

大黄-枳实炭纳米类成分对肝内胆汁淤积症的治疗作用及机制研究

李梦含¹, 张曦文^{1#}, 陈 瑞¹, 邹 鹏¹, 夏敏隆¹, 程国良², 孔 慧³, 张 越⁴, 屈会化^{3*}, 赵 琰^{1*}

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

2. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276000

3. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029

4. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100029

摘要: 目的 研究大黄 (*Rhei Radix et Rhizoma*, R)-枳实炭纳米类成分 (*Aurantii Fructus Immaturus Carbonisatum* nano-components, AFIC-NCs) 对肝内胆汁淤积症 (intrahepatic cholestasis, IC) 的治疗作用及作用机制。方法 从枳实炭中提取分离出 AFIC-NCs 并利用纳米材料表征方法分析其形态结构、光学性质和官能团性质等。将 48 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA, 100 mg/kg) 组及 R-AFIC-NCs 高、中、低剂量 (22.66、11.33、5.67 mg/kg) 组, 每组各 8 只。连续给药 7 d, 并于第 5 天 ig α -萘异硫氰酸酯 (α -naphthalene isothiocyanate, ANIT) 诱导 IC 小鼠模型。给药结束后检测各组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL)、间接胆红素 (indirect bilirubin, IBIL)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 和总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 的水平; 观察小鼠肝脏和胆囊外观并计算肝脏指数; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色观察肝组织病理变化; TUNEL 法检测肝细胞凋亡; 检测各组小鼠肝脏中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 及还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量; 采用 Western blotting 法检测肝组织中内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 相关蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 和 C/EBP 同源蛋白 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, CHOP) 的表达。结果 表征结果显示, AFIC-NCs 呈类球形颗粒, 晶格间距为 0.18 nm, 表面含有羟基、羰基等官能团。R-AFIC-NCs 各剂量组均能显著下调肝内胆汁淤积症模型小鼠肝功能指标 ALP、ALT、AST 及胆汁淤积指标 DBIL、IBIL、TBIL、TBA ($P < 0.05$ 、 0.01); 改善肝组织损伤, 减少肝细胞凋亡 ($P < 0.05$); 降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提高肝脏 SOD 和 GSH 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低了 MDA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01); 此外, R-AFIC-NCs 各剂量组还能降低 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 R-AFIC-NCs 可能通过抑制内质网应激标志蛋白 GRP78 和 CHOP 的表达, 减轻肝内胆汁淤积症引起的细胞凋亡和氧化应激反应, 从而改善其肝脏功能。

关键词: 大黄-枳实炭; 纳米类成分; α -萘异硫氰酸酯; 肝内胆汁淤积症; 氧化应激; 细胞凋亡; 内质网应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)06-2034-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.06.017

Therapeutic effect and mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma-Aurantii Fructus Immaturus Carbonisatum* nano-components on intrahepatic cholestasis

LI Menghan¹, ZHANG Xiwen¹, CHEN Rui¹, ZOU Peng¹, XIA Minlong¹, CHENG Guoliang², KONG Hui³, ZHANG Yue⁴, QU Huihua³, ZHAO Yan¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000, China

3. Beijing Institute of Chinese Medicine Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

4. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

收稿日期: 2024-12-11

基金项目: 国家中医药管理局岐黄学者支持项目 (90020172120064); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2024-JYB-JBZD023, 2024-JYB-JBZD040, 2024-JYB-JBZD-045)

作者简介: 李梦含, 硕士研究生, 研究方向为经典方药的现代应用的基础研究。E-mail: Lmh0698@163.com

#共同第一作者: 张曦文, 硕士研究生, 研究方向为经典方药的现代应用的基础研究。E-mail: 18794797916@163.com

*通信作者: 屈会化, 研究员, 从事经典方药的现代应用的基础研究。E-mail: quhuihuadr@163.com

赵 琰, 博士生导师, 教授, 从事经典方药现代应用的基础研究。E-mail: zhaoyandr@163.com

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma-Aurantii Fructus Immaturus Carbonisatum* nano-components (R-AFIC-NCs) on intrahepatic cholestasis (IC). **Methods** *Aurantii Fructus Immaturus Carbonisatum* nano-components (AFIC-NCs) were extracted and isolated from *Aurantii Fructus Immaturus Carbonisatum* and analyzed for their morphological structure, optical properties, and functional group properties using nanomaterials characterization methods. Forty-eight male C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, ursodeoxycholic acid (UDCA) group (100 mg/kg), and high-, medium-, and low-dose (22.66, 11.33, 5.67 mg/kg) R-AFIC-NCs group, with eight animals in each group. The drugs were administered for seven consecutive days, and the IC model was induced by α -naphthalene isothiocyanate (ANIT) gavage on the fifth day. After treatment, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), direct bilirubin (DBIL), indirect bilirubin (IBIL), total bilirubin (TBIL), and total bile acid (TBA) were measured. The appearance of liver and gallbladder of the mice was observed and the liver index was calculated; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate the pathological changes in the liver tissues. The TUNEL assay was used to assess hepatocyte apoptosis. Additionally, the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) were measured in the livers of the different groups. The expressions of endoplasmic reticulum stress (ERS)-related proteins, glucose-regulated protein 78 (GRP78) and protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (CHOP), were detected by Western blotting. **Results** The characterization results indicated that AFIC-NCs exhibited a spherical morphology, with a lattice spacing of 0.18 nm, and the surface was enriched with functional groups such as hydroxyl and carbonyl. All dose groups of R-AFIC-NCs significantly reduced the liver function indexes ALP, ALT, AST and cholestasis indexes DBIL, IBIL, TBIL, TBA in mouse modeled with intrahepatic cholestasis ($P < 0.05, 0.01$). They also ameliorated liver tissue damage, decreased hepatocyte apoptosis ($P < 0.05$), lowered the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P < 0.05, 0.01$), enhanced hepatic activities of SOD and GSH ($P < 0.05, 0.01$), and diminished MDA levels ($P < 0.05, 0.01$). Furthermore, R-AFIC-NCs suppressed the expression of GRP78 and CHOP proteins in all dosage groups ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** R-AFIC-NCs may improve liver function by suppressing the expression of endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP, which may reduce oxidative stress responses and apoptosis by intrahepatic cholestasis.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma-Aurantii Fructus Immaturus Carbonisatum*; nano-components; α -naphthalene isothiocyanate; intrahepatic cholestasis; oxidative stress; apoptosis; endoplasmic reticulum stress

肝内胆汁淤积症 (intrahepatic cholestasis, IC) 是由肝细胞功能障碍引起的, 以胆汁分泌和血流紊乱为特征的疾病^[1], 主要临床表现为黄疸、皮肤瘙痒、肝大、肝压痛等, 严重者将面临胆汁性肝硬化、终末期肝病乃至死亡的严峻风险^[2-3]。目前, 临床治疗方案主要依赖于熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA)、奥贝胆酸 (obeticholic acid, OCA) 和糖皮质激素等药物干预^[4]。然而, 部分药物疗效并不显著, 且治疗周期较长, 导致治疗费用增加, 并伴随较多的不良反应, 因此, 迫切需要探索更为有效安全的新治疗策略。

IC 属于中医学“黄疸”的范畴, 常用大黄-枳实配伍治疗, 其中大黄性苦寒, 具有泻下攻积、清热解毒的作用^[5]; 枳实性味苦、辛、温, 具有破气消积、行气导滞的功效^[6]。张仲景在治疗黄疸时, 大黄多生用, 枳实炮制方法不一, 例如, 张仲景的茵陈蒿汤、栀子大黄汤中均用生大黄, 后世医家普遍认为生大黄利胆退黄效果更佳^[7]; 然而枳实多经炮制后入药, 在《伤寒杂病论》中枳实芍药散中枳实

