基于 Fas－Bax/Bcl－2 信号轴探讨退黄合剂对胆汁淤积大鼠肝细胞凋亡的影响*

马瑞雪[1]，朱正望[1]，王琳琳[1]，赵静涵[1]，苗明三[1]，王兵[2]，蔡庆春[3]，朱平生[1]

1. 河南中医药大学，河南 郑州 450046；2. 上海交通大学医学院附属第六人民医院，上海 200233；
3. 河南中医药大学第三附属医院，河南 郑州 450008

摘要：目的：观察退黄合剂对胆汁淤积大鼠肝细胞凋亡的影响，并基于 Fas－Bax/Bcl－2 信号轴探讨相关作用机制。方法：从 40 只 Wistar 大鼠中随机选取 10 只大鼠作为空白组（CON 组），其余大鼠采用 α－萘异硫氰酸酯（alpha－naphthylisothiocyanate，ANIT）诱导胆汁淤积模型。将造模大鼠随机分为模型组（MODEL 组）、熊去氧胆酸组（UDCA 组，100 mg·kg^{-1}）、退黄合剂组（THM 组，17.25 g·kg^{-1}），每组 10 只。各组大鼠以纯水或药物灌胃，每天 1 次，连续 3 d。采用全自动生化分析仪检测大鼠血清中总胆红素（total bilirubin，TBIL）、γ－谷氨酰转肽酶（gamma－glutamyl transferase，γ－GT）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）、谷丙转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、谷草转氨酶（aspartate transaminase，AST）水平。采用 HE 染色法观察大鼠肝脏病理形态，Western blot 和 qRT－PCR 法检测肝脏 Fas、B 细胞淋巴瘤－2（B－cell lymphoma－2，Bcl－2）、Bax、胱天蛋白酶 8（Caspase－8）、胱天蛋白酶 3（Caspase－3）蛋白和基因表达水平。结果：与 CON 组比较，MODEL 组大鼠血清中 ALT、AST、ALP、γ－GT、TBIL 水平升高（$P<0.01$）。与 MODEL 组比较，UDCA 组大鼠血清中 γ－GT、TBIL 水平降低（$P<0.01$）；THM 组大鼠血清中 ALT、AST、γ－GT、TBIL 水平降低（$P<0.05$）。HE 染色显示，CON 组大鼠肝脏病理形态无明显异常。MODEL 组大鼠肝脏可见小叶间胆管增生，炎症细胞浸润及细胞凋亡。与 MODEL 组比较，UDCA 组和 THM 组大鼠肝脏病理形态明显改善。与 CON 组比较，MODEL 组大鼠肝脏 Caspase－8、Caspase－3、Fas、Bax 蛋白和基因表达水平升高（$P<0.05$）。与 MODEL 组比较，THM 组大鼠肝脏 Caspase－8、Caspase－3、Fas、Bax 蛋白和基因表达水平降低，*Bcl－2* mRNA 水平升高（$P<0.05$）。结论：退黄合剂可能通过调控 Fas－Bax/Bcl－2 信号轴、抑制细胞凋亡，从而发挥改善胆汁淤积大鼠肝功能的作用。

关键词：退黄合剂；胆汁淤积；细胞凋亡；Fas－Bax/Bcl－2 信号轴；Fas；Bax；Bcl－2；大鼠
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.08.284
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)08－1764－06

The Effect of Tuihuang Mixture on Hepatocyte Apoptosis in Cholestatic Rats Based on Fas－Bax/Bcl－2 Signaling Axis

MA Ruixue[1]，ZHU Zhengwang[1]，WANG Linlin[1]，ZHAO Jinghan[1]，MIAO Mingsan[1]，
WANG Bing[2]，CAI Qingchun[3]，ZHU Pingsheng[1]

1. Henan University of Chinese Medicine，Zhengzhou Henan China 450046；2. The Sixth People's Hospital Affiliated to Medicine School of Shanghai Jiao Tong University，Shanghai China 200233；3. The Third Affiliated Hospital of Henan University to Chinese Medicine，Zhengzhou Henan China 450008

