

广金钱草提取物抗胆汁淤积性肝损伤的活性成分筛选及其作用机制研究^Δ

黄涛^{1,2*}, 陈超^{1,2}, 韦文华^{1,2}, 韦柳婷^{1,2}, 李波^{1,2}, 高雅^{1,2}, 曹后康^{1,2#}(1. 广西高校高发病防治药理学重点实验室, 广西 桂林 541199; 2. 桂林医科大学药物研究所, 广西 桂林 541199)

中图分类号 R284;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)17-2241-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.17.05



摘要 **目的** 阐明广金钱草提取物(DME)抗胆汁淤积性肝损伤(CLI)的活性成分,并验证其作用靶点与分子机制,为广金钱草的临床应用及保肝新药研发提供科学依据。**方法** 采用高效液相色谱法建立19批DME的指纹图谱,并进行相似度评价和共有峰指认;采用石胆酸(LCA)诱导HepG2细胞损伤建立体外CLI模型,评价DME体外抗CLI的作用;采用Spearman相关性分析、灰色关联度分析和偏最小二乘回归分析评价DME抗CLI的谱效关系,初步筛选核心活性成分;通过分子对接、表面等离子共振技术预测并验证核心活性成分与法尼醇X受体(FXR)的结合能力;采用qRT-PCR、Western blot、免疫荧光染色实验验证核心活性成分对CLI模型细胞中FXR/胆汁酸盐输出泵(BSEP)通路相关分子表达的影响。**结果** 19批DME指纹图谱中共标定12个共有峰,相似度均大于0.990;共指认出4个共有峰,分别为6号峰(夏佛塔昔)、7号峰(异荭草昔)、11号峰(异荭佛塔昔)、12号峰(异荭荭昔)。80 μg/mL DME对CLI模型细胞的保护作用最好,作用24 h后细胞存活率为(75.66±4.60)%。谱效关系研究结果显示,夏佛塔昔与DME抗CLI的关联性最强,为核心活性成分。靶点预测与验证结果显示,夏佛塔昔与FXR的结合能为-8.1 kcal/mol,平衡解离常数为27.3 μmol/L。机制研究结果显示,100 μmol/L夏佛塔昔可显著升高CLI模型细胞中FXR、BSEP蛋白及其编码基因*Nr1h4*、*Abcb11*的mRNA表达水平($P<0.05$)。**结论** 夏佛塔昔可能是DME抗CLI的核心活性成分,其作用机制可能与激活FXR/BSEP通路有关。**关键词** 广金钱草提取物;胆汁淤积性肝损伤;谱效关系;夏佛塔昔;FXR/BSEP通路;活性成分

Study on screening of active components from *Desmodium styracifolium* (Osborne) Merr. extract against cholestatic liver injury and its mechanism of action

HUANG Tao^{1,2}, CHEN Chao^{1,2}, WEI Wenhua^{1,2}, WEI Liuting^{1,2}, LI Bo^{1,2}, GAO Ya^{1,2}, CAO Houkang^{1,2}(1. Key Laboratory of Pharmacology for Prevention and Treatment of High-incidence Diseases of Guangxi Higher Education Institutions, Guangxi Guilin 541199, China; 2. Institute of Materia Medica, Guilin Medical University, Guangxi Guilin 541199, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To identify the active components of *Desmodium styracifolium* (Osborne) Merr. extract (DME) against cholestatic liver injury (CLI), and to verify its target and molecular mechanism, so as to provide scientific evidence for the clinical application of *D. styracifolium* (Osborne) Merr. and the development of new hepatoprotective agents. **METHODS** High-performance liquid chromatography was applied to establish fingerprints of 19 batches of DME, followed by similarity evaluation and identification of common peaks. An *in vitro* CLI model was constructed by lithocholic acid (LCA)-induced injury in HepG2 cells to evaluate the *in vitro* protective effect of DME against CLI. Spearman correlation analysis, grey relational analysis and partial least-squares regression analysis were adopted to investigate the spectrum-effect relationship of DME against CLI and preliminarily screen the core active components. Molecular docking and surface plasmon resonance technology were used to predict and verify the binding capacity between core active components and farnesoid X receptor (FXR). qRT-PCR, Western blot and immunofluorescence staining tests were performed to validate the influences of core active components on the expression of molecules related to FXR/bile salt export pump (BSEP) pathway in CLI model cells. **RESULTS** A total of 12 common peaks were calibrated in the fingerprints of 19 batches of DME, and the similarity values were all above 0.990. Four common peaks were identified, namely peak 6 (schafoside), peak 7 (isoorientin), peak 11 (isoschafoside) and peak 12 (isovitexin). DME at 80 μg/mL exerted the optimal protective effect on CLI-model cells, and the cell viability reached (75.66±4.60)% after 24 h of treatment. Spectrum-effect analysis revealed that schafoside possessed the strongest correlation with the anti-CLI activity of DME and served as the core active component. Target prediction and validation results showed that the binding energy between schafoside and FXR was -8.1 kcal/mol, and

^Δ **基金项目** 国家自然科学基金青年科学基金项目(No.82505187); 广西壮族自治区第一批青苗人才普惠性支持政策项目(No.桂人社函[2024]161号); 八桂青年拔尖人才项目(No.桂科发[2025]420号)
* **第一作者** 硕士研究生。研究方向:中药质量评价与保肝药效物质基础。E-mail:ht_crayon@foxmail.com
通信作者 助理研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中药质量评价与保肝药效物质基础。E-mail:zyxchkchk@163.com

the equilibrium dissociation constant was 27.3 $\mu\text{mol/L}$. Mechanistic experiments demonstrated that 100 $\mu\text{mol/L}$ schaftoside significantly elevated the expression levels of FXR and BSEP, and mRNA of their encoded genes *Nr1h4*, *Abcb11* in CLI-model cells ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Schaftoside may be the core active component of DME against CLI, and its mechanism may be related to the activation of FXR/BSEP pathway.

