

· 其他肝病 ·

DOI: 10.12449/JCH260117

解毒化瘀颗粒对急性肝衰竭小鼠肝损伤的调控作用及机制分析

牙程玉^{1,2,3}, 王挺帅^{1,3,4}, 严惠萍¹, 王怡¹, 赵庆瑞^{1,3,4}, 曾胜澜^{1,3,4}, 陈玮钰¹, 张荣臻²

1 广西中医药大学研究生院, 南宁 530200

2 广西中医药大学附属国际壮医医院肝胆内科, 南宁 530201

3 广西中医药大学第一附属医院中医临床研究重点实验室, 南宁 530023

4 广西中医药大学第一附属医院肝病科, 南宁 530023

通信作者: 张荣臻, zhangrongzhen2007@163.com (ORCID: 0000-0003-2243-665X)

摘要: **目的** 通过观察解毒化瘀颗粒对急性肝衰竭(ALF)小鼠模型的影响,以预防性给药方式,探究该方改善ALF小鼠肝损伤的作用机制,以期为临床用药提供依据。**方法** 将60只雄性SPF级C57BL/6J小鼠按随机数字表随机分为对照组、模型组、解毒化瘀颗粒组(JDHY组)和法尼醇X受体(FXR)激动剂(GW4064)组,每组各15只。采用D-氨基半乳糖联合脂多糖一次性腹腔注射诱导建立ALF模型,JDHY组小鼠在造模前3天预防性给予0.3 g/mL解毒化瘀颗粒中药液灌胃,对照组、模型组小鼠予以0.9% NaCl溶液灌胃,GW4064组在造模前3天连续予以腹腔注射GW4064。造模完成后,处死小鼠,并对小鼠血清、肝组织进行收集;采用兽用全自动生化分析仪测定各组小鼠血清总胆红素(TBil)、总胆汁酸(TBA)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平;苏木精-伊红(HE)染色法观察小鼠肝脏的病理学变化;运用逆转录PCR检测各组小鼠FXR、成纤维细胞生长因子15(FGF15)、成纤维细胞生长因子受体4(FGFR4)、小异二聚体伴侣(SHP)和胆盐输出泵(BSEP)的mRNA表达;蛋白免疫印迹法检测各组小鼠FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP的蛋白表达情况。组间比较采用One-way ANOVA方差分析,进一步的组间两两比较用Dunnett法。**结果** 与对照组相比,模型组小鼠血清TBil、ALT、AST、TBA、GGT表达水平均明显升高(P 值均 <0.01);与模型组相比,JDHY组、GW4064组小鼠血清TBil、ALT、AST、TBA、GGT的表达水平均明显降低(P 值均 <0.01)。HE染色结果显示,与模型组相比,JDHY组、GW4064组的病理损伤较轻,肝细胞坏死面积减少,细胞肿胀、水肿程度明显减轻。与对照组相比,模型组小鼠肝组织中FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP的mRNA及蛋白表达水平均显著降低(P 值均 <0.01);与模型组相比,JDHY组、GW4064组小鼠肝组织中FXR、FGF15、FGFR4、SHP、BSEP的mRNA及蛋白表达水平均明显升高(P 值均 <0.05)。**结论** 解毒化瘀颗粒可能通过FXR/SHP轴调控ALF小鼠的肝损伤。

关键词: 解毒化瘀颗粒; 肝功能衰竭,急性; 胆汁酸代谢**基金项目:** 国家自然科学基金(82160881, 82460901);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2023KY0307);广西自然科学基金(2021GXNSFAA220112, 2024GXNSFDA999066);广西中医药大学第三批“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(202409)

Regulatory effect of Jiedu Huayu granules on liver injury in mice with acute liver failure and its mechanism

YA Chengyu^{1,2,3}, WANG Tingshuai^{1,3,4}, YAN Huiping¹, WANG Yi¹, ZHAO Qingrui^{1,3,4}, ZENG Shenglan^{1,3,4}, CHEN Weiyu¹, ZHANG Rongzhen²

1. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Department of Hepatobiliary Medicine, International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530201, China; 3. Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 4. Department of Hepatology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China

Corresponding author: ZHANG Rongzhen, zhangrongzhen2007@163.com (ORCID: 0000-0003-2243-665X)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of action of Jiedu Huayu granules in improving liver injury in mice with acute liver failure (ALF) by observing its effect on a mouse model of ALF after prophylactic administration, and to provide a basis for clinical medication. **Methods** A total of 60 specific pathogen-free male C57BL/6J mice were divided into normal group, model group, Jiedu Huayu granules group (JDHY group), and farnesoid X receptor (FXR) agonist (GW4064) group using a random number table, with 15 mice in each group. The model of ALF was induced by a single intraperitoneal injection of D-galactosamine combined with lipopolysaccharide. The mice in the JDHY group were given prophylactic administration of 0.3 g/mL drug solution of Jiedu Huayu granules by gavage for 3 days before modeling, those in the normal group and the model group were given 0.9% NaCl solution by gavage, and those in the GW4064 group were given intraperitoneal injection of GW4064 for 3 consecutive days before modeling. The mice were sacrificed after modeling, and serum and liver tissue samples were collected. A veterinary automatic biochemical analyzer was used to measure the serum levels of total bilirubin (TBil), total bile acids (TBA), gamma-glutamyl transferase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) in mice from each group; HE staining was used to observe liver pathological changes; RT-PCR was used to measure the mRNA expression levels of FXR, fibroblast growth factor 15 (FGF15), fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4), small heterodimer partner (SHP), and bile salt export pump (BSEP) in mice, and Western blot was used to measure the protein expression levels of FXR, FGF15, FGFR4, SHP, and BSEP. A one-way analysis of variance was used for comparison between groups, and the Dunnett method was used for further comparison between two groups. **Results** Compared with the normal group, the model group had significant increases in the serum levels of TBil, ALT, AST, TBA, and GGT (all $P < 0.01$), and compared with the model group, the JDHY group and the GW4064 group had significant reductions in the serum levels of TBil, ALT, AST, TBA, and GGT (all $P < 0.01$). HE staining showed that compared with the model group, the JDHY group and the GW4064 group had milder pathological injury, a reduction in the area of hepatocyte necrosis, and alleviation of cellular swelling and edema. Compared with the normal group, the model group had significant reductions in the mRNA and protein expression levels of FXR, FGF15, FGFR4, SHP, and BSEP in liver tissue (all $P < 0.01$), and compared with the model group, the JDHY group and the GW4064 group had significant increases in the mRNA and protein expression levels of FXR, FGF15, FGFR4, SHP, and BSEP in liver tissue (all $P < 0.05$). **Conclusion** Jiedu Huayu granules may alleviate liver injury in mice with ALF through the FXR/SHP axis.

