



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目： 4-苯基丁酸改善脂多糖引起的母鼠胆汁酸代谢紊乱
作者： 梁心茹，孙影，暴双蕊，詹童，吴红艳，陶文康，张伦，王建青，张程
收稿日期： 2026-03-20
网络首发日期： 2026-05-26
引用格式： 梁心茹，孙影，暴双蕊，詹童，吴红艳，陶文康，张伦，王建青，张程. 4-苯基丁酸改善脂多糖引起的母鼠胆汁酸代谢紊乱[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260526.1114.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

4-苯基丁酸改善脂多糖引起的母鼠胆汁酸代谢紊乱

梁心茹^{1,2*}, 孙影^{1,2*}, 暴双蕊^{1,2}, 詹童^{1,2}, 吴红艳^{1,2}, 陶文康^{3,4}, 张伦⁴

王建青^{3,4,5}, 张程^{1,2}

(¹安徽医科大学公共卫生学院卫生毒理学系, 合肥 230032; ²环境毒理学安徽普通高校重点实验室, 合肥 230032; ³安徽医科大学药学院, 合肥 230032; ⁴安徽省公共卫生临床中心药学部, 合肥 230032; ⁵安徽省第二人民医院药剂科, 合肥 230032)

2026-03-20 接收

基金项目：国家自然科学基金项目（编号：82073566）；安徽省自然科学基金项目（编号：2008085MH280）；安徽省高校中青年教师培养行动项目（编号：DTR2023012）

作者简介：梁心茹，女，硕士研究生；

张程，男，副教授，硕士生导师，通信作者，E-mail: zhangcheng@ahmu.edu.cn

*对本文具有同等贡献

摘要 目的 探讨内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸（4-PBA）对细菌脂多糖（LPS）诱导的妊娠晚期小鼠胆汁酸代谢紊乱的改善作用，阐明内质网应激（ERS）在妊娠期肝内胆汁淤积症（ICP）中的调控机制。**方法** 将 24 只孕鼠随机分为对照组、LPS 组、4-PBA 组及 LPS+4-PBA 组。LPS 组于妊娠第 16 天腹腔注射 LPS(200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)，4-PBA 组腹腔注射 4-PBA(150 mg/kg)，LPS+4-PBA 组在腹腔注射 4-PBA (150 mg/kg) 后 1 h 再腹腔注射 LPS (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。所有孕鼠在 LPS 处理后 6 h 检测血清总胆汁酸(TBA)、肝损伤标志物、胆汁酸谱及其关键基因和蛋白表达。**结果** LPS 暴露升高孕鼠血清 TBA 水平 ($P<0.05$)，激活 ERS 标志物及炎症因子，并下调胆汁酸转运蛋白和合成限速酶 CYP7A1 的表达 (均 $P<0.05$)。4-PBA 干预有效抑制 ERS，降低 TBA 水平 ($P<0.05$)，并上调 *Ntcp*、*Bsep*、*Mdr3* 及 *Mrp3* 基因表达 (均 $P<0.05$)。**结论** ERS 在 LPS 干扰妊娠期胆汁酸代谢稳态中发挥重要作用，抑制 ERS 可通过调控胆汁酸转运蛋白改善胆汁

淤积，为 ICP 的靶向治疗提供理论依据。

关键词 妊娠期肝内胆汁淤积症；内质网应激；细菌脂多糖；4-苯基丁酸；胆汁酸代谢；肝脏

中图分类号 R 575.1

4-Phenylbutyrate ameliorates lipopolysaccharide-induced bile acid metabolism disorder in maternal mice

Liang Xinru^{1,2*}, Sun Ying^{1,2*}, Bao Shuangrui^{1,2}, Zhan Tong^{1,2}, Wu Hongyan^{1,2}, Tao Wenkang^{3,4},
Zhang Lun⁴, Wang Jianqing^{3,4,5}, Zhang Cheng^{1,2}

(¹Department of Toxicology, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Key Laboratory of Environmental Toxicology of Anhui Higher Education Institutes, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Department of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ⁴Anhui Public Health Clinical Center, Hefei 230032; ⁵Department of Pharmacy, Anhui No.2 Provincial People's Hospital, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the ameliorative effect of the endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-phenylbutyric acid (4-PBA) on bile acid metabolism disorders induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) in late-pregnant mice, and to clarify the regulatory mechanism of endoplasmic reticulum stress (ERS) in intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). **Methods** Twenty-four pregnant mice were divided into control group, LPS group, 4-PBA group, and LPS+4-PBA group. On the 16th day of pregnancy, the LPS group received intraperitoneal injection of LPS (200 µg/kg) and the 4-PBA group received injection of 4-PBA (150 mg/kg). In the LPS+4-PBA group, 4-PBA was intraperitoneally injected first, followed by LPS administration 1 h later. Serum total bile acid (TBA), liver injury markers, bile acid profiles, and the expression of key genes and proteins were detected 6 h after LPS treatment. **Results** LPS exposure increased serum TBA levels in pregnant mice ($P < 0.05$), activated ERS markers and inflammatory factors, and

downregulated bile acid transporters and the expression of the rate limiting enzyme CYP7A1(all $P<0.05$). 4-PBA intervention effectively inhibited ERS, reduced TBA levels($P<0.05$), and upregulated *Ntcp*, *Bsep*, *Mdr3*, and *Mrp3* gene expression(all $P<0.05$). **Conclusion** ERS plays an important role in LPS interference with the homeostasis of bile acid metabolism during pregnancy. Inhibiting ERS can improve bile stasis by regulating bile acid transporters, providing a theoretical basis for targeted therapy of ICP.