Abstract：Objective：To observe the effect of Tuihuang Mixture on hepatocyte apoptosis in cholestatic rats，and to explore the related mechanism based on the Fas－Bax/Bcl－2 signaling axis. Methods：Ten rats were randomly selected from 40 Wistar rats as the blank group（CON group），and the remaining rats were induced by α－naphthylisothiocyanate（ANIT）to induce cholestasis. The rats were

* **基金项目**：国家自然科学基金面上项目（82074340）；河南省“双一流”创建学科中医学科学研究专项项目（HSRP－DFCTCM－2023－1－19，HSRP－DFCTCM－2023－8－32）；河南省科技创新人才计划－杰出青年项目（154100510020）

randomly divided into model group (MODEL group), ursodeoxycholic acid group (UDCA group, 100 mg · kg^{-1}) and antiyellowing mixture group (THM group, 17.25 g · kg^{-1}), with 10 rats in each group. The rats in each group were gavaged with pure water or drug once a day for 3 consecutive days. The total bilirubin (TBIL), γ - glutamyl transferase (γ - GT), alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase in the serum of rats were detected by an automatic biochemical analyzer transaminase, AST) levels. The pathological morphology of rat liver was observed by HE staining, and the protein and gene expression levels of Fas, B - cell lymphoma - 2 (Bcl - 2), Bax, Caspase - 8 and Caspase - 3 were detected by Western blot and qRT - PCR. Results: Compared with the CON group, the serum levels of ALT, AST, ALP, γ - GT and TBIL in the MODEL group increased ($P < 0.01$). Compared with the MODEL group, the serum levels of γ - GT and TBIL in the UDCA group decreased ($P < 0.01$), and the serum levels of ALT, AST, γ - GT and TBIL in the THM group decreased ($P < 0.05$). HE staining showed that there was no obvious abnormality in the pathological morphology of the liver of rats in the CON group. Interlobular bile duct hyperplasia, inflammatory cell infiltration and apoptosis were seen in the liver of rats in the MODEL group. Compared with the MODEL group, the liver pathological morphology of the UDCA group and the THM group was significantly improved. Compared with the CON group, the liver liver expression levels of Caspase - 8, Caspase - 3, Fas and Bax in the MODEL group were increased ($P < 0.05$). Compared with the MODEL group, the protein and gene expression levels of Caspase - 8, Caspase - 3, Fas and Bax in the liver of the THM group were decreased, and the mRNA level of Bcl - 2 was increased ($P < 0.05$). Conclusion: Tuihuang Mixture may play a role in improving liver function in cholestatic rats by regulating the Fas - Bax/Bcl - 2 signaling axis and inhibiting apoptosis.

Key words: Tuihuang Mixture; cholestasis; apoptosis; Fas - Bax/Bcl - 2 signal axis; Fas; Bax; Bcl - 2; rat

胆汁淤积是指肝内外因素引起的胆汁合成、分泌及排泄异常，导致胆汁酸不能正常流入十二指肠，而在肝脏和体循环中过度蓄积的一种常见消化系统疾病[1]。流行病学调查显示，慢性肝病患者中胆汁淤积的发生率为 10.26%，且随着年龄增长发病率呈上升趋势[2]。胆汁淤积的发病机制复杂，包括药物、自身免疫、感染、代谢及家族遗传等因素，预后差异较大[3]。若未对胆汁淤积进行及时有效的治疗，可能导致胆管增生、纤维化，甚至进展为肝硬化、肝衰竭和肝癌[4]。目前，一线治疗药物熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)存在较高比例的应答不佳问题，二线药物如奥贝胆酸有明显不良反应[5-6]。因此，积极探索和研发有效的治疗药物仍为当务之急。

Fas/Fas - L 死亡受体途径和 B 细胞淋巴瘤 - 2 (B - cell lymphoma - 2, Bcl - 2)家族介导的线粒体凋亡途径是调控细胞凋亡的 2 条经典信号通路[7]。前者为外在信号通路，启动因素在细胞膜表面；后者为内在信号通路，主要发生在线粒体。这 2 条途径存在协同效应，细胞凋亡的发生通常需要两者相互配合共同完成。研究发现，当 Fas/Fas - L 死亡受体途径诱导的胱天蛋白酶(Caspase)级联反应不够充分时，会进一步启动线粒体凋亡途径，激活线粒体膜上 Bax/Bcl - 2 受体，使 Caspase 级联反应更彻底，直至诱导细胞凋亡过程[8]。研究发现，疏水胆汁酸对肝细胞具有直接毒性，可刺激 Fas 抗原从细胞质向细胞膜转移并聚集，通过 Fas/Fas - L 死亡受体途径使特定细胞表面受体与其内源性同源配体结合，从而引起肝细胞凋亡[9-10]。因此推测，通过药物干预 Fas - Bax/Bcl - 2 信号轴，可能抑制肝细胞凋亡，从而发挥改善胆汁淤积、保护肝细胞的功效。

