

## 基于转录组学的补骨脂酚致小鼠肝损伤种属差异

康倩君, 涂灿, 郭兆娟, 李品, 蒋冰倩, 王婷\*, 张晶璇\*

(北京中医药大学北京中医药研究院, 国家药品监督管理局中医药研究与评价重点实验室,  
北京 100029)

**[摘要]** 目的:探究补骨脂酚在 Institute of Cancer Research(ICR)小鼠和昆明(KM)小鼠不同种属之间的肝毒性应答差异。方法:通过急性毒性和亚急性毒性动物实验证实补骨脂酚致小鼠肝毒性的客观表现,运用转录组学比较正常 ICR 小鼠和 KM 小鼠 2 种不同种属小鼠间的差异基因富集通路,在此基础上采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)验证相关通路上关键基因的 mRNA 表达证实补骨脂酚致肝损伤的种属差异。结果:补骨脂酚亚急性毒性实验,与正常组比较,ICR 小鼠血清碱性磷酸酶(ALP),5'-核苷酸酶(5'-NT)含量均有不同程度升高,差异无统计学意义,KM 小鼠无明显变化;病理结果显示 ICR 小鼠以肝细胞肥大为主要病理特征,KM 小鼠主要表现为肝细胞脂肪变性。补骨脂酚急性毒性实验,给药 3 d,KM 小鼠出现竖毛,精神萎靡,濒死,ICR 小鼠无明显毒性表现。与正常组比较,KM 小鼠(400 mg·kg<sup>-1</sup>)血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)显著升高( $P<0.01$ ),肝脏总活性氧(SOD)酶活力显著降低( $P<0.01$ );ICR 小鼠(400 mg·kg<sup>-1</sup>)血清 5'-NT,胆碱酯酶(CHE)含量显著升高( $P<0.01$ )。ICR 小鼠肝脑比增加 20.34%,KM 小鼠增加 29.14%( $P<0.01$ )。ICR 小鼠肝脏病理主要表现为肝细胞肥大,KM 小鼠以局灶性炎症为主,伴肝细胞肥大、肝细胞脂肪变性。转录组学京都基因和基因组数据库(KEGG)通路和 Reactome 通路富集分析,发现 ICR 小鼠和 KM 小鼠不同种属间差异基因表达主要涉及氧化磷酸化、胆汁分泌、胆汁酸及胆汁酸盐合成和代谢通路。与正常组比较,细胞色素 P450 家族成员 7A1(CYP7A1)在各给药组均显著上调( $P<0.01$ ),多耐药相关蛋白(MRP2)在 KM 小鼠各给药组均显著降低( $P<0.01$ ),在 ICR 小鼠各给药组显著升高( $P<0.01$ );胆汁酸盐输出泵(BSEP)在 ICR 小鼠急性肝损伤(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组明显降低( $P<0.05$ );SHP1 在 KM 小鼠急性肝损伤(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组高表达,法尼醇 X 受体(FXR)在 ICR 小鼠亚急性肝损伤(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组显著降低( $P<0.01$ );SOD1,过氧化氢酶(CAT),核转录因子 E<sub>2</sub> 相关因子 2(NRF2)在 KM 小鼠急性肝损伤(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组显著降低( $P<0.01$ ),CAT 在 KM 小鼠亚急性肝损伤(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组显著降低( $P<0.01$ );谷胱甘肽巯基转移酶 1(GSTA1),谷胱甘肽过氧化物酶 1(GPX1)在 KM 小鼠急性肝损伤(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组显著增强( $P<0.01$ ),SOD1,CAT,NRF2,GSTA1 在 ICR 小鼠亚急性肝损伤(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组显著升高( $P<0.01$ ),CAT,NRF2 在 ICR 小鼠急性肝损伤(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组显著升高( $P<0.01$ )。结论:随着补骨脂酚给药剂量增加,KM 小鼠氧化应激所致肝损伤逐渐加重;ICR 小鼠表现出更强的抗氧化能力。通过比较 2 种小鼠对补骨脂酚的毒性应答反应,关于研究补骨脂酚所致小鼠肝脏肝毒性机制,ICR 小鼠更适合研究胆汁分泌及胆汁酸代谢相关的机制,KM 小鼠更易受氧化应激的影响而发生肝损伤。

**[关键词]** 中药;补骨脂酚;肝损伤;种属差异;转录组学

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0077-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220429 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211210.2157.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-12-13 17:27

### Species Differences of Bakuchiol-induced Liver Injury in Mice Based on Transcriptomics

KANG Qian-jun, TU Can, GUO Zhao-juan, LI Pin, JIANG Bing-qian, WANG Ting\*, ZHANG Jing-xuan\*  
(Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), National Medical Products Administration Key Laboratory for Research and Evaluation of TCM, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[收稿日期]** 20211013(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81773992);中央高校基本科研业务费重点攻关项目(2020-JYB-ZDGG-109)