KEYWORDS *Desmodium styracifolium* (Os.) Merr. extract; cholestatic liver injury; spectrum-effect relationship; schaftoside; FXR/BSEP pathway; active components

广金钱草为豆科植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Os.) Merr. 的干燥地上部分, 是我国岭南道地药材, 也是壮族、瑶族等南方少数民族常用药材。其味甘、淡, 性凉, 归肝、肾、膀胱经, 具有利湿退黄、利尿通淋之功效, 传统用于黄疸尿赤、热淋、石淋等病症的治疗^[1], 民间应用历史悠久。广金钱草化学成分复杂, 涵盖黄酮类、多糖类、生物碱类、挥发油类等多种成分^[2]。现代药理学研究表明, 广金钱草及其活性成分具有抗炎、抗氧化、利尿排石、保肝护肾等多种药理活性^[3]。

胆汁淤积性肝损伤 (cholestatic liver injury, CLI) 是多种急慢性肝胆疾病共同的病理核心环节, 持续进展可诱发肝纤维化、肝硬化甚至肝衰竭^[4]。目前临床治疗胆汁淤积性肝病的药物主要为熊去氧胆酸和奥贝胆酸等, 存在一定的不良反应 (如腹泻、瘙痒、血脂异常等) 发生风险^[5]。法尼酯 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR)/胆汁盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP) 通路是维持胆汁酸代谢稳态的关键枢纽, 其功能异常与胆汁淤积的发生发展密切相关^[6]。本课题组前期研究发现, 广金钱草提取物 [*D. styracifolium* (Os.) Merr. extract, DME] 可通过激活 FXR/BSEP 通路逆转 CLI 模型动物的肝功能损伤^[7], 但其抗 CLI 的活性成分及该成分是否可通过 FXR/BSEP 通路发挥作用尚未系统阐明。

谱效关系研究通过整合中药化学指纹图谱与药效数据, 可锁定与药效直接相关的活性成分群, 是目前中药活性成分研究的核心技术手段之一^[8]。因此, 本研究拟构建“化学指纹-多维度谱效关联-靶点验证”的研究体系: 以 19 批 DME 为研究对象, 建立其高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱; 同时, 以石胆酸 (lithocholic acid, LCA) 诱导的 HepG2 细胞体外 CLI 模型评价 DME 的保肝活性, 构建谱效关系并筛选核心活性成分; 在此基础上, 采用分子对接技术初步预测核心活性成分与 FXR 的结合能力, 再通过表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 技术进一步验证其与 FXR 的直接结合活性, 最后从基因和蛋白层面阐明其调控 FXR/BSEP 通路的分子机制。本研究旨在为阐明 DME 抗 CLI 的活性成分及作用机制提供参考, 并为其临床合理应用及保肝新药研发提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有 1260 Infinity 型 HPLC 仪

(美国 Agilent 公司), AUV220D 型电子天平 (日本 Shimadzu 公司), GM-0.33A 型隔膜真空泵 (天津市津腾实验设备有限公司), Epoch2 型全波长酶标仪 (美国 BioTek 公司), NanoDrop 2000 型核酸蛋白定量仪、QuantStudio 3 型 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), BX51 型正置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), GeneGnome XRQ 型专业化学发光成像系统 (英国 Syngene 公司), Biacore™ 1K 型分子互作仪 (瑞典 Cytiva 公司) 等。

1.2 药材

不同产地、不同批次的广金钱草药材样品信息见表 1。所有样品均经桂林医科大学药物研究所高雅教授鉴定为广金钱草 *D. styracifolium* (Os.) Merr. 的干燥地上部分。

表 1 广金钱草样品信息

编号	产地	批号	编号	产地	批号
G1	广东揭阳	20250317	G11	广西桂林	20250317
G2	广西贵港	20250317	G12	广西玉林	20250301
G3	广西桂林	20250317	G13	广东广州	20250317
G4	广西桂林	20250326	G14	广西桂林	20250321
G5	广东湛江	20250301	G15	广西桂林	20250321
G6	广西梧州	20250306	G16	广西钦州	20250317
G7	广西南宁	20250317	G17	广东清远	20250317
G8	广西玉林	20250317	G18	广东清远	20250317
G9	广东揭阳	20250317	G19	广西桂林	20250321
G10	广西玉林	20250317			

