

基于 FXR-SULT1E1 通路探究盐补骨脂致小鼠胆汁淤积性肝损伤的性别差异

吴育^{1,2}, 周浓^{2,3}, 梅春梅², 石芸², 华政颖², 李伟东^{2*}

1. 南京中医药大学南通附属医院, 江苏 南通 226000

2. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023

3. 重庆三峡学院, 重庆 404120

摘要:目的 从法尼醇受体 (farnesoid X receptor, FXR)-硫酸基转移酶 1E1 (sulfotransferase 1E1, SULT1E1) 通路探讨盐补骨脂致小鼠胆汁淤积性肝损伤性别差异的潜在机制。方法 ICR 雌性和雄性小鼠连续 ig 不同剂量 (5、10、20 g/kg) 的盐补骨脂水煎液 30 d, 采用 HPLC 仪检测补骨脂炮制后化学成分含量; 采用全自动生化仪检测肝损伤相关指标; 取肝脏、脾脏、肾脏、肺脏以及卵巢、睾丸, 称定质量并计算脏器指数; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法进行肝脏病理组织学检查; 采用透射电镜观察盐补骨脂致胆汁淤积性肝损伤的显微结构变化; 采用 ELISA 法检测血清中雌二醇 (estradiol, E₂)、促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、对氧磷酶 1 (paraoxonase 1, PON1) 及 FXR 含量; 采用免疫荧光染色法检测肝脏胆盐输出泵 (bile salt export pump, Bsep)、多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance protein 2, Mrp2) 和 SULT1E1 的表达; 采用 Western blotting 检测肝脏 FXR、Mrp2、胆固醇 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7a1)、Bsep、SULT1E1、肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α) 和核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 蛋白表达。结果 盐补骨脂给药后小鼠肝脏出现明显的肝细胞肿胀、胆管扩张、血清生化指标升高病理变化, 其中雌鼠更为严重 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。免疫荧光实验显示给药后肝脏 Bsep 和 Mrp2 荧光强度均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), 但雌鼠更为明显; 雌鼠肝脏中 SULT1E1 表达水平显著降低 ($P < 0.001$), 而在雄鼠的肝脏中没有差异。ELISA 结果显示雌鼠和雄鼠血清中 E₂、FSH 和 LH 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 雌鼠更为明显。Western blotting 结果显示, 雌鼠给药后肝脏 FXR、Mrp2、Bsep、SULT1E1、HNF4 α 和 Nrf2 表达明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), CYP7a1 表达显著升高 ($P < 0.01$); 雄鼠给药后 FXR 和 Bsep 表达明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 盐补骨脂通过 HNF4 α 调控 FXR-SULT1E1 信号通路, 补骨脂下调了胆固醇和胆汁酸生物合成的关键酶 SULT1E1, 增加了胆汁淤积性肝损伤的风险, 这可能是肝损伤性别差异的主要原因。

关键词: 盐补骨脂; 法尼醇受体-硫酸基转移酶 1E1 通路; 肝细胞核因子 4 α ; 胆汁淤积性肝损伤; 雌激素; 性别差异

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2802-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.013

Gender difference of cholestatic liver injury induced by salt-processed *Psoraleae Fructus* in mice based on FXR-SULT1E1 pathway

WU Yu^{1,2}, ZHOU Nong^{2,3}, MEI Chun-mei², SHI Yun², HUA Zheng-ying², LI Wei-dong²

1. Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nantong 226000, China

2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Engineering Center of Normalization and Standardization of Chinese Medicine Processing of Ministry of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of salt-processed Buguzhi (*Psoraleae Fructus*) induced gender difference of cholestatic liver injury in mice through farnesoid X receptor (FXR)-sulfotransferase 1E1 (SULT1E1) pathway. **Methods** ICR female and male mice were subjected to continuous ig of different dosages (5, 10, 20 g/kg) of salt-processed *Psoraleae Fructus* water

收稿日期: 2022-10-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773902); 国家自然科学基金面上项目 (81973484); 2022 年南京中医药大学自然科学基金资助项目 (XZR2021085)

作者简介: 吴育, 博士, 研究方向为中药学。E-mail: wylucky@njucm.edu.cn

*通信作者: 李伟东, 教授, 博士生导师。E-mail: liweidong0801@163.com

decoction for 30 d, and chemical composition content of processed *Psoraleae Fructus* was detected by HPLC; Fully automated biochemical analyzer was used to detect liver injury related indicators; Liver, spleen, kidney, lung, ovary and testis were taken and weighed, organ index was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used for histopathological examination of liver. The microscopic structure of cholestatic liver injury induced by salt-processed *Psoraleae Fructus* was observed by transmission electron microscopy. ELISA was used to detect the levels of estradiol (E_2), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), interleukin-6 (IL-6), paraoxonase 1 (PON1) and FXR in serum; The expressions of bile salt export pump (Bsep), multiple drug resistance protein 2 (Mrp2) and SULT1E1 in liver were detected by immunofluorescence staining; Western blotting was used to detect FXR, Mrp2, cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7a1), Bsep, SULT1E1, hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) and nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) protein expressions in liver. **Results** After the administration of salt-processed *Psoraleae Fructus*, liver of mice showed significant liver cell swelling, bile duct dilation, and elevated serum biochemical indicators, with female mice showing more severe pathological changes ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The immunofluorescence experiment showed that fluorescence intensity of Bsep and Mrp2 in liver were significantly decreased after administration ($P < 0.05, 0.001$), but it was more pronounced in female mice; The expression level of SULT1E1 was significantly reduced in liver of female mice ($P < 0.001$), while there was no difference in liver of male mice. ELISA results showed a significant increase in E_2 , FSH and LH levels in serum of both female and male mice ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), with female mice being more pronounced. Western blotting results showed that FXR, Mrp2, Bsep, SULT1E1, HNF4 α and Nrf2 expressions in liver of female mice after administration were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while the expression of CYP7a1 was significantly increased ($P < 0.01$); The expressions of FXR and Bsep in male mice were significantly decreased after administration ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Salt-processed *Psoraleae Fructus* regulates the FXR-SULT1E1 signaling pathway through HNF4 α , reduces the key enzyme SULT1E1 for cholesterol and bile acid biosynthesis, increases the risk of cholestatic liver injury, which may be the main reason for gender differences in liver injury.