**[第一作者]** 康倩君,在读硕士,从事中药毒性研究,E-mail:17637636238@163.com

**[通信作者]** \*张晶璇,硕士,副研究员,从事中药毒性研究,E-mail:zh\_xyj@126.com;

\*王婷,博士,教授,博士生导师,从事中药毒性研究,E-mail:wangting1973@sina.com

**[Abstract] Objective:** To explore the differences in response to bakuchiol-induced hepatotoxicity between Institute of Cancer Research (ICR) mice and Kunming (KM) mice. **Method:** The objective manifestations of bakuchiol-induced hepatotoxicity in mice were confirmed by acute and subacute toxicity animal experiments, and enrichment pathways of differential genes between normal ICR mice and KM mice were compared by transcriptomics. The real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time qPCR) assay was used to verify the mRNA expression of key genes in the related pathways to confirm the species differences of bakuchiol-induced liver injury. **Result:** In the subacute toxicity experiment, compared with the normal mice, the ICR mice showed increased serum content of alkaline phosphatase (ALP), and 5'-nucleotidase (5'-NT), without significant difference, and no manifest change was observed in KM mice. Pathological results showed that hepatocyte hypertrophy was the main pathological feature in ICR mice and hepatocyte steatosis in KM mice. In the acute toxicity experiment, KM mice showed erect hair, mental malaise, and near-death 3 days after administration. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in KM mice ( $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) significantly increased ( $P<0.01$ ), and the activity of total reactive oxygen species (SOD) in liver significantly decreased ( $P<0.01$ ) compared with those in normal mice, while the serum content of 5'-NT and cholinesterase (CHE) in ICR mice ( $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) were significantly elevated ( $P<0.01$ ). The liver/brain ratio in ICR mice increased by 20.34% and that in KM mice increased by 29.14% ( $P<0.01$ ). The main pathological manifestation of the liver in ICR mice was hepatocyte hypertrophy, while those in KM mice were focal inflammation, hepatocyte hypertrophy, and hepatocyte steatosis. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Reactome pathway enrichment analyses showed that the differential gene expression between ICR mice and KM mice was mainly involved in oxidative phosphorylation, bile secretion, bile acid and bile salts synthesis, and metabolism pathway. CYP7A1 was up-regulated in all groups with drug intervention ( $P<0.01$ ) and MRP2 was reduced in all groups with drug intervention of KM mice ( $P<0.01$ ) and elevated in all groups with drug intervention of ICR mice ( $P<0.01$ ) compared with those in the normal group. The expression of BSEP was lowered in ICR mice with acute liver injury ( $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ( $P<0.05$ ). SHP1 was highly expressed in KM mice with acute liver injury ( $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). The expression of FXR was diminished in ICR mice with subacute liver injury ( $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ( $P<0.01$ ). SOD1, CAT, and NRF2 significantly decreased in KM mice with acute liver injury ( $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and CAT dwindled in KM mice with subacute liver injury ( $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ( $P<0.01$ ). GSTA1 and GPX1 significantly increased in KM mice with acute liver injury ( $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ( $P<0.01$ ) and SOD1, CAT, NRF2, and GSTA1 significantly increased in ICR mice with subacute liver injury ( $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ( $P<0.01$ ). CAT and NRF2 significantly increased in ICR mice with acute liver injury ( $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** With the increase in the dosage of bakuchiol, the liver injury induced by oxidative stress in KM mice was gradually aggravated, and ICR mice showed stronger antioxidant capacity. The comparison of responses to bakuchiol-induced hepatotoxicity between ICR mice and KM mice reveals that ICR mice are more suitable for the investigation of the mechanisms related to bile secretion and bile acid metabolism in the research on bakuchiol-induced hepatotoxicity in mice. KM mice are more prone to liver injury caused by oxidative stress.

**[Keywords]** Chinese medicine; bakuchiol; liver injury; species difference; transcriptomics

近年来,随着《健康中国2030》战略的实施、人们对健康美好生活的需求日益增长,中医药广泛用于疾病治疗、养生保健等领域,随之而来的中医药安全性问题也逐渐增多<sup>[1-3]</sup>。虽然历代医者对传统有毒中药的使用有着深刻认识,也积累了较丰富的安全用药经验和理论,但近年来中药相关的安全性事件引发了国内外的重视与担忧。由于中药自身

复杂体系,目前中药安全性评价体系和风险防控策略尚不完善,这为中药新药研发、中医药健康发展及临床安全用药带来了很大挑战。

补骨脂酚是补骨脂 *Psoralea corylifolia* 的主要活性成分之一,药理活性作用广泛,如抗病毒作用<sup>[4]</sup>、抗癌作用<sup>[5]</sup>、抗炎作用<sup>[6]</sup>、抗菌作用<sup>[7]</sup>、免疫调节作用<sup>[8]</sup>和植物雌激素样作用<sup>[9]</sup>等。补骨脂是一种

临床常用中药,近年来,随着其应用范围的扩大,国内外出现了多例与补骨脂相关的不良反应报道<sup>[10]</sup>,国家药监部门也多次通报含补骨脂制剂的安全风险警示,如壮骨关节丸等。此外,多个课题组在动物实验研究也发现补骨脂及其主要活性成分(补骨脂酚等)具有明显的肝损伤<sup>[11-13]</sup>。因此,以补骨脂为代表的传统“无毒”中药的安全性问题也成为本领域内亟待解决的难点问题。相对而言,大多数研究并不能严格将药物导致的人类肝脏的不良反应与在实验动物中产生的肝损伤相关联,但实验动物和人类基因组测序的完成使这种严格比较不同种属间的差异和相关性成为可能。

根据文献研究,课题组发现补骨脂酚是中药补骨脂的主要成分之一,根据不同基源及批次的补骨脂生药成分测定,补骨脂酚的含量平均占补骨脂的7.42%~65.02%<sup>[14-17]</sup>,依据前期预实验条件和文献研究<sup>[18-19]</sup>,本实验拟以相当2倍和4倍成人每日临床等效剂量补骨脂的补骨脂酚进行补骨脂酚致肝损伤的亚急性毒性试验(200 mg·kg<sup>-1</sup>补骨脂酚)和急性毒性实验(400 mg·kg<sup>-1</sup>补骨脂酚),采用全基因组转录组分析的方法,探讨物种差异对肝脏的毒性作用差异,为药物肝损伤机制的研究和安全性评价动物模型的选择提供临床前依据。

## 1 材料

**1.1 动物** ICR小鼠,SPF级,雄性,6周,体质量(31.03±1.72)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0011。KM小鼠,SPF级,雄性,6周,体质量(36.35±1.28)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0011。本研究经北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会审查通过,伦理审查编号BUCM-4-2019041901-2013。

**1.2 药物** 补骨脂酚(纯度>98%,江苏永健医药科技有限公司,批号YJ0101);羧甲基纤维素(CMC, BioRuler公司,批号r401801)。

**1.3 试剂** 天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),丙氨酸氨基转移酶(ALT),胆碱酯酶(CHE)测定试剂盒[贝克曼库尔特实验系统(苏州)有限公司,批号分别为AUZ8893, AUZ8511, AUZ9151, AUZ6547];总活性氧(SOD)活性检测试剂盒(WST-8法,碧云天生物公司,批号080219191211);5'-核苷酸酶(5'-NT)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20210417);FastPure<sup>®</sup> Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2,

