

## 栀子苷对大鼠肝损伤及血清、肝脏、粪便中胆汁酸的影响

刘毓<sup>1</sup>, 张聪聪<sup>2</sup>, 胡永红<sup>1</sup>, 陈高峰<sup>1</sup>, 杨海琳<sup>1</sup>, 张定棋<sup>1</sup>, 陈佳美<sup>1</sup>,  
刘平<sup>1,2</sup>, 刘伟<sup>1,3\*</sup>, 张华<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 肝病研究所, 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海市中医临床  
重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中医药大学中药研究所, 交叉科学研究院, 上海 201203;  
3. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的:探讨不同剂量栀子苷对大鼠肝脏的毒性,以及对其血清、肝组织及粪便中胆汁酸的影响。方法:60只SD大鼠,雌雄各半,按体质量随机分成空白组及栀子苷(50,100,200,400 mg·kg<sup>-1</sup>)组,共5组,每组12只,每天灌胃给药1次,连续7 d,于第8天收集大鼠血清、肝组织和盲肠内容物。检测各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP)活性,白蛋白(ALB),总胆红素(TBIL),总胆汁酸(TBA),肌酐(Crea),尿素(Urea)含量,肝脏组织切片分别作苏木素-伊红(HE)染色,免疫组化检测细胞角蛋白7(CK7),细胞角蛋白19(CK19)蛋白表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)测定肝组织CK7,CK19蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测胆固醇7 $\alpha$ -羟化酶(CYP7A1),胆固醇27 $\alpha$ -羟化酶(CYP27A1),胆固醇12 $\alpha$ -羟化酶(CYP8B1) mRNA表达情况,采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS)测定血清、肝脏及盲肠内容物中18种胆汁酸含量。结果:与空白组比较,各剂量栀子苷组TBIL水平显著升高( $P<0.01$ );400 mg·kg<sup>-1</sup>栀子苷组ALT,AST活性和TBA含量明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ );HE染色表明,与空白组比较,栀子苷200,400 mg·kg<sup>-1</sup>组肝组织的汇管区有胆管反应,胆管周围有炎症细胞的浸润,尤以栀子苷400 mg·kg<sup>-1</sup>毒性明显。栀子苷400 mg·kg<sup>-1</sup>栀子苷组肝组织中CK7,CK19表达较空白组明显增加( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。与空白组比较,400 mg·kg<sup>-1</sup>栀子苷组肝组织中甘氨酸熊脱氧胆酸(GUDCA),甘氨酸猪去氧胆酸(GHDCA)含量明显下降( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA),猪去氧胆酸(HDCA),胆酸(CA),鹅去氧胆酸(CDCA)含量显著升高( $P<0.01$ ),甘氨酸胆酸(GCA),甘氨酸鹅去氧胆酸(GCDCA),甘氨酸脱氧胆酸(GDCA),甘氨酸石胆酸(GLCA),牛磺熊去氧胆酸(TUDCA),GUDCA,GHDCA,熊去氧胆酸(UDCA),牛磺石胆酸(TLCA)的含量占比降低,TCDCA,HDCA,CA,CDCA,脱氧胆酸(DCA)的占比增加;血清中GHDCA,石胆酸(LCA)含量显著下降( $P<0.01$ ),牛磺猪去氧胆酸(THDCA),牛磺胆酸(TCA),GCA,TCDCA,UDCA,CA,CDCA,DCA含量明显增加( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),CA/DCA显著升高( $P<0.01$ ),且CA与CDCA含量占比分别上升19.60%和4.63%;与空白组比较,400 mg·kg<sup>-1</sup>栀子苷组盲肠内容物中所有的胆汁酸含量均下降,其中GCA,UDCA,HDCA,GCDCA,GDCA,TLCA,GLCA,CDCA,DCA,LCA含量明显下降( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。Real-time PCR结果显示,与空白组比较,400 mg·kg<sup>-1</sup>栀子苷组肝组织中CYP7A1,CYP27A1 mRNA表达明显增加( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论:400 mg·kg<sup>-1</sup>栀子苷灌胃,可导致大鼠明显的肝损伤,其肝脏、血清与粪便中胆汁酸发生显著改变,且同一种胆汁酸在肝脏、血清与粪便中的变化不尽相同。然而,由栀子苷所导致的肝损伤与体内胆汁酸变化间的因果关系尚不清楚,仍有待后续进一步研究给予阐明。

**[关键词]** 栀子苷; 肝脏毒性; 肝组织; 血清; 粪便; 胆汁酸

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0063-13

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210627

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210120.1009.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-1-20 10:27

**[收稿日期]** 20201103(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81703681);上海市科技创新行动计划项目(19401972700,20S21902600);上海市青年科技英才扬帆计划项目(17YF1419800);江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室开放基金项目(TCM-202008)

**[第一作者]** 刘毓,在读硕士,从事中医药防治慢性肝病的临床与基础研究,E-mail:doubing\_xiangxiang@126.com

**[通信作者]** \*刘伟,博士,副研究员,从事中药复方药效物质基础及体内过程研究,E-mail:lwhzayl@163.com;

\*张华,博士,研究员,从事中医肝病证候基础研究,E-mail:lnutcmzh@126.com

## Effect of Geniposide on Liver Injury and Bile Acid Profile in Serum, Liver and Excrement of Rats

LIU Yu<sup>1</sup>, ZHANG Cong-cong<sup>2</sup>, HU Yong-hong<sup>1</sup>, CHEN Gao-feng<sup>1</sup>, YANG Hai-lin<sup>1</sup>, ZHANG Ding-qi<sup>1</sup>,  
CHEN Jia-mei<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>1,2</sup>, LIU Wei<sup>1,3\*</sup>, ZHANG Hua<sup>1\*</sup>

(1. *Shuguang Hospital, Institute of Liver Diseases, Key Laboratory of Liver and Kidney Disease (Ministry of Education), Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China*; 2. *Institute of Chinese Materia Medica, Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China*; 3. *Key Laboratory of Modern Preparation of TCM Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the hepatotoxicity of different doses of geniposide on the liver of rats and the effects on bile acid profile in serum, liver tissue and feces. **Method:** The 60 Sprague Dawley rats, half male and half female, were randomly divided into 5 groups according to body weight: blank group and four different doses (50, 100, 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup>) geniposide groups, 12 rats in each group. The rats were treated by gavage once a day for 7 consecutive days, and the serum, liver and cecal contents were collected on the 8<sup>th</sup> day of treatment. The activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP), the contents of albumin (ALB), total bilirubin (TBIL), total bile acid (TBA), creatinine (Crea) and carbamide (Urea) were detected in each group. The sections of liver tissue were stained with hematoxylin-eosin(HE), and the protein expressions of cytokeratin 7(CK7) and cytokeratin 19(CK19) were detected by immunohistochemistry. The protein expressions of CK7 and CK19 in the liver tissue were detected by Western blot. And the mRNA expressions of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1), cholesterol 27 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27A1) and cholesterol 12 $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1) were detected by real-time PCR. The contents of 18 kinds of bile acids in serum, liver and cecal contents were determined by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry(UPLC-MS). **Result:** Compared with the control group, TBIL level in each dose of geniposide group was increased significantly ( $P<0.01$ ). ALT, AST activity and TBA content in 400 mg·kg<sup>-1</sup> geniposide group were increased significantly ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). HE staining showed that, compared with control group, there was bile duct reaction in the portal area and inflammatory cells infiltrate around bile duct in 200 mg·kg<sup>-1</sup> and 400 mg·kg<sup>-1</sup> geniposide groups, especially 400 mg·kg<sup>-1</sup>. The expressions of CK7 and CK19 in liver tissue of 400 mg·kg<sup>-1</sup> geniposide group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the control group, the contents of glycocholic acid (GUDCA) and glycohyodeoxycholic acid (GHDCA) in liver tissue of 400 mg·kg<sup>-1</sup> geniposide group decreased significantly ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the contents of sodium taurochenodeoxycholate (TCDCA), hyodeoxycholic acid (HDCA), cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) in liver tissue increased significantly ( $P<0.01$ ), the contents of glycocholic acid hydrate (GCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), glycodeoxycholic acid hydrate (GDCA), glycocholic acid (GLCA), taurocholic acid (TUDCA), GUDCA, GHDCA, ursodeoxycholic (UDCA) and taurochenodeoxycholic acid (TLCA) decreased, the proportions of TCDCA, HDCA, CA, CDCA and deoxycholic acid (DCA) in liver tissue increased, the contents of GHDCA and lithocholic acid (LCA) in serum decreased significantly ( $P<0.01$ ), while sodium taurohyodeoxycholate hydrate (THDCA), taurocholic acid (TCA), GCA, TCDCA, UDCA, CA, CDCA, DCA in serum decreased significantly ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The contents of CA, UDCA, CA, CDCA and DCA increased significantly ( $P<0.05$ ), the ratio of CA/DCA increased significantly ( $P<0.05$ ), and the ratio of CA and CDCA increased by 19.60% and 4.63%, respectively; Compared with the control group, the contents of all bile acids in cecal contents of 400 mg·kg<sup>-1</sup>

were decreased, and the contents of GCA, UDCA, HDCA, GCDCA, GDCA, TLCA, GLCA, CDCA, DCA and LCA were decreased significantly ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). In addition, real-time PCR results showed that the mRNA expressions of CYP7A1, CYP27A1 in the  $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  geniposide group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** The  $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  geniposide can cause obvious hepatotoxicity in rats, and the bile acid profile in liver, serum and excrement changes significantly, and the changes of the each bile acid in liver, serum and feces are different. However, the causal relationship between the gardenoside-induced liver injury and the changes in bile acid profile are not clear. It needs to be further studied.

