

· 胆道疾病 ·

DOI: 10.12449/JCH260219

## 柴胡疏肝散加减方对胆囊胆固醇结石肝郁证小鼠模型的治疗作用及其机制

李兆艳, 王荷颖, 梁仁杰, 王奕淳, 陈惠萍, 闵莉

福建中医药大学中医证研究基地, 福建省中医健康状态辨识重点实验室, 福州 350122

通信作者: 闵莉, 44072083@qq.com (ORCID: 0009-0000-6518-4881)

**摘要:** 目的 探讨柴胡疏肝散加减方对胆囊胆固醇结石(CS)肝郁证胆囊异常舒张的作用机制,进而为临床用药提供依据。方法 采用“高脂致石饲料+慢性不可预知轻度应激(CUMS)”建立CS肝郁证小鼠模型。将45只C57BL/6雄性小鼠随机分为空白组(6只,普通饲料)和CS造模组(39只,高脂致石饲料)。CS成模后,将CS造模组再次随机分为CS组、CS肝郁组、中药组(柴胡疏肝散加减方)和西药组(熊去氧胆酸),每组各9只;继续高脂致石饲料喂养,除CS组外,其余3组进行21天的CUMS造模,干预结束后取材。检测血清胆囊收缩素(CCK)、肝功能、血脂相关指标;肝、胆囊组织行苏木精-伊红染色;RT-qPCR与Western Blot分别检测肠道G蛋白偶联胆汁酸受体1(TGR5)、胰高血糖素样肽-1/2(GLP-1/2)和胆囊TGR5、胰高血糖素样肽-2受体(GLP-2R)的mRNA及蛋白表达;代谢组学检测肠内容物胆汁酸组成。计量资料两组间比较采用成组t检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-t法或Games-Howell法。结果 与空白组相比,CS组出现明显胆囊结石、胆汁浑浊,脂肪肝变性及胆囊壁结构异常,行为学结果表明焦虑与抑郁样行为增加;胆汁总胆固醇、血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶及低密度脂蛋白水平显著升高,胆汁总胆汁酸(TBA)、血清CCK及高密度脂蛋白(HDL)水平显著降低( $P$ 值均 $<0.05$ );肠GLP-1/2、TGR5 mRNA表达均显著升高,胆GLP-2R、TGR5的蛋白表达显著升高, mRNA表达显著降低( $P$ 值均 $<0.05$ );肠内容物多种胆汁酸成分显著改变( $P$ 值均 $<0.05$ )。与CS组相比,CS肝郁组病理及行为学表现进一步加重,胆汁酸成分改变,肠TGR5、GLP-1/2及胆TGR5、GLP-2R的蛋白和mRNA表达均升高( $P$ 值均 $<0.01$ )。与CS肝郁组相比,两用药组均能改善胆囊形态,减轻结石及肝损伤,恢复肝功能及血脂水平;并且均可显著降低肠TGR5、GLP-1/2及胆TGR5、GLP-2R的蛋白和mRNA表达( $P$ 值均 $<0.05$ );甘氨酸脱氧胆酸、牛磺 $\alpha$ -鼠胆酸与牛磺鹅脱氧胆酸在中药组显著上调( $P$ 值均 $<0.05$ ),西药组则见牛磺猪脱氧胆酸、牛磺 $\alpha$ -鼠胆酸、牛磺鹅脱氧胆酸、甘氨酸脱氧胆酸和甘氨酸熊脱氧胆酸显著上调( $P$ 值均 $<0.05$ )。与西药组相比,中药组行为学改善更明显,胆汁TBA和血清HDL更高( $P$ 值均 $<0.01$ ),肠TGR5、GLP-1/2及胆TGR5、GLP-2R的蛋白表达降低,肠TGR5的mRNA表达降低( $P$ 值均 $<0.01$ ),牛磺熊脱氧胆酸上调,而甘氨酸脱氧胆酸、牛磺猪脱氧胆酸、牛磺鹅脱氧胆酸和牛磺石胆酸显著下调( $P$ 值均 $<0.05$ )。结论 柴胡疏肝散加减方可通过调控胆汁酸-TGR5轴改善CS肝郁证肝功能及胆囊异常舒张,发挥疏肝解郁、行气利胆的治疗作用。

**关键词:** 胆囊结石病;肝郁;柴胡疏肝散;小鼠,近交C57BL**基金项目:** 福建省自然科学基金(2025J01934, 2021J01928);福建中医药大学校管课题(X2024033)

### Therapeutic effect and mechanism of modified Chaihu Shugan Powder on a mouse model of gallbladder cholesterol stone with liver depression syndrome

LI Zhaoyan, WANG Heying, LIANG Renjie, WANG Yichun, CHEN Huiping, MIN Li

Research Base of Traditional Chinese Medicine Syndrome, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Health Status Identification in Fujian Province, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Corresponding author: MIN Li, 44072083@qq.com (ORCID: 0009-0000-6518-4881)

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of action of modified Chaihu Shugan Powder in the treatment of abnormal

gallbladder relaxation in gallbladder cholesterol stone (CS) with liver depression syndrome, and to provide a basis for clinical medication. **Methods** Mice were given a high-fat lithogenic diet combined with chronic unpredictable mild stress (CUMS) to establish a model of CS. A total of 45 male C57BL/6 mice were randomly divided into blank group (6 mice fed a normal diet) and CS group (39 mice fed a high-fat lithogenic diet). After CS modeling, the CS group was further randomly divided into four subgroups of CS group, CS liver depression group, traditional Chinese medicine group (treated with modified Chaihu Shugan Powder), and Western medicine group (treated with ursodeoxycholic acid), with 9 mice in each group. All subgroups were fed with the high-fat lithogenic diet, and all mice except those in the CS group were given 21 days of CUMS for modeling. Samples were collected after intervention. The serum levels of cholecystokinin (CCK), liver function parameters, and blood lipid profiles were measured; HE staining was performed for liver and gallbladder tissue; qPCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of G protein-coupled bile acid receptor 1 (TGR5) and glucagon-like peptide-1/2 (GLP-1/2) in the intestine and TGR5 and glucagon-like peptide-2 receptor (GLP-2R) in gallbladder; metabolomics methods were used to determine bile acid composition in intestinal contents. The independent-samples *t*-test was used for comparison of continuous data between two groups; a one-way analysis of variance was used for comparison between multiple groups, and the least significant difference *t*-test or the Games-Howell method was used for further comparison between two groups. **Results** Compared with the blank group, the CS group showed significant gallstone formation, bile turbidity, hepatic steatosis, abnormal gallbladder wall structure, and significant increases in anxiety- and depression-like behaviors based on behavioral tests; significant increases in the level of total cholesterol in bile and the serum levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and low-density lipoprotein and significant reductions in the level of total bile acid (TBA) in bile and the serum levels of CCK and high-density lipoprotein (HDL) (all  $P < 0.05$ ); significant increases in the mRNA expression levels of GLP-1/2 and TGR5 in the intestine and the protein expression levels of GLP-2R and TGR5 in the gallbladder and significant reductions in the mRNA expression levels of GLP-2R and TGR5 in the gallbladder (all  $P < 0.05$ ); significant changes in multiple bile acid components in intestinal contents (all  $P < 0.05$ ). Compared with the CS group, the CS liver depression group had further aggravation of pathological and behavioral manifestations, changes in bile acid composition, significant increases in the protein and mRNA expression levels of TGR5 and GLP-1/2 in the intestine, and significant increases in the protein and mRNA expression levels of TGR5 and GLP-2R in the gallbladder (all  $P < 0.01$ ). Compared with the CS liver depression group, both treatment groups had an improvement in gallbladder morphology, alleviation of stones and liver injury, and recovery of liver function and blood lipid levels, as well as significant reductions in the protein and mRNA expression levels of TGR5 and GLP-1/2 in the intestine and TGR5 and GLP-2R in the gallbladder (all  $P < 0.05$ ); the traditional Chinese medicine group showed significant increases in glycodeoxycholic acid (GDCA), tauro- $\alpha$ -muricholic acid (T- $\alpha$ -MCA), and taurochenodeoxycholic acid (TCDCa) (all  $P < 0.05$ ), while the Western medicine group showed significant increases in taurohyodeoxycholic acid, T- $\alpha$ -MCA, TCDCa, GDCA, and glyoursodeoxycholic acid (all  $P < 0.05$ ). Compared with the Western medicine group, the traditional Chinese medicine group had significantly greater behavioral improvements, significantly higher levels of TBA in bile and serum HDL (both  $P < 0.01$ ), significant reductions in the protein expression levels of TGR5 and GLP-1/2 in the intestine and TGR5 and GLP-2R in the gallbladder, and a significant reduction in the mRNA expression level of TGR5 in the intestine (all  $P < 0.01$ ), as well as a significant increase in taoursodeoxycholic acid and significant reductions in glyoursodeoxycholic acid, taurohyodeoxycholic acid, TCDCa, and tauroolithocholic acid (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Modified Chaihu Shugan Powder can improve liver function and abnormal gallbladder relaxation in CS with liver depression syndrome by regulating the bile acid-TGR5 axis, thereby exerting the therapeutic effect of soothing the liver, resolving depression, moving Qi, and promoting bile flow.