HiScript<sup>®</sup> III RT SuperMix for qPCR (+gDNA, wiper), ChamQ Universal SYBR 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix(诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别为7E531B1, 7E490K0, 7E412L0);苏木素-伊红(HE)染色液(北京九州柏林生物科技有限公司,批号20210405)。

**1.4 仪器** CX4 Pro型全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司);BX53型自动化智能型正置显微镜(日本Olympus公司);YP1002N型电子天平(上海京孚仪器有限公司);CFX96 Optics Module(美国Bio-Rad公司);Retsch GmbH MM400组织研磨机(德国Retsch公司);Qubit型荧光计(美国Life Technology公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 雄性ICR小鼠与KM小鼠各15只,适应性饲养5 d,分别将ICR, KM品系小鼠随机分为正常组,补骨脂酚(200, 400 mg·kg<sup>-1</sup>)组,每组5只。亚急性肝损伤实验以补骨脂酚200 mg·kg<sup>-1</sup>给药14 d,急性肝损伤实验以补骨脂酚400 mg·kg<sup>-1</sup>给药7 d。各组药物补骨脂酚用2%羧甲基纤维素溶液溶解并配至相应浓度,按照0.02 mL·g<sup>-1</sup>给药体积每日连续、定点灌胃给予相应的药物,正常组给予等量2%羧甲基纤维素溶液。每日观察大小鼠的行为活动、呼吸、粪便性状等一般体征,每3 d测定小鼠体质量1次。

**2.2 取材及血清生化指标检测** 给药结束后,禁食(自由饮水)12 h,摘眼球取血,室温静置4 h后3 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径11 cm),分离血清,采用全自动生化分析仪检测AST, ALP, ALT, CHE等指标。

**2.3 系统尸解和肝脏系数测定** 小鼠失血死亡后,对其进行解剖,观察记录各动物主要脏器的大小、色泽、质地等形态特征,取出完整肝脏和脑,称质量,计算肝脏脏器系数:肝脏脏体比=肝脏湿质量(g)/体质量(g),肝脏脏脑比=肝脏湿质量(g)/脑湿质量(g)。

**2.4 肝组织SOD酶活力及血清5'-NT含量测定** 使用取肝组织研磨,血清获得同2.3项,使用相关试剂盒检测总SOD活性和5'-NT水平。

**2.5 病理组织学检查** 将所取各组大小鼠的肝脏依次经过10%甲醛固定、脱水、石蜡包埋、常规切片及HE染色,光学显微镜观察肝脏病理变化。

**2.6 正常ICR小鼠和KM小鼠转录组学差异比较** 分别选择正常ICR小鼠和KM小鼠各4只作为生

物重复(原始序列数据来自中国生物信息中心中国科学院北京基因组学研究所,可在<https://ngdc.cncb.ac.cn>公开查阅,登录号CRA003625)。丢弃长度<35 nt或含有含混不清核苷酸的读数,用于计算每个基因的唯一图谱的读数,用R-package DEseq 2分析ICR, KM小鼠的差异表达基因, fold-change cut off = 1.0, P value cut off =  $5 \times 10^{-2}$ 。R-package cluster profiler用于GO分析以进行功能富集分析,仅保留P<0.05的GO项。

**2.7 Real-time PCR检测相关mRNA表达** 根据试剂盒说明书,用试剂盒提取总RNA,采用Qubit荧光计对RNA浓度进行定量,用试剂盒反向合成等量cDNA,逆转录反应条件:37℃反应15 min, 85℃反应5 s;进行PCR反应,PCR反应条件:95℃, 30 s预变性,变性95℃, 10 s,延伸60℃, 30 s, 40个循环。用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)进行归一化, 2<sup>-ΔΔCt</sup>方法进行基因表达分析,所用引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,见表1。

**2.8 统计方法** 采用SPSS 20.0统计软件进行数据处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用One-Way ANOVA方法分析组间差异,方差齐时采用LSD方法分析,方差不齐时采用Dunnett's T3方法分析, P<0.05为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 补骨脂酚对小鼠一般体征的影响** 给药期间,补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组2种品系小鼠毛发、行为活动、呼吸、腺体分泌均未出现明显异常;补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组中ICR小鼠未见明显异常;KM小鼠于给药第3天出现明显异常,活动度差、竖毛、精神萎靡,2只濒死。为保证实验数据,补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组KM小鼠于给药3 d取材,ICR小鼠按原计划给药7 d后取材。

**3.2 补骨脂酚对小鼠血清中肝功能生化指标及肝脏中SOD酶活力的影响** 与正常组比较,ICR小鼠补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组血清ALP, 5'-NT有升高趋势,差异无统计学意义;CHE明显升高(P<0.05), KM小鼠各指标无明显异常。ICR小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组血清ALP有升高趋势,差异无统计学意义;补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组CHE, 5'-NT显著升高(P<0.01);KM小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组血清AST, ALT含量显著升高(P<0.01), 肝组织SOD酶活力显著降低(P<0.01)。见表2。

