

基于回肠顶端钠依赖性胆酸转运体探究栀子水提物对小鼠胆汁淤积的治疗作用

张国强^{1,4}, 文苑洁^{3,4}, 董毓松^{1,2}, 石晓盼^{1,2}, 魏玉辉^{1,4*}

1. 兰州大学第一医院 药剂科, 甘肃 兰州 730000

2. 兰州大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000

3. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

4. 甘肃省医院中药制剂产业技术创新联盟, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 基于回肠顶端钠依赖性胆酸转运体 (apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT) 考察栀子水提物对 α -异硫氰酸萘酯 (α -naphthyl isothiocyanate, ANIT) 诱导的胆汁淤积小鼠的治疗作用, 并筛选潜在的活性化合物。方法 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、栀子对照 (240 mg/kg) 组、ANIT 组及栀子水提物低、中、高剂量 (60、120、240 mg/kg) 组和熊去氧胆酸 (60 mg/kg) 组, 每组 10 只。给予药物进行干预, 2 次/d, 连续 14 d; 于第 12 天单次 ig ANIT (50 mg/kg) 诱导小鼠胆汁淤积模型。采用栀子水提物干预 ANIT 诱导的小鼠小肠上皮 MODE-K 细胞; 测定血清生化指标及肝脏、血清、胆囊、回肠及粪便中胆酸盐含量; 测定小鼠回肠及 MODE-K 细胞 ASBT 及法尼酯 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 的表达; 采用原位肠灌注及外翻肠囊法测定回肠组织及肝门静脉中牛磺胆酸钠 (taurocholate sodium, TCA) 含量; 采用定性代谢组学技术测定给予栀子水提物 2 h 后血清及回肠组织中的化合物。结果 与 ANIT 组比较, 栀子水提物能缓解肝脏病变, 减少肝脏胆酸盐及回肠 TCA 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 增加粪便胆酸盐的含量 ($P < 0.05$); 增加小鼠回肠及 MODE-K 细胞 FXR 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 减少 ASBT 的表达 ($P < 0.01$ 、 0.001)。同时, 筛选出潜在的活性化合物 37 个。结论 栀子水提物可通过激活回肠 FXR 而抑制回肠 ASBT 的表达和功能, 减少回肠胆酸盐重吸收并促进粪便排泄, 减少肝脏胆酸盐蓄积, 从而缓解 ANIT 诱导的小鼠肝内胆汁淤积。

关键词: 栀子; 胆汁淤积; 顶端钠依赖性胆酸转运体; 法尼酯 X 受体; 京尼平; 京尼平苷; 京尼平龙胆二糖苷

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)01-0122-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.01.015

Effect of *Gardenia jasminoides* water extract on cholestasis in mice based on apical sodium-dependent bile acid transporter of ileum

ZHANG Guo-qiang^{1,4}, WEN Yuan-jie^{3,4}, DONG Yu-song^{1,2}, SHI Xiao-pan^{1,2}, WEI Yu-hui^{1,4}

1. Department of Pharmacy, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

3. College of Pharmaceutical Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

4. Industry Technology Innovation Alliance of Hospital Traditional Chinese Medicine Preparation, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Gardenia jasminoides* water extract on α -naphthyl isothiocyanate (ANIT)-induced cholestasis in mice based on apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) of ileum, and screen the potential active compounds.

Methods C57BL/6 mice were randomly divided into control group, *G. jasminoides* control group (240 mg/kg), ANIT group, *G. jasminoides* water extract low-, medium- and high-dose (60, 120, 240 mg/kg) groups and ursodeoxycholic acid (60 mg/kg) group, with 10 mice in each group. Drug intervention was given twice a day for 14 d; Cholestasis model of mice was induced by single ig ANIT

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82160711); 国家自然科学基金资助项目 (82174067); 国家自然科学基金资助项目 (81960646); 国家自然科学基金资助项目 (81702853); 兰州市科技指导性计划项目 (2022-ZD-94); 兰州大学第一医院院内基金优秀博士科研启动基金资助项目 (ldyyyn2020-94)

作者简介: 张国强, 男, 博士, 主管药师, 研究方向为药物肝损伤及中药药理。E-mail: zhanggq15@lzu.edu.cn

***通信作者:** 魏玉辉, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理研究及临床药学。E-mail: yhwei@lzu.edu.cn

(50 mg/kg) on 12th day. *G. jasminoides* water extract was used to interfere with ANIT-induced MODE-K cells; Serum biochemical indexes and bile salt content in liver, serum, gallbladder, ileum and feces were measured; The expressions of ASBT and farnesoid X receptor (FXR) in ileum of mice and MODE-K cells were measured; The contents of sodium taurocholate (TCA) in ileum and hepatic portal vein were determined by *in situ* intestinal perfusion and everted intestinal sac method; Qualitative metabonomics was used to determine the compounds in serum and ileum tissue after 2 h of ig *G. jasminoides* water extract. **Results** Compared with ANIT group, *G. jasminoides* water extract could alleviate liver diseases, reduce the content of bile salts in liver and TCA in ileum ($P < 0.05, 0.01$), and increase the content of fecal bile salts ($P < 0.05$); *G. jasminoides* water extract increased the expression of FXR in ileum of mice and MODE-K cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and decreased the expression of ASBT ($P < 0.01, 0.001$). At the same time, 37 potential active compounds were screened. **Conclusion** *G. jasminoides* water extract can inhibit the expression and function of ASBT by activating FXR in ileum, reduce bile salt reabsorption in ileum, promote fecal excretion, and reduce hepatic bile salt accumulation, thereby relieving ANIT-induced intrahepatic cholestasis in mice.