退黄合剂是河南中医药大学第一附属医院的院内制剂，在改善肝病患者肝功能、降低胆红素水平、延缓病情进展方面有显著作用[11]，但其对受损肝细胞的保护作用机制尚不明确。因此，本研究采用 α - 异硫氰酸奈酯(alpha - naphthylisothiocyanate, ANIT)灌胃建立胆汁淤积动物模型，观察退黄合剂对肝细胞凋亡的影响，并基于 Fas - Bax/Bcl - 2 信号轴探讨相关作用机制。

1　材料

1.1　实验动物　SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只，体质量(200 ± 10) g，购自济南朋悦实验动物繁育有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK(鲁)20220006。所有大鼠适应性饲养 7 d，常规进食和饮水。本研究由河南中医药大学实验动物福利伦理委员会批准，批号：202409009。

1.2　药物与试剂　退黄合剂(河南中医药大学第一附属医院，批号：230818)；熊去氧胆酸胶囊(德国 Losan Pharma GmbH 公司，批号：L20063A)；ANIT(上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号：G2306124)；乌拉坦(上海麦克林生化科技股份有限公司，批号：C15348964)；谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、γ - 谷氨酰转肽酶(gamma - glutamyl transfer-

ase，γ－GT）、总胆红素（total bilirubin，TBIL）测定试剂盒（深圳迈瑞动物医疗科技股份有限公司，批号：140124008、140224001、140323015、140423012、147424003）；高效 RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，批号：2312009、240003008）；Caspase－3 抗体、Fas 抗体、Bcl－2 抗体、Caspase－8 抗体（北京博奥森生物技术有限公司，批号：BD01051488、BC04577370、BC12126821、BC04913076）；Bax 抗体（武汉三鹰生物有限公司，批号：00148199）；ReverTra Ace® qPCR RT Kit（日本 TOYOBO 公司，批号：256200）；Universal SYBR Green qPCR Super Mix（苏州宇恒生物科技有限公司，批号：230807L01－01）。

1.3　实验仪器　KZ－Ⅲ－F 高速低温组织研磨仪（武汉赛维尔生物科技有限公司）；KF－PRO－005 数字病理切片扫描系统（宁波江丰生物信息技术有限公司）；BS－240VET 全自动生化分析仪（深圳迈瑞动物医疗科技有限公司）；NaNoDrop One 超微量分光光度计、Thermal Cycler Block 5020 梯度 PCR 仪、QuantStudio 6 Flex 实时荧光定量 PCR 系统（美国 ThermoFisher Scientific 公司）；Odyssey Clx 近红外双色激光成像系统（美国 LI－COR 公司）。

2　方法

2.1　分组、造模及给药　从 40 只 Wistar 大鼠中随机选取 10 只大鼠作为空白组，其余大鼠采用 ANIT 诱导胆汁淤积模型[12]。具体方法如下：大鼠禁食不禁水 12 h，灌胃 100 mg·kg^{-1} ANIT（以橄榄油为溶剂）；空白组大鼠给予 5 mL·kg^{-1}橄榄油灌胃。造模 24 h 后，大鼠随机分为模型组、熊去氧胆酸组、退黄合剂组，每组 10 只。按照成人（60 kg）临床用量换算成大鼠的等效剂量，即退黄合剂组大鼠的灌胃剂量为 17.25 g·kg^{-1}，熊去氧胆酸组大鼠的灌胃剂量为 100 mg·kg^{-1}，空白组和模型组大鼠给予等体积纯水灌胃，每天 1 次，连续 3 d。

