

## 残黄片对ANIT诱导黄疸模型大鼠的退黄作用机制分析

吉日木巴图<sup>1,2</sup>, 谢国明<sup>2</sup>, 范娜<sup>2</sup>, 周燕萍<sup>2</sup>, 韩晋<sup>2\*</sup>

(1. 内蒙古医科大学蒙医药研究院, 呼和浩特 010110;

2. 中国人民解放军总医院第五医学中心, 北京 100039)

**[摘要]** 目的: 考察残黄片对 $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT)诱导黄疸模型大鼠肝脏法尼醇X受体(FXR), 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1(UGT1A1)和多药耐药相关蛋白2(MRP2)mRNA和蛋白表达的影响, 探讨其治疗残留黄疸的作用机制。方法: 大鼠分为正常组、模型组、残黄片(CHP)组和熊去氧胆酸片(UDCA)组, ANIT灌胃复制黄疸模型, 相应药物干预后进行血清总胆红素(TBIL), 总胆汁酸(TBA), 丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和碱性磷酸酶(ALP)的含量检测和肝组织病理学检查, 以评价残黄片的治疗作用。应用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western blot)检测各组大鼠肝组织FXR, UGT1A1, MRP2 mRNA和蛋白的相对表达量。结果: CHP能显著降低由ANIT引起的大鼠血清TBIL, TBA, ALT, AST, ALP的升高, 抑制肝脏病理学改变, 退黄作用优于UDCA。与正常组比较, ANIT造模后显著抑制大鼠肝组织FXR, UGT1A1, MRP2的mRNA水平( $P < 0.01$ )。与模型组比较, CHP和UDCA干预后均显著提升了各蛋白目的基因mRNA水平( $P < 0.01$ ), 在提升胆红素代谢酶UGT1A1的mRNA水平上CHP优于UDCA( $P < 0.01$ )。在影响蛋白表达方面, 与正常组比较ANIT造模使大鼠FXR表达明显升高( $P < 0.05$ ), CHP干预有促进FXR表达的趋势, 而UDCA未见有促进趋势, 但二者无显著差异。在促进胆红素代谢和胆汁排泄方面, ANIT造模使得UGT1A1, MRP2的表达显著降低( $P < 0.01$ ), 而CHP治疗后显著提高了UGT1A1和MRP2蛋白的表达( $P < 0.01$ )。在提高胆红素与胆汁酸外排蛋白MRP2的表达上CHP优于UDCA( $P < 0.01$ )。结论: CHP退黄作用机制与激活肝脏FXR mRNA的表达, 促进胆红素代谢酶UGT1A1和胆汁酸转运体MRP2的mRNA和蛋白表达, 提高肝脏对游离胆红素的代谢并促进胆汁酸排出肝脏, 缓解胆汁淤积性肝损伤有关。

**[关键词]** 残黄片; 黄疸; 胆汁; 胆红素; 法尼醇X受体(FXR); 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1(UGT1A1); 多药耐药相关蛋白2(MRP2)

[中图分类号] R22; R256; R28; R96; C37 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)17-0064-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201050

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200204.1200.001.html>

[网络出版日期] 2020-2-4 12:35

### Research on Therapeutic Mechanism of Canhuang Tablets on Jaundiced Rats Induced by ANIT

JIRIMU Ba-tu<sup>1,2</sup>, XIE Guo-ming<sup>2</sup>, FAN Na<sup>2</sup>, ZHOU Yan-ping<sup>2</sup>, HAN Jin<sup>2\*</sup>

(1. Academy of Mongolian Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China;

2. Fifth Medical Center of People's Liberation Army of China (PLA) General Hospital,  
Beijing 100039, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the therapeutic mechanism of Canhuang tablets on the mRNA and protein expression of farnesoid X receptor (FXR), uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and multidrug resistance associated protein 2 (MRP2) in the liver of jaundiced rats induced by  $\alpha$ -naphthalene isothiocyanate (ANIT). **Method:** The rats were divided into normal group, model group, Canhuang tablets

[收稿日期] 20191204(013)

[基金项目] 北京市科技计划“十病十药”研发专项(Z171100001717002, Z131100002513005)

[第一作者] 吉日木巴图, 博士, 助理研究员, 从事蒙药物质基础与作用机制研究, Tel: 0471-6653693, E-mail: 328022578@qq.com