Key words: salt-processed *Psoraleae Fructus*; farnesoid X receptor-sulfotransferase 1E1; hepatocyte nuclear factor 4 α ; cholestatic liver injury; estrogen; gender difference

补骨脂是豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实,几个世纪以来,补骨脂在中国被广泛用作补益中药,外用可治疗白癜风和牛皮癣。现代研究表明,作为一种雌激素补充剂,补骨脂具有抗菌、抗氧化和抗肿瘤作用,能改善腹泻、骨质疏松和抑郁症状^[1-2]。近年来,越来越多的研究报道了补骨脂的不良反应,尤其是肝损害,且肝损伤具有性别差异,文献报道补骨脂更易造成雌性大鼠肝损伤,但肝损伤性别差异的深层次原因并未阐明^[3]。研究表明,补骨脂给药后大鼠肝脏中 575 个蛋白发生了显著变化,其中 352 个蛋白显著上调,223 个蛋白显著下调,其中胆汁分泌、谷胱甘肽代谢、嘌呤代谢等代谢途径异常明显,提示胆汁酸代谢、氧化应激、能量代谢和免疫系统紊乱。补骨脂水提物会引起胆汁酸代谢中胆固醇 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7a1)、法尼醇受体 (farnesoid X receptor, FXR)、胆盐输出泵 (bile salt export pump, Bsep)、硫酸基转移酶 2A1 (sulfotransferase 2A1, SULT2A1) 等蛋白表达的改变^[4]。补骨脂素、异补骨脂素、bakuchiol 具有丰富的植物雌激素活性^[5-6],过量的类雌激素植物化学物质可引起肝脏损伤。雌激素可改变细胞膜胆固醇与磷脂的比例,影响 FXR

的活性,从而下调肝代谢转移酶 SULT1E1,引起肝脏多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance protein 2, Mrp2) 和 Mrp4 的上调,加剧肝损伤^[7]。SULT1E1 可催化雌激素发生硫酸化反应,硫酸化雌激素不能与雌激素受体结合而丧失雌激素的活性。研究显示,FXR 通过抑制过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 与肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α) 的结合,这种竞争减少了 HNF4 α 的乙酰化和核保留,进而抑制了依赖 HNF4 α 的 SULT1E1 基因的转录^[8-10]。

FXR 参与了促进胆汁酸稳态和胆汁淤积发病的主要调控机制。FXR 可调控胆汁酸的肝胆运输,诱导位于肝细胞小管膜的外排转运体的表达,这些转运体负责胆汁酸从肝细胞运输到胆管。FXR 可上调 Bsep 和 Mrp2,同时抑制 Na⁺-牛磺酸钠共转运体 (sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)、CYP7a1 和 CYP8b1 的表达^[11]。在配体激活后,FXR 通过诱导外排转运体 Bsep 和 Mrp2 的表达来促进胆汁酸的分泌^[12-14]。它还通过降低吸收 NTCP 和有机阴离子转运多肽 (organic anion transporting polypeptides, OATPs) 的表达来减少胆

汁酸的再吸收^[15]，此外，FXR 抑制 CYP7a1 和 CYP8b1 的表达，减少胆汁酸的合成，诱导 CYP3a2 和 SULT1E1 的表达^[16]。内源性和合成的雌激素都可以被 SULT1E1 代谢，如用于激素替代疗法和口服避孕药的激素。为了进一步探究盐补骨脂肝毒性的性别差异原因，本研究从 FXR-SULT1E1 信号通路着手，深度挖掘盐补骨脂肝损伤性别差异的机制，为更好地指导临床合理用药打下基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 ICR 小鼠 48 只，雌雄各半，14~16 周龄，体质量 32~36 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK (LU) 2016-0001，饲养于动物实验室中，按标准 12 h 光/暗循环饲养。所有动物均得到人道关怀，所有治疗方案均按照《中国实验动物管理立法规定》执行，并经南京中医药大学动物实验中心委员会批准（伦理批准号 202004A038）。

1.2 药材

补骨脂（批号 191101，产地为云南大理）购自安徽亳州中药市场，标本由南京中医药大学陈建伟教授鉴定为豆科植物补骨脂 *P. corylifolia* L. 的干燥成熟果实，凭证标本（编号 1804058）保存于南京中医药大学植物标本馆。

1.3 药品与试剂

对照品补骨脂素（批号 ZN-2011166，质量分数≥99.0%）、异补骨脂素（批号 ZN-2011166，质量分数≥98%）、补骨脂甲素（批号 ZN-2011137，质量分数≥99.0%）、corylifol A（批号 ZN-2006018，质量分数≥99.0%）、4'-O-甲基补骨脂查耳酮（批号 ZN-2001251，质量分数≥98%）、补骨脂定（批号 ZN-2001253，质量分数≥98%）、补骨脂宁（批号 ZN-2001251，质量分数≥99.0%）、补骨脂二氢黄酮甲醚（批号 ZN-2001251，质量分数≥99.0%）、新补骨脂异黄酮（批号 ZN-2011137，质量分数≥98%）、补骨脂苷（批号 ZN-2011166，质量分数≥99.0%）、异补骨脂苷（批号 ZN-2011166，质量分数≥98%）均购自世洲生物公司；甲醇（色谱纯，4 L，批号 20065159）和乙腈（色谱纯，4 L，批号 20075136）均购自美国天地有限公司；甲酸（色谱纯，500 mL，批号 C153320-83）购自上海麦克林生化科技有限公司；丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase, ALT）试剂盒（批号 30501KUD）、天冬氨酸氨基转移酶

（aspartate aminotransferase, AST）试剂盒（批号 30618IUB）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, ALP）试剂盒（批号 30401FUB）、总胆红素（total bilirubin, TBIL）试剂盒（批号 30810HUC）和总胆汁酸（total bile acid, TBA）试剂盒（批号 30101GUB）均购自南京澳林生物科技；小鼠 FXR 试剂盒（批号 02B190720）、小鼠白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）试剂盒（批号 01A120820）、小鼠雌二醇（estradiol, E₂）试剂盒（批号 02A160920）、小鼠促卵泡激素（follicle-stimulating hormone, FSH）试剂盒（批号 01C230920）、小鼠 SULT1E1 试剂盒（批号 832X724744）、促黄体生成素（luteinizing hormone, LH）试剂盒（批号 04A160820）、对氧磷酶 1（paraoxonase 1, PON1）试剂盒（批号 03D170920）购自 Anglegene 公司；FXR 抗体（批号 L1719）、CYP7a1 抗体（批号 H1321）、HNF4a 抗体（批号 H1820）、SULT2A1 抗体（批号 G1917）购自美国 Santa 公司；Mrp2 抗体（批号 2927）、Bsep 抗体（批号 2928）、核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nr2f2）抗体（批号 5814）、SULT1E1 抗体（批号 2928）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）抗体（批号 9217）购自 SAB 公司；生物素标记的山羊抗小鼠 IgG/FITC 抗体购自英国 Abcam 公司；10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒（批号 03531360）购自上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.4 仪器