1.3 对照品与试剂

异荭草苷对照品 (批号 Y01023SA13, 纯度 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司; 夏佛塔苷对照品 (批号 X02902108024, 纯度 $> 98\%$)、异夏佛塔苷对照品 (批号 Y15302409025, 纯度 $> 98\%$) 均购自成都瑞芬思德丹生物科技有限公司; 异牡荆苷对照品 (批号 140914, 纯度 $\geq 98\%$) 购自北京世纪奥科生物技术有限公司; DMEM 高糖基础培养基 (批号 WHB825Z221)、胎牛血清 (批号 SA240411) 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (批号 2500030002)、青链霉素混合液 (批号 240004003)、胰蛋白酶 (批号 2400010020)、二甲基亚砜 (DMSO, 批号 34241216014) 均购自北京索莱宝科技有限公司; LCA (批号 G2422470, 纯度 $> 97\%$) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 鼠源 FXR 单克隆抗体 (批号 374666)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/鼠免疫球蛋白 G (IgG) 二抗 (批号 384331) 均购自上海艾比玛特医药科技有限公司;

兔源BSEP多克隆抗体(批号20250314)购自杭州纳克生物科技有限公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(批号H651006028)购自杭州华安生物技术有限公司;山羊抗兔、山羊抗鼠CoraLite® Plus 488荧光标记的IgG(H+L)重组二抗(批号分别为20001486、20001066)均购自武汉三鹰生物科技有限公司;FXR重组蛋白(批号BF01063728)购自北京博奥森生物技术有限公司;系列S传感器CM7芯片(批号10371984)购自瑞典Cytiva公司;甲醇(批号25096223,色谱级)购自美国Tedia公司;甲酸(批号J2408028,色谱级)、D101大孔树脂(批号KS344791)均购自上海源叶生物科技有限公司;实验用水为实验室纯水机所制备的超纯水;其余试剂均为分析纯。

1.4 细胞

人肝癌HepG2细胞株(批号MUVSUIG94D)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 DME的制备

取适量广金钱草药材,粉碎成粗粉。称取粗粉30.0 g,置于1 000 mL烧瓶中,按料液比1:10(g/mL)加入50%乙醇,50℃超声提取3次,每次30 min;过滤,合并滤液,并将滤液上样到预处理好的D101大孔树脂中;上样完成后,用纯水以每小时3柱体积(bed volume, BV)的流速洗至流出液近无色、无醇味,再用6 BV的50%乙醇以2 BV/h的流速洗脱;收集洗脱液,并用旋转蒸发仪将洗脱液浓缩至无醇味,真空冷冻干燥,得DME粉末,−20℃密封保存,备用。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液

精密称取DME粉末0.2 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇25 mL,称定质量;超声(功率100 W,频率40 kHz)处理20 min,放冷,再次称定质量。用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 对照品溶液

精密称取夏佛塔苷、异荭草苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷对照品适量,分别加入80%甲醇溶解并定容,配制夏佛塔苷、异夏佛塔苷质量浓度均为1.0 mg/mL,异荭草苷、异牡荆苷质量浓度均为0.5 mg/mL的单标储备液。分别精密量取各单标储备液适量,置于同一1.0 mL容量瓶中,加80%甲醇稀释并定容,摇匀,即得混合对照品溶液(夏佛塔苷、异荭草苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷的质量浓度分别为248、74、88、89 μ g/mL),4℃冷藏备用。

2.3 色谱条件

采用Agilent 5 TC-C₁₈(2)色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),以甲醇(A)-0.2%甲酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min, 27%A; 10~12 min, 27%A→

30%A; 12~20 min, 30%A; 20~22 min, 30%A→32%A; 22~80 min, 32%A);柱温为30℃;流速为1 mL/min;进样量为10 μ L;检测波长为355 nm。

2.4 DME指纹图谱分析

2.4.1 方法学考察

参考文献[9]进行方法学考察。精密度、稳定性、重复性试验结果均显示,以6号峰(夏佛塔苷)为参照,计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均低于2.0%($n=6$),相对峰面积的RSD均低于3.0%($n=6$)。结果表明,仪器精密度、室温放置24 h内供试品(编号G1)溶液稳定性以及方法重复性均符合指纹图谱分析要求。

2.4.2 指纹图谱生成及共有峰指认

按“2.2.1”项下方法制备19批DME(编号G1~G19)的供试品溶液。取19批DME的供试品溶液和“2.2.2”项下混合对照品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将19批DME的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,以G1样品的色谱图作为参照图谱,设置时间窗宽度为0.1 min,经多点校正后进行Mark峰匹配,生成叠加指纹图谱,并采用中位数法生成对照指纹图谱R,详见图1。结果显示,在19批DME中共标定出12个共有峰。通过与对照品保留时间比对,共指认出4个共有峰,分别为6号峰(夏佛塔苷)、7号峰(异荭草苷)、11号峰(异夏佛塔苷)、12号峰(异牡荆苷),详见图2。