[通信作者] \* 韩晋, 硕士, 主任药师, 博士生导师, 从事中药制剂与工程技术研究, Tel: 010-66933225, E-mail: hanjin302emba@163.com

(CHP) group and ursodeoxycholic acid tablets (UDCA) group. The jaundice model was reproduced by ANIT. After the intervention of the corresponding drugs, the contents of total bilirubin (TBIL), total bile acid (TBA), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) in serum and the liver histopathology were examined to evaluate the therapeutic effect of CHP. The relative mRNA and protein expressions of FXR, UGT1A1 and MRP2 in rat liver tissues were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. **Result:** CHP can significantly reduce the increase of TBIL, TBA, ALT, AST and ALP caused by ANIT in rat serum, and inhibit the liver pathological changes, which showed that the removing jaundice effect of CHP was better than UDCA. Compared with the normal group, ANIT significantly inhibited the mRNA levels of FXR, UGT1A1 and MRP2 in rat liver tissues after modeling ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, CHP and UDCA significantly increased the mRNA levels of target genes of each protein after intervention ( $P<0.01$ ), and CHP was superior to UDCA in improving the mRNA level of bilirubin metabolizing enzyme UGT1A1 ( $P<0.01$ ). In the aspect of affecting protein expression, compared with the normal group, ANIT modeling significantly increased the expression of FXR in rats ( $P<0.05$ ). CHP intervention showed a tendency to promote the expression of FXR, while UDCA did not, but there was no significant difference between them. In the aspects of promoting bilirubin metabolism and bile excretion, the expressions of UGT1A1 and MRP2 were significantly decreased by ANIT modeling ( $P<0.01$ ), while the expressions of UGT1A1 and MRP2 proteins were significantly increased after treatment of CHP ( $P<0.01$ ). CHP was superior to UDCA in increasing the expression of bilirubin and bile acid efflux protein MRP2 ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** The jaundice abating mechanism of CHP is related to activating FXR mRNA expression in liver, promoting the mRNA and protein expression of bilirubin metabolizing enzyme UGT1A1 and bile acid transporter MRP2, improving liver metabolism of free bilirubin and promoting bile acid excretion from the liver, and alleviating cholestatic liver injury.

**[Key words]** Canhuang tablets; jaundice; bile; bilirubin; farnesoid X receptor (FXR); uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1); multidrug resistance associated protein 2 (MRP2)

黄疸在肝病临床病证中较为常见,属中医肝病范畴,其主症为目黄、身黄、小便黄,主要病因是肝胆疏泄功能异常而胆汁外溢所致<sup>[1]</sup>。肝内胆汁淤积是肝失疏泄的表现,也是黄疸的诱因,可伴随多种肝脏病变。当肝细胞功能不全或肝内毛细胆管阻塞时引起胆红素、胆汁酸和胆汁酸盐等的摄取、生成、转运、排泄异常导致胆汁回流入血,致使血中相应成分含量升高<sup>[2]</sup>。胆红素是胆汁的主要组成之一,也是胆汁颜色的主要来源,在肝脏中代谢清除<sup>[3]</sup>。血清总胆红素水平是黄疸和肝损伤的诊断指标,其代谢主要受肝脏法尼醇X受体(FXR),尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)及多药耐药相关蛋白2(MRP2)等的调节<sup>[4]</sup>。

残黄片是中国人民解放军总医院第五医学中心的医院制剂,临床用于肝炎后期、肝硬化慢性进展出现的黄疸持久不退——残留黄疸。中医认为黄疸的病机属湿,肝炎后期肝失疏泄,顽固性湿邪流注于脉络,壅聚生热,瘀热不行,致久留不去之残黄,出现目肤黄染、口粘、苔腻、尿黄、胁肋胀疼等症

状<sup>[5]</sup>。该制剂由黄连、青黛、白矾、郁金4味药组成<sup>[6]</sup>,方中黄连以清湿浊壅热为君,青黛配白矾利胆泻火为臣,郁金活血解郁、清心凉血为佐使,诸药合用起到宣通脉络、清化湿浊、祛除黄疸的作用。本课题组前期研究发现残黄片对 $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT)诱导的黄疸模型大鼠有促进胆汁排泄、抑制肝损伤等作用<sup>[7]</sup>。然而,关于该制剂治疗残留黄疸的机制尚不明确,缺乏药理作用机制研究。本研究通过ANIT诱导大鼠黄疸模型,考察残黄片对肝内胆红素代谢和胆汁排泄相关蛋白的基因转录和表达的调节作用,以期阐释该制剂的退黄作用机制。

