·实验研究·

莱菔子通过 FXR－FGF15－FGFR4 轴改善正常高值血压痰湿壅盛证大鼠肝损伤的实验研究

丁海，贾蔷*，齐冬梅，石作荣
（山东中医药大学，山东 济南 250300）

摘要　目的：观察莱菔子对大鼠肝脏 FGF15、FGFR4 及回肠 FXR、FGF15 蛋白表达水平的影响，探索莱菔子改善正常高值血压（PHT）痰湿壅盛证大鼠肝损伤的作用机制。方法：大鼠随机分为模型组和空白组，模型组喂食高脂饲料，空白组给予等量普通饲料。8 周后，模型组腹腔注射左旋硝基精氨酸（*L*－NNA）进行造模，连续 3 周，每周 2 次。空白组注射等体积生理盐水。大鼠造模成功后随机分为模型组、莱菔子组、水飞蓟宾组，每组 15 只。莱菔子组（2.5 g·kg^{-1}）、水飞蓟宾组（20 mg·kg^{-1}）分别给予相应药物进行干预，每日 1 次。6 周后，HE 染色观察肝脏组织形态结构；WB 法检测肝脏 FGF15、FGFR4 及回肠 FXR、FGF15 蛋白表达水平。结果：模型组大鼠肝脏出现大量脂滴空泡；莱菔子组及水飞蓟宾组大鼠肝脏内脂肪空泡大幅减少。模型组肝脏 FGF15、FGFR4 及回肠 FXR、FGF15 蛋白表达低于空白组（$P<0.05$）；莱菔子组肝脏 FGF15、FGFR4 及回肠 FXR、FGF15 蛋白表达高于模型组（$P<0.05$）。结论：莱菔子对 PHT 痰湿壅盛证大鼠肝损伤具有显著的保护效应，其机制之一在于激活 FXR，进而诱导 FGF15 的表达，从而提升肝肠循环中 FGF15 的水平，并且同时也激活了 FGFR4 信号通路。

关键词　莱菔子；正常高值血压；痰湿壅盛证；FXR；FGF15；FGFR4
中图分类号：R285.5　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1002－2392（2025）08－0010－04
DOI：10.19664/j.cnki.1002－2392.250157

正常高值血压，即高血压前期（Prehypertension，PHT），是血压从正常状态过渡到高血压的一个过渡阶段，具有较高的进展为高血压的风险[1]。在 PHT 的诸多证型中，痰湿壅盛证尤为常见[2-4]。该证型患者已出现肝脏脂肪积聚和变性，甚至伴随肝脏细胞的损害[5]。肝脏受损后，其影响是多方面的：一方面，它可能通过胰岛素抵抗引发机体中心血容量的过载或交感神经活动的多重抑制，进而直接导致血压升高；另一方面，肝脏脂肪变性患者的体内，过量的脂肪细胞会分泌出大量促炎性细胞因子以及游离脂肪酸，这些物质会导致患者心血管功能出现障碍，进一步间接造成患者血压上升[6]，形成恶性循环。因此，在针对 PHT 痰湿壅盛证实施治疗的过程中，不仅需要着重对血压进行有效的调控与管理，而且需要对肝脏实施保护举措，这是打破恶性循环、实现有效治疗的关键所在。

莱菔子是十字花科植物萝卜的干燥成熟种子，现代研究表明，其具有较好的降血压功效[7-8]，此外还能减轻机体炎性反应，阻止肝脏损伤，保护肝细胞的完整性；调节机体脂质代谢，保证肝脏脂质的正常转运，避免脂质在肝脏内过度沉积而损害肝脏[9-10]。本次实验研究通过复制 PHT 痰湿壅盛证模型[11]，从而探究莱菔子对 PHT 痰湿壅盛证大鼠肝损伤的影响，并深入研究其治疗作用与胆汁酸肝肠循环的关系，希望能为莱菔子的进一步开发与应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物

60 只 Wistar 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，SPF 级，雄性，6 周龄，体质量（160±20）g，质量合格证号：SCXK（京）2016－0006。实验动物使用许可证号：SYXK 鲁 2017 0022。动物饲养于山东中医药大学，实验在温度（22±2）℃，相对湿度 50%～60% 的昼夜循环屏障系统条件下完成。