**Key words:** Cholecystolithiasis; Stagnation of Liver Qi; Chai Hu Shu Gan San; Mice, Inbred C57BL

**Research funding:** Fujian Provincial Natural Science Foundation (2025J01934, 2021J01928); Fujian University of Traditional Chinese Medicine University-administered Research Project(X2024033)

随着生活模式及饮食习惯的演变,胆囊胆固醇结石 (cholesterol stone, CS)的发病率呈持续增长态势,已成为消化科临床常见疾病之一<sup>[1]</sup>。CS是胆囊结石中最常见的类型,约占全部病例的80%<sup>[2-3]</sup>。CS的形成是多种因

素相互作用的结果,其中胆固醇过饱和及胆囊动力学异常改变是两大关键环节<sup>[4]</sup>。相关研究报道表明,G蛋白偶联胆汁酸受体1(G protein-coupled bile acid receptor 1, GPBAR1,也称TGR5)及其下游相关因子参与胆汁酸代谢紊乱,其异常可能增加胆固醇结石的形成风险<sup>[5-6]</sup>。研究表明,脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)及其甘氨酸结合物等次级胆汁酸是TGR5的天然激动剂,可通过激活TGR5过表达<sup>[7-9]</sup>,促进其下游肠L细胞释放胰高血糖素样肽-1/2(glucagon-like peptide-1/2, GLP-1/2),尤其是GLP-2。激活胆囊固有层及平滑肌层细胞上的GLP-2受体(GLP-2 receptor, GLP-2R),可使平滑肌细胞中的Ca<sup>2+</sup>浓度降低,促进过度的胆囊舒张与胆汁充盈,抑制进食后的胆囊排空,导致结石形成<sup>[10]</sup>。此外,胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)能够通过激活胆囊平滑肌上的CCK-1受体,发挥刺激胆囊收缩的作用。研究发现,TGR5过表达通过对进食时CCK刺激引发胆囊收缩的拮抗作用,抑制胆囊运动和排空,最终导致结石形成<sup>[11-12]</sup>。胆石症发于胆而因于肝,肝郁证是胆固醇结石产生的重要病机,也是胆石症常见的中医证候之一<sup>[13]</sup>。柴胡疏肝散加减方为治疗胆结石的有效方剂<sup>[14]</sup>。本课题组前期及相关研究表明,柴胡疏肝散加减方及其单味药如柴胡、白芍能够通过增强胆囊收缩功能,促进结石排出,同时减缓患者胁肋腹胀痛、口苦等相关症状<sup>[15-18]</sup>。因此,本研究基于胆汁酸-TGR5轴,从胆囊动力角度研究柴胡疏肝散加减方治疗CS肝郁证小鼠的作用机制,以期CS防治提供实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 选用45只6周龄C57BL/6雄性小鼠,体重(18±2)g[实验动物生产许可证编号:SCXK(京)2019-0008;实验动物使用许可证编号:SYKX(闽)2019-0007;合格证编号:110322231103290958]。

1.2 饲料与药物 高脂致石饲料(南通特洛菲饲料科技有限公司,批号:TP20231024013,型号:TP28900,含15%脂肪、1.25%胆固醇、0.5%胆盐)、普通饲料(含60%碳水化合物、22%蛋白质、10%脂肪、8%纤维)由福建中医药大学实验动物中心提供。柴胡疏肝散加减方参照《(急、慢性)胆囊炎、胆石症中医诊疗专家共识(2023)》<sup>[19]</sup>配制:柴胡15g、白芍30g、枳壳10g、香附9g、川芎9g、陈皮9g、金钱草15g和炙甘草6g,药材纯水浸泡30min后煎煮2次,将药液混匀并浓缩至生药量1.06g/mL<sup>[20]</sup>。熊去氧胆酸胶囊(进口药品注册证号:H20181059,批号:L20182A):用超纯水将胶囊内容物完全溶解至浓度为2.5mg/mL的溶液<sup>[21]</sup>。

1.3 主要试剂与仪器 小鼠总胆固醇(total cholesterol, TC)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)ELISA检测试剂盒(批号:E24028956RNAex、E24029963);丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)测定试剂盒(批号:20231127、20230926、20230904、20231007);柱式法RNA提取试剂、Evo M-MLV反转录预混型试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Green Pro Taq HS(批号:A6A2227、A6A1505、A6A1103);GLP-1/2、TGR5(英国Abcam plc公司,批号:ab200474、ab72608);GLP-2R、 $\beta$ -tubulin、兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:00017777、23002777、20001097);生物组织包埋机、石蜡切片机(德国Leica Biosystems公司,型号:EG1150H、RM2245);体视显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司,型号:SZ66);实时荧光定量聚合酶链反应仪、基因扩增仪(美国Applied Biosystems公司,型号:QuantStudio6 Flex, Veriti);化学发光凝胶成像(美国Bio-rad Laboratories公司,型号:ChemiDocTMXRS+)。

1.4 分组、造模及干预方法 将45只雄性C57BL/6小鼠按体重随机分层分组法分成空白组( $n=6$ )与CS造模组( $n=39$ )。空白组普通饲料喂养;CS造模组高脂致石饲料喂养,8周CS造模后随机取3只小鼠查看胆囊结石情况。成功构建CS模型后,将造模组小鼠再次随机分为CS组、CS肝郁组、中药组(柴胡疏肝散加减方)和西药组(熊去氧胆酸),每组9只。除CS组外,其余3组采用慢性不可预知轻度应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)建立CS肝郁证模型<sup>[22]</sup>,为期21天。本实验CUMS应激包括:10min悬尾、10min热刺激、10min夹尾,2~5h锯末移除、12h45°鼠笼倾斜、24h湿垫料、24h禁食禁水。每天随机选择1种应激,且同一应激不能连续2天使用。在肝郁证造模期间,观察并记录小鼠的一般状况和体重。CUMS构建前后进行行为学测试,包括旷场实验、强迫游泳实验、悬尾实验和糖水实验,用以评估肝郁证模型是否构建成功<sup>[23]</sup>。

## 1.5 检测指标及方法

1.5.1 一般情况及模型评估 造模期间内,每周固定时间记录小鼠体重(禁食禁水后48h内不测量),CUMS期间观察并记录小鼠行为活动、大小便及精神状况等一般情况。记录小鼠CUMS造模前后行为学实验指标,包括旷场实验中移动总距离和中心停留时间,强迫游泳实验、悬尾实验中不动时间,以及糖水偏好实验中糖水消耗率。

1.5.2 结石观察及指标检测 胆囊于体视镜下拍照观察结石情况,胆汁引流于200  $\mu$ L离心管,根据ELISA试剂盒说明书,检测血清CCK、ALT、AST、HDL和LDL,以及胆汁TC、TBA含量。

1.5.3 苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin staining, HE染色)观察小鼠肝脏、胆囊组织形态学 肝脏和胆囊组织经固定、冲水后进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明,浸蜡包埋,石蜡切片约4  $\mu$ m,再脱蜡、水化,苏木精染色3 min,伊红染色3 min,二次乙醇梯度脱水、二甲苯透明,最后封片于显微镜下观察组织病理变化。

1.5.4 肠TGR5、GLP-1/2、胆囊TGR5和GLP-2R的mRNA表达 采用逆转录定量聚合酶链反应(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)法检测,将胆囊组织进行RNA提取、逆转录后进行PCR扩增。引物由福州瑞真生物技术有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度(bp)
GAPDH		
F	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'	151
R	5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'	
GLP-1/2		
F	5'-CCAGAAGAAGTCGCCATTGCC-3'	118
R	5'-TCAGCCAGTTGATGAAGTCCCT-3'	
GLP-2R		
F	5'-TCTTCTGTTCCTTCGAAAAGTGC-3'	190
R	5'-GAGCGCAGGAGGCAGAAAT-3'	
TGR5		
F	5'-TTATGGCCTCCTGTTGCCTG-3'	135
R	5'-GCCAGGGTTGAGGGTACATC-3'	

注:GAPDH,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,本实验所选内参基因;GLP-1/2,胰高血糖素样肽-1/2;GLP-2R,胰高血糖素样肽-2受体;TGR5,G蛋白偶联胆汁酸受体1。

1.5.5 肠TGR5、GLP-1/2、胆囊TGR5和GLP-2R的蛋白表达 采用Western Blot检测,提取胆囊组织总蛋白后采用二喹啉甲酸法进行浓度测定,配置凝胶,经上样、电泳、转膜后转移到聚偏二氟乙烯膜上;5%脱脂奶粉封闭及一、二抗分别孵育结束后进行化学发光成像曝光条带,使用Imagelab软件分析灰度值并计算。

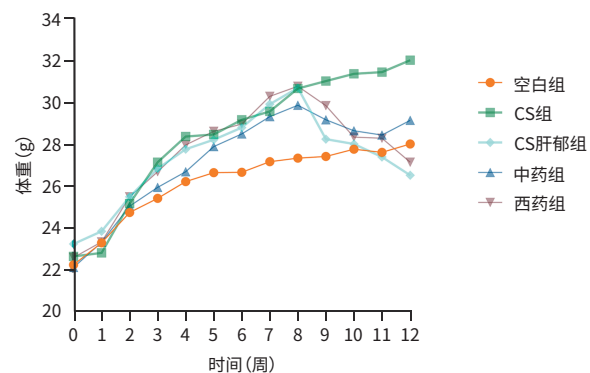
1.5.6 肠内容物胆汁酸定量检测 采集小鼠肠内容物样本进行靶标胆汁酸代谢组学研究。

1.6 统计学方法 使用GraphPad Prism和SPSS 25.00软

件分析数据与作图。数据分析时,分组样本量可能因“替代-减少-优化”原则、中途死亡、技术受限和质量问题而发生调整。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用成组 $t$ 检验。多组间比较采用单因素方差分析;进一步两两比较时,方差齐用LSD- $t$ 法,方差不齐用Games-Howell法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组小鼠体重比较 在CUMS造模前,与空白组相比,余4组小鼠体重均显著升高( $P$ 值均 $< 0.01$ )。在CUMS造模期间,空白组和CS组小鼠表现活跃,喜攀爬,对外界刺激反应迅速,抓取时反抗明显;CS肝郁组小鼠表现为淡漠懒动、反应迟钝、活动缓慢,抓取时放弃挣扎抵抗等行为。造模后,与空白组相比,CS组小鼠体重、肝重和肝脏系数均显著升高( $P$ 值均 $< 0.01$ );与CS组相比,CS肝郁组小鼠体重显著下降( $P < 0.01$ ),肝重与肝脏系数均显著上升( $P$ 值均 $< 0.01$ );与CS肝郁组相比,中药组和西药组小鼠体重显著上升( $P$ 值均 $< 0.01$ ),肝重、肝脏系数均显著减小( $P$ 值均 $< 0.01$ );与中药组相比,西药组小鼠体重显著降低( $P < 0.05$ ),肝重、肝脏系数显著升高( $P$ 值均 $< 0.05$ )(图1,表2)。