## 1 材料

L-550型台式大容量离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司),FCR 2002-UF型纯水机(日本FLOM公司),BSA623S-CW型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],IMS-120型全自动雪花制冰机(苏州裕宸仪器有限公司),10-T型匀浆机(德国IKA公司),Legend Micro 21R型台式冷冻离心机(美国Thermo Scientific公司),Synergy H1型

全功能酶标仪(美国BioTek公司), AU5400型全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司), 7500型逆转录-聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国Applied Biosystems公司), Mini-PROTEAN® Tetra型蛋白电泳系统和Trans-Blot SD型蛋白半干转印槽(美国Bio-Rad公司), Tanon 4200SF型全自动化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司)。

残黄片(CHP, 中国人民解放军总医院第五医学中心制剂中心生产, 批号20180429), 熊去氧胆酸片(UDCA, 四川迪菲特药业有限公司, 批号180303),  $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT, 上海Macklin生化科技有限公司, 批号C10116101); 总胆红素(TBIL, 批号1010906), 总胆汁酸(TBA, 批号1010112), 丙氨酸氨基转移酶(ALT, 批号1010206), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST, 批号1010306), 碱性磷酸酶(ALP, 批号1010406)测定试剂盒均购自烟台澳斯邦生物工程有限公司; GoScrip™反转录系统(美国Promega公司, 批号0000303454), PCR扩增试剂盒(美国Applied Biosystems公司, 批号1712046); 兔抗鼠法尼醇X受体(FXR)多克隆抗体(批号ab228949), 兔抗鼠尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1(UGT1A1)多克隆抗体(批号ab194697), 兔抗鼠多药耐药相关蛋白2(MRP2)单克隆抗体(批号ab203397), 兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(批号ab9485)均购自英国Abcam公司; 试剂均为国产分析纯。

SPF级雄性SD大鼠40只, 体质量(200±20)g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 许可证号SCXK(京)2016-0002, 饲养于中国人民解放军总医院第五医学中心的实验动物中心, 实验动物使用许可证号SYXK(军)2018-0010。标准条件喂养, 环境温度22~26℃, 相对湿度55%~65%, 保持12h昼夜规律, 自由进食进水。本研究所涉及的动物实验经中国人民解放军总医院第五医学中心实验动物福利伦理委员会审查批准, 编号IACUC-2018-002。

## 2 方法

**2.1 黄疸模型建立及给药** 按每组10只, 将40只SD大鼠随机分为4组。将造模剂ANIT溶于大豆油中, 配成质量浓度为10g·L<sup>-1</sup>的溶液。正常组按给药体积10mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃生理盐水(NS), 大豆油模拟造模。模型组以10mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>NS灌胃, ANIT造模。CHP组以残黄片0.315g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃(临床剂量0.045g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的7倍为小鼠剂量), ANIT造模; UDCA组以熊去氧胆酸片0.135g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(临床

剂量0.0193g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的7倍为小鼠剂量)灌胃, ANIT造模。各组大鼠分别给予相应药物连续7d, 于第5天给药2h后, 模型组和CHP组, UDCA组均按75mg·kg<sup>-1</sup>灌胃大豆油溶解的ANIT复制黄疸模型, 48h后模型组血清TBIL, TBA, ALT, AST水平高于正常组2倍以上视为造模成功<sup>[8]</sup>。正常组灌胃相应体积的大豆油模拟造模。

**2.2 取材及标本处理** 全部大鼠在收集血液和肝组织前禁食不禁水12h, 于第7天给药2h后腹腔注射20%乌拉坦进行麻醉, 打开腹腔从腹主动脉采血, 然后沿剑突剪开胸腔, 取出肝脏, 自肝右叶剪下一块肝组织于10%中性甲醛溶液中以备肝组织病理学检查; 剩余部分剪成若干小块分装于离心管后暂存于液氮中, 后转存于-80℃冰箱。采集的血液样本自然凝血后以1500×g离心15min(离心半径150mm), 吸取上清液于离心管中, -80℃低温冰箱保存。