Key words intrahepatic cholestasis of pregnancy; endoplasmic reticulum stress; lipopolysaccharide; 4-Phenylbutyric acid; bile acid metabolism; liver

Found programs National Natural Science Foundation of China (No. 82073566); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2008085MH280); Project for Cultivation of Young and Middle-aged Teachers in Universities of Anhui Province

(No. DTR2023012)

Corresponding author Zhang Cheng, E-mail: zhangcheng@ahmu.edu.cn

妊娠期肝内胆汁淤积症 (intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP) 是妊娠中晚期特有的肝脏疾病, 以皮肤瘙痒和血清总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 水平升高 ($TBA \geq 10 \mu\text{mol/L}$) 为特征, 严重时可引发母体黄疸及胎儿不良结局 (如早产、死产等)^[1-2]。近年研究^[3]表明, ICP 对母体的危害不仅限于妊娠期, 还可能增加远期心血管疾病、糖尿病、肝胆疾病甚至癌症风险, 但其具体机制尚不明确。肠道菌群失调及内毒素如脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 通过破坏肠屏障进入循环, 可能激活内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS), 而 ERS 已被证实与胆汁酸代谢紊乱及肝损伤密切相关^[4]。ERS 是细胞应对内质网未折叠蛋白积累的适应性反应, 但其过度激活可引发炎症和代谢异常。课题组前期研究^[5]显示, LPS 可诱导妊娠晚期小鼠胆汁酸代谢紊乱。然而, 目前针对 ICP 的治疗仍以对症为主, 缺乏针对 ERS 的靶向干预策略。该研究聚焦母体层面的病理机制, 探讨 ERS 抑制剂 4-苯基丁酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) 对 LPS 诱导的妊娠晚期胆汁酸代谢紊乱的改善作用, 通过分析母体血清及肝脏胆汁酸组成变化, 结合 ERS 标志物表达, 旨在揭示 ERS 在 ICP 中的调控作用, 为开发基于 ERS

靶点的治疗策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物的饲养与处理程序

本研究使用健康 SPF 级 ICR 小鼠（雄性 30~34 g，雌性 26~28 g，8 周龄），购自北京维通利华动物有限公司。小鼠在温度 20~25 °C、湿度（50±5）% 的环境中适应性饲养 1 周。雄雌交配合笼，以发现阴栓日为受孕第 0 天（GD0）。实验选取 24 只孕鼠，随机分为对照组、LPS 组、4-PBA 组及 LPS+4-PBA 组。按照孕鼠体质量的 0.5%（V/W）经腹腔注射给予处理，LPS 组于 GD16 腹腔注射 LPS（200 μg/kg），对照组注射等量 0.9% 氯化钠溶液。4-PBA 组于 GD16 腹腔注射 4-PBA（150 mg/kg），LPS+4-PBA 组在腹腔注射 4-PBA（150 mg/kg）后 1 h 再腹腔注射 LPS（200 μg/kg）。所有孕鼠在 LPS 处理后 6 h 经称重、采血后处死，分离血清和收集肝脏组织用于后续分析。

1.2 主要试剂

LPS(货号: L2630-10MG, 美国 Sigma 公司); 4-PBA(货号: P21005, 美国 MedChemExpress 公司); TRIzol 试剂(货号: 15596026, 美国 Invitrogen 公司); LightCycler® 480 SYBR Green I Master 及 LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white(货号: 04887352001、04729692001, 瑞士 Roche 公司); LC-MS 级有机溶剂(甲醇, 货号: 67-56-1, 上海安谱实验科技股份有限公司; 乙腈, 货号: A998-4, 美国赛默飞世尔科技有限公司); 甲酸铵(货号: A800015, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 抗体 p-IRE1 α、IRE1 α 和 GRP78(货号: PA5-117321、MA5-14991、MA5-27686, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 抗体 ATF4、p-PERK 和 PERK(货号: ab85049、ab192591、ab229912, 英国 Abcam 公司); 抗体 CYP7A1(货号: sc-518007, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 抗体 β-actin(货号: A2228, 德国 Merck 公司)。

1.3 主要仪器

实时荧光定量 PCR 仪(型号: LightCycler® 480 II, 瑞士 Roche 公司); LC-MS/MS 串联质谱仪(型号: 3500 QTRAP, 美国 AB SCIEX 公司); 全自动生化分析仪(型号: CS-T300, 中国迪瑞医疗科技公司)。

1.4 组织病理学检查

将母鼠的肝脏组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h，随后在 75% 乙醇中脱水 24 h。之后，将肝脏组织包埋于石蜡中，并以 5 μm 的厚度进行切片。切片采用苏木精和伊红（HE）染色法进行染色。

1.5 血清与肝脏生化指标检测

收集母鼠血液后，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 5 000 r/min 离心 10 min，分离血清。使用丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒检测血清中 ALT、AST 活性，TBA 试剂盒检测血清 TBA 含量。取 100 mg 肝脏组织，加入 1 mL 的 75% 乙醇匀浆，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 5 000 r/min 离心 10 min，取 50 μL 上清液用 TBA 试剂盒检测肝脏 TBA 含量。实验使用迪瑞 CS-T300 全自动生化分析仪。