注:CS,胆固醇结石。

图1 各组小鼠体重变化趋势

Figure 1 Weight change trend of mice in each group

2.2 各组小鼠造模前后行为学实验结果比较

2.2.1 旷场实验 CUMS造模前,各组小鼠旷场实验移动总距离和中心停留时间差异均无统计学意义( $P$ 值均 $> 0.05$ )。造模后,与空白组相比,CS组移动总距离和中心停留时间均显著降低( $P$ 值均 $< 0.01$ );与CS组相比,CS肝郁组移动总距离和中心停留时间进一步降低( $P$ 值均 $< 0.01$ );与CS肝郁组相比,中药组的移动总距离和中心停留时间均显著增加( $P$ 值均 $< 0.05$ );与中药组相比,西药组的移动总距离显著降低( $P < 0.01$ )(表3)。

表2 各组小鼠肝郁造模前后体重、肝重及肝脏系数变化

Table 2 Body weight, liver weight and liver coefficient of mice in each group before and after liver depression modeling

组别	动物数(只)	造模前体重(g)	造模后		
			体重(g)	肝重(g)	肝脏系数(%)
空白组	6	27.35 ± 0.75	28.01 ± 0.35	1.27 ± 0.06	44.55 ± 2.12
CS组	9	30.68 ± 0.68 <sup>1)</sup>	32.14 ± 0.68 <sup>1)</sup>	1.89 ± 0.06 <sup>1)</sup>	61.12 ± 1.50 <sup>1)</sup>
CS肝郁组	9	30.72 ± 0.40 <sup>1)</sup>	26.13 ± 0.65 <sup>2)</sup>	2.10 ± 0.05 <sup>2)</sup>	78.52 ± 2.93 <sup>2)</sup>
中药组	9	29.87 ± 0.12 <sup>1)</sup>	29.11 ± 0.97 <sup>3)</sup>	1.77 ± 0.10 <sup>3)</sup>	62.80 ± 2.51 <sup>3)</sup>
西药组	9	30.77 ± 0.62 <sup>1)</sup>	27.11 ± 1.10 <sup>3)4)</sup>	1.85 ± 0.08 <sup>3)4)</sup>	67.94 ± 3.53 <sup>3)4)</sup>
F值		47.21	89.39	120.70	156.53
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组相比,1)P<0.01;与CS组相比,2)P<0.01;与CS肝郁组相比,3)P<0.01;与中药组相比,4)P<0.05。CS,胆固醇结石。肝脏系数=肝重/体重×100%。

表3 各组小鼠旷场实验

Table 3 Open field test of mice in each group

组别	动物数(只)	移动总距离(mm)		中心停留时间(s)	
		造模前	造模后	造模前	造模后
		空白组	4	17 015.81 ± 400.57	18 122.23 ± 1 450.42
CS组	4	15 913.23 ± 2 018.68	15 734.50 ± 1 381.68 <sup>1)</sup>	40.25 ± 2.88	31.61 ± 7.40 <sup>1)</sup>
CS肝郁组	4	15 154.36 ± 1 453.04	8 930.80 ± 807.28 <sup>2)</sup>	40.90 ± 11.27	18.08 ± 5.68 <sup>2)</sup>
中药组	4	16 156.59 ± 939.05	13 356.06 ± 547.00 <sup>3)</sup>	36.01 ± 7.34	29.16 ± 3.57 <sup>3)</sup>
西药组	4	15 610.81 ± 1 458.77	9 399.90 ± 992.70 <sup>4)</sup>	35.03 ± 8.07	23.99 ± 4.63
F值		1.029	53.202	0.883	11.684
P值		0.424	<0.001	0.497	<0.001

注:与空白组相比,1)P<0.01;与CS组相比,2)P<0.01;与CS肝郁组相比,3)P<0.05;与中药组相比,4)P<0.01。CS,胆固醇结石。

2.2.2 强迫游泳实验 CUMS造模前,各组小鼠强迫游泳实验不动时间差异无统计学意义(P>0.05)。CUMS造模后,与CS组相比,CS肝郁组不动时间显著增加(P<0.05);与CS肝郁组相比,中药组不动时间显著减少(P<0.05)(表4)。

表4 各组小鼠强迫游泳实验不动时间

Table 4 Immobility time of forced swimming test in mice of each group

组别	动物数(只)	造模前(s)	造模后(s)
空白组	4	45.71 ± 7.65	63.46 ± 5.83
CS组	4	40.39 ± 9.47	78.02 ± 23.01
CS肝郁组	4	38.09 ± 6.44	105.15 ± 6.09 <sup>1)</sup>
中药组	4	43.46 ± 9.02	75.76 ± 8.51 <sup>2)</sup>
西药组	4	46.35 ± 9.70	89.42 ± 18.31
F值		0.678	4.902
P值		0.617	0.010

注:与CS组相比,1)P<0.05;与CS肝郁组相比,2)P<0.05。

2.2.3 悬尾实验 CUMS造模前,各组小鼠悬尾不动时间差异无统计学意义(P>0.05)。CUMS造模后,与CS组相比,CS肝郁组悬尾不动时间显著增加(P<0.01);与CS肝郁组相比,中药组和西药组小鼠悬尾不动时间均显著减少(P值均<0.01)(表5)。

表5 各组小鼠悬尾实验不动时间

Table 5 Immobility time of tail suspension test in each group of mice

组别	动物数(只)	造模前(s)	造模后(s)
空白组	4	86.75 ± 25.57	90.59 ± 19.33
CS组	4	100.86 ± 4.51	100.68 ± 27.50
CS肝郁组	4	94.96 ± 25.90	157.17 ± 22.98 <sup>1)</sup>
中药组	4	86.33 ± 17.67	100.02 ± 5.87 <sup>2)</sup>
西药组	4	92.97 ± 8.87	105.65 ± 28.52 <sup>2)</sup>
F值		0.424	5.594
P值		0.789	0.006

注:与CS组相比,1)P<0.01;与CS肝郁组相比,2)P<0.01。

2.2.4 糖水偏好实验 CUMS造模前,各组小鼠糖水消耗率差异无统计学意义(P>0.05)。CUMS造模后,与CS组相比,CS肝郁组糖水消耗率显著减少(P<0.01);与CS肝郁组相比,中药组糖水消耗率显著增加(P<0.01);与中药组相比,西药组糖水消耗率显著减少(P<0.01)(表6)。

2.3 各组小鼠胆囊结石情况 CUMS造模后,体视镜下观察结石情况。空白组胆囊形态正常,胆汁清透呈黄绿色;CS组胆囊见颗粒样圆形晶体,胆汁浑浊;CS肝郁组胆囊体积明显胀大,结石样晶体更为明显;两用药组胆囊体积缩小,结石晶体改善,其中中药组较西药组胆囊回缩更为明显且胆汁清透(图2)。

表6 各组小鼠糖水实验糖水消耗率  
Table 6 Sugar water consumption rate of mice in each group

组别	动物数(只)	造模前(%)	造模后(%)
空白组	4	57.43 ± 2.43	59.46 ± 4.79
CS组	4	53.15 ± 9.73	54.60 ± 1.11
CS肝郁组	4	55.79 ± 2.54	39.09 ± 4.32 <sup>1)</sup>
中药组	4	57.20 ± 7.68	56.75 ± 3.38 <sup>2)</sup>
西药组	4	56.64 ± 4.33	44.64 ± 10.11 <sup>3)</sup>
F值		0.327	9.574
P值		0.856	<0.001

注:与CS组相比,1) $P < 0.01$ ;与CS肝郁组相比,2) $P < 0.01$ ;与中药组相比,3) $P < 0.01$ 。CS,胆固醇结石。

## 2.4 各组小鼠指标比较

2.4.1 胆汁TC、TBA及血清CCK 与空白组相比,CS组TC含量显著增高,TBA与CCK含量显著降低( $P$ 值均 $< 0.01$ );与CS组相比,CS肝郁组TC含量显著增高,TBA与CCK含量显著降低( $P$ 值均 $< 0.05$ );与CS肝郁组相比,中药组和西药组TC显著降低,TBA显著增高( $P$ 值均 $< 0.01$ );与中药组相比,西药组TBA含量显著下降( $P < 0.01$ )(表7)。

2.4.2 血清ALT、AST、HDL、LDL 与空白组相比,CS组ALT、LDL和AST含量显著增高( $P$ 值均 $< 0.05$ ),HDL含量显著降低( $P < 0.05$ );与CS组相比,CS肝郁组LDL含量显著增高( $P < 0.05$ ),HDL含量显著降低( $P < 0.05$ );与CS肝郁组相比,中药组小鼠ALT、AST和LDL含量显著降低( $P$ 值均 $< 0.05$ ),HDL含量显著增高( $P < 0.05$ ),西药组AST、LDL含量显著降低( $P$ 值均 $< 0.05$ );与中药组相比,西药组HDL含量显著降低( $P < 0.01$ )(表8)。

2.5 各组小鼠肝脏、胆囊组织形态变化比较 肝组织:空白组小鼠肝细胞排列整齐;CS组肝细胞排列紊乱、错杂,细胞质疏松,脂肪浸润,细胞大小不等;CS肝郁组肝细胞脂肪变性,肿胀,细胞质中易见脂肪空泡;与CS肝郁组相比,中药组与西药组小鼠肝脏脂肪样变性、细胞质空泡化均有不同程度的改善,细胞结构清