2.2　样本采集和处理　末次灌胃 2 h 后，大鼠以 20% 乌拉坦（5 mL·kg^{-1}）腹腔注射麻醉，腹主动脉取血，3 500 r·min^{-1}离心 10 min，分离血清于－40 ℃保存备用。解剖大鼠并取出肝组织，切成 2 份，1 份放入 4% 中性甲醛溶液中固定；1 份置于冻存管中，－80 ℃ 保存备用。

2.3　肝功能指标检测　取大鼠血清，采用全自动生化分析仪检测血清中 TBIL、γ－GT、ALP、ALT、AST 水平，严格按照相应测定试剂盒的说明书进行操作。

2.4　肝组织病理形态检测　取大鼠新鲜肝组织，4% 中性甲醛溶液中固定 24 h 后，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，常规石蜡包埋、切片，随后进行 HE 染色，显微镜下观察肝组织病理变化。

2.5　Western blot 法检测肝组织 Fas、Bcl－2、Bax、Caspase－8、Caspase－3 蛋白表达水平　取大鼠新鲜肝组织，提取总蛋白，以 BCA 法测定总蛋白浓度。采用 SDS－PAGE 凝胶电泳分离蛋白，转印至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶封闭 2 h。加入 Fas（1∶1 000）、Bcl－2（1∶1 000）、Bax（1∶8 000）、Caspase－8（1∶1 000）、Caspase－3（1∶1 000）一抗孵育过夜，洗膜 3 次。加入二抗（1∶15 000）常温避光孵育 1 h，显影并拍照。采用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值，以 β－actin 为内参蛋白，计算目的蛋白的相对表达水平。

2.6　qRT－PCR 法检测肝组织 *Fas*、*Bcl－2*、*Bax*、*Caspase－8*、*Caspase－3* 基因表达水平　取大鼠新鲜肝组织，按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA，检测总 RNA 纯度。采用反转录试剂盒制备 cDNA，条件：变性 65 ℃ 5 min，37 ℃ 15 min，98 ℃ 5 min。使用荧光定量 PCR 仪以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，根据说明书设定反应程序。以 *β－actin* 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因	引物序列（5′－3′）	长度/bp
Fas	F：CCCGGACCCAGAATACCAAG R：GTTCGTGTGCAAGGCTCAAG	124
Bcl－2	F：GGTGAACTGGGGGAGGATTG R：AGAGCGATGTTGTCCACCAG	102
Bax	F：GACAGGGGCCTTTTTGCTAC R：CACTCGCTCAGCTTCTTGGT	123
Caspase－8	F：GACCACATCCCGCAGAAGAA R：GATCCCGCCGACTGATATGG	139
Caspase－3	F：GCTGGACTGCGGTATTGAGA R：TAACCGGGTGCGGTAGAGTA	108
β－actin	F：ATGGATGACGATATCGCTGC R：CTTCTGACCCATACCCACCA	150

2.7　统计学方法　采用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）进行描述。若数据符合正态分布，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较若方差齐时采用 *LSD* 检验，方差不齐时采用 *Dunnett's T3* 检验；若数据不符合正态分布，采用非参数检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

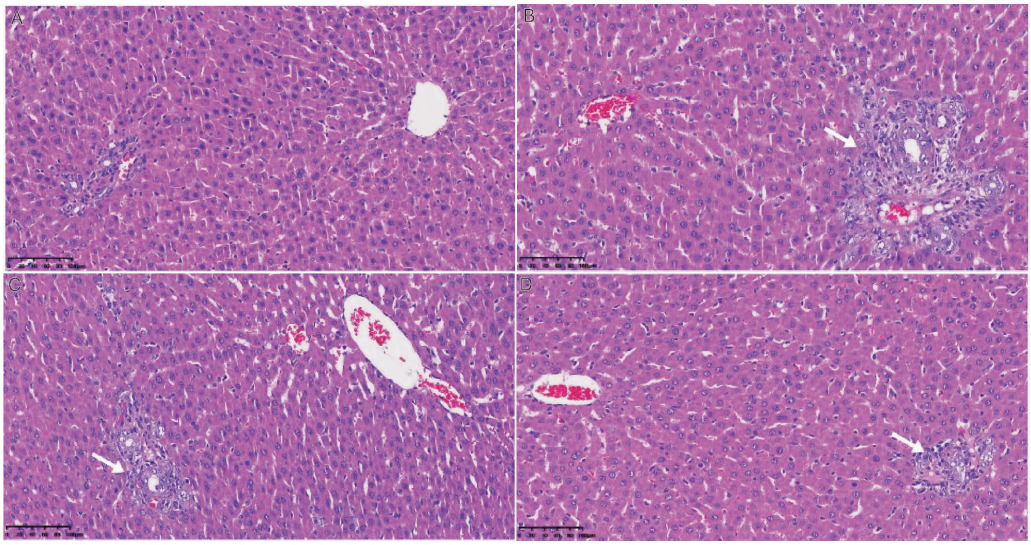
3.1　退黄合剂对大鼠肝功能的影响　与空白组比较，模型组大鼠血清中 ALT、AST、ALP、γ－GT、TBIL 水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，熊去氧胆酸组大鼠血清中 γ－GT、TBIL 水平降低（$P<0.01$），退黄合剂组大鼠血清中 ALT、AST、γ－GT、TBIL 水平降低（$P<0.05$）。见表 2。

