

枸杞多糖对肝内胆胆汁淤积模型大鼠肝脏预防保护作用的研究

夏勇, 宋燕华, 曹彬, 陈钢

【摘要】目的 探讨枸杞多糖(LBP)对肝内胆胆汁淤积模型大鼠肝脏损伤的预防保护作用。**方法** SPF级雄性SD幼龄大鼠,设阴性对照组、模型组、LBP 50、150、450 mg/kg 剂量组,以及阳性对照组,每组各10只。构建大鼠肝内胆胆汁淤积模型,模型组、LBP各剂量组及阳性对照组,予60 mg/kg α -萘异硫氰酸酯,每隔1天给药一次,第2周开始改为每隔3天给药一次,持续6周。第2周起,各剂量组每天予不同剂量的LBP,阳性对照组予熊去氧胆酸,模型组大鼠予蒸馏水。6周后采集血液及肝组织样本,测定血清生化指标、凝血功能指标及白细胞分类计数指标,检测肝组织中的炎症因子含量以及Toll样受体4(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B)、核转录因子(pNF- κ B)及髓分化因子88(MyD88)蛋白的表达量,观察大鼠肝脏的病变情况。**结果** 与阴性对照组比较,模型组大鼠血清 γ -谷氨酰转氨酶(γ -GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆汁酸(TBA)、总胆红素(TBil)、胆固醇(CHOL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平,血液白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYMP)、中性粒细胞(NEUT)、单核细胞(MONO)及嗜酸性粒细胞(EO)计数,纤维蛋白原(FIB)含量均升高(均 $P < 0.05$),肝组织中炎症因子肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素1 β (IL-1 β)、白介素6及巨噬细胞炎症蛋白2(MIP-2)含量增加,TLR4、pNF- κ B、MyD88蛋白表达水平上调(均 $P < 0.05$)。肝脏可见多量炎症细胞浸润、胆管增生、纤维组织增生等病理性改变,组织形态学观察评分上升(均 $P < 0.05$);与模型组比较,LBP 450 mg/kg组大鼠血清 γ -GGT、TBA、TBil、ALT水平,血液WBC、LYMP、NEUT计数,FIB含量均下降(均 $P < 0.05$),肝组织中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、MIP-2含量降低,TLR4、pNF- κ B、MyD88蛋白的表达水平下调(均 $P < 0.05$),肝脏组织形态学观察评分下降(均 $P < 0.05$),肝脏损伤减轻,LBP 150 mg/kg组大鼠血液FIB含量均下降,TLR4蛋白的表达水平下调(均 $P < 0.05$)。**结论** LBP对肝内胆胆汁淤积模型大鼠肝脏损伤有缓解和保护功效,其作用机制可能与下调TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路相关蛋白的表达,抑制过度炎症反应有关。

【关键词】 枸杞多糖;胆汁淤积;保肝作用;TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.05.003

【中图分类号】 R285.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)05-0570-06

Study on the relieving and protective effects of lycium barbarum polysaccharides on the liver of rats model with intrahepatic cholestasis model

XIA Yong, SONG Yanhua, CAO Bin, CHEN Gang (Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To study the relieving and protective effects of lycium barbarum polysaccharides (LBP) on liver injury in rats model with intrahepatic cholestasis. **Methods** The model of intrahepatic cholestasis in SPF male sprague-dawley (SD) rats was established, and the negative control group, positive control group, model group, LBP dose groups of 50, 150 and 450 mg/kg were set up. The model group, each dose group of LBP, and positive control group was given 60 mg/kg α -Naphthalene isothiocyanate (ANIT) every other day, and from the second week, it was changed to every three days for a duration of six weeks. From the second week, different doses of LBP were given to each dose group, ursodeoxycholic acid was given to the positive control group, and distilled water was given to the model group. After six weeks, blood and liver tissue samples were collected to measure serum biochemical indicators, coagulation function indicators and white blood cell (WBC) classification count indicators. The content of inflamma-

基金项目: 浙江省中医药科技计划(2022ZB091)