**3.3 补骨脂酚对小鼠体质量的影响** 与正常组比较, KM和ICR小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组体质量

表1 引物序列

Table 1 Sequenc primer

| 引物                               | 序列(5'-3')                  | 长度/bp |
|----------------------------------|----------------------------|-------|
| 法尼醇X受体(FXR)                      | 上游 GCTTGATGTGCTACAAAAGCTG  | 110   |
|                                  | 下游 CGTGGTGATGGTTGAATGTC    |       |
| Src 同源酪氨酸磷酸酶1(SHP1)              | 上游 GGACTTCTATGACCTGTACGGA  | 71    |
|                                  | 下游 GCTGCGTGTAATACTCGACCA   |       |
| 胆汁酸盐输出泵(BSEP)                    | 上游 TCTGACTCAGTGATTCTTCGCA  | 191   |
|                                  | 下游 CCCATAAACATCAGCCAGTTGT  |       |
| 多耐药相关蛋白(MRP2)                    | 上游 GTGTGGATTCCCTTGGGCTTT   | 123   |
|                                  | 下游 CACAACGAACACCTGCTTGG    |       |
| Na <sup>+</sup> /牛黄胆酸共转运蛋白(NTCP) | 上游 CAAACCTCAGAAGACCAAACA   | 108   |
|                                  | 下游 GTAGGAGGATTATCCCGTTGTG  |       |
| 胆固醇7-羟化酶(CYP7A1)                 | 上游 GGGATTGCTGTGGTAGTGAGC   | 100   |
|                                  | 下游 GGTATGGAATCAACCCGTTGTC  |       |
| GAPDH                            | 上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTG    | 123   |
|                                  | 下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA |       |
| 谷胱甘肽巯基转移酶1(GSTA1)                | 上游 AAGCCCGTGCTTCACTACTTC   | 159   |
|                                  | 下游 GGGCACTTGGTCAAACATCAAA  |       |
| SOD1                             | 上游 AACCCAGTTGTGTTGTCAGGAC  | 139   |
|                                  | 下游 CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG |       |
| 过氧化氢酶(CAT)                       | 上游 GGAGGCGGGAACCCAATAG     | 102   |
|                                  | 下游 GTGTGCCATCTCGTCAGTGAA   |       |
| 谷胱甘肽过氧化物酶1(GPX1)                 | 上游 AGTCCACCGTGTATGCCTTCT   | 105   |
|                                  | 下游 GAGACGCGACATTCTCAATGA   |       |
| 核转录因子E <sub>2</sub> 相关因子2(NRF2)  | 上游 TCTTGAGTAAGTCGAGAAGTGT  | 140   |
|                                  | 下游 GTTGAAACTGAGCGAAAAAGGC  |       |

量显著降低(P<0.01); KM小鼠和ICR小鼠补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组体质量均低于正常组,但差异无统计学意义。见表3。

**3.4 补骨脂酚对小鼠脏器系数的影响** 与正常组比较, ICR小鼠补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组肝脏脏体比增加10.23%, 肝脏脏脑比增加12.00%, KM小鼠补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组肝脏脏体比增加12.01%, 肝脏脏脑比增加12.22%, 差异无统计学意义; ICR小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组肝脏脏体比增加29.06%, 肝脏脏脑比增加20.34%(P<0.01); KM小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组肝脏脏体比增加35.92%, 肝脏脏脑比增加29.13%(P<0.01)。见表4。

**3.5 补骨脂酚对小鼠肝组织病理的影响** 与正常组比较, ICR小鼠补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组2/5出

表2 补骨脂酚对两种品系小鼠的肝功能指标的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of bakuchiol on liver function indexes of two strains of mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

| 品系  | 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | ALP/U·L <sup>-1</sup>     | ALT/U·L <sup>-1</sup>     | AST/U·L <sup>-1</sup>      | CHE/U·L <sup>-1</sup>   | SOD/unit                | 5'-NT/U·L <sup>-1</sup>  |
|-----|------|------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| ICR | 正常   |                        | 94.72±19.74               | 31.20±8.23                | 115.34±20.74               | 4.03±0.76               | 2.45±0.32               | 14.37±3.76               |
|     | 补骨脂酚 | 200                    | 138.92±66.61              | 54.00±55.58               | 131.12±34.38               | 6.57±1.29 <sup>1)</sup> | 2.49±0.22               | 24.79±9.97               |
|     |      | 400                    | 124.22±20.27              | 28.20±6.65                | 112.34±22.29               | 7.25±2.11 <sup>2)</sup> | 2.17±0.20               | 31.53±8.65 <sup>2)</sup> |
| KM  | 正常   |                        | 124.78±29.83              | 29.00±7.58                | 89.30±24.64                | 6.82±0.59               | 2.76±0.27               | 12.47±6.46               |
|     | 补骨脂酚 | 200                    | 123.72±29.91              | 25.60±4.62                | 96.30±7.658                | 6.42±0.86               | 2.67±0.30               | 18.04±4.39               |
|     |      | 400                    | 68.32±13.49 <sup>2)</sup> | 83.80±38.96 <sup>2)</sup> | 158.12±59.42 <sup>2)</sup> | 6.09±0.09               | 1.77±0.42 <sup>2)</sup> | 17.42±15.94              |

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01(表3~6同)。

表3 补骨脂酚对小鼠肝损伤体质量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of body weight of liver injury induced by bakuchiol in mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

| 品系  | 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | D0/g       | D3/g                     | D7/g                     | D10/g      | D14/g      |
|-----|------|------------------------|------------|--------------------------|--------------------------|------------|------------|
| ICR | 正常   |                        | 35.68±0.88 | 35.74±1.30               | 37.48±1.19               | 38.64±1.37 | 38.40±1.69 |
|     | 补骨脂酚 | 200                    | 36.56±1.72 | 36.82±1.39               | 38.60±1.98               | 38.04±2.32 | 36.80±2.08 |
|     |      | 400                    | 35.46±1.72 | 34.80±1.42               | 34.42±1.69 <sup>2)</sup> | -          | -          |
| KM  | 正常   |                        | 41.58±0.63 | 41.66±0.88               | 45.02±1.14               | 46.26±1.32 | 47.84±1.60 |
|     | 补骨脂酚 | 200                    | 40.28±1.07 | 40.88±1.42               | 43.06±1.42               | 44.38±1.79 | 45.34±1.68 |
|     |      | 400                    | 40.40±1.34 | 38.12±1.53 <sup>2)</sup> | -                        | -          | -          |