表 2　各组大鼠肝功能指标比较　（$\bar{x}\pm s$，$U\cdot L^{-1}$）

组别	n	ALT	AST	ALP	γ－GT	TBIL
空白组	10	17.66±3.86	52.68±7.59	164.12±40.36	0.88±0.28	1.00±0.23
模型组	10	286.83±67.84**	310.71±65.52**	408.56±96.41**	9.07±2.09**	29.13±7.67**
熊去氧胆酸组	10	272.94±65.42	281.57±52.02	396.15±106.42	5.11±0.88$^{\#\#}$	20.34±4.13$^{\#\#}$
退黄合剂组	10	200.16±50.48$^{\#\#}$	244.48±66.01$^{\#}$	388.89±65.98	4.28±1.04$^{\#\#}$	20.40±6.53$^{\#}$

注：与空白组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$；与模型组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$。

3.2　退黄合剂对大鼠肝组织病理形态的影响　HE 染色显示，空白组大鼠肝小叶结构完整，肝索排列整齐，未见肝细胞坏死、凋亡及炎症细胞浸润。模型组大鼠肝组织汇管区、肝小叶周边可见小叶间胆管显著增生，炎症细胞浸润及肝细胞凋亡。与模型组比较，熊去氧胆酸组和退黄合剂组大鼠肝组织炎症细胞浸润减轻，小叶间胆管增生及肝细胞凋亡减少，见图 1。



注：A：空白组；B：模型组；C：熊去氧胆酸组；D：退黄合剂组。

图 1　各组大鼠肝组织病理染色图（HE，×200）

3.3　退黄合剂对大鼠肝组织 Caspase－8、Caspase－3、Fas、Bax、Bcl－2 蛋白表达水平的影响　与空白组比较，模型组大鼠肝组织 Caspase－8、Caspase－3、Fas、Bax 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。与模型组比较，熊去氧胆酸组大鼠肝组织 Caspase－3、Fas、Bax 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），退黄合剂组大鼠肝组织 Caspase－8、Caspase－3、Fas、Bax 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），见图 2、表 3。

表 3　各组大鼠肝组织 Caspase－8、Caspase－3、Fas、Bax、Bcl－2 蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Caspase－8	Caspase－3	Fas	Bax	Bcl－2
空白组	3	0.69±0.03	0.67±0.08	0.78±0.09	0.99±0.12	0.88±0.10
模型组	3	1.01±0.08**	0.95±0.09*	1.04±0.04*	1.24±0.07*	0.82±0.09
熊去氧胆酸组	3	0.97±0.04	0.73±0.10$^{\#}$	0.73±0.16$^{\#}$	1.02±0.12$^{\#}$	0.91±0.06
退黄合剂组	3	0.67±0.11$^{\#}$	0.67±0.15$^{\#}$	0.81±0.13$^{\#}$	0.96±0.11$^{\#}$	0.83±0.16

注：与空白组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$；与模型组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$。

