DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.07.045

基于TIPE2/TLR4－NF－κB通路探讨大黄素对肝内胆汁淤积大鼠的保护作用

刘怡静,姚恒潘,李素丽,周方
(郑州大学附属儿童医院,河南省儿童医院郑州儿童医院,河南 郑州 450053)

摘要:目的 探讨大黄素对肝内胆汁淤积大鼠的保护作用及机制。方法 将40只SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、模型+大黄素组和正常+大黄素组,模型+大黄素组和正常+大黄素组给予大黄素40 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃7 d,正常组及模型组给予羧甲基纤维素钠处理,于实验第5天给药4 h后,模型组和模型+大黄素组50 mg·kg^{-1}·d^{-1}给予α-萘异硫氰酸酯(alpha-naphthylisothiocyanate,ANIT)灌胃1次建立肝内胆汁淤积模型,其余两组予以橄榄油对照处理,建模后48 h处死动物,收集标本。HE染色观察肝脏病理改变;采用比色定量法检测各组实验动物血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、γ-谷氨酰转移酶(gamma-glutamyl transferase,GGT)、血清总胆红素(total bilirubin,TBiL)、直接胆红素(direct bilirubin,DBiL)和总胆汁酸(total bile acid,TBA)水平;采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法检测肝脏组织丙二醛(malondialdehyde,MDA)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)、白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor,TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)含量;实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测单个核细胞肿瘤坏死因子-α诱导蛋白8样分子2(tumor necrosis factor-α-induced protein8-like2,TIPE2)及肝组织Toll样受体4(Toll-like receptor 4,TLR4)、核因子-κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)mRNA表达;蛋白质印迹法(western blot,WB)检测肝组织TLR4、NF-κB和TIPE2蛋白表达。结果 与正常对照组比较,模型组血清ALT、AST、GGT、TBiL、DBiL、TBA浓度及肝组织MDA、MPO、TNF-α、IL-6、IL-1β含量明显升高($P<0.01$);TIPE2 mRNA及蛋白水平表达下调($P<0.01$),TLR4及NF-κB表达均升高($P<0.01$)。与模型组相比,给予大黄素治疗后显著降低血清ALT、AST、GGT、TBiL、DBiL、TBA浓度及肝组织MDA、MPO、TNF-α、IL-6、IL-1β含量($P<0.01$);TIPE2 mRNA及蛋白表达均升高($P<0.01$),下调TLR4及NF-κB表达($P<0.05$,$P<0.01$)。结论 大黄素可通过上调TIPE2的表达,抑制TLR4-NF-κB信号通路过度激活,进而抑制氧化应激及炎症反应,减轻胆汁淤积,发挥其保护作用。

关键词:大黄素;胆汁淤积;肿瘤坏死因子-α诱导蛋白8样分子2;Toll样受体4;核因子-κB
中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)07-0246-07

基金项目:河南省医学科技攻关省部共建重点计划项目(SBGJ202002125);河南省科技攻关计划项目(232102311124)
作者简介:刘怡静(1996-),女,河南三门峡人,硕士在读,研究方向:儿童肝脏疾病的中西医诊疗。
通讯作者:周方(1978-),女,河南郑州人,主任医师,硕士研究生导师,硕士,研究方向:儿童消化系统疾病的中西医诊疗。E-mail:zf78@163.com。

[11] 李绍康,樊袁笑,曹晓雯,等. 乌头汤加味联合盐酸替扎尼定片治疗椎间盘源性腰痛风寒瘀阻证临床观察[J]. 河北中医,2024,46(4):548-551,557.
[12] 屠金康,李方方,付腾飞,等. 改良八段锦"前三式"对神经根型颈椎病患者的疗效探究[J]. 中国全科医学,2022,25(30):3783-3788.
[13] 孙兵,车晓明. 颈椎功能障碍指数量表(NDI)[J]. 中华神经外科杂志,2012,28(6):626.
[14] 张鸣生,许伟成,林仲民,等. 颈椎病临床评价量表的信度与效度研究[J]. 中华物理医学与康复杂志,2003,25(3):151-154.
[15] 周建伟,皮燕,严攀. 660例神经根型颈椎病患者中医证候分布规律研究[J]. 四川中医,2012,30(6):69-70.
[16] 王显,赵聚峰,向益. 浅析活血化瘀法在颈型颈椎病治疗当中的应用[J]. 内蒙古中医药,2019,38(1):77-79.
[17] 陆庆旺,周红海,田君明,等. 基于文献对腰痛中医脉象特征的探讨[J]. 颈腰痛杂志,2024,45(1):195-198.
[18] 徐强. 中医药治疗痹证临床研究进展[J]. 中医药临床杂志,2012,24(10):1020-1021.
[19] 王晓东,熊桂华. 中医药对颈椎病的认识及治疗进展[J/OL]. 现代医学与健康研究(电子版),2024,8(1):138-141.
[20] 李双,黎锐,曾勇,等. 川乌的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2019,44(12):2433-2443.
[21] 刘陆,安玉芳. 中药川乌与草乌的研究进展[J]. 黑龙江中医药,2019,48(2):175-177.
[22] 马悦颖,李沧海,李兰芳,等. 桂皮醛解热镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006,11(12):1336-1339.
[23] 唐伟军,卢新华,周大现,等. 桂枝镇痛效应的药理学研究[J]. 郴州医学高等专科学校学报,2003(1):14-16.
[24] 张利青,张占刚,付岩,等. 桂皮醛药理作用的研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(23):4568-4572.
[25] UMA REDDY B,ROUTHU N K,KUMAR A. Multifaceted roles of plant derived small molecule inhibitors on replication cycle of SARS-CoV-2[J]. Microb Pathog,2022,168:105512.
[26] KARKHAH A,EBRAHIMPOUR S,ROSTAMTABAR M,et al. Helicobacter pylori evasion strategies of the host innate and adaptive immune responses to survive and develop gastrointestinal diseases[J]. Microbiol Res,2019,218:49-57.