作者单位: 310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心

通信作者: 陈钢, Email: gchen@cdc.zj.cn

tory factors and the expression levels of TLR4, nuclear factor(NF)- κ B, pNF- κ B, and MyD88 proteins in rat liver tissue were measured, and the pathological changes in rat liver were observed. **Results** Compared to the negative control group, the values of the serum γ -GGT, alkaline phosphatase(ALP), total bile acid(TBA), total bilirubin(TBiL), cholesterol(CHOL), ALT, AST levels, the blood WBC, lymphocyte(LYMP), neutrophil granulocyte(NEUT), mononuclear leucocyte(MONO), eosinophilic granulocyte(EO) counts, and fibrinogen(FIB) content increased in model group(all $P < 0.05$), and the concentration of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and macrophage inflammatory protein(MIP)-2 increased, and the levels of TLR4, pNF- κ B and MyD88 proteins were upregulated (all $P < 0.05$). Pathological changes such as excessive inflammation, bile duct hyperplasia, and fibrous tissue hyperplasia were observed, and the observation score increased in model group(all $P < 0.05$). Compared with the model group, the LBP 450 mg/kg group serum transglutaminase(γ -GGT), TBA, TBiL, ALT, blood WBC, LYMP, NEUT counts, and FIB concentration all decreased(all $P < 0.05$), and the content of TNF- α , IL-1 β , MIP-2 decreased, and the levels of TLR4, pNF- κ B and MyD88 proteins were down regulated(all $P < 0.05$). The morphological scores decreased (all $P < 0.05$), and liver damage was alleviated. The level of TLR4 protein in the LBP 150 mg/kg group was down regulated (all $P < 0.05$). **Conclusions** LBP has alleviating and protective effects on liver damage in rats with intrahepatic cholestasis model and their mechanism may be related to downregulating TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway related proteins and inhibiting of excessive inflammatory response.

【Key words】 Lycium barbarum polysaccharides; Cholestasis; Liver protective effect; TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway
[Modern Practical Medicine, 2024, 36(5):570-575]

胆汁淤积可分为多种类型,临床以肝内胆汁淤积多见^[1]。胆汁淤积发病周期长,迁延难治,持续损伤肝组织,导致胆汁性胆管炎、肝硬化及肝功能衰竭等不良后果^[2]。目前,针对胆汁淤积的治疗药物有熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)和肾上腺糖皮质激素等,但疗效不佳^[3-4]。研究发现,炎症应激可损伤肝细胞及胆管上皮细胞,干扰胆汁成分的代谢转化及排泄清除,引起肝内胆汁淤积^[5]。淤积的胆汁成分介导 Toll 样受体 (TLRs)/核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路的转导,诱导炎症因子的表达,导致炎症细胞过度激活和增殖,引发炎症级联反应加重肝损伤^[6-7]。枸杞多糖 (lycium barbarum polysaccharides, LBP) 具有保肝功效,对多种类型的肝损伤具有保护作用^[8-9]。本研究拟探讨 LBP 对肝内胆汁淤积模型大鼠肝脏预防保护作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 材料 SPF 级雄性 SD 幼龄大鼠,体质量(58 $\pm$ 5)g,购自通利华实验动物技术有限公司。动物饲养条件:屏障环境,温度 21 ~ 23 $^{\circ}$ C,相对湿度 45% ~ 70%。动物饲料购于浙江省实验动物中心。动物实验设施使用许可证号:SYXK(浙)2018-0190。

1.2 仪器与试剂 XT-1800i 型全自动血细胞分析仪,美国 Sysmex 公司; TBA-40FR 型全自动生化分析仪,日本 TOSHIBA 公司; Precellys 24 型组织匀浆

机,法国 BERTIN 公司; FluoChem E 型化学发光仪,美国 Santa Clara 公司; STA COMPACT MAX 型血凝分析仪,法国 STAGO 公司; R540IE 型麻醉机,中国瑞沃德生命科学有限公司。 α -萘异硫氰酸酯脂 (α -naphthylisothiocyanate, ANIT), 批号 OE6LD-PR, 购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; UDCA, 批号 C12029404, 购自上海麦克林生化科技公司; 大鼠白介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒, 批号 202208, 购于上海远慕生物科技有限公司; 大鼠巨噬细胞炎症蛋白 2 (MIP-2) ELISA 试剂盒, 批号 202211, 大鼠白介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒, 批号 202211, 均购自江苏酶免实业有限公司; 超敏化学发光试剂盒, 批号 032422220512, 购自碧云天生物技术公司; 抗 β -Actin 抗体, 货号 ab115777, 抗 p65 (phospho S536) 抗体, 货号 ab76302, 抗 Toll 样受体 4 (TLR4) 抗体, 货号 ab217274, 抗髓分化因子 88 (MyD88) 抗体, 货号 ab219413, 均购自 Abcam 公司; 抗核因子 κ B (NF- κ B) p65 抗体, 货号#8242, 辣根过氧化物酶标记 IgG 抗体, 货号#7074, 均购自 CST 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物试验 大鼠随机分为阴性对照组、阳性对照组、模型组, LBP 低、中、高剂量组(低、中、高剂量组), 每组各 10 只。灌胃法予受试物, 灌胃容量为 5 ml/kg, 参照 Yan 等^[10]方法构建大鼠肝内胆汁淤积模型。模型组、LBP 各剂量组及阳性对照组, 于实验