Key words: *Gardenia jasminoides* Ellis; cholestasis; apical sodium-dependent bile acid transporter; farnesoid X receptor; genipin; geniposide; genipin-1- β -D-gentiobioside

梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 具有清泄三焦的功效^[1-2]。现代药理学研究证实, 梔子及其主要成分京尼平苷、藏红花酸等具有治疗胆汁淤积的作用^[3-5]。胆汁淤积是肝脏胆酸盐循环发生障碍, 蓄积于肝细胞而引起肝细胞毒性^[6]。胆酸盐重吸收是肝脏胆酸盐循环中关键的环节, 机体约 95%胆酸盐经肠道重吸收入肝^[6]。顶端钠依赖性胆酸转运体 (apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT) 是介导肠道胆酸盐重吸收的关键蛋白^[7]。抑制 ASBT 可减少胆酸盐的肠道重吸收而缓解肝脏胆酸盐的蓄积毒性^[7-9]。近年来, 研究证实抑制肠道 ASBT 可明显缓解小鼠胆汁淤积肝损伤^[10], 且以 ASBT 为靶点治疗胆汁淤积相关疾病的药物 A4250 及 BAT117213 (二者均为 ASBT 抑制剂) 也进入了临床研究阶段^[11-12]。因此, 本研究主要基于回肠 ASBT 探讨梔子水提取物对胆汁淤积的治疗作用, 并筛选潜在的药效物质。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 19~21 g, 8 周龄, 购自中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 许可证号 SCXK (甘) 2020-0002。动物饲养于温度 20~25 °C、相对湿度 40%~60%及通风良好的动物房里, 给予小鼠标准维持饲料并自由饮水, 每日光照 12 h。小鼠于实验前适应性喂养 1 周。动物实验经兰州大学第一医院伦理委员会批准 (批准号 LDYYLL2017-72)。

1.2 细胞

小鼠小肠上皮 MODE-K 细胞 (批号 BNCC338300) 购自北纳生物。

1.3 药材

梔子购自甘肃冠兰中药饮片有限公司, 产地为江西省樟树市, 经甘肃省药品检验研究院宋平顺教授鉴定为茜草科植物梔子 *G. jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。

1.4 药品与试剂

α -异硫氰酸萘酯 (α -naphthyl isothiocyanate, ANIT, 批号 STBH7289) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 牛磺胆酸钠 (taurocholate sodium, TCA, 批号 B26949) 购自上海源叶生物科技有限公司; RIPA 裂解液 (批号 P0013B) 购自碧云天生物技术研究所; 天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 C010-2-1)、总胆汁酸 (total bile acids, TBA) 试剂盒 (批号 E003-2-1)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 C009-2-1)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒 (批号 A059-2-2)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 试剂盒 (批号 C019-1-1) 购自南京建成生物工程研究所; 法尼酯 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 抗体 (批号 sc-25309) 购自 Santa Cruz 公司; β -actin 抗体 (批号 TA-09) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ASBT 抗体 (批号 ab203205)、HRP 标记的山羊抗兔抗体 (批号 ab6721)、HRP 标记的山羊抗大鼠抗体 (批号 ab6789) 购自英国 Abcam 公司; 其他试剂均为国产分析纯; 纯化水为兰州大学第一医院自制。

1.5 仪器

1260 型高效液相色谱仪、6460 型质谱仪 (美国安捷伦公司); 3k15 型高速离心机 (美国 Sigma 公司); DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); TP-

24 型组织细胞破碎仪（北京飞驰科学仪器公司）；AU400 型全自动生化分析仪（日本 Olympus 公司）；LT-224S 型电子天平（德国 Sartorius 公司）。

2 方法

2.1 栀子水提物的制备

栀子水提物与本课题组前期研究^[5]为同一批，栀子采用水煎法提取 2 次，合并滤液，喷雾干燥得粉末，药材提取率为 10%。测定栀子提取物中 9 种主成分含量用于质量控制，其中京尼平苷 115 660.02 ng/mL、木犀草苷 4 422.28 ng/mL、京尼平龙胆二糖苷 1 279.94 ng/mL、木犀草素 1 020.7 ng/mL、京尼平苷酸 962.46 ng/mL、鼠李柠檬素 175.84 ng/mL、6 α -羟基栀子苷 181.08 ng/mL、栀子苷 B 124.86 ng/mL、滨蒿内酯 101.46 ng/mL。

2.2 动物分组、给药及造模

C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组、栀子对照（240 mg/kg）组、模型组及栀子水提物低、中、高剂量（60、120、240 mg/kg）组和熊去氧胆酸（60 mg/kg）组，每组 10 只。对照组 ig 蒸馏水（0.2 mL/只），栀子对照组 ig 栀子水提物，2 次/d，连续 14 d，并于第 12 天单次 ig 玉米油（0.2 mL/只）；模型组 ig 蒸馏水（0.2 mL/只），各给药组 ig 相应药物，2 次/d，连续 14 d，并于第 12 天单次 ig ANIT（50 mg/kg，以玉米油溶解）。实验结束后，大鼠禁食并收集 2 h 内粪便，ip 10%水合氯醛麻醉后，摘眼球取血，离心后用于后续生化分析；取小鼠肝脏、胆囊、结肠组织，称定肝脏及胆囊（含胆汁）质量，计算肝脏指数和胆囊指数；部分肝脏及回肠组织采用 10%甲醛溶液固定，苏木素-伊红（HE）染色，观察组织病变情况；部分回肠样品提取总蛋白，采用 Western blotting 法分析蛋白表达。

肝脏指数 = 肝脏质量 / 体质量

胆囊指数 = 胆囊（含胆汁）质量 / 肝质量

2.3 血清生化及肝脏、回肠组织 HE 染色

采用试剂盒说明书测定血清中 AST、ALP、ALT 活性及 TBIL 水平，肝脏组织、回肠组织、胆汁、粪便及血清中 TBA 水平；肝脏及回肠组织采用常规 HE 染色，于显微镜下观察组织病理形态学变化。

2.4 Western blotting 检测回肠组织 ASBT 和 FXR 蛋白表达

称取各组大鼠新鲜的回肠组织 0.04 g，加入 RIPA 裂解液 300 μ L，提取总蛋白，BCA 法测定蛋白含量，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝

胶电泳，转至 PVDF 膜，于 5%脱脂牛奶中封闭，分别加入 ASBT（1：1000）、FXR（1：500）和 β -actin（1：2000）抗体，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；洗膜，孵育二抗，曝光，采用 Image J 软件对条带进行灰度分析。

2.5 在体肠灌流实验

按“2.2”项下方法进行分组和给药，每组 5 只小鼠，不设置熊去氧胆酸组。于实验结束后，小鼠禁食 12 h，ip 10%水合氯醛麻醉后，游离出回肠 10 cm 并两端结扎，注入 10 μ mol/L TCA 200 μ L，于 10 min 后一次性取肝门静脉血，离心取上清，-80 $^{\circ}$ C 冻存用于后续分析。

2.6 外翻肠囊实验

按“2.5”项下方法进行分组和给药，每组 5 只小鼠。于实验结束后，小鼠禁食 12 h，ip 10%水合氯醛麻醉后，从回盲交界处向上 5 cm 游离并截取 10 cm 回肠，立即放入冰的 PBS 中，剪去肠系膜，外翻肠道并清洗，灌入 Krebs-Ringer 缓冲液（Krebs-Ringer buffer, KRB）200 μ L 并夹紧两头，将肠囊置入氧饱和的含 10 μ mol/L TCA 的 KRB 中，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min，收集肠囊内液及肠组织，-80 $^{\circ}$ C 冻存用于后续分析。

2.7 HPLC-MS/MS 分析^[13]

血样及肠内液离心取上清液，回肠组织加入甲醇匀浆后离心并取上清，取适量血样、肠内液、回肠组织匀浆上清液，用含内标（d⁴-CDCA）的甲醇沉淀各生物样品中的蛋白，涡旋离心后取上清，按照本课题组前期研究方法^[13]检测各生物样品中 TCA 的含量。

2.8 MODE-K 细胞培养及药物干预

MODE-K 细胞采用 DMEM 培养基常规培养、传代，MTT 法分别评价栀子水提物（25~800 μ g/mL）及 ANIT（12.5~200 μ mol/L）对 MODE-K 细胞活性的影响；筛选出 ANIT 70 μ mol/L 作为细胞模型浓度，进一步采用 MTT 评价栀子水提物在 ANIT 干预下对 MODE-K 细胞活性的影响；采用 50、100、200 μ g/mL 栀子水提物干预 MODE-K 细胞 24 h，按“2.4”项下方法评价其对 ASBT 及 FXR 蛋白表达的影响。

2.9 栀子水提物中潜在药效化合物的筛选

C57BL/6J 小鼠分为模型组和给药组，每组 4 只。各组 ig ANIT（50 mg/kg）48 h 后，给药组 ig 栀子水提物（240 mg/kg），给药 2 h 后采集小鼠的血液和回肠组织。采用 UHPLC-QTOF-MS 中药非靶标代谢组学检测栀子水提物、血清和回肠中共有的化合物；并

从蛋白质三维结构数据库 (PDB) 中筛选 FXR-OCA 复合物晶体结构 (PDB 代码: 4QE6), 采用 Maestro 11.5 软件进行分子对接, 筛选潜在的 FXR 激动剂。

2.10 统计学分析

实验数据采用 Microsoft Excel 2016 软件进行统计分析, 各组间两两比较, 采用 *t* 检验。

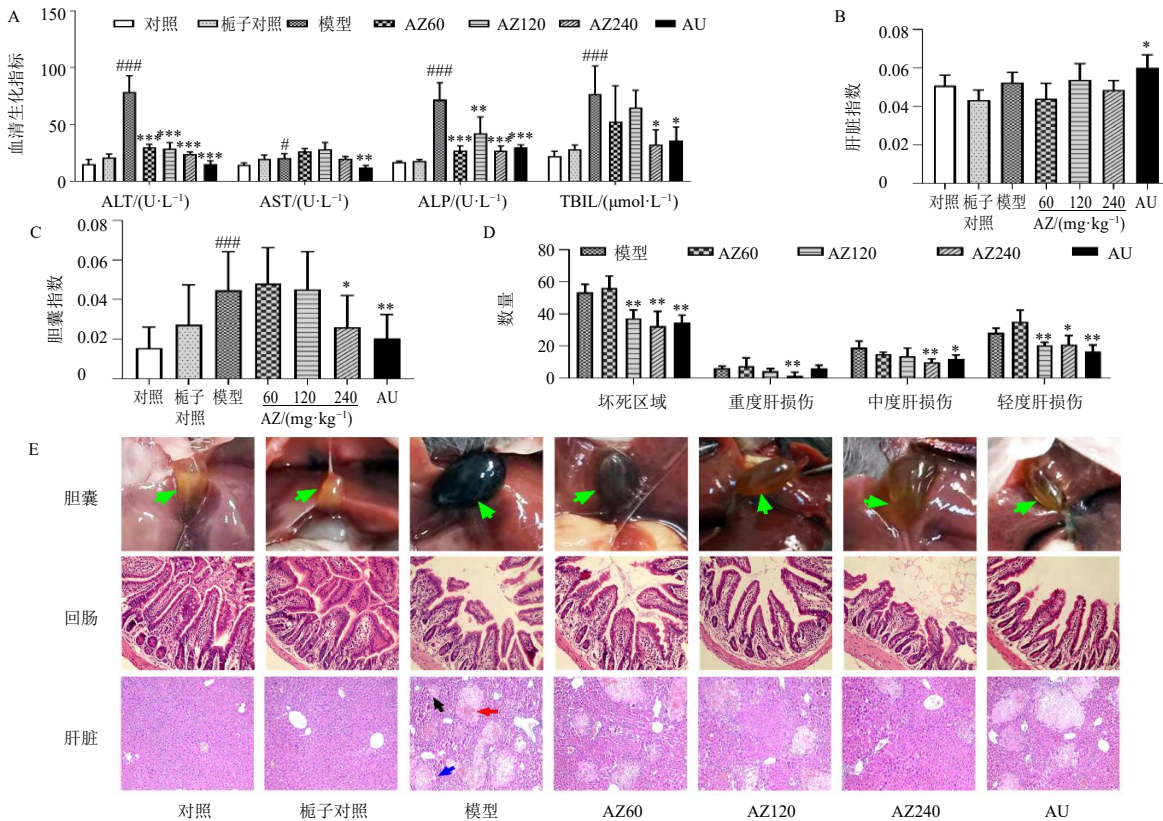
3 结果

3.1 栀子水提取物对 ANIT 诱导小鼠胆汁淤积的治疗作用

如图 1-A~C 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性及 TBIL、胆囊指数

均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001); 与模型组比较, 各给药组血清中 ALT、ALP 活性均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 熊去氧胆酸组血清中 AST 活性显著降低 ($P < 0.01$), 肝脏指数显著升高 ($P < 0.05$); 栀子水提取物高剂量组和熊去氧胆酸组血清中 TBIL 水平及胆囊指数显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