晰。胆囊组织:与空白组相比,CS组胆囊皱襞缩短、分支减少;与CS组相比,CS肝郁组胆囊肌层增厚、表面毛糙,皱襞矮小且增粗、分支稀少;与CS肝郁组相比,两用药组胆囊肌层回缩,胆囊皱襞的病理改变有所改善(图3)。

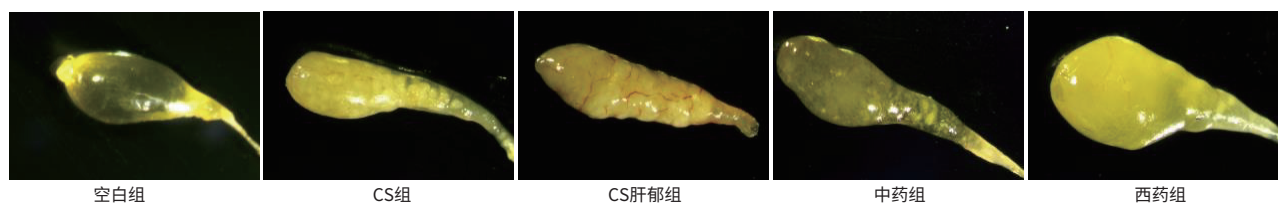
2.6 各组小鼠肠GLP-1/2、TGR5及胆囊GLP-2R、TGR5的mRNA水平比较 与空白组相比,CS组肠GLP-1/2、TGR5的mRNA表达显著升高( $P$ 值均 $< 0.05$ ),胆囊GLP-2R、TGR5的mRNA表达显著降低( $P$ 值均 $< 0.05$ )。与CS组相比,CS肝郁组肠GLP-1/2、TGR5及胆囊GLP-2R、TGR5的mRNA表达显著升高( $P$ 值均 $< 0.01$ )。与CS肝郁组相比,中药组和西药组肠GLP-1/2、TGR5及胆囊GLP-2R、TGR5的mRNA表达显著降低( $P$ 值均 $< 0.05$ )。与中药组相比,西药组肠TGR5的mRNA表达显著升高( $P < 0.01$ )(表9)。

2.7 各组小鼠肠TGR5、GLP-1/2及胆囊TGR5、GLP-2R的蛋白水平比较 与空白组相比,CS组肠GLP-1/2、TGR5与胆囊GLP-2R、TGR5的蛋白相对表达量均显著升高( $P$ 值均 $< 0.01$ );与CS组相比,CS肝郁组肠GLP-1/2、TGR5与胆囊GLP-2R、TGR5的蛋白相对表达量均显著升高( $P$ 值均 $< 0.01$ );与CS肝郁组相比,两用药组肠GLP-1/2、TGR5与胆囊GLP-2R、TGR5的蛋白相对表达量均显著降低( $P$ 值均 $< 0.01$ );与中药组相比,西药组小鼠GLP-1/2、TGR5与胆囊GLP-2R、TGR5的蛋白相对表达量显著升高( $P$ 值均 $< 0.01$ )(表10,图4)。

## 2.8 各组小鼠肠内容物胆汁酸代谢物定量结果

采用超高效液相色谱-平行反应监测-串联质谱联用技术,针对25只小鼠肠内容物样品中的70种胆汁酸类目标化合物进行检测分析,共计检出63种胆汁酸类化合物。

2.8.1 胆汁酸代谢偏最小二乘判别分析与组间正交偏最小二乘判别分析 偏最小二乘判别分析结果显示, $Q^2$ 回归线与Y纵轴的截距为 $-0.196 < 0$ ,表明模型稳健可靠,未发生过拟合。模型拟合良好,可预测性强,适合后续数据分析(图5)。正交偏最小二乘判别分析分析结果显



注:CS,胆固醇结石。

图2 肝郁气滞证造模后各组小鼠CS情况

Figure 2 Gallbladder stones in each group of mice after liver depression and qi stagnation syndrome modeling

示,空白组、CS组、CS肝郁组、中药组和西药组的 $Q^2$ 回归线截距分别为-0.28、-0.01、-0.21、-0.20和-0.18,均 $<0$ ,模

表7 各组小鼠胆汁TC、TBA及血清CCK含量

Table 7 Content of TC and TBA in bile and CCK in serum of mice in each group

组别	动物数(只)	TC(mmol/L)	TBA( $\mu$ mol/L)	CCK(pg/mL)
空白组	4	2.10 $\pm$ 0.25	17.05 $\pm$ 0.79	313.00 $\pm$ 6.14
CS组	4	3.12 $\pm$ 0.35 <sup>1)</sup>	12.47 $\pm$ 0.53 <sup>1)</sup>	251.07 $\pm$ 6.98 <sup>1)</sup>
CS肝郁组	4	4.34 $\pm$ 0.35 <sup>2)</sup>	10.50 $\pm$ 1.00 <sup>2)</sup>	174.13 $\pm$ 23.54 <sup>2)</sup>
中药组	4	3.33 $\pm$ 0.14 <sup>3)</sup>	14.76 $\pm$ 0.88 <sup>3)</sup>	229.72 $\pm$ 6.13
西药组	4	3.57 $\pm$ 0.14 <sup>3)</sup>	12.76 $\pm$ 0.73 <sup>3)4)</sup>	198.46 $\pm$ 33.02
F值		46.752	48.327	32.220
P值		$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$

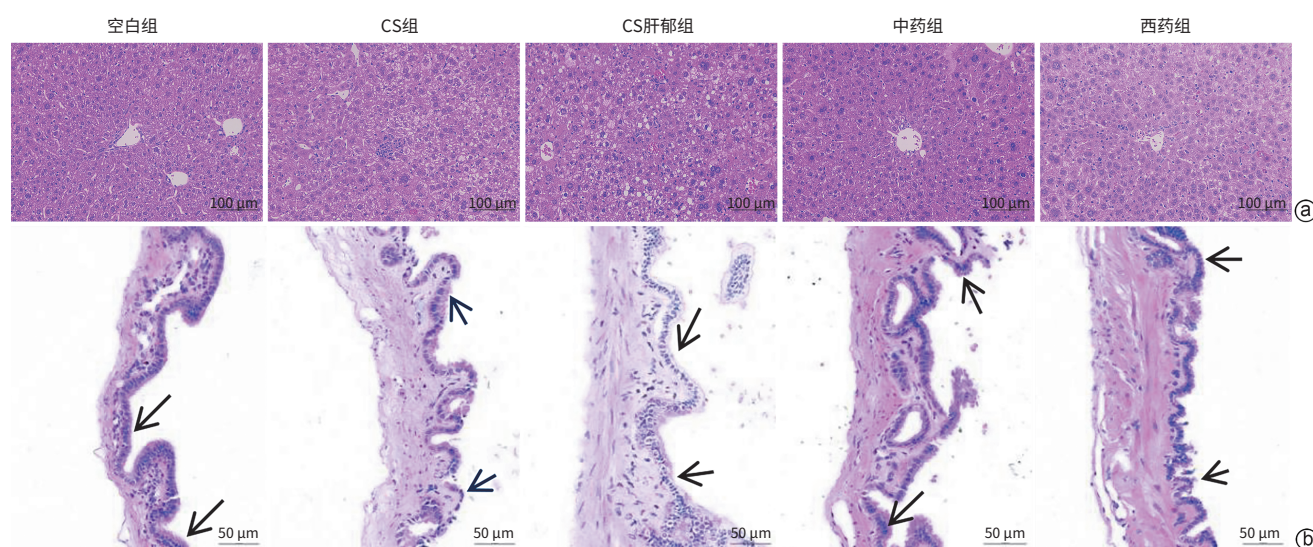
注:与空白组相比,1) $P<0.01$ ;与CS组相比,2) $P<0.05$ ;与CS肝郁组相比,3) $P<0.01$ ;与中药组相比,4) $P<0.01$ 。TC,总胆固醇;TBA,总胆汁酸;CCK,胆囊收缩素;CS,胆固醇结石。

表8 各组小鼠血清ALT、AST、HDL和LDL含量

Table 8 Serum ALT, AST, HDL and LDL levels in each group of mice

组别	动物数(只)	ALT(U/L)	AST(U/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)
空白组	5	64.23 $\pm$ 9.20	109.13 $\pm$ 9.55	1.86 $\pm$ 0.23	0.35 $\pm$ 0.04
CS组	5	194.28 $\pm$ 33.58 <sup>1)</sup>	211.23 $\pm$ 38.59 <sup>1)</sup>	1.47 $\pm$ 0.21 <sup>1)</sup>	1.44 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>
CS肝郁组	5	249.22 $\pm$ 51.48	270.80 $\pm$ 25.78	1.02 $\pm$ 0.26 <sup>2)</sup>	1.91 $\pm$ 0.35 <sup>2)</sup>
中药组	5	120.21 $\pm$ 27.93 <sup>3)</sup>	204.82 $\pm$ 15.40 <sup>3)</sup>	1.70 $\pm$ 0.17 <sup>3)</sup>	1.20 $\pm$ 0.13 <sup>3)</sup>
西药组	5	172.49 $\pm$ 14.44	183.02 $\pm$ 17.28 <sup>3)</sup>	1.16 $\pm$ 0.35 <sup>4)</sup>	1.35 $\pm$ 0.24 <sup>3)</sup>
F值		25.825	30.606	9.931	37.601
P值		$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$

注:与空白组相比,1) $P<0.05$ ;与CS组相比,2) $P<0.05$ ;与CS肝郁组相比,3) $P<0.05$ ;与中药组相比,4) $P<0.01$ 。ALT,丙氨酸氨基转移酶;AST,天冬氨酸氨基转移酶;HDL,高密度脂蛋白;LDL,低密度脂蛋白;CS,胆固醇结石。



注:a,肝组织。b,胆囊组织;箭头处为胆囊壁平滑肌。CS,胆固醇结石。

图3 各组小鼠肝脏和胆囊组织形态(HE染色,  $\times 200$ )