**2.3 血清黄疸相关指标的检测** 用全自动生化分析仪测定大鼠血清指标, 测定步骤严格按TBIL, TBA, ALT, AST和ALP试剂盒说明书进行。

**2.4 肝组织病理学检查** 取于10%中性甲醛溶液中固定的肝组织, 进行脱水后石蜡包埋, 按约2μm厚度连续切片, 低温烘烤后进行苏木素-伊红(HE)染色, 封片并采集图像。

**2.5 RT-PCR检测FXR, UGT1A1, MRP2 mRNA的表达** 采用trizol提取RNA, 严格按照操作手册执行, 以DNA/蛋白定量紫外分光光度计检测RNA纯度, 以提取的mRNA3μg为模板逆转录为cDNA, 以GAPDH为内参, 检测FXR, UGT1A1, MRP2 mRNA的相对表达量。PCR扩增产物运用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算各目的基因的表达量。目的基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物信息见表1。RT-PCR仪用于目的基因mRNA的相对定量。20μL反应体系为2×Taq MasterMix 10μL, 上游和下游引物各0.8μL, cDNA 0.2μL, 无RNA/DNA酶水8.2μL。反应条件为50℃激活Taq酶2min, 95℃维持10min; 95℃预变性15s, 温度60℃退火1min, 循环2次; 95℃变性15s, 温度60℃退火、延伸1min, 重复循环40次。目的基因的特异性以溶解曲线检测。

**2.6 FXR, UGT1A1, MRP2表达的检测** 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测。将冻存的肝组织取出称重, 并置于冰上进行破碎匀浆, 精确称重, 每20mg组织加裂解液150μL, 充分裂解后12000×g离心15min(离心半径40mm), 取上清进行蛋白含

表1 肝组织 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of liver tissue for RT-PCR

蛋白	基因	引物序列(5'→3')
FXR	NR1H4	上游 TGGACTCATACAGCAAACAGAGA
		下游 GTCTGAAACCCTGGAAGTCTTTT
UGT1A1	UGT1A1	上游 CTCTCCAGCCTTCACAAG
		下游 CTAATACTTCTCCTTCACTCC
MRP2	ABCC2	上游 CTGGTGTCTGTGGTCACATTTT
		下游 AATCGTCTCTCCCAAATACCT
GAPDH	GAPDH	上游 TCCGCCCTTCCGCTGATG
		下游 CACGGAAGGCCATGCCAGTGA

注:NR1H4.核受体亚家族1H组成员4;ABCC2.三磷酸腺苷结合盒亚家族C成员2。

量测定。利用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至每个蛋白浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,加入 Loading Buffer,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 干浴器放置 5 min,使蛋白变性。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)预制胶每孔上样蛋白  $20 \mu\text{g}$ ,电泳分离,聚偏二氟乙烯膜(PVDF)转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,  $1 \times \text{TBST}$  等渗缓冲盐溶液洗去奶粉溶液,按相对分子质量指示剂颜色剪下目的蛋白区域,加入一抗,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内轻摇过夜。次日取出膜后  $1 \times \text{TBST}$  洗 3 遍,加入二抗,于  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 脱色摇床上摇动封闭 1 h。一抗、二抗使用浓度见表 2。随后用化学发光试剂(ECL 发光液)润湿,于化学发光成像系统中进行图像采集。

表3 残黄片对大鼠血清中相关检测指标浓度的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Canhuang tablets on contents of related indicators in rat serum( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TBIL	TBA	ALT	AST	ALP
正常	-	$0.55 \pm 0.21^{2,4)}$	$15.50 \pm 5.68^{2,4)}$	$39.00 \pm 5.02^{2,4)}$	$146.00 \pm 24.58^{2,4)}$	$365.16 \pm 44.40^{2,4)}$
模型	-	$60.43 \pm 18.93$	$224.16 \pm 25.61$	$334.66 \pm 114.30$	$818.00 \pm 32.64$	$658.50 \pm 188.43$
CHP	0.315	$27.50 \pm 20.24^{2,4)}$	$158.83 \pm 34.36^{2,4)}$	$217.50 \pm 25.97^{2,4)}$	$512.50 \pm 70.56^{2,4)}$	$577.50 \pm 109.79^{1)}$
UDCA	0.135	$43.93 \pm 17.48^{2)}$	$206.16 \pm 78.81^{2)}$	$363.83 \pm 71.38$	$830.83 \pm 276.11$	$577.50 \pm 112.24^{1)}$