“烧令黑”^[8], 栀子厚朴汤中“炙令黄”^[9], 四逆散中“炙干”^[10]。基于张仲景用药思想, 本课题组在前期研究中创新性地发现了从枳实炭中提取分离出的枳实炭纳米类成分 (*Aurantii Fructus Immaturus Carbonisatum* nano-components, AFIC-NCs) 具有良好的抗炎活性, 对高尿酸血症和痛性关节炎具有良好的治疗作用^[11], 并证实 AFIC-NCs 为枳实炭发挥药效的物质基础。大黄-枳实炭是治疗黄疸的经典药对, 为了在复方中验证 AFIC-NCs 的药效, 本研究选用大黄与其进行配伍, 形成大黄 *Rhei Radix et Rhizoma*-AFIC-NCs (R-AFIC-NCs), 并以此为研究对象, 通过 α -萘异硫氰酸酯 (α -naphthalene isothiocyanate, ANIT) 诱导小鼠 IC 模型, 从多个维度探讨 R-AFIC-NCs 对 IC 的治疗作用及作用机制, 以期为大黄-枳实炭的临床应用提供参考, 并为 IC 的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 8 周龄, 体质量为

(22±2) g, 购自于斯贝福(北京)生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010, 饲养于北京中医药大学实验动物中心, 温度为(24±1)℃, 相对湿度为 55%~65%, 明暗循环为 12 h, 通风良好, 饲养期间小鼠自由饮水进食。本研究所有动物实验均遵循北京中医药大学有关实验动物管理和使用的规定, 动物实验经北京中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 BUCM-2024070405-3021)。

1.2 药品与试剂

大黄饮片(批号 220615002)和枳实饮片(批号 220708002)购自北京仟草中药饮片有限公司, 经北京中医药大学赵琰教授鉴定为药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎及甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果, 符合《中国药典》2020 年版规定。

UDCA(批号 S25093, 质量分数 98%)购自上海源叶生物科技有限公司; ANIT(批号 N814658, 质量分数 98%)购自上海麦克林生化科技有限公司; 橄榄油(批号 S30503)购自上海源叶生物科技有限公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 A001-3-2)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(批号 A006-2-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号 A003-1-2)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 H052-1-2)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(批号 H002-1-2)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 H007-1-2)、苏木素-伊红(Hematoxylin eosin, HE)染色液(批号 D006-1-2)均购自南京建成生物工程研究所有限公司; TUNEL 试剂盒(批号 11684817910)购自上海罗氏制药有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号 BN27109)购自北京百瑞极生物科技有限公司; 葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein78, GRP78)一抗(批号 11587-1-AP)、C/EBP 同源蛋白(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, CHOP)一抗(批号 15204-1-AP)、山羊抗兔二抗(批号 SA00001-2)、兔多抗 β -肌动蛋白(β -actin, β -actin, 批号 20536-1-AP)均购自美国 Proteintech Group 公司。

1.3 仪器

PXR-9 型马弗炉(北京中科奥博科技有限公司); PFT-100A 型高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣

生化仪器厂); Tecnai G2 20 型透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, 美国 FEI 公司); JEN-1230 型高分辨透射电子显微镜(high-resolution transmission electron microscope, HRTEM, 日本电子株式会社); CECIL 型紫外-可见分光光度计(ultraviolet-visible spectrophotometer, UV-Vis, 英国 Cambridge 公司); JEN-1230 型傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)、F-4500 型荧光分光光度计(fluorospectrophotometer, FL)、Escalab 250Xi 型 X-射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); D8-Advanced 型 X 射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD, 德国 Bruker AXS 公司); AU-480 型全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 AFIC-NCs 的制备

依据课题组前期制备工艺^[1], 称取 400 g 生枳实, 放入干燥的坩埚中, 铝箔纸密封, 放入马弗炉, 马弗炉升温程序: 5 min 升温至 70℃, 维持 30 min; 25 min 升温至 350℃, 维持 1 h。待冷却至室温, 打成粉末。称取 30 g 炭粉, 加入 900 mL 去离子水, 煎煮 1 h, 共煎煮 2 次。放凉后滤过, 合并滤液, 浓缩、透析, 待透析袋外溶液颜色没有任何变化, 取出袋内溶液, 定容至 1 g/mL(以枳实炭质量计), 即得 AFIC-NCs 溶液, 于 4℃冰箱中保存。

2.2 AFIC-NCs 的表征

利用 TEM 获取 AFIC-NCs 的形态大小及分散程度; 通过 HRTEM 获取其晶格间距等微观结构; 利用 XRD 获取 AFIC-NCs 的内部原子的空间分布; 利用 UV-Vis 和 FL 检测 AFIC-NCs 的光学特征; 利用 FTIR 研究 AFIC-NCs 的表面官能团信息; 利用 XPS 在获取 AFIC-NCs 元素组成等信息。

2.3 溶液配制

2.3.1 大黄水煎液 称取 50 g 大黄, 加 30 倍体积去离子水, 浸泡 30 min, 煮沸后继续煎煮 25 min, 冷却后滤过并收集药渣, 再次煎煮, 滤过, 合并滤液, 定容至 1 g/mL(以生大黄质量计, 芦荟大黄素质量分数为 0.898 mg/g)。

2.3.2 R-AFIC-NCs 溶液 参考栀子大黄汤中的经典配比, 将“2.1”项下制备的 AFIC-NCs 溶液与大黄水煎液按 4:1 混匀, 得到 R-AFIC-NCs 溶液; 利用去离子水稀释 R-AFIC-NCs 溶液, 使高、中、低

剂量 R-AFIC-NCs 溶液质量浓度分别为 1.6、0.8、0.4 g/mL。

2.3.3 UDCA 溶液 称取 21.6 mg UDCA 粉末, 加入 2.16 mL 去离子水, 配制成质量浓度为 10 mg/mL 的 UDCA 溶液, 现用现配。

2.3.4 ANIT 溶液 称取 120 mg ANIT 粉末, 充分溶解于 12 mL 橄榄油, 配制成质量浓度为 10 mg/mL 的 ANIT 溶液, 现用现配。

2.4 R-AFIC-NCs 对 IC 小鼠的影响

2.4.1 分组、造模与给药 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、UDCA (100 mg/kg) 组及 R-AFIC-NCs 高、中、低剂量 (22.66、11.33、5.67 mg/kg) 组, 每组 8 只。各给药组小鼠 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组给予等体积生理盐水, 连续 7 d, 1 次/d。第 5 天给药 2 h 后, 除对照组外, 各组小鼠 ig ANIT 溶液 (80 mg/kg), 对照组 ig 等体积橄榄油^[12]。造模后继续给药 2 d。每天同一时间对各组小鼠的精神状态、活动、对刺激的反应、皮毛色泽、大小便颜色质地、有无死亡情况等进行观察比较并记录。

2.4.2 肝功能及胆汁酸水平检测 末次给药结束后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 麻醉后眼眶取血, 4 °C 静置 4 h, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 取上清, 备用。利用全自动生化分析仪检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL)、间接胆红素 (indirect bilirubin, IBIL)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 和总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 水平。

2.4.3 肝脏指数、小鼠肝脏和胆囊外观 取血后迅速剖取小鼠肝脏, 观察其颜色和质地, 有无出血点或坏死, 胆囊颜色及大小等。并称取各组小鼠肝脏质量, 计算肝脏指数。