收稿日期：2024－05－06　　**修回日期**：2024－09－11
基金项目：国家自然科学基金项目（81974555）
作者简介：丁海（1993－），男，硕士研究生，研究方向：病因病机理论研究。
*通信作者：贾蔷（1989－），女，博士，讲师，研究方向：中药药理机制研究。

1.2 主要试剂与仪器

左旋硝基精氨酸（N^G - Nitro - L - arginine, L - NNA）（批号 BCCD9665，美国 Sigma - Aldrich 公司）；水飞蓟宾胶囊（批号 150703014，天津天士力圣特制药有限公司）；莱菔子（批号 210415，济南建联中药大药房）；兔抗大鼠 FGF - 15 一抗（批号 GR3437323 - 1，abcam 公司）；兔抗大鼠 FGFR4 一抗（批号 00111566，美国 Proteintech 公司）；兔抗大鼠 FXR 一抗（批号 00101307，美国 Proteintech 公司）。

转运电泳仪、垂直电泳仪（北京六一生物科技有限公司，DYCZ - TRANS2）；电泳仪电源（美国 Bio - rad 公司，PowerPacTM Basic）；立体荧光显微镜（德国 Leica 显微系统公司，M205FA）；石蜡切片机（德国 Leica 显微系统公司，RM2255）。

1.3 造模及给药

将大鼠随机分为模型组（$n = 45$）与空白组（$n = 15$）。使用高脂饲料对模型组大鼠进行喂养，每日记录大鼠食量，然后按模型组大鼠的食量给予空白组大鼠普通饲料。持续喂养 8 周，模型组大鼠腹腔注射剂量为 7.625 mg · kg^{-1} 的 L - NNA 溶液，空白组腹腔注射等体积生理盐水，2 次/周，共干预 3 周[11]。大鼠造模成功后随机分为模型组、莱菔子组、水飞蓟宾组，每组 15 只。每周测量大鼠体质量，以大鼠体质量为基准，莱菔子组给予莱菔子溶液灌胃，剂量为 2.5 g·kg^{-1}；水飞蓟宾组则给予水飞蓟宾溶液（20 mg·kg^{-1}）灌胃；两组剂量均指有效成分质量。模型组与空白组大鼠使用等量生理盐水灌胃；每日 1 次，总计持续 6 周[12]。

1.4 样品采集及指标检测

取肝脏中叶制作 HE 染色切片，显微镜观察。取部分肝脏及回肠组织用于法尼醇受体（Farnesoid X receptor, FXR）、成纤维细胞生长因子 15（Fibroblast growth factor 15, FGF15）、成纤维细胞生长因子受体 4（Fibroblast growth factor receptor 4, FGFR4）蛋白表达水平的检测。具体步骤如下，提取肝脏和回肠总蛋白，每孔上样量为 30 μg，进行电泳和转膜操作，脱脂奶粉封闭 PVDF 膜，一抗 4 ℃孵育，二抗室温孵育，在多色荧光成像系统中显影。

1.5 数据分析

所有实验数据均运用 SPSS 21 统计软件予以处理。各组数据均以（$\bar{x} \pm s$）呈现，组间差异的比较采用单因素方差分析方法。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 一般状况

空白组大鼠表现出极为敏锐的反应能力，周身皮毛光亮顺滑，饮食状况良好，排便规律且正常。模型组大鼠反应明显迟钝，皮毛稀疏，色泽暗淡、发黄，进食量大幅减少，排出大便稀薄不成型。经过莱菔子和水飞蓟宾的干预后，大鼠的整体状态有了显著变化，精神状态显著提升，毛发逐渐恢复亮泽，饮食量逐步增加，大便恢复到正常成形状态。

2.2 莱菔子对肝脏病理的影响

如图 1 所示，相较于空白组，模型组大鼠的肝脏内可见大量大小不一的脂滴积聚；与模型组相比，莱菔子组和水飞蓟宾组大鼠的肝脏内脂肪空泡数量明显减少，显示出明显的改善效果。