AU680 型全自动生化仪、Microfuge 22R 型离心机（美国 Beckman Coulter 公司）；酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）；DM1L 型倒置荧光显微镜（德国莱卡公司）；HT7700 型透射电子显微镜（TEM，日本日立公司）；自动曝光仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2 方法

2.1 盐补骨脂成分测定

2.1.1 盐补骨脂饮片的制备 取补骨脂适量，加盐水拌匀，闷透，置炒制容器内，以文火加热，炒至规定的程度时，取出，放凉，即得盐补骨脂。盐炙时，每 100 千克饮片用食盐 2 kg。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别取 4'-O-甲基补骨脂查耳酮、补骨脂甲素、corylifol A、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂宁、新补骨脂异黄酮、补骨脂

定、补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素对照品适量,精密称定,分别置于10 mL量瓶中,加入甲醇至刻度,得各个对照品储备液;再分别精密量取各个对照品储备液适量至同一10 mL量瓶中,加入甲醇至刻度,制成质量浓度分别为14.70、22.15、31.46、14.90、32.63、33.81、76.44、237.16、515.48、68.21、65.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取盐补骨脂粉末(过4号筛)约10 g,精密称定,置于250 mL圆底烧瓶中,加入纯水100 mL浸泡30 min,回流提取,保持微沸20 min,滤过,药渣再加入纯水80 mL,回流,保持微沸20 min,滤过,合并2次滤液,减压浓缩,定容至100 mL,精密量取浓缩液1 mL,加入无水乙醇1 mL,12 000 r/min离心10 min,取上清液过0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.4 色谱条件 Kromasil C₁₈色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~3 min, 5% A; 3~15 min, 5%~15% A; 15~25 min, 15%~18% A; 25~35 min, 18%~35% A; 35~50 min, 35%~40% A; 50~55 min, 40%~50% A; 55~70 min, 50%~100% A; 70~88 min, 100%~5% A; 88~90 min, 5% A; 体积流量为1 mL/min;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为254 nm;进样量为10 μL 。

2.1.5 方法学考察 结果显示具有专属性;线性关系均达到0.999以上;精密密度试验RSD均小于3%,表明仪器精密密度良好;重复性试验RSD均小于3%,表明该方法重复性良好;稳定性试验RSD均小于3.0%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好;各成分的加样回收率均在95%~105%,表明该方法准确度良好。

2.2 盐补骨脂对雌、雄鼠的肝毒性研究

2.2.1 分组与给药 分别取140 g盐补骨脂,按传统煎煮方法煎煮,第1次加8倍量水煎煮,第2次加6倍量水煎煮,煎煮液浓缩至200 mL,冷冻干燥,制成冻干粉,用于后续毒性试验。将雌、雄ICR小鼠随机分为对照组和盐补骨脂低、中、高剂量(5、10、20 g/kg)组,对照组ig生理盐水(10 mL/kg),各给药组ig相应药物,1次/d,连续30 d^[17]。

2.2.2 样本采集 给药结束后,小鼠禁食不禁水24 h,次日取材;最后一次给药24 h后经眼后静脉采血,血清4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,3000 r/min离心15 min,静置4 h,取上清液于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取血结束后,将小鼠腹部

剖开,于9:00~13:00时取出肝脏。先将肝左叶剪下一小块,固定于10%多聚甲醛中,保存待测。剩余部分一剪为二,部分肝脏在液氮中快速淬灭,分别用冻存管保存起来,做好标记放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。分别称定肝脏、肾脏、脾脏质量,计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \text{器官质量}/\text{体质量} \times 1000$$

2.2.3 血清生化指标检测 采用全自动生化仪检测48个血清样本中ALT、AST、ALP活性及TBA、TBIL含量。

2.2.4 肝脏组织苏木素-伊红(HE)染色 取固定于10%多聚甲醛溶液中的小鼠肝脏样本,切取约2 mm厚度的肝组织修整备用。经脱水、浸泡、浸蜡、包埋、切片、染色等程序,于显微镜下观察,采集图像分析。

2.2.5 TEM 观察肝脏超微结构变化 新鲜组织确定取材部位,尽量减小牵拉、挫伤与挤压等机械损伤,组织体积不超过1 mm \times 1 mm \times 1 mm,迅速投入电镜固定液,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定2~4 h。0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗3次,每次15 min;1%锇酸-0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.4)室温固定2 h,0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗3次,每次15 min。经脱水、浸泡、浸蜡、包埋、切片、染色等程序,TEM下观察,采集图像分析。

2.2.6 ELISA 检测血清中E₂、FSH、LH、FXR、PON1和IL-6水平 取保存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下的血清,按试剂盒说明书检测血清中E₂、FSH、LH、FXR、PON1和IL-6水平。

2.2.7 免疫荧光检测肝组织中Bsep、Mrp2和SULT1E1蛋白表达 将-80 $^{\circ}\text{C}$ 下的新鲜肝组织制成7 mm薄的冰冻切片,分别滴加Bsep、Mrp2、SULT1E1抗体(1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用PBS冲洗;滴加与生物素标记的山羊抗小鼠IgG/FITC抗体(1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,回收二抗。滴加DAPI工作液染核,室温孵育10~20 min,回收DAPI,滴加5~10 μL 抗荧光衰减封片剂,于共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.2.8 Western blotting 检测肝组织中HNF4 α 、SULT1E1、FXR、Mrp2、CYP7a1、Bsep和Nrf2蛋白表达 将-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的肝组织冰上融化,称取约30 mg,加入RIPA与cocktail按照100:1比例配成的裂解液,使用BCA试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转

至 PVDF 膜, 加入 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 分别加入抗体, 4 °C 孵育过夜。复温 30 min, 回收抗体, PBST 洗膜 3 次, 加入二抗, 在摇床上常温孵育 2 h, 洗膜 3 次。加入 ECL 化学发光液, 利用自动曝光仪进行检测, 使用 Image J 软件进行半定量分析。

2.3 统计学处理

所有数据使用 GraphPad Prism v.8 进行统计, 并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间的差异采用 *T* 检验, 多重比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行分析。