Figure 3 Morphology of liver and gallbladder tissue of mice in each group (HE staining,  $\times 200$ )

型未发生过拟合,可准确描述数据(图6)。

2.8.2 差异代谢物定量分析 图7结果显示,与空白组相比,CS组牛磺脱氧胆酸、甘氨酸胆酸(glycocholic acid, GCA)、DCA、甘氨酸脱氧胆酸(glycodeoxycholic acid, GDCA)和3-脱氢胆酸显著上调( $P$ 值均 $<0.05$ ); $\beta$ -鼠胆酸显著下调( $P<0.05$ )。与CS组相比,CS肝郁组GDCA显著下调( $P<0.05$ )。与CS肝郁组相比,两用药组DCA均呈下调趋势;中药组GCA、牛磺 $\beta$ -鼠胆酸呈上调趋势,GDCA、牛磺 $\alpha$ -鼠胆酸(tauro- $\alpha$ -muricholic acid, T- $\alpha$ -MCA)和牛磺鹅脱氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)显著上调( $P$ 值均 $<0.05$ );西药组牛磺猪脱氧胆酸、T- $\alpha$ -MCA、TCDCA、GDCA和甘氨酸熊脱氧胆酸显著上调( $P$ 值均 $<0.05$ )。与中药组相比,西药组牛磺熊脱氧胆酸显著下调( $P<0.05$ );甘氨酸熊脱氧胆酸、牛磺猪脱氧胆酸、TCDCA、牛磺石胆酸显著上调( $P$ 值均 $<0.05$ )。

表9 各组小鼠肠GLP-1/2、TGR5与胆囊GLP-2R、TGR5的mRNA相对表达量

Table 9 Relative mRNA expression of intestinal GLP1/2, TGR5 and gallbladder GLP2R, TGR5 in each group of mice

组别	动物数(只)	肠 GLP-1/2	肠 TGR5	胆 GLP-2R	胆 TGR5
空白组	3	1.00 ± 0.03	0.97 ± 0.05	0.99 ± 0.07	1.01 ± 0.04
CS组	3	2.66 ± 0.06 <sup>1)</sup>	1.21 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.77 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.84 ± 0.10 <sup>1)</sup>
CS肝郁组	3	5.39 ± 0.29 <sup>2)</sup>	2.29 ± 0.13 <sup>2)</sup>	1.32 ± 0.18 <sup>2)</sup>	1.28 ± 0.11 <sup>2)</sup>
中药组	3	3.16 ± 0.17 <sup>3)</sup>	1.22 ± 0.16 <sup>3)</sup>	0.94 ± 0.08 <sup>3)</sup>	0.87 ± 0.07 <sup>3)</sup>
西药组	3	3.57 ± 0.60 <sup>3)</sup>	1.59 ± 0.03 <sup>3)4)</sup>	0.93 ± 0.08 <sup>3)</sup>	0.89 ± 0.06 <sup>3)</sup>
F值		105.225	111.967	16.664	19.635
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

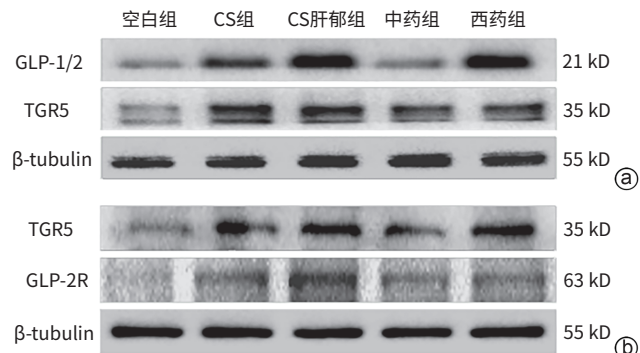
注:与空白组相比,1)P<0.05;与CS组相比,2)P<0.01;与CS肝郁组相比,3)P<0.05;与中药组相比,4)P<0.01。GLP-1/2,胰高血糖素样肽-1/2;TGR5,G蛋白偶联胆酸受体1;GLP-2R,胰高血糖素样肽-2受体;CS,胆固醇结石。

表10 各组小鼠肠GLP-1/2、TGR5与胆囊GLP-2R、TGR5的蛋白相对表达量

Table 10 The relative protein expression of intestinal GLP-1/2, TGR5 and gallbladder GLP-2R, TGR5 in each group of mice

组别	动物数(只)	肠 GLP-1/2	肠 TGR5	胆 GLP-2R	胆 TGR5
空白组	3	0.25 ± 0.01	0.47 ± 0.07	0.63 ± 0.05	0.37 ± 0.03
CS组	3	0.50 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.66 ± 0.05 <sup>1)</sup>	1.03 ± 0.11 <sup>1)</sup>	0.65 ± 0.03 <sup>1)</sup>
CS肝郁组	3	0.74 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.94 ± 0.02 <sup>2)</sup>	1.49 ± 0.05 <sup>2)</sup>	1.07 ± 0.04 <sup>2)</sup>
中药组	3	0.43 ± 0.02 <sup>3)</sup>	0.67 ± 0.05 <sup>3)</sup>	1.04 ± 0.03 <sup>3)</sup>	0.62 ± 0.04 <sup>3)</sup>
西药组	3	0.54 ± 0.04 <sup>3)4)</sup>	0.80 ± 0.03 <sup>3)4)</sup>	1.28 ± 0.09 <sup>3)4)</sup>	0.76 ± 0.07 <sup>3)4)</sup>
F值		120.580	41.464	63.365	106.892
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组相比,1)P<0.01;与CS组相比,2)P<0.01;与CS肝郁组相比,3)P<0.01;与中药组相比,4)P<0.01。GLP-1/2,胰高血糖素样肽-1/2;TGR5,G蛋白偶联胆酸受体1;GLP-2R,胰高血糖素样肽-2受体;CS,胆固醇结石。



注:a,肠;b,胆囊。CS,胆固醇结石;GLP-1/2,胰高血糖素样肽-1/2;TGR5,G蛋白偶联胆酸受体1;GLP-2R,胰高血糖素样肽-2受体。

图4 各组小鼠肠和胆囊蛋白表达情况

Figure 4 Protein expression of GLP-1/2 and TGR5 in intestine of mice

### 3 讨论

课题组前期以及多项研究证实,胆汁酸的肠肝循环代谢主要依赖于法尼醇X受体和TGR5两条关键通路<sup>[21,24-27]</sup>。其中,TGR5作为一种膜型胆酸受体,在调节胆囊运动方面发挥重要作用<sup>[9]</sup>。TGR5调控胆囊舒张

主要通过两条途径实现:在次级胆汁酸激活作用下,TGR5促进肠L细胞释放GLP-1/2尤其是GLP-2,进而激活胆囊固有层及平滑肌层细胞受体GLP-2R,降低平滑肌细胞中钙离子浓度,从而促进过度的胆囊舒张与胆汁充盈,抑制进食后胆囊排空<sup>[10,28-30]</sup>。Bidault-Jourdainne等<sup>[31]</sup>研究发现,TGR5过表达小鼠胆囊较重且体积大,TGR5激动剂对肝脏初级与次级胆汁酸的比值具有调节作用,表明胆汁酸-TGR5轴的存在可能对胆囊充盈扩张产生影响。本研究发现,CS组小鼠肠组织中GLP-1/2、TGR5与胆囊GLP-2R、TGR5的蛋白表达升高,此结果可能受本次实验中CS组游离胆汁酸上调激动作用影响,TGR5被其激活后,促进GLP-1/2及平滑肌层细胞GLP-2R活化,介导胆囊过度舒张,并抑制胆囊排空促使结石产生。

中医学认为,肝气郁结、胆腑郁滞、胆汁瘀滞为胆石症的重要病机,其中气滞为核心病机。胆石症临床表现多因情绪变化而加重。“肝主疏泄”,情志不畅易致肝气郁结,胆附于肝,胆汁的排泄依赖于肝的疏泄功能,疏泄失职而致胆汁排泄不畅,胆腑郁滞,形成胁痛或胆胀。如

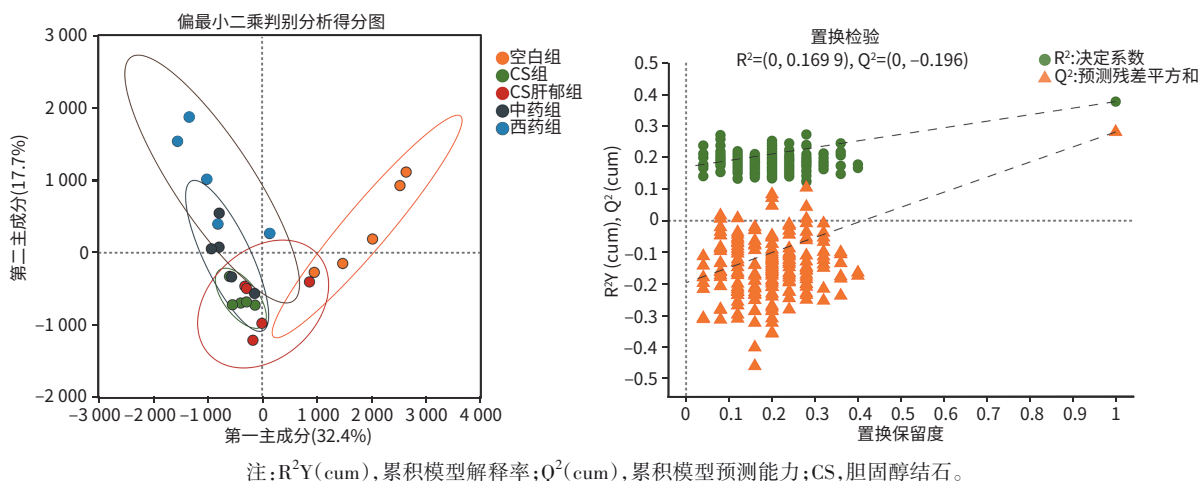


图5 偏最小二乘判别分析得分图与置换检验

Figure 5 PLS-DA analysis scores chart and permutation test

《灵枢·百病始生》篇所言：“若内伤于忧怒，则气上逆……而积皆成矣。”明确情志内伤会导致气机逆乱，进而形成积聚，与肝郁证病理机制相符。且本研究发现，经肝郁证造模的小鼠比未经肝郁证造模的小鼠胆囊结石晶体更为明显，肠组织中GLP-1/2、TGR5与胆囊GLP-2R、TGR5的mRNA和蛋白表达显著增高，也提示肝郁对CS模型中胆汁酸-TGR5轴的加重作用。