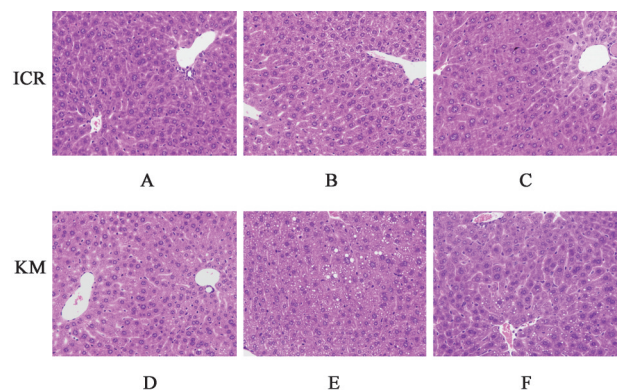
表4 补骨脂酚对两种品系小鼠脏器系数的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of bakuchiol on organ coefficient of two strains of mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

| 品系  | 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | 体质量/g                     | 肝脏/g                      | 肝脏脏体比/g·(100g) <sup>-1</sup> | 肝脏脏脑比/g·g <sup>-1</sup>   |
|-----|------|------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
| ICR | 正常   |                        | 38.40±1.693               | 1.608±0.070               | 4.191±0.194                  | 3.248±0.152               |
|     | 补骨脂酚 | 200                    | 36.80±2.080               | 1.702±0.221               | 4.620±0.482                  | 3.638±0.301               |
|     |      | 400                    | 34.42±1.688 <sup>2)</sup> | 1.862±0.135 <sup>1)</sup> | 5.409±0.291 <sup>2)</sup>    | 3.909±0.206 <sup>2)</sup> |
| KM  | 正常   |                        | 47.84±1.595               | 1.654±0.127               | 3.458±0.254                  | 3.512±0.344               |
|     | 补骨脂酚 | 200                    | 45.34±1.680               | 1.759±0.141               | 3.876±0.199                  | 3.941±0.332               |
|     |      | 400                    | 38.12±1.534 <sup>2)</sup> | 2.058±0.238 <sup>2)</sup> | 5.396±0.541 <sup>2)</sup>    | 4.535±0.494 <sup>2)</sup> |

现中度肝细胞肥大,1/5出现轻度小灶炎,KM小鼠补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组3/5出现肝细胞脂肪变性,以小泡和微泡为主,1/5出现轻度小灶炎;ICR小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组4/5出现重度肝细胞肥大,病变累及至肝小叶中间带肝细胞;KM小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组以肝细胞脂肪变性伴肝细胞肥大为主要病变。见图1。

3.6 差异表达基因分析 相同品系小鼠的表达模式相似,不同品系间样本表达区分明显。2个品系小鼠样本的差异基因聚类热图见增强出版相关材料。ICR小鼠与KM小鼠共有差异基因有10 475个。见图2。火山图可直观展示每个比较组合的差异基因分布情况,正常ICR小鼠与KM小鼠比较有5 772个基因有明显差异,其中1 409个基因显著上调,4 363



A. ICR正常组; B, C. ICR小鼠补骨脂酚(200, 400 mg·kg<sup>-1</sup>)组; D. KM正常组; E, F. KM小鼠补骨脂酚(200, 400 mg·kg<sup>-1</sup>)组

图1 补骨脂酚致小鼠肝损伤的肝脏病理的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Pathological picture of liver injury induced by bakuchiol in mice (HE, ×400)

个基因显著下调。具体火山图见增强出版相关材料。



图2 差异基因韦恩图

Fig. 2 Differential gene Venn diagram

**3.7 差异表达基因的基因本体(GO)分析及京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路, Reactome 通路分析** 基于上述筛选出的不同种属间差异基因,通过采用 clusterProfile 软件对差异基因进行 GO 功能富集分析。GO 是描述基因功能的综合性数据库,可分为生物过程(BP)和细胞组成(CC),分子功能(MF)3部分。差异表达基因的 GO 分析结果显示,在生物过程中主要与代谢过程、核小体组装、有机酸合成相关;在分子功能中主要与氧化还原酶活性、胆汁酸结合相关;在细胞组成中主要与线粒体、细胞膜、核小体相关。差异表达基因具体见增强出版附加材料。将差异表达基因集进行 KEGG 通路和 Reactome 富集分析,从 KEGG 和 Reactome 富集结果中,选取最显著的 20 个 KEGG, Reactome 通路绘制散点图进行展示,见图 3, 4。KEGG 通路和 Reactome 通路显著富集,主要包括氧化磷酸化、非酒精性脂肪性肝病、胆汁分泌、糖异生、细胞色素 CYP450 对外源物质的代谢、生物氧化反应、胆汁酸及胆汁酸盐合成和代谢、类固醇合成等,与肝损伤相关通路主要为氧化磷酸化通路和胆汁分泌通路。

**3.8 对不同品系小鼠肝损伤肝脏胆汁分泌相关 mRNA 表达的影响** 与正常组比较, KM, ICR 小鼠补骨脂酚(200, 400 mg·kg<sup>-1</sup>)组 CYP7A1 mRNA 表达均显著上调( $P < 0.01$ ); KM 小鼠补骨脂酚(200, 400 mg·kg<sup>-1</sup>)组 MRP2 mRNA 表达均显著降低( $P < 0.01$ ), ICR 小鼠补骨脂酚(200, 400 mg·kg<sup>-1</sup>)组 MRP2 mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ ), ICR 小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组 BSEP mRNA 表达明显降低( $P < 0.05$ ); KM 小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组 SHP1 mRNA 表达和 ICR 小鼠补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组 FXR mRNA 表达显著增加( $P < 0.01$ )。见表 5。