Discussion on Protective Effect of Emodin on Intrahepatic Cholestasis in Rats Based on TIPE2/TLR4 – NF – κB Pathway

LIU Yijing, YAO Hengpan, LI Suli, ZHOU Fang
(Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Henan Children's Hospital
Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450053, Henan, China)

Abstract: *Objective* Intrahepatic cholestasis is a common pathological condition of several types of liver disorders. In this study, it aimed to investigate the hepatoprotective effect of emodin against cholestasis liver injury induced by α – naphthylisothiocyanate (ANIT) in rats. *Methods* Forty SD rats were randomly divided into control group, model group, emodin group with ANIT treatment and emodin group without ANIT treatment. Emodin group with and without ANIT treatment groups were intragastrically administrated emodin (40 mg · kg^{-1} · d^{-1}) for 7 days, and the control group and the model group were fed by sodium carboxymethylcellulose. On the 5th day after administration and fasting 4 h, the model group and the emodin group with ANIT treatment were given ANIT (50 mg · kg^{-1} · d^{-1}) to establish the intrahepatic cholestasis model, and the other two groups were fed by olive oil. At 48 h after the model establishment, the specimens were collected. The liver histopathological changes were observed by hematoxylin – eosin (HE). The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma – glutamyl transferase (GGT), total bilirubin (TBiL), direct bilirubin (DBiL) and total bile acid (TBA) in serum were determined by colorimetric quantitative method. The levels of malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), tumor necrosis factor – α (TNF – α), interleukin – 6 (IL – 6) and interleukin – 1β (IL – 1β) of liver tissue were measured by ELISA. Quantitative fluorescent PCR was used to detect the expression levels of tumor necrosis factor – α – induced protein 8 – like 2 (TIPE2), Toll – like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor kappa B (NF – κB) mRNA. Western blot was used to evaluate the changes in the protein levels of TIPE2, TLR4 and NF – κB. *Results* Compared with those in the control group, the concentrations of ALT, AST, GGT, TBiL, DBiL and TBA, the contents of MDA, MPO, TNF – α, IL – 6 and IL – 1β were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). The mRNA and protein expressions of TIPE2 were down – regulated ($P < 0.01$), while the expressions of TLR4 and NF – κB were increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, emodin treatment could reduce the levels of ALT, AST, GGT, TBiL, DBiL and TBA ($P < 0.01$), decrease the concentrations of MDA, MPO, TNF – α, IL – 6 and IL – 1β ($P < 0.01$), increase the expression of TIPE2 ($P < 0.01$), meanwhile significantly inhibit the expressions of TLR4 and NF – κB ($P < 0.05$, $P < 0.01$). *Conclusion* Emodin has a protective effect against intrahepatic cholestasis in the rats through up – regulating the expression of TIPE2 and inhibition of the TLR4/NF – κB pathway.

Keywords: emodin; cholestasis; TIPE2; TLR4; NF – κB

肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis, IHC)是指由于肝实质细胞和(或)肝内胆管疾病引起胆汁合成缺陷、排泄异常,以及胆管中胆汁流动的机械性或功能性障碍,使胆汁成分入血所致的临床症候群[1],可进一步发展为肝纤维化、肝硬化、肝衰竭,甚至死亡。然而,IHC尚缺乏有效的治疗手段,肝脏移植仍是目前唯一的潜在根治方法。大黄素(emodin)是从传统中药大黄根茎中提取的天然蒽醌类衍生物,具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌及抗癌等多种药理作用[2]。既往研究表明大黄素是重要的治疗肝内胆汁淤积的中药活性成分之一,但其发挥作用的机制尚不完全明确[3]。肿瘤坏死因子 – α 诱导蛋白8样分子2(tumor necrosis factor – α – induced protein8 – like2, TIPE2)是一种新型的负性免疫调节蛋白,在免疫反应和炎性反应中均发挥负性调节作用[4],主要通过抑制T细胞受体(TCR)和Toll样受体(Toll – like receptor, TLR)信号途径来实现负向调控效应[5-6]。Toll样受体4(TLR4)/核因子 – κB(nuclear factor kappa B, NF – κB)信号通路是肝脏组织炎症反应的重要通路,在肝内胆汁淤积的发生发展中发挥重要作用[7-8]。有研究发现,大黄素通过作用于TLR4信号通路,改善急性淤胆型肝炎[9],但是能否通过调控TIPE2表达,抑制TLR4/NF – κB信号通路减轻肝内胆汁淤积目前尚不清楚。本研究通过构建肝内胆汁淤积大鼠模型,基于TIPE2/TLR4 – NF – κB信号通路,探讨大黄素对肝内胆汁淤积症的保护作用及机制。