开始首日经口予 1.2% (m/v) ANIT 色拉油溶液 60 mg/kg, 灌胃前、后分别禁食 2 h, 以后每隔 1 天给药 1 次, 第 2 周起, 每隔 3 天给药 1 次, 直至实验结束。于实验开始后第 2 周起, 剂量组分别予 50、150、450 mg/kg LBP, 阳性对照组予 UDCA 60 mg/kg, 模型组大鼠予相同体积的蒸馏水, 1 次/d。阴性对照组用蒸馏水和色拉油灌胃, 处理方法同模型组。实验期间, 每天观察并记录实验大鼠体征及死亡情况。实验大鼠于 6 周后禁食 16 h, 不限制饮水, 用麻醉机麻醉, 大体解剖, 采集血液及肝组织样本进行指标检测。

1.3.2 血液样本检测 分离血清测定血清生化指标: γ -谷氨酰转移酶(γ -GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆汁酸(TBA)、总胆红素(TBil)、胆固醇(CHOL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST); 取血液样本测定白细胞分类计数指标: 白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYMP)、中性粒细胞(NEUT)、单核细胞(MONO)、嗜酸性粒细胞(EO); 取血液样本检测凝血功能指标: 纤维蛋白原(FIB)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)及活化部分凝血活酶时间(APTT)。

1.3.3 酶联免疫吸附法检测肝组织中炎症因子 取肝中叶充分剪碎, 称取适量组织, 用 ELISA 法检测大鼠肝组织中肿瘤坏死因子(TNF- α)、IL-6、IL-1 β 及 MIP-2 的含量。

1.3.4 Western Blot 法测定肝组织中蛋白的表达水平 取肝中叶充分剪碎, 称取适量组织, 加入预冷的 RIPA 裂解液(按 100 mg/1 ml 比例), 置碎冰中裂解后匀浆, 测定上清液的蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 置于金属浴变性, 经过 SDS-PAGE 电泳(90 V 30 min、120 V 90 min)、湿法转膜(250 mA, 90 ~ 120 min), 封闭 2 h, 一抗 β -Actin 抗体、TLR4 抗体、NF- κ B p65 抗体、pNF- κ B p65 抗体、MyD88 抗体均于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 二抗辣根过氧化物酶标记 IgG 抗体孵育 2 h, 经化学发光反应显影后拍摄条带, AlphaView SA 3.30 软件分析目标条带的灰度值, 结果以目的蛋白相对表达量表示。

1.3.5 观察肝脏的组织病理学改变 摘取肝脏放入 10%中性甲醛溶液固定 48 h, 石蜡包埋, 切片厚度 4 μ m, 伊红和苏木素(HE)染色, 观察肝脏组织形态, 天狼星红(SR)染色观察肝脏纤维增生情况, 并进行组织

病理学评分, 计算每个实验组大鼠评分中位数(M)和四分位间距(IQR)并进行统计分析。评分标准参考赵瑞秋等^[11]文献报道。

1.4 统计方法 数据采用 SPSS 22.0 软件分析, 正态分布计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 t 检验或 q 检验; 非正态分布计量资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 采用 Mann-whitney U 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般表现 除阴性对照组外, 各实验组大鼠尿液呈深黄色, 毛色泛黄。给造模剂 ANIT 1 周后, 模型组大鼠体质量低于阴性对照组($t=4.78, P < 0.05$), 余各观察时点各实验组大鼠体质量差异均无统计学意义($t \leq 1.08$, 均 $P > 0.05$), 见图 1。

2.2 血清生化指标变化 模型组与阴性对照大鼠比较, 血清 γ -GGT、ALP、TBA、TBil、CHOL、ALT 及 AST 数值均升高($t \geq 4.57$, 均 $P < 0.05$); LBP 高剂量组与模型组比较, 大鼠血清 γ -GGT、TBA、TBil 及 ALT 均降低($q \geq 5.19$, 均 $P < 0.05$); 阳性对照组与模型组比较, 大鼠血清 γ -GGT、TBA、TBil、CHOL、ALT 及 AST 均降低($q \geq 5.32$, 均 $P < 0.05$); 其余各组血清生化指标差异均无统计学意义($q \leq 2.23$, 均 $P > 0.05$), 见表 1。