3.4　退黄合剂对大鼠肝组织 *Caspase－8*、*Caspase－3*、*Fas*、*Bax*、*Bcl－2* mRNA 水平的影响　与空白组比较，模型组大鼠肝组织 *Caspase－8*、*Caspase－3*、*Fas*、*Bax* mRNA 水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，熊去氧胆酸组大鼠肝组织 *Caspase－8*、*Caspase－3*、*Fas*、*Bax* mRNA 水平降低（$P<0.05$），*Bcl－2* mRNA 水平升高（$P<0.05$）。与模型组比较，退黄合剂组大鼠肝组织 *Caspase－8*、*Caspase－3*、*Fas*、*Bax* mRNA

水平降低($P<0.05$),*Bcl-2* mRNA 水平升高($P<0.05$),见表 4。

表 4　各组大鼠肝组织 *Caspase-8*、*Caspase-3*、*Fas*、*Bax*、*Bcl-2* mRNA 水平比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	*Caspase-8* mRNA	*Caspase-3* mRNA	*Fas* mRNA	*Bax* mRNA	*Bcl-2* mRNA
空白组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	1.86±0.07**	1.62±0.06**	2.01±0.11**	1.95±0.17**	0.93±0.06
熊去氧胆酸组	3	1.31±0.10##	1.16±0.18#	1.23±0.20##	1.12±0.23##	1.21±0.15#
退黄合剂组	3	1.15±0.13##	1.06±0.13##	1.32±0.20##	1.27±0.26#	1.15±0.12#

注:与空白组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$;与模型组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$。

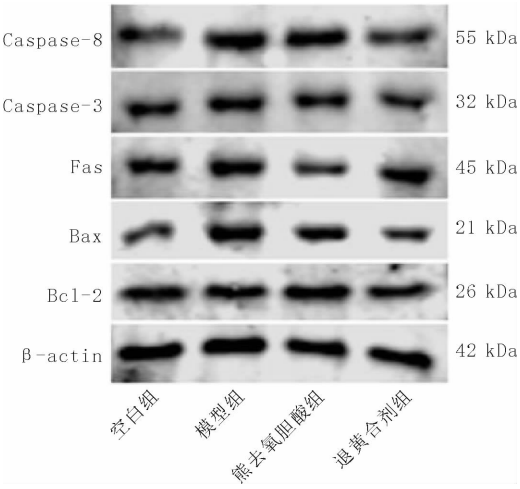


图 2　各组大鼠肝组织 Caspase-8、Caspase-3、Fas、Bax、Bcl-2 蛋白条带图

4　讨论

胆汁淤积是一组在多种急慢性肝病中普遍存在的临床证候群,早期一般无明显的临床症状。部分患者可能出现恶心、乏力、纳差及两侧胁肋不适等表现,进一步发展还可出现黄疸、皮肤瘙痒等症状[13]。胆汁淤积归属于中医“黄疸”范畴,多认为由肝气不畅、湿热内蕴、淤阻胆道,或因湿毒浸淫、伤阴耗血、热灼肝胆,致胆汁排泄障碍、循行不畅而成。病理因素以湿、热、瘀为主,治法以清热利湿、活血凉血为主[14]。退黄合剂由茵陈、赤芍、金钱草、郁金、大黄组成,以茵陈蒿汤为底方,去栀子加入金钱草、郁金以增强清热利湿退黄之功,加赤芍以增强行气活血凉血之功,全方符合“君、臣、佐、使”的配伍原则,用药严谨。

前期已开展一系列退黄合剂的临床研究,如退黄合剂联合脐火疗法治疗阴黄型慢性乙型重型肝炎、退黄合剂保留灌肠联合逐水方敷脐治疗肝硬化顽固性腹水、退黄合剂治疗黄疸型病毒性肝炎,显示退黄合剂在辅助治疗重型肝炎、肝硬化顽固性腹水、黄疸等疾病中有较好疗效[11,15-16]。此外,基础研究显示退黄合剂可显著降低 ANIT 诱发肝内胆汁淤积大鼠血清中 ALT、TBIL、DBIL 含量[17],且能够抑制急性肝衰竭大鼠细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达,对改善胆汁淤积有较好的作用[18]。但退黄合剂保护肝细胞的作用机制尚未明确,因此本研究从肝细胞凋亡角度探讨退黄合剂改善胆汁淤积、保护肝细胞的作用机制。