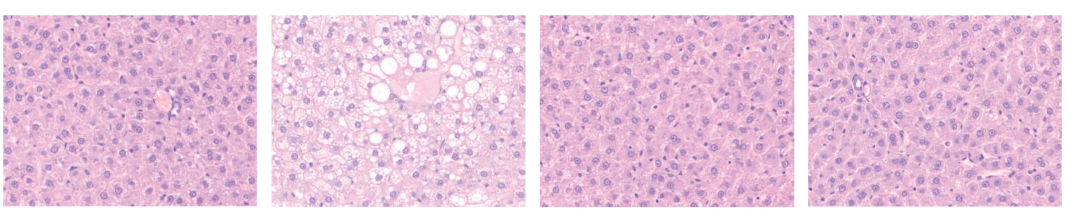


图 1 各组大鼠肝脏组织病理情况（HE 染色，×200）

2.3 莱菔子对回肠 FXR、FGF15 及肝脏 FGF15、FGFR4 蛋白表达的影响

如表 1、图 2 所示，模型组回肠 FXR、FGF15 及肝脏 FGF15、FGFR4 蛋白表达低于空白组（$P < 0.05$）；莱菔子组回肠 FXR、FGF15 及肝脏 FGF15、FGFR4 蛋白表达高于模型组（$P < 0.05$）。结果表明，莱菔子能够有效提升以上关键蛋白的表达水平。

表 1 莱菔子对各组大鼠回肠 FXR、FGF15 及肝脏 FGF15、FGFR4 表达水平的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

组别	回肠 FXR	回肠 FGF15	肝脏 FGF15	肝脏 FGFR4
空白组	2.02 ± 0.33	1.38 ± 0.08	1.72 ± 0.26	1.35 ± 0.22
模型组	1.01 ± 0.21$^{\#}$	0.87 ± 0.15$^{\#}$	1.03 ± 0.10$^{\#}$	0.92 ± 0.15$^{\#}$
莱菔子组	1.85 ± 0.14*	1.33 ± 0.15*	1.64 ± 0.23*	1.46 ± 0.32*

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

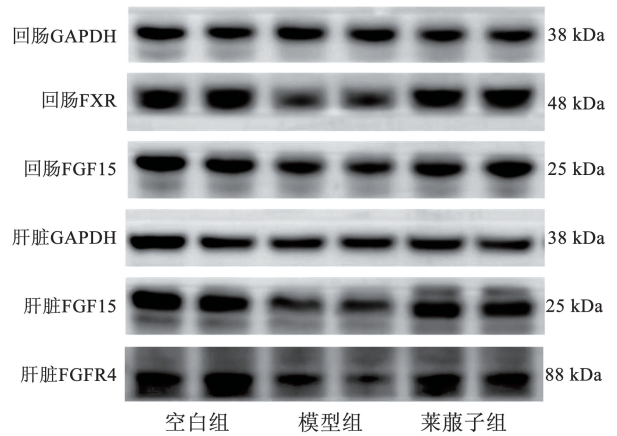


图 2　各组大鼠回肠 FXR、FGF15 及肝脏 FGF15、FGFR4 表达印迹图

3　讨论

胆汁酸(Bile acid, BA)代谢的紊乱,是导致各类肝脏疾病产生的重要因素[13],一旦 BA 代谢平衡被打破,会严重影响肝脏的脂质代谢功能[14],更为严重的是,肝脏中 BA 的过量积累,可导致肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌,对肝脏健康构成巨大威胁[15-16]。

肝肠循环中的 BA 可以通过调节 FXR 活性维持体内 BA 的动态平衡[17]。FXR 是一种 BA 受体,主要在肝细胞和下部小肠上皮细胞中表达,并且可以由肠道微生物群编码[14]。人在进食后,体内的 BA 可以通过胆囊收缩排泄到小肠中以帮助人体消化食物,完成任务后的 BA 由肠道微生物群对其进行修饰,其中一小部分随食物残渣被排出体外,剩余大部分则被机体重新吸收,重新参与到肝肠循环中。目前研究表明,FXR 可能通过以下途径调节肝肠循环中的 BA 水平,当肝肠循环中 BA 水平过高时,远端小肠(尤其是回肠)BA 浓度增加,过高水平的 BA 会导致其与 FXR 的结合增加,而这一现象会诱导肠道 FGF15 表达增加[18],使肝肠循环中 FGF15 水平升高,从而增加 FGF15 与 FGFR4 的结合,激活 FGFR4 信号通路,从而抑制新的 BA 合成[19-20],降低肝肠循环中的 BA 水平。