2.3 白细胞分类计数指标变化 模型组与阴性对照大鼠比较, 血液 WBC、LYMP、NEUT、MONO 及 EO 计数值均升高($t \geq 6.35$, 均 $P < 0.05$)。LBP 高剂量组与模型组大鼠比较, 血液 WBC、LYMP、NEUT 计数值均降低($q \geq 4.51$, 均 $P < 0.05$), 阳性对照组与模型组大鼠比较, 血液 YMP 计数值降低($q=4.87, P < 0.05$), 见表 2。

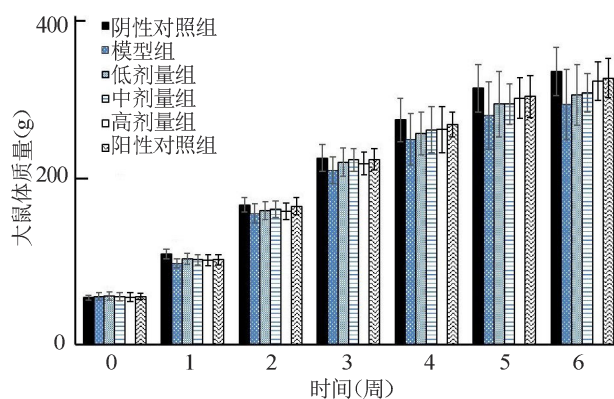


图1 6组大鼠体质量变化情况

2.4 凝血功能指标变化 模型组与阴性对照大鼠比较,凝血功能指标 FIB 升高($t \geq 8.94$, 均 $P < 0.05$)。LBP 中、高剂量组与模型组大鼠比较,FIB 下降($q \geq 4.36$, 均 $P < 0.05$),阳性对照组与模型组大鼠比较,FIB 下降($q \geq 4.53$, 均 $P < 0.05$),见表 3。

2.5 肝组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 MIP-2 含量变化 模型组与阴性对照大鼠比较,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 MIP-2 含量均升高($t \geq 3.82$, 均 $P < 0.05$)。LBP 高剂量组与模型组大鼠比较,TNF- α 、IL-1 β 及 MIP-2 水平均降低($q \geq 4.47$, 均 $P < 0.05$),阳性对照组与模型组大鼠比较,TNF- α 含量降低($q \geq 4.89$, 均 $P < 0.05$),见表 4。

2.6 大鼠肝组织蛋白表达水平的影响 模型组与阴性对照大鼠比较,TLR4、pNF- κ B 及 MyD88 蛋白相对表达水平上调($t \geq 6.40$, 均 $P < 0.05$)。与模型组比较,LBP 中、高剂量组 TLR4 蛋白相对表达水平均下调($q \geq 3.98$, 均 $P < 0.05$),LBP 高剂量组 pNF- κ B 及 MyD88 蛋白相对表达水平均下调 ($q \geq 4.65$,

均 $P < 0.05$),见表 5。

2.7 LBP 对胆汁淤积大鼠肝脏组织形态的影响

阴性对照组大鼠肝脏结构完整、细胞形态正常,未见胆管增生、管腔扩大、炎症细胞浸润等改变(图 2),汇管区未见增生性改变(图 3);模型对照组大鼠肝脏可见多量炎症细胞浸润,汇管区多见,胆管及胆管上皮增生,胆管管腔扩张(图 2),汇管区出现大量胶原纤维沉积,纤维组织增生(图 3);LBP 高剂量组及阳性对照组大鼠肝脏汇管区炎症细胞浸润减轻,胆管及胆管上皮增生有所缓解(图 2),胶原纤维沉积减少,纤维组织增生程度较轻(图 3)。LBP 低、中剂量组大鼠肝组织形态与模型组差别不明显(图 2 ~ 3)。

模型组与阴性对照组大鼠比较,肝脏的组织形态学评分升高($Z=100.00$, $P < 0.05$),LBP 高剂量组和阳性对照组与模型对照组大鼠比较,肝组织形态学评分均降低($Z=18.60$, $P < 0.05$),见表 6。

表 1 6 组大鼠血清生化指标变化($n=10$)