[Key words] geniposide; hepatotoxicity; liver tissue; serum; feces; bile acid

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实,始载于《神农本草经》,列为中品,其化学成分主要包括环烯醚萜类、二萜类、三萜类、黄酮类、有机酸类、甾醇类、挥发油、多糖及色素等<sup>[1]</sup>。栀子苷属于环烯醚萜类,被认为是栀子最主要的药效活性成分之一,已被证实具有多种疾病的治疗潜力,包括自身免疫性疾病、心血管疾病等,研究报道表明低剂量的栀子苷对多种原因导致的肝脏损伤具有保护作用<sup>[2]</sup>。2020年版《中华人民共和国药典》中,栀子苷作为栀子含量测定指标,要求其含量不得低于1.6%。然而,近年来有研究发现大鼠和小鼠灌胃栀子提取物( $>3.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )<sup>[3]</sup>或栀子苷( $>100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )<sup>[4]</sup>后,会产生明显的肝损伤,血清谷丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP)活性,总胆汁酸(TBA)含量显著升高,肝脏TBA含量增加达75%;大鼠单次灌胃栀子苷剂量超过 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的24 h后,ALT, AST,总胆红素(TBIL)水平明显的升高,呈肝细胞肿胀等明显的“量-毒”关系<sup>[5]</sup>,栀子苷被认为是栀子引起肝损伤的主要毒性成分<sup>[6]</sup>。胆汁酸是由肝脏产生的重要消化液,通过胆道系统进入小肠,参与食物的消化与吸收。现代药理学研究发现小剂量栀子苷对胆汁淤积性肝病具有良好的治疗作用<sup>[7-8]</sup>,能够显著调节肝脏中法尼醇X受体(FXR)<sup>[9]</sup>及胆汁酸合成相关基因[胆固醇 $7\alpha$ -羟化酶(CYP7A1),胆固醇 $27\alpha$ -羟化酶(CYP27A1),胆固醇 $12\alpha$ -羟化酶(CYP8B1)等]的表达<sup>[4]</sup>,影响体内胆汁酸的含量及体内代谢,提示大剂量栀子苷导致的肝损伤可能与其影响体内胆汁酸合成代谢有着密切关系。然而大剂量毒性情况下体内各环节胆汁酸谱的全面变化尚不明确。现有相关研究仅报道了栀子苷对C57BL/6和载脂蛋白E基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠肝组织中的胆汁酸代谢影响<sup>[10]</sup>,缺少对肝组织、血清及盲肠内容物胆汁酸全面变化的研究。基于此,本研究通过给予大鼠栀子苷( $50, 100, 200, 400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )干

预,连续给药7 d,探讨栀子苷对大鼠肝脏的毒性及其对血清、肝组织及盲肠内容物中胆汁酸变化的影响,以期探讨栀子苷肝损伤与体内胆汁酸代谢之间的关系。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD大鼠60只,雌雄各半,体质量170~230 g,购买并饲养于北京维通利华实验动物技术有限公司上海分公司,合格证号SCXK(沪)2017-0011,室温( $22\pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度30%~60%,12 h光照/12 h黑暗,自由进食和饮水。本研究动物伦理通过上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会审查,动物伦理编号PZSHUTCM200327003。

**1.2 药品与试剂** 栀子苷(成都普瑞法科技开发有限公司,批号PRF10072502);血清ALT, AST, TBIL, ALP, 尿素(Urea), 白蛋白(ALB)生化检测试剂盒(美国贝克曼库尔特有限公司,批号分别为AUZ7214, AUZ7031, AUZ7101, AUZ7121, AUZ7255, AUZ7524);血清TBA生化检测试剂盒(上海执诚生物科技有限公司,批号ZCFEBT009);血清肌酐(Crea)生化检测试剂盒(日本世诺临床诊断品株式会社,批号H950);免疫组化试剂盒(上海基因科技有限公司,货号GK500705);苏木素-伊红(HE)染液(南京建成生物科技有限公司,批号D006-1);细胞角蛋白19(CK19),细胞角蛋白7(CK7),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Proteintech Group公司,货号分别为10712-1-AP, 15539-1-AP, 60004-1-1);总RNA提取试剂盒,逆转录反应试剂盒,SYBR Green Real Time PCR Master Mix(日本Toyobo公司,货号分别为NPK-201, FSQ-301, QPK-201);RIPA裂解液,蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物,30%丙烯酰胺溶液,pH 6.8 Tris-HCl溶液,pH 8.8 Tris-HCl溶液,Western蛋白封闭液,一抗稀释液,二抗稀释液,过硫酸铵(APS),5 $\times$ 蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为P0013B, P1045, ST003, ST768, ST788, P0023B,

P0023A, P0023D, ST005, P0015)。BCA 法蛋白定量试剂盒, GAPDH 抗体(Thermo Fisher Scientific 公司, 货号分别为 23252, 26616)。甘氨酸(Gly), 三羟甲基氨基甲烷(TRIS), 十二烷基硫酸钠(SDS), 四甲基乙二胺(TEMED)(美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号分别为 G7126, RDD008, 74255, T7024); 胆酸(CA), 鹅去氧胆酸(CDCA), 脱氧胆酸(DCA), 熊去氧胆酸(UDCA), 猪去氧胆酸(HDCA), 石胆酸(LCA), 甘氨胆酸(GCA), 甘氨鹅去氧胆酸(GCDCA), 甘氨脱氧胆酸(GDCA), 甘氨熊脱氧胆酸(GUDCA), 牛磺胆酸(TCA), 牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA), 牛磺石胆酸(TLCA), 牛磺脱氧胆酸(TDCA), 牛磺熊去氧胆酸(TUDCA), 牛磺猪去氧胆酸(THDCA), 甘氨石胆酸(GLCA), 甘氨猪去氧胆酸(GHDCA)(大连美仑生物技术有限公司, 货号分别为 M0214AS, A0221AS, J0602AS, 00424AS, D1017AS, A0809AS, J0115AS, J0312A, O1009A, B03D9K76539, B0516AS, S0312AS, J0115A, M1202A, A0311A, A0409A, MY02YE08MY13, MY02YE08MY17); CYP7A1, CYP27A1, CYP8B1 mRNA 检测引物序列由上海冠泰生物科技有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CYP7A1	上游 CTGAGGGATTGAAGCACAAGC	95
	下游 AAAGGTGGAGAGCGTGTTCATT	
CYP27A1	上游 CATCCAATACACTGACCTGGG	88
	下游 ACCACACCAGTCACTTCCTTG	
CYP8B1	上游 CCTTCAAGTACAATCGGTTCC	83
	下游 GTAGTGGTGGATCTTCTTGCC	

**1.3 仪器** XFSTPRP-48 型全自动研磨仪(上海净信科技有限公司); F200 PRO 型酶标仪(瑞士 Tecan 集团公司); V II A 7 型 PCR 仪(美国 ABI 公司); 041BR127719 型电泳仪及转膜仪, Thermal Cycler 型 cDNA 逆转录仪(美国 Bio-Rad 公司); Odyssey CLX 双色红外荧光成像系统(美国 LI-COR Biosciences 公司); SCN400 型数据扫描切片机(德国 Leica 公司); Synchron DXC800 型全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司); Dionex Ultimate 3000 高压液相色谱串联 Thermo Q Exactive 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪, ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司);

HGC-36A 型氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠给药、分组与样品收集** SD 大鼠适应性饲养 1 周, 按体质量随机分成 5 组, 每组 12 只, 雌雄各半, 即空白组, 栀子苷 50, 100, 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup> 栀子苷组。栀子苷组剂量选择参照文献报道栀子苷引起大鼠产生明显肝损伤的剂量<sup>[5,7-8]</sup>, 并通过前期预实验最终确定。按照上述给药剂量, 每天灌胃给药 1 次, 连续 7 d。每天记录动物体质量, 并观察动物进食、饮水、行为、活动、精神状态、毛发及大小便等情况。于第 7 天晚禁食不禁水 12 h, 第 8 天经麻醉后采集血、肝脏组织和盲肠内容物。经腹主动脉采血, 分离血清, 用于胆汁酸和生化指标检测。肝脏组织取部分用于 HE 染色及免疫组化检测, 其余分装液氮处理后 -80 °C 保存, 用于实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR), 蛋白免疫印迹法(Western blot)及胆汁酸含量检测。盲肠内容物用于检测粪便中胆汁酸含量。