研究显示,饮食诱发的肠道微生物群失调是诱发肝脏炎症的重要因素[21-22]。在肠道中,BA 和微生物群具有双向调节的作用[23-24],肠道微生物群可以通过对 BA 的修饰来调节肠道 BA 对肠道 FXR 的激活,从而调节新 BA 的生成;并且被修饰过的 BA 会成为不同种类的次级 BA,这些次级 BA 对肠道微生物具有不同程度的灭杀作用,这种差异性使 BA 对肠道微生物群具有调节作用。而饮食诱发的菌群失调会导致肠道 BA 与肠道微生物群之间这种双向调节的功能紊乱,导致肝肠循环中的 BA 水平得不到有效调节,BA 水平的失调导致肝脏中累积过量的 BA,这些过量的 BA 则会对肝脏造成一定程度的伤害。现代药理研究表明[25],莱菔子具有抗微生物、抗氧化、抗高血压、祛痰等作用,可以有效调节肠道菌群正常化[26],恢复肠道菌群对 BA 的修饰作用,激活 FXR,从而诱导 FGF15 表达[18],导致肝肠循环中 FGF15 水平升高,而肝脏中 FGF15 水平的升高可导致肝细胞中 FGF15 与 FGFR4 结合增加,从而激活 FGFR4 信号通路,抑制肝脏 BA 合成[19-20]。

本研究显示,莱菔子可有效改善模型组的整体状态,扭转其肝脏脂肪变性的状况,促使肝脏形态学结构恢复,表明莱菔子对 PHT 痰湿壅盛证大鼠的肝脏具备一定的保护功效。本研究发现,模型组回肠 FXR、FGF15 及肝脏组织中 FGF15、FGFR4 蛋白表达显著降低;莱菔子干预后,能明显上调回肠 FXR、FGF15 及肝脏 FGF15、FGFR4 的表达,提示莱菔子可能通过激活 FXR,诱导 FGF15 表达[18],FGF15 与 FGFR4 结合增加,激活 FGFR4 信号通路[19-20],抑制 BA 合成,维持肝肠循环中的 BA 持续处于正常范围,从而发挥对肝脏的保护作用。

参考文献:

[1] 刘海,黄冠华. 正常高值血压对于儿童青少年的意义[J]. 中国全科医学,2023,26(18):2183-2189.

[2] 李新梅,邱思婕. 原发性高血压病人中医体质特点及相关影响因素分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2021,19(13):2138-2141.

[3] 柳淑琴. H 型高血压中医证型、中医体质与免疫机制、部分细胞因子的关系研究[D]. 成都:成都中医药大学,2020.

[4] 王雅清. 中青年正常高值血压人群的中医状态要素及影响因素的研究[D]. 福州:福建中医药大学,2020.

[5] 蔡嘉洛,朱贻霖,李晓屏,等. 脾虚痰湿证糖尿病前期模型的建立和评价[J]. 广州中医药大学学报,2022,39(11):2646-2651.

[6] BALI A D, ROSENZVEIG A, FRISHMAN W H, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: causation or association[J]. Cardiology in Review, 2024, 32(5): 453-462.

[7] 李华妮,郑连营,王艳艳,等. 莱菔子配伍蒺藜对自发性高血压大鼠的降压作用及机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2021,27(5):756-759,865.

[8] LIU Y, YIN H L, LI C, et al. Sinapine thiocyanate ameliorates vascular endothelial dysfunction in hypertension by inhibiting activation of the NLRP3 inflammasome[J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 620159.

[9] 李莉,黄涵柽. 莱菔子乙醇提取物对 ApoE$^{-/-}$小鼠血脂血糖及肝脂肪变性的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2021,37(6):622-628.

[10] 李有栋. 芥子碱护肝机理的研究[D]. 无锡:江南大学,2021.

[11] 贾蔷,阴启明,李运伦,等. 正常高值血压痰湿壅盛证大鼠模型的建立及代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(24):171-178.