组别	γ -GGT(U/L)	ALP(U/L)	TBA(mmol/L)	TBiL(μ mol/L)	CHOL(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
阴性对照组	0.80 $\pm$ 0.26	242 $\pm$ 58	29 $\pm$ 14	2.2 $\pm$ 0.4	2.07 $\pm$ 0.29	33 $\pm$ 7	164 $\pm$ 43
模型组	3.35 $\pm$ 0.98	387 $\pm$ 62	90 $\pm$ 22	30.3 $\pm$ 7.0	3.80 $\pm$ 0.29	90 $\pm$ 15	271 $\pm$ 60
低剂量组	2.93 $\pm$ 0.97	386 $\pm$ 68	86 $\pm$ 28	29.0 $\pm$ 6.6	3.61 $\pm$ 0.35	85 $\pm$ 15	276 $\pm$ 88
中剂量组	2.84 $\pm$ 0.95	385 $\pm$ 62	73 $\pm$ 25	25.1 $\pm$ 6.7	3.71 $\pm$ 0.39	83 $\pm$ 12	247 $\pm$ 79
高剂量组	2.07 $\pm$ 0.71	355 $\pm$ 64	61 $\pm$ 25	21.9 $\pm$ 5.7	3.49 $\pm$ 0.28	72 $\pm$ 14	198 $\pm$ 48
阳性对照组	1.92 $\pm$ 0.60	392 $\pm$ 68	51 $\pm$ 19	20.1 $\pm$ 5.8	3.08 $\pm$ 0.35	69 $\pm$ 18	176 $\pm$ 46

注: γ -GGT 为 γ -谷氨酰转氨酶,ALP 为碱性磷酸酶,TBA 为总胆汁酸,TBiL 为总胆红素,CHOL 为胆固醇,ALT 为丙氨酸氨基转移酶,AST 为天冬氨酸氨基转移酶

表 2 6 组大鼠白细胞分类计数指标变化($n=10$)

组别	WBC($\times 10^9$ /L)	LYMP($\times 10^9$ /L)	NEUT($\times 10^9$ /L)	MONO($\times 10^9$ /L)	EO($\times 10^9$ /L)
阴性对照组	15.93 $\pm$ 3.81	11.52 $\pm$ 2.58	4.03 $\pm$ 1.20	0.23 $\pm$ 0.08	0.14 $\pm$ 0.05
模型组	33.45 $\pm$ 4.60	19.50 $\pm$ 2.94	12.60 $\pm$ 2.14	0.82 $\pm$ 0.19	0.50 $\pm$ 0.17
低剂量组	33.42 $\pm$ 5.12	19.70 $\pm$ 3.60	12.34 $\pm$ 2.68	0.83 $\pm$ 0.19	0.52 $\pm$ 0.18
中剂量组	30.44 $\pm$ 4.81	18.04 $\pm$ 3.75	10.98 $\pm$ 2.08	0.81 $\pm$ 0.26	0.57 $\pm$ 0.22
高剂量组	26.47 $\pm$ 3.49	15.63 $\pm$ 2.46	9.70 $\pm$ 1.72	0.66 $\pm$ 0.13	0.46 $\pm$ 0.23
阳性对照组	28.64 $\pm$ 3.86	15.92 $\pm$ 2.62	11.52 $\pm$ 2.31	0.67 $\pm$ 0.15	0.50 $\pm$ 0.17

注:WBC 为白细胞,LYMP 为淋巴细胞,NEUT 为中性粒细胞,MONO 为单核细胞,EO 为嗜酸性粒细胞

表 3 LBP 对胆汁淤积大鼠凝血功能指标的影响($n=10$)

组别	FIB(g/L)	PT(s)	TT(s)	APTT(s)
阴性对照组	2.69 $\pm$ 0.20	17.6 $\pm$ 0.7	31.9 $\pm$ 2.7	23.4 $\pm$ 1.2
模型组	4.80 $\pm$ 0.72	17.9 $\pm$ 0.8	30.7 $\pm$ 2.4	22.0 $\pm$ 1.9
低剂量组	5.06 $\pm$ 0.44	17.4 $\pm$ 0.7	29.9 $\pm$ 2.7	21.2 $\pm$ 2.2
中剂量组	4.04 $\pm$ 0.72	17.5 $\pm$ 1.0	32.1 $\pm$ 2.2	23.0 $\pm$ 1.3
高剂量组	3.09 $\pm$ 0.42	16.9 $\pm$ 0.8	32.5 $\pm$ 2.2	21.6 $\pm$ 1.6
阳性对照组	2.97 $\pm$ 0.49	17.2 $\pm$ 1.0	30.5 $\pm$ 2.4	22.4 $\pm$ 1.3