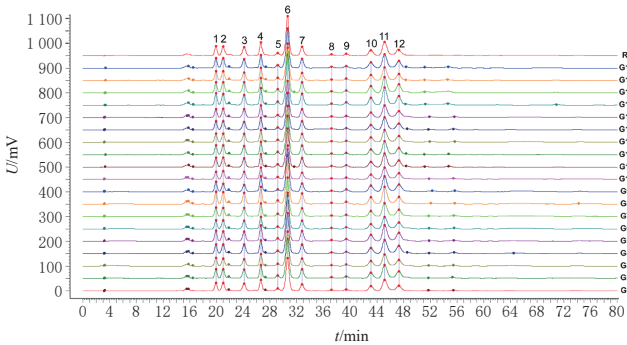
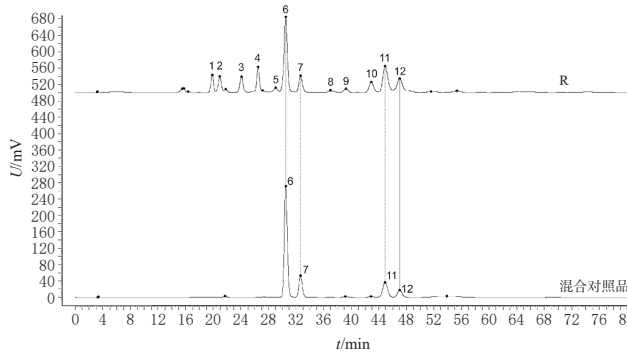


图1 19批DME的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱R



6:夏佛塔苷;7:异荭草苷;11:异夏佛塔苷;12:异牡荆苷。

图2 对照指纹图谱R和混合对照品的HPLC叠加图

2.4.3 相似度评价

以对照指纹图谱R为参照,通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行相似度评价。结果显示,19批DME的图谱与对照指纹图谱R的相似度均大于0.990,表明不同产地、不同批次DME间化学成分整体一致性良好。

2.5 DME抗CLI的体外药效研究

2.5.1 细胞培养

将HepG2细胞接种于含10%胎牛血清和1%青链霉素混合液的DMEM高糖基础培养基中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。取对数生长期细胞进行后续实验。

2.5.2 DME对HepG2细胞活性的影响

采用MTT法检测。将对数生长期细胞以8 000个/孔的密度接种于96孔板中,将细胞分为对照组(含细胞但不给药)、模型组(含75 μmol/L LCA的培养基,为LCA对HepG2细胞的半数抑制浓度,用以诱导体外CLI模型)和给药组(含75 μmol/L LCA以及20、40、60、80、100、120、240、480 μg/mL DME的培养基,药物浓度根据前期预实验结果设置),每组设置3个复孔;同时,设置用于调零的空白孔(只含培养基、不含细胞)。细胞培养至贴壁后,加入空白/含药培养基干预24 h,弃去培养基;每孔加入10 μL MTT溶液和90 μL培养基,继续培养4 h;弃去上清液,加入110 μL甲臞溶液,待结晶充分溶解后,采用酶标仪于490 nm波长处测定各孔光密度(optical density, OD)值,并计算细胞存活率[细胞存活率=(实验组OD值-空白孔OD值)/(对照组OD值-空白孔OD值)×100%]。采用SPSS 28.0软件进行统计分析;数据符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Dunnett-*t*检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

MTT结果显示,与对照组[细胞存活率为(99.34±3.22)%]比较,模型组细胞存活率[(47.91±3.15)%]显著降低($P<0.05$)。20~480 μg/mL DME组细胞的存活率为65.03%~87.68%;随着药物质量浓度的升高,给药组细胞存活率呈先升高后降低的趋势,其中以80 μg/mL DME组细胞存活率[(75.66±4.60)%]最高,且与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。因此,本研究后续以80 μg/mL DME组的细胞存活率为药效指标,进行谱效关系分析。

2.6 DME抗CLI的谱效关系研究

2.6.1 Spearman相关性分析

以19批DME中12个共有峰的峰面积为自变量,对应批次样品在80 μg/mL给药浓度下的细胞存活率为因变量,采用SPSS 28.0软件进行Spearman相关性分析。结果显示,除12号峰外,其余11个共有峰与细胞存活率均呈显著正相关($P<0.05$)。其中6号峰与细胞存活率的相关系数最高,为0.847;其余11个共有峰与细胞存活

率的相关系数在0.416~0.833之间。该结果提示,6号峰(夏佛塔苷)与DME抗CLI的药效关联最为密切。

2.6.2 灰色关联度分析

参照文献[10]方法,以19批DME在80 μg/mL给药浓度下的细胞存活率为药效参考数列,以12个共有峰的相对峰面积为化学成分比较数列,经均值化法无量纲化处理后,设置分辨系数 $\rho=0.5$,计算各共有峰与药效指标(细胞存活率)的灰色关联度。结果(表2)显示,6号峰(夏佛塔苷)与药效指标间的灰色关联度最高,提示其对药效的贡献度最大。

表2 DME中各共有峰与药效指标的灰色关联度

共有峰峰号	灰色关联度	共有峰峰号	灰色关联度
6(夏佛塔苷)	0.78	7(异荜茇苷)	0.72
2	0.77	11(异夏佛塔苷)	0.71
1	0.76	8	0.69
10	0.76	5	0.67
4	0.75	9	0.62
3	0.74	12(异荜茇苷)	0.56