肝脏指数 = 肝脏质量 / 体质量

2.4.4 HE 染色观察肝组织病理变化 将肝脏组织于多聚甲醛固定 48 h 以上, 经过无水乙醇和二甲苯脱水、石蜡包埋后, 进行切片处理, 进行 HE 染色, 利用倒置显微镜对各组小鼠肝组织进行观察并采集图像。

2.4.5 TUNEL 凋亡染色检测肝细胞凋亡 石蜡切片烘干, 脱蜡、脱水后, 滴加 TUNEL 反应液, 37 °C 避光孵育 60 min, 清洗残留的缓冲液, 将 DAPI 滴于切片, 避光孵育 10 min, 洗涤, 封片。使用倒置荧光显微镜, 观察并采集各组小鼠肝组织 TUNEL

凋亡染色的图像, 计算凋亡指数。

凋亡指数 = 凋亡肝细胞数 / 肝细胞总数

2.4.6 肝组织炎症因子和氧化应激水平 根据试剂盒说明书, 分别检测小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、SOD、MDA 及 GSH 含量。

2.4.7 Western blotting 检测肝组织中 GRP78 和 CHOP 蛋白表达 剪取 20 mg 肝组织, 加入裂解液, 充分匀浆, 离心取上清, 使用 BCA 法检测样品蛋白质含量。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, 用快速封闭液封闭 20 min 后, 加入一抗 (GRP78 和 CHOP 分别以 1 : 3 000 和 1 : 2 000 的比例稀释), 4 °C 孵育过夜。次日, TBST 洗涤 5 次, 加入二抗 (1 : 8 000), 室温孵育 1 h。使用 ECL 试剂显色, 用仪器显影曝光。利用 Image-J 软件分析测量灰度值。

2.5 统计学分析

利用 SPSS 20.0 软件中的方差分析分析数据, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态分布的数据用单因素 ANOVA 分析, 方差齐且符合正态分布的数据使用 LSD-*t* 检验, 方差不齐且符合正态分布的数据使用 Dunnett's T3 检验。

3 结果

3.1 AFIC-NCs 的表征

AFIC-NCs 呈类球形颗粒, 分布均一 (图 1-A), 粒径范围 1.2~4.0 nm (图 1-B), 主要集中于 1.7~2.5 nm。HRTEM 结果显示, AFIC-NCs 的晶格清晰且排列整齐, 其晶格间距为 0.18 nm (图 1-C)。XRD 结果显示, AFIC-NCs 在衍射角度 $2\theta=22^\circ$ 的非晶体衍射峰 (图 1-D), 可能由于 AFIC-NCs 由高度无定形的碳结构组成^[13]。AFIC-NCs 在 268 nm 处可见微弱的紫外吸收峰, 这可能由于 $\pi-\pi^*$ 跃迁所致 (图 2-A)。AFIC-NCs 的红外光谱图可见多处吸收峰 (图 2-B), 3 428.56 cm^{-1} 处的峰值由 N-H 或 O-H 的伸缩振动引起; 2 916.83、2 844.85 cm^{-1} 附近的峰值由 C-H 的伸缩振动引起; 1 628.95 cm^{-1} 附近的峰值由 C=O 的伸缩振动引起^[14]; 1 460.03、1 375.22 cm^{-1} 附近的峰值由 C-N 的伸缩振动引起; 1 069.46 cm^{-1} 处的峰值由 C-O-C 键的伸缩振动引起^[15-17], 由此可见 AFIC-NCs 含有羟基、羰基等官能团。AFIC-NCs 的荧光光谱显示, AFIC-NCs 的激发最大值和发射最大值分别为 318、418 nm (图 2-C), 并随着激发波长由 280 nm 增大至 400 nm, 发射波长逐渐红移至 467 nm, 且强度逐渐降低 (图 2-D)。

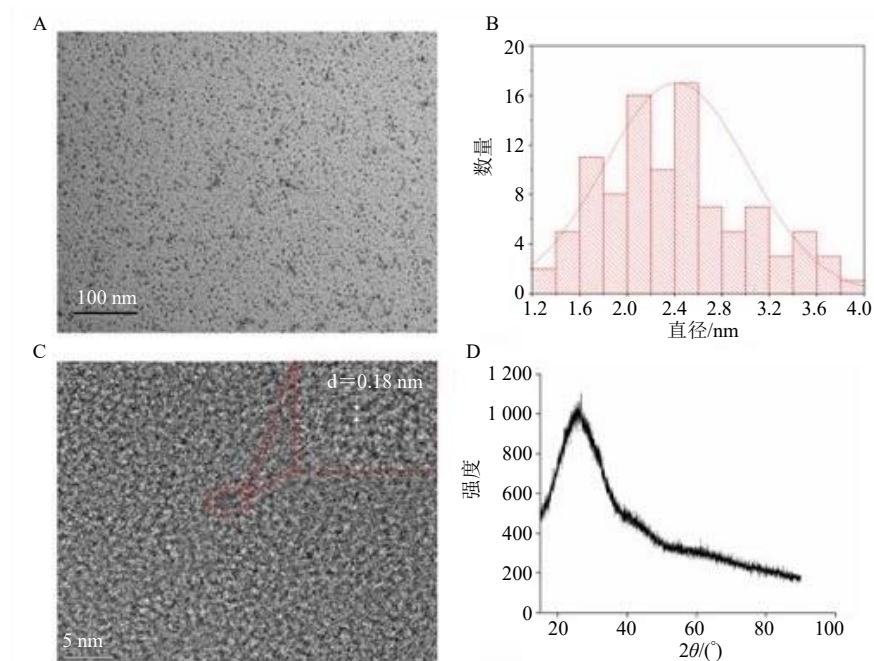


图 1 AFIC-NCs 的 TEM (A)、粒径分布 (B)、HRTEM (C)、XRD (D) 图

Fig. 1 TEM (A), particle size distribution (B), HRTEM (C) and XRD (D) diagrams of AFIC-NCs

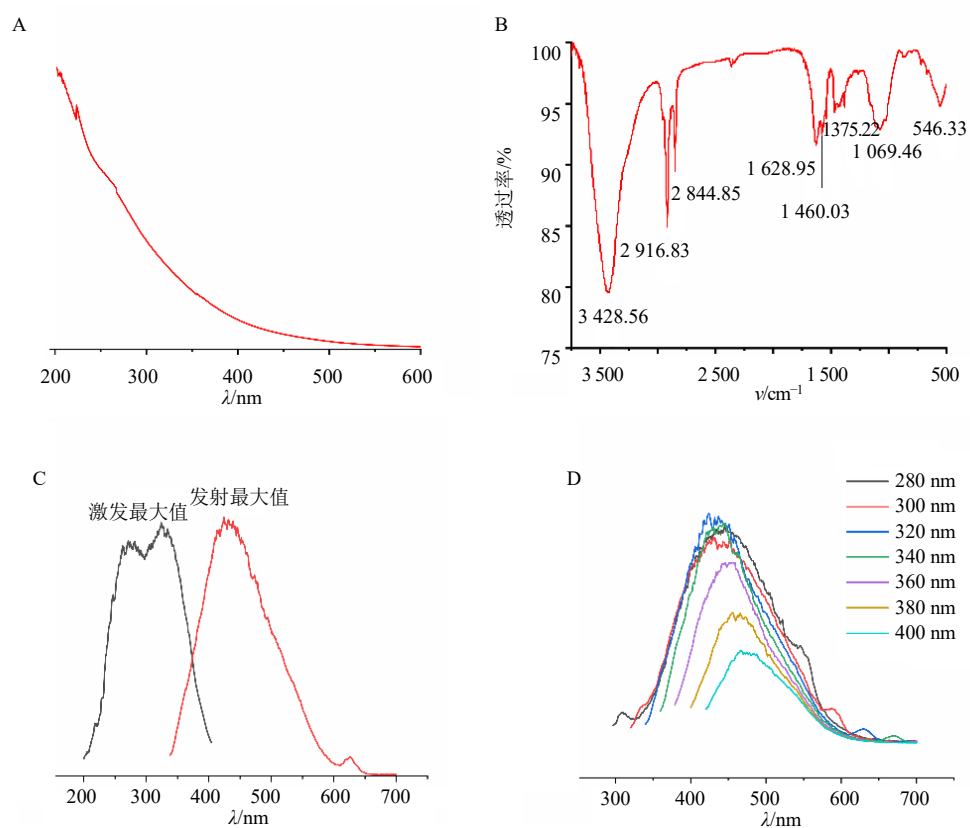


图 2 AFIC-NCs 的 UV-Vis 光谱 (A)、FTIR 光谱 (B)、FL 光谱 (C)、不同激发波长下的发射光谱 (D)