1 材料

1.1 *实验动物* 选取40只雄性、清洁级SD大鼠,体质量(200 ± 20) g,实验动物来自河南省实验动物中心,动物许可证号为SCXK(豫)2020 – 0001。本实验经郑州大学附属儿童医院伦理委员会批准,伦理批准号为2023 – H – H02。

1.2 药品与试剂 α-萘异硫氰酸酯(alpha-naphthylisothiocyanate,ANIT)(美国 Sigma 公司,批号:N4525-10);大黄素(日本 Tokyo Chemical Industry CO 公司,批号:E0500);大鼠丙二醛(malondialdehyde,MDA)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)、白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为 JL13297、JL10367、JL49831、JL20896、JL20884);引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成;总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号:DP443);逆转录及实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 RR037A,RR820A);BCA 蛋白定量试剂盒(杭州弗德生物科技有限公司,批号:FD2001);全蛋白提取试剂盒(批号:AR0155)、兔抗大鼠 TIPE2 抗体(批号:BA3300)、兔抗大鼠 TLR4 抗体(批号:A09398-1)、兔抗大鼠 NF-κB p65 抗体(批号:BA0610)均购自武汉博士德生物工程有限公司;山羊抗兔 IgG-HRP 二抗(广州财盛生物科技有限公司,批号:PL003);兔抗大鼠 GAPDH 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bsm-0978M)。

1.3 实验仪器 贝克曼库尔特 AU680 自动生化分析仪(美国,贝克曼库尔特公司);Light Cycler 480 Ⅱ实时荧光定量 PCR 仪(瑞士,Roche 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备 雄性 SD 大鼠正常喂养 1 周后,采用随机数字表法将大鼠分为正常对照组、模型组、模型+大黄素组、正常+大黄素组,每组 10 只。大黄素用羧甲基纤维素钠配制成 0.4% 浓度,ANIT 用橄榄油配制成 1% 浓度,冷藏备用。正常对照组及模型组给予羧甲基纤维素钠 10 mL·kg^{-1}·d^{-1},模型+大黄素组及正常+大黄素组给予大黄素 40 mg·kg^{-1}·d^{-1},1 次/d,共 7 d;于实验第 5 天给药后 4 h,模型组及模型+大黄素组给予 ANIT 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃 1 次,建立肝内胆汁淤积模型,正常对照组及正常+大黄素组等量橄榄油处理;实验第 7 天给药后 4 h,即模型建立后 48 h,采集大鼠血、单个核细胞及肝脏组织进行进一步研究。

2.2 血清学指标检测 血清从-20 ℃冰箱中取出,室温下平衡 30 min,自动生化分析仪检测血清总胆红素(total bilirubin,TBiL),直接胆红素(direct bilirubin,DBiL),γ-谷氨酰转移酶(gamma-glutamyl transferase,GGT),丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT),天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)和总胆汁酸(total bile acid,TBA)等生化指标。

2.3 肝组织病理形态学检查 肝组织固定,石蜡包埋,5 μm 切片,依次苏木精-伊红染色、烘干、脱水、封片,光学显微镜下观察病理变化。

2.4 肝组织 MDA、MPO、TNF-α、IL-6 及 IL-1β 水平检测 肝脏组织匀浆后根据试剂盒说明书操作方法,用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测肝组织中 MDA、MPO、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量。

2.5 实时荧光定量聚合酶反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测肝组织 TIPE2、TLR4 及 NF-κB mRNA 表达水平 应用 RNA 提取试剂盒从单个核细胞和肝组织中提取总 RNA,清除残存的基因组 DNA 后,测定其浓度,根据逆转录试剂盒说明书反转录为 cDNA,并置于-20 ℃保存。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应模式:95 ℃预变性 30 s,每次循环 95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,40 个循环。以管家基因 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标 mRNA 的表达。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	长度/(bp)
TIPE2	Forward:5'-AGCTGTGCATTCTCTCCAACA-3'	182
	Reverse:5'-ACGGTTCATCACCACTGTCAC-3'	
TLR4	Forward:5'-AAGATCAACCGATGGAC-3'	114
	Reverse:5'-CTTTCAGGGAATTAGGC-3'	
NF-κB	Forward:5'-AAGATCAACCGATGGAC-3'	118
	Reverse:5'-CTTTCAGGGAATTAGGC-3'	
GAPDH	Forward:5'-GCTGACAATCTTGAGGGAG-3'	158
	Reverse:5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTT-3'	