Key words: Jiedu Huayu Granules; Liver Failure, Acute; Bile Acid Metabolism

Research funding: National Natural Science Foundation of China (82160881, 82460901); Guangxi University Young and Middle-aged Teachers' Basic Research Ability Improvement Project (2023KY0307); Guangxi Natural Science Foundation (2021GXNSFAA220112, 2024GXNSFDA999066); The Third Batch of "Qihuang Project" High-Level Talent Team Cultivation Program of Guangxi University of Chinese Medicine (202409)

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是一种由多种病因引起的肝细胞严重损伤综合征,以起病迅速、发展迅猛和死亡率高为主要特征^[1]。研究发现,胆汁酸、法尼酯X受体(farnesoid X receptor, FXR)之间存在密切联系,且其相互作用参与了肝衰竭的发生。FXR是胆汁酸代谢过程中的重要分子,其可诱导小异二聚体伴侣(small heterodimer partner, SHP)的转录抑制,进而抑制人钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白和胆固醇7 α -羟化酶(cholesterol 7-alpha-hydroxylase, CYP7A1)基因的反式激活,从而在胆汁淤积状态下减轻胆汁酸超负荷和肝细胞损伤。此外,FXR与结合胆汁酸结合后,可诱导成纤维细胞生长因子15(fibroblast growth factor 15, FGF15)表达,以减少肝细胞

中细胞色素P450酶的转录,进一步抑制胆汁酸的从头合成^[2]。有研究表明,FXR和SHP通过多级反馈回路严格调节胆汁酸的生理浓度和稳态^[3],进而通过降低胆汁酸毒性、减轻胆汁淤积参与肝衰竭的病理进程^[4]。

解毒化瘀颗粒由茵陈、赤芍、大黄、郁金、白花蛇舌草和石菖蒲组成,是毛德文教授基于“毒邪-毒浊”中医理论学说,通过不断钻研前人经验及自身实践感悟创制的具有确切临床疗效用于治疗肝衰竭的中药方剂^[5]。多项临床及动物实验研究已证实,解毒化瘀颗粒可通过调控多条信号通路,在改善肝功能、保护肝细胞、减轻肝脏炎症损伤、抑制肝细胞焦亡与凋亡、促进肝细胞再生以及减轻免疫炎症反应等方面展现一定的疗效^[6-9]。本

课题组为进一步探究解毒化瘀颗粒改善肝损伤的作用机制,基于前期研究基础,提出“解毒化瘀颗粒可通过FXR/SHP轴调控胆汁酸代谢从而改善肝衰竭肝损伤”的研究假说,以期为临床用药提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF级C56BL/6J小鼠,雄性,8~9周龄,体重(20±2)g,共60只,由长沙市天勤生物技术有限公司提供。实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2022-0011;实验动物使用许可证编号:SYXK(桂)2019-0001。

1.1.2 药品和主要试剂 解毒化瘀颗粒(江阴天江药业有限公司,批号:07004160),购自广西中医药大学第一附属医院,由茵陈、赤芍、大黄、石菖蒲、郁金和白花蛇舌草组成。D-氨基半乳糖、脂多糖购自美国Sigma公司(批号:L3024、G0500)。FXR、成纤维细胞生长因子受体4(fibroblast growth factor receptor 4,FGFR4)、SHP、胆盐输出泵(bile salt export pump,BSEP)抗体购买自武汉三鹰生物技术有限公司(批号:13194-1-AP、11098-1-AP、24546-1-AP、67512-1-Ig);FGF15购于艾比玛特医药科技(上海)有限公司(批号:PK15481);FXR激动剂GW4064购于美国Santa Cruz公司(批号:Sc218577)。苏木素-伊红(hematoxylineosi,HE)试剂购于北京索宝科技有限公司(批号:G1120)。

1.1.3 主要仪器 本研究使用的仪器主要包括:新加坡ESCO公司AB2-5S1型BSL-II级生物安全柜、美国Bio-Rad公司实时荧光定量PCR检测系统、美国Queue公司QWJ300TCO2培养箱、德国Qiagen公司QIAcube型多功能全自动样本制备工作站、Qiagen公司QIAgility型全自动高通量体系构建工作站、美国Invitrogen公司Qubit2.0核酸/蛋白定量仪、日本Olympus公司IX71-22FL/PH倒置荧光显微镜、瑞士卡玛Scanner3薄层扫描仪、Moticam1300数码显微图像分析系统、美国Harris公司ELT-13V-85℃超低温冰箱、德国Eppendorf公司5417R低温高速离心机等大型精密仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组、造模、给药和标本采集 在温度、湿度适宜的环境下适应性饲养小鼠,自由饮食、饮水。60只小鼠按随机数字表法随机分成4组,每组各15只,分别为对照组、模型组、解毒化瘀组(JDHY组)和FXR激动剂组(GW4064组)。通过一次性腹腔注射D-氨基半乳糖500 mg/kg、脂多糖20 μg/kg,诱导ALF小鼠模型建