1.6 胆汁酸成分的测定

使用 LC-MS/MS 检测母鼠血清和肝脏的胆汁酸成分和含量^[6]。使用液相色谱-三重四级杆质谱仪对母鼠血清及肝脏组织样本中的胆汁酸组分含量进行测定，色谱柱选用 Phenomenex Gemini 3 μm NX-C₁₈ 110A 柱。流动相配置：A 相为 4 mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1% 冰乙酸），B 相为甲醇；柱温维持在 40 $^{\circ}\text{C}$ ；流速设定为 0.4 mL/min；进样体积为 10 μL 。血清预处理：取样本 50 μL ，加入 250 μL 甲醇与 50 μL 内标（200 ng/mL），涡旋混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 20 min；于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 5 000 r/min 离心 10 min，取上清氮气吹干；以 50 μL 甲醇 - 水（1:1, v/v）复溶，再次离心后取上清进样。肝脏组织处理：称取 100 mg 肝组织，加入 1 mL 75% 乙醇匀浆，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 2 h；于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 5 000 r/min 离心 10 min，取 50 μL 上清液，加入 50 μL 内标，涡旋后离心；取上清氮气吹干，甲醇-水（1:1）复溶，离心后取上清待测。

1.7 用 RT-qPCR 技术检测相关基因的 mRNA 表达水平

从母鼠的肝脏中提取总 RNA，每组使用 TRIzol 试剂提取 6 个生物学独立样本。随后，利用专门的逆转录酶系统进行逆转录。使用 LightCycler[®] 480 SYBR Green I 试剂盒以及针对特定基因定制的引物（详见表 1），对 PCR 产物进行实时检测。这些反应在 LightCycler[®] 480 仪器中发生，首先在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 10 min 的变性步骤，然后进行 45 个三步 PCR 扩增循环：在 95 $^{\circ}\text{C}$

下变性 15 s, 在 60 °C 下退火 15 s, 然后在 72 °C 下延伸 20 s。所有引物均由美国 Invitrogen 公司合成。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法定量靶基因的表达水平, 以 18S rRNA 水平作为参考。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Genes	Forward primers (5' -3')	Reverse primers (5' -3')
<i>Rn18s</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>Cyp7a1</i>	ACTAGGGAAGTTTCGACATGC	ATGGTGTGGTCTTGGAGGT
<i>Bsep</i>	CTGCCAAGGATGCTAATGCA	CGATGGCTACCCTTTGCTTCT
<i>Ntcp</i>	TCTTTTATTTGCCACAGCTACA	CATCCTCCGACCCAGTGAAC
<i>Mrp3</i>	CTGGGTCCCCTGCATCTAC	GCCGTCTTGAGCCTGGATAAC
<i>Mdr3</i>	TATCCGCTATGGCCGTGGGAA	ATCGGTGAGCTATCACAATGG
<i>Chop</i>	CCAACAGAGGTCACACGCACATC	CTTGAGCCGCTCGTTCTCTTCAG
<i>Grp78</i>	GCCGAGGAGGAGGACAAGAAGG	CATTCCAAGTGCGTCCGATGAGG
<i>Atf6a</i>	TTATCTCCGGGATCATCAGC	CTAGCATGTTCCACCCCACT
<i>Atf4</i>	GAGTAATGTAAGCAGCAGAGTCAGG	ATTCCTTTAGTTTAGAGCTAGGCAGTG
<i>Xbp1s</i>	GAGTCCGCAGCAGGTG	GTGTCAGAGTCCATGGGA
<i>IL-1α</i>	GTGCTCAAACGAAGACGAACC	CATATTGCCATGCTTTTCCCAGAA
<i>IL-1β</i>	GAGCCATCCTCTGTGACTC	TCCATTGAGGTGGAGAGCTT
<i>IL-6</i>	CTGGCAGAAAACAACCTGAACC	TGATTCTCATCAAGCAGGTCTCC
<i>TNF-α</i>	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT

1.8 Western blot 实验

通过 SDS-PAGE 电泳分离母鼠肝脏总蛋白裂解物，随后转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后，将膜置于稀释后的一抗工作液 GRP78、ATF4、PERK、p-PERK、IRE1 α 、p-IRE1 α 和 CYP7A1（稀释比分别为 1: 1 000、1: 500、1: 1 000、1: 1 000、1:2 000、1:1 000 和 1:1 000），随后在 4 °C 条件下摇床孵育过夜。 β -肌动蛋白（稀释比为 1: 5 000）在实验中被用作标准化蛋白质水平的参考点。使用含 0.05% Tween-20 的 TBST 缓冲液洗涤，洗涤 3 次，每次洗涤 8 min。孵育结束后用二抗（山羊抗兔或小鼠 IgG，稀释比为 1: 10 000）室温孵育 2 h。随后，在含有 0.05% Tween-20 的 TBST 缓冲液中再次洗涤膜 3 次，每次 8 min。最后，通过使用 ECL 检测试剂盒检测信号。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。对于符合正态分布的两组数据间的差异，采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组数据比较则采用方差分析（ANOVA）方法进行处理，其中多组间多个时间点数据的比较，采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4-PBA 干预显著抑制 LPS 诱导的内质网应激

为探讨 ERS 对 LPS 诱导的胆汁酸代谢的影响，本研究采用 ERS 抑制剂 4-PBA 进行干预。结果显示，4-PBA 显著抑制了 LPS 诱导的 ERS 标志基因 *Chop*、*Grp78*、*Atf6 α* 、*Atf4* 和 *Xbp1s* 的 mRNA 表达上调（ $P < 0.05$ ，图 1A-1E）。同时，4-PBA 干预显著降低了 ATF4 和 GRP78 的蛋白表达水平（ $P < 0.05$ ，图 1F-1G），并抑制了 p-IRE1 α 的表达，而总 IRE1 α 表达量上升，p-IRE1 α /IRE1 α 比值显著降低（ $P < 0.05$ ，图 1H-1J）。此外，4-PBA 还降低了 PERK 及 p-PERK 的蛋白表达，p-PERK/PERK 比值下降（ $P < 0.05$ ，图 1K-1N）。以上结果表明，4-PBA 通过抑制 IRE1 α 和 PERK 通路，有效缓解了 LPS 诱导的孕期母鼠肝脏 ERS，为 ERS 在胆汁酸代谢中的调控作用提供了实验依据。