如图 1-D、E 所示, 对照组和栀子对照组胆囊较小且胆汁颜色淡黄色, 肝组织肝脏组织结构清晰, 肝板结构排列整齐; ANIT 干预后, 可见胆囊充盈且胆汁颜色偏黑; 肝组织出现大面积的桥接性坏死及局部点状坏死, 且肝脏坏死区域数目较多; 栀子提



A-血清生化指标 B-肝脏指数 C-胆囊指数 D-肝脏坏死病理评分 E-胆囊形态及肝脏、回肠病理图片 ($\times 100$), 其中绿色箭头指示胆囊, 肝脏主要病变呈现肝细胞坏死及炎症, 依据坏死区域的大小, 将肝损伤程度分为: ①重度肝损伤: 直径大于 $200\ \mu\text{m}$ 的肝脏坏死区域 (红色箭头); ②中度肝损伤: 直径 $100\sim 200\ \mu\text{m}$ 的肝脏坏死区域 (蓝色箭头); ③轻度肝损伤: 直径为 $0\sim 100\ \mu\text{m}$ 的肝脏坏死区域 (黑色箭头), 坏死区域的直径通过软件 Motic Images plus 2.0 ML 软件的测量功能计算 AZ60-栀子水提取物 $60\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ AZ120-栀子水提取物 $120\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ AZ240-栀子水提取物 $240\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ AU-熊去氧胆酸 与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$, 下图同

A-serum biochemical index B-liver index C-gallbladder index D-pathological score of liver necrosis E-gallbladder morphology, liver and ileum pathology ($\times 100$), green arrow indicates gallbladder, main pathological changes of liver present necrosis and inflammation of hepatocytes, according to the size of necrotic area, degree of liver injury can be divided into: ①Severe liver injury: Red arrow indicates large area of liver necrosis ($>200\ \mu\text{m}$); ②Moderate liver injury: Blue arrow indicates middle area of liver necrosis ($100\sim 200\ \mu\text{m}$); ③Mild liver injury: Black arrow indicates small area of liver necrosis ($0\sim 100\ \mu\text{m}$). Diameter of necrosis area was calculated by the measurement function of Motic Images plus 2.0 ML software AZ60-*G. jasminoides* water extract $60\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ AZ120-*G. jasminoides* water extract $120\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ AZ240-*G. jasminoides* water extract $240\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ AU-ursodeoxycholic acid $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图 1 栀子水提取物对 ANIT 诱导的小鼠胆汁淤积的治疗作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of *G. jasminoides* water extract on ANIT-induced cholestasis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

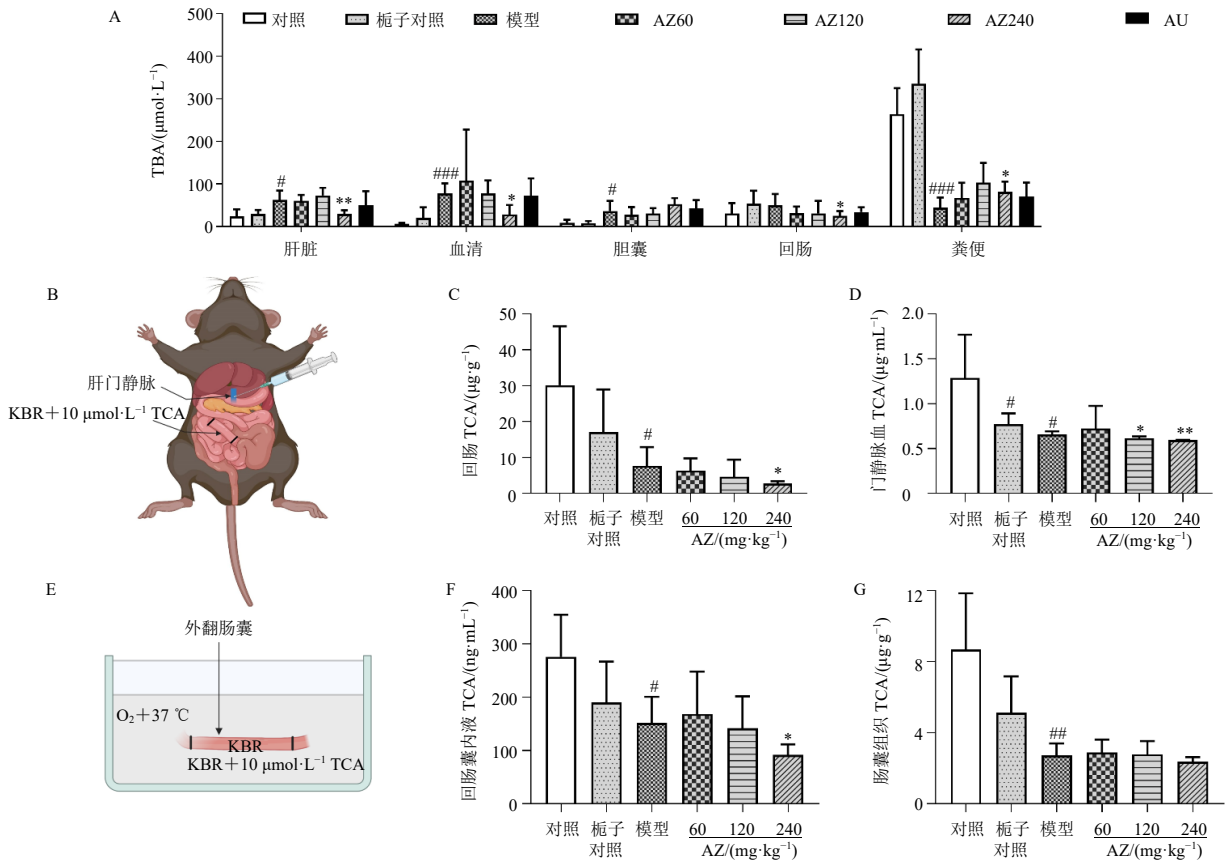
取物及熊去氧胆酸干预后, 胆囊充盈度降低, 且胆汁颜色呈淡黄色; 肝脏坏死区域的数目明显减少 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 栀子水提物对 ANIT 诱导胆汁淤积小鼠胆酸盐的影响