**3.9 对不同品系小鼠肝损伤肝脏氧化磷酸化相关 mRNA 表达的影响** 与正常组比较, KM 小鼠补骨

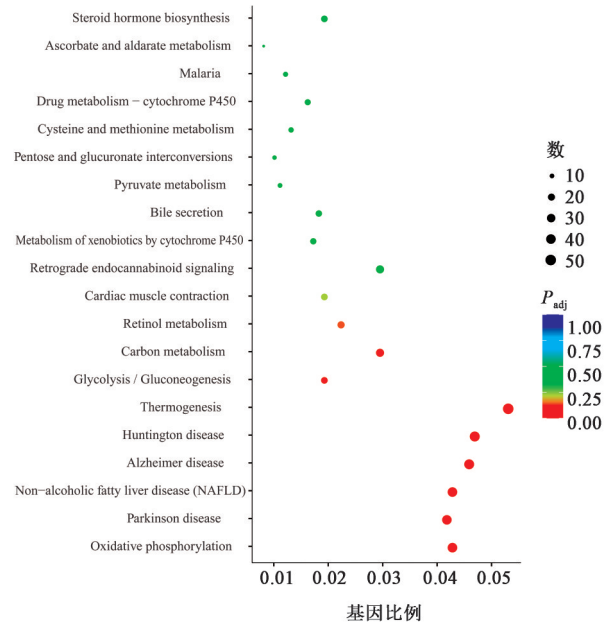


图3 KEGG 富集散点

Fig. 3 KEGG rich distribution point diagram

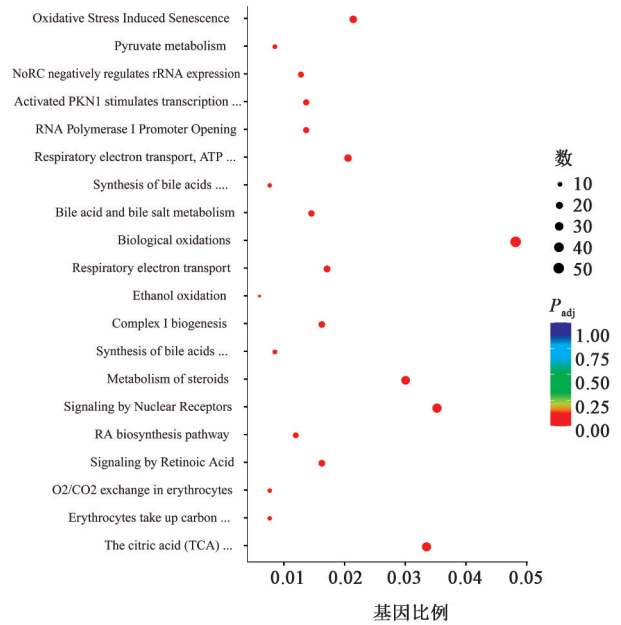


图4 Reactome 富集散点

Fig. 4 Reactome rich distribution point diagram

脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组肝脏中抗氧化因子 SOD1, CAT, NRF2 mRNA 表达均显著降低( $P < 0.01$ ), KM 小鼠补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组 CAT mRNA 表达显著降低( $P < 0.01$ ); KM 小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组氧化因子 GSTA1, GPX1 mRNA 表达均显著升高( $P < 0.01$ )。ICR 小鼠补骨脂酚(200 mg·kg<sup>-1</sup>)组肝脏 SOD1, CAT, NRF2, GSTA1 mRNA 表达均显著升高( $P < 0.01$ ), ICR 小鼠补骨脂酚(400 mg·kg<sup>-1</sup>)组肝脏 CAT, NRF2 mRNA 表达升高( $P < 0.01$ )。见表 6。

表5 补骨脂酚对小鼠肝损伤肝脏胆汁分泌相关 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of liver bile secretion related mRNA in mice with liver injury induced by bakuchiol ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 品系  | 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | CYP7A1                    | MRP2                      | BSEP                      | NTCP                      | SHPI                      | FXR                       |
|-----|------|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ICR | 补骨脂酚 | 200                    | 1.642±0.324 <sup>2)</sup> | 1.701±0.671 <sup>2)</sup> | 1.107±0.487               | 1.215±0.306               | 1.168±0.376               | 1.533±0.402 <sup>2)</sup> |
|     |      | 400                    | 1.797±0.496 <sup>2)</sup> | 1.860±0.335 <sup>2)</sup> | 0.669±0.204 <sup>1)</sup> | 1.243±0.239               | 1.275±0.225               | 1.235±0.317               |
| KM  | 补骨脂酚 | 200                    | 2.007±0.805 <sup>2)</sup> | 0.774±0.113 <sup>2)</sup> | 0.790±0.236               | 1.197±0.129 <sup>2)</sup> | 0.816±0.133               | 0.932±0.291               |
|     |      | 400                    | 2.970±1.950 <sup>2)</sup> | 0.540±0.248 <sup>2)</sup> | 0.992±0.616               | 0.410±0.179 <sup>2)</sup> | 1.756±0.827 <sup>2)</sup> | 1.158±0.796               |

注:设正常组相关 mRNA 表达均为 1(表 6 同)。

表6 补骨脂酚对小鼠肝损伤肝脏氧化磷酸化相关 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 6 Effect of liver oxidative phosphorylation related mRNA in mice with liver injury induced by bakuchiol ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 品系  | 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | SOD1                      | CAT                       | NRF2                      | GSTA1                     | GPX1                      |
|-----|------|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ICR | 补骨脂酚 | 200                    | 1.436±0.359 <sup>2)</sup> | 1.696±0.677 <sup>2)</sup> | 1.996±0.717 <sup>2)</sup> | 3.201±1.383 <sup>2)</sup> | 1.453±0.447               |
|     |      | 400                    | 1.147±0.204               | 1.736±0.419 <sup>2)</sup> | 1.791±0.377 <sup>2)</sup> | 1.967±0.867               | 1.208±0.312               |
| KM  | 补骨脂酚 | 200                    | 1.056±0.357               | 0.659±0.144 <sup>2)</sup> | 0.742±0.138               | 1.095±0.549               | 0.750±0.115               |
|     |      | 400                    | 0.513±0.176 <sup>2)</sup> | 0.520±0.349 <sup>2)</sup> | 0.624±0.298 <sup>2)</sup> | 2.893±0.833 <sup>2)</sup> | 1.813±0.525 <sup>2)</sup> |