肝郁证作为胆石症的常见证型之一<sup>[32-33]</sup>，其基本治法为疏肝利胆。柴胡疏肝散出自《景岳全书》，乃疏肝解郁，行气止痛的代表方，现代药理学机制也阐明柴胡疏肝散加减方为疏肝利胆，治疗胆结石之效方<sup>[14]</sup>。本研究所选用的柴胡疏肝散加减方为《(急、慢性)胆囊炎、胆石症中医诊疗专家共识(2023)》<sup>[19]</sup>中胆石症肝郁气滞证推荐方。该方以柴胡为君，疏肝解郁，柴胡皂苷作为柴胡中的有效成分具有显著抗抑郁、抗炎和护肝效能，且临证不良反应极小；香附与川芎活血行气，陈皮、枳壳、芍药和甘草4种药物共佐，理气行滞、调和气血、缓解疼痛；陈皮、香附主含挥发油能调节平滑肌的收缩与松弛，且具有促进胆汁分泌及护肝的作用；此外，较原方酌加金钱草，归肝胆经，取其清热退黄、利胆排石之效，与柴胡配伍使用，有增强疏肝利胆的作用，对于肝气郁滞引起的胁肋疼痛、胸闷等症状有较好的改善作用；甘草为使，调和诸药。相关研究也证明，柴胡疏肝散能够缓解动物在CUMS及慢性束缚应激等不同方法制备抑郁模型中的行为学表现<sup>[34-35]</sup>。

“以方测证”是一种基于“方证相应”理念发展而来的中医诊断病症的方法<sup>[36]</sup>。本研究采用“高脂饲料+CUMS”法成功建立CS肝郁证小鼠模型，其表现出体重下降、行为学异常及肝胆组织病理改变，符合肝郁证候特点，且柴胡

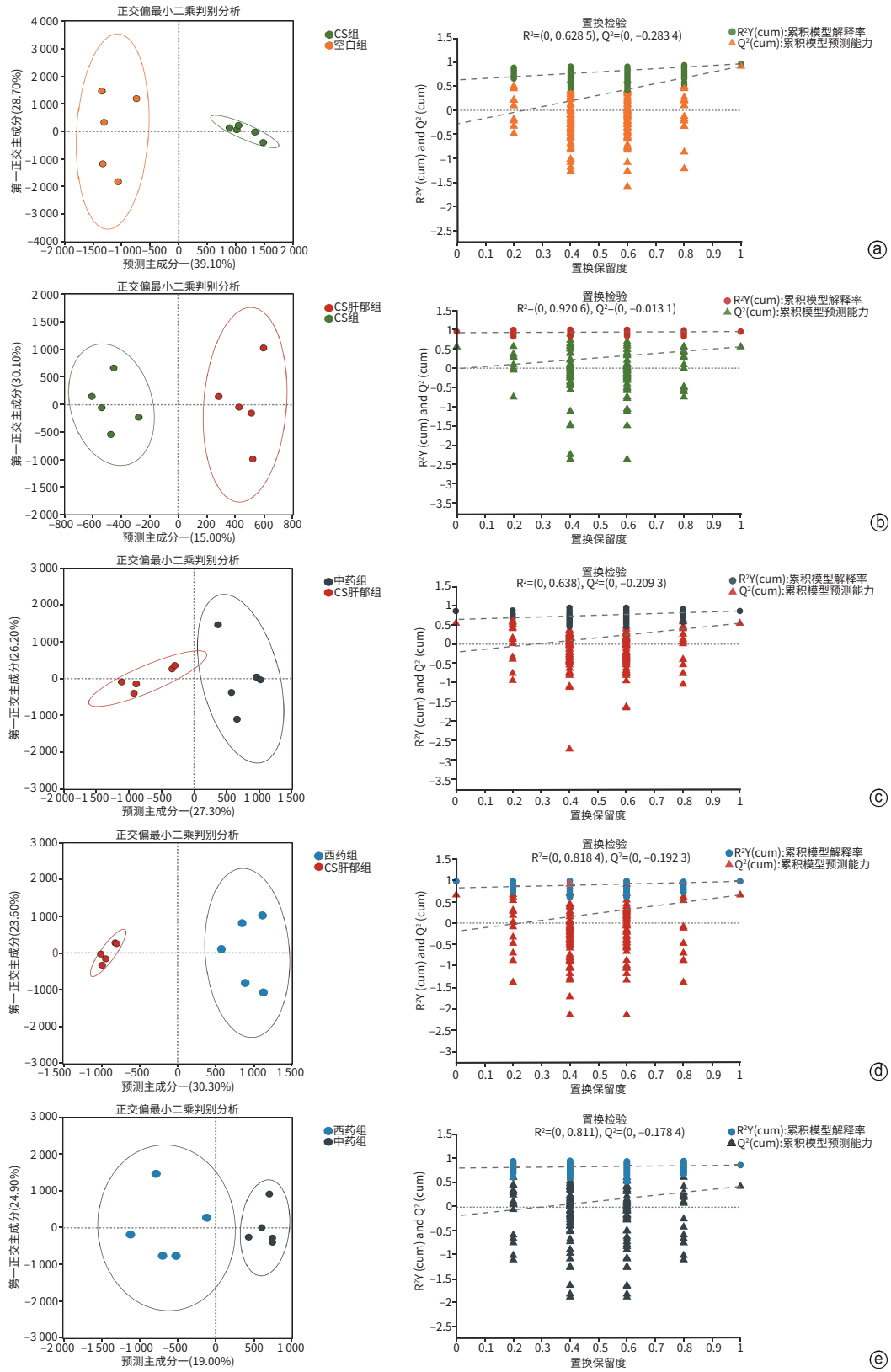
疏肝散加减方干预后可改善上述表现，尤其在行为恢复和胆囊回缩方面优于西药组，验证了该方的治疗优势。

胆汁酸代谢与肝密切相关<sup>[37]</sup>，中医学认为胆汁为肝之余气积聚而成，胆附于肝，胆汁泌泄受肝疏泄功能的调节，柴胡疏肝散加减方在此过程中发挥调节作用<sup>[38]</sup>。本研究的胆汁酸差异代谢物定量显示，中药组较之CS肝郁组DCA呈下调趋势，GCA、T- $\alpha$ -MCA、TCDCA显著上调。研究表明，DCA对胆汁酸代谢途径相关因子法尼醇X受体和TGR5具有激动作用<sup>[39]</sup>。中药组DCA水平下调表明，胆汁酸对其下游代谢与胆囊动力相关因子激动作用减弱。高胆固醇饮食致肝脏胆固醇和胆汁中胆固醇均逐渐增加而胆汁GCA逐渐减少，提示柴胡疏肝散加减方可能通过上调GCA发挥其促进胆汁分泌、溶解和排泄胆固醇、防止胆固醇在胆汁中过饱和的作用<sup>[40]</sup>。另外，两用药组小鼠肠组织中GLP-1/2、TGR5与胆囊GLP-2R、TGR5的mRNA和蛋白表达显著降低，且中药组相较西药组表达降低，表明柴胡疏肝散加减方对肝郁加重的胆汁酸-TGR5轴诱发胆囊舒张相关因子过度表达具有改善作用。

综上所述，胆汁酸-TGR5轴及其相关因子异常表达引发胆囊过度舒张可能是CS肝郁证的分子生物学机制，柴胡疏肝散加减方可能通过调节CS肝郁证小鼠胆汁酸-TGR5轴相关因子的异常表达，恢复胆囊收缩功能，进而发挥疏肝利胆排石的作用。