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与UDCA组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表4,5同)。

3.2 残黄片改善肝组织病理改变情况 正常组大鼠肝组织以小叶间静脉为中心,规整排列,肝细胞间紧密连接,细胞结构清晰完整,细胞核大而圆,未见坏死或炎性细胞浸润,见图1(A)。模型组大鼠肝组织病变明显,肝小叶静脉充血,肝细胞排列疏松、紊乱,多数肝细胞核萎缩且有空泡产生,细胞间紧密连接被破坏,提示肝小叶结构破坏、肝细胞损伤坏死,见图1(B)。CHP组肝脏病变不明显,肝细胞排列规整,紧密连接破坏较少,多数细胞核大而圆,少见空泡样变性,见图1(C)。UDCA组肝细胞间紧

表2 抗体使用浓度

Table 2 Concentrations of antibodies

类别	抗体	稀释比例
一抗	FXR	1:500
	UGT1A1	1:1000
	MRP2	1:500
二抗	GAPDH	1:500
	辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)	1:5000

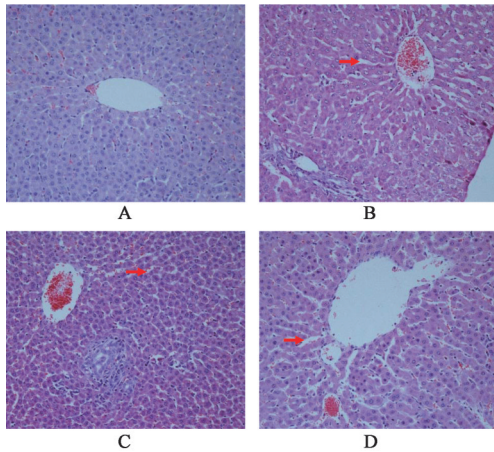
2.7 数据处理与分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较,以  $t$  检验比较组间差异, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 残黄片对血清黄疸相关指标的影响 血清 TBIL 和 TBA 是临床诊断黄疸的重要指标,血清 ALT,AST,ALP 是肝损伤及肝内胆管损伤的诊断指标。结果模型组血清 TBIL, TBA 浓度和 ALT,AST,ALP 浓度均显著高于正常组( $P < 0.01$ ),表明 ANIT 引起了大鼠胆汁排泄障碍和肝损伤,黄疸模型建立成功。与模型组比较,CHP 显著降低黄疸模型大鼠血清 TBIL, TBA, ALT, AST 和 ALP 水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),治疗作用明显。CHP 对降低血清 TBIL, TBA, ALT, AST 水平的作用明显优于 UDCA,二者比较具有显著性差异( $P < 0.01$ )。见表 3。

密连接破坏较多,肝细胞部分排列紊乱,多数肝细胞表现为核萎缩且有空泡产生,见图1(D)。提示 CHP 能改善肝组织病理学改变,且作用优于 UDCA。

3.3 残黄片对 FXR, UGT1A1, MRP2 mRNA 表达的影响 各组大鼠肝组织 FXR, UGT1A1, MRP2 的 mRNA 表达见表 4。与正常组比较,ANIT 造模后显著抑制了大鼠肝组织 FXR, UGT1A1, MRP2 的 mRNA 水平( $P < 0.01$ )。CHP 和 UDCA 干预后均显著提升了各蛋白目的基因的 mRNA 水平( $P < 0.01$ ),



A. 正常组; B. 模型组; C. CHP组; D. UDCA组(图2同)

图1 各组大鼠肝组织的病理观察(HE, ×200)

Fig. 1 Pathological observation of liver tissue of rats in each group(HE, ×200)