**2.2 血清生化指标检测** 血清生化指标由上海中医药大学附属曙光医院检验科协助检测, 检测 ALT, AST, ALP 活性及 TBIL, TBA, Crea, Urea, ALB 含量。

**2.3 HE 染色** 取肝脏大叶同一部位肝组织, 置于 10% 中性甲醛缓冲溶液固定 72 h, 自动脱水机脱水, 石蜡包埋, 切片。HE 染色, 将封好的片子使用数据扫描切片机自动扫描, 观察肝细胞损伤、炎症浸润及胆管反应等。

**2.4 免疫组化检测肝组织 CK7, CK19** 石蜡切片脱蜡后, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次, 使用柠檬酸钠缓冲液置于微波炉内 100 °C, 8 min, 60 °C, 25 min 进行抗原修复, 自然冷却至室温后, PBS 洗 3 次, 3% 过氧化氢对内源性过氧化物酶活性进行阻断, PBS 洗 3 次, 10% 山羊血清封闭 30 min, 滴加一抗(CK7, CK19, 浓度分别为 1:300, 1:400), 4 °C 孵育过夜, PBS 洗 3 次, 滴加二抗(1:1 万), PBS 洗 3 次, DAB 显色, 苏木素染核, 0.4% 盐酸-乙醇分化, 自来水冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 数据扫描切片机自动扫描封片, 观察 CK7, CK19 表达情况。

**2.5 Western blot 检测肝组织 CK7, CK19** 称取肝组织 50 mg, 加 RIPA 蛋白裂解液 1 mL, 使用全自动研磨仪 65 Hz 匀浆 1 min, 使用 BCA 蛋白定量并加上样缓冲液。制备 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 转膜, 膜封闭及抗体反应, CK7 (1:800), CK19

(1:800), GAPDH(1:1 000), 二抗(1:1 万)。使用 odyssey 红外图像系统检测, 采用 Image J 软件分析各条带灰度值。

**2.6 Real-time PCR 检测肝组织 CYP7A1, CYP27A1, CYP8B1 mRNA 的表达** 称取肝组织 50 mg, 提取总 RNA。应用 NanoVue 浓度检测仪, 取 2  $\mu$ L 总 RNA 滴在透光点中心表面, 检测 RNA 浓度及 260/280 nm 和 230/280 nm。使用逆转录试剂盒对总 RNA 进行逆转录, 反应条件为 110  $^{\circ}$ C, 25  $^{\circ}$ C 10 min, 37  $^{\circ}$ C 2 h, 85  $^{\circ}$ C 5 min, 4  $^{\circ}$ C 保存, 大约 2 h 取出, 离心使挂壁水珠沉降, 进而得到 cDNA。用 Real-time PCR 检测肝组织中 CYP7A1, CYP27A1, CYP8B1 mRNA 的表达水平, SYBR Green 两步法扩增反应体系为 DEPC 2  $\mu$ L; 上游引物 1  $\mu$ L; 下游引物 1  $\mu$ L; SYBR Master Mix 5  $\mu$ L; cDNA 1  $\mu$ L。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 60 s, 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60  $^{\circ}$ C 延伸退火 60 s, 扩增 45 循环。mRNA 表达采用 GAPDH 校正, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各 mRNA 表达量。

**2.7 超高效液相串联质谱法(UPLC-MS)进行胆汁酸定量分析** 参考文献[11]报道, 使用 Dionex Ultimate 3000 高压液相系统分离, 色谱柱 Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu$ m); 流动相为 5 mM 醋酸铵含 0.1% 甲酸(A)-甲醇(B); 梯度洗脱程序 0~1 min(55% B), 1~2.6 min(55%~62% B), 2.6~11.4 min(62%~80% B); 流速 0.30 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>; 进样量为 5  $\mu$ L; 柱温 45  $^{\circ}$ C。

使用 Q Exactive 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪作为分析检测的仪器。离子源为电喷雾离子源(H-ESI), 采用负离子模式全扫描-单离子监控(Full scan-SIM)模式用于采集数据质谱参数, 扫描范围( $m/z$  100~1 500); 分辨率 70 000; 喷雾电压 2.8 kV; 毛细管温度 320  $^{\circ}$ C; 辅助加热器温度 300  $^{\circ}$ C; 鞘气(N<sub>2</sub>)流量 35 arb; 辅助气(N<sub>2</sub>)流量

13 arb; 自动增益控制(AGC) 10<sup>6</sup>; s-lens 射频水平 50。

**2.8 血清、肝脏、盲肠内容物中胆汁酸分析** 取血清 50  $\mu$ L, 加入甲醇 150  $\mu$ L 混匀, 4  $^{\circ}$ C, 1 万 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清 140  $\mu$ L 氮吹仪吹干, 再用 70% 甲醇 70  $\mu$ L 复溶, 取上清进样 UPLC-MS; 称取肝脏组织 50 mg, 加入甲醇 1 mL 匀浆, 于 4  $^{\circ}$ C, 1 万 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 离心半径 10 cm, 取上清 800  $\mu$ L 氮吹仪吹干, 用 70% 甲醇 80  $\mu$ L 复溶残渣, 待充分溶解后相同参数再次离心, 取上清进行 LC-MS 分析; 称取盲肠内容物 100 mg, 加入甲醇 1 mL 超声提取 30 min, 于 4  $^{\circ}$ C, 1 万 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 离心半径 10 cm, 取上清 800  $\mu$ L 氮吹仪吹干, 用 70% 甲醇 80  $\mu$ L 复溶残渣, 待充分溶解后相同参数再次离心, 取上清进行 UPLC-MS 分析。

**2.9 统计学方法** 采用 SPSS 25.0 处理。计量资料数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 首先进行正态性检验, 符合正态性分布的数据以单因素方差分析进行多组间比较, 组间两两比较用 LSD 法; 不符合正态性分布采用非参数检验,  $P<0.05$  认为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠一般体征的影响** 给药第 3 天, 与空白组比较, 400 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 栀子苷组中部分大鼠行动迟缓, 排泄物呈绿色; 给药第 4 天, 与空白组比较, 200 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 栀子苷组大鼠排泄物呈黄绿色; 给药第 5 天, 与空白组比较, 400 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 栀子苷组部分大鼠的皮肤呈绿紫色。

**3.2 对大鼠体质量的影响** 给药期间空白组, 栀子苷 50, 100 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 组大鼠体质量随时间增加趋势一致, 栀子苷 200, 400 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 组大鼠体质量增加趋势缓慢。从给药后的第 3 天开始栀子苷 400 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 组大鼠体质量明显低于空白组 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表 2。

表 2 栀子苷对大鼠体质量的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

Table 2 Effect of gardenoside on body weight of rats ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

组别	剂量 /mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup>	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
空白		191.92 $\pm$ 9.27	191.67 $\pm$ 9.49	197.44 $\pm$ 14.00	202.00 $\pm$ 14.46	206.44 $\pm$ 18.27	209.89 $\pm$ 20.61	213.78 $\pm$ 21.21	219.00 $\pm$ 23.40
栀子苷	50	190.67 $\pm$ 12.90	194.08 $\pm$ 12.29	197.18 $\pm$ 16.31	203.18 $\pm$ 19.31	207.00 $\pm$ 20.77	212.55 $\pm$ 24.33	217.09 $\pm$ 26.77	222.00 $\pm$ 29.04
	100	191.50 $\pm$ 12.38	194.83 $\pm$ 10.69	199.92 $\pm$ 14.48	205.50 $\pm$ 17.15	210.27 $\pm$ 14.68	215.73 $\pm$ 18.28	221.45 $\pm$ 19.67	225.82 $\pm$ 21.56
	200	189.58 $\pm$ 11.52	193.33 $\pm$ 14.91	193.17 $\pm$ 16.10	192.50 $\pm$ 21.38	198.00 $\pm$ 26.23	201.10 $\pm$ 32.30	204.90 $\pm$ 33.59	210.70 $\pm$ 36.07
	400	189.67 $\pm$ 11.13	192.17 $\pm$ 10.01	188.42 $\pm$ 14.21	187.67 $\pm$ 17.01 <sup>1)</sup>	184.89 $\pm$ 21.27 <sup>2)</sup>	186.44 $\pm$ 26.34 <sup>2)</sup>	191.38 $\pm$ 27.73 <sup>1)</sup>	201.14 $\pm$ 24.33 <sup>1)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ (表 3~12 同)。

**3.3 对大鼠血清肝肾功生化指标的影响** 与空白组比较, 50, 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup> 栀子苷组 TBIL 水平显著升高 ( $P<0.01$ ), 且随着剂量的升高而升高, 栀子苷 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组 TBIL 水平显著升高 ( $P<0.01$ ), 但略低于 200 mg·kg<sup>-1</sup> 栀子苷组; 栀子苷 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组

血清 ALT, AST 明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 栀子苷 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组 ALP 水平升高 ( $P<0.05$ ); 栀子苷 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组 TBA 水平升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 栀子苷 100 mg·kg<sup>-1</sup> 组 ALB 水平升高 ( $P<0.05$ )。见表 3。