立。解毒化瘀颗粒由单味中药浓缩颗粒剂配制而成,用蒸馏水将中药颗粒配制成中药液。根据课题组前期多项研究结果^[10-12],确定大鼠的最佳有效中药液灌胃浓度为0.22 g/mL,由此计算小鼠等效灌胃药量浓度,进行固定有效剂量研究,小鼠灌胃剂量为每次1 mL/100 g,1次/12 h,浓度为0.3 g/mL的中药液,对照组、模型组小鼠予以0.9% NaCl溶液灌胃。JDHY组小鼠在造模前3天给予解毒化瘀颗粒灌胃,行预防性给药,最后1次给药后诱导建立ALF小鼠模型;GW4064组在造模前3天连续予腹腔注射GW4064(40 mg/kg),末次给药后诱导建立ALF模型。造模24 h后处死小鼠,经腹主动脉采血,收集各组小鼠的肝组织。

本研究初始每组纳入15只小鼠,由于ALF模型致死率较高,在造模及给药过程中,部分小鼠死亡;故制定剔除标准为:(1)造模后24 h内死亡;(2)因灌胃等操作意外导致非肝衰竭死亡。最终各组纳入的样本量分别为15、11、13、14只小鼠。所有数据均来自存活至实验终点并成功取材的小鼠。

1.2.2 各组小鼠肝功能指标变化情况 采血后将血液于室温中静置30 min,以4 000 r/min离心10 min,分离血清。采用兽用全自动生化分析仪测定血清总胆红素(total bilirubin, TBil)、总胆汁酸(total bile acids, TBA)、γ-谷氨酰转氨酶(gamma glutamyltransferase, GGT)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平。

1.2.3 HE染色观察病理变化 取出固定液中的肝组织,切成适宜大小的方块置于包埋盒中,流水冲洗2 h,用梯度乙醇脱水处理后行石蜡浸蜡、包埋、切片和HE染色等,然后在显微镜下观察各组肝组织的病理学改变。

1.2.4 逆转录PCR法(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测各组小鼠的基因表达水平 使用Trizol裂解液裂解肝组织,提取肝组织中的总RNA,并测定总RNA浓度,根据逆转录试剂盒说明,将总RNA逆转录成cDNA后进行RT-PCR的扩增。根据引物序列(表1),以YBR Green q PCR混合物在PTC-100 q PCR System(MJ Research, USA)上进行扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析表达量,以β-肌动蛋白(β-actin)为内参,检测FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP的mRNA水平。

1.2.5 Western Blot检测各组小鼠的蛋白表达水平 取出样本置于冰上解冻,使用RIPA裂解缓冲液提取肝组织蛋白质,BCA法测定蛋白浓度;将变性的蛋白样品在SDS-PAGE中电泳、分离,后转移到PVDF膜上,5%脱脂

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列	长度(bp)
FXR	上游:CTAATGAGGACGACAGCGAAGG	147
	下游:CCTGAGGCATTCTCTGTTTGTGTA	
FGF15	上游:GAAGACGATTGCCATCAAGGAC	93
	下游:TCCTCCGAGTAGCGAATCAGC	
FGFR4	上游:CTACCCACAGCAAGCACCTTA	181
	下游:CCGAATGCCTCCAATACGAT	
SHP	上游:ATCCTCTCAACCCAGATGTGC	171
	下游:GCCTGGAATGTTCTTGAGGGTAG	
BSEP	上游:AGTCAATGTTTCAGTTCCTCCGTT	252
	下游:GCAATAGCAATGCGTTGTTTC	
β-actin	上游:CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游:TGAGGTCAATGAAGGGTCTCGT	

注:FXR,法尼醇X受体;FGF15,成纤维细胞生长因子15;FGFR4,成纤维细胞生长因子受体4;SHP,小异二聚体伴侣;BSEP,胆盐输出泵;β-actin,β-肌动蛋白。

牛奶封闭1 h后使用TBST溶液清洗3次,每次10 min;按比例使用3% BSA 稀释一抗:β-actin(1:4 000)、FXR(1:25 000)、FGF15(1:500)、FGFR4(1:650)、SHP(1:25 000)、BSEP(1:25 000),在4℃下避光孵育过夜;次日回收一抗后,使用TBST溶液清洗3次,每次10 min,继续孵育二抗(1:4 000)2 h,TBST溶液清洗后,使用ECL化学发光底物显影,Image J软件分析蛋白条带灰度。

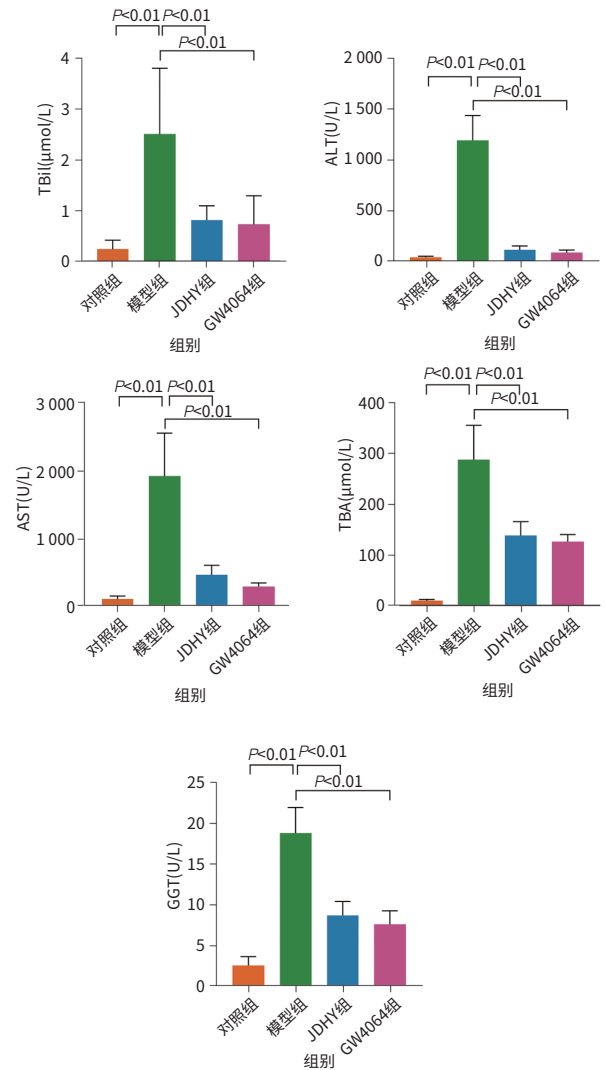
1.3 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用One-way ANOVA方差分析,进一步两两比较用Dunnett法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清肝功能变化水平 与对照组相比,模型组小鼠血清总的TBil、ALT、AST、TBA和GGT表达水平均明显升高(P 值均 < 0.01);与模型组相比,JDHY组和GW4064组小鼠的TBil、ALT、AST、TBA和GGT表达水平均明显降低(P 值均 < 0.01)(图1)。