在提升胆红素代谢酶 UGT1A1 的 mRNA 水平上 CHP 优于 UDCA ( $P < 0.01$ )。

表4 残黄片对大鼠肝组织中 FXR, UGT1A1, MRP2 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of Canhuang tablets on FXR, UGT1A1, MRP2 mRNA expression in rat liver tissues( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	FXR	UGT1A1	MRP2
正常	-	1.25±0.20 <sup>2,4)</sup>	1.14±0.15 <sup>2,4)</sup>	1.05±0.14 <sup>2,4)</sup>
模型	-	0.30±0.02	0.46±0.11	0.65±0.05
CHP	0.315	0.81±0.07 <sup>2,4)</sup>	3.47±0.25 <sup>2,4)</sup>	1.07±0.31 <sup>2,4)</sup>
UDCA	0.135	0.97±0.04 <sup>2)</sup>	1.91±0.17 <sup>2)</sup>	1.36±0.27 <sup>2)</sup>

**3.4 残黄片对胆汁成分代谢与转运相关蛋白表达的影响** 各组大鼠肝组织核受体 FXR 和胆红素代谢转运相关 UGT1A1, MRP2 蛋白的表达情况见表 5 和图 2。与正常组比较, ANIT 造模使大鼠 FXR 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), CHP 干预有促进 FXR 表达的趋势, 而 UDCA 未见有促进趋势, 但二者无显著差异。在促进胆红素代谢和胆汁排泄方面, ANIT 造模使得 UGT1A1, MRP2 的表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而 CHP 治疗后显著提高了 UGT1A1 和 MRP2 蛋白的表达 ( $P < 0.01$ )。CHP 对提高胆红素与胆汁外排相关 MRP2 的表达作用优于 UDCA ( $P < 0.01$ )。

#### 4 讨论

肝脏 FXR 是胆汁成分的天然受体, 定位于肝细胞核受体膜, 对胆汁的形成和转运具有调控作用。有研究显示, FXR 激动剂可诱导 MRP2 蛋白的表达, 促进淤积的胆红素、胆汁酸盐以及有毒物质的外

表5 残黄片对大鼠肝组织中 FXR, UGT1A1, MRP2 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of Canhuang tablets on FXR, UGT1A1, MRP2 protein expression in rat liver tissues( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	FXR	UGT1A1	MRP2
正常	-	1.03±0.03 <sup>1)</sup>	0.35±0.04 <sup>2,4)</sup>	1.14±0.03 <sup>2,4)</sup>
模型	-	1.22±0.11	0.14±0.01	0.53±0.04
CHP	0.315	1.23±0.13	0.23±0.02 <sup>2,4)</sup>	0.92±0.04 <sup>2,4)</sup>
UDCA	0.135	1.15±0.10	0.54±0.02 <sup>2)</sup>	0.43±0.03 <sup>2)</sup>

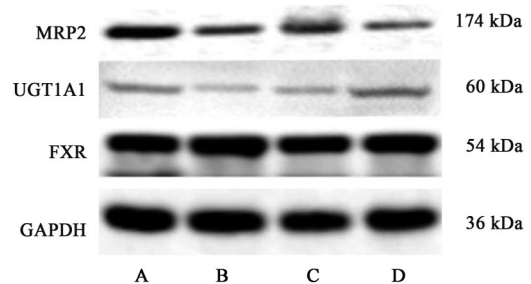


图2 各组大鼠肝组织中 FXR, UGT1A1, MRP2 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of FXR, UGT1A1, MRP2 protein expression in liver tissues of rats in each group

排<sup>[9-10]</sup>。UGT1A1 主要存在于肝细胞微粒体上, 可选择性催化 80% 的脂溶性未结合胆红素与葡萄糖醛酸结合, 产生水溶性胆红素葡萄糖醛酸结合物, 进而被肝细胞基底侧 MRP2 转运入毛细胆管, 排出肝脏<sup>[11-12]</sup>。本课题组前期分子对接研究结果提示, CHP 中的小檗浸碱、氢化小檗碱、穆坪马兜铃酰胺、槲皮素、去甲氧基姜黄素、桉木酮、黄柏酮、姜黄素、柚皮素和 Corchoroside A 共 10 个成分与 FXR, 一氧化氮合酶, 三磷酸鸟苷(GTP)环化水解酶 1, 细胞色素 P450 2E1, 单胺氧化酶 A 等 7 个以上靶点作用, 通过促进胆汁排泄、调节胆汁酸生成与重吸收、调控胆红素代谢、调节免疫与细胞凋亡等多个途径发挥作用<sup>[5]</sup>。相关研究显示, 黄连所含生物碱对大鼠肝细胞 UGT1A1 蛋白有激活作用<sup>[13]</sup>, 并激活 FXR 和提升胆汁酸盐输出泵转运蛋白(BSEP)表达而促进肝脏胆汁的排出<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, CHP 能显著提高黄疸模型大鼠肝脏 UGT1A1 的 mRNA 和蛋白表达, 恢复肝细胞对游离胆红素的代谢, 有助于排出肝脏。与此同时, CHP 激活大鼠肝组织 FXR mRNA 的表达, 并显著提升其下游的 MRP2 mRNA 和蛋白表达, 促进了胆红素和胆汁酸盐排出肝脏, 降低胆汁淤积引起的肝损伤。本研究结果也验证了分子对接模拟的 CHP 调节肝内胆红素及胆汁代谢转运相关蛋白的作用机制, 填补了该制剂退黄机制研究