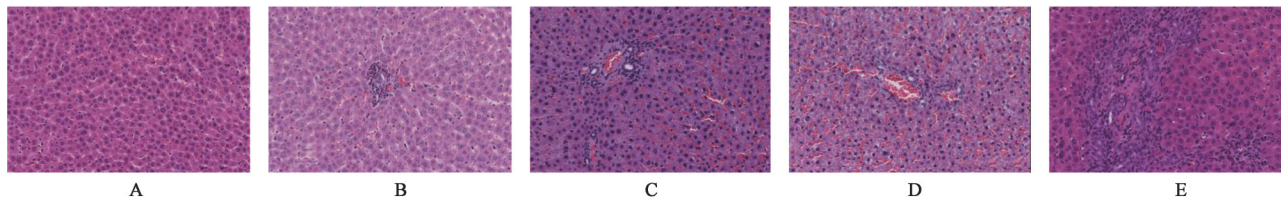
表3 栀子苷对大鼠血液生化指标的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 3 Effect of gardenoside on blood biochemical indexes in rats ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	TBIL /μmol·L <sup>-1</sup>	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	ALP /U·L <sup>-1</sup>	TBA /μmol·L <sup>-1</sup>	Urea /μmol·L <sup>-1</sup>	Crea /μmol·L <sup>-1</sup>	ALB /g·L <sup>-1</sup>
空白		1.20±0.95	26.11±5.93	63.00±8.94	191.00±80.20	12.69±4.69	6.20±0.92	22.44±3.28	28.47±4.56
栀子苷	50	3.58±0.70 <sup>2)</sup>	29.00±4.75	61.09±6.12	228.22±99.15	12.11±7.19	7.20±1.57	22.09±5.20	30.29±2.36
	100	6.04±1.61 <sup>2)</sup>	29.18±3.63	60.45±7.53	267.56±88.98	16.45±2.94	6.65±1.57	22.18±2.32	32.08±3.41 <sup>1)</sup>
	200	11.51±3.05 <sup>2)</sup>	31.11±8.42	66.44±6.37	325.29±50.92 <sup>1)</sup>	22.67±7.04 <sup>1)</sup>	8.12±4.00	21.22±3.99	30.10±3.10
	400	9.43±2.29 <sup>2)</sup>	36.00±8.89 <sup>2)</sup>	72.57±15.22 <sup>1)</sup>	258.80±79.38	25.23±5.09 <sup>2)</sup>	6.51±2.86	24.86±6.09	26.83±3.14

**3.4 对大鼠肝组织病理的影响** 空白组肉眼可见肝脏质地柔软, 颜色红润有光泽, 形态大小正常。镜下未见肝细胞有肿胀、坏死, 中央静脉未见扩张, 汇管区无胆管反应, 间质未见炎症细胞的浸润。栀子苷 50, 100 mg·kg<sup>-1</sup> 栀子苷组肉眼可见肝脏大小正常, 质地较为柔软, 无明显坏死区域。镜下未见明显的肝细胞肿胀及坏死, 有部分肝小叶中央静脉有

瘀血并有轻度扩张。栀子苷 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组肉眼可见肝脏颜色呈暗红色, 镜下可见部分肝细胞肿胀, 汇管区有胆管反应, 胆管周围有炎症细胞的浸润。栀子苷 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组大鼠肉眼可见肝脏颜色呈黑色或暗红色, 质地偏硬。镜下可见大鼠肝组织中肝索细胞排列紊乱, 失去正常结构, 汇管区有明显的胆管增生反应, 胆管周围有炎症细胞的浸润。见图 1。



A. 空白组; B-E. 栀子苷 50, 100, 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组 (图 2~5 同)

图1 栀子苷对正常大鼠肝组织病理学变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of geniposide on pathological changes of liver tissue in normal rats (HE, ×100)

**3.5 对大鼠肝组织免疫组化 CK7, CK19 表达的影响** HEGADE 等<sup>[12]</sup> 研究及报道了胆管反应 (DR), 认为其特征是肝脏损伤诱导的反应性胆管增生, 而 CK7 和 CK19 作为识别胆管细胞的标志物, 在评价胆管反应中被广泛应用。空白组 CK7 蛋白表达非常少, 与空白组比较, 栀子苷 50, 100 mg·kg<sup>-1</sup> 组可见有少量的 CK7 蛋白表达, 栀子苷 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组

可见显著 CK7 蛋白表达。空白组, 栀子苷 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组可见少量的 CK19 蛋白表达, 与空白组比较, 栀子苷 100 mg·kg<sup>-1</sup> 组也可见较为明显的 CK19 蛋白表达, 栀子苷 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组可见 CK19 蛋白显著表达。以上结果提示随之栀子苷剂量的增大, 胆管反应逐渐明显, 且高剂量栀子苷可引起肝脏发生较显著的胆管反应。见图 2, 3。

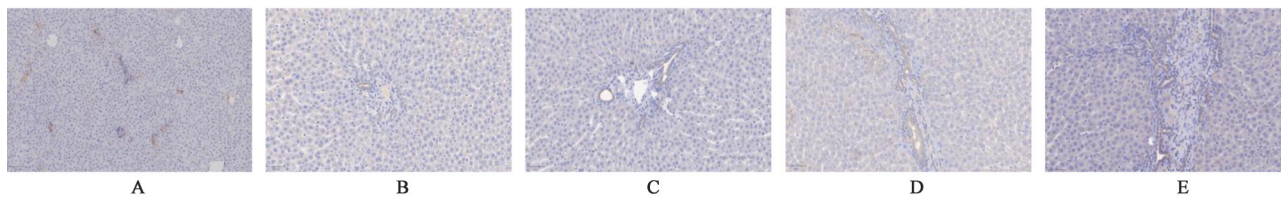


图2 栀子苷对正常大鼠肝组织 CK7 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×100)

Fig. 2 Effect of CK7 protein expression of liver tissue in normal rats (IHC, ×100)

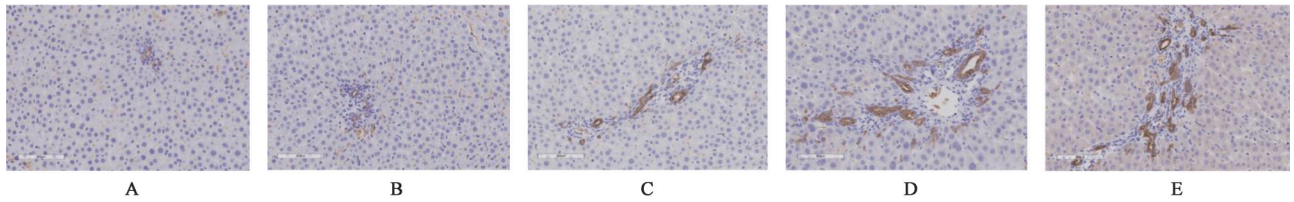


图3 栀子苷对正常大鼠肝组织CK19蛋白表达的影响(免疫组化,×100)

Fig. 3 Effect of CK19 protein expression of liver tissue in normal rats (IHC,×100)

3.6 对大鼠肝组织CK7,CK19蛋白表达的影响  
与空白组比较,栀子苷400 mg·kg<sup>-1</sup>组CK7,CK19蛋白表达明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。见图4,表4。

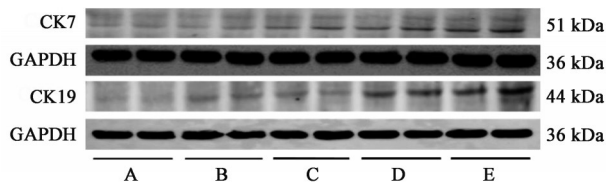


图4 栀子苷对大鼠CK7和CK19蛋白电泳表达电泳

Fig. 4 Electrophoretic of gardenoside on protein electrophoresis expression of CK7 and CK19 in rats

### 3.7 对大鼠胆汁酸的影响

3.7.1 对大鼠肝组织中胆汁酸的影响 与空白组比较,栀子苷50 mg·kg<sup>-1</sup>组肝组织中GUDCA, GHDCA含量明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ), TLCA含量显著升高( $P<0.01$ );栀子苷100 mg·kg<sup>-1</sup>组肝组织中GUDCA, GHDCA, GCA含量明显降低( $P<0.05$ ,

表4 栀子苷对大鼠肝组织中CK7和CK19蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 4 Effect of geniposide on CK7 and CK19 protein expression in rat liver tissue ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	CK7/GAPDH	CK19/GAPDH
空白		0.50±0.03	0.37±0.01
栀子苷	50	0.42±0.06	0.50±0.10
	100	0.58±0.01	0.45±0.09
	200	0.66±0.10	0.57±0.04
	400	0.84±0.08 <sup>2)</sup>	0.73±0.28 <sup>1)</sup>

$P<0.01$ ), TCDCA含量明显升高( $P<0.05$ );栀子苷200 mg·kg<sup>-1</sup>组肝组织中GUDCA, GHDCA, CDCA含量明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ), TCDCA, GDCA, HDCA, CA含量显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ );栀子苷400 mg·kg<sup>-1</sup>组肝组织中TCDCA, HDCA, CA, CDCA含量显著升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。见表5。

表5 栀子苷对大鼠肝组织中胆汁酸含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 5 Effect of gardenoside on bile acid content in liver tissue of rats ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	THDCA	TUDCA	GUDCA	GHDCA	TCDCA	UDCA	HDCA	GCDCA
空白		0.47±0.09	0.17±0.05	0.10±0.03	0.08±0.04	1.38±0.45	0.01±0.01	0.01±0.01	0.57±0.24
栀子苷	50	0.43±0.09	0.21±0.12	0.05±0.02 <sup>2)</sup>	0.05±0.02 <sup>1)</sup>	2.31±0.98	0.02±0.01	0.01±0.01	0.36±0.05
	100	0.46±0.07	0.08±0.01	0.07±0.02 <sup>1)</sup>	0.04±0.02 <sup>2)</sup>	2.64±0.63 <sup>1)</sup>	0.02±0.01	0.02±0.01	0.55±0.33
	200	0.44±0.13	0.09±0.02	0.05±0.03 <sup>2)</sup>	0.04±0.03 <sup>1)</sup>	2.61±1.19 <sup>1)</sup>	0.02±0.01	0.03±0.02 <sup>1)</sup>	0.61±0.20
	400	0.59±0.11	0.13±0.02	0.07±0.03 <sup>1)</sup>	0.03±0.02 <sup>2)</sup>	4.98±1.78 <sup>2)</sup>	0.01±0.01	0.04±0.02 <sup>2)</sup>	0.66±0.43

