

加味茵陈蒿汤对雌激素致肝内胆汁淤积症大鼠肝脏 AQP8 mRNA 和蛋白表达的影响^{*}

刘 佳, 赵 宇, 侯莉莉^{**}

(南京市妇幼保健院 南京 210004)

摘 要:目的:观察加味茵陈蒿汤对雌激素致肝内胆汁淤积症大鼠肝脏水通道蛋白 8 (AQP8) mRNA 和蛋白表达的影响,探讨加味茵陈蒿汤治疗妊娠肝内胆汁淤积症可能的分子机制。方法:50 只 SD 雌性大鼠,体质量 180–200 g,随机分为正常组(N, $n=10$)和模型组(M', $n=40$)。M'组大鼠皮下注射 17- α 乙炔雌二醇 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续 5 天,建立肝内胆汁淤积症模型, N 组大鼠给予相同体积的丙二醇皮下注射。5 天后, M'组大鼠随机分为模型组(M, $n=10$)、加味茵陈蒿汤高剂量(Zg, $n=10$)、中剂量(Zz, $n=10$)和低剂量组(Zd, $n=10$),分别给予生理盐水和高、中、低剂量的加味茵陈蒿汤灌胃,连续 7 天。7 天后处死大鼠,留取肝脏组织,置于液氮中保存,分别运用实时定量 PCR 法及蛋白免疫印迹法检测 AQP8 mRNA 与蛋白表达情况。结果:与正常组(N)比较,模型组(M)大鼠肝脏组织 AQP8 mRNA 与蛋白表达水平降低($P<0.01$)。与模型组(M)比较,高、中和低剂量的加味茵陈蒿汤均可增加大鼠肝脏组织 AQP8 mRNA 与蛋白表达水平($P<0.05$)。此外,研究还发现,随着加味茵陈蒿汤给药剂量的增加,其上调 AQP8 mRNA 和蛋白表达的作用增强。结论:加味茵陈蒿汤治疗妊娠肝内胆汁淤积症的分子机制可能是通过增加肝脏组织 AQP8 mRNA 与蛋白表达水平实现的。

关键词: 雌激素 肝内胆汁淤积症 加味茵陈蒿汤 AQP8

doi:10.11842/wst.2015.08.015 中图分类号:R285.5 文献标识码:A

妊娠肝内胆汁淤积症的发病机制尚未完全阐明,由于其通常发生在妊娠中晚期、雌激素合成的高峰阶段,故研究者认为,雌激素及其代谢产物的增加可能是导致本病发生的重要病理机制之一^[1]。临床研究发现,2 胎或 3 胎妊娠的女性与单胎妊娠的女性比较更容易发生妊娠肝内胆汁淤积症,可能是因为其体内雌激素水平高于单胎妊娠的女性^[2]。另外,还有研究观察到口服避孕药或绝经后的激素替代治疗也可导致肝内胆汁淤积症的发生^[3]。上述研究结果提示,雌激素及其代谢产物可能是引起肝

内胆汁淤积症的重要原因。目前,采用 17- α 乙炔雌二醇干预大鼠,造成胆汁淤积症模型是用于研究雌激素致胆汁淤积症的稳定模型之一^[4]。

加味茵陈蒿汤是在中医治疗黄疸病基本方“茵陈蒿汤”的基础上^[5],依据“肾主生殖”、“肝主疏泄”和“脾主运化”的中医基础理论,增加补肾固冲药“杜仲”、健脾利湿药“茯苓”和祛风止痒药“白藓皮”等,针对妊娠期肝内胆汁淤积症治疗拟定的中药复方。临床研究发现,加味茵陈蒿汤能明显改善妊娠肝内胆汁淤积症患者的瘙痒、黄疸症状,降低血清甘胆酸水平^[6],是治疗妊娠肝内胆汁淤积症的有效方剂。因此,深入研究加味茵陈蒿汤治疗

收稿日期:2014-12-06

修回日期:2015-03-28

^{*} 国家自然科学基金委青年基金项目(81102611) 补肾祛湿法对雌激素共诱导肝内胆汁淤积症胆汁酸排泄通路的调控,负责人:侯莉莉。

^{**} 通讯作者:侯莉莉,博士,主任医师,主要研究方向:妇科内分泌学。

妊娠肝内胆汁淤积症的分子机制,有望为其更加合理、规范地运用于临床妊娠肝内胆汁淤积症的治疗提供基础研究依据。前期实验研究结果发现,加味茵陈蒿汤可能通过增加与胆汁酸转运有关的肝细胞膜转运蛋白胆汁酸盐输出泵(Bile Salt Export Pump, BSEP)和多药耐药相关蛋白(Multidrug Resistance-associated Protein 2, MRP2)的表达,发挥对抗雌激素致胆汁淤积的作用^[7,8]。