Fig. 2 UV-Vis spectra (A), FTIR spectra (B), FL spectra (C), and emission spectra under different excitation wavelengths (D) of AFIC-NCs

由 AFIC-NCs 的元素峰图可见, 在 283.83、398.82、531.15 eV 处由明显的 3 个峰, 分别表示 C 1s (69.11%)、O 1s (28.73%)、N 1s (1.93%), 还有极少量 S 2p (0.23%) 存在 (图 3-A)。进一步观察 C 1s 谱带明显可见在 283.72、286.97、285.71 eV 处的 3 个峰 (图 3-B), 依次对应为 C=C、C=O^[18]、C-O^[19]。在 O 1s 谱带显示有 2 个峰, 分别在 531.13、529.66 eV, 分别表示 C-O 和 C=O^[14,18] (图 3-C)。在 N 1s 谱带显示 2 个峰, 依次在 398.84、398.97 eV (图 3-D), 分别对应 C-N、C=N^[20-21]。因此, AFIC-NCs 主要由碳、氧、氮元素组成, 占 99% 以上。

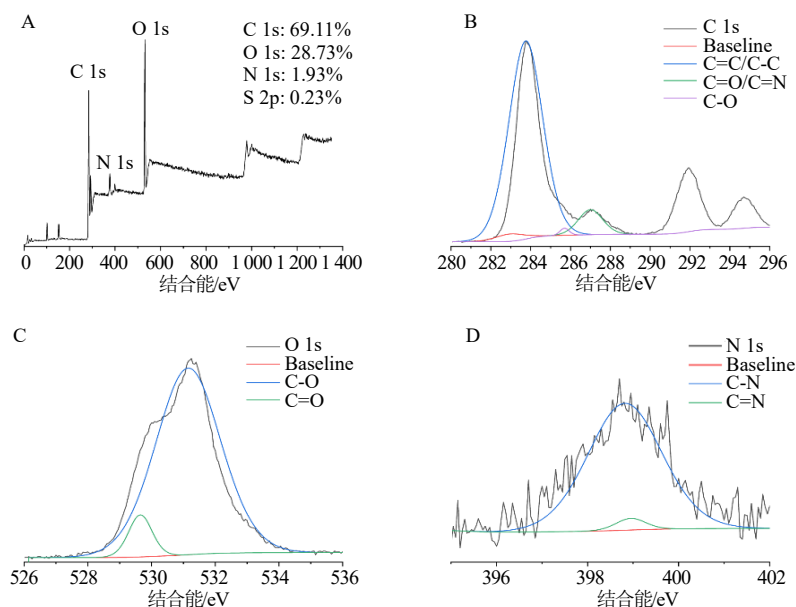
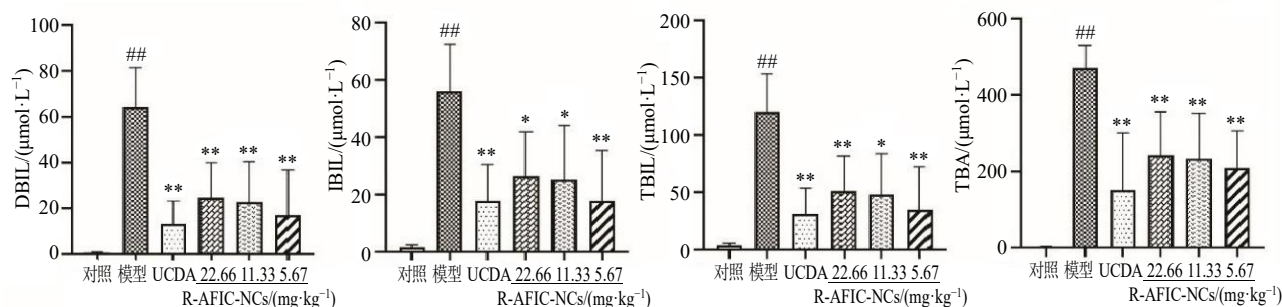


图 3 AFIC-NCs 的元素组成和表面基团
A-full-scan spectrum; B-C 1s spectrum; C-O 1s spectrum; D-N 1s spectrum.

图 3 AFIC-NCs 的元素组成和表面基团
Fig. 3 Elemental composition and surface composition of AFIC-NCs



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同。
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 4 R-AFIC-NCs 对 IC 小鼠 DBIL、IBIL、TBIL、TBA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 4 Effects of R-AFIC-NCs on DBIL, IBIL, TBIL, TBA levels in IC mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 对 IC 小鼠一般情况的影响

造模期间各组小鼠存活率为 100%, 对照组未见明显异常; 与对照组比较, 模型组小鼠精神萎靡, 基本俯卧不动, 蜷缩在角落, 对外界刺激反应迟钝, 毛发凌乱欠光泽, 尿液颜色呈深黄色。与模型组比较, 各给药组小鼠情况明显改善, 活动较频繁, 对外界刺激较灵敏。

3.3 对 IC 小鼠胆汁酸相关水平的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组 DBIL、IBIL、TBIL、TBA 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 DBIL、IBIL、TBIL、TBA 水平显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.4 对 IC 小鼠肝功能的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组 ALP、ALT 和 AST 的含量显著增加($P<0.01$);与模型组比较,各给药组 ALP、ALT 和 AST 水平均显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。

3.5 对 IC 小鼠肝指数、肝脏和胆囊外观的影响

如表 1 所示,与对照组比较,模型组的肝脏质量和肝指数显著升高($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,R-AFIC-NCs 中、低剂量组的肝脏质量明显降低($P<0.05$ 、 0.01);UDCA 组、R-AFIC-NCs 高、

中、低剂量组肝脏指数显著下降($P<0.05$ 、 0.01)。

如图 6 所示,对照组小鼠肝脏未见明显肿大、颜色、质地等未见明显异常,胆囊内未见明显胆汁淤积,胆囊大小和颜色符合正常;模型组肝脏明显充血肿大,颜色加深,质地偏韧,表面可见大量出血点,胆囊呈深墨绿色,且明显增大,说明 IC 模型造模成功,引起了肝脏和胆囊的病变。与模型组比较,各给药组小鼠肝脏和胆囊外观明显改善,肝脏颜色接近正常,未见明显肿大,表面出血点明显减少,胆囊稍增大,颜色呈黄色。