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	GCA	GDCA	TLCA	GLCA	CDCA	DCA	CA
空白		12.00±3.94	0.55±0.41	0.13±0.06	0.02±0.01	0.02±0.01	0.06±0.05	0.18±0.22
栀子苷	50	7.77±1.75	0.53±0.37	0.24±0.10 <sup>2)</sup>	0.02±0.01	0.04±0.04	0.07±0.02	0.16±0.12
	100	7.49±3.25 <sup>1)</sup>	0.72±0.62	0.14±0.05	0.02±0.01	0.05±0.03	0.08±0.03	0.87±0.49
	200	11.34±7.62	1.45±0.89 <sup>1)</sup>	0.10±0.03	0.02±0.01	0.10±0.07 <sup>2)</sup>	0.18±0.17	1.80±1.63 <sup>1)</sup>
	400	7.34±1.93	0.79±0.47	0.14±0.03	0.010±0.01	0.10±0.04 <sup>2)</sup>	0.12±0.05	4.26±1.81 <sup>2)</sup>

与空白组比较,栀子苷50 mg·kg<sup>-1</sup>组大鼠肝组织中GUDCA, GHDCA, GCA, GCDCA胆汁酸含量占比均有所降低,其中降低幅度最大的是GCA,下降了13.76%,其余胆汁酸的含量占比均有所上升;

栀子苷100 mg·kg<sup>-1</sup>组大鼠肝组织中TUDCA, GUDCA, GHDCA, GCA的胆汁酸含量占比均有所下降,其余胆汁酸含量占比则有所增加,其中TCDCA的含量占比增幅最大,上升了10.33%;栀子

昔 200 mg·kg<sup>-1</sup>组大鼠肝组织中 TCDCA, UDCA, HDCA, CA, GDCA, CDCA, DCA 胆汁酸含量占比有所上升,其中增幅最大的为 CA,上升了 17.22%,其余胆汁酸含量有所降低;其中与空白组比较, TUDCA, GUDCA, GHDC, GCA, UDCA, GCDCA, GDCA, TLCA, GLCA 胆汁酸含量均下降,

其中下降幅度最大的是 GCA,与空白组的占比比较,除 CA 外,栀子昔 400 mg·kg<sup>-1</sup>组大鼠肝组织中胆汁酸的含量降低,其余胆汁酸含量占比较空白组则有所增加,其中栀子昔 400 mg·kg<sup>-1</sup>组中 TCDCA 的含量占比较空白组增幅最大,上升了 14.56%。见表 6。

表 6 栀子昔对大鼠肝组织中胆汁酸组成比例的影响

**Table 6 Effect of gardenoside on proportion of bile acid in rat liver** %

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	THDCA	TUDCA	GUDCA	GHDC	GCA	TCD-CA	UDCA	HDCA	GCD-CA	CA	GDCA	TLCA	GLCA	CDCA	DCA
空白		2.81	1.02	0.60	0.48	71.86	9.10	0.06	0.06	3.41	4.25	4.97	0.78	0.12	0.12	0.36
栀子昔	50	3.27	1.49	0.43	0.36	58.10	18.32	0.07	0.14	2.98	5.97	6.32	1.70	0.14	0.21	0.50
	100	3.61	0.59	0.52	0.29	55.11	19.43	0.15	0.15	4.05	7.80	6.18	1.03	0.15	0.37	0.59
	200	2.00	0.41	0.23	0.23	51.50	14.26	0.14	0.27	2.41	21.07	5.68	0.45	0.09	0.45	0.82
	400	2.91	0.64	0.35	0.15	44.82	24.56	0.05	0.20	3.25	17.36	3.90	0.69	0.05	0.49	0.59

**3.7.2 对大鼠血清中胆汁酸的影响** 与空白组比较,栀子昔 50 mg·kg<sup>-1</sup>组血清中 GCDCA, GHDC, LCA 胆汁酸含量明显降低 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 栀子昔 100 mg·kg<sup>-1</sup>组血清中 GHDC, LCA 胆汁酸含量降低 ( $P<0.01$ ); 栀子昔 200 mg·kg<sup>-1</sup>组血清中

GHDC, LCA 胆汁酸的含量降低 ( $P<0.01$ ), CDCA 胆汁酸的含量升高 ( $P<0.01$ ); 栀子昔 400 mg·kg<sup>-1</sup>组血清中 THDCA, TCA, GCA, TCDCA, UDCA, CA, CDCA, DCA 的含量升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ), GHDC, LCA 含量则降低 ( $P<0.01$ )。见表 7。

表 7 栀子昔对大鼠血清中胆汁酸含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

**Table 7 Effect of gardenoside on serum bile acid content in rats ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )**  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	THDCA	TUDCA	GUDCA	TCA	GCA	TCDCA
空白		2.45±0.35	1.14±0.79	0.87±0.34	42.48±13.22	64.59±8.30	12.45±6.41
栀子昔	50	2.84±0.57	1.41±0.58	0.68±0.36	56.81±15.97	68.63±21.92	8.65±2.13
	100	2.61±0.47	1.03±0.54	0.58±0.13	52.33±15.63	66.05±17.16	16.09±6.02
	200	3.11±0.85	1.44±0.56	0.97±0.59	69.24±25.33	63.36±19.45	16.02±4.08
	400	3.76±0.95 <sup>1)</sup>	1.57±1.08	1.03±0.46	119.61±75.91 <sup>2)</sup>	130.74±30.69 <sup>2)</sup>	27.19±5.54 <sup>2)</sup>
组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	UDCA	GCDCA	GHDC	CA	GDCA	TLCA
空白		7.28±5.99	10.15±4.20	2.04±0.70	1 391.38±502.03	14.84±7.31	1.14±0.48
栀子昔	50	4.98±3.24	5.68±0.75 <sup>1)</sup>	1.16±0.29 <sup>2)</sup>	770.97±552.39	9.16±5.94	0.44±0.20
	100	5.30±2.99	5.68±2.00	0.76±0.09 <sup>2)</sup>	1 012.47±308.22	7.22±5.63	0.77±0.17
	200	9.28±5.09	6.98±3.58	0.79±0.12 <sup>2)</sup>	1 447±662.4	10.49±7.53	1.10±0.73
	400	22.65±7.08 <sup>2)</sup>	11.63±6.23	0.71±0.15 <sup>2)</sup>	3 454.01±2 003.22 <sup>2)</sup>	10.69±4.71	1.02±0.27
组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	GLCA	CDCA	DCA	LCA	HDCA	
空白		0.66±0.07	103±87.26	100.57±104.91	10.23±0.88	14.53±3.12	
栀子昔	50	0.70±0.19	88.17±67.75	75.61±53.12	6.80±2.39 <sup>2)</sup>	10.33±3.88	
	100	0.64±0.11	102.31±35.44	166.41±62.17	6.49±1.07 <sup>2)</sup>	12.96±4.97	
	200	0.66±0.01	288.43±162.90 <sup>2)</sup>	95.61±74.91	5.13±0.73 <sup>2)</sup>	14.52±6.73	
	400	0.69±0.02	609.79±151.38 <sup>2)</sup>	151.98±64.03 <sup>1)</sup>	7.73±1.74 <sup>2)</sup>	25.92±17.31	

与空白组比较,栀子昔 50 mg·kg<sup>-1</sup>组大鼠血清中胆汁酸 TUDCA, HDCA, CA, GLCA, CDCA, THDCA, TCA 含量占比有所上升,其中 CA 占比的

上升幅度最大,与空白组比较,增加了 4.75%,其余胆汁酸含量占比下降;100 mg·kg<sup>-1</sup>栀子昔组大鼠血清中胆汁酸 CA, CDCA, THDCA 含量占比有所上

升,且CA的上升幅度最大,增加了9.26%,其余胆汁酸含量占比下降;栀子苷200 mg·kg<sup>-1</sup>组大鼠血清中胆汁酸CA,CDCA含量占比有所上升,CA较空白组增加了17.46%;栀子苷400 mg·kg<sup>-1</sup>组与空白组的大鼠血清中胆汁酸的组成发生了较大的变化,与空白

组比较,栀子苷400 mg·kg<sup>-1</sup>组大鼠血清中,除CA及CDCA外的胆汁酸,含量均呈下降趋势,且CA占比的上升幅度较大,与空白组比较,栀子苷400 mg·kg<sup>-1</sup>组占比增加了19.60%;与空白组比较,CDCA升高了4.63%。见表8。