如图 2-A 所示, 与对照组比较, 模型组肝脏、血清、胆囊中 TBA 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), 但粪便中 TBA 水平显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 栀子水提物高剂量组肝脏、血清、回肠中 TBA 水平均有不同程度的降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 粪便中 TBA 水平显著升高 ($P < 0.05$), 提示

栀子水提物可能通过促进 TBA 的粪便排泄而利胆。

为了进一步明确栀子水提物对回肠重吸收的影响, 采用在体肠灌流和外翻肠囊实验评价了回肠对 TCA 的摄取。如图 2-B~G 所示, 与对照组比较, 模型组在体肠组织、门静脉血、回肠囊内液、肠囊组织中 TCA 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 栀子水提物高剂量组在体肠组织、门静脉血、回肠囊内液中 TCA 进一步降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示栀子水提物可抑制 TCA 的回肠重吸收。此外, 栀子水提物也可抑制正常小鼠回肠 TCA 的重吸收 (图 2-D)。



A-血清、肝脏、胆囊、回肠及粪便中 TBA 水平 ($n = 10$) B-在体肠灌流实验示意图 C-在体肠灌流回肠段组织中 TCA 水平 ($n = 5$) D-在体肠灌流肝门静脉血中 TCA 水平 ($n = 5$) E-外翻肠囊实验示意图 F-外翻肠囊囊内液中 TCA 水平 ($n = 5$) G-外翻肠囊肠囊组织中 TCA 水平 ($n = 5$)

A-TBA levels in serum, liver, gallbladder, ileum and feces ($n = 10$) B-schematic diagram of *in situ* intestinal perfusion C-TCA level in ileum of *in situ* intestinal perfusion ($n = 5$) D-TCA level in hepatic portal vein of *in situ* intestinal perfusion ($n = 5$) E-schematic diagram of everted ileum sac experiment F-TCA level in ileum sac fluid of everted ileum sac ($n = 5$) G-TCA level in ileum of everted ileum sac ($n = 5$)

图 2 栀子水提物对 ANIT 诱导的胆汁淤积小鼠胆酸盐的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effect of *G. jasminoides* water extract on bile acids in ANIT-induced cholestatic mice ($\bar{x} \pm s$)

3.3 栀子水提物对小鼠回肠及 MODE-K 细胞 ASBT 及 FXR 表达的影响

回肠 ASBT 是介导胆酸盐肠道重吸收的关键蛋白, 其表达受回肠 FXR 的负调控。如图 3-A、B 所

示, 与对照组比较, 模型组小鼠回肠 ASBT 及 FXR 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 栀子水提物中、高剂量组和熊去氧胆酸组回肠 ASBT 蛋白表达进一步降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 各