2.6 蛋白质印迹法(western blot,WB)检测 TIPE2、TLR4 和 NF-κB 蛋白表达水平 按照试剂盒说明书提取单个核细胞和肝组织总蛋白,采用 BCA 法测定总蛋白浓度。调整蛋白浓度后取 40 μg 样品 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入目的蛋白 TIPE2(1∶500)、TLR4(1∶1000)、NF-κB(1∶1000)和内参蛋白 GAPDH(1∶500)的一抗 4 ℃孵育过夜,洗涤后室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶10 000)1.5 h,ECL 化学发光成像系统成像,用目标蛋白与内参条带灰度值比值表示结果。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较,方差齐同时采用 LSD-t 检验,方差不齐时采用 *Tamhane* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄素对各组大鼠肝组织病理形态的影响 与正常对照组相比,模型组肝脏组织病理学检查显示弥漫性汇管区卵圆细胞增生伴炎性细胞浸润,胆管增生,部分胆管上皮细胞坏死,胆管扩张,管腔内嗜酸性物质沉积;相较于模型组,给予大黄素处理后,胆管增生及炎症减轻,嗜酸性物质沉积减少;而正常组及正常+大黄素组肝细胞排列整齐,肝小叶完整,未见肝实质细胞病变,中央静脉和汇管区结构正常。见插页ⅩⅩⅩⅢ图 1。

3.2 大黄素对各组大鼠血清肝功能指标的影响 与正常对照组相比,模型组血清 ALT、AST、GGT、TBiL、DBiL 及 TBA 均明显升高($P<0.01$);与模型组相比,给予大黄素后显著降低血清 ALT、AST、GGT、TBiL、DBiL 及 TBA 水平,差异有统计学意义($P<0.01$);正常对照组和正常+大黄素组肝功能各指标比较

表 2 各组大鼠 ALT、AST、GGT、TBiL、DBiL 和 TBA 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	GGT/(U/L)	TBiL/(μmol/L)	DBiL/(μmol/L)	TBA/(μmol/L)
正常对照组	10	64.80 ± 12.80	272.60 ± 19.10	1.00 ± 0.82	2.13 ± 0.77	0.37 ± 0.25	15.39 ± 9.57
模型组	10	629.30 ± 139.71**	1 104.20 ± 223.83**	4.90 ± 0.88**	53.72 ± 22.41**	26.03 ± 14.47**	248.74 ± 67.83**
模型 + 大黄素组	10	119.20 ± 43.49*##	469.20 ± 35.84**##	2.10 ± 0.74**##	4.72 ± 0.40**##	1.60 ± 0.30**##	48.41 ± 10.07**##
正常 + 大黄素组	10	85.20 ± 31.87##	257.90 ± 34.12##	1.30 ± 0.67##	2.49 ± 0.32##	0.29 ± 0.11##	16.65 ± 0.64##
W/F 值		54.113	18.317	51.986	18.472	17.346	15.084
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：* 与正常对照组比较，$P<0.05$，** 与正常对照组比较，$P<0.01$；## 与模型组比较，$P<0.01$。

表 3 各组大鼠 MDA、MPO、TNF－α、IL－6 和 IL－1β 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA/(nmol/mg)	MPO/(ng/mL)	TNF－α/(pg/mg)	IL－6/(pg/mg)	IL－1β/(pg/mg)
正常对照组	10	3.00 ± 0.06	0.73 ± 0.06	1.03 ± 0.00	1.44 ± 0.04	0.95 ± 0.04
模型组	10	7.44 ± 0.15**	5.65 ± 0.12**	2.96 ± 0.02**	4.64 ± 0.12**	7.67 ± 0.10**
模型 + 大黄素组	10	3.81 ± 0.17**##	1.12 ± 0.03**##	1.27 ± 0.05**##	1.56 ± 0.03**##	1.43 ± 0.02**##
正常 + 大黄素组	10	3.03 ± 0.08##	0.74 ± 0.03##	1.04 ± 0.02##	1.42 ± 0.02##	0.95 ± 0.04##
W/F 值		2 419.636	5 538.886	45 862.144	2 194.766	12 391.684
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：** 与正常对照组比较，$P<0.01$；## 与模型组比较，$P<0.01$。

差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

3.3 大黄素对各组大鼠肝组织 MDA、MPO、TNF－α、IL－6 及 IL－1β 的影响 与正常对照组相比，模型组 MDA、MPO、TNF－α、IL－6 和 IL－1β 显著升高($P<0.01$)；与模型组相比，给予大黄素后，可显著降低肝组织 MDA、MPO 含量及 TNF－α、IL－6、IL－1β 水平($P<0.01$)；正常对照组和正常 + 大黄素组比较，MDA、MPO、TNF－α、IL－6、IL－1β 含量差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

3.4 大黄素对各组大鼠 TIPE2、TLR4 和 NF－κB mRNA 表达的影响 与正常对照组相比，模型组 TLR4 和 NF－κB mRNA 表达明显升高，TIPE2 mRNA 表达明显降低($P<0.01$)；相较于模型组，给予大黄素治疗后，TIPE2 mRNA 表达增加，TLR4 和 NF－κB mRNA 表达下降($P<0.01$)。与正常对照组相比，正常 + 大黄素组 TIPE2、TLR4 和 NF－κB mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠 TIPE2、TLR4 和 NF－κB mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TIPE2	TLR4	NF－κB
正常对照组	10	1.00 ± 0.02	1.45 ± 0.04	0.98 ± 0.01
模型组	10	0.71 ± 0.082**	3.05 ± 0.18**	3.03 ± 0.14**
模型 + 大黄素组	10	0.86 ± 0.02**##	1.98 ± 0.08**##	2.00 ± 0.11**##
正常 + 大黄素组	10	0.98 ± 0.01##	1.44 ± 0.02##	0.99 ± 0.01##
W 值		18.959	366.787	17.912
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001