表8 栀子苷对大鼠血清中胆汁酸组成比例的影响

Table 8 Effect of gardenoside on composition of bile acid in rat serum

%

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TUDCA	GUDCA	GHDCA	GCA	TCDCA	UDCA	HDCA	GCDCA	CA	GDCA	TLCA	GLCA	CDCA	DCA	THDCA	TCA	LCA
空白		0.10	0.06	0.12	11.69	1.63	0.81	1.11	1.16	60.63	1.08	0.07	0.04	6.63	7.58	0.15	6.54	0.60
栀子苷	50	0.12	0.05	0.09	9.05	0.81	0.73	1.27	0.52	65.38	1.03	0.01	0.05	7.14	6.27	0.23	6.71	0.55
	100	0.07	0.04	0.05	4.76	1.52	0.60	0.93	0.40	69.89	0.56	0.05	0.04	7.35	7.11	0.18	5.98	0.45
	200	0.07	0.03	0.04	3.21	0.84	0.55	0.96	0.29	78.09	0.69	0.03	0.03	8.28	2.52	0.13	4.03	0.22
	400	0.04	0.02	0.02	2.15	0.73	0.42	0.73	0.25	80.23	0.24	0.02	0.01	11.26	0.60	0.09	2.99	0.18

3.7.3 对大鼠盲肠内容物中胆汁酸的影响 与空白组比较,栀子苷50 mg·kg<sup>-1</sup>组盲肠内容物中胆汁酸THDCA含量显著升高( $P<0.01$ ),GCDCA,GLCA,CDCA,DCA,LCA,HDCA含量下降( $P<0.05$ , $P<0.01$ );栀子苷100 mg·kg<sup>-1</sup>组盲肠内容物中胆汁酸THDCA,TUDCA,TCA含量升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),GCA,GCDCA,GDCA,GLCA,DCA,

LCA,HDCA含量降低( $P<0.01$ );200 mg·kg<sup>-1</sup>栀子苷组盲肠内容物中胆汁酸TCA,TCDCA的含量升高( $P<0.01$ ),GCA,GCDCA,GDCA,TLCA,GLCA,DCA,LCA,HDCA的含量显著降低( $P<0.01$ );栀子苷400 mg·kg<sup>-1</sup>组盲肠内容物中GCA,UDCA,HDCA,GCDCA,GDCA,TLCA,GLCA,CDCA,DCA,LCA下降( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。见表9。

表9 栀子苷对大鼠盲肠内容物中胆汁酸含量的影响( $\bar{x}\pm s$ , $n=12$ )

Table 9 Effect of gardenoside on bile acid content in cecal contents of rats ( $\bar{x}\pm s$ , $n=12$ )

μg·g<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	THDCA	TUDCA	GUDCA	TCA	GCA	TCDCA
空白		63.22±26.95	26.59±18.71	23.51±10.11	1671.02±726.51	989.91±291.61	142.69±107.90
栀子苷	50	236.69±90.96 <sup>2)</sup>	46.19±18.82	14.26±3.89	1887.37±858.69	862.55±345.97	277.78±86.18
	100	197.98±133.59 <sup>1)</sup>	67.49±28.02 <sup>2)</sup>	6.64±1.56	3844.11±859.74 <sup>2)</sup>	367.93±106.44 <sup>2)</sup>	195.46±222.13
	200	75.22±40.87	12.28±12.90	3.17±0.98	6213.84±832.8 <sup>2)</sup>	314.96±131.72 <sup>2)</sup>	615.57±166.08 <sup>2)</sup>
	400	22.59±9.64	15.82±8.69	4.48±0.13	540.68±260.08	65.29±5.42 <sup>2)</sup>	91.52±16.10

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	UDCA	GHDCA	GCDCA	CA	GDCA	TLCA
空白		1404.17±485.70	36.25±7.38	110.72±38.82	7853.05±711.38	139.59±57.64	28.13±19.12
栀子苷	50	1023.85±305.56	9.03±3.03	61.95±31.02 <sup>1)</sup>	4786.94±1906.88	89.33±66.93	37.88±11.28
	100	1248.58±260.86	5.14±1.39	29.58±0.99 <sup>2)</sup>	17894.57±6966.73	45.68±13.27 <sup>2)</sup>	16.07±10.68
	200	785.70±606.39	3.88±0.11	32.03±18.06 <sup>2)</sup>	20620.61±18959.90	39.86±14.89 <sup>2)</sup>	4.76±1.26 <sup>2)</sup>
	400	136.43±53.00 <sup>2)</sup>	2.29±0.03	6.39±3.02 <sup>2)</sup>	788.38±208.39	4.95±2.33 <sup>2)</sup>	5.26±2.54 <sup>1)</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	GLCA	CDCA	DCA	LCA	HDCA
空白		39.11±15.63	2706.40±1228.38	44508.29±2449.47	14216.19±3546.05	5376.87±330.26
栀子苷	50	18.49±5.97 <sup>2)</sup>	1003.52±269.25 <sup>1)</sup>	31637.19±2835.23 <sup>2)</sup>	9728.62±1539.78 <sup>1)</sup>	3142.98±321.29 <sup>2)</sup>
	100	12.28±5.82 <sup>2)</sup>	2495.55±1176.04	35489.56±2365.38 <sup>2)</sup>	7387.36±1078.01 <sup>2)</sup>	2855.97±214.92 <sup>2)</sup>
	200	10.94±5.68 <sup>2)</sup>	2117.11±902.21	34090.11±3406.83 <sup>2)</sup>	6117.89±2631.77 <sup>2)</sup>	3397.20±675.91 <sup>2)</sup>
	400	3.05±2.35 <sup>2)</sup>	7.86±5.13 <sup>2)</sup>	26740.56±2997.30 <sup>2)</sup>	3976.94±1871.81 <sup>2)</sup>	3224.89±367.29 <sup>2)</sup>

与空白组比较, 栀子苷 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组大鼠盲肠内容物中胆汁酸 TUDCA, CA, DCA, THDCA, TCA 含量占比升高, 其余胆汁酸含量占比则有所降低; 栀子苷 100 mg·kg<sup>-1</sup> 组大鼠盲肠内容物中胆汁酸 TUDCA, CA, THDCA, TCA 的含量占比有所升高, 其中 CA 的上升幅度最大, 为 10.57%, 其余胆汁酸含量占比则下降; 栀子苷 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组大鼠盲肠内容物中胆汁酸 TUDCA, GHDCA, TCDCA, CA,

CDCA, DCA, THDCA, TCA 的含量占比升高, 其余胆汁酸含量占比降低, 其中 LCA 的含量占比从空白组的 20.17% 下降至 10.85%; 栀子苷 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组与空白组的大鼠盲肠内容物中胆汁酸的组成发生了较大的变化, 其中与空白组比较, DCA, HDCA 在栀子苷 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组中的占比升高, 其余栀子苷 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组的胆汁酸的占比有所下降。见表 10。

表 10 栀子苷对大鼠盲肠内容物中胆汁酸组成比例的影响

Table 10 Effect of gardenoside on proportion of bile acid in cecal contents of rats %

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	TUDCA	GUDCA	GHDCA	GCA	TCDCA	UDCA	HDCA	GCDCA	CA	GDCA	TLCA	GLCA	CDCA	DCA	THDCA	TCA	LCA
空白		0.05	0.03	0.04	1.38	0.53	2.67	6.70	0.22	9.66	0.20	0.10	0.05	3.20	52.85	0.15	1.98	20.17
栀子苷	50	0.08	0.03	0.04	0.97	0.45	1.78	6.35	0.12	11.98	0.17	0.08	0.03	1.65	56.91	0.40	2.63	16.31
	100	0.10	0.01	0.01	0.73	0.33	1.82	5.47	0.07	20.23	0.08	0.07	0.02	3.03	52.19	0.36	2.31	13.17
	200	0.19	0.02	0.06	1.21	0.64	1.13	6.16	0.06	15.77	0.11	0.04	0.02	3.53	56.15	0.32	3.74	10.85
	400	0.03	0.01	0.01	0.24	0.16	0.48	7.64	0.02	7.25	0.03	0.02	0.01	0.61	71.04	0.10	1.05	11.30

与空白组比较, 栀子苷 50, 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组肝组织 CA/DCA 降低 ( $P < 0.01$ ), 其中栀子苷 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组 CA/DCA 最高。与空白组比较, 栀子苷 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组血清 CA/DCA 显著升高 ( $P < 0.01$ ), 约为正常组的 247 倍。与空白组比较, 栀子苷 100 mg·kg<sup>-1</sup> 组盲肠内容物中胆汁酸 CA/DCA 升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与空白组比较, 栀子苷 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组 CA/DCA 降低, 且 400 mg·kg<sup>-1</sup> 栀子苷组 CA/DCA 最低, 但差异无统计学意义。见表 11。

表 12 栀子苷对大鼠 CYP7A1, CYP27A1, CYP8B1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 12 Effect of geniposide on mRNA expression of CYP7A1, CYP27A1 and CYP8B1 in rats ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	CYP7A1	CYP27A1	CYP8B1
空白		2.23±1.31	1.74±0.67	2.18±1.17
栀子苷	50	4.22±2.74	2.23±0.91	2.41±1.4
	100	3.51±2.09	2.9±1.46 <sup>1)</sup>	2.79±1.92
	200	6.56±4.49 <sup>1)</sup>	1.92±0.52	2.59±1.75
	400	7.58±2.11 <sup>1)</sup>	3.45±0.47 <sup>2)</sup>	3.46±0.49