#### 4 讨论

中药新药在批准上市之前必须对其安全性进行全面的评估,这是药物发展的重要环节。中药安全性研究受伦理道德原则约束,临床前安全性评价对中药临床安全合理使用起着重要作用。然而,在临床前安全性评价试验中,动物种属的选择、剂量、遗传代谢等多个因素均影响着安全性评价预测的准确性,其中动物种属差异因素是造成药物不良反应错误评价的主要原因,有报道显示,在药物安全性评价中,有近三分之一的药物的毒性不能通过任何一种标准受试动物而被完整预测<sup>[20]</sup>。啮齿类动物(大鼠或小鼠)是目前进行中药临床前安全性评价研究的主要体内模型,其结果对临床研究具有较高的参考价值。大、小鼠存在不同种属间差异,如有研究表明大鼠不适合用于对乙酰氨基酚(APAP)诱导的肝损伤研究<sup>[21]</sup>,因此,并非每种种属动物模型都适用于所有药物的安全性研究。本课题组前期研究也发现小鼠和人的肝功能基因在表达上更相似,其中小鼠更适合于氧化应激相关肝损伤的研究,大鼠更适合研究人类肝脏脂肪变性相关疾病<sup>[22]</sup>。此外课题组还发现补骨脂致肝损伤的表型中小鼠较大鼠的毒性表现更显著<sup>[23]</sup>。

通过选用国家药监部门已通报安全风险,且多个研究团队(包括本课题组)已证实肝损伤客观性的中药补骨脂的主要单体成分之一补骨脂酚作为模式药。本研究发现在相同给药条件下,补骨脂酚肝损伤在 ICR 小鼠与 KM 小鼠的表型具有显著差

异,且同一种属动物在吸收不同含量的药物后,肝损伤类型会发生改变。

补骨脂酚亚急性毒性实验中,ICR 小鼠 ALP, CHE, 5'-NT 含量均有不同程度升高, KM 小鼠无明显变化;病理结果显示 ICR 小鼠以肝细胞肥大为主要病理特征,而 KM 小鼠主要表现为肝细胞脂肪变性。生化指标和病理结果表明在亚急性毒性实验条件下,ICR 小鼠的肝损伤倾向于胆汁淤积, KM 小鼠肝损伤倾向于脂肪变性。

补骨脂酚急性毒性实验显示,给药 3 d, KM 小鼠即出现明显毒性表征(竖毛、精神萎靡、濒死), ICR 小鼠在 7 d 的给药过程中均未出现明显的肝损伤表现。KM 小鼠血清 ALT, AST 显著升高, 肝脏 SOD 酶活力显著性降低, ICR 小鼠血清 ALP, 5'-NT, 胆碱酯酶含量显著性升高。ICR 小鼠肝脏脏脑比相较于同期正常组增加 20.34%, KM 小鼠肝脏脏脑比增加 29.14%。ICR 小鼠肝脏病理主要表现为肝细胞肥大, KM 小鼠以局灶性炎症为主,伴肝细胞肥大、肝细胞脂肪变性。KM 小鼠在 3 d 内迅速出现急性肝损伤,肝损伤与氧化应激密切相关,可能伴胆汁淤积; ICR 小鼠表现为慢性肝损伤,肝损伤氧化应激不明显,以胆汁淤积为主。

为进一步验证种属差异对中药安全性评价的重要性,通过转录组学从基因水平证实了正常 ICR 小鼠和正常 KM 小鼠间存在差异基因表达, ICR 小鼠与 KM 小鼠的差异表达基因主要集中于胆汁分泌和氧化磷酸化两条通路之间,采用 PCR 技术检测两

条通路上的关键基因 mRNA 的表达情况。胆汁主要通过胆盐和胆汁酸起作用,胆汁酸由胆固醇在肝脏中合成,肝细胞内质网上的 CYP7A1 为胆汁酸合成的主要限速酶,胆盐由胆汁酸和牛磺酸结合而成。胆汁的分泌和排泄主要依赖肝细胞膜和胆管膜上的转运体,如位于肝细胞膜上的 NTCP,位于毛细胆管上的 BSEP,MRP2 等<sup>[24-28]</sup>。FXR 维持胆汁稳态,FXR 与 SHP 结合后,可以抑制 CYP7A1 的转录,在肝细胞胆汁酸负荷增加的情况下,胆汁酸通过激活 FXR 从而增加 BSEP 的表达来增加其自身向胆汁的外流<sup>[29]</sup>。本研究表明补骨脂酚给药后小鼠体内胆汁负荷增加,CYP7A1 酶活性增强,激活 FXR,SHPI 表达,刺激胆汁向外分泌。SOD1,CAT,NFR2 是机体抗氧化应激的重要转录因子,当机体处于氧化应激状态被活性氧攻击时,SOD1,CAT 和 NFR2 激活调控的相关抗氧化基因 GSTA1,GPX1 的表达,从而保护机体<sup>[30-31]</sup>。本研究发现随着补骨脂酚的给药剂量增加,KM 小鼠氧化应激所致的肝损伤逐渐加重;ICR 小鼠表现出更强的抗氧化能力。通过比较两种小鼠对有毒中药补骨脂酚的毒性应答反应,可以认为对于补骨脂酚所致肝损伤的机制来说,ICR 小鼠对胆汁分泌通路变化更敏感,KM 小鼠抗氧化能力较 ICR 小鼠弱,更易受氧化应激影响肝脏功能。