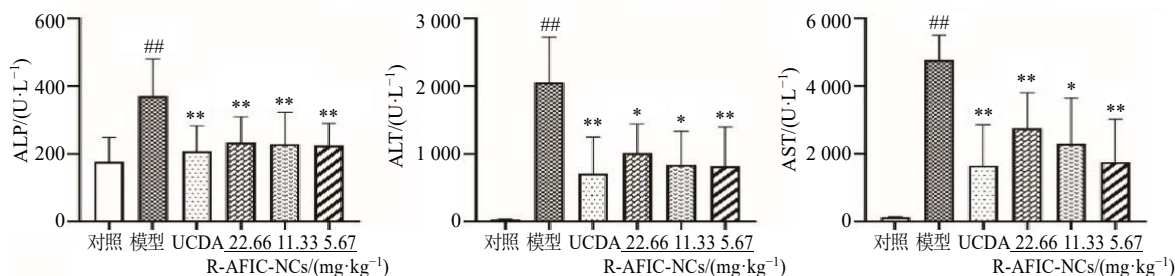


图 5 R-AFIC-NCs 对 IC 小鼠 ALP、ALT、AST 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 5 Effects of R-AFIC-NCs on ALP, ALT, AST levels in IC mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

表 1 各组小鼠的肝脏质量和肝指数 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Liver mass and liver index of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝脏质量/g	肝指数/%
对照	—	1.10±0.09	4.74±0.50
模型	—	1.24±1.42 [#]	6.37±0.63 ^{##}
UDCA	100.00	1.09±0.12	5.30±0.56 ^{**}
R-AFIC-NCs	22.66	1.13±0.09	5.58±0.53 [*]
	11.33	1.09±0.08 [*]	5.29±0.54 ^{**}
	5.67	1.08±0.14 ^{**}	5.28±0.69 ^{**}

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$

^{**} $P<0.01$ 。

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group.

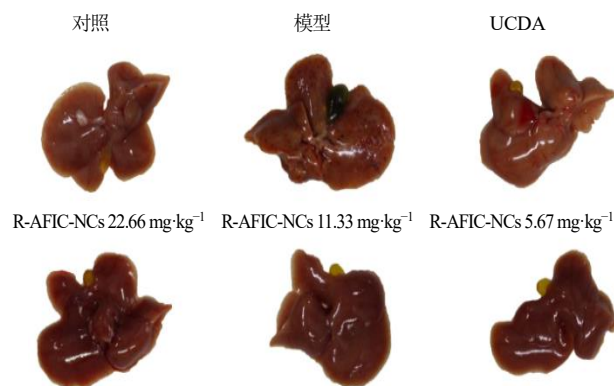


图 6 R-AFIC-NCs 对 IC 小鼠肝脏的影响

Fig. 6 Effects of R-AFIC-NCs on liver of IC mice

3.6 对 IC 小鼠肝组织病理形态的影响

如图 7 所示,对照组小鼠肝组织结构清晰完整,肝索排列有序,肝细胞大小和结构均未见异常;模型组小鼠肝组织严重损伤,结构模糊不清,肝小叶明显失去正常结构,十分不规则,肝索紊乱,且中央静脉出现了明显充血,大量胆汁淤积和炎症细胞浸润,可见空泡样改变,肝细胞明显增大、甚至部分坏死;而各给药组小鼠肝组织病理损害明显改善,肝血窦未见明显充血,胆汁淤积和炎症细胞浸润明显减少,肝细胞形状和大小明显改善。

3.7 对 IC 所致小鼠肝细胞凋亡的影响

如图 8 所示,与对照组比较,模型组有大量凋亡细胞产生,肝细胞凋亡率大幅度上升($P<0.05$);与模型组比较,各给药组的小鼠凋亡细胞数量显著下降,细胞凋亡率较模型组显著减少($P<0.05$)。

3.8 对 IC 小鼠肝脏炎症因子的影响

如图 9 所示,与对照组比较,模型组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。

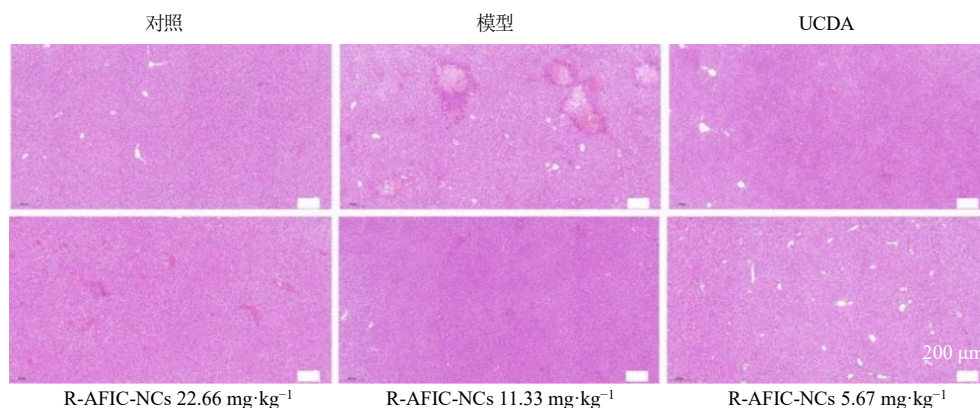


图 7 R-AFIC-NCs 对 IC 小鼠肝组织病理形态的影响 (HE, ×200)

Fig. 7 Effects of R-AFIC-NCs on histopathological morphology of liver in IC mice (HE, ×200)

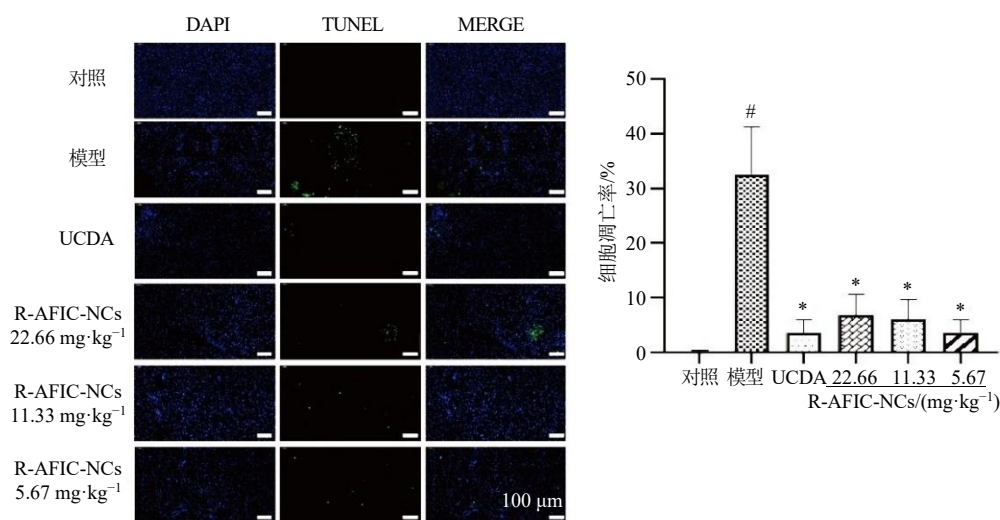


图 8 R-AFIC-NCs 对 IC 小鼠肝细胞凋亡的影响 (×200; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 8 Effect of R-AFIC-NCs on hepatocyte apoptosis in IC mice (×200; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