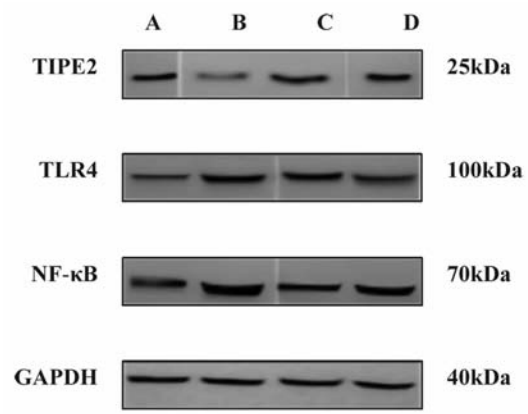
注：** 与正常对照组比较，$P<0.01$；## 与模型组比较，$P<0.01$。

3.5 大黄素对各组大鼠 TIPE2、TLR4 及 NF－κB 蛋白表达的影响 与正常对照组相比，模型组 TIPE2 蛋白表达明显降低，TLR4 和 NF－κB 蛋白表达明显升高($P<0.01$)；和模型组对比，给予大黄素后，TIPE2 蛋白表达水平显著升高，TLR4 和 NF－κB 蛋白表达水平均显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与正常对照组相比，正常 + 大黄素组 TIPE2、TLR4 和 NF－κB 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5 及图 2。

表 5 各组大鼠 TIPE2、TLR4 和 NF－κB 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TIPE2	TLR4	NF－κB
正常对照组	10	1.04 ± 0.06	1.04 ± 0.04	1.31 ± 0.05
模型组	10	0.50 ± 0.03**	1.24 ± 0.06**	2.02 ± 0.04**
模型 + 大黄素组	10	0.81 ± 0.03**##	1.16 ± 0.03**#	1.12 ± 0.06**##
正常 + 大黄素组	10	1.00 ± 0.05##	1.08 ± 0.03##	1.07 ± 0.07##
W 值		36.136	34.439	1.946
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001

注：** 与正常对照组比较，$P<0.01$；# 与模型组比较，$P<0.05$；## 与模型组比较，$P<0.01$。



注：A 正常对照组；B 模型组；C 模型 + 大黄素组；D 正常 + 大黄素组。

图 2 Western Blot 检测各实验组大鼠 TIPE2、TLR4 和 NF－κB 蛋白表达

4 讨论

IHC 是一组临床症候群，常见于药物性肝损害、原发性胆汁性胆管炎、非酒精性脂肪性肝病、妊娠期肝内胆汁淤积症、原发性硬化性胆管炎、酒精性肝炎、自身免疫性肝炎、遗传性胆汁淤积及病毒性肝炎等肝脏疾病。其发病率在世界各地差异较大，中国香港发病率为 3.1/10 万，但 2016 年日本研究显示其

流行率可达 33.8/10 万,与欧洲、美国和加拿大等国家相当[1]。胆汁淤积早期若得不到及时治疗,肝细胞在高浓度胆汁酸的作用下可快速进展为肝纤维化及肝硬化,常见的途径包括:细胞膜脂质成分的破坏、氧化应激及死亡受体信号激活等。目前,肝内胆汁淤积症的治疗以改善临床症状和肝脏损伤为主,主要的药物有熊去氧胆酸、S-腺苷蛋氨酸、考来烯胺、奥贝胆酸和贝特类药等[1]。然而,其治疗效果并不令人十分满意,约 1/3 患者对熊去氧胆酸不敏感[10],高剂量的奥贝胆酸不仅可导致严重瘙痒,还可增加代偿期原发性胆汁性胆管炎患者的肝脏失代偿风险[11]。因此,需要进一步探索有效治疗 IHC 的药物。目前国内外公认 ANIT 单次给药诱导能够建立模拟人类肝内胆汁淤积动物模型,故本实验应用这一模型进行研究。

大黄素即 1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌,是从多种中草药如大黄、虎杖、何首乌中提取出的活性成分,在治疗肝脏疾病中具有巨大的潜力[3,12]。有实验证实,含大黄素的中药合剂可增加法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor,FXR)、胆盐输出泵(bile salt export pump,BSEP)、多药耐药相关蛋白 2、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 和有机阴离子转运多肽 1A4 的表达水平,缓解肝内胆汁淤积症大鼠的临床症状[13-14]。XIONG X L 等[15]研究发现大黄素可通过促进 FXR 及其下游分子 BSEP 表达,引起胆汁酸合成减少,解毒及转运增加,从而发挥对急性淤胆型肝炎大鼠的保护作用。在脂质代谢方面,大黄素可以抑制脂质过氧化,抑制炎症反应和氧化应激[3]。既往研究报道,大黄素在减轻非酒精性脂肪性肝病的炎症反应[16],缓解脂多糖诱导的急性肝炎中发挥重要作用[17]。本研究发现,ANIT 模型组大鼠血清胆红素、转氨酶及胆汁酸水平显著升高,肝脏组织病理切片显示弥漫性汇管区卵圆细胞增生伴炎性细胞浸润,胆管增生、扩张,部分胆管上皮细胞坏死,提示肝内胆汁淤积模型构建成功;给予大黄素治疗后,肝功能指标明显好转,肝组织病理改善,与 XIONG X L 等[15]研究一致,证实了大黄素对淤胆型肝炎的治疗作用。本实验进一步对比正常对照组与正常+大黄素组大鼠的肝功能指标及肝脏组织病理,发现无显著差异,提示在此治疗剂量下,大黄素对大鼠肝脏无损伤等不良反应。