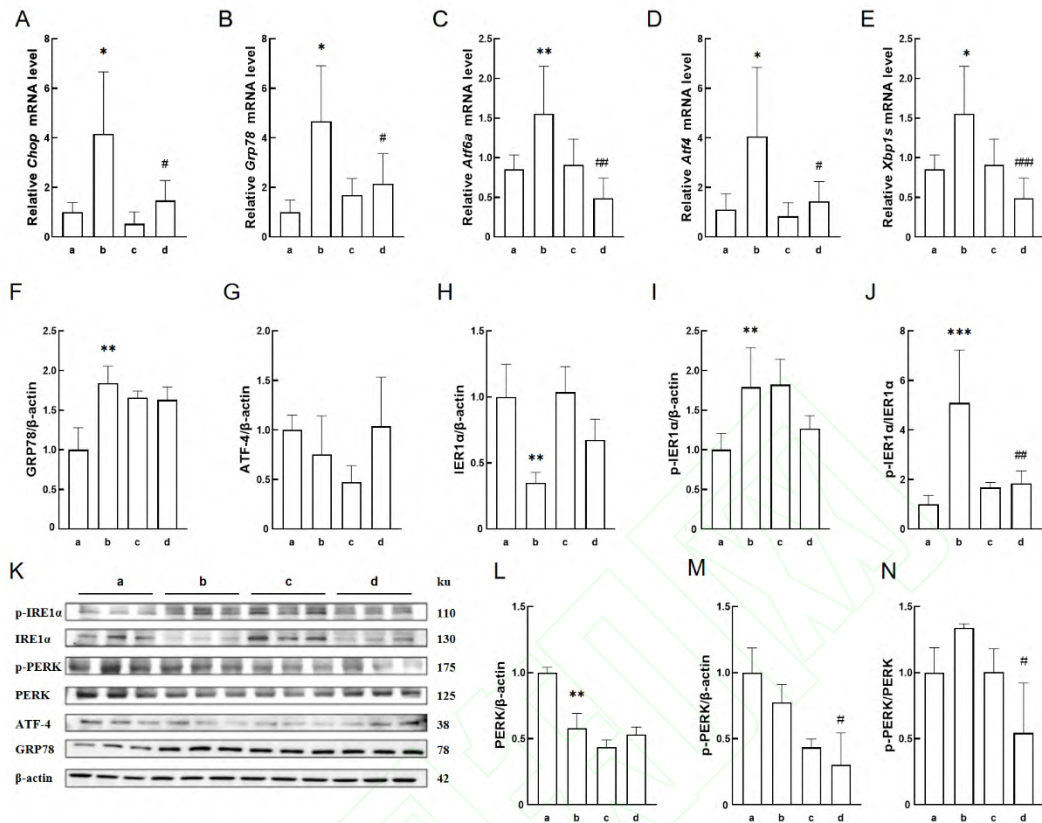


图 1 急性 LPS 暴露及 4-PBA 干预对母鼠肝脏内质网应激的影响 ($n = 6$)

Fig. 1 The effects of acute LPS exposure and 4-PBA intervention on hepatic endoplasmic reticulum stress of maternal mice ($n = 6$)

注: A–E: The levels of *Chop*, *Grp78*, *Atf6a*, *Atf4*, and *Xbp1s* mRNA in maternal liver were detected by RT-qPCR; F–N: The protein expression levels of GRP78, ATF4, IRE1 α , p-IRE1 α , PERK and p-PERK in maternal liver were detected by Western blot analysis with quantification; a: Control group; b:LPS group; c:4-PBA group; d:LPS+4-PBA group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs LPS group.

2.2 4-PBA 干预抑制 LPS 引起的母鼠肝脏炎症反应

为观察 4-PBA 干预对 LPS 引起母鼠肝脏炎症反应的影响, 用 RT-qPCR 技术检测 *IL-1 α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* 以及 *TNF α* mRNA 水平。其中 *IL-1 α* 和 *IL-1 β* 作为早期炎症反应的关键介质, 能够触发一系列下游信号通路; *IL-6* 则参与调节免疫反应和急性期反应; 而 *TNF α* 则是引发炎症和

组织损伤的重要细胞因子。实验结果显示,经 LPS 暴露后激活的炎症基因表达水平,在 4-PBA 进行干预后出现了显著的下落 ($P < 0.05$, 图 2A-2D)。结果表明,4-PBA 的干预措施有效地抑制了由急性 LPS 暴露所诱导的母鼠肝脏中的炎症反应。

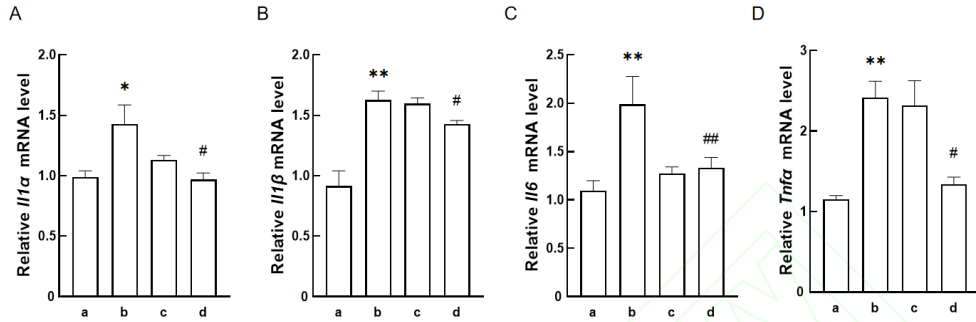


图 2 4-PBA 对急性 LPS 暴露下母鼠肝脏炎症反应的影响 ($n = 6$)

Fig. 2 The effects of 4-PBA on hepatic inflammatory response in maternal mice under acute LPS exposure ($n = 6$)

注: A-D: The levels of *Il1α*, *Il1β*, *Il6* and *Tnfrα* mRNA in maternal liver were detected by RT-qPCR; a:Control group; b:LPS group; c:4-PBA group; d:LPS+4-PBA group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs LPS group.