2.6.3 偏最小二乘回归分析

以19批DME中12个共有峰的峰面积为自变量(*X*),对应批次样品在80 μg/mL给药浓度下的细胞存活率为因变量(*Y*),采用SIMCA 14.1软件进行偏最小二乘回归(partial least squares, PLS)分析,PLS得分图见图3。经单位方差标准化处理后,PLS模型共提取出2个主成分,此时累计 R^2X (自变量解释度)=0.874,累计 R^2Y (模型拟合优度)=0.847,累计 Q^2 (预测能力指标)=0.607,表明该模型可解释87.4%的化学成分变异、84.7%的药效指标变异,且拟合效果良好、预测性能稳定。

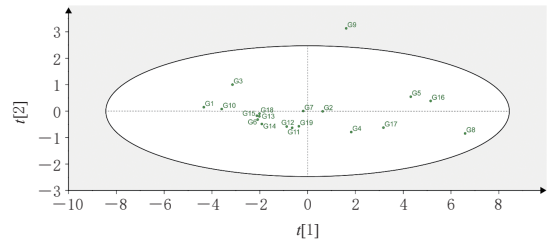


图3 19批DME的PLS得分图

基于该模型计算各共有峰的变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值。结果(图4)显示,4、10、6、9、2、11、7号峰的VIP值均大于1(参考文献[11]方法,以VIP值>1为判断关键变量的核心标准),提示这7个峰对应的化学成分可能为影响DME抗CLI药效的关键成分。

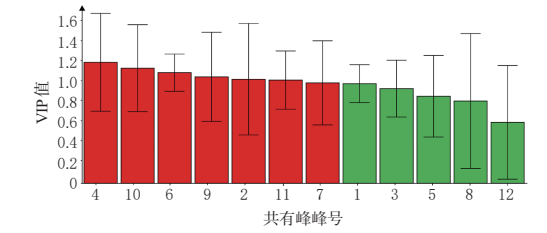


图4 19批DME中各共有峰的VIP值

2.6.4 DME抗CLI的核心活性成分确定

综合“2.6.1”~“2.6.3”项下结果可知,6号峰(夏佛塔昔)与药效指标(细胞存活率)的关联度最高,为DME抗CLI的核心活性成分。因此,本研究后续以夏佛塔昔为研究对象,依次从分子对接预测、SPR结合验证、基因及蛋白功能表达4个层面,系统阐明其抗CLI的作用靶点与分子机制。

2.7 夏佛塔昔与FXR的亲合力验证

2.7.1 分子对接技术预测夏佛塔昔与FXR的结合能力

从PubChem数据库中获取夏佛塔昔的三维结构,并于PDB数据库中下载含有配体分子的FXR蛋白。利用PyMOL 2.1.1软件去除蛋白的溶剂分子和原配体,使用AutoDock 1.5.6软件对蛋白与成分结构进行加氢等处理,然后使用AutoDock Vina 1.1.1软件对二者进行分子对接,并对结果进行可视化处理。结果显示,夏佛塔昔与FXR的结合能为-8.1 kcal/mol(1 kcal≈4.19 kJ),提示其与FXR之间具有较强的结合活性(结合能<-5 kcal/mol表明配体与受体具有一定的结合活性,<-7 kcal/mol则表明两者具有较强的结合活性^[12])。限于篇幅,分子对接图请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图1。

2.7.2 SPR技术验证夏佛塔昔与FXR的直接结合活性

将CM7芯片置于分子互作仪的芯片槽中,采用氨基偶联法^[7]将FXR重组蛋白(质量浓度为100 μg/mL)固定于CM7芯片上,测得FXR蛋白的偶联响应值为28 201.8 RU。采用含5%DMSO的磷酸盐缓冲液配制不同浓度(7.8、15.625、31.25、62.5、125、250、500 μmol/L)的系列夏佛塔昔溶液,依次进样测定(设定进样参数为结合时间90 s、流速30 μL/min、解离时间90 s)。实验结果经计算机拟合与稳态分析后,得到夏佛塔昔与FXR的平衡解离常数为27.3 μmol/L。SPR传感图中响应曲线信号在结合阶段随夏佛塔昔浓度升高而逐步增强;进入解离阶段后,信号快速回落至基线附近。这提示夏佛塔昔与FXR的结合与解离性能良好,表明夏佛塔昔与FXR具有直接且特异性的相互作用。限于篇幅,SPR技术验证结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图1。

2.8 夏佛塔昔调控FXR/BSEP通路抗CLI的机制研究

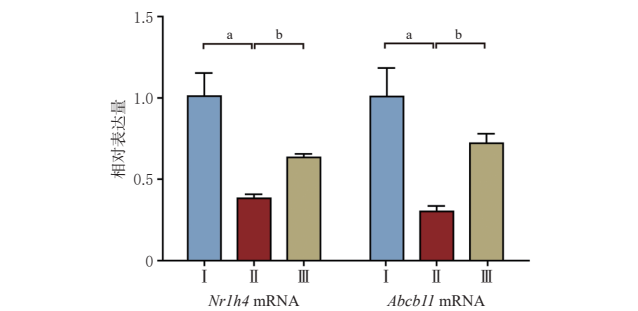
2.8.1 夏佛塔昔对HepG2细胞中Nr1h4、Abcb11 mRNA表达的影响