2.2 各组小鼠肝组织病理学情况 对照组小鼠肝组织肝小叶清晰完整,肝细胞形态、大小均正常,排列规整,未见细胞肿胀、变性和坏死。模型组小鼠肝细胞呈大块坏死,部分可见细胞肿胀、水肿,核染色异常,肝组织结构紊乱,肝小叶结构遭到破坏,并伴有大量炎性细胞浸润。与模型组相比,JDHY组及GW4064组的病理损伤较轻,肝细胞坏死面积减少,细胞肿胀、水肿程度明显减轻(图2)。

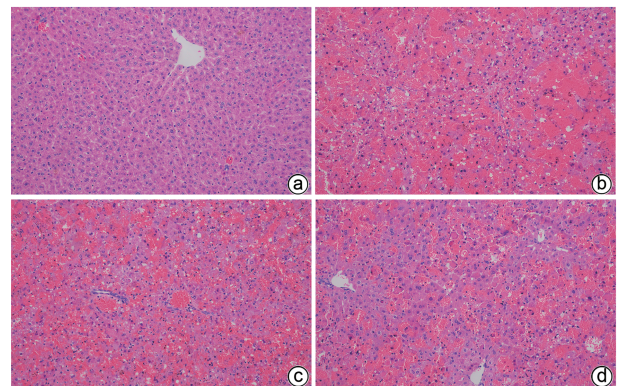
2.3 各组小鼠 FXR、FGF15、FGFR4、SHP 和 BSEP 的 mRNA 水平比较 与对照组相比,模型组小鼠肝组织中



注:TBil,总胆红素;ALT,丙氨酸氨基转移酶;AST,天冬氨酸氨基转移酶;TBA,总胆汁酸;GGT,γ-谷氨酰转移酶。

图1 各组小鼠血清肝功能水平比较

Figure 1 Comparison of serum liver function levels among different groups of mice



注:a,对照组;b,模型组;c,JDHY组;d,GW4064组。

图2 肝组织病理学结果(HE染色,×200)

Figure 2 Liver histopathology (HE staining, ×200)

FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP的 mRNA 表达水平均明显降低(P 值均 <0.01);与模型组相比,JDHY组小鼠肝组织中FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP的 mRNA 表达水平均有所升高(P 值均 <0.05),GW4064组小鼠肝组织中FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP的 mRNA 表达水平均明显升高(P 值均 <0.01)(图3)。

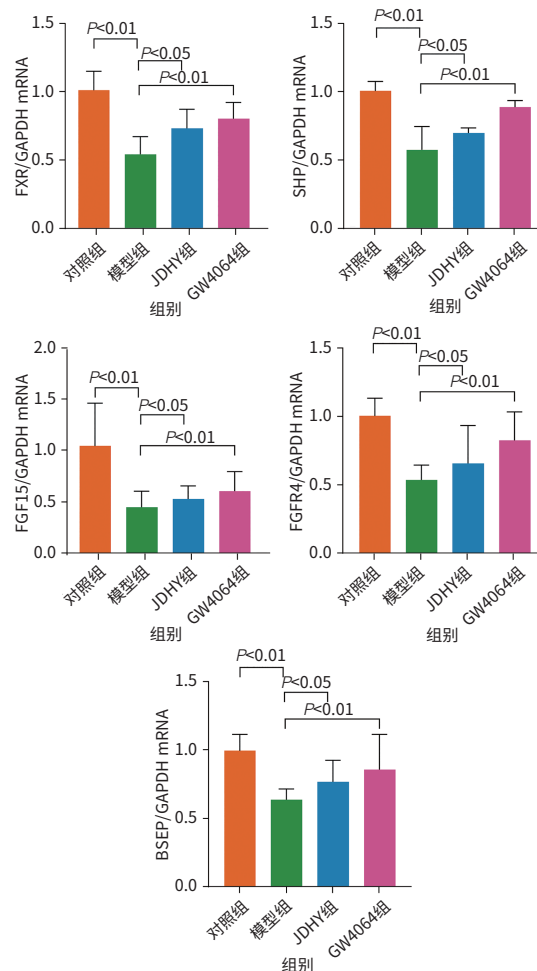
2.4 各组小鼠 FXR、FGF15、FGFR4、SHP 和 BSEP 的蛋白水平比较 与对照组相比,模型组小鼠肝组织中FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP蛋白表达水平均显著降低(P 值均 <0.01);与模型组相比,JDHY组小鼠肝组织中FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP蛋白表达水平均明显升高(P 值均 <0.01),GW4064组小鼠肝组织中FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP蛋白表达水平均明显升高(P 值均 <0.01)(图4,表2)。

3 讨论

肝功能异常的严重程度可表现为从轻度的肝酶升高到ALF不等,急性肝损伤包括肝细胞损伤和胆汁淤积,严重时可导致ALF。ALF特征是起病迅速、病情进展迅猛且病因呈现多样性,可合并诸多严重并发症,短期病死率高达30%以上^[13]。在发达国家,药物性肝损伤是ALF的主要诱因;我国则以病毒性肝炎(尤其是乙型肝炎)为ALF的主要诱因^[14]。临床常通过对症支持治疗、防治相关并发症、人工肝甚至肝移植等相关治疗手段进行干预^[15],虽有逆转疾病的可能,但常因肝源缺乏等,使ALF的治疗在一定程度上受到了限制。因此,积极探索减轻ALF肝损伤的新型药物及其作用机制尤为关键。