本研究通过一次性灌胃给予 100 mg·kg^{-1} ANIT,使胆管上皮细胞变性、肿胀、坏死脱落,导致胆汁堵塞和淤积,并评估退黄合剂对肝内胆汁淤积的治疗作用。在 ANIT 诱导的胆汁淤积模型中,大鼠血清 ALT、AST、ALP、γ-GT、TBIL 水平显著升高,且肝组织出现明显病理改变,说明大鼠发生了胆汁淤积及肝功能损伤。退黄合剂组大鼠血清 ALT、AST、γ-GT、TBIL 水平明显降低,肝组织病理损伤明显减轻,证实了退黄合剂在促进胆汁排泄、减轻肝脏炎症反应、保护肝细胞方面的疗效。此外,模型组大鼠肝组织 Caspase-8、Caspase-3、Fas、Bax 蛋白及基因表达水平明显升高,经退黄合剂治疗后得到逆转,提示退黄合剂可能通过调控 Fas-Bax/Bcl-2 信号轴发挥对胆汁淤积大鼠的肝脏保护作用。

细胞凋亡在维持机体正常发育、内环境稳态及抵御疾病方面有着至关重要的作用。死亡受体途径和线粒体途径是细胞凋亡的两大经典途径,Fas 和 Bax/Bcl-2 分别是其中的关键效应蛋白[19]。线粒体凋亡途经在胆汁淤积性肝损伤中发挥重要作用[20]。胆汁酸的直接毒性会激活 Fas 诱导的死亡受体途经,并通过 Caspase-8 激活线粒体途经[10,21]。在死亡受体途径中,细胞表面死亡受体 Fas 对细胞凋亡的启动发挥关键作用,其在疏水胆汁酸的刺激下首先被激活,引发 Caspase 级联反应。激活的 Caspase-8 可切割 Bid,其羧基片段移位至线粒体,触发线粒体凋亡途径[22-23]。在线粒体途径中,Bcl-2 家族蛋白和 Caspase 家族蛋白对细胞凋亡的调控至关重要。促凋亡因子 Bax 和抗凋亡因子 Bcl-2 能够形成同二聚体或异二聚体,影响线粒体膜的通透性,控制细胞色素 C 的释放,引发 Caspase 级联反应[24],死亡受体途经与线粒体途经相互配合,共同执行细胞凋亡过程。其中,Caspase-8 与

Caspase－3 在 2 条途径的 Caspase 级联反应中处于核心地位。Caspase－8 可将凋亡信号传递至线粒体，激活线粒体途径，释放细胞色素 C 进入胞浆，激活下游的 Caspase－9 和 Caspase－3，诱导细胞凋亡。此外，Caspase－3 还可直接破坏细胞结构，促进凋亡小体的形成[25]。本研究提示，退黄合剂通过调控死亡受体途径和线粒体途径，从而抑制细胞凋亡。