采用qRT-PCR法检测。取对数生长期HepG2细胞,分为对照组(空白培养基)、模型组(75 μmol/L LCA)、夏佛塔昔组(75 μmol/L LCA+100 μmol/L夏佛塔昔,夏佛塔昔给药浓度根据预实验结果确定)。加入空白/含药培养基干预24 h后,收集细胞。采用TRIzol试剂提取细胞中总RNA,检测其纯度和浓度后,使用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩

增。扩增程序为:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火/延伸30 s,共40个循环。反应体系(共20 μL):2×SYBR Green Mix 10 μL,上、下游引物各0.4 μL,cDNA模板0.8 μL,ddH₂O 8.4 μL。以β-actin为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算各目的基因的相对表达量。实验重复3次。各基因的引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,具体引物序列及扩增产物长度见表3。

表3 引物序列及扩增产物长度		
基因名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
Nr1h4	上游:TGCAGATCAGACCGTGAATGA	234
	下游:TTGGTTGCCATTTCGTCAAA	
Abcb11	上游:TTGGCTGATGTTTGTGGGAAG	75
	下游:CCAAAAATGAGTAGCACGCCT	
β-actin	上游:CATGTACGTTGCTATCCAGGC	250
	下游:CTCCTTAATGTCACGCACGAT	

结果(图5)显示,与对照组比较,模型组细胞中Nr1h4、Abcb11 mRNA表达均显著下调(P<0.05);与模型组比较,夏佛塔昔组细胞中Nr1h4、Abcb11 mRNA表达均显著上调(P<0.05)。



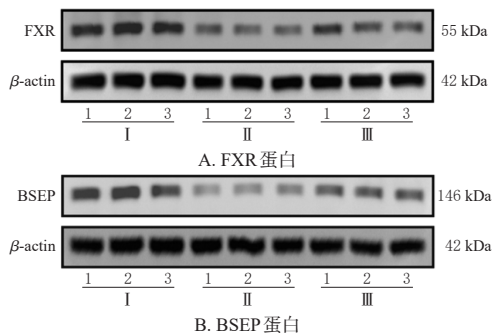
I:对照组;II:模型组;III:夏佛塔昔组;a:与对照组比较,P<0.05;b:与模型组比较,P<0.05。

图5 各组细胞中Nr1h4、Abcb11 mRNA的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.8.2 夏佛塔昔对HepG2细胞中FXR、BSEP蛋白表达的影响

(1)Western blot实验:细胞分组与给药同“2.8.1”项。干预结束后收集细胞,采用RIPA裂解液提取细胞中总蛋白,检测其浓度并进行变性处理。取30 μg蛋白样品经10%SDS-PAGE电泳分离并转印至NC膜,以5%脱脂奶粉封闭;加入FXR、BSEP一抗(稀释比例均为1:2 000),4℃孵育过夜;经相应二抗孵育、ECL化学发光显影后,使用剥离液洗脱膜上的一抗和二抗,然后再以β-actin一抗(稀释比例为1:50 000)于4℃孵育过夜,重复二抗孵育与显影步骤,最后使用化学发光成像系统采集图像。采用ImageJ软件分析蛋白条带灰度值,以β-actin为内参,计算FXR、BSEP蛋白的相对表达量。实验重复3次。

结果(图6、表4)显示,与对照组比较,模型组细胞中FXR、BSEP蛋白的相对表达量均显著降低(P<0.05);与模型组比较,夏佛塔昔组细胞中FXR、BSEP蛋白的相对表达量均显著升高(P<0.05)。



I: 对照组; II: 模型组; III: 夏佛塔苷组。

图6 各组细胞中FXR、BSEP蛋白表达的电泳图($\bar{x} \pm s, n=3$)

表4 各组细胞中FXR、BSEP蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Western blot实验		免疫荧光实验(荧光强度)	
	FXR/ β -actin	BSEP/ β -actin	FXR	BSEP
对照组	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.17	145.07 $\pm$ 3.51	74.43 $\pm$ 2.28
模型组	0.41 $\pm$ 0.04 ^a	0.52 $\pm$ 0.05 ^a	50.58 $\pm$ 6.36 ^a	28.15 $\pm$ 1.94 ^a
夏佛塔苷组	0.62 $\pm$ 0.03 ^b	0.88 $\pm$ 0.09 ^b	126.01 $\pm$ 3.15 ^b	48.70 $\pm$ 4.37 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

(2) 免疫荧光染色实验: 细胞分组与给药同“2.8.1”项。干预结束后, 用磷酸盐缓冲液洗涤细胞, 然后用4%多聚甲醛固定20 min, 以0.1% Triton X-100处理后使用5%牛血清白蛋白封闭; 分别加入FXR(稀释比例为1:500)、BSEP(稀释比例为1:1 000)一抗在4℃下孵育过夜, 随后加入荧光二抗(稀释比例为1:800)孵育, 最后用DAPI进行细胞核染色, 封片, 拍照。阳性蛋白染色后呈绿色荧光, 细胞核染色后呈蓝色荧光。采用ImageJ软件对阳性蛋白进行定量分析, 荧光强度值越大代表该蛋白表达水平越高。实验重复3次。

结果(图7、表4)显示, 与对照组比较, 模型组细胞中FXR、BSEP蛋白表达均显著下调($P<0.05$); 与模型组比较, 夏佛塔苷组细胞中FXR、BSEP蛋白表达均显著上调($P<0.05$)。