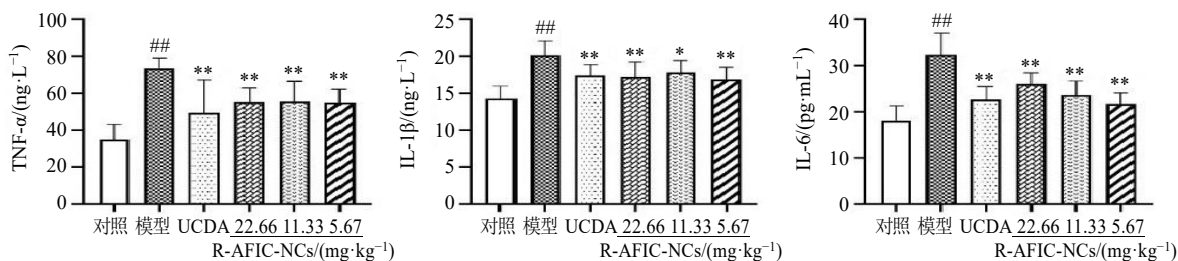


图 9 R-AFIC-NCs 对 IC 小鼠 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

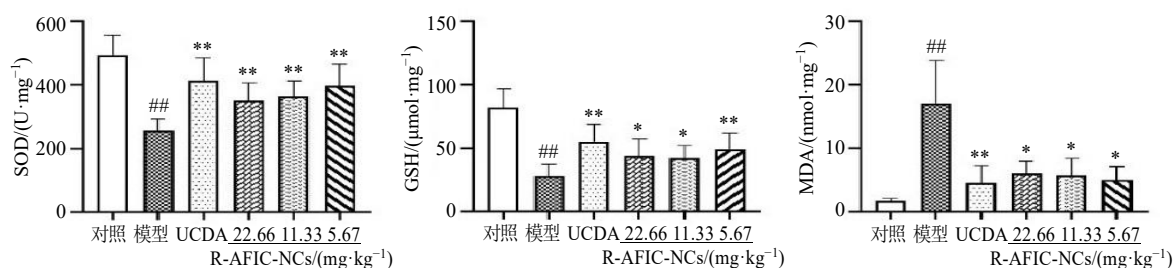
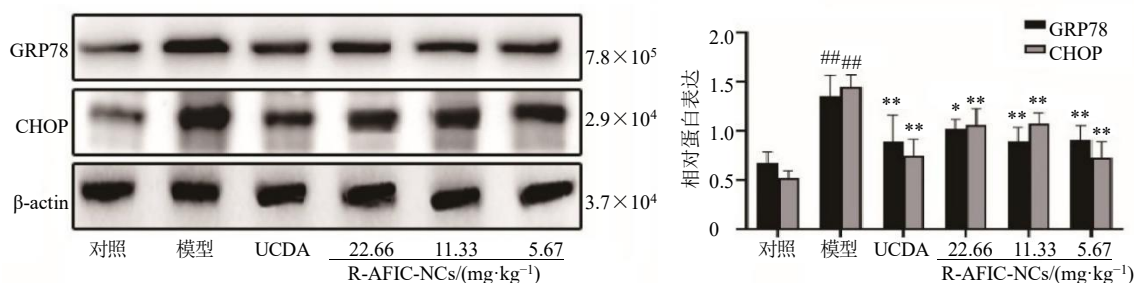
Fig. 9 Effects of R-AFIC-NCs on TNF-α, IL-1β and IL-6 levels in IC mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3.9 对 IC 小鼠肝脏氧化应激的影响

如图 10 所示,与对照组比较,模型组 SOD 和 GSH 含量显著下降 ($P < 0.01$),MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 SOD 和 GSH 活力显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)、MDA 的生成显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.10 对 IC 小鼠肝组织中 GRP78 和 CHOP 蛋白表达的影响

如图 11 所示,与对照组比较,模型组 GRP78 和 CHOP 蛋白表达均显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 CHOP 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$),GRP78 表达也显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

图 10 R-AFIC-NCs 对 IC 小鼠 SOD、GSH、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Fig. 10 Effects of R-AFIC-NCs on SOD, GSH and MDA levels in IC mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)图 11 R-AFIC-NCs 对 IC 小鼠肝组织 GRP78 和 CHOP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 11 Effects of R-AFIC-NCs on GRP78 and CHOP protein expression in liver tissues of IC mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

中药炭药应用历史悠久,且经历了反复的实践验证,在内外妇儿多科疾病中疗效明确且肯定。本课题组前期研究发现,炭药多样性药效的物质基础均与其纳米类成分有关^[22]。枳实炭应用历史悠久,在《金匱要略》中有枳实“炙令黄”“烧令黑”等炮制方法的记载,据此,本研究对枳实进行炭化,并提取出 AFIC-NCs,利用纳米表征技术,确定 AFIC-NCs 是一种类球形颗粒,粒径在 1.2~4.0 nm,晶格间距为 0.18 nm,具有紫外和荧光特性,并且具有激发波长依赖性的光致发光行为,与碳点的荧光现象报道一致^[23],这可能由于纳米类成分的不均匀颗粒尺寸和不同的发射位置导致^[24]。AFIC-NCs 主要由碳、氮、氧组成,3 种元素总占比达 99% 以上,表面含有氨基、羟基、羧基等官能团,具有良好的亲水性,为后期探讨其与药物配伍后的生物活性奠定了基础。

ANIT 已被广泛用于啮齿动物 IC 模型的建立,仅单剂量的 ANIT 就会损害胆管上皮细胞,并诱导胆汁淤积损伤,出现明显的炎症和肝细胞损伤^[25],引起肝质量和肝指数的增加^[26]。本研究中,ANIT 诱导的 IC 小鼠肝质量和肝指数显著提升,肝组织可见大量胆汁淤积和炎症细胞聚集,肝细胞明显增大、甚至部分坏死。给予 R-AFIC-NCs 后,肝脏外

观接近对照组,肝脏指数下降,胆囊明显缩小,胆汁淤积减少,肝细胞形态和结构病理变化减轻,表明 R-AFIC-NCs 可以减轻 IC 对肝脏的病理损害。血清 ALP、ALT、AST、DBIL、IBIL、TBIL 和 TBA 是诊断和评价 IC 的常规指标^[27]。当 IC 发生后,肝胆发生炎症、坏死时,胞内酶 ALT 和 AST 因细胞膜通透性增加而穿过细胞膜渗透进入血液当中,造成其在血液中的含量增加^[28],且这 2 种转氨酶的升高与肝细胞损伤的程度一致。此外,ALP、DBIL、IBIL、TBIL 和 TBA 是评价胆红素代谢及胆汁淤积的特征性血清生化指标^[29]。当胆汁代谢障碍,淤积于肝组织内损害肝细胞,进一步加重肝脏代谢胆汁的负担,造成恶性循环。同时过量的胆汁淤积可引起肝细胞膜通透性增加,使大量的胆汁酸、胆红素、肝功能酶反流入血,导致血清中其含量大幅度增加^[30]。研究表明伴随着胆红素水平的升高,肝细胞凋亡数目增加^[31]。本研究结果表明,模型小鼠血清中 ALP、ALT、AST、DBIL、IBIL、TBIL 和 TBA 含量明显升高的现象,而 R-AFIC-NCs 能够显著降低小鼠血清中异常升高的生化指标。

氧化应激是 ANIT 诱导的 IC 的重要发病机制。胆汁淤积是有害氧化应激的有效刺激,其通过触发中性粒细胞流入肝脏,释放大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS)^[32],调节 Nrf2 转录因子等抗