2.3 4-PBA 干预缓解 LPS 引起的母鼠肝损伤

为评估 4-PBA 对 LPS 诱导的母鼠肝脏损伤的干预效果,本研究结合形态学观察与生化指标检测进行了系统分析。结果显示,4-PBA 显著缓解了 LPS 诱导的肝细胞体积增大(图 3A-3C),并降低了肝脏系数 ($P < 0.05$, 图 3D)。同时,4-PBA 干预显著降低了血清 TBA、ALT 及 AST 水平 ($P < 0.05$, 图 3E-3G),以及肝脏 TBA 水平 ($P < 0.05$, 图 3H)。这些结果表明,4-PBA 通过改善 LPS 引起的肝损伤,为妊娠期肝内胆汁淤积症的治疗提供了实验依据。

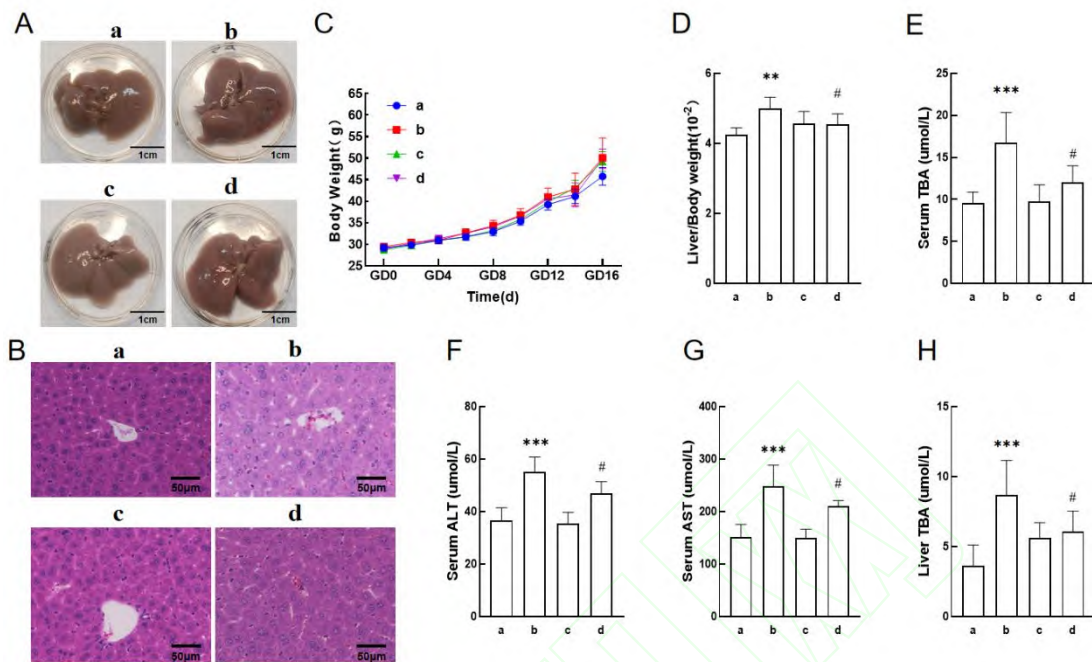


图3 4-PBA 对急性 LPS 暴露诱导的母鼠高胆汁酸状态及肝损伤的改善作用 ($n = 6$)

Fig. 3 Improving effects of 4-PBA on hypercholanemia and liver injury induced by acute LPS exposure of maternal mice ($n = 6$)

注: A: Representative liver images (photographed in a 30 mm culture dish, scale bar 1 cm); B: Representative H&E staining images of liver tissue ($\times 200$, scale bar 50 μm); C: Body weight of pregnant mice from GD0 to GD16; D: Liver coefficient; E: Serum total bile acid levels; F: Serum alanine aminotransferase levels; G: Serum aspartate aminotransferase levels; H: Hepatic total bile acid levels; a:Control group; b:LPS group; c:4-PBA group; d:LPS+4-PBA group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs LPS group.

2.4 4-PBA 干预改善 LPS 对母鼠胆汁酸谱的干扰作用

为明确 4-PBA 干预对孕期母鼠胆汁酸代谢是否产生显著的表型影响，用 LC-MS/MS 技术系统测定了母鼠血清和肝脏中的胆汁酸组分。研究结果显示：在母鼠血清中共检测出了 21 种胆汁酸成分(图 4A)。值得注意的是，相较于仅接受 LPS 处理的对照组，LPS+4-PBA 组的血清中大部分胆汁酸成分的含量呈现出明显的下降趋势。在初级胆汁酸中，结合胆汁酸 TCA、T- α -MCA 以及游离胆汁酸 α -MCA 的含量尤为突出，且 LPS+4-PBA 组的含量相较于 LPS 组有显著下降 ($P<0.05$ ，图 4B)。而在次级胆汁酸中，LPS+4-PBA 组的 GDCA 的含量相较于 LPS 组显著下降 ($P<0.05$ ，图 4C)。在母鼠肝脏中，同样检测出了 21 种胆汁酸成分，且与血清中的检测结果相一致(图 4D)。肝脏中初级结合胆汁酸的占比具有绝对优势。具体到初级胆汁酸，LPS+4-PBA 组的 T- α -MCA、TCA、T- β -MCA、CA、CDCA、 α -MCA 和 β -MCA 的含量相较于 LPS 组有显著下降($P<0.05$ ，图 4E)。而在次级胆汁酸中，LPS+4-PBA 组的 TLCA、TDCA、GUDCA 和 DCA 的含量同样相较于 LPS 组有显著下降 ($P<0.05$ ，图 4F)。这些结果共同表明，4-PBA 干预对孕期母鼠的胆汁酸代谢产生了显著的积极影响，有助于缓解由 LPS 暴露引起的高胆汁酸状态。