研究表明,胆汁酸在肠肝循环中出现障碍时,可导致机体内堆积过量的胆汁酸,从而造成胆汁淤积性肝炎,严重时可发展为肝衰竭^[16]。此外,胆汁酸可透过血脑屏障,参与肝衰竭时肝性脑病的发生机制^[17]。在胆汁淤积的条件下,积累的高水平胆汁酸可促进凋亡蛋白酶激活因子-1/半胱天冬酶-4焦亡体的组装,激活半胱天冬

酶-3-焦孔素-E执行的焦亡,从而导致胆汁淤积性肝衰竭^[18]。胆汁淤积性肝功能障碍常发生于危重患者,主要由胆汁酸合成、运输和反馈调节紊乱引起。肝脏中的炎



注:FXR,法尼醇X受体;FGF15,成纤维细胞生长因子15;FGFR4,成纤维细胞生长因子受体4;SHP,小异二聚体伴侣;BSEP,胆盐输出泵;GAPDH,甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图3 各组小鼠FXR、SHP、FGF15、FGFR4和BSEP的 mRNA 表达情况

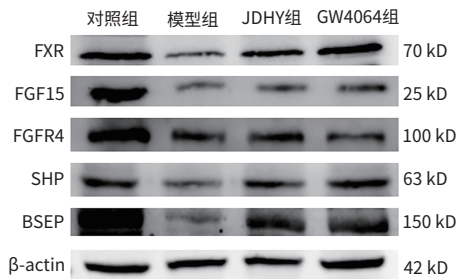
Figure 3 mRNA expression levels of FXR, SHP, FGF15, FGFR4 and BSEP in mice from each group

表2 目的蛋白灰度值/内参灰度值

Table 2 Target protein gray value / internal reference gray value

指标	例数	FXR	SHP	FGF15	FGFR4	BSEP
正常组	15	1.20±0.07 ¹⁾	0.95±0.05 ¹⁾	0.90±0.24 ¹⁾	0.90±0.13 ¹⁾	1.16±0.12 ¹⁾
模型组	11	0.65±0.18	0.58±0.09	0.37±0.10	0.50±0.06	0.52±0.09
JDHY组	13	0.89±0.18 ¹⁾	0.82±0.26 ¹⁾	0.49±0.07 ¹⁾	0.72±0.12 ¹⁾	0.71±0.05 ¹⁾
GW4064组	14	1.01±0.23 ¹⁾	0.90±0.10 ¹⁾	0.58±0.15 ¹⁾	0.83±0.16 ¹⁾	0.73±0.05 ¹⁾
F值		22.45	20.32	22.39	26.78	135.67
P值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与模型组比较,1) $P<0.01$ 。FXR,法尼醇X受体;SHP,小异二聚体伴侣;FGF15,成纤维细胞生长因子15;FGFR4,成纤维细胞生长因子受体4;BSEP,胆盐输出泵。



注:FXR,法尼醇X受体;FGF15,成纤维细胞生长因子15;FGFR4,成纤维细胞生长因子受体4;SHP,小异二聚体伴侣;BSEP,胆盐输出泵;
β-actin,β-肌动蛋白。

图4 各组小鼠FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP蛋白表达情况

Figure 4 Protein expression levels of FXR, FGF15, FGFR4, SHP and BSEP in mice from each group

症状态,无论是直接的肝毒性还是作为全身炎症反应的一部分,都会抑制肝脏FXR功能,从而降低或消除对CYP7A1的负反馈,并导致新的胆汁酸合成^[19]。众所周知,胆汁酸代谢过程复杂,涉及多种信号通路和调控因子。FXR是核受体超家族成员,主要在肝脏和肠道中表达,是胆汁酸代谢的核心调控因子^[20]。鹅去氧胆酸是FXR的天然配体,二者结合后可激活FXR;SHP是FXR的下游靶基因,属于核受体超家族,但没有DNA结合域,FXR被激活后,可诱导SHP的表达^[21];BSEP是位于肝细胞毛细胆管膜上的转运蛋白,负责将胆汁酸从肝细胞排泄到胆汁中,FXR被激活后,可以上调BSEP的表达^[22];FGF15(小鼠)和FGF19(人类)是肠道分泌的激素样因子,同样参与胆汁酸代谢的负反馈调节,肠道中的FXR被胆汁酸激活后,诱导FGF15/19的表达和分泌,FGF15/19通过血液循环到达肝脏,与肝细胞膜上的FGF15/19受体FGFR4结合,主要在肝脏中表达,二者结合后可抑制CYP7A1的表达,减少胆汁酸合成^[23]。另有研究表明,FGFR4-LRH-1复合物介导的FGF4信号对胆汁酸合成的精确空间和时间控制具有精确调控作用,可维持胆汁酸体内平衡,并最大程度地减少其在肝胆管和肠系统中的毒性,以应对各种生理需求和病理挑战^[24]。FGF4在肝内和胆道胆汁淤积小鼠中的肝细胞特异性缺陷释放了胆汁酸合成,导致胆汁淤积和肝损伤加剧。由此,FXR、FGFR4、FGF15/19、SHP和BSEP在胆汁酸代谢中形成一个复杂的调控网络,通过负反馈机制维持胆汁酸稳态,在肝脏健康和代谢调节中发挥关键作用。因此,调节肝脏的胆汁酸代谢、减轻胆汁淤积,可能为肝衰竭患者的治疗提供新策略。