[12] 丁海,贾蔷,齐冬梅,等. 莱菔子对正常高值血压痰湿壅盛证大鼠

肝脏保护作用及其机制研究[J]. 中医药学报,2023,51(11):23 - 28.
[13] ARAB J P, KARPEN S J, DAWSON P A, et al. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: molecular insights and therapeutic perspectives[J]. Hepatology, 2017, 65(1): 350 - 362.
[14] CAUSSY C, HSU C, SINGH S, et al. Serum bile acid patterns are associated with the presence of NAFLD in twins, and dose - dependent changes with increase in fibrosis stage in patients with biopsy - proven NAFLD[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2019, 49(2): 183 - 193.
[15] SCHAAP F G, TRAUNER M, JANSEN P L. Bile acid receptors as targets for drug development[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 11(1): 55 - 67.
[16] HAEUSLER R A, ASTIARRAGA B, CAMASTRA S, et al. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12α - hydroxylated bile acids[J]. Diabetes, 2013, 62(12): 4184 - 4191.
[17] SUN L L, CAI J, GONZALEZ F J. The role of farnesoid X receptor in metabolic diseases, and gastrointestinal and liver cancer[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(5): 335 - 347.
[18] INAGAKI T, CHOI M, MOSCHETTA A, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis[J]. Cell Metab, 2005, 2(4): 217 - 225.
[19] DING L L, YANG L, WANG Z T, et al. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases[J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(2): 135 - 144.
[20] KATAFUCHI T, MAKISHIMA M. Molecular basis of bile acid - FXR - FGF15/19 signaling axis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11): 6046.
[21] MORAN - RAMOS S, CERQUEDA - GARCÍA D, LÓPEZ - CONTRERAS B, et al. A metagenomic study identifies a *Prevotella copri* enriched microbial profile associated with non - alcoholic steatohepatitis in subjects with obesity[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2023, 38(5): 791 - 799.
[22] HSU C L, WANG Y H, DUAN Y, et al. Differences in bacterial translocation and liver injury in ethanol versus diet - induced liver disease[J]. Dig Dis Sci, 2023, 68(7): 3059 - 3069.
[23] CHÁVEZ - TALAVERA O, TAILLEUX A, LEFEBVRE P, et al. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2017, 152(7): 1679 - 1694, e3.
[24] 熊淑琪. 胆汁酸生理功能及其与肠道微生物互作研究进展[J]. 生物技术通报, 2023, 39(4): 187 - 200.
[25] GAO L, LI H, LI B Q, et al. Traditional uses, phytochemistry, transformation of ingredients and pharmacology of the dried seeds of *Raphanus sativus* L. (Raphani *Semen*), a comprehensive review[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 294: 115387.
[26] HE C X, HUANG L, LEI P, et al. Sulforaphane normalizes intestinal flora and enhances gut barrier in mice with BBN - induced bladder cancer[J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(24): e1800427.

Experimental Study on Raphani Semen Ameliorating Liver Injury in High - Normal Blood Pressure Rats with Phlegm - Dampness Stagnation Syndrome via FXR - FGF15 - FGFR4 Axis

DING Hai, JIA Qiang, QI Dongmei, SHI Zuorong
(*Shandong University of Traditional Chinese Medicine*, *Jinan* 250300, *China*)

Abstract Objective: To explore the mechanism by which Raphani Semen ameliorates liver injury in high - normal blood pressure (PHT) rats with phlegm - dampness stagnation syndrome through its effects on FGF15 and FGFR4 expression in the liver and FXR and FGF15 expression in the ileum. Methods: PHT rats with phlegm - dampness stagnation syndrome were used as experimental models, fed a high - fat diet, and injected intraperitoneally with L - NNA to establish the model. After modeling, rats were randomly divided into the model group ($n = 15$), Raphani Semen group ($n = 15$), and silymarin group ($n = 15$). The Raphani Semen group (2.5 g/kg) and silymarin group (20 mg/kg) were treated with corresponding interventions once daily. After six weeks, liver tissue morphology was observed, and protein expression levels of FXR and FGF15 in the ileum and FGF15 and FGFR4 in the liver were detected. Results: The model group exhibited a large number of lipid droplets and vacuoles in the liver, while the Raphani Semen and silymarin groups showed significant reductions in fat vacuoles. FGF15 and FGFR4 expression in the liver and FXR and FGF15 expression in the ileum were lower in the model group than in the control group ($P < 0.05$). The Raphani Semen group exhibited higher expression of these proteins compared to the model group ($P < 0.05$). Conclusion: Raphani Semen exerts significant protective effects on liver injury in PHT rats with phlegm - dampness stagnation syndrome. The mechanism involves FXR activation, which induces FGF15 expression, increases FGF15 levels in the enterohepatic circulation, and activates the FGFR4 signaling pathway to exert protective effects.

Key words Raphani Semen; High - normal blood pressure; Phlegm - dampness stagnation syndrome; FXR; FGF15; FGFR4