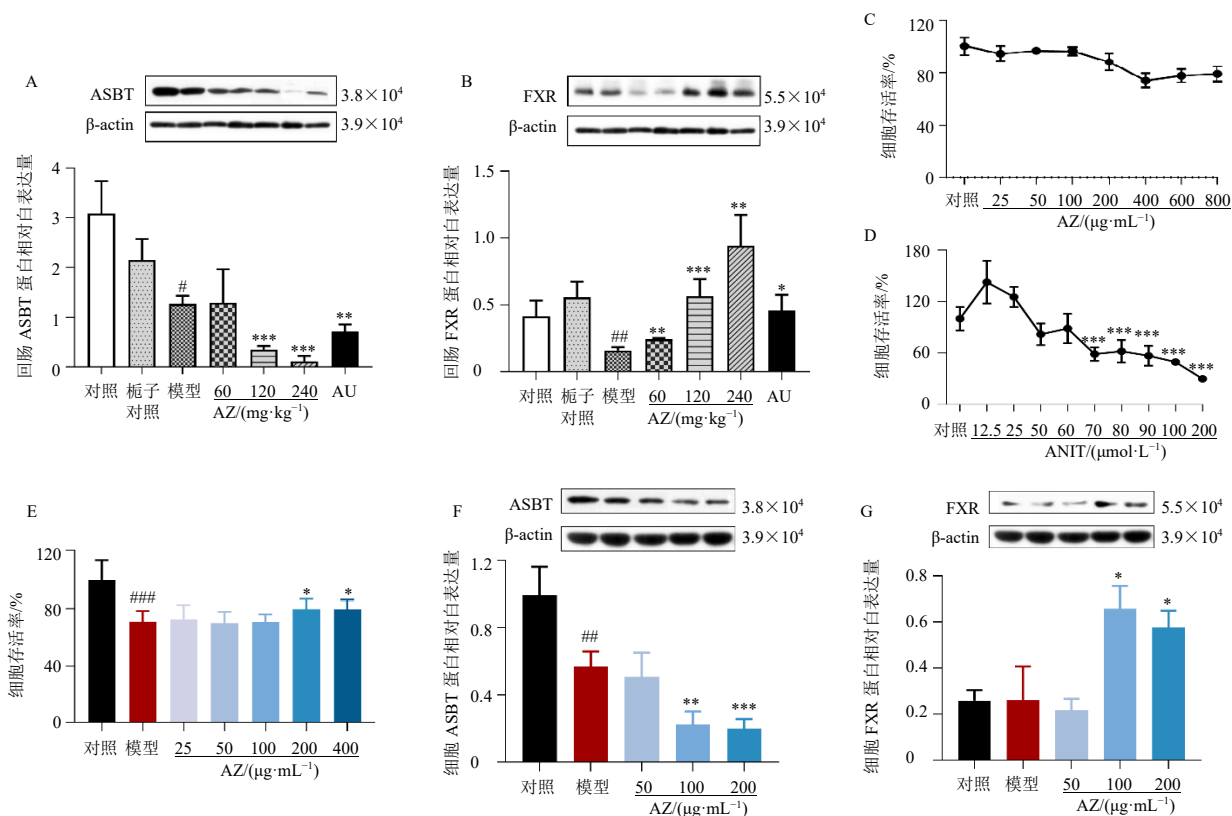


图3 栀子水提取物对小鼠回肠及 MODE-K 细胞 ASBT 及 FXR 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Fig. 3 Effect of *G. jasminoides* water extract on ASBT and FXR expressions in ileum of mice and MODE-K cells ($\bar{x} \pm s$)
 A-小鼠回肠组织 ASBT 蛋白表达 ($n = 3$) B-小鼠回肠组织 FXR 蛋白表达 ($n = 3$) C-栀子水提取物对 MODE-K 细胞活性的影响 ($n = 6$)
 D-ANIT 对 MODE-K 细胞活性的影响 ($n = 6$) E-栀子水提取物对 ANIT 细胞毒性的拮抗作用 ($n = 6$) F-MODE-K 细胞 ASBT 蛋白表达 ($n = 3$)
 G-MODE-K 细胞 FXR 蛋白表达 ($n = 3$)
 A-ASBT protein expression in ileum of mice ($n = 3$) B-FXR protein expression in ileum of mice ($n = 3$) C-effect of *G. jasminoides* water extract on MODE-K cells viability ($n = 6$) D-effect of ANIT on MODE-K cells viability ($n = 6$) E-antagonistic effect of *G. jasminoides* water extract on ANIT-induced cell toxicity ($n = 6$) F-ASBT protein expression in MODE-K cells ($n = 3$) G-FXR protein expression in MODE-K cells ($n = 3$)

图3 栀子水提取物对小鼠回肠及 MODE-K 细胞 ASBT 及 FXR 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of *G. jasminoides* water extract on ASBT and FXR expressions in ileum of mice and MODE-K cells ($\bar{x} \pm s$)

给药组回肠 FXR 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

为了进一步明确 FXR 对 ASBT 表达及功能的调控作用,采用小鼠小肠 MODE-K 细胞评价栀子水提取物对 ASBT 表达的影响。如图 3-C~E 所示,栀子水提取物在 $800 \mu\text{g}/\text{mL}$ 对 MODE-K 细胞活性无显著影响; ANIT ($70 \sim 200 \mu\text{mol}/\text{L}$) 显著抑制 MODE-K 细胞活性 ($P < 0.001$); 与 ANIT 组比较,栀子水提取物 (200 、 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$) 对 ANIT 导致的细胞毒性具有明显的保护作用 ($P < 0.05$)。如图 3-F、G 所示,与对照组比较,ANIT 可明显降低细胞 ASBT 的表达 ($P < 0.01$); 与 ANIT 组比较, 100 、 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的栀子水提取物能显著降低细胞 ASBT 的表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 上调 FXR 的表达 ($P < 0.05$)。

3.4 筛选栀子水提取物中潜在的药效物质

通过 UHPLC-QTOF-MS 中药非靶标代谢组学检

测,如图 4 所示,通过阳离子及阴离子模式下,栀子提取物、血中及回肠组织中共有的已知化合物 37 个,阳离子检测模式下有麦芽三糖、麦芽五糖、2-乙酰基-5-(四羟基丁基)咪唑、5,6-二甲基苯并咪唑、2,4-二羟基苯乙酮、(9Z,11E)-13-酮基-亚油酸、(-)-异松蒎醇、5-羟甲基-2-呋喃甲醛、玉叶金花苷酸、木樨榄苷-11-甲酯、9-O-11-(3-戊基-2-环氧乙烷)-10E-十一碳烯酸、6-羟基-7-甲氧基香豆素、4-羟基苯甲酸异丁酯、京尼平龙胆二糖苷、对甲氧基肉桂酸甲酯、1-苯基乙醇、京尼平、京尼平苷、3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸、7,8-二羟基-4-甲基香豆素、斑蝥素、10-羟基-2-癸烯酸、4-香豆酸、刺五加苷 E、丹皮酚、(1S)-(+)-樟脑醌、吡啶-3-乳酸、3,6-壬二烯醇、7-羟基-4-甲基香豆素-3-乙酸、2,6-二叔丁基-4-羟基苯酚、crocusatin C、2-hydroxyethyl gardemide A、jasminodiol、6'-O-sinapoyljasminoside C、epijasminoside A, 阴离子检测

模式下有戟叶马鞭草苷、京尼平苷、jasminoside A。提示这些化合物可能是潜在的活性物质，能到达靶部位发挥药效或激活肠道 FXR。

进一步对 37 个化合物通过计算机分子对接技

术，初步筛选出 23 种化合物可能为 FXR 受体潜在的激动剂（表 1），其通过激活肠道 FXR 而抑制 ASBT 对胆酸盐的重吸收作用，促进了胆酸盐的粪便排泄而缓解了肝脏胆酸盐蓄积。