氧化途径, 以及引发随后的脂质过氧化损伤^[33-34]。SOD 能够维持组织的还原状态, 抑制氧自由基的蓄积引起的氧化反应^[35]; GSH 具有清除氧自由基的能力, 从而减少大量自由基诱导的细胞凋亡的发生^[36]; MDA 能够损害细胞, 使细胞功能蛋白的活性变化, 干扰细胞发挥正常作用^[37]。本研究表明, 模型组小鼠 SOD 活力和 GSH 含量显著降低, 大量 MDA 产生, 而 R-AFIC-NCs 可提高 IC 小鼠肝脏 SOD 活性和 GSH 水平, 抑制 MDA 生成, 提示 R-AFIC-NCs 能够明显改善 IC 导致的氧化应激损伤。多项研究表明, 有害的氧化应激状态与促炎细胞因子的激活之间存在密切关联, ROS 可以诱导核转录因子 NF- κ B 的表达, 从而控制炎症性细胞内信号通路^[7], 导致 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 过量产生^[38]。此外, 过多的 TNF- α 可以通过经相应受体结合后激活 NF- κ B、JNK 信号通路、促进氧自由基产生的脂类介质生成, 以及诱导脂质过氧化等途径促进肝细胞凋亡^[39]。IL-1 β 能抑制参与胆汁酸摄取、转运、代谢的 FXR、PXR 等受体的转录, 同时间接干扰胆汁酸转运体的正常功能, 促进胆汁淤积^[40]。大量的 IL-1 β 可刺激中性粒细胞分泌细胞因子以及氧自由基, 并使其聚集在肝脏, 损害肝细胞, 引起肝细胞凋亡^[41]。IL-6 可活化能够分泌 TNF- α 等促炎细胞因子的中性粒细胞和单核巨噬细胞, 使体内炎症因子含量大幅度增加, 促进炎症反应进一步发展, 同时介导细胞凋亡^[42]。本研究结果进一步证实了这些发现, IC 模型组产生了大量的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6, 肝细胞凋亡率大幅度上升; 而 R-AFIC-NCs 治疗组肝细胞内炎症因子含量降低明显, 可见少量凋亡细胞, 提示 R-AFIC-NCs 可能通过抑制炎症反应和细胞凋亡发挥作用, 但其具体分子机制还需进一步研究。

研究表明, 疏水性胆汁酸诱导的细胞凋亡是多种肝脏疾病发生的主要病理过程^[43], 肝细胞凋亡被认为是 IC 的主要发生机制^[44]。内质网应激是导致肝细胞凋亡的重要通路之一, 在诸多肝脏疾病中扮演着重要角色。肝脏中重要的解毒成分细胞色素 P450 酶主要分布于内质网膜上, 胆汁酸从有毒的疏水性转化为无毒的亲水性以及胆汁酸的顺利排泄均依赖细胞色素 P450 酶的代谢作用^[45], 因此, 正常的内质网结构和功能有利于胆汁的代谢, 而当内质网应激时, 可能引起疏水性胆汁酸的堆积, 引起胆汁淤积。研究发现, 在内质网应激时, 未折叠蛋白启动自我保护反应时激活 BiP/GRP78 和 CHOP

的表达受疏水性的脱氧胆酸的影响, 其能够上调基因产物的表达^[46], 而 GRP78 和 CHOP 基因是 ERS 的标志性蛋白, 这反映了胆汁酸是内质网应激发生的原因之一。GRP78 和 CHOP 是 ATF6 通路激活后表达的基因, 正常情况下 ATF6 蛋白与 BiP/GRP78 结合呈无活性的组合, 广泛分布于内质网膜上。当机体受到炎症、氧化应激等刺激时可能诱发 ERS, 这时聚集的未折叠蛋白可迫使这种无活性的组合成分解离, 游离的 ATF6 蛋白容易被水解产生活性, 激活 GRP78、CHOP 等基因表达。GRP78 是存在内质网中数目最多的分子伴侣, 应激状态下 GRP78 大量表达能准确反应内质网状态, 其能同时激活未折叠蛋白反应中的 3 条通路, 促使蛋白正确折叠, 同时, 当未折叠蛋白反应超负荷时, GRP78 能够活化凋亡蛋白, 促使细胞发生凋亡^[47-48]。CHOP 是诱导细胞凋亡的主要基因, 在内质网应激时可大量表达, 通过多种途径介导细胞凋亡^[49], 包括促进 pEIF2 α 去磷酸化, 增加蛋白质翻译以增加细胞负荷, 促使细胞凋亡^[50], 同时促进内质网氧化酶 1 α 表达, 增加二硫键的形成, 进而产生大量活性氧并导致钙超载, 引起氧化应激和线粒体损伤的细胞凋亡^[51-53], 同时使促凋亡蛋白表达相对增加, 诱导细胞凋亡^[54-55]。由此可知, GRP78 基因高水平的上调表示细胞内存在持续的内质网应激, 可能诱导细胞凋亡, CHOP 基因的激活是启动细胞凋亡的标志之一。因此, 适量的 ERS 是机体降解、输出错误折叠蛋白、增加蛋白质折叠等以保护细胞的反应, 过度则成为诱发细胞凋亡的重要病理因素。本研究中模型组 GRP78 表达明显增加, 提示肝组织内存在较为严重的 ERS, 使 CHOP 表达水平进一步上升, 诱导细胞凋亡, 这一结果与凋亡染色中 IC 模型的肝细胞凋亡数量显著增加的结果一致。而经过 R-AFIC-NCs 干预的肝组织中 GRP78 和 CHOP 表达显著降低, 由此可见, R-AFIC-NCs 可能对 ERS 中的关键信号蛋白 GRP78 和 CHOP 的表达进行调节, 减少 ERS 及其引起的细胞凋亡, 减轻肝细胞损伤, 治疗 IC。

