逆散能显著抑制 *Mdr2*^{-/-}小鼠肝脏 *Cyp7a1* 基因的转录,进而抑制胆汁酸的合成,缓解肝损伤。然而,四逆散到底是通过肝内FXR的激活还是通过促进肠道分泌FGF19信号传递造成的 *Cyp7a1* 表达的下降仍不明确,值得进一步的探究。

本研究以 *Mdr2*^{-/-}小鼠为主要研究对象,结合免疫组化和qRT-PCR技术明确了四逆散对 *Mdr2*^{-/-}小鼠胆汁淤积和肝纤维化的改善作用;并基于肝脏转录组测序技术,提示了四逆散通过调节炎症、细胞焦亡、胆汁酸合成和转运来减轻 *Mdr2*^{-/-}小鼠肝损伤的作用机制,明确了其“多成分-多靶点-多通路”起效的作用特点,为后续深入探究四逆散的作用靶点提供思路,为临床胆汁淤积性肝病治疗药物的开发提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘杜先, 刘兰侠, 杨永峰. 淤胆型肝炎的临床与病理[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(11): 2283-2288.
Liu D X, Liu L X, Yang Y F. Clinical and pathological study of cholestatic liver injury [J]. J Clin Hepatol, 2018, 34(11): 2283-2288.
- [2] Poupon R, Chazouillères O, Poupon R E. Chronic cholestatic diseases [J]. J Hepatol, 2000, 32: 129-140.
- [3] Hasegawa S, Yoneda M, Kurita Y, et al. Cholestatic liver disease: Current treatment strategies and new therapeutic agents [J]. Drugs, 2021, 81(10): 1181-1192.
- [4] You H, Ma X, Efe C, et al. APASL clinical practice guidance: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis [J]. Hepatol Int, 2022, 16 (1): 1-23.
- [5] Rodrigues P M, Perugorria M J, Santos-Laso A, et al. Primary biliary cholangitis: A tale of epigenetically-induced secretory failure? [J]. J Hepatol, 2018, 69(6): 1371-1383.
- [6] Wagner M, Fickert P. Drug therapies for chronic cholestatic liver diseases [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2020, 60: 503-527.
- [7] 徐加敏, 唐映梅. 胆管病变及其相关肝脏疾病的研究现状 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(4): 934-936.
Xu J M, Tang Y M. Current status of research on bile duct lesions and related liver diseases [J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(4): 934-936.
- [8] 蒋美洁. 四逆散通过抑制AKT介导的肝细胞凋亡改善肝纤维化 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
Jiang M J. Sinisan can improve liver fibrosis by inhibiting hepatocyte apoptosis mediated by AKT [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2023.
- [9] 王剑锋, 王付, 苗小玲, 等. 四逆散加味对肝纤维化大鼠肝组织中TGF-β1及其受体基因和蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 176-180.
Wang J F, Wang F, Miao X L, et al. Effect of Sinisan jiawei on TGF-β1 and its receptor gene and protein expression in liver tissue of rats with hepatic fibrosis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2013, 19(20): p. 176-180.
- [10] 甘陈菲. 四逆散加味对抗肝纤维化大鼠磷酸化SMAD、PDGF-BB和其受体调节作用的研究 [D]. 郑州: 河南中医学院, 2015.
Gan C F. Study on the regulation of phosphorylated SMAD and PDGF-BB and their receptors in rats with hepatic fibrosis by adding Sinisan jiawei [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2015.
- [11] 李萌, 平键, 徐列明. *Mdr2*基因敲除小鼠建立原发性肝癌模型观察 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1058-1063.
Li M, Ping J, Xu L M. Establishment of a primary liver cancer model in *Mdr2* gene knockout mice: An observational study [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2022, 30(8): 1058-1063.
- [12] Fuchs M, Stange E F. Cholesterol and cholestasis: A lesson from the *Mdr2*^{-/-} mouse [J]. J Hepatol, 2001, 34(2): 339-341.
- [13] 李萌, 平键, 徐列明. *Mdr2*基因敲除小鼠在肝病研究中的应用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2021, 29(6): 585-590.
Li M, Ping J, Xu L M. Application of *Mdr2* gene

- knockout mice in liver disease research [J]. Chin J Hepatol, 2021, 29(6): 585-590.
- [14] Cai Y J, Xu B, Zhou F, et al. Si-Ni-San ameliorates chronic colitis by modulating type I interferons-mediated inflammation [J]. Phytomedicine, 2021, 84: 153495.
- [15] 陈瑞玲, 马雄. 胆汁淤积导致肝纤维化的机制及其阻断策略 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(2): 247-251.
- Chen R L, Ma X. Pathogenesis of cholestasis-induced liver fibrosis and thoughts for blockade [J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(2): 247-251.
- [16] 罗苒艺, 贾可欣, 张蕾, 等. 从虚论治肝纤维化相关方剂的现代药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7554-7563.
- Luo R Y, Jia K X, Zhang L, et al. Research progress on modern pharmacological effects of prescriptions for liver fibrosis from deficiency [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(22): 7554-7563.
- [17] Banales J M, Huebert R C, Karlsen T, et al. Cholangiocyte pathobiology [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(5): 269-281.
- [18] Pinto C, Giordano D M, Maroni L, et al. Role of inflammation and proinflammatory cytokines in cholangiocyte pathophysiology [J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2018, 1864(4): 1270-1278.
- [19] 万义鹏, 张望, 朱萱. 细胞焦亡在肝纤维化发生、发展中的作用研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(24): 69-74.
- Wan Y P, Zhang W, Zhu X. Research advance in the role of pyroptosis in the development and progression of liver fibrosis [J]. China J Mod Med, 2021, 31(24): 69-74.
- [20] Gulamhusein A F, Hirschfield G M. Primary biliary cholangitis: Pathogenesis and therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(2): 93-110.
- [21] 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.
- [22] Al-Khaifi A, Rudling M, Angelin B. An FXR agonist reduces bile acid synthesis independently of increases in FGF19 in healthy volunteers [J]. Gastroenterology, 2018, 155(4): 1012-1016.

[责任编辑 兰新新]