胆汁淤积早期,由于炎症反应产生大量的细胞因子和趋化因子等炎症介质,诱导中性粒细胞在肝组织中聚集、浸润和活化,中性粒细胞通过脱颗粒释放蛋白酶和活性氧攻击靶细胞,引起细胞内氧化应激及其坏死凋亡[18]。当活性氧的生成量超过机体清除能力时,细胞内脂质蛋白会被大量自由基氧化,损伤细胞膜,加剧炎症反应,促进炎症因子 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 的生成[19]。MPO 是介导脂质过氧化的一种过氧化物酶,MDA 是脂质过氧化过程中形成的次级产物,其水平与脂质过氧化呈正相关[20-21]。本研究发现,模型组大鼠的 MPO、MDA、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平显著升高,与既往研究结果一致[22]。易巍等[23]发现,使用含大黄素的利胆合剂可显著降低胆汁淤积性肝纤维化患儿 MDA 水平。本研究发现,给予大黄素治疗后,MPO、MDA、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平显著下降,说明大黄素通过抑制氧化应激及炎症反应,发挥保护肝脏的作用。

TLR4/NF-κB 信号通路是参与炎症反应的经典信号通路[24],在胆汁淤积形成过程中起重要作用[25]。在胆汁淤积的发生发展过程中,过度的炎症反应可激活 TLR4 信号通路,促进 NF-κB 的核易位,诱导 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 等炎症因子 mRNA 转录;而 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 等作为细胞外刺激因子,又可激活 NF-κB,进一步放大炎症反应[8]。本实验结果显示,模型组大鼠 TLR4 和 NF-κB 的表达增加,炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的水平升高,与既往研究结果一致[26],此结果提示 ANIT 诱导的肝内胆汁淤积形成过程中启动了 TLR4/NF-κB 信号通路。FAYED A M 等[27]发现,下调 TLR4/NF-κB 信号通路能够明显改善肝内胆汁淤积大鼠的临床表现。本研究发现,进一步给予大黄素干预后,TLR4 及 NF-κB 的表达显著下降,炎症因子 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 的水平明显下降,提示大黄素通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路,减轻炎症细胞浸润,发挥促进肝脏功能恢复的作用。

TIPE2 是位于肝细胞、胃、结肠和淋巴组织等细胞核和细胞质中的一种负性免疫调节蛋白,可调节固有免疫及适应性免疫,维持机体免疫系统环境的稳定,参与炎症、免疫及肿瘤性疾病的发生发展[4]。TIPE2 可通过负调控 T 细胞受体和 Toll 样受体信号转导,在维持免疫稳态中发挥关键作用[5]。大量研究表明,TIPE2 在肝炎、肝硬化以及肝细胞癌中均有明显改变,参与了不同肝脏疾病发生发展过程[4]。TIPE2 的表达在乙型肝炎及原发性胆汁性胆管炎中下调,并且敲除 TIPE2 会加重肝脏炎症和损伤[28]。LIU Y P 等[29]发现,TIPE2 直接与转化生长因子-β 激活激酶 1 结合并抑制其下游通路,预防肝脏脂肪变性和非酒精性脂肪性肝炎的恶化。YAO R 等[30]发现,上调 TIPE2,可降低 TLR4 及 NF-κB 表达,降低炎症因子 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 释放,改善心肌肥厚及纤维化,发挥保护心脏的作用。基于此,TIPE2/TLR4-NF-κB 信号通路有望成为治疗肝内胆汁淤积症的新靶点。本研究发现,模型组大鼠 TIPE2 表达下降,TLR4 和 NF-κB 表达升高,给予大黄素治疗后,上调 TIPE2 表达,TLR4 和 NF-κB 表达下降,下游炎性因子的水平同时显著下降,提示大黄素可能是通过上调 TIPE2,抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的激活,改善大鼠肝内胆汁淤积的进程。

综上所述,大黄素可减轻肝内胆汁淤积,其作用机制可能与上调 TIPE2 表达,抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的激活,进而减轻肝脏氧化应激和炎性反应有关。本研究为大黄素治疗肝内胆汁淤积症作用机制的探索提供了一定的实验基础,为疾病的精准诊疗提供新靶点。

参考文献

[1] 国家感染性疾病临床医学研究中心, 李兰娟, 陈燕飞, 等. 肝内胆汁淤积症诊治专家共识(2021 年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(2): 137-146.