本研究结合课题组的前期研究,进一步从胆汁酸代谢角度探讨了解毒化瘀颗粒改善肝衰竭肝损伤的作用机

制。实验结果显示,模型组FXR、SHP和BSEP的mRNA及蛋白表达水平均较对照组明显下降;与模型组相比,JDHY组小鼠FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP的蛋白及mRNA表达水平升高,肝功能、胆汁淤积和肝组织病理损伤情况均得到改善;与模型组相比,GW4064组小鼠相应蛋白及mRNA表达水平明显升高,肝功能、胆汁淤积和肝组织病理损伤情况也有明显改善。由此可见,解毒化瘀颗粒可能通过调控胆汁酸稳态发挥改善ALF小鼠肝损伤的作用。GW4064是合成激动剂,对FXR的靶点选择性更强、亲和力更高,解毒化瘀颗粒作为一个多成分体系,其作用更为温和和广泛,可能在强效激活FXR的同时,通过抗炎、抗氧化等其他途径协同发挥保肝作用,其整体效益和安全性特征有待进一步的全面评估,旨在为临床治疗ALF提供一种多系统调控的替代方案。此外,其作为FXR激动剂,可能存在过度激活的不良反应,一般可见高密度脂蛋白胆固醇降低、低密度脂蛋白胆固醇增高和皮肤瘙痒等潜在不良反应^[25]。本研究尚未对上述不良反应指标进行检测,未来研究需全面评估解毒化瘀颗粒长期应用的效益-风险比,其多成分特性可能因其相对温和的激活效应或通过其他成分的拮抗作用而带来更好的耐受性,值得进行更深入的探究。

肝衰竭在中医学中被归为“黄疸、急黄”范畴。毛德文教授在总结前人理论并结合自身临床用药经验基础上,提出“毒、浊、瘀”在肝衰竭发病中的重要地位,并研制出解毒化瘀颗粒,前期研究表明该方可显著提高肝衰竭患者的存活率,改善中医证候积分、肝功能和凝血功能,降低患者内毒素水平^[7]。茵陈是临床上用于治疗黄疸的要药^[26],也是解毒化瘀颗粒的重要组成部分,朱正望等^[27]通过建立胆汁淤积大鼠模型,表明模型组大鼠肝组织中FXR的mRNA及蛋白表达水平明显降低,使用茵陈蒿汤干预后,上调了大鼠肝组织中FXR的mRNA及蛋白表达水平,其机制可能与调控FXR抑制Toll样受体4/髓样分化因子88/核因子-κB通路介导的炎症反应有关。芍药苷是从赤芍中分离提取的水溶性单萜苷类化合物,邓昕雨等^[28]研究发现,赤芍能降低毒性胆汁酸含量,恢复胆汁酸核受体FXR、胆汁酸转运体BSEP的活性,改善胆汁酸的合成及转运过程,从而对抗胆汁淤积。王玮辰等^[29]对大黄素的实验研究证明,大黄素对胆汁淤积性小鼠具有保护作用,且机制可能是通过调控CYP7A1/FXR/SHP通路,进一步调控氧化应激反应发挥保护作用。另外,白花蛇舌草的主要成分为京尼平苷酸,可通过上调FXR表达,诱导BSEP/多药耐药相关基

因2,促进胆汁酸排泄,并增加谷胱甘肽、超氧化物歧化酶等抗氧化水平,从而改善胆汁淤积^[30]。解毒化瘀颗粒由茵陈、赤芍、大黄、石菖蒲、郁金和白花蛇舌草组成,前期临床试验研究发现,解毒化瘀颗粒在治疗慢性肝衰竭毒热瘀结证患者时,可降低患者体内内毒素、二胺氧化酶及血氨水平,减少体内降钙素、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1(interleukin, IL-1)、IL-6和IL-17等炎症因子释放,有效改善乙型肝炎相关急性肝衰竭患者肝功能,降低Th17及Th1表达水平^[6-7];另有动物实验结果证明,解毒化瘀颗粒可能通过调节急性肝衰竭大鼠Kupffer细胞的核因子- κ B信号通路,减轻免疫损伤、降低促炎因子释放,从而拮抗ALF;此外,解毒化瘀颗粒还能够通过调控黑色素瘤缺失因子2-半胱天冬酶1/半胱天冬酶11-焦孔素D焦亡信号通路,抑制肝细胞焦亡^[8-9]。由此可见,解毒化瘀颗粒是通过多条通路、多靶点协同发挥作用的复方制剂。本研究在既往研究的基础上进一步揭示,解毒化瘀颗粒激活FXR/SHP通路、纠正胆汁酸代谢紊乱,是其发挥保肝作用的核心新机制之一,该发现不仅从胆汁酸代谢调控层面补充了解毒化瘀颗粒的作用机理,也延续并深化了对该方剂多靶点调控特性的认识。本研究实验结果表明,解毒化瘀颗粒可调控ALF小鼠FXR、FGF15、FGFR4、SHP和BSEP等关键因子的表达,有效降低了胆汁酸毒性,减轻了胆汁淤积相关肝损伤。该结果与既往研究结论相符,进一步从多靶点协同作用的角度,为解毒化瘀颗粒治疗急性肝衰竭提供了新的理论依据与通路层面机制解释。

综上所述,本研究发现解毒化瘀颗粒可能通过FXR/SHP轴调控胆汁酸代谢,从而发挥改善ALF小鼠肝损伤的作用。然而本研究尚存在一定的局限性:(1)目前尚未明确复方中具体发挥关键作用的FXR激动剂成分,亦不清楚各成分之间是否存在协同作用。后续研究可增设奥贝胆酸阳性对照组,并采用治疗性给药模式,以更直接地揭示解毒化瘀颗粒的作用机制。课题组未来计划综合运用网络药理学预测、分子对接技术及体外细胞模型筛选等方法,对本方活性成分进行深度挖掘。(2)未设立多剂量组以构建量效曲线,未来需通过不同剂量组的对比,进一步明确其效价强度,为临床等效剂量的精确换算提供更可靠的实验依据。

伦理学声明:本研究方案于2022年10月17日经由广西中医药大学动物实验伦理委员会审核批准,符合实验动物伦理委员会的要求,批号:DW20221017-221。

利益冲突声明:本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明:牙程玉、王挺帅负责设计论文框架,起草论文;严惠萍、王怡、赵庆瑞负责实验操作,研究过程的实施;曾胜澜、陈玮钰负责数据收集、整理,统计学分析,绘制图表;张荣臻负责拟定写作思路,指导撰写文章并最后定稿。