表 11 栀子苷对大鼠肝组织、血清和盲肠内容物中胆汁酸 CA/DCA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 11 Effect of CA/DCA expression of liver, serum and cecal contents in rats ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	肝组织	血清	盲肠内容物
空白		54.29±12.6	4.36±2.65	0.15±0.07
栀子苷	50	11.84±10.89 <sup>2)</sup>	5.69±2.83	0.19±0.12
	100	18.2±13.37 <sup>2)</sup>	12.57±9.44	0.35±0.23 <sup>1)</sup>
	200	17.17±7.36 <sup>2)</sup>	8.61±4.35	0.14±0.19
	400	38.56±26.16	1 077.09±52.57 <sup>2)</sup>	0.04±0.03

3.7.4 对大鼠肝组织中 CYP7A1, CYP27A1, CYP8B1 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 栀子苷 200, 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组 CYP7A1 mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ); 栀子苷 100, 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组 CYP27A1 mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 12。

#### 4 讨论

胆汁酸在体内常以钠盐或钾盐的形式存在, 由肝细胞通过胆固醇的酶促分解代谢而合成的<sup>[13]</sup>, 是产生胆汁流动的关键分子, 这是肝脏的一项基本功能<sup>[14]</sup>, 在胆汁淤积性疾病的情况下, 可溶解胆固醇结石并改善肝脏功能<sup>[15]</sup>。胆汁酸有助于肠道营养物质的吸收和促进胆汁中胆固醇的分泌, 以维持正常的胆汁酸代谢, 从而更好地保护肝脏。正常情况下, 胆汁酸的代谢处于平衡状态, 但由于胆汁酸的代谢, 排泄受到干扰而造成胆汁淤积可以造成肝脏的功能性损伤, 引起线粒体损伤, 从而导致肝细胞的降解和衰竭, 实验研究表明胆汁酸可以作为生物标识物用来表征肝脏毒性<sup>[16]</sup>。循环胆汁酸池由初级胆汁酸(CA, CDCA)和次级胆汁酸(DCA, LCA)组成<sup>[17]</sup>。胆汁酸的合成分为 2 种途径: 一是由

CYP7A1启动,在 $3\beta$ -羟基- $\Delta^5$ -C27-类固醇氧化还原酶(HSD3B7)的作用下,大部分胆汁酸代谢中间产物被CYP8B1进一步转化为CA,而未经CYP8B1作用的代谢中间产物通过CYP27A1转化为CDCA。在这种作用下,CYP8B1控制着CA的合成速率。这被称为“中性”途径,也被叫做经典途径,这部分占胆汁酸合成的90%,而初级胆汁酸是以胆固醇为原料直接在肝细胞内合成的胆汁酸,主要包括CDCA和CA以及与甘氨酸和牛磺酸结合形成的结合胆汁酸。剩下的10%则是另一条由CYP27A1启动的“酸性”途径,随后CYP7B1作用形成CDCA<sup>[18]</sup>。CYP7A1,CYP27A1,CYP8B1是最主要的参与胆汁酸合成的基因,对维持胆汁酸具有重要作用。有研究提出CYP7A1是胆汁酸合成代谢经典途径的限速酶之一<sup>[19]</sup>,可诱导肝脏胆固醇的合成、摄取、分解代谢和分泌,催化胆固醇在肝脏分解为胆汁酸,胆固醇可通过其催化转化为胆汁酸排除体外<sup>[20]</sup>。CYP7A1的增加可促进胆汁和粪便中胆固醇的分泌,其诱导也会增加胆汁酸池中的CDCA<sup>[20]</sup>。此外,有研究表明CYP7A1和CYP8B1均是肝脏中CA和CDCA平衡的关键调节剂,可以将CDCA自身转化为CA<sup>[21]</sup>。CYP7A1的活性决定了胆汁酸池的大小,CYP8B1决定了CA与CDCA的比值,从而决定了胆汁酸池的组成<sup>[22]</sup>。CYP27A1是主要存在于肝脏中的一种功能多样且非常重要的细胞色素P450酶<sup>[23]</sup>,体内近50%的胆固醇通过CYP7A1的催化转化为胆汁酸排除体外。当肝脏发生损伤时,肝非实质细胞可向肝细胞释放促炎细胞因子,这些细胞因子正是通过抑制CYP7A1转录来抑制胆汁酸合成,CYP7A1对于合成胆汁酸总量有着重要作用。

目前有研究发现,胆汁酸作为胆汁流动的主要驱动因素,并排泄至胆小管<sup>[24]</sup>,可以在胆汁淤积的环境下引发炎症反应,造成肝细胞和胆管细胞的损伤<sup>[25]</sup>。而当肝细胞受损时,会影响胆汁酸的合成、分泌,从而破坏了各级胆管管道,引起肝内外胆管阻塞,造成胆汁的瘀滞,最终导致胆汁酸水平的升高<sup>[26]</sup>。本研究中发现,Real-time PCR结果中,栀子苷 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组较空白组的CYP7A1,CYP27A1,CYP8B1 mRNA表达有所上升,且血清的TBA水平及肝组织内CA和CDCA含量有所升高,由此证实了在胆汁酸合成的过程中,CYP7A1,CYP27A1和CYP8B1的升高与总胆汁酸含量的增加有关,并可以促进CA和CDCA的生成。KIM等<sup>[27]</sup>研究认为CDCA和CA会引起肝损伤和炎症反应,导致细胞

自噬清除功能受损,增强了胆汁酸诱导的细胞死亡,最终造成肝脏毒性。因此本研究结果提示,服用大剂量的栀子苷可能促进CYP7A1,CYP27A1和CYP8B1的表达,进而促进了胆汁酸的合成,造成了一定程度的胆汁淤积,尤其是CA和CDCA含量的增加,最终对肝组织造成了一定的损伤。

现代研究表明,栀子中主要有效成分是环烯醚萜苷类物质,而栀子苷是栀子中含量最高的环烯醚萜苷类物质<sup>[28]</sup>,其药理作用广泛,有镇痛<sup>[29]</sup>、抗炎<sup>[30]</sup>、抗内毒素<sup>[31]</sup>、脑缺血保护<sup>[32]</sup>、抗氧化<sup>[33]</sup>、保肝利胆<sup>[33]</sup>等作用。然而,现有研究也发现,如果大剂量服用栀子苷会产生一定的毒性反应,肝脏是栀子苷的主要毒性靶器官。王波等<sup>[34]</sup>发现栀子的主要成分栀子苷对肝脏有明显的毒性;杨洪军等<sup>[3]</sup>探讨了栀子不同化学部位的肝损伤作用,结果提示栀子提取物和栀子苷均具有肝损伤,栀子苷是栀子肝损伤的主要物质基础;DING等<sup>[35]</sup>证实了过量服用栀子苷会损伤肝脏,但是小剂量内的服用不会引起肝损伤。LIU等<sup>[10]</sup>研究发现栀子苷通过阻断FXR介导的胆汁酸负反馈调节,加速肝脏合成胆汁酸,促进胆固醇逆向转运和胆固醇分解代谢。而且,栀子苷减少回肠FXR介导的胆汁酸重吸收,导致胆汁酸排泄增加,由此认为,栀子苷对FXR介导的胆汁酸肝-肠串扰的调节作用可能与维持胆固醇的稳态有关。而且FXR可直接抑制胆汁酸合成相关基因,调节胆汁酸的成分,可能对肝脏代谢和疾病存在重大影响。TIAN等<sup>[4]</sup>发现栀子苷 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 可诱导肝损伤,并伴随着胆汁酸调节基因的改变,导致牛磺酸结合物在大鼠肝脏中的积累,且TCA,TCDCA和牛磺酰胆碱(T- $\alpha$ -MCA)是栀子苷诱导肝损伤的潜在标志物。在本研究中,栀子苷 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组大鼠肝组织和血清中胆汁酸TCDCA以及血清中TCA的含量较空白组都有所增加,且血清生化指标中AST,ALT的活性增强,病理观察可见排列紊乱的肝索细胞和明显的胆管增生反应,Western blot结果表明,与空白组比较,各剂量栀子苷给药组的CK7和CK19蛋白都有所表达,尤其在 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 栀子苷组中的表达最为显著,且与空白组比较具有统计学意义。由此可说明,大剂量服用栀子苷对肝脏造成损伤,出现较为严重的胆管反应,栀子苷诱导的肝脏毒性可能通过胆汁酸中TCA和TCDCA来反映。