3 讨论

本研究成功建立了19批DME的HPLC指纹图谱, 共标定出12个共有峰, 指出夏佛塔苷、异荭草苷、异夏佛塔苷、异牡荊苷4个黄酮类成分; 方法学验证结果稳定、可靠, 可初步表征药材的化学全貌。本研究进一步采用LCA诱导的HepG2细胞CLI模型, 以细胞存活率作为药效指标进行体外抗CLI的药效评价。19批DME(80 μ g/mL)给药组细胞存活率均显著升高($P<0.05$), 提示各批次DME均具有一定的抗CLI活性。

在指纹图谱和药效分析基础上, 本研究进一步开展了谱效关系分析。中药具有多成分、多靶点、协同起效的整体作用特点, 单一统计方法易受数据特征影响, 导致结果出现偏倚^[13]。现有研究证实, 通过多种互补的化学计量学方法构建多维度谱效关联模型进行交叉验证,

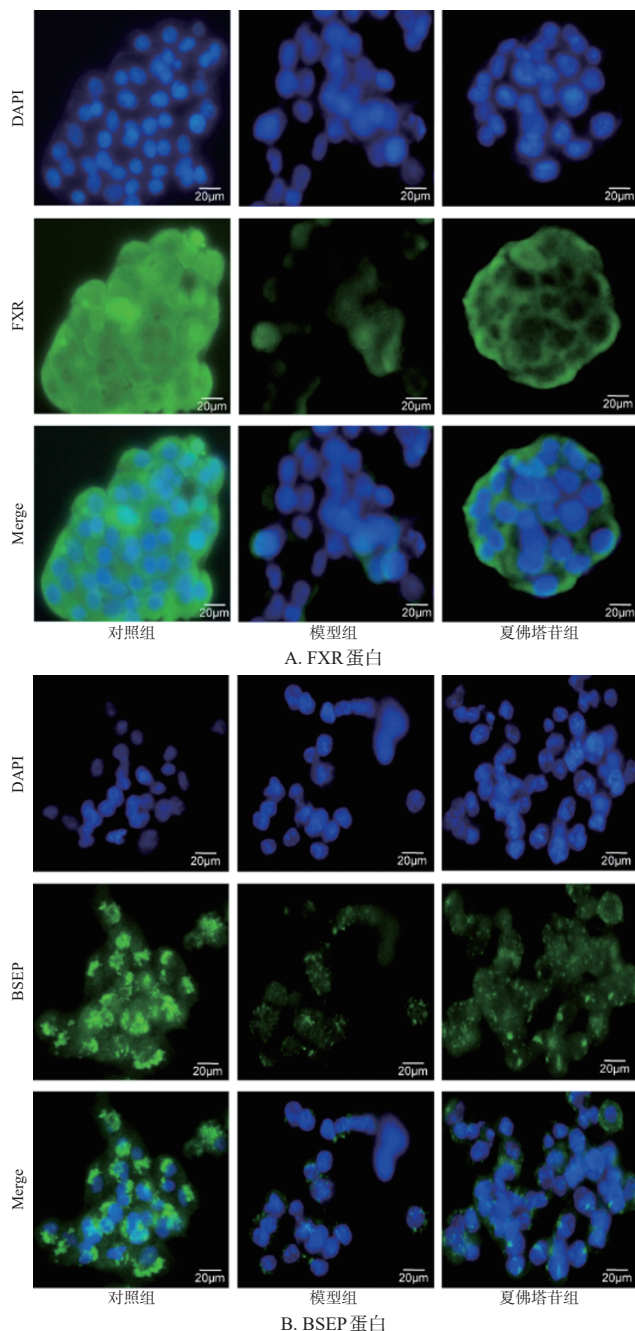


图7 各组细胞中FXR、BSEP蛋白表达的免疫荧光图

可有效提升中药活性成分筛选结果的稳健性与准确性^[14]。因此本研究整合Spearman相关性分析、灰色关联度分析、PLS分析3种方法进行交叉验证, 结果表明6号峰对应成分夏佛塔苷为核心活性成分。同时, 该结果也为2025年版《中国药典》以夏佛塔苷作为广金钱草核心质控指标提供了直接的药效学支撑。

FXR作为核受体超家族成员, 是调控胆汁酸合成、转运、代谢稳态的核心靶点, 也是干预CLI的关键作用靶点^[15-16]。Abcb11(BSEP蛋白的编码基因)是FXR直接调控的下游靶基因之一, 其编码的胆盐输出泵是介导肝细胞胆汁酸外排至胆小管的主要转运体, 在维持胆汁酸稳态中发挥关键作用^[17]。激活FXR通路可抑制胆汁酸

的过度合成并上调BSEP的表达,从而促进胆汁酸的排泄,减轻胆汁酸蓄积所致的肝细胞损伤,改善胆汁淤积的病理状态^[18-20]。夏佛塔苷是广金钱草中的特征性黄酮类成分,现代研究已证实它具有保肝、抗炎、抗氧化等肝保护活性^[21-22]。夏佛塔苷作为本研究中通过谱效关系筛选出的核心活性成分,其是否通过直接靶向激活FXR/BSEP通路发挥抗CLI作用尚不清楚。鉴于此,本研究首先采用分子对接与SPR技术预测并验证了夏佛塔苷与FXR具有良好的直接结合活性;在此基础上,进一步通过qRT-PCR、Western blot及免疫荧光染色实验验证其对FXR/BSEP通路相关分子表达的影响。结果显示,夏佛塔苷可显著升高CLI模型细胞中FXR、BSEP蛋白及其编码基因*Nr1h4*(FXR蛋白的编码基因)、*Abcb11*的mRNA表达水平,初步揭示了其促进胆汁酸排泄的作用机制。