3 结果

3.1 盐补骨脂水煎液成分含量测定

盐补骨脂水煎液经 HPLC 检测, 其 11 种成分均被检测到。补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂苷、异补骨脂苷是其含量较高的化学成分; 补骨脂甲素、corylifol A、补骨脂二氢黄酮甲醚、新补骨脂异黄酮含量次之; 4'-*O*-甲基补骨脂查耳酮、补骨脂宁、补骨脂定含量相对较低。结果见表 1。

3.2 血清生化检测结果

根据临床医学中诊断和评估肝损伤最常用的 5 种生物标志物, 检测 ALT、AST、ALP 活性以及 TBA、TBIL 水平, 结果如图 1 所示。与对照组比较, 雌、雄鼠盐补骨脂高剂量组 ALT 活性显著升高 ($P < 0.05$), 雌、雄鼠盐补骨脂各剂量组 AST、ALT 活性及 TBA、TBIL 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。雌、雄鼠盐补骨脂高剂量组 TBA 水平有显

表 1 盐补骨脂水煎液中各成分的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Contents of components in decoction of salt-processed *Psoraleae Fructus* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

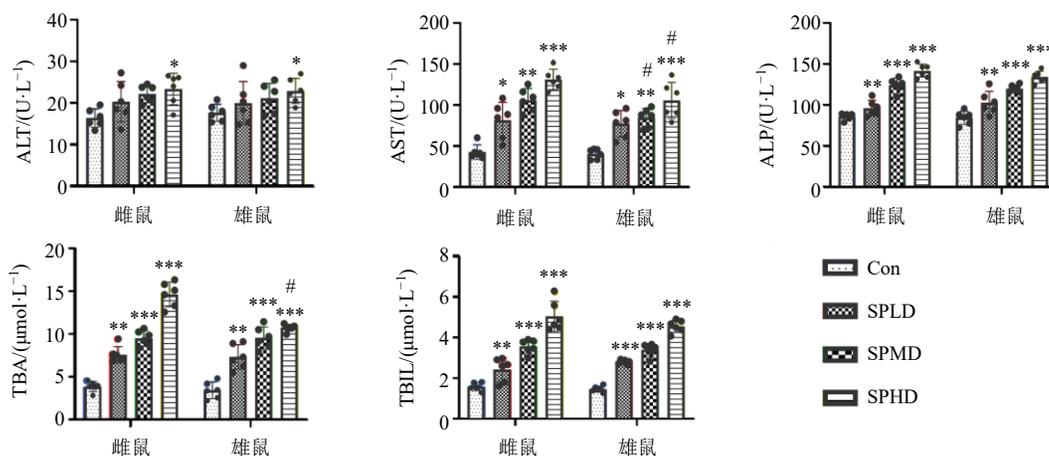
| 成分 | 质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
|------------------------|---|
| 4'- <i>O</i> -甲基补骨脂查耳酮 | 5.77 ± 0.58 |
| 补骨脂甲素 | 21.32 ± 3.48 |
| corylifol A | 69.11 ± 9.73 |
| 补骨脂二氢黄酮甲醚 | 26.49 ± 3.70 |
| 补骨脂宁 | 9.89 ± 3.52 |
| 新补骨脂异黄酮 | 23.36 ± 6.07 |
| 补骨脂定 | 17.23 ± 1.48 |
| 补骨脂苷 | 687.82 ± 82.55 |
| 异补骨脂苷 | 398.91 ± 47.11 |
| 补骨脂素 | 278.76 ± 39.00 |
| 异补骨脂素 | 262.50 ± 36.62 |

著差异 ($P < 0.05$), 雌、雄鼠盐补骨脂中、高剂量组 AST 活性有显著差异 ($P < 0.05$)。

ALP ≥ 2 ULN、 $R \leq 2$ [$R = (\text{ALT 测定值} / \text{ALT ULN}) / (\text{ALP 测定值} / \text{ALP ULN})$, ULN 为正常上限] 为国际医学组织理事会 (Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS) 修订的药物性肝损害 (drug induced liver injury, DILI) 标准。无论雌鼠还是雄鼠, 其盐补骨脂高剂量组各指标较盐补骨脂低、中剂量组均有升高趋势, 肝损伤与剂量呈正相关。

3.3 肝组织病理变化

如图 2 所示, 各给药组小鼠均出现不同程度的炎性细胞轻度浸润; 雌鼠盐补骨脂高剂量组出现部

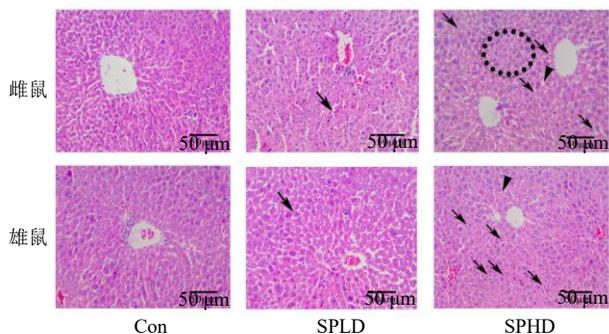


Con-对照组 SPLD-盐补骨脂低剂量组 SPMD-盐补骨脂中剂量组 SPHD-盐补骨脂高剂量组 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与雌鼠同等剂量的给药组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同

Con-control group SPLD-salt-processed *Psoraleae Fructus* low-dose group SPMD-salt-processed *Psoraleae Fructus* medium-dose group SPHD-salt-processed *Psoraleae Fructus* high-dose group * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs equivalent dose administration group in female, same as below figures

图 1 盐补骨脂对不同性别小鼠肝毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of salt-processed *Psoraleae Fructus* on hepatotoxicity in mice with different genders ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



箭头表示炎性浸润，虚线表示点状坏死，三角表示 Kupffer 细胞增加

arrows indicate inflammatory infiltration, dashed lines indicate punctate necrosis, and triangles indicate an increase in Kupffer cells

图 2 盐补骨脂对不同性别小鼠肝组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of salt-processed *Psoraleae Fructus* on pathological changes of liver tissue in mice with different genders (HE, × 200)