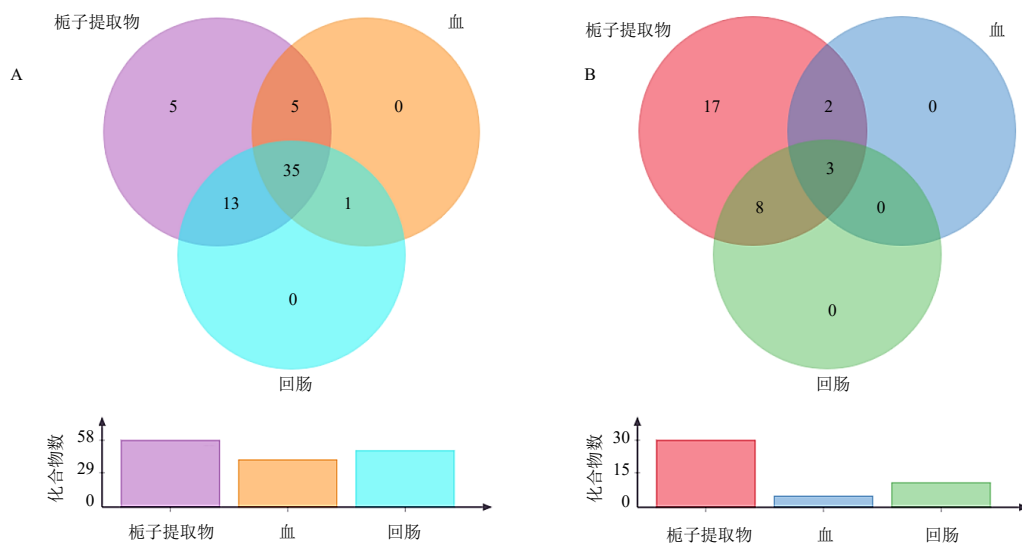


图 4 栀子水提取物、血液及回肠组织中质谱阳 (A) 和阴 (B) 离子监测模式下的化合物

Fig. 4 Compounds of *G. jasminoides* water extract, blood and ileum under positive (A) and negative (B) monitoring modes

表 1 基于 FXR-OCA 晶体结构筛选栀子水提取物中潜在的 FXR 激动剂

Table 1 Screening of potential FXR agonist from *G. jasminoides* water extract based on FXR-OCA crystal structure

化合物	CAS	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
奥贝胆酸 (阳性对照)	459789-99-2	-12.865
7-羟基-4-甲基香豆素-3-乙酸	5852-10-8	-7.975
9-O-11-(3-戊基-2-环氧乙烷)-10E-十一碳烯酸	478931-82-7	-7.792
7,8-二羟基-4-甲基香豆素	2107-77-9	-7.726
(-)-异松蒎醇	1196-00-5	-7.725
木樨榄苷-11-甲酯	60539-23-3	-7.605
麦芽三糖	1109-28-0	-7.547
玉叶金花苷酸	82451-22-7	-7.447
6-羟基-7-甲氧基香豆素	776-86-3	-7.360
京尼平苷	24512-63-8	-7.340
斑蝥素	56-25-7	-7.320
樟脑醌	2767-84-2	-7.260
吡啶-3-乳酸	1821-52-9	-7.225
1-苯基乙醇	98-85-1	-7.138
4-羟基苯甲酸异丁酯	4191-73-5	-7.109
2,6-二叔丁基-4-羟甲基苯酚	88-26-6	-7.008
丹皮酚	552-41-0	-6.931
5,6-二甲基苯并咪唑	582-60-5	-6.828
京尼平	6902-77-8	-6.778
2,4-二羟基苯乙酮	2161-85-5	-6.742
2-乙酰基-5-(四羟基丁基)咪唑	94944-70-4	-6.705
4-香豆酸	4501-31-9	-6.268
京尼平龙胆二糖苷	29307-60-6	-6.091
5-羟甲基-2-呋喃甲醛	67-47-0	-5.788

4 讨论

肝内胆汁淤积主要是胆酸盐肝肠循环障碍,使肝脏胆酸盐蓄积而引起肝毒性^[14]。本研究采用 ig ANIT (75 mg/kg) 诱导小鼠肝内胆汁淤积模型,血清中 ALT、AST、ALP 活性及 TBIL、TBA 水平均显著升高,且肝脏出现大面积桥接性坏死,胆囊充盈且胆汁颜色偏黑,与本课题组前期研究的结果一致^[15]。栀子水提物干预 14 d 后,血清生化指标均显著降低,且肝脏病理及胆囊形态均趋于正常小鼠,以高剂量效果最好,提示栀子水提物对 ANIT 诱导的肝内胆汁淤积具有明显的治疗作用,且这种作用存在剂量相关性。

肝脏胆酸盐蓄积是导致胆汁淤积肝损伤的主要原因。ANIT 诱导的肝内胆汁淤积可导致肝脏、胆囊、血清中胆酸盐显著升高,但粪便中胆酸盐降低,提示胆酸盐在肝脏蓄积,且肠道排泄途径受阻。栀子水提物 (240 mg/kg) 可显著减少肝脏及血清胆酸盐,增加粪便胆酸盐含量,提示栀子水提物可促进胆酸盐的粪便排泄。本课题组前期研究发现,栀子水提物可促进胆酸盐的尿液排泄^[5],本研究从另一个角度证实了栀子水提物的利胆作用。TCA 是回肠胆酸盐重吸收转运体 ASBT 的底物,且 TCA 常用作探针评价回肠 ASBT 的功能^[16]。在体肠灌流及外翻肠囊研究发现,ANIT 干预后,TCA 的回肠重吸收减少,而栀子水提物干预后 TCA 的回肠重吸收进一步减少,提示 ANIT 和栀子水提物均能抑制回肠 ASBT 对 TCA 的摄取。ANIT 诱导胆汁淤积模型后,虽然抑制了回肠对 ASBT 对 TCA 的重吸收过程,但粪便胆酸盐相比正常小鼠,其含量并未增加;然而,与 ANIT 组小鼠相比,栀子水提物却增加了粪便胆酸盐的排泄,提示栀子水提物除了进一步抑制了回肠 ASBT 对 TCA 的重吸收外,还可能促进了胆酸盐从回肠向粪便的排泄,如增加肠蠕动等,但尚需更多的研究证实。