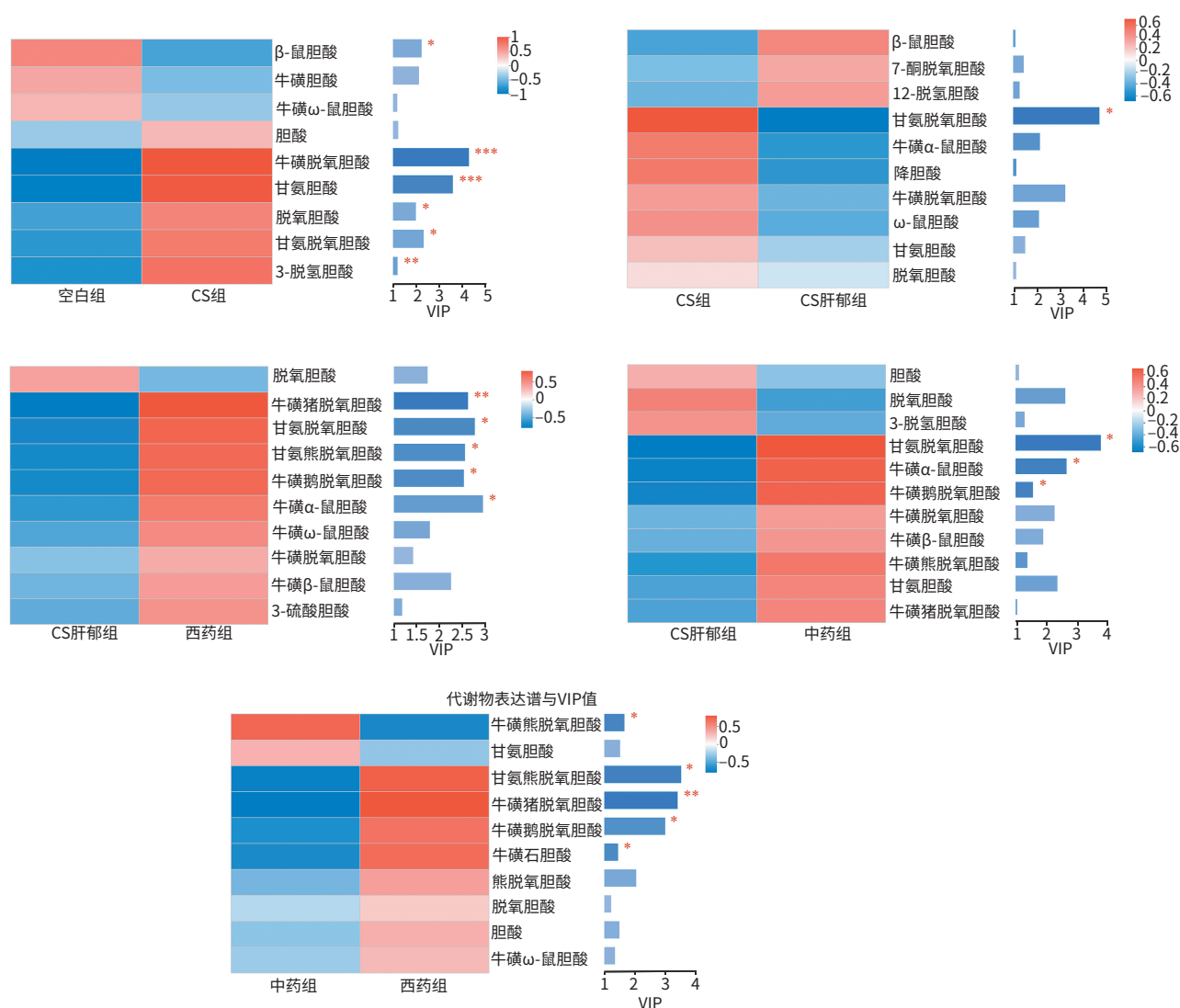
**伦理学声明：**本研究方案于2023年9月12日经由福建中医药大学实验动物伦理委员会审批，批号：FJTCM IACUC 2023343，符合实验室动物管理与使用准则。

**利益冲突声明：**本文不存在任何利益冲突。



注:a,空白组 vs CS组;b,CS组 vs CS肝郁组;c,CS肝郁组 vs 中药组;d,CS肝郁组 vs 西药组;e,中药组 vs 西药组。CS,胆固醇结石;R<sup>2</sup>,决定系数;Q<sup>2</sup>,预测残差平方和。

图6 正交偏最小二乘判别分析得分图与置换检验  
Figure6 OPLS-DA analysis and permutation test



注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。VIP, 该代谢物对两组差异的贡献值, 值越大表示该代谢物在两组间差异越大。

图7 组间差异代谢物定量相比图

Figure 7 Quantitative comparison of differential metabolites between groups

**作者贡献声明:** 李兆艳、王荷颖负责设计论文框架, 起草论文, 操作实验, 实施研究过程; 梁仁杰、王奕淳、陈惠萍负责数据收集, 统计学分析, 绘制图表; 闵莉负责论文修改, 拟定写作思路, 指导撰写文章并最后定稿。

#### 参考文献:

- [1] LU JH, LI YL, GUO RF, et al. Clinical features of patients with recurrent primary common bile duct stones after cholecystectomy[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(1): 118-126. DOI: 10.12449/JCH250118. 芦建慧, 李勇利, 郭瑞芳, 等. 胆囊切除术后原发性胆总管结石复发患者的临床特征分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(1): 118-126. DOI: 10.12449/JCH250118.
- [2] HJALTADÓTTIR K, HARALDSDÓTTIR KH, MÖLLER PH. Gallstones-review[J]. Læknablaðið, 2020, 106(10): 464-472. DOI: 10.17992/lbl.2020.10.602.
- [3] LI JQ, ZHANG GX. Research advances in the risk factors for recur-

rence of common bile duct stone after choledocholithotomy[J]. J Clin Hepatol, 2023, 39(1): 231-237. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.01.036.

李积强, 张桂信. 胆总管取石术后结石复发危险因素的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(1): 231-237. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.01.036.

- [4] TENG JH, CHEN WT, PAN M, et al. Formation mechanism and surgical treatment status of cholelithiasis[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(8): 1489-1494. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.030.

滕金豪, 陈伟棠, 潘孟, 等. 胆石症的形成机制及外科治疗现状[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(8): 1489-1494. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.030.

- [5] SONG B, WEN GQ, WANG L. Intestinal microorganisms and bile acid metabolism[J]. J Microbiol, 2021, 41(3): 107-112. DOI: 10.3969/j.issn.1005-7021.2021.03.016.

宋波, 文国琴, 王茜. 胆汁酸代谢与肠道微生物[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(3): 107-112. DOI: 10.3969/j.issn.1005-7021.2021.03.016.

- [6] LI M, MA CY. Exploration of the biological basis of "liver controlling

- conveyance and dispersion" in TCM based on bile acid signal[J]. J Shanxi Univ Chin Med, 2023, 24(1): 110-113. DOI: 10.19763/j.cnki.2096-7403.2023.01.22.
- 李鸣, 马重阳. 基于胆汁酸信号探讨中医“肝主疏泄”的生物学基础[J]. 山西中医药大学学报, 2023, 24(1): 110-113. DOI: 10.19763/j.cnki.2096-7403.2023.01.22.
- [7] BERR F, KULLAK-UBLICK GA, PAUMGARTNER G, et al. 7 alpha-dehydroxylating bacteria enhance deoxycholic acid input and cholesterol saturation of bile in patients with gallstones[J]. Gastroenterology, 1996, 111(6): 1611-1620. DOI: 10.1016/s0016-5085(96)70024-0.
- [8] AKAO T, AKAO T, HATTORI M, et al. 3 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase of *Ruminococcus* sp. from human intestinal bacteria[J]. J Biochem, 1986, 99(5): 1425-1431. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135612.
- [9] MA XH, SUN YB, CEN YY, et al. Advances in effect of bile acid metabolism on cholesterol gallstone disease[J/CD]. Electron J Metab Nutr Cancer, 2023, 10(3): 430-436. DOI: 10.16689/j.cnki.cn11-9349/r.2023.03.020.
- 马先豪, 孙岩波, 岑云云, 等. 胆汁酸代谢对胆固醇结石形成影响的研究进展[J/CD]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2023, 10(3): 430-436. DOI: 10.16689/j.cnki.cn11-9349/r.2023.03.020.
- [10] YUSTA B, MATTHEWS D, FLOCK GB, et al. Glucagon-like peptide-2 promotes gallbladder refilling via a TGR5-independent, GLP-2R-dependent pathway[J]. Mol Metab, 2017, 6(6): 503-511. DOI: 10.1016/j.molmet.2017.03.006.
- [11] GETHER IM, NEXØE-LARSEN C, KNOP FK. New avenues in the regulation of gallbladder motility-implications for the use of glucagon-like peptide-derived drugs[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(7): 2463-2472. DOI: 10.1210/je.2018-01008.
- [12] REHFELD JF, KNOP FK, ASMAR A, et al. Cholecystokinin secretion is suppressed by glucagon-like peptide-1: Clue to the mechanism of the adverse gallbladder events of GLP-1-derived drugs[J]. Scand J Gastroenterol, 2018, 53(12): 1429-1432. DOI: 10.1080/00365521.2018.1530297.
- [13] FU X, WANG XM, ZHANG Y, et al. Shugan Xiaoshi decoction in treatment of cholelithiasis with liver depression and qi stagnation syndrome[J]. Acta Chin Med, 2024, 39(11): 2465-2470. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2024.11.406.
- 付鑫, 王雪梅, 张雨, 等. 疏肝消石汤治疗胆石症肝郁气滞证[J]. 中医学报, 2024, 39(11): 2465-2470. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2024.11.406.
- [14] ZHANG Z, ZHAO JJ, WANG YZ, et al. Research progress in pharmacological effects and mechanism of Chaihu Shugan Powder[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2017, 24(9): 128-131. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2017.09.035.
- 张喆, 赵静洁, 王永志, 等. 柴胡疏肝散药理作用及机制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(9): 128-131. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2017.09.035.
- [15] MIN L, LIN XJ, ZHOU ZH, et al. Effects of Chaihu Shugan Powder on gallbladder contractile function in mice with gallbladder cholesterol stones[J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2023, 54(3): 23-26. DOI: 10.13260/j.cnki.jfjtc.2023.03007.
- 闵莉, 林雪娟, 周智慧, 等. 柴胡疏肝散对胆胆固醇结石小鼠胆囊收缩功能的影响[J]. 福建中医药, 2023, 54(3): 23-26. DOI: 10.13260/j.cnki.jfjtc.2023.03007.
- [16] ZHOU YN. Mechanism of soothing the liver, eliminating dampness and heat on gallbladder dynamics in CS mice[D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- 周亚男. 疏肝清利湿热对CS小鼠胆囊动力学影响的机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2018.
- [17] ZHANG Z, CAO DF. Effect of Chaishao Liujunzi decoction combined with anethol trithione tablets on abdominal pain, gallbladder systolic function and inflammatory response of patients with chronic cholecystitis[J]. Drug Eval, 2024, 21(8): 1011-1014. DOI: 10.19939/j.cnki.1672-2809.2024.08.25.
- 张珍, 曹丹凤. 柴芍六君子汤联合茴三硫片治疗慢性胆囊炎对患者腹痛程度、胆囊收缩功能及炎症反应的影响[J]. 药品评价, 2024, 21(8): 1011-1014. DOI: 10.19939/j.cnki.1672-2809.2024.08.25.
- [18] CAO HF, ZHANG Y, WEI ST, et al. Effect of modified Chaihu Shugansan on gallbladder function and inflammatory cytokines levels in treatment of chronic cholecystitis cholelithiasis[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(15): 63-67. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20210331.
- 曹海芳, 张瑜, 魏胜泰, 等. 柴胡疏肝散加减治疗慢性胆囊炎胆石症及胆囊功能和炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 63-67. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20210331.
- [19] Branch of Gastrointestinal Diseases, China Association of Chinese Medicine. Expert consensus on traditional Chinese medicine diagnosis and treatment of (acute and chronic) cholecystitis and cholelithiasis (2023) [J]. Chin J Integr Trad West Med Dig, 2024, 32(10): 839-848. DOI: 10.3969/j.issn.1671-038X.2024.10.01.
- 中华中医药学会脾胃病分会. (急、慢性)胆囊炎、胆石症中医诊疗专家共识(2023) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2024, 32(10): 839-848. DOI: 10.3969/j.issn.1671-038X.2024.10.01.
- [20] ZHOU ZH. Study on the mechanism of cholesterol gallstones in regulating gallbladder motility from DAG-PKC pathway based on "Fu organs for general purpose" [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2021. DOI: 10.27021/d.cnki.gfjzc.2021.000079.
- 周智慧. 基于“腑以通为用”从DAG-PKC通路调控胆囊动力的胆固醇结石机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2021. DOI: 10.27021/d.cnki.gfjzc.2021.000079.
- [21] WANG SY. Molecular biological mechanism of damp-heat syndrome of gallbladder cholesterol stones based on the regulation of FXR/FGF15/FGFR4 pathway by intestinal flora[D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2022. DOI: 10.27021/d.cnki.gfjzc.2022.000003.
- 王素英. 基于肠道菌群调控FXR/FGF15/FGFR4通路探讨胆囊胆固醇结石湿热证的分子生物学机制[D]. 福州: 福建中医药大学, 2022. DOI: 10.27021/d.cnki.gfjzc.2022.000003.
- [22] NOLLET M. Models of depression: Unpredictable chronic mild stress in mice[J]. Curr Protoc, 2021, 1(8): e208. DOI: 10.1002/cpz1.208.
- [23] LU YJ, ZHANG S, ZHAO Q, et al. A review of behavioral evaluation of depression in rodents[J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(6): 87-93. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2023.06.016.
- 卢宇佳, 张珊, 赵谦, 等. 啮齿类动物抑郁相关行为学评价[J]. 实验动物科学, 2023, 40(6): 87-93. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2023.06.016.
- [24] WANG YN, ZHANG XY, LIU YP, et al. Traditional Chinese medicine regulates the gut microbiota-bile acids-FXR axis to intervene in the development of colorectal cancer[J]. Acta Pharm Sin, 2024, 59(11): 3027-3041. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0568.
- 王亚妮, 张潇予, 刘玉萍, 等. 肠道菌群-胆汁酸-FXR轴干预结肠癌的研究进展及中药干预的现状分析[J]. 药学报, 2024, 59(11): 3027-3041. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0568.
- [25] LIU C, WANG ZY, ZHANG N, et al. Exploring the mechanism of Houpo Sanwu Decoction in regulating bile components in rabbits after cholecystectomy based on the FXR/TGR5 bile acid receptor signaling pathway[J/OL]. Acta Chin Med, 1-10[2024-08-05]. https://link.cnki.net/urlid/41.1411.R.20240805.1321.097.
- 刘昌, 王兆阳, 张楠, 等. 基于胆汁酸受体FXR/TGR5信号通路探讨厚朴三物汤调节胆囊切除术后兔胆汁组分的作用机制[J/OL]. 中医学报, 1-10[2024-08-05]. https://link.cnki.net/urlid/41.1411.R.20240805.1321.097.
- [26] WARD BJB, LAJZAK NK, KELLY OB, et al. Ursodeoxycholic acid and lithocholic acid exert anti-inflammatory actions in the colon[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017, 312(6): G550-G558. DOI: 10.1152/ajpgi.00256.2016.