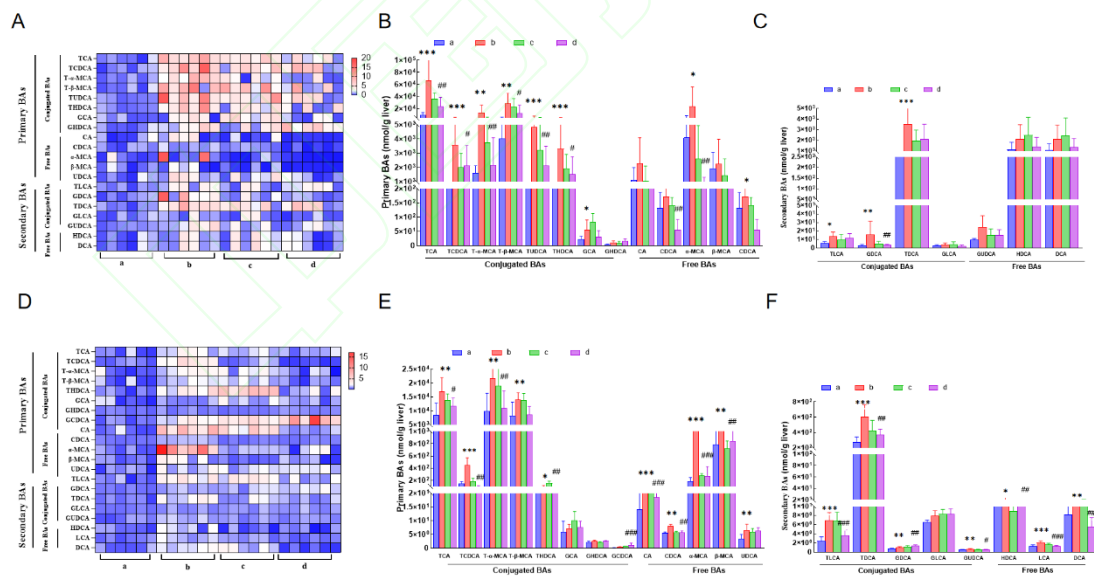


图 4 4-PBA 对急性 LPS 暴露诱导的母鼠胆汁酸代谢异常的影响 ($n = 6$)

Fig. 4 The effects of 4-PBA on abnormal bile acid metabolism induced by acute LPS exposure of maternal mice ($n = 6$)

注：A: Heatmap of serum bile acid profiles; B: Metabolic profiles of primary bile acids in serum; C: Metabolic profiles of secondary bile acids in serum; D: Heatmap of hepatic bile acid profiles; E: Metabolic profiles of primary bile acids in liver; F: Metabolic profiles of secondary bile acids in liver; a:Control group; b:LPS group; c:4-PBA group; d:LPS+4-PBA group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs LPS group.

2.5 4-PBA 干预对 LPS 干扰母鼠胆汁酸代谢的影响

为探究 LPS 对孕期母鼠胆汁酸代谢关键调控因子的影响及 4-PBA 的干预机制，本研究采用 Western blot 和 RT-qPCR 技术进行了系统分析。结果显示，LPS 急性暴露显著降低孕鼠肝脏中 CYP7A1 的蛋白水平，而 4-PBA 干预使其显著回升 ($P < 0.05$, 图 5A、5B)，提示 4-PBA 通过促进 CYP7A1 表达缓解胆汁酸合成抑制。此外，LPS 导致胆汁酸代谢相关基因 *Cyp7a1*、*Ntcp*、*Bsep*、*Mdr3*、*Mrp3*、*Cyp3a11* 的 mRNA 表达全面下调；4-PBA 处理后，这些基因表达均显著上调 ($P < 0.05$, 图 5C-5H)，表明其通过多靶点改善胆汁酸合成、转运及排泄功能。以上结果提示，LPS 通过抑制 CYP7A1 及胆汁酸代谢基因引发胆汁酸稳态失衡，而 4-PBA 可逆转这一过程，为靶向 ER 应激治疗妊娠期胆汁淤积症提供了实验依据。