参考文献:

- [1] Liver Failure and Artificial Liver Group, Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association; Severe Liver Disease and Artificial Liver Group, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association. Guideline for diagnosis and treatment liver failure (2024 version) [J]. *J Clin Hepatol*, 2024, 40(12): 2371-2387. DOI: 10.12449/JCH241206.
中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2024年版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(12): 2371-2387. DOI: 10.12449/JCH241206.
- [2] HARTMANN P, HOCHRATH K, HORVATH A, et al. Modulation of the intestinal bile acid/farnesoid X receptor/fibroblast growth factor 15 axis improves alcoholic liver disease in mice[J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2150-2166. DOI: 10.1002/hep.29676.
- [3] ZHONG YD, CHEN YJ, PAN ZS, et al. Ginsenoside Rc, as an FXR activator, alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via relieving inflammation and oxidative stress[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1027731. DOI: 10.3389/fphar.2022.1027731.
- [4] CHEN YY, LAN YM, WANG MG, et al. Mechanism of action of bile acid-farnesoid X receptor-intestinal microecological axis in the development of liver failure and liver regeneration[J]. *J Clin Hepatol*, 2021, 37(2): 480-484. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.02.049.
陈研焰, 蓝艳梅, 王明刚, 等. 胆汁酸-法尼醇核受体R-肠道微生物生态轴在肝衰竭发生及肝再生中的作用机制[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(2): 480-484. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.02.049.
- [5] LYU C, SHI QL, QIN Q, et al. Progress of mechanism of Jiedu Huayu Granules treating hepatic failure[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2019, 46(11): 2453-2457. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2019.11.060.
吕超, 石清兰, 覃倩, 等. 解毒化瘀颗粒治疗肝衰竭作用机制研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(11): 2453-2457. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2019.11.060.
- [6] BAI WJ, MAO DW, SHI QL, et al. Effect of Jiedu Huayu Granules on inflammatory state of patients with chronic hepatic failure with toxic heat and stasis syndrome[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(3): 109-115. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220304.
柏文婕, 毛德文, 石清兰, 等. 解毒化瘀颗粒对慢性肝衰竭毒热瘀结证患者炎症状态的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(3): 109-115. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220304.
- [7] SHI QL, MAO DW, CHEN YQ, et al. Effect of Jiedu Huayu II Decoction on the expression of Th17 and Th1 in peripheral blood of patients with HBV related acute liver failure and its clinical efficacy[J]. *China Med Her*, 2018, 15(21): 122-125.
石清兰, 毛德文, 陈月桥, 等. 解毒化瘀II方对HBV相关急性肝衰竭患者外周血Th17、Th1表达及临床疗效的影响[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(21): 122-125.
- [8] WANG TS, ZHANG RZ, WANG MG, et al. Based on NF- κ B signaling pathway of Kuffer cells, the mechanism of Jiedu Huayu Granule in antagonizing liver failure was discussed[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(4): 1878-1883.
王挺帅, 张荣臻, 王明刚, 等. 基于Kuffer细胞NF- κ B信号通路探讨解毒化瘀颗粒拮抗肝功能衰竭的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(4): 1878-1883.
- [9] ZHANG K, MAO DW, WANG MG, et al. To explore the regulation of Jiedu Huayu granule on hepatocytopyroptosis in Acute liver failure