[2] GAO J S, LI Y S, CHEN J H, et al. Emodin ameliorates acute radi-

ation proctitis in mice by regulating AKT/MAPK/NF - κB/VEGF pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 132: 111945.

[3] HU N H, LIU J, XUE X Y, et al. The effect of emodin on liver disease —comprehensive advances in molecular mechanisms[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 882: 173269.

[4] GAO J, ZHANG H T, ZHANG F. Research progress of TIPE2 in immune - related diseases [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 121: 110514.

[5] GOLDSMITH J R, CHEN Y H. Regulation of inflammation and tumorigenesis by the TIPE family of phospholipid transfer proteins[J]. Cell Mol Immunol, 2017, 14(6): 482 - 487.

[6] XUE J H, CHEN F, WANG J, et al. Emodin protects against concanavalin A - induced hepatitis in mice through inhibiting activation of the p38 MAPK - NF - κB signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(4): 1557 - 1570.

[7] KHAYAT M T, MOHAMMAD K A, MOHAMED G A, et al. γ - Mangostin abrogates AINT - induced cholestatic liver injury: Impact on Nrf2/NF - κB/NLRP3/Caspase - 1/IL - 1β/GSDMD signalling [J]. Life Sci, 2023, 322: 121663.

[8] FAWZY M A, NASR G, ALI F E M, et al. Quercetin potentiates the hepatoprotective effect of Sildenafil and/or pentoxifylline against intrahepatic cholestasis: Role of Nrf2/ARE, TLR4/NF - κB, and NLRP3/IL - 1β signaling pathways[J]. Life Sci, 2023, 314: 121343.

[9] DING Y, LIU P, CHEN Z L, et al. Emodin attenuates lipopolysaccharide - induced acute liver injury *via* inhibiting the TLR4 signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 962.

[10] KUIPER E M M, HANSEN B E, DE VRIES R A, et al. Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid[J]. Gastroenterology, 2009, 136(4): 1281 - 1287.

[11] JOHN B V, SCHWARTZ K, LEVY C, et al. Impact of obeticholic acid exposure on decompensation and mortality in primary biliary cholangitis and cirrhosis[J]. Hepatol Commun, 2021, 5(8): 1426 - 1436.

[12] YU L Y, ZHAO Y L, ZHAO Y L. Advances in the pharmacological effects and molecular mechanisms of emodin in the treatment of metabolic diseases[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1240820.

[13] XIA Y F, YAN S X, CHANG Y, et al. Mechanism and active components of Qingre Lidan Tablets alleviate intrahepatic cholestasis by activating the farnesoid X receptor[J]. Evid Based Complementary Altern Med, 2022, 2022(1): 1589388.

[14] YI Y X, DING Y, ZHANG Y, et al. Yinchenhao decoction ameliorates alpha - naphthylisothiocyanate induced intrahepatic cholestasis in rats by regulating phase Ⅱ metabolic enzymes and transporters [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 510.

[15] XIONG X L, DING Y, CHEN Z L, et al. Emodin rescues intrahepatic cholestasis *via* stimulating FXR/BSEP pathway in promoting the canalicular export of accumulated bile[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 522.

[16] LI S, WU X, MA Y, et al. Prediction and verification of the active ingredients and potential targets of Erhuang Quzhi Granules on non - alcoholic fatty liver disease based on network pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 311: 116435.

[17] XIE R J, LIU M, LI S J. Emodin weakens liver inflammatory injury triggered by lipopolysaccharide through elevating microRNA - 145 *in vitro* and *in vivo*[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 1877 - 1887.

[18] LIEW P X, KUBES P. The neutrophil's role during health and disease[J]. Physiol Rev, 2019, 99(2): 1223 - 1248.

[19] HUANG X, HE D, PAN Z, et al. Reactive - oxygen - species - scavenging nanomaterials for resolving inflammation[J]. Mater Today Bio, 2021, 11: 100124.

[20] MALLE E, FURTMÜLLER P G, SATTLER W, et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? [J]. Br J Pharmacol, 2007, 152(6): 838 - 854.

[21] SOMI M H, KALAGEYCHI H, HAJIPOUR B, et al. Lipoic acid prevents hepatic and intestinal damage induced by obstruction of the common bile duct in rats[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(10): 1305 - 1310.

[22] CAO W R, GE J Q, XIE X, et al. Protective effects of petroleum ether extracts of Herpetospermum caudigerum against α - naphthylisothiocyanate - induced acute cholestasis of rats[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 198: 139 - 147.

[23] 易巍, 鄢素琪, 汤建桥, 等. 中药利胆合剂调节氧化应激拮抗婴儿胆汁淤积性肝纤维化的临床观察[J]. 中华危重病急救医学, 2023, 35(7): 741 - 745.

[24] 高婵婵, 张海博, 魏海梁, 等. 基于肠 - 肝 - 脑轴探讨益木脑液灌肠对肝性脑病大鼠 TLR4/NF - κB/NLRP3 通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(6): 2599 - 2604.

[25] FANG S, WANG T M, LI Y Y, et al. Gardenia jasminoides Ellis polysaccharide ameliorates cholestatic liver injury by alleviating gut microbiota dysbiosis and inhibiting the TLR4/NF - κB signaling pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 205: 23 - 36.