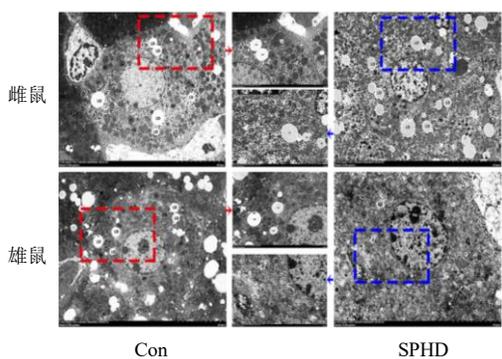
表 2 盐补骨脂对不同性别小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of salt-processed *Psoraleae Fructus* on organ indices in mice with different genders ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 性别 | 组别 | 剂量/(g·kg ⁻¹) | 肝指数 | 脾指数 | 肺指数 | 肾指数 | 卵巢或睾丸指数 |
|----|------|--------------------------|----------------|--------------|-------------|---------------|----------------|
| 雌鼠 | 对照 | — | 37.49 ± 5.11 | 4.13 ± 0.89 | 6.22 ± 0.48 | 11.95 ± 0.47 | 0.82 ± 0.08 |
| | 盐补骨脂 | 5 | 40.45 ± 5.29 | 5.30 ± 1.64 | 6.47 ± 0.67 | 12.10 ± 0.40 | 0.99 ± 0.12* |
| | | 10 | 44.43 ± 2.99* | 5.60 ± 1.14 | 6.10 ± 0.33 | 11.47 ± 0.32 | 1.08 ± 0.07*** |
| 雄鼠 | 对照 | — | 37.25 ± 3.75 | 3.87 ± 1.43 | 5.37 ± 0.35 | 14.07 ± 0.92 | 9.45 ± 0.51 |
| | 盐补骨脂 | 5 | 41.94 ± 2.23* | 5.18 ± 2.18 | 5.48 ± 1.09 | 15.93 ± 1.68* | 7.60 ± 1.28** |
| | | 10 | 42.03 ± 3.68* | 5.79 ± 0.84* | 5.16 ± 0.62 | 15.85 ± 0.94* | 7.36 ± 0.64** |
| | | 20 | 44.12 ± 4.00** | 5.25 ± 1.26 | 5.31 ± 0.54 | 15.99 ± 2.01* | 7.58 ± 1.51** |

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs control group



虚线框表示局部放大倍数 (×2500)

dotted boxes represent the local magnification (× 2500)

图 3 盐补骨脂对不同性别小鼠肝细胞超微结构的影响 (×1000)

Fig. 3 Effect of salt-processed *Psoraleae Fructus* on ultrastructure of liver cells in mice with different genders (× 1000)

炎性浸润。雌鼠盐补骨脂低剂量组肝细胞明显水肿，分脂肪变性，明显水肿，炎细胞增多，肝局灶性坏死。雄鼠盐补骨脂低剂量组同样存在肝细胞水肿，炎性细胞浸润；雄鼠盐补骨脂高剂量组部分肝细胞脂肪化，水肿较明显，炎性细胞增多，但未见肝局灶性坏死。

3.4 各组小鼠脏器指数

如表 2 所示，与对照组比较，雌鼠盐补骨脂中、高剂量组肝指数显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，雌鼠盐补骨脂各剂量组卵巢指数显著升高 ($P < 0.05, 0.001$)。雄鼠盐补骨脂各剂量组肝指数、肾指数和睾丸指数均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，雄鼠盐补骨脂中剂量组脾指数显著升高 ($P < 0.05$)。

3.5 肝组织超微结构变化

采用 TEM 观察盐补骨脂致胆汁淤积性肝损伤小鼠肝脏的超微结构变化，如图 3 所示，雌、雄鼠

对照组的肝细胞内基质分布均匀，肝细胞间胆管正常。盐补骨脂高剂量组肝细胞器明显肿胀，胆管扩张；细胞核不规则，局部皱缩，多核；线粒体增多，且大部分肿胀；膜内基质溶解，线粒体嵴破裂消失；内质网部分扩张，表面有核糖体附着；此外，脂滴丰富且局部聚集；糖原丰富，并分离出溶酶体。这些现象在雌鼠和雄鼠中均有发现。但雌鼠肝细胞损伤较雄鼠严重；雌鼠肝细胞器明显肿胀，胆管扩张更为明显，少量絮状物及粉砂质胆管淤积。

3.6 各组小鼠血清中 E₂、FSH、LH、FXR、PON1 和 IL-6 水平

血清 PON1 水平下降是肝脏损伤的早期指标，已被证明比测定 AST 和 ALT 活性更敏感^[13]。如图 4 所示，与对照组比较，盐补骨脂各剂量组小鼠 PON1 水平明显下降 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)，其中

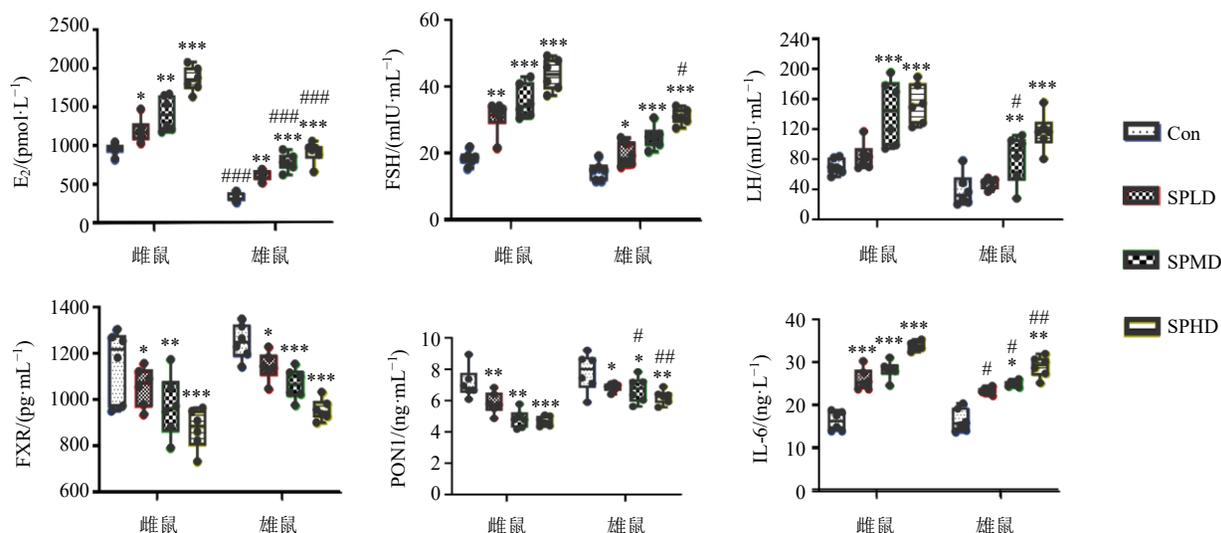


图4 盐补骨脂对不同性别小鼠血清中 E₂、FSH、LH、FXR、PON1 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of salt-processed *Psoraleae Fructus* on E₂, FSH, LH, FXR, PON1 and IL-6 levels in serum of mice with different genders ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