综上所述，退黄合剂可能通过调控 Fas－Bax/Bcl－2 信号轴、抑制细胞凋亡，从而发挥改善胆汁淤积大鼠肝功能的作用。

参考文献：

[1]谌洁，章述军. 胆汁淤积发生机制的研究进展[J]. 重庆医学，2024，53(7)：1074－1079.
[2]国家感染性疾病临床医学研究中心. 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.
[3]丘燕燕，鄢素琪，秦欢，等. 利胆合剂抑制钙敏感受体介导的肝细胞凋亡改善幼龄大鼠肝内胆汁淤积研究[J]. 中华中医药杂志，2022，37(4)：2264－2269.
[4]杨柳，郑思嘉，杨念，等. 胆汁淤积肝病的炎症反应和氧化应激机制及中医药干预研究[J/OL]. 中医学报，2024：1－10[2024－12－10]. https://link. cnki. net/urlid/41. 1411. R. 20240929. 1140. 006
[5]GULAMHUSEIN A F，HIRSCHFIELD G M. Primary biliary cholangitis：pathogenesis and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2020，17(2)：93－110.
[6]何睿，张才江，孔维金，等. 进行性家族性肝内胆汁淤积症常见类型的发病机制及治疗进展[J]. 肝脏，2023，28(8)：994－997.
[7]杨焕焕，袁诗雨，唐映梅. 原发性胆汁性胆管炎胆管上皮细胞凋亡因素及机制的研究进展[J]. 实用医学杂志，2023，39(16)：2148－2152.
[8]XU X，LAI Y，HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body：disease message and therapeutic target potentials[J]. Biosci Rep，2019，39(1)：BSR20180992.
[9]HU Y，ZHANG H，XIE N，et al. Bcl－3 promotes TNF－induced hepatocyte apoptosis by regulating the deubiquitination of RIP1[J]. Cell Death Differ，2022，29(6)：1176－1186.
[10]GREEN D R. The death receptor pathway of apoptosis[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol，2022，14(2)：a041053.
[11]陈欣菊，韩捷. 退黄合剂联合脐火疗法治疗阴黄型慢性乙型重型肝炎 15 例[J]. 中国中医药现代远程教育，2015，13(10)：45－46.
[12]朱正望，朱平生，苗明三. 基于中西医临床病证特点的胆汁淤积性肝病动物模型评价[J]. 临床肝胆病杂志，2023，39(12)：2959－2964.
[13]陶庆雪. 基于 TLR4/NF－κB/NLRP3 通路探讨赤茵合剂干预肝内胆汁淤积细胞焦亡的机制研究[D]. 合肥：安徽中医药大学，2024.
[14]杨雯，王敏，唐金模. 胆汁淤积性肝病的中医诊治概况[J]. 中西医结合肝病杂志，2023，33(5)：452－455.
[15]刘光伟，费景兰，王春芳，等. 退黄合剂保留灌肠联合逐水方敷脐治疗肝硬化顽固性腹水临床疗效观察[J]. 时珍国医国药，2015，26(3)：662－663.
[16]马素平. 退黄合剂治疗黄疸型病毒性肝炎 56 例[J]. 陕西中医，2006，27(1)：18－20.
[17]张照兰，郭胜，郭勇义. 退黄合剂对 ANIT 诱发肝内胆汁淤积大鼠的影响[J]. 中国中医药信息杂志，2004，11(12)：1052－1053.
[18]刘江凯，赵文霞，许顺畅. 退黄合剂对急性肝衰竭大鼠内毒素及 TNF－α、IL－1β、IL－6 水平的影响[J]. 时珍国医国药，2015，26(3)：587－588.
[19]RENAULT T T，CHIPUK J E. Death upon a kiss：mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to BAK/BAX－dependent apoptosis[J]. Chem Biol，2014，21(1)：114－123.
[20]HEIDARI R，GHANBARINEJAD V，MOHAMMADI H，et al. Mitochondria protection as a mechanism underlying the hepatoprotective effects of Glycine in cholestatic mice[J]. Biomed Pharmacother，2018，97：1086－1095.
[21]NASEHI M，TORABINEJAD S，HASHEMI M，et al. Effect of cholestasis and neuroaid treatment on the expression of Bax，Bcl－2，Pgc－1α and Tfam genes involved in apoptosis and mitochondrial biogenesis in the striatum of male rats[J]. Metab Brain Dis，2020，35(1)：183－192.
[22]YANG Y，ZONG M，XU W，et al. Natural pyrethrins induces apoptosis in human hepatocyte cells via Bax－ and Bcl－2－mediated mitochondrial pathway[J]. Chem Biol Interact，2017，262：38－45.
[23]SMAILI S S，HSU Y T，YOULE R J，et al. Mitochondria in Ca^{2+} signaling and apoptosis[J]. J Bioenerg Biomembr，2000，32(1)：35－46.
[24]BURKE P J. Mitochondria，bioenergetics and apoptosis in cancer[J]. Trends Cancer，2017，3(12)：857－870.
[25]HERR A B. Evolution of an allosteric “off switch” in apoptotic caspases[J]. J Biol Chem，2018，293(15)：5462－5463.

收稿日期：2025－02－20
作者简介：马瑞雪(1997－)，女，河南安阳人，硕士研究生，研究方向：中医药防治消化系统疾病。
通信作者：朱平生(1973－)，男，医学博士，教授，博士研究生导师，研究方向：中医药防治肝胆疾病。E－mail：zhupingsheng@126. com

编辑：刘凯歌