注:FIB 为纤维蛋白原,PT 为凝血酶原时间,TT 为凝血酶时间,APTT 为活化部分凝血活酶时间

表 4 LBP 对胆汁淤积大鼠肝组织中 TNF- α 、IL-6、

IL-1 β 及 MIP-2 含量的影响($n=10$)				pg/ml
组别	TNF- α	IL-6	IL-1 β	MIP-2
阴性对照组	143.3 $\pm$ 23.8	74.9 $\pm$ 8.7	30.5 $\pm$ 4.0	246.6 $\pm$ 19.0
模型组	216.6 $\pm$ 33.0	110.7 $\pm$ 20.8	52.4 $\pm$ 5.5	282.3 $\pm$ 22.7
低剂量组	211.9 $\pm$ 39.3	106.9 $\pm$ 15.4	51.9 $\pm$ 6.1	279.9 $\pm$ 26.3
中剂量组	188.5 $\pm$ 32.8	97.2 $\pm$ 17.1	47.6 $\pm$ 7.8	269.5 $\pm$ 24.1
高剂量组	168.7 $\pm$ 35.2	95.3 $\pm$ 18.9	43.9 $\pm$ 6.0 [*]	252.7 $\pm$ 18.4
阳性对照组	172.9 $\pm$ 36.7	90.0 $\pm$ 13.8	46.2 $\pm$ 5.3	260.8 $\pm$ 22.4

注:TNF- α 为肿瘤坏死因子,IL-6 为白介素 6,IL-1 β 为白介素 1 β ,MIP-2 为炎性蛋白 2

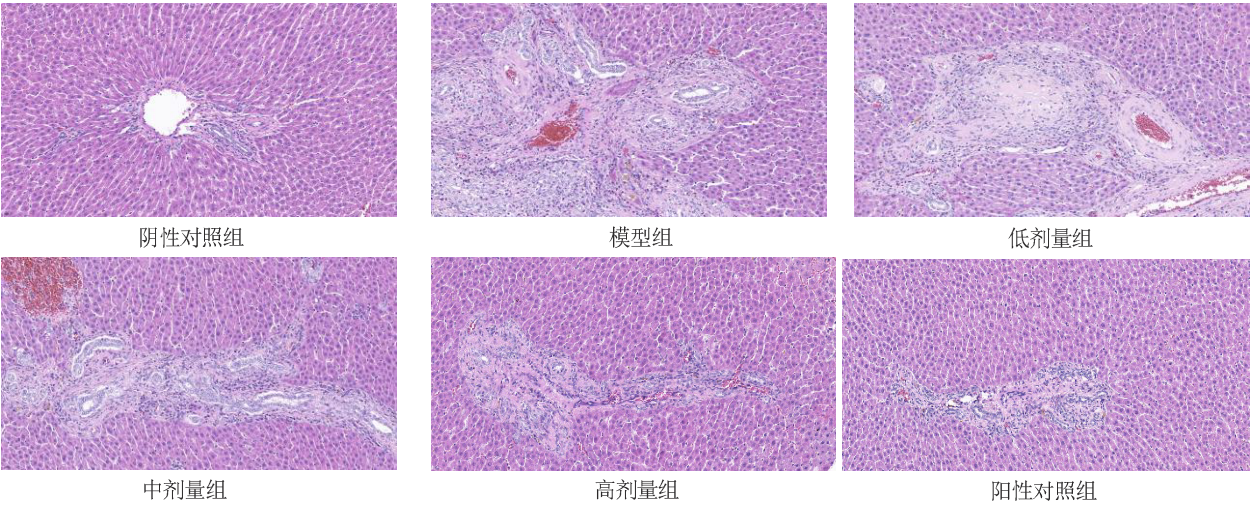


图2 大鼠肝脏切片标本镜下观察(HE 染色,×200)