盐补骨脂中、高剂量组雌鼠 PON1 水平下降较雄鼠更为显著 ($P < 0.05, 0.01$), 揭示了性别差异。IL-6 水平的变化趋势与 PON1 水平相反, 与对照组比较, 盐补骨脂中、高剂量组的雄鼠和各给药组的雌鼠 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 其中盐补骨脂各剂量组雌鼠 IL-6 水平升高较雄鼠更为显著 ($P < 0.05, 0.01$), 表明雌鼠更容易肝损伤并发生炎症。FXR 维持胆汁酸稳态, 是胆汁酸水平最重要的传感器之一。FXR 水平在雌鼠和雄鼠各给药组中均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。根据文献和临床不良反应报道^[3]的分析, 对雌激素水平的几个指标进行检测。雌鼠和雄鼠各给药组的 E₂ 和 FSH 水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 雌鼠和雄鼠盐补骨脂中、高剂量组的 LH 水平均显著升高 ($P < 0.01, 0.001$), 其中盐补骨脂高剂量组雌鼠的 FSH 水平升高较雄鼠更为显著 ($P < 0.05$), 盐补骨脂中剂量组雌鼠 LH 水平升高较雄鼠更为显著 ($P < 0.05$), 盐补骨脂中、高剂量组雌鼠 E₂ 水平升高较雄鼠更为显著 ($P < 0.001$), 对照组雌鼠 E₂ 水平较雄鼠显著升高 ($P < 0.001$)。

3.7 免疫荧光检测小鼠肝组织 Bsep、Mrp2 和 SULT1E1 蛋白表达

为了进一步证实盐补骨脂诱导的小鼠肝毒性与胆汁酸转运之间的关系, 采用免疫荧光染色法检测肝脏 Bsep、Mrp2 和 SULT1E1 的表达。如图 5 所

示, 雌、雄鼠盐补骨脂高剂量组肝脏中 Bsep 和 Mrp2 表达均显著下降 ($P < 0.05, 0.001$), SULT1E1 表达仅在雌鼠肝脏中显著降低 ($P < 0.001$), 而在雄鼠的肝脏中无显著变化。

3.8 Western blotting 检测小鼠肝组织胆汁酸代谢及转运蛋白表达

如图 6-A 所示, 雌、雄鼠对照组肝组织 HNF4 α 和 SULT1E1 蛋白表达有显著差异 ($P < 0.05, 0.01$)。如图 6-B 所示, 与对照组比较, 雌鼠盐补骨脂中、高剂量组合成相关酶 CYP7a1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 代谢相关酶 SULT1E1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 提示盐补骨脂能够加速胆汁酸的合成, 降低胆汁酸的代谢。雌鼠盐补骨脂中、高剂量组外排转运蛋白 Bsep 和 Mrp2 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 雄鼠各给药组 Bsep 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 提示胆汁排泄障碍是胆汁淤积性肝损伤的重要原因。Nrf2 是一种重要的转录因子, 可调控肝脏中一系列解毒和抗氧化防御基因的表达, 雌鼠盐补骨脂中、高剂量组 Nrf2 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 说明经盐补骨脂处理后, 肝脏解毒功能受到抑制。雌鼠盐补骨脂低、中剂量组 FXR 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 雄鼠盐补骨脂中、高剂量组 FXR 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 雌鼠各给药组 HNF4 α 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01, 0.001$)。