综上,夏佛塔苷可能是DME抗CLI的核心活性成分,其作用机制可能与激活FXR/BSEP通路相关。本研究仍存在以下局限性:首先,本研究仅以细胞存活率作为谱效关系中的药效指标,尚不足以精准反映胆汁淤积发生时胆汁酸代谢紊乱、转运体功能抑制等核心病理过程;其次,本研究采用HepG2细胞建立体外CLI模型,该细胞系与正常肝细胞系或原代肝细胞在药物代谢酶活性和肝特异性功能方面存在差异^[23]。后续研究需进一步完善上述不足。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2025年版. 北京:中国医药科技出版社, 2025:46.
- [2] 黄盼,周改莲,周文良,等. 广金钱草的化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(7):135-139.
- [3] 张子婷,钟轻娇,周碧瑶,等. 广金钱草总黄酮的提取方法及药理作用研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(8):107-110.
- [4] 陆伦根,蔡晓波,王建设,等. 胆汁淤积性肝病管理指南:2021[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(1):62-69.
- [5] Hasegawa S, Yoneda M, Kurita Y, et al. Cholestatic liver disease: current treatment strategies and new therapeutic agents[J]. *Drugs*, 2021, 81(10):1181-1192.
- [6] 唐银佩,朱正望,王琳琳,等. 基于法尼醇X受体探讨中医药抗胆汁淤积机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2025, 34(7):706-712.
- [7] Zhang Z Y, Guan G Q, Tang Z X, et al. *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. extracts alleviate cholestatic liver disease by FXR pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337:118972.
- [8] 张小艺,刘久石,高石曼,等. 中药谱效关系的研究方法及应用进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20):4405-4411.
- [9] 周慧英,王园,王亚妮,等. 基于指纹图谱和多成分含量

- 测定的清瘟护肺颗粒质量评价[J]. 中国药房, 2026, 37(3):338-343.
- [10] 刘星村,张米婵,姚青青,等. 双冬胶囊HPLC指纹图谱建立及其抗炎作用的谱效关系研究[J]. 中国药房, 2024, 35(9):1094-1099.
- [11] 段雨晴,朱田密,陈树和,等. 桦褐孔菌药材的薄层色谱鉴别和HPLC指纹图谱建立及化学模式识别分析[J]. 中国药房, 2023, 34(1):52-56.
- [12] 余秋香,李思雨,常安,等. 消食颗粒化学成分鉴定及其治疗功能性消化不良的潜在作用机制研究[J]. 中国药房, 2022, 33(23):2874-2879.
- [13] 袁媛,牛娣,庞欣欣,等. 中药复方药效物质基础分析技术研究进展[J]. 中国药房, 2025, 36(21):2738-2741.
- [14] He P Y, Zhang C L, Yang Y S, et al. Spectrum-effect relationships as an effective approach for quality control of natural products: a review[J]. *Molecules*, 2023, 28(20):7011.
- [15] 智月平,张可锋,唐子轩,等. 基于网络药理学和体外实验探讨广金钱草缓解胆汁淤积性肝病的作用机制[J]. 中国新药杂志, 2025, 34(18):1985-1996.
- [16] Petrescu A D, De Morrow S. Farnesoid X receptor as target for therapies to treat cholestasis-induced liver injury[J]. *Cells*, 2021, 10(8):1846.
- [17] Ren T Q, Pang L W, Dai W L, et al. Regulatory mechanisms of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) and its role in related diseases[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2021, 45(6):101641.
- [18] Tang Z X, Zhong M L, Cao H K, et al. Polysaccharide of *Dicliptera chinensis* (L.) Juss. alleviated cholestatic liver disease by modulating the FXR pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 281:136393.
- [19] He X L, Zhou Y Y, Yu J T, et al. JiaGaSongTang improves chronic cholestasis via enhancing FXR-mediated bile acid metabolism[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128:155347.
- [20] 蔡昕,覃仁武,刘玉青,等. 桂枝通过调控FXR通路改善ANIT诱导的肝内胆汁淤积大鼠模型的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12):2594-2599.
- [21] Thongyim S, Sattayawat P, Pongamornkul W, et al. Schaftoside contributed to anti-inflammatory activity of *Clinacanthus nutans* extract in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells[J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16:1584620.
- [22] Liu M J, Zhang G H, Song M, et al. Activation of farnesoid X receptor by schaftoside ameliorates acetaminophen-induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress and inflammation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 33(2):87-116.
- [23] Stanley L Y, Wolf C R. Through a glass, darkly HepaRG and HepG2 cells as models of human phase I drug metabolism[J]. *Drug Metab Rev*, 2022, 54(1):46-62.

(收稿日期:2026-04-01 修回日期:2026-08-17)

(本文责编:林 静)