[26] SU H Z, WANG Q, LI Y, et al. Effect of different ratios of Yinchen and Gancao decoction on ANIT - treated cholestatic liver injury in mice and its potential underlying mechanism[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 611610.

[27] FAYED A M, ABDALLA E A, HASSAN S A, et al. Downregulation of TLR4 - NF - κB - p38 MAPK signalling in cholestatic rats treated with cranberry extract[J]. Pak J Biol Sci, 2022, 25(2): 112 - 122.

[28] QIN B D, WEI T T, WANG L L, et al. Decreased expression of TIPE2 contributes to the hyperreactivity of monocyte to Toll - like receptor ligands in primary biliary cirrhosis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2016, 31(6): 1177 - 1183.

[29] LIU Y P, SONG J J, YANG J, et al. Tumor necrosis factor α - induced protein 8 - like 2 alleviates nonalcoholic fatty liver disease through suppressing transforming growth factor beta - activated kinase 1 activation[J]. Hepatology, 2021, 74(3): 1300 - 1318.

[30] YAO R, KONG L Y, YANG C L, et al. Tumor necrosis factor - α - induced protein 8 - like 2 ameliorates cardiac hypertrophy by targeting TLR4 in macrophages[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9469143.

桂枝茯苓汤加味对宫颈癌术后放化疗及 T 淋巴细胞的影响

(正文见 214 – 218 页)

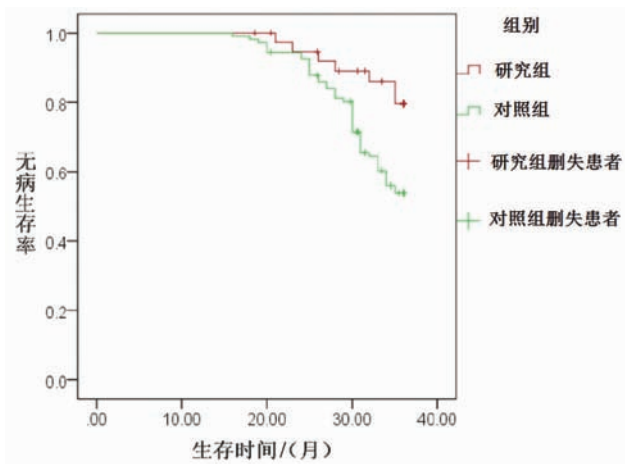


图 1 两组宫颈癌患者的 Kaplan – Meier 无病生存曲线

基于 TIPE2/TLR4 – NF – κB 通路探讨大黄素对肝内胆汁淤积大鼠的保护作用

(正文见 246 – 251 页)

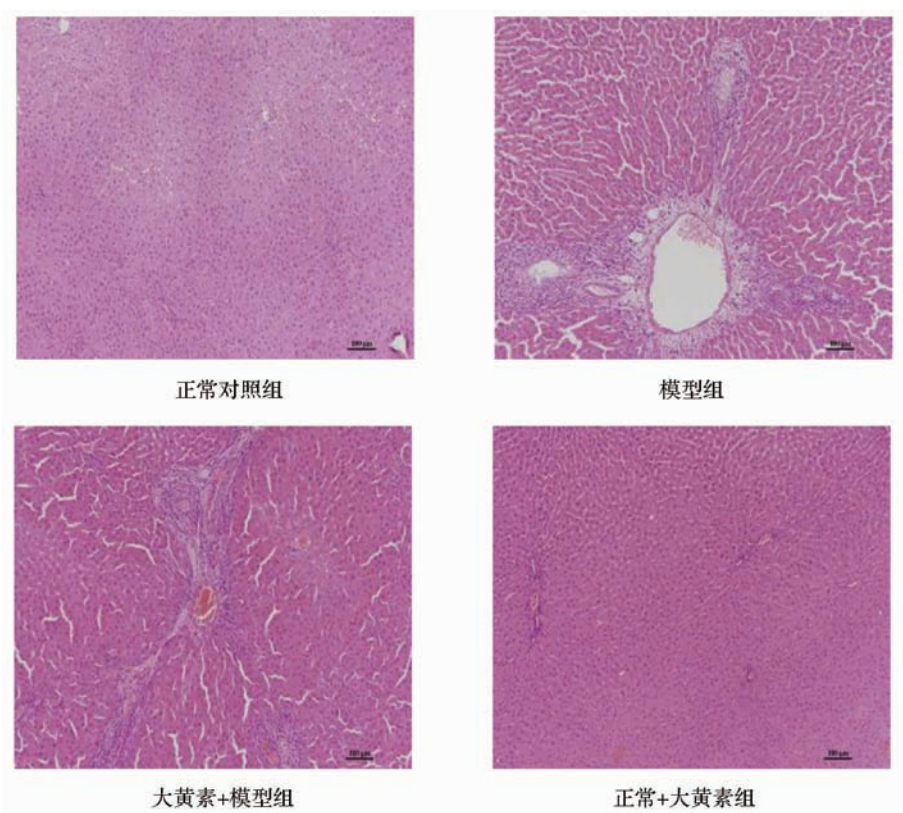


图 1 各组大鼠肝脏组织病理学表现(HE, ×100)