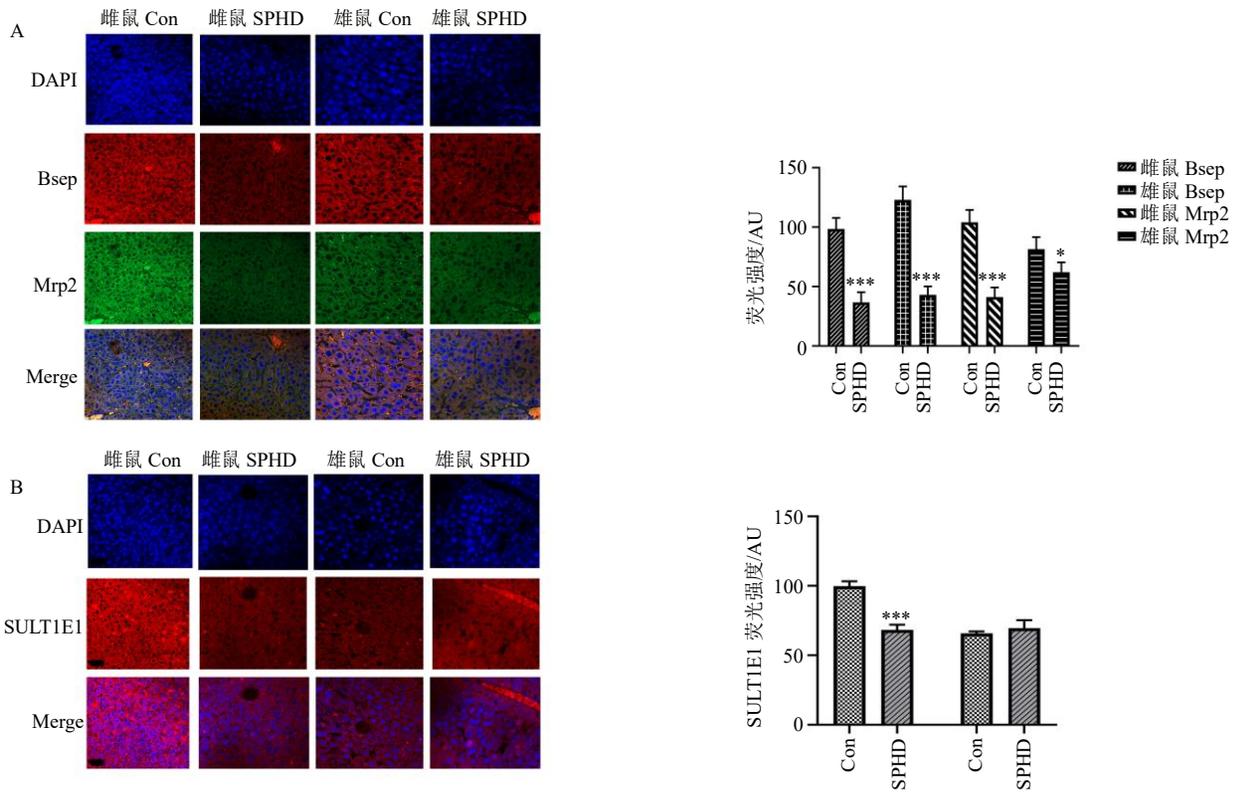
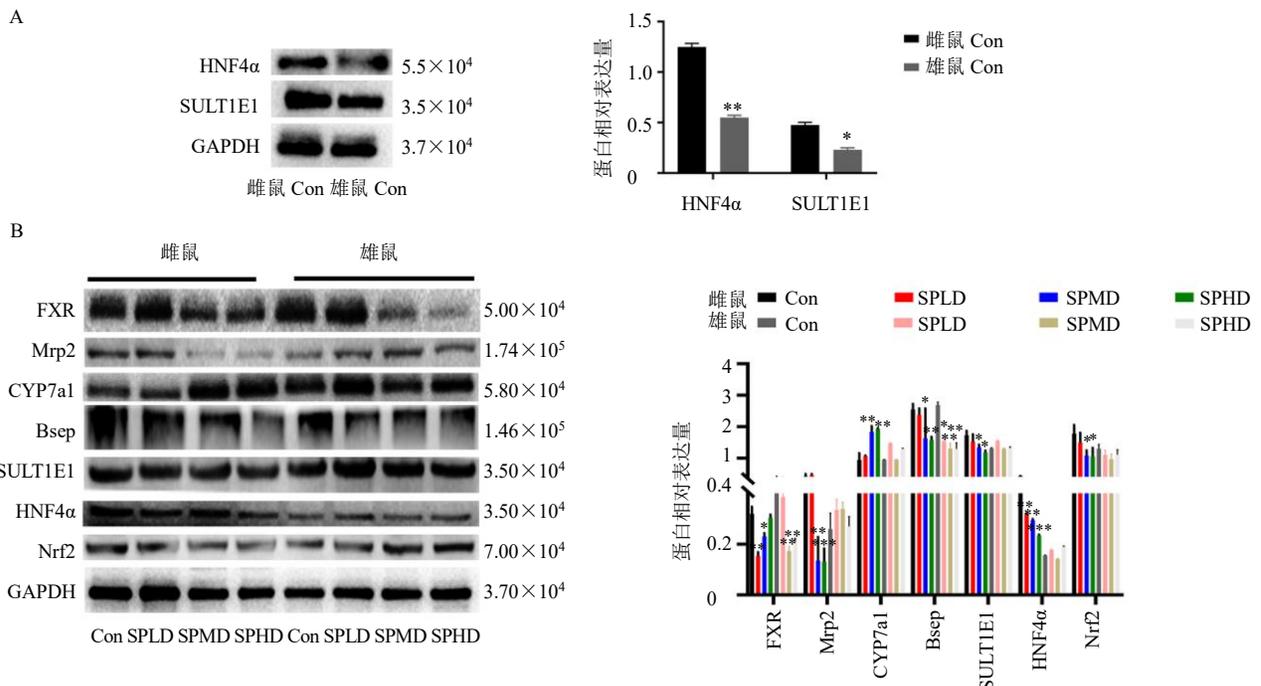


图5 盐补骨脂对不同性别小鼠肝组织 Bsep、Mrp2 (A) 和 SULT1E1 (B) 表达的影响

Fig. 5 Effect of salt-processed *Psoraleae Fructus* on Bsep, Mrp2 (A) and SULT1E1 (B) expressions in liver of mice with different genders



A-对照组雌、雄小鼠肝组织 HNF4α 和 SULT1E1 蛋白表达 B-各组肝组织 FXR、Mrp2、CYP7a1、Bsep、SULT1E1、HNF4α 和 Nrf2 蛋白表达
A-HNF4α and SULT1E1 protein expressions in liver of female and male mice in control group B-FXR, Mrp2, CYP7a1, Bsep, SULT1E1, HNF4α and Nrf2 protein expressions in liver of each group

图6 盐补骨脂对不同性别小鼠胆汁酸代谢及转运蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of salt-processed *Psoraleae Fructus* on bile acid metabolism and transporter protein expressions in liver of mice with different genders ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

补骨脂最早见于《开宝本草》，具有补肾壮阳、固精缩尿、温脾止泻的功效，其味辛、苦，性温，盐炙后能和其辛窜温燥之性，并引药入肾。但现代临床研究表明，补骨脂具有肝毒性，长期使用可能会在一定程度上造成肝损害。研究发现，补骨脂致肝损伤相关的主要信号通路包括磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路等，可能是通过对细胞凋亡、黏着斑、胆汁分泌等的调控引起的^[18-19]。本研究发现，雌性和雄性小鼠肝脏水肿伴炎症浸润，肝损伤程度与盐补骨脂剂量呈正相关。雌性和雄性小鼠盐补骨脂高剂量组均出现部分脂肪变性、明显水肿和 Kupffer 细胞数量可疑增加，并且雌性小鼠盐补骨脂高剂量组局部坏死。血清生化结果显示，雌、雄鼠盐补骨脂高剂量组 AST、APL、ALT 活性及 TBA、TBIL 水平明显高于对照组，且存在一定的剂量相关性。雌鼠的 AST 活性和 TBA 水平普遍高于雄鼠，提示雌鼠肝脏损伤可能更为严重。PON1 是肝脏损伤的早期指标，比 AST 和 ALT 活性更敏感^[20]。盐补骨脂各剂量组小鼠 PON1 水平显著降低，雌性小鼠盐补骨脂中、高剂量组 PON1 水平的下降较雄性小鼠更明显，揭示了性别差异。与对照组比较，雌性和雄性小鼠 IL-6 水平均升高；而且，雌性小鼠盐补骨脂中、高剂量组较雄性小鼠增加更为显著，表明雌性小鼠更容易发生肝损伤和炎症。TEM 结果显示，盐补骨脂处理后，肝细胞受到影响，细胞器明显肿胀，胆管明显扩张；肝细胞内的线粒体数量也在治疗后增加，且大部分肿胀；膜内基质变苍白溶解，线粒体嵴破裂消失；内质网部分扩张，脂滴丰富，局部聚集；糖原丰富，溶酶体分离；未见脂滴。这些现象在雄性和雌性小鼠中均有发现。TEM 分析还发现，雌性小鼠肝细胞损伤较严重，肝细胞器肿胀更明显，胆管扩张更明显，少量絮状和粉砂质胆囊淤积。