- mice based on AIM2 inflammasomesignaling pathway[J/OL]. Liaoning J Tradit Chin Med, 1-18[2025-07-23]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20250716.0845.002>.
- 张衍, 毛德文, 王明刚, 等. 基于AIM2炎症小体信号通路探讨解毒化痰颗粒调控急性肝衰竭小鼠肝细胞焦亡的实验研究[J/OL]. 辽宁中医杂志, 1-18[2025-07-23]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20250716.0845.002>.
- [10] MAO DW, QIU H, YU J, et al. Protective effect of Jiedu Huayu II recipe on experimental fulminant liver failure in rats[J]. Tradit Chin Med Res, 2006, 19(12): 8-10. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6910.2006.12.005.
- 毛德文, 邱华, 余晶, 等. 解毒化痰II方对实验性暴发性肝衰竭大鼠的保护作用[J]. 中医研究, 2006, 19(12): 8-10. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6910.2006.12.005.
- [11] WANG TS, MAO DW, ZHANG RZ, et al. Relationship between expression of Toll-like receptors and inflammatory cytokine on acute liver failure rats with Jiedu Huayu granule[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(9): 2167-2171. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2018.09.029.
- 王挺帅, 毛德文, 张荣臻, 等. 解毒化痰颗粒对急性肝衰竭大鼠TOLL样受体表达与炎症细胞因子关系的研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(9): 2167-2171. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2018.09.029.
- [12] ZHANG RY, WU FL, CHEN YQ, et al. Exploring the mechanism of Jiedu Huayu granule on inflammatory response in acute liver failure based on the IL-6/JAK2/STAT3 axis[J/OL]. Liaoning J Tradit Chin Med, 1-16[2025-07-23]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20250819.1508.002>.
- 张日云, 吴凤兰, 陈月桥, 等. 基于IL-6/JAK2/STAT3轴探讨解毒化痰颗粒对急性肝衰竭炎症反应的作用机制[J/OL]. 辽宁中医杂志, 1-16[2025-07-23]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20250819.1508.002>.
- [13] YANG B, CHEN S, XIA XQ, et al. Mas signaling potentiates neutrophil extracellular traps formation induced by endothelial cells derived S1P in mice with acute liver failure[J]. Adv Sci, 2025, 12(20): 2411428. DOI: 10.1002/advs.202411428.
- [14] STRAVITZ RT, LEE WM. Acute liver failure[J]. Lancet, 2019, 394(10201): 869-881. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)31894-x.
- [15] FERNÁNDEZ J, BASSEGODA O, TOAPANTA D, et al. Acute liver failure: A practical update[J]. JHEP Rep, 2024, 6(9): 101131. DOI: 10.1016/j.jhepr.2024.101131.
- [16] ALVAREZ-SOLA G, URIARTE I, LATASA MU, et al. Bile acids, FGF15/19 and liver regeneration: From mechanisms to clinical applications[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2018, 1864(4): 1326-1334. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.06.025.
- [17] CZARNECKA AM, MILEWSKI K, ALBRECHT J, et al. The status of bile acids and farnesoid X receptor in brain and liver of rats with thioacetamide-induced acute liver failure[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7750. DOI: 10.3390/ijms21207750.
- [18] XU WF, WANG Y, CUI S, et al. Methylcobalamin protects against liver failure via engaging gasdermin E[J]. Nat Commun, 2025, 16: 1233. DOI: 10.1038/s41467-024-54826-6.
- [19] CHEUNG A, FLAMM S. Hepatobiliary complications in critically ill patients[J]. Clin Liver Dis, 2019, 23(2): 221-232. DOI: 10.1016/j.cld.2018.12.005.
- [20] WANG MQ, ZHANG KH, LIU FL, et al. Wedelolactone alleviates cholestatic liver injury by regulating FXR-bile acid-NF- κ B/NRF2 axis to reduce bile acid accumulation and its subsequent inflammation and oxidative stress[J]. Phytomedicine, 2024, 122: 155124. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.155124.
- [21] JIA SQ, DOU XG. Farnesol X receptor and its agonist and liver diseases[J]. Chin Hepatol, 2021, 26(11): 1293-1297. DOI: 10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2021.11.028.
- 贾锐琦, 窦晓光. 法尼醇X受体及其激动剂与肝脏疾病[J]. 肝脏, 2021, 26(11): 1293-1297. DOI: 10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2021.11.028.
- [22] MOHAMMED TA, ZALZALA MH. Hepatoprotective effects of cilnidipine in cholestatic liver disease: Role of FXR and NRF2 signalling[J]. J Exp Pharmacol, 2025, 17: 93-105. DOI: 10.2147/JEP.S504511.
- [23] XIE XM, ZHANG BY, FENG S, et al. Activation of gut FXR improves the metabolism of bile acids, intestinal barrier, and microbiota under cholestatic condition caused by GCDCa in mice[J]. Microbiol Spectr, 2025, 13(4): e03150-24. DOI: 10.1128/spectrum.03150-24.
- [24] SONG LT, HOU YS, XU D, et al. Hepatic FXR-FGF4 is required for bile acid homeostasis via an FGFR4-LRH-1 signal node under cholestatic stress[J]. Cell Metab, 2025, 37(1): 104-120. e9. DOI: 10.1016/j.cmet.2024.09.008.
- [25] LI Y, LIU TY, ZHANG WJ. Research progress on the role of hepatoenteric farnesoid X receptor in metabolic diseases[J]. Tianjin Pharm, 2023, 35(1): 71-78. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5687.2023.01.015.
- 李云, 刘天宇, 张文军. 肝肠法尼醇X受体在代谢性疾病中的作用研究进展[J]. 天津药学, 2023, 35(1): 71-78. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5687.2023.01.015.
- [26] LYU L, WANG J, ZHANG QY. Effect of Yinchensiling granules combined with rifaximin on gut microbiota and intestinal barrier function in mice with acute liver failure[J]. Chin J Immunol, 2025, 41(8): 1833-1839. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2025.08.007.
- 吕琳, 王京, 张琪瑶. 茵陈四苓颗粒联合利福昔明对急性肝衰竭小鼠肠道菌群及肠屏障功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41(8): 1833-1839. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2025.08.007.
- [27] ZHU ZW, YANG Y, ZHAO JH, et al. Mechanism of Yinchenhao decoction in ameliorating cholestatic liver injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway via FXR[J/OL]. Chin J Exp Tradit Med Form, 1-10[2025-07-23]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20251194>.
- 朱正望, 杨洋, 赵静涵, 等. 茵陈蒿汤通过FXR抑制TLR4/MyD88/NF- κ B通路改善胆汁淤积性肝损伤的机制[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 1-10[2025-07-23]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20251194>.
- [28] DENG XY, WU HF, LI YB, et al. Mechanism of paeoniflorin on ameliorating α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis based on bile acid metabolomics[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(1): 148-158. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.016.
- 邓昕雨, 吴和霏, 李煜兵, 等. 基于胆汁酸代谢组学探讨芍药苷改善 α -萘异硫氰酸酯诱导胆汁淤积的作用机制[J]. 中草药, 2024, 55(1): 148-158. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.016.
- [29] WANG WC, MA YP, WANG M, et al. Investigating the therapeutic effect of emodin on cholestatic liver injury in mice based on the CYP7A1/FXR/SHP pathway[J/OL]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 1-10[2025-07-23]. <https://link.cnki.net/urlid/34.1206.R.20250528.0830.002>.
- 王玮辰, 马雅萍, 王萌, 等. 基于CYP7A1/FXR/SHP途径探究大黄素对胆汁淤积性肝损伤小鼠的治疗作用[J/OL]. 中国临床药理学与治疗学, 1-10[2025-07-23]. <https://link.cnki.net/urlid/34.1206.R.20250528.0830.002>.
- [30] ZHONG YH, LI YY, LIN Z, et al. Study on hepatoprotective effect of hedyotis diffusae herba on ANIT-induced cholestasis in rats[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2021, 32(7): 952-958. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.07.008.
- 钟艳花, 李颖仪, 林重, 等. 白花蛇舌草对ANIT诱导的胆汁淤积大鼠保肝作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(7): 952-958. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.07.008.

收稿日期: 2025-07-23; 录用日期: 2025-09-24

本文编辑: 王莹

引证本文: YA CY, WANG TS, YAN HP, et al. Regulatory effect of Jiedu Huayu granules on liver injury in mice with acute liver failure and its mechanism[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(1): 143-150.

牙程玉, 王挺帅, 严惠萍, 等. 解毒化痰颗粒对急性肝衰竭小鼠肝损伤的调控作用及机制分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(1): 143-150.