回肠 ASBT 是介导胆酸盐重吸收的关键蛋白,约 95% 的胆酸盐经重吸收进入肝门静脉,再次入肝^[9],因此,阻断胆酸盐的重吸收途径、促进胆酸盐的粪便排泄,是近年来利胆药物开发的新思路,而 ASBT 也成为了治疗胆汁淤积的新靶点。研究证实抑制回肠 ASBT 可明显缓解小鼠胆汁淤积肝损伤^[8,10],且以 ASBT 为靶点治疗胆汁淤积相关疾病的药物 A4250 及 BAT117213 (二者均为 ASBT 抑制剂) 也进入了临床研究阶段^[11-12]。本研究发现,

栀子水提物能明显抑制小鼠回肠及肠道细胞中 ASBT 的表达,提示栀子水提物可阻断胆酸盐的回肠重吸收,从而减少胆酸盐的肝脏蓄积,而粪便胆酸盐的增加,则提示栀子进一步促进了胆酸盐的粪便排泄。回肠 ASBT 的表达和功能受回肠 FXR 的负调控^[14],因此,本研究进一步考察了栀子水提物对 FXR 的影响,发现栀子水提物可上调小鼠回肠及肠道细胞中 FXR 的表达,这可能是其抑制回肠 ASBT 表达的主要原因。此外,激动回肠 FXR 受体后,可通过回肠 FXR-成纤维细胞生长因子 15 (fibroblast growth factor 15, FGF15) 通路负反馈抑制肝脏胆固醇 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, Cyp7a1) 的表达及功能,减少肝脏胆酸盐的合成^[14],这可能是栀子水提物缓解肝脏胆酸盐蓄积毒性的另一途径,但尚需进一步验证。

药物通常吸收入血并由血液循环运送至靶部位,才能发挥相应的药物活性。因此,分析栀子水提物、血液及回肠中可能存在的化合物,或可找到潜在的栀子水提物的活性物质。本研究通过代谢组学技术分析发现,栀子水提物、血液及回肠组织中共同的并且已鉴定出的化合物共 37 个,并对这 37 个化合物通过计算机分子对接发现,有 23 个化合物可能是 FXR 的潜在激动剂,因此,基于这些化合物的进一步研究或可开发出以回肠 FXR-ASBT 通路为靶点的胆汁淤积治疗药物。

综上所述,栀子水提物可通过激活回肠 FXR 的功能,抑制回肠 ASBT 的表达和功能,减少胆酸盐的回肠重吸收,并促进回肠胆酸盐的粪便排泄,减少胆酸盐在肝脏的蓄积毒性,缓解了 ANIT 诱导的小鼠肝内胆汁淤积。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吴先昊,邓绍勇,王小青,等. 栀子果实性状、化学成分与其消炎利胆作用的关系研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7229-7235.
- [2] Zhang F, Wei Y H, Duan Y T, et al. Potential mechanism of cholagogic effect about *Gardenia jasminoides* Ellis (Zhizi)-mediated increase of bile acids urinary excretion in normal rats [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(4): 431-436.
- [3] Chen P, Chen Y, Wang Y R, et al. Comparative evaluation of hepatoprotective activities of geniposide, crocins and crocetin by CCl₄-induced liver injury in mice [J]. *Biomol Ther*, 2016, 24(2): 156-162.
- [4] Wang L L, Wu G X, Wu F H, et al. Geniposide attenuates

- ANIT-induced cholestasis through regulation of transporters and enzymes involved in bile acids homeostasis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 196: 178-185.
- [5] 张国强, 魏玉辉, 文苑洁, 等. 栀子水提物对雌激素诱导的胆汁淤积大鼠中硫酸化胆酸盐的影响及机制研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55(20): 1680-1685.
- [6] Chiang J Y L, Ferrell J M. Discovery of farnesoid X receptor and its role in bile acid metabolism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 548: 111618.
- [7] Duan S N, Li X, Fan G F, *et al.* Targeting bile acid signaling for the treatment of liver diseases: From bench to bed [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 152: 113154.
- [8] Yang N, Dong Y Q, Jia G X, *et al.* ASBT(SLC10A2): A promising target for treatment of diseases and drug discovery [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110835.
- [9] Li M, Wang Q, Li Y, *et al.* Apical sodium-dependent bile acid transporter, drug target for bile acid related diseases and delivery target for prodrugs: Current and future challenges [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 212: 107539.
- [10] Matye D J, Li Y, Chen C, *et al.* Gut-restricted apical sodium-dependent bile acid transporter inhibitor attenuates alcohol-induced liver steatosis and injury in mice [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2021, 45(6): 1188-1199.
- [11] Graffner H, Gillberg P G, Rikner L, *et al.* The ileal bile acid transporter inhibitor A4250 decreases serum bile acids by interrupting the enterohepatic circulation [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 43(2): 303-310.
- [12] Hegade V S, Kendrick S F, Dobbins R L, *et al.* BAT117213: Ileal bile acid transporter (IBAT) inhibition as a treatment for pruritus in primary biliary cirrhosis: Study protocol for a randomised controlled trial [J]. *BMC Gastroenterol*, 2016, 16(1): 71.
- [13] Jin Y W, Rao Z, Zhou Y, *et al.* Development of a LC-MS/MS method for simultaneous determination of bile acids and their conjugates in hepatocytes, tissue and fluids in rat [J]. *Curr Pharm Anal*, 2018, 14 (3): 331-341.
- [14] Molinaro A, Marschall H U. Bile acid metabolism and FXR-mediated effects in human cholestatic liver disorders [J]. *Biochem Soc Trans*, 2022, 50(1): 361-373.
- [15] Zhang G Q, Sun X H, Wen Y J, *et al.* Hesperidin alleviates cholestasis via activation of the farnesoid X receptor *in vitro* and *in vivo* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 885: 173498.
- [16] Takashima Y, Ishikawa K, Miyawaki R, *et al.* Modulatory effect of theaflavins on apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(33): 9585-9596.

[责任编辑 李亚楠]