综上, 本研究成功从枳实炭中分离得到 AFIC-NCs, 并证实了 R-AFIC-NCs 对 IC 具有潜在治疗作用, 其作用机制可能与 R-AFIC-NCs 下调 ERS 相关蛋白表达、抑制氧化应激和炎症因子产生从而减少肝细胞凋亡有关。该研究为 R-AFIC-NCs 用于临床中治疗 IC 奠定了一定的实验基础, 为中药配伍应用研究提供了新的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yu L L, Liu Y R, Wang S H, *et al.* Cholestasis: Exploring the triangular relationship of gut microbiota-bile acid-cholestasis and the potential probiotic strategies [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2181930.
- [2] Onofrio F Q, Hirschfield G M. The pathophysiology of cholestasis and its relevance to clinical practice [J]. *Clin Liver Dis*, 2020, 15(3): 110-114.
- [3] Yu L X, Liu X X, Li X, *et al.* Protective effects of SRT1720 via the HNF1 α /FXR signalling pathway and anti-inflammatory mechanisms in mice with estrogen-induced cholestatic liver injury [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 264: 1-11.
- [4] Liu Y S, Guo G Y, Zheng L H, *et al.* Effectiveness of fenofibrate in treatment-naïve patients with primary biliary cholangitis: A randomized clinical trial [J]. *Am J Gastroenterol*, 2023, 118(11): 1973-1979.
- [5] 郭博, 刘彦晶, 连丽. 大黄的药理作用研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2015, 13(20): 152-154
- [6] 孟丹丹, 吴晓迪, 袁顺, 等. 枳实在经方中的应用规律分析[J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(5): 578-582.
- [7] 张芳, 孙丽霞. 浅析“退黄以大黄为专功” [J]. 环球中医药, 2016, 9(4): 450-452.
- [8] 邓高丕. 略论《金匱要略》妇人病篇理血法 [J]. 江西中医药杂志, 1999, 4: 58.
- [9] 唐兵役. 浅析仲景方剂药后注释之意义 [J]. 河南中医杂志, 2003, 4: 3-4.
- [10] 罗瑞钦, 刘新亚. 四逆散方证论四逆散病机 [J]. 光明中医杂志, 2009, 4: 761-762.
- [11] Wang S N, Zhang Y, Kong H, *et al.* Antihyperuricemic and anti-gouty arthritis activities of *Aurantii Fructus Immaturus Carbonisata*-derived carbon dots [J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(22): 2925-2939.
- [12] Guan G Q, Cao H K, Tang Z X, *et al.* Mechanistic studies on the alleviation of ANIT-induced cholestatic liver injury by *Polygala fallax* Hemsl. polysaccharides [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 328: 118108.
- [13] Wei J M, Zhang X, Sheng Y Z, *et al.* Simple one-step synthesis of water-soluble fluorescent carbon dots from waste paper [J]. *New J Chem*, 2014, 38(3): 906-909.
- [14] Zhang M L, Cheng J J, Zhang Y, *et al.* Green synthesis of *Zingiberis Rhizoma*-based carbon dots attenuates chemical and thermal stimulus pain in mice [J]. *Nanomedicine*, 2020, 15(9): 851-869.
- [15] Zhao Y S, Zhang Y, Kong H, *et al.* Carbon dots from *Paeoniae Radix Alba Carbonisata*: Hepatoprotective effect [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 9049-9059.
- [16] Zhang J H, Niu A P, Li J, *et al.* *In vivo* characterization of hair and skin derived carbon quantum dots with high quantum yield as long-term bioprobes in zebrafish [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37860.
- [17] Mewada A, Pandey S, Shinde S, *et al.* Green synthesis of biocompatible carbon dots using aqueous extract of *Trapa bispinosa* peel [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(5): 2914-2917.
- [18] Wang X K, Zhang Y, Kong H, *et al.* Novel mulberry silkworm cocoon-derived carbon dots and their anti-inflammatory properties [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 68-76.
- [19] Jamaludin N, Tan T L, Zaman A S K, *et al.* Acid-free hydrothermal-extraction and molecular structure of carbon quantum dots derived from empty fruit bunch biochar [J]. *Materials*, 2020, 13(15): 3356.
- [20] 熊威, 赵琰, 成金俊, 等. 绵马贯众炭中新型碳点的发现及其止血作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1388-1394.
- [21] 赵玉升, 侯婷婷, 赵金莉, 等. 以机油为分散剂高温热解人发合成新型碳点及其生物效应研究 [J]. 中草药, 2020, 51(14): 3663-3669.
- [22] Zhao Y, Zhang Y, Liu X M, *et al.* Novel carbon quantum dots from egg yolk oil and their haemostatic effects [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4452.
- [23] Sahu S, Behera B, Maiti T K, *et al.* Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: Application as excellent bio-imaging agents [J]. *Chem Commun*, 2012, 48(70): 8835-8837.
- [24] Wang Y Y, Li Y, Yan Y, *et al.* Luminescent carbon dots in a new magnesium aluminophosphate zeolite [J]. *Chem Commun*, 2013, 49(79): 9006-9008.
- [25] 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.
- [26] 李晓玲, 孙凤霞, 王晓静, 等. 复方茵丹汤对大鼠急性肝内胆汁淤积的干预作用 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2014, 22(9): 497-500.
- [27] 屠海焯, 包方奇, 张利棕, 等. 部分胆管结扎致胆汁淤积小鼠模型的构建方法学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(5): 620-629.
- [28] Xin X L, Yang W J, Yaseen M, *et al.* The mechanism of hepatoprotective effect of sesquiterpene rich fraction from *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet on immune reaction-induced liver injury in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1068-1075.
- [29] 侯梦贞, 余芸, 黄倩倩, 等. 叶酸对邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP) 暴露导致小鼠胆汁淤积型肝损伤的保护作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(10): 2062-2069.
- [30] 赵亚芳, 李郁茹, 陈玉民, 等. 王不留行炭纳米类成分

- 发现及其对小鼠酒精性肝损伤保护作用 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6825-6833.
- [31] Scopa C D, Koureleas S, Tsamandas A C, *et al.* Beneficial effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on intestinal bacterial translocation, endotoxemia, and apoptosis in experimentally jaundiced rats [J]. *J Am Coll Surg*, 2000, 190(4): 423-431.
- [32] Li T, Yang C Y, Cao H K, *et al.* The effect of bergenin on isonicotinic acid hydrazide and rifampicin-induced liver injury revealed by RNA sequencing [J]. *Molecules*, 2023, 28(14): 5496.
- [33] Yu L X, Liu X X, Yuan Z H, *et al.* SRT1720 alleviates ANIT-induced cholestasis in a mouse model [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 256.
- [34] Ma X, Zhao Y L, Zhu Y, *et al.* *Paeonia lactiflora* Pall. protects against ANIT-induced cholestasis by activating Nrf2 via PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 5061-5074.
- [35] Xu G Y, Han X, Yuan G X, *et al.* Screening for the protective effect target of deproteinized extract of calf blood and its mechanisms in mice with CCl₄-induced acute liver injury [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180899.
- [36] Armstrong J S, Jones D P. Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells [J]. *FASEB J*, 2002, 16(10): 1263-1265.
- [37] Yin D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores [J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 21(6): 871-888.
- [38] Mosaoa R M, Al-Rabia M W, Asfour H Z, *et al.* Targeting SIRT1/AMPK/Nrf2/NF- κ B by sitagliptin protects against oxidative stress-mediated ER stress and inflammation during ANIT-induced cholestatic liver injury [J]. *Toxicology*, 2024, 507: 153889.
- [39] Abdulaal W H, Omar U M, Zeyadi M, *et al.* Pirfenidone ameliorates ANIT-induced cholestatic liver injury via modulation of FXR, NF- κ B/TNF- α , and Wnt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2024, 490: 117038.
- [40] Kusters A, White D D, Sun H D, *et al.* Redundant roles for cJun-N-terminal kinase 1 and 2 in interleukin-1 β -mediated reduction and modification of murine hepatic nuclear retinoid X receptor alpha [J]. *J Hepatol*, 2009, 51(5): 898-908.
- [41] 刘胜新, 徐军辉, 蔡涛, 等. IL-1 β 在急性胰腺炎时肝损伤中的作用 [J]. 临床外科杂志, 2019, 27(9): 777-778.
- [42] Wang T, He C. TNF- α and IL-6: The link between immune and bone system [J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(3): 213-227.
- [43] Rodrigues C M, Steer C J. Bile acids and hepatocyte apoptosis: Living/leaving life in the fas lane [J]. *Gastroenterology*, 1999, 117(3): 732-736.
- [44] 余晶, 覃洁萍, 邱华, 等. 黄芩苷对抗牛磺酸脱氧胆酸诱导肝细胞损伤的实验研究 [J]. 广西中医药大学学报, 2014, 17(2): 3-7.
- [45] 兰轲. 药物代谢酶 CYP3A 在胆汁酸宿主-肠道微生物协同代谢中的生物学功能假说 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(22): 2923-2929.
- [46] Bernstein H, Payne C M, Bernstein C, *et al.* Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate [J]. *Toxicol Lett*, 1999, 108(1): 37-46.
- [47] Mazumdar B, Meyer K, Ray R. N-terminal region of gelsolin induces apoptosis of activated hepatic stellate cells by a caspase-dependent mechanism [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e44461.
- [48] Luo B, Lee A S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies [J]. *Oncogene*, 2013, 32(7): 805-818.
- [49] 王冬梅, 朱启英, 丁丽, 等. 妊娠肝内胆汁淤积症患者胎盘细胞凋亡及调控基因的研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38(1): 5-7.
- [50] Lu M, Lawrence D A, Marsters S, *et al.* Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis [J]. *Science*, 2014, 345(6192): 98-101.
- [51] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3): 184-190.
- [52] Timmins J M, Ozcan L, Seimon T A, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(10): 2925-2941.
- [53] 任路平, 张璞, 张雪梅, 等. 4-苯基丁酸对高果糖喂养大鼠肝脏脂质沉积及氧化应激的影响 [J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(3): 1-4.
- [54] Tamaki T, Kamatsuka K, Sato T, *et al.* A novel transmembrane protein defines the endoplasmic reticulum stress-induced cell death pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(1): 149-155.
- [55] Li Y, Zhu D X, Hou L D, *et al.* TRB3 reverses chemotherapy resistance and mediates crosstalk between endoplasmic reticulum stress and AKT signaling pathways in MHCC97H human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1): 1343-1349.

[责任编辑 罗 曦]