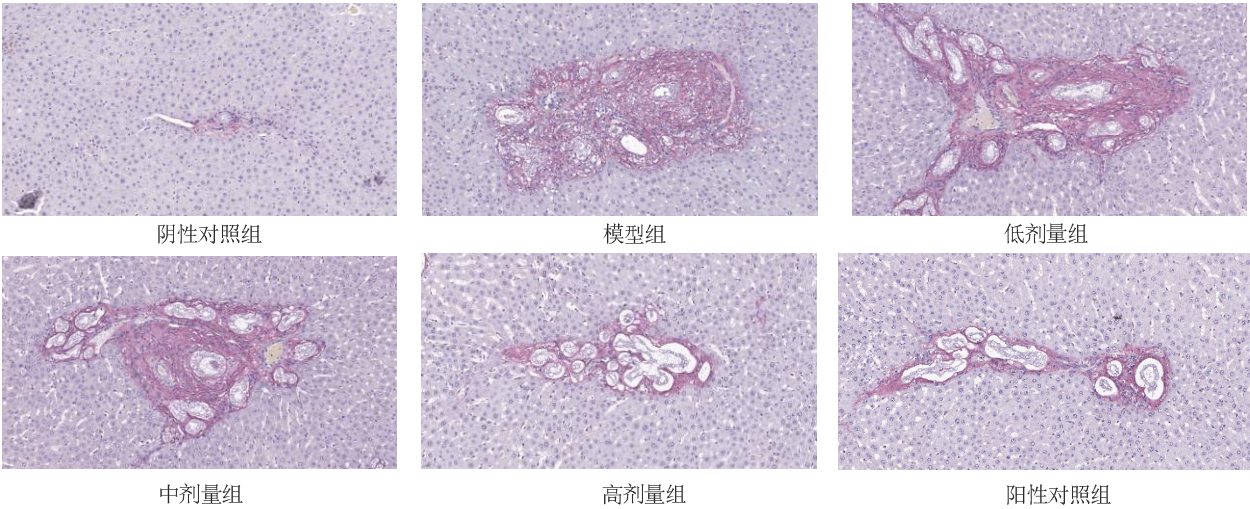


图3 大鼠肝脏切片标本镜下观察(SR 染色,×200)

3 讨论

本研究结果显示,在持续给予造模剂 ANIT 后,

模型组大鼠出现尿液颜色深黄、毛色泛黄等黄疸体征,血清生化指标 r-GGT、ALP、TBA、TbIL、CHOL、ALT 及 AST 升高,白细胞分类计数及凝血功能指标 WBC、LYMP、NEUT、MONO、EO 及 FIB 增加,肝脏炎症细胞增多、胆管和纤维组织增生,且体质量有减轻趋势。这些改变与胆汁淤积性肝病的临床表现基本一致,说明模型建立成功。

在本研究中,模型组大鼠 TBA、TbIL、 γ -GGT、ALP、ALT 及 AST 等血清生化指标均大幅升高,这与文献报道一致^[1, 12]。胆汁淤积大鼠出现体质量减轻趋势及黄疸体征,应与胆汁酸和胆红素不能通过胆汁途径排入肠道,造成脂肪和脂溶性维生素吸收障碍和高胆红素血症有关^[13]。在连续给予 LBP 5 周后,450 mg/kg LBP 组大鼠血清 TBA、TbIL、r-GGT、ALT、AST 均有下降,肝脏组织形态学观察评分降低,提示 LBP 对肝内胆汁淤积模型大鼠的血清生化

表5 6组大鼠炎症信号通路蛋白表达情况(n=10)

组别	TLR4/ β -ACTIN	NF- κ B/ β -ACTIN	pNF- κ B/ β -ACTIN	MyD88/ β -ACTIN
阴性对照	0.69±0.12	0.52±0.12	0.48±0.06	0.62±0.06
模型组	1.12±0.11	0.60±0.14	0.75±0.12	1.00±0.16
低剂量组	1.13±0.09	0.53±0.11	0.71±0.14	0.94±0.16
中剂量组	0.99±0.09	0.54±0.10	0.65±0.14	0.91±0.14
高剂量组	0.81±0.11	0.56±0.11	0.55±0.12	0.78±0.12
阳性对照组	1.02±0.11	0.55±0.09	0.63±0.11	0.83±0.14

表6 6组大鼠肝脏组织形态学观察评分

组别	例数	形态学观察评分
阴性对照	10	0.50(0.00, 1.00)
模型组	10	6.00(6.00, 7.00)
低剂量组	10	6.00(4.75, 7.00)
中剂量组	10	5.00(5.00, 6.25)
高剂量组	10	4.00(3.00, 5.00)
阳性对照组	10	3.50(3.00, 4.00)

指标及肝脏组织病理学改变有改善作用。

凝血因子主要在肝脏合成,胆汁淤积性肝损伤常伴发凝血功能异常,凝血功能指标对评估胆汁淤积性肝损伤具有重要价值^[13-14]。本研究结果显示,模型组大鼠血液 FIB 含量高于阴性对照,提示其血液可能呈高凝状态,流动性下降,影响微循环,加重肝脏损害。血液 FIB 升高的原因可能与血液中高水平的 TBA 破坏了血管内皮细胞,激活血小板,释放凝血因子有关^[14]。450 mg/kg LBP 组大鼠血液 FIB 含量明显降低,提示 LBP 对胆汁淤积大鼠的血液流动性有改善作用。

多项研究表明炎症反应可能是引起肝内胆汁淤积的重要发病机制^[15],胆汁淤积往往伴随炎症因子表达上调,诱导炎症细胞增殖与活化,加重肝脏炎症反应,导致肝脏形态结构与功能受损^[16]。在本研究中,模型组大鼠的血液 WBC、LYMP、NEUT、MONO 及 EO 均增加,而肝组织中的促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及趋化因子 MIP-2 水平也明显升高,肝脏可见多量炎症细胞浸润,胆管、纤维组织出现增生性改变。而 LBP 450 mg/kg 组大鼠血液 WBC、LYPM、NUET 及而肝组织中的炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、MIP-2 水平均低于模型组,肝脏汇管区炎症细胞浸润减少,增生性改变有所缓解,表明 LBP 对胆汁淤积模型大鼠肝脏的炎症因子、血液中白细胞数量及肝脏病理性改变均有改善作用,提示 LBP 对胆汁淤积模型大鼠肝脏的保护作用可能与抗炎功效有关。