- [27] WANG YH, YU XY, SHEN L. Regulation of NF- $\kappa$ B pathway by bile acid receptor TGR5 in DSS induced mouse colitis[J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2024, 33(11): 1459-1463. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5709.2024.11.008.  
王宇豪,余晓云,沈磊.胆汁酸受体TGR5对DSS诱导的小鼠结肠炎NF- $\kappa$ B通路的调节作用[J].胃肠病学和肝病学杂志,2024,33(11):1459-1463. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5709.2024.11.008.
- [28] POOLE DP, GODFREY C, CATTARUZZA F, et al. Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system[J]. Neurogastroenterol Motil, 2010, 22(7): 814-825. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2010.01487.x.
- [29] HANSEN NL, BRØNDEN A, NEXØE-LARSEN CC, et al. Glucagon-like peptide 2 inhibits postprandial gallbladder emptying in man: A randomized, double-blinded, crossover study[J]. Clin Transl Gastroenterol, 2020, 11(12): e00257. DOI: 10.14309/ctg.000000000000257.
- [30] HUNT JE, BILLESCHOU A, WINDELØV JA, et al. Pharmacological activation of TGR5 promotes intestinal growth via a GLP-2-dependent pathway in mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020, 318(5): G980-G987. DOI: 10.1152/ajpgi.00062.2020.
- [31] BIDAULT-JOURDAINNE V, MERLEN G, GLÉNISSON M, et al. TGR5 controls bile acid composition and gallbladder function to protect the liver from bile acid overload[J]. JHEP Rep, 2021, 3(2): 100214. DOI: 10.1016/j.jhepr.2020.100214.
- [32] CHENG JL. Retrospective study of TCM syndrome differentiation of cholelithiasis and its distribution in metabolic syndrome[D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2024. DOI: 10.27465/d.cnki.gzzyc.2024.000041.  
程建林.胆石症中医证候分型与代谢综合征分布规律的回溯性研究[D].杭州:浙江中医药大学,2024. DOI: 10.27465/d.cnki.gzzyc.2024.000041.
- [33] LI LL. Cholelithiasis on TCM syndromes study and its retrospective analysis of curative effect of TCM[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2021. DOI: 10.27879/d.cnki.ggxzy.2021.000105.  
李璐璐.胆石症中医证候研究及中医药治疗疗效回顾性分析[D].南宁:广西中医药大学,2021. DOI: 10.27879/d.cnki.ggxzy.2021.000105.
- [34] LU YJ, ZHANG S, SHI W, et al. Effects of Chaihu-Shugan San on behavior and hippocampal neurogenesis in depressive model mice[J]. Chin J Behav Med Brain Sci, 2022, 31(3): 198-204. DOI: 10.3760/cma.j.cn371468-20210918-00538.  
卢宇佳,张珊,史伟,等.柴胡疏肝散对抑郁模型小鼠行为及海马神经再生的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2022,31(3):198-204. DOI: 10.3760/cma.j.cn371468-20210918-00538.
- [35] YU YQ, WANG LL, WANG JJ, et al. Antidepressant effects of Chaihu Shugan Powder alcohol extracts in mice depression model[J]. Acta Neuropharmacol, 2014, 4(5): 8-14. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1396.2014.05.002.  
于亚青,王林林,王静静,等.柴胡疏肝散醇提物对抑郁模型小鼠的抗抑郁作用[J].神经药理学报,2014,4(5):8-14. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1396.2014.05.002.
- [36] LI AQ, HE QY. Discussion on the TCM syndrome differentiation system of 'categorized formula-formula syndrome-main TCM syndrome'[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(4): 2148-2151.  
李安琪,何庆勇.“类方-方证-主证”辨证体系的探讨[J].中华中医药杂志,2021,36(4):2148-2151.
- [37] SHEN ZY, ZHAO LY, WU D, et al. Exploration of the mechanism of liver injury caused by ethanol extract of Inonotus Obliquus based on liver metabolomics[J]. J Changchun Univ Chin Med, 2024, 40(10): 1095-1101. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2024.10.008.  
沈子扬,赵良友,吴丹,等.基于肝脏代谢组学探讨桦褐孔菌醇提物肝损伤机制[J].长春中医药大学学报,2024,40(10):1095-1101. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2024.10.008.
- [38] WANG X, WANG XS, ZHOU BD, et al. Clinical observation on Chaihu Shugansan combined with Xuanfu Daizhetang in treating barrett's esophagus with liver-stomach disharmony[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(24): 10-17. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20241122.  
王晓,王晓素,周秉舵,等.柴胡疏肝散合旋覆代赭汤治疗肝胃不和型Barrett食管临床观察[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(24):10-17. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20241122.
- [39] WENG LR, WANG QH, CAI JH, et al. Progress in pharmacological action and clinical application of cholic acid[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2025, 42(12): 2179-2184. DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20232348.  
翁浪仁,王秋红,蔡家瀚,等.胆酸的药理作用及其临床应用研究进展[J].中国现代应用药理学,2025,42(12):2179-2184. DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20232348.
- [40] ZHAO JC, SHU Y, CHENG NS, et al. Changes of cholesterol metabolism in cholesterol gallstone formation in the rabbit[J]. Chin J Gen Surg, 2000, 9(2): 124-128. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6947.2000.02.010.  
赵纪春,舒晔,程南生,等.胆囊结石中胆固醇代谢变化的实验研究[J].中国普通外科杂志,2000,9(2):124-128. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6947.2000.02.010.

收稿日期: 2025-08-13; 录用日期: 2025-11-13

本文编辑: 林蛟

引证本文: LI ZY, WANG HT, LIANG RJ, et al. Therapeutic effect and mechanism of modified Chaihu Shugan Powder on a mouse model of gallbladder cholesterol stone with liver depression syndrome[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(2): 387-399.

李兆艳,王荷颖,梁仁杰,等.柴胡疏肝散加减方对胆囊胆固醇结石肝郁证小鼠模型的治疗作用及其机制[J].临床肝胆病杂志,2026,42(2):387-399.