病理条件下,胆汁排泄异常导致胆汁酸及其结合胆汁盐在肝细胞和血中聚集,高水平的胆汁酸中含有的GCDCA具有较大的毒性,可直接干扰线粒

体功能或导致细胞死亡,从而诱导细胞凋亡<sup>[36]</sup>。本研究中,各给药组的肝组织中GCDCA的含量随着栀子苷剂量的升高呈上升趋势,基于此推测高剂量的栀子苷会使胆汁酸排泄异常,以及GCDCA含量的升高,继而诱导肝细胞的损伤及凋亡。而且血清TBIL,ALT,AST,ALP及TBA水平随着栀子苷剂量的增加而增大,血清及肝组织中胆汁酸CA,CDCA含量的占比也有所增加。其中TBA可作为肝损伤的敏感标志物之一,在肝细胞中是由胆固醇代谢产生而来,生成后进入肠腔在回肠和结肠绝大部分又被重吸收,经门静脉入肝,进行重新利用。胆汁经肝肠循环被重吸收后,胆汁中的TBA被肝细胞摄取,以致血清中TBA仅为微量。当肝细胞受损时,肝脏摄取胆汁酸的能力下降,其转变总胆汁酸减少,导致血液中总胆汁酸升高。由此认为TBA可提示肝脏损伤,同时也是唯一可以同时反映肝脏合成、代谢、分泌状态和细胞损伤的指标。因此认为大剂量服用栀子苷后,初级胆汁酸的水平的升高与肝功能受损的受损可能存在着一定关系。

肝-胆-肠系统共同维持胆汁酸的稳态,肠道中95%胆汁酸被重新吸收进入肝脏代谢,余下的胆汁酸则会随着粪便而排出<sup>[37]</sup>。胆汁酸可以抑制肠道部分细菌的生长,维持肠道屏障作用,胆汁酸的缺乏会导致肠道细菌平衡失调<sup>[38]</sup>。在此研究中,盲肠内容物中DCA,HDCA含量则随着栀子苷剂量的增大而降低,可以认为大剂量栀子苷的摄入改变了大鼠肠道胆汁酸含量和胆汁酸的排泄,提高了次级胆汁酸的占比,改变了大鼠盲肠内容物的胆汁酸谱,且其可能抑制了大鼠胆汁酸的合成,促进了胆汁酸在肝脏的累积,影响了胆汁酸的肝肠循环。

胆汁酸体内过程复杂、种类繁多、生理功能各异,其稳态的干扰不仅能揭示肝损伤的发生机制,对于肝损伤的早期预警同样具有重要意义。胆汁酸谱的变化可能是栀子苷引起肝损的潜在标志物和预后靶标。本研究观察了不同剂量栀子苷给予大鼠灌胃后的病理、血清学改变,以及血清、肝脏、盲肠内容物中胆汁酸含量的变化,发现大剂量的服用栀子苷可显著影响大鼠胆汁酸谱的组成,且肝脏、血清、粪便中的组成变化各不相同,十分复杂,而这些胆汁酸谱的改变是导致大鼠肝损伤的原因,还是由于肝脏损伤后导致胆汁酸谱发生改变,目前研究尚不能明晰,后续十分有必要在体外开展相关机制探讨。另外,由于盲肠内容物胆汁酸谱的变化与肝组织和血清中的有较大的区别,且有现代研究

发现肠道菌群对胆汁酸的转化起着至关重要的作用,不同的肠菌属对胆汁酸的代谢有着一定的影响<sup>[39]</sup>,因此明确栀子苷-肠道菌群-肠道胆汁酸之间的关联,可能解析栀子苷诱导肝损伤的潜在机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 何理想,王允吉,张倩倩,等. UPLC Q-Exactive Orbitrap MS分析栀子水提液中的化学成分[J]. 广州化工, 2020,48(5):94-97.
- [2] KIM J, KIM H Y, LEE S M. Protective effects of geniposide and genipin against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *Biomol Ther*, 2013, 21(2):132-137.
- [3] 杨洪军,付梅红,吴子伦,等. 栀子对大鼠肝毒性的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006,31(13):1091-1093.
- [4] TIAN J Z, ZHU J J, YI Y, et al. Dose-related liver injury of geniposide associated with the alteration in bile acid synthesis and transportation. [J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):8938.
- [5] 卫璐戈,张海虹,李会芳. 栀子苷、京尼平、栀子蓝的体内外肝毒性对比研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(2):311-314.
- [6] TIAN J Z, YI Y, ZHAO Y, et al. Oral chronic toxicity study of geniposide in rats [J]. *J. Ethnopharmacology*, 2018,213(1):166-175.
- [7] 陈浩,高璇,赵威,等. 基于网络药理学的栀子抗胆汁淤积的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019,44(13):2709-2718.
- [8] 谭楨,刘爱明,罗敏,等. 茵栀黄注射液抗胆汁淤积药效成分的筛选及其作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2016,41(6):1113-1118.
- [9] 冯筱懿,田婧卓,易艳,等. 栀子苷对大鼠的肾脏毒性作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 118-121.
- [10] LIU J, LI Y, SUN C, et al. Geniposide reduces cholesterol accumulation and increases its excretion by regulating the FXR-mediated liver-gut crosstalk of bile acids[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 152:104631.
- [11] YANG L, XIONG A Z, HE Y Q, et al. Bile acids metabonomics study on the CCl<sub>4</sub> and alpha-naphthylisothiocyanate-induced animal models: quantitative analysis of 22 bile acids by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(12): 2280-2288.
- [12] HEGADE S V, SPEIGHT A R, ETHERINGTON E R, et al. Novel bile acid therapeutics for the treatment

- of chronic liver diseases [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2016, 9(3):376-391.
- [13] MONTE M, MARIN J, ANTELO A, et al. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(7):804-816.
- [14] ARAB J P, CABRERA D, ARRESE M. Bile Acids in cholestasis and its treatment [J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(S1):s53-s57.
- [15] TONIN F, ARENDS I. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review [J]. *Beilstein J Org Chem*, 2018, 14:470-483.
- [16] 张雪莹, 杨劲, 尹雪芬, 等. 谷胱甘肽的肝脏转运及其在胆汁淤积中的作用 [J]. *药学报*, 2009, 44(4):327-332.
- [17] ZHANG Z, FAN S, HUANG D, et al. Polysaccharides from fermented *Asparagus officinalis* with *Lactobacillus plantarum* NCU116 alleviated liver injury via modulation of glutathione homeostasis, bile acid metabolism, and SCFA production [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9):7681-7695.
- [18] CEN X, SHOGO T, CHAD N B, et al. Hepatocyte peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  regulates bile acid synthesis and transport [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(10):1396-1411.
- [19] 邢万佳, 高聆, 赵家军. 胆固醇7- $\alpha$ -羟化酶CYP7A1表达及调控相关研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(16):1439-1446.
- [20] LI T, MATOZEL M, BOEHME S, et al. Overexpression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3):996-1006.
- [21] LIN B F, JAN F J, PRADEEPRAJ D, et al. Conversion of chenodeoxycholic acid to cholic acid by human CYP8B1 [J]. *Biol Chem*, 2019, 400(5):625-628.
- [22] LI H J, GAFVELS M, OLIN M, et al. Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(8):1191-200.
- [23] 陈思航. 鸡CYP27A1对维生素D<sub>3</sub>的羟化功能研究 [D]. 汉中: 陕西理工大学, 2020.
- [24] TRAUNER M, BOYER J L. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(2):633-671.
- [25] TRAUNER M, FUCHS C D, Halilbasic E, et al. New therapeutic concepts in bile acid transport and signaling for management of cholestasis [J]. *Hepatology*, 2017, 65(4):1393-1404.
- [26] 段银环. 血清胆汁酸代谢轮廓分析在肝胆疾病诊断中的意义 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
- [27] KIM S, HAN S Y, YU K S, et al. Impaired autophagy promotes bile acid-induced hepatic injury and accumulation of ubiquitinated proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1):1541-1547.
- [28] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:231.
- [29] 杨宇, 杨光, 曾宪阳. 栀子苷镇痛作用及其机制初步研究 [J]. *武警医学*, 2013, 24(3):218-220, 223.
- [30] 张文娟, 李茂星, 张泉龙, 等. 栀子苷的快速提取分离及其镇痛抗炎作用研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(21):170-174.
- [31] 孙勇, 李德鹏, 张雯, 等. 栀子苷对LPS诱导的小鼠乳腺炎的抑制效果 [J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(8):876-880.
- [32] 侯金才, 张鹏, 刘建勋, 等. 栀子苷对缺氧/复氧小胶质细胞TLR4通路的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(6):769-773.
- [33] 武海霞. 栀子苷体外抗氧化作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(3):456.
- [34] 王波, 杨洪军, 高双荣, 等. 栀子对大鼠肝肾毒性的病理学观察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2007, 13(5):45-48.
- [35] DING Y, ZHANG T, TAO J S, et al. Potential hepatotoxicity of geniposide, the major iridoid glycoside in dried ripe fruits of *Gardenia jasminoides* (Zhi-zi) [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(10):929-933.
- [36] CHUNG B K, KARLSEN T H, FOLSERAAS T. Cholangiocytes in the pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and development of cholangiocarcinoma [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(4):1390-1400.
- [37] 蒙丹丽, 梁列新, 宋怀宇. 乙肝相关慢加急性肝衰竭患者粪便胆汁酸谱变化的研究 [J]. *中国临床新医学*, 2019, 12(11):1188-1192.
- [38] ABU F N H, SHERIF T M K, MOHAMMED O A, et al. Intestinal barrier integrity and function in infants with cholestasis [J]. *Intest Res*, 2017, 15(1):118-123.
- [39] 王菲, 王允野, 张丹, 等. 调节胆汁酸代谢及肠道菌群对非酒精性脂肪肝治疗效果研究 [J]. *中国医药科学*, 2019, 9(19):36-40, 45.

[责任编辑 张丰丰]