综上,本研究首先通过补骨脂酚急性毒性和亚急性毒性动物实验发现了补骨脂酚(相同剂量下)致 ICR 和 KM 小鼠肝损伤存在种属差异,实验结果提示不同种属动物对同种药物的毒性表现不同,存在明显的种属差异,随后运用转录组学通过 KEGG 和 Reactome 通路富集分析发现正常 ICR 小鼠和正常 KM 小鼠不同种属间差异基因表达主要与氧化磷酸化、胆汁分泌、生物氧化反应等相关。进一步 PCR 实验证实了 ICR 和 KM 小鼠不同种属间基因差异表达的客观性。基于本实验,对于补骨脂酚所致小鼠肝脏肝损伤机制,ICR 小鼠应该更适合研究胆汁分泌及胆汁酸代谢相关的疾病,KM 小鼠更易受氧化应激的影响而发生肝损伤。这些结果提示种属差异可能会直接影响中药安全性评价的正确性,在使用动物模型进行药物安全性评价时,应尽量选择多种种属动物作为研究对象,给药剂量范围尽可能广泛,有利于充分认识药物的毒性作用机制,本研究也为中药毒性研究的方法学提供了借鉴。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] JUNG K A, MIN H J, YOO S S, et al. Drug-induced liver injury: twenty five cases of acute hepatitis following ingestion of *Polygonum multiflorum* thunb [J]. Gut Liver, 2011,5(4):493-499.
- [2] 王停,董润生.一起中药临床试验严重不良事件带给我们的思考[J].中国新药杂志,2008,17(14):1185-1187.
- [3] 朱云,李永纲,王夔,等.595例中药导致肝损伤临床特征分析[J].中国中西医结合杂志,2016,36(1):44-48.
- [4] ZHANG D, HAMDOUN S, CHEN R, et al. Identification of natural compounds as SARS-CoV-2 entry inhibitors by molecular docking-based virtual screening with bio-layer interferometry[J]. Pharmacol Res, 2021,172:105820.
- [5] LEE D E, JANG E H, BANG C, et al. Bakuchiol, main component of root bark of *Ulmus davidiana* var. japonica, inhibits TGF-beta-induced *in vitro* EMT and *in vivo* metastasis[J]. Arch Biochem Biophys, 2021,709:108969.
- [6] XU Y, GAO X, WANG L, et al. Bakuchiol ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating NLRP3 inflammasome and Nrf2 signaling [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2021,292:103707.
- [7] LI H, LIU J, LIU C F, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of membrane-active bakuchiol derivatives as effective broad-spectrum antibacterial agents[J]. J Med Chem, 2021,64(9):5603-5619.
- [8] KUMAR A, SAWHNEY G, KUMAR N R, et al. Evaluation of the immunomodulatory and anti-inflammatory activity of bakuchiol using RAW 264.7 macrophage cell lines and in animal models stimulated by lipopolysaccharide (LPS) [J]. Int Immunopharmacol, 2021,91:107264.
- [9] 寿清耀,杨荣平,王宾豪,等.补骨脂雌激素样作用的有效成分研究[J].中药新药与临床药理,2007(6):425-427.
- [10] 朱兰,逢瑜,杨乐,等.骨康胶囊肝损伤风险特点及因素分析[J].中国药物警戒,2018,15(4):248-250.
- [11] LI Z J, ABULIZI A, ZHAO G L, et al. Bakuchiol contributes to the hepatotoxicity of psoralea corylifolia in rats[J]. Phytother Res, 2017,31(8):1265-1272.
- [12] YU Y, WANG P, YU R, et al. Long-term exposure of psoralen and isopsoralen induced hepatotoxicity and serum metabolites profiles changes in female rats[J]. Metabolites, 2019,doi:10.3390/metabo9110263.
- [13] 杨莉,王昭昕,卢国彦,等.补骨脂不同提取部位大

- 鼠给药3个月的毒性比较研究[J]. 药物评价研究, 2019,42(8):1531-1536.
- [14] 王娟,周植星,杨莉,等. 补骨脂药材UPLC指纹图谱建立及12种主要成分含量测定[J]. 中草药, 2021,52(2):552-557.
- [151] 魏舒婷,盛云华,黄坚,等. 吴茱萸指标成分体内外肝损伤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(02):87-92.
- [16] 李建梅,周凡,希尔艾力·吐尔逊,等. 反相高效液相色谱法在补骨脂提取物3种主要成分含量测定中的应用[J]. 中国医药导报, 2017,14(27):12-15.
- [17] 李凯,许梦莹,周宁,等. 炮制时间对盐补骨脂中10种化学成分的影响[J]. 中草药, 2017, 48(4): 710-713.
- [18] 黄芳华,王庆利.《药物单次给药毒性研究技术指导原则》解读[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(4): 386-389.
- [19] 王庆利,王海学,马磊. 急性毒性试验的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2009,18(21):2024-2027.
- [20] 郭兆娟,张晶璇,涂灿,等. 关于中药潜在肝毒性若干问题的思考[J]. 中华中医药杂志, 2020,35(11): 5399-5402.
- [21] MCGILL M R, WILLIAMS C D, XIE Y, et al. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 264(3): 387-394.
- [22] XU Z, KANG Q, YU Z, et al. Research on the species difference of the hepatotoxicity of medicine based on transcriptome [J]. Front Pharmacol, 2021, 12:647084.
- [23] 郭兆娟,张晶璇,康倩君,等. 补骨脂对大鼠、小鼠肝毒性的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020,26(22):16-25.
- [24] CHEN H, HUANG X, MIN J, et al. Geniposidic acid protected against ANIT-induced hepatotoxicity and acute intrahepatic cholestasis, due to Fxr-mediated regulation of Bsep and Mrp2 [J]. J Ethnopharmacol, 2016,179:197-207.
- [25] GUO H L, HASSAN H M, ZHANG Y, et al. Pyrazinamide induced rat cholestatic liver injury through inhibition of FXR regulatory effect on bile acid synthesis and transport [J]. Toxicol Sci, 2016, 152(2):417-428.
- [26] STURM E, WAGNER M, TRAUNER M. Nuclear receptor ligands in therapy of cholestatic liver disease [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2009, 14: 4299-4325.
- [27] ZHANG A, JIA Y, XU Q, et al. Dioscin protects against ANIT-induced cholestasis via regulating Oatps, Mrp2 and Bsep expression in rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016,305:127-135.
- [28] 赵晶,陈曼玉,李磊. 胆酸盐外排泵研究的最新进展 [J]. 中国药理学通报, 2017,33(1):18-22.
- [29] LIU B, LI Y, JI H, et al. Glutamine attenuates obstructive cholestasis in rats via farnesoid X receptor-mediated regulation of Bsep and Mrp2 [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017,95(2):215-223.
- [30] LI Y, WANG C, LU J, et al. PPAR delta inhibition protects against palmitic acid-LPS induced lipidosis and injury in cultured hepatocyte L02 cell [J]. Int J Med Sci, 2019,16(12):1593-1603.
- [31] SU W, ZHANG C, CHEN F, et al. Purple sweet potato color protects against hepatocyte apoptosis through Sirt1 activation in high-fat-diet-treated mice [J]. Food Nutr Res, 2020, doi: 10.29219/fnr.v64.1509.

[责任编辑 张丰丰]