肝脏是雌激素代谢的主要部位，而 SULT1E1 长期以来被认为是一种 II 期代谢酶，其主要功能是将雌激素磺胺酶失活。盐补骨脂通过抑制外排转运蛋白 Bsep 和 Mrp2 来减少胆汁酸的肝脏摄取和外排，同时上调 CYP7a1 增加肝脏中胆汁酸的合成。

SULT1E1 对疾病的影响可能是组织特异性的和/或性别特异性^[21]。研究者发现绝经后乳腺癌患者的血浆脱氧胆酸水平比健康对照组高 52%^[22]，胆汁相关疾病和雌激素密切相关。HNF4 α 为 SULT1E1 提供能量，是其主要调节因子。盐补骨脂对肝损伤的影响在性别上有显著差异。雌性小鼠 SULT1E1 和 HNF4 α 的表达水平显著降低，而雄性小鼠则没有显著性差异。当 HNF4 α (一种已知的 SULT1E1 的激活因子) 被沉默时，SULT1E1 的调控被取消。FXR 通过抑制 PGC-1 α 与 HNF4 α 的结合在转录上调控 SULT1E1 的表达^[23]。FXR 对胆汁淤积症期间 E₂ 代谢的影响已被报道，E₂ 水平升高与胆汁淤积患者胆汁酸浓度呈正相关^[24]。胆管结扎使小鼠血清 E₂ 水平升高，而 FXR^{-/-}小鼠的这一作用有所减轻。本研究证实，盐补骨脂通过 HNF4 α 调控 FXR-SULT1E 信号通路，HNF4 α 和 SULT1E1 是引起胆汁淤积的重要因素，也可能是导致肝损伤严重程度存在性别差异的主要原因。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 195.
- [2] 许妍, 吴育, 谢辉, 等. 补骨脂盐炙前后对去卵巢大鼠的骨保护作用及其机制 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(7): 948-952.
- [3] Wang L, Wang Y, Wee A, *et al.* Clinicopathological features of Bu Gu Zhi-induced liver injury, a long-term follow-up cohort study [J]. *Liver Int*, 2020, 40(3): 571-580.
- [4] Duan J Y, Dong W Y, Xie L J, *et al.* Integrative proteomics-metabolomics strategy reveals the mechanism of hepatotoxicity induced by *Fructus Psoraleae* [J]. *J Proteomics*, 2020, 221: 103767.
- [5] Mao H P, Wang H, Ma S W, *et al.* Bidirectional regulation of bakuchiol, an estrogenic-like compound, on catecholamine secretion [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 274(1): 180-189.
- [6] Lim S H, Ha T Y, Ahn J, *et al.* Estrogenic activities of *Psoralea corylifolia* L. seed extracts and main constituents [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(5): 425-430.
- [7] Ruhl C E, Everhart J E. Association of diabetes, serum insulin, and C-peptide with gallbladder disease [J]. *Hepatology*, 2000, 31(2): 299-303.
- [8] Hu H, Negishi M. ROR α phosphorylation by casein kinase 1 α as glucose signal to regulate estrogen sulfation in human liver cells [J]. *Biochem J*, 2020, 477(18): 3583-3598.

- [9] Liu X J, Xue R Y, Yang C T, *et al.* Cholestasis-induced bile acid elevates estrogen level via farnesoid X receptor-mediated suppression of the estrogen sulfotransferase SULT1E1 [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(33): 12759-12769.
- [10] Wang S, Yuan X, Lu D Y, *et al.* Farnesoid X receptor regulates SULT1E1 expression through inhibition of PGC1 α binding to HNF4 α [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 145: 202-209.
- [11] Herraes E, Gonzalez-Sanchez E, Vaquero J, *et al.* Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(9): 2565-2576.
- [12] Meng Q, Chen X L, Wang C Y, *et al.* Protective effects of alisol B₂₃-acetate via farnesoid X receptor-mediated regulation of transporters and enzymes in estrogen-induced cholestatic liver injury in mice [J]. *Pharm Res*, 2015, 32(11): 3688-3698.
- [13] Wang L P, Luo Q, Zeng S J, *et al.* Disordered farnesoid X receptor signaling is associated with liver carcinogenesis in Abcb11-deficient mice [J]. *J Pathol*, 2021, 255(4): 412-424.
- [14] Ren T Q, Pang L W, Dai W L, *et al.* Regulatory mechanisms of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) and its role in related diseases [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2021, 45(6): 101641.
- [15] Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(1): 155-168.
- [16] Chiang J Y L. Bile acid metabolism and signaling [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(3): 1191-1212.
- [17] 符映均, 吴育, 梅春梅, 等. 补骨脂炮制前后水煎液致雌性 ICR 小鼠胆汁淤积性肝损伤作用比较 [J]. *中草药*, 2022, 53(5): 1434-1441.
- [18] 曹站霞, 陈毓龙, 李伟霞, 等. 基于网络药理学和细胞试验探讨补骨脂致肝损伤的毒理机制 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(16): 2052-2062.
- [19] 陈成龙, 姜欣洋, 刘兰玲, 等. 基于整合网络毒理学和分子对接的补骨脂酚致肝毒性机制探讨 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(2): 251-258.
- [20] Soliman A M, Karam H M, Mekkawy M H, *et al.* Antioxidant activity of novel quinazolinones bearing sulfonamide: Potential radiomodulatory effects on liver tissues via NF- κ B/PON1 pathway [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 197: 112333.
- [21] Barbosa A C S, Feng Y, Yu C H, *et al.* Estrogen sulfotransferase in the metabolism of estrogenic drugs and in the pathogenesis of diseases [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2019, 15(4): 329-339.
- [22] Costarelli V, Sanders T B. Plasma deoxycholic acid concentration is elevated in postmenopausal women with newly diagnosed breast cancer [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2002, 56(9): 925-927.
- [23] Kodama S, Hosseinpour F, Goldstein J A, *et al.* Liganded pregnane X receptor represses the human sulfotransferase SULT1E1 promoter through disrupting its chromatin structure [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(19): 8392-8403.
- [24] Liu Y, Rong Z, Xiang D, *et al.* Detection technologies and metabolic profiling of bile acids: A comprehensive review [J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 121.

[责任编辑 李亚楠]