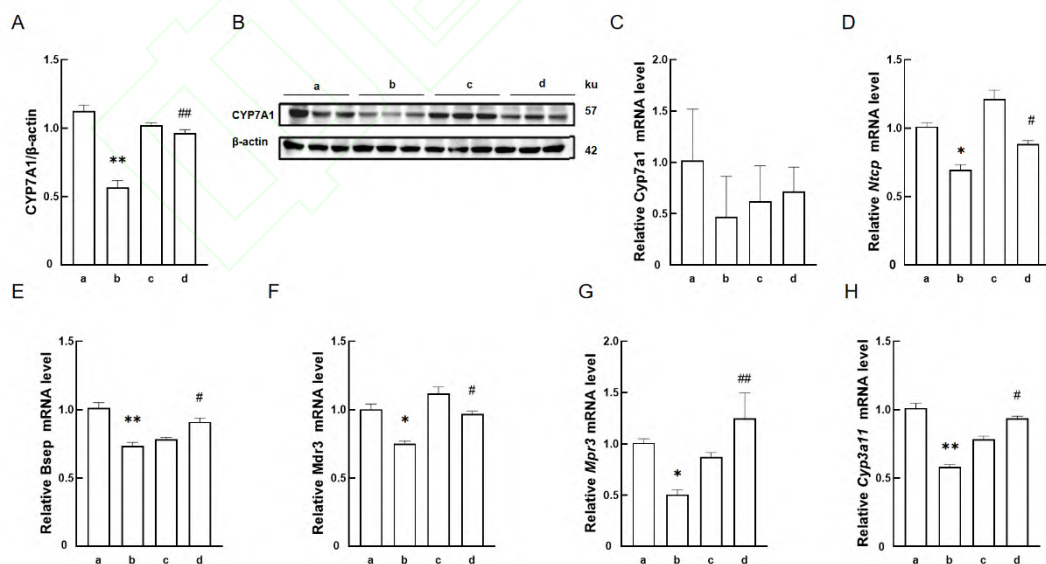


图 5 4-PBA 在急性 LPS 暴露引起母鼠胆汁酸代谢紊乱中的干预作用 ($n = 6$)

Fig. 5 Interventions role of 4-PBA in bile acid metabolism disorder induced by acute LPS

exposure of maternal mice ($n = 6$)

注: A, B: The protein expression level of CYP7A1 was detected by Western blot analysis with quantification; C-H: The levels of *Cyp7a1*, *Ntcp*, *Bsep*, *Mdr3*, *Mrp3* and *Cyp3a11* in maternal liver were detected by RT-qPCR; a:Control group; b:LPS group; c:4-PBA group; d:LPS+4-PBA group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs LPS group.

3 讨论

本研究证实 ERS 激活在 LPS 诱导的妊娠期胆汁酸代谢紊乱中发挥重要调控作用。ERS 是细胞应对蛋白质折叠失衡的适应性反应,但其过度激活可触发炎症级联反应并干扰代谢稳态。本研究成功构建妊娠期小鼠 LPS 急性暴露模型,研究结果显示,LPS 单次暴露显著升高血清 TBA 水平。此外,4-PBA 干预能有效缓解胆汁淤积表型,降低血清 TBA 水平并改善肝脏病理损伤。这一结果与既往研究^[7]提出的 ERS 参与胆汁淤积性肝损伤的观点一致,进一步明确了 ERS 在妊娠期特异性胆汁酸代谢失衡中的重要作用。近年来,肠道菌群失调与妊娠相关疾病的关联备受关注。妊娠期母体肠道菌群的重塑可能通过增加肠道通透性,促进 LPS 易位入血,进而影响肝脏代谢功能^[4]。本研究中,LPS 暴露显著升高妊娠小鼠血清 LPS 水平,并诱导胆汁酸转运蛋白 BSEP 和 MDR3 的表达下调,这一现象与临床 ICP 患者中观察到的胆汁酸排泄障碍高度相似^[8-10]。结合前期研究^[5],本研究提出“肠道菌群-LPS-ERS 轴”可能是 ICP 发生的重要机制:肠道屏障破坏导致 LPS 易位入血→激活肝细胞 ERS→抑制胆汁酸转运蛋白→胆汁酸蓄积及肝损伤。这一通路为解释 ICP 的母体中心病理机制提供了新视角,同时也提示针对肠道菌群或 LPS 的干预可能成为预防和治疗 ICP 的潜在策略。

为明确内质网应激在胆汁酸代谢紊乱中的调控作用,本研究采用 4-PBA 进行体内干预实验,结果表明,4-PBA 作为内质网应激抑制剂,可多途径缓解妊娠期胆汁淤积病理改变。结果表明 4-PBA 通过抑制 PERK 与 IRE1 α 通路,降低 GRP78 与 p-IRE1 α 表达,缓解 ERS 状态;且上调 *Ntcp*、*Bsep*、*Mdr3* 及 *Mrp3* 等胆汁酸转运蛋白的基因表达,促进胆汁酸排泄与肝内稳态重建。值得注意的是,尽管 4-PBA 对 ATF6 通路的抑制作用未达统计学意义,但其对整体 ERS 的调控足以改善胆汁淤积表型,提示 IRE1 α 通路可能是更关键的干预靶点。然而,本研究与 Henkel^[11]的结论存在差异,可能与实验动物妊娠阶段或 LPS 暴露模式不同有关,需进一

步验证。

胆汁酸代谢依赖于肝细胞膜上多种转运蛋白的协同作用。本研究重点探讨了 NTCP（胆汁酸摄取）、BSEP/MDR3（胆汁排泄）及 MRP3（胆汁酸逆向转运）在 ERS 调控下的表达变化。结果显示，LPS 暴露导致 Bsep 与 Mdr3 表达显著下调，而 4-PBA 干预可逆转这一趋势。BSEP 作为胆汁酸排泄的关键泵，其功能缺失可直接导致肝内胆汁酸蓄积^[9]。MDR3 则通过分泌磷脂形成混合微粒，减轻胆汁酸对胆管上皮的毒性^[10, 12]。因此，ERS 可能通过抑制 BSEP/MDR3 表达，破坏胆汁酸排泄，最终引发胆汁淤积。此外，MRP3 的上调可能是肝细胞应对胆汁酸过载的代偿性反应，通过将胆汁酸逆向转运至血液减轻肝内压力，但其长期激活可能加剧全身性胆汁酸暴露，这一矛盾效应也有待进一步研究^[13-14]。