本研究结果显示,TLR4、pNF- κ B 及 MyD88 蛋白相对表达水平在模型组大鼠肝组织中均呈明显上调,而在 450 mg/kg LBP 组大鼠肝组织中这种上调趋势受到了抑制,肝组织中的促炎因子、趋化因子水平及血液中的白细胞数量均有下降,提示 LBP 可能通过下调 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的转导,减少肝内炎症细胞募集和减轻炎性反应^[17],缓解对肝脏细胞及胆管系统的损伤。

综上所述,LBP 能减轻胆汁淤积导致的肝脏病理性损伤,其作用机制可能与 LBP 下调 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的转导,减轻肝脏过度炎症反应有关。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 夏勇:实验操作、论文撰写;宋燕华,曹彬:数据整理、统计学分析;陈钢:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] 中华医学会肝病学分会,中华医学会消化病学分会,中华医学会感染病学分会.胆汁淤积性肝病诊断和治疗共识(2015)[J]. 胃肠病学,2016,21(1):39-51.
- [2] TANAKA A. Current understanding of primary biliary cholangitis[J]. Clin Mol Hepatol, 2021, 27(1): 1-21.
- [3] GOLDSTEIN J, LEVY C. Novel and emerging therapies for cholestatic liver diseases[J]. Liver Int, 2018, 38(9): 1520-1535.
- [4] WAGNER M, FICKERT P. Drug therapies for chronic cholestatic liver diseases[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2020, 60: 503-527.
- [5] KOLARIĆ T O, NINČEVIĆ V, SMOLIĆ R, et al. Mechanisms of hepatic cholestatic drug injury[J]. J Clin Transl Hepatol, 2019, 7(1): 86-92.
- [6] LI M, CAI S Y, BOYER J L. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver[J]. Mol Aspects Med, 2017, 56: 45-53.
- [7] 王倩,李玥,严东明,等.茵陈四逆汤对 ANIT 诱导肝内胆汁淤积症小鼠肝损伤保护作用及机制研究[J]. 上海中医药杂志,2020,54(S1):171-176.
- [8] 王莉,叶维佳,吴红静,等.黑果枸杞多糖对大鼠肝损伤的保护研究[J]. 食品工业科技,2020,41(14):287-290,296.
- [9] WANG F, TIPOE G L, YANG C Q, et al. Lycium barbarum polysaccharide supplementation improves alcoholic liver injury in female mice by inhibiting stearyl-CoA desaturase 1[J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(13): e1800144.
- [10] YAN J Y, XIE G X, LIANG C G, et al. Herbal medicine Yinchenaotang protects against α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis in rats[J]. Sci Rep, 2017, 7: 4211.
- [11] 赵瑞秋,管晓琴,罗子国,等.婴儿胆汁淤积性肝病肝组织病理学特征及其在病因诊断中的意义[J]. 中华肝脏病杂志,2010,18(9): 694-698.
- [12] 李国栋,杨金玉,马小华,等.清热卡森颗粒对肝内胆汁淤积大鼠模型的治疗作用及机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2022, 24(10):4038-4046.
- [13] 张梅,杨永生,韩金鹏,等.N-乙酰半胱氨酸联合熊去氧胆酸对慢性乙型病毒性肝炎合并肝内胆汁淤积患者的影响[J]. 西北药学杂志,2021,36(4):664-668.
- [14] 孙晓彤,郭因,曲涛,等.凝血功能与炎症标志物在妊娠期肝内胆汁淤积症中的变化分析[J]. 中华生殖与避孕杂志,2020,40(8): 638-643.
- [15] 何胜夫.胆汁酸在胆汁淤积性肝损伤发病中的作用研究进展[J]. 实用肝病杂志,2020,23(6):919-922.
- [16] 丁洁.龙胆苦苷抗 α -异硫氰酸萘酯所致大鼠急性肝损伤的作用机制研究[J]. 中国药师,2020,23(11):2133-2137.
- [17] JU M J, LIU B F, HE H Y, et al. MicroRNA-27a alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis through modulating TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. Cell Cycle, 2018, 17(16): 2001-2018.

收稿日期:2024-01-11

(本文编辑:钟美春)