的空白。

胆汁的形成和转运不仅涉及胆红素,还与多种初级胆汁酸和次级胆汁酸的代谢转运有关。成人平均胆汁酸总量3~5 g,每天可循环5~8次,由肝脏排出的胆汁酸95%在肠道被重吸收,经门静脉回到肝脏,形成肝肠循环<sup>[15-16]</sup>。CHP成分复杂多样,其退黄机制可能不仅限于FXR及下游靶点,还可能与肝脏胆汁酸代谢酶、肝血窦膜转运蛋白以及肠道胆汁成分转运体有关。从胆汁的肝肠循环角度,借助网络药理学方法建立“疾病-基因-靶点-成分”相互作用网络,预测CHP可能的作用靶点和机制,结合成分敲入敲出和血清LC-MS分析方法进行验证,将有望全面阐释CHP退黄作用机制。

#### [参考文献]

- [1] 洪嘉禾.实用中医肝病学[M].上海:上海中医药大学出版社,1993:1-134.
- [2] 吴孟超,李梦东.实用肝病学[M].北京:人民卫生出版社,2011:764.
- [3] ROSS P M, ALEXANDER J S, ISTVAN T. Biological properties and therapeutic potential of bilirubin [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2003, 3(3): 253-256.
- [4] 李秋红,邵勇.胆红素在肝脏的代谢及调节机制研究进展[J].*肝脏*, 2012, 17(1): 56-59.
- [5] 吉日木巴图,范娜,王蕊,等.基于分子对接技术探讨残黄片退黄作用机制[J].*中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(10): 154-161.
- [6] 吉日木巴图,张诗龙,范娜,等.基于超微粉碎工艺的残黄片质量稳定性提升[J].*中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12): 9-13.
- [7] 陈红鹤,韩晋,袁海龙,等.微粉化增溶技术在残黄片工艺中的应用[J].*中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(13): 14-17.
- [8] 欧巧群,钱新华,黄笑群,等. ANIT诱导大鼠亚急性肝内胆汁淤积的生化 and 病理变化[J].*胃肠病学和肝病学杂志*, 2015, 24(4): 463-465.
- [9] QU X Y, TAO L N, ZHANG S X, et al. The role of Ntcp, Oatp2, Bsep and Mrp2 in liver injury induced by *Dioscorea bulbifera* L. and diosbulbin B in mice [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 51: 16-22.
- [10] MAHER J M, CHENG X G, SLITT A L, et al. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor mediated pathways in mouse liver [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(7): 956-962.
- [11] GAO X G, FU T, WANG C Y, et al. Computational discovery and experimental verification of farnesoid X receptor agonist auraptene to protect against cholestatic liver injury [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 146: 127-138.
- [12] TIRIBELLI C. Bilirubin metabolism and jaundice revisited [J]. *Gastroenterol Latinoam*, 1999, 10(supl): 17-18.
- [13] 赵园园,苗培培,苗青,等. 6种黄连生物碱对鼠肝微粒体UGTs及UGT1A1活性影响的体内外研究[J].*中国中药杂志*, 2016, 41(2): 309-313.
- [14] 贺凯. 黄连生物碱调节高脂C57BL/6J小鼠胆汁酸信号通路和肠道微生物改善血脂异常研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [15] ESTELLER A. Physiology of bile secretion [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(37): 5641-5649.
- [16] HOFMANN A F. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions [J]. *Front Biosci*, 2009, 14(7): 2584-2598.

[责任编辑 刘德文]