尽管本研究揭示了 ERS 在 ICP 中的重要作用，但仍存在一定局限性。首先，CYP7A1 作为胆汁酸合成的限速酶，在 LPS 诱导的代谢紊乱中是否受 ERS 调控尚未明确。前期研究表明，CYP7A1 表达受多种通路（如 FXR 信号）调节，其与 ERS 的交互作用值得深入探讨^[15]。其次，本研究未系统分析肠道菌群变化与 LPS 暴露的因果关系，未来可通过粪菌移植或抗生素干预模型进一步验证“肠-肝轴”机制。本研究结果发现 4-PBA 显著缓解了 LPS 诱导的肝细胞体积增大并降低了肝脏系数，因所有组别孕鼠体重在 LPS 处理前后均无明显改变，未考虑急性 LPS 和 4-PBA 暴露对胎鼠发育的影响，可能影响肝脏/去子宫质量比值。本研究参考前期孕晚期急性单次 LPS 暴露剂量效应和时间效应研究结果，建立了急性单剂量暴露的母鼠胆汁酸代谢紊乱模型，本研究结果也存在一定的局限性^[15-17]。此外，4-PBA 的临床转化还需考虑其长期安全性及对胎儿的潜在影响，需开展更多的体内外研究进行验证。

综上所述，本研究通过体内实验，从 ERS 激活、炎症反应、胆汁酸谱变化到关键分子调控，阐明了 LPS 诱导妊娠期胆汁酸代谢紊乱的部分机制，并证实 4-PBA 可通过抑制 ERS 有效改善胆汁淤积表型。这一发现不仅为理解 ICP 的发病机制提供了新视角，也为开发靶向 ERS 的干预策略提供了实验基础。

参考文献

[1] Tang M, Xiong L, Cai J, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: insights into pathogenesis and advances in omics studies[J]. *Hepatol Int*, 2024, 18(1): 50-62. doi:10.1007/s12072-023-10604-y.

- [2] Ovadia C, Sajous J, Seed P T, et al. Ursodeoxycholic acid in intrahepatic cholestasis of pregnancy: a systematic review and individual participant data meta-analysis[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2021, 6(7): 547-58. doi:10.1016/S2468-1253(21)00074-1.
- [3] Hobson S, Gandhi S, Sobel M. Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Can Med Assoc J*, 2022, 194(48): E1650. doi:10.1503/cmaj.220334.
- [4] Moraitis I, Guiu J, Rubert J. Gut microbiota controlling radiation-induced enteritis and intestinal regeneration[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34(8): 489-501. doi:10.1016/j.tem.2023.05.006.
- [5] Zhang C, Gan Y, Lv J W, et al. The protective effect of obeticholic acid on lipopolysaccharide-induced disorder of maternal bile acid metabolism in pregnant mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106442. doi:10.1016/j.intimp.2020.106442.
- [6] 赵凡, 张伦, 叶露, 等. LC-MS/MS同时测定22种胆汁酸在孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘中的应用[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(8): 1287-92, 1299.
- [6] Zhao F, Zhang L, Ye L, et al. LC-MS/MS simultaneous determination of 22 bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of pregnant mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(8): 1287-92, 1299.
- [7] Huang C Y, Deng J S, Huang W C, et al. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by hispolon in mice, through regulating the TLR4/PI3K/Akt/mTOR and Keap1/Nrf2/HO-1 pathways, and suppressing oxidative stress-mediated ER stress-induced apoptosis and autophagy[J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1742. doi:10.3390/nu12061742.
- [8] Ren T, Pang L, Dai W, 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. doi:10.1016/j.clinre.2021.101641.
- [9] van Wessel D B E, Thompson R J, Gonzales E, et al. Genotype correlates with the natural history of severe bile salt export pump deficiency[J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 84-93. doi:10.1016/j.jhep.2020.02.007.
- [10] Beaudoin J J, Yang K, Adiwidjaja J, et al. Investigating bile acid-mediated cholestatic drug-induced liver injury using a mechanistic model of multidrug resistance protein 3 (MDR3) inhibition[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 13: 1085621. doi:10.3389/fphar.2022.1085621.
- [11] Henkel A S, LeCuyer B, Olivares S, et al. Endoplasmic reticulum stress regulates hepatic bile acid metabolism in mice[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 3(2): 261-71. doi:10.1016/j.jcmgh.2016.11.006.
- [12] Stättermayer A F, Halilbasic E, Wrba F, et al. Variants in ABCB4 (MDR3) across the spectrum

of cholestatic liver diseases in adults[J]. *J Hepatol*, 2020, 73(3): 651-63. doi:10.1016/j.jhep.2020.04.036.

[13] Lu Q, Zhu Y, Wang C, et al. Obeticholic acid protects against lithocholic acid-induced exogenous cell apoptosis during cholestatic liver injury[J]. *Life Sci*, 2024, 337: 122355. doi:10.1016/j.lfs.2023.122355.

[14] Lozano E, Asensio M, Perez-Silva L, et al. MRP3-mediated chemoresistance in cholangiocarcinoma: target for chemosensitization through restoring SOX17 expression[J]. *Hepatology*, 2020, 72(3): 949-64. doi:10.1002/hep.31088.

[15] Rizzolo D, Kong B, Taylor R E, et al. Bile acid homeostasis in female mice deficient in Cyp7a1 and Cyp27a1[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12): 3847-56. doi:10.1016/j.apsb.2021.05.023.

[16] Chen Y H, Wang J P, Wang H, et al. Lipopolysaccharide treatment downregulates the expression of the pregnane X receptor, cyp3a11 and mdr1a genes in mouse placenta[J]. *Toxicology*, 2005, 211(3): 242-52. doi:10.1016/j.tox.2005.03.011.

[17] Li X Y, Zhang C, Wang H, et al. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced downregulation of CYP3A in fetal liver: its repression by a low dose LPS pretreatment[J]. *Toxicol Lett*, 2008, 179(2): 71-7. doi:10.1016/j.toxlet.2008.04.005.