胆汁的分泌除需上述一系列可溶性膜蛋白转运系统协调作用外,还要依靠主动转运过程中形成的渗透梯度,使水分子进入胆管。水通道蛋白家族由一系列膜转运蛋白组成,负责调控水分子的跨膜转运。研究发现,水通道蛋白8(Aquaporin 8, AQP8)在大鼠肝细胞内,通过调节渗透压介导小管膜水的转运和胆汁的形成,水通道蛋白表达的下降可能导致胆汁生成异常^[9]。有研究显示,17- α 乙炔雌二醇干预可降低大鼠肝脏AQP8的表达^[10],这可能是雌激素致胆汁淤积作用的机制之一。

由此,本研究运用17- α 乙炔雌二醇诱导形成大鼠肝内胆汁淤积症模型,观察17- α 乙炔雌二醇对大鼠肝脏组织AQP8 mRNA和蛋白表达水平的影响。在此基础上,进一步观察不同剂量中药复方加味茵陈蒿汤干预后,大鼠肝脏组织AQP8 mRNA和蛋白表达水平的变化,进一步探讨加味茵陈蒿汤治疗妊娠肝内胆汁淤积症可能的分子机制,为临床更加合理、有效地运用加味茵陈蒿汤治疗妊娠肝内胆汁淤积症提供实验研究基础。

1 材料

1.1 动物

清洁级SD雌性大鼠,50只,体质量180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2012-0001。

1.2 药品与试剂

加味茵陈蒿汤(由茵陈蒿、制大黄、田基黄、栀子、杜仲、黄芩等组成),按剂量配制组方,水煎,药液浓缩为含生药1.8 g·mL⁻¹。17- α 乙炔雌二醇(美国Sigma公司,批号MO63103)。Trizol液(Invitrogen公司,批号B3505-1)。Takara PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR® Premix ExTaq™ II [宝生物工程(大连)有限公司,批号AK1801]。BCA蛋白测定试剂盒、ECL化学发光检测试剂盒(均购自Pierce公司,批

号分别为JK127667、MJ161892A)。抗AQP8抗体(Abcam公司,批号ab104745),抗 β -actin抗体与驴抗羊第二抗体(均购自Cell Signaling Technology公司,批号分别为H2906、GR44808-4)。

1.3 仪器

LightCycler 1.5实时定量PCR仪(罗氏诊断公司,型号FB1405657)。酶标仪(BioTek公司,型号EXL800)。电泳仪、半干转膜仪(均购自Amersham公司,型号分别为EPS 2A200、TE77)。逆转录用PCR仪、核酸蛋白测定仪、高速离心机(均购自德国Eppendorf股份有限公司,型号分别为Mastercycler、BioPhotometre、5810R)。

2 方法

2.1 动物分组及模型建立

清洁级SD大鼠50只,随机分为2组,分别为正常组(N, $n=10$)、模型组(M', $n=40$)。适应性喂养一周后, M'组大鼠皮下注射17- α 乙炔雌二醇5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, N组大鼠给予相同体积的丙二醇(17- α 乙炔雌二醇溶媒),连续5天。5天后M'组分为4组,分别为模型组(M, $n=10$)、加味茵陈蒿汤高剂量组(Zg, 72 g·kg⁻¹·d⁻¹, $n=10$)、中剂量组(Zz, 36 g·kg⁻¹·d⁻¹, $n=10$)和低剂量组(Zd, 18 g·kg⁻¹·d⁻¹, $n=10$)。参考文献中标准体质量动物剂量折算表,成人与大鼠的换算系数为6.17,则大鼠等效剂量为18 g·kg⁻¹·d⁻¹,设为Zd组, Zz组按照2倍剂量计算为36 g·kg⁻¹·d⁻¹, Zg组按照4倍剂量计算为72 g·kg⁻¹·d⁻¹,给予10 mL·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, N组及M组大鼠给予等体积生理盐水灌胃,每日2次,连续7天。

2.2 大鼠肝脏组织AQP8 mRNA水平测定

2.2.1 大鼠肝脏组织RNA提取及逆转录

称取肝脏组织,加入1 mL Trizol液裂解组织细胞,4℃、12 000 rpm、离心10 min,收集上清液,转移至新的无RNA酶的1.5 mL离心管中,室温(22℃)放置5 min,加入氯仿(1 mL Trizol液加200 μ L氯仿),震荡至呈粉红色,室温(22℃)放置3 min后4℃、12 000 rpm、离心15 min,取上清液,加等体积异丙醇轻摇混匀,室温(22℃)放置10 min后4℃、15 000 rpm、离心16 min,弃上清液,加75%的无水乙醇,4℃、12 000 rpm、离心10 min,干燥5 min后加无RNA酶的水溶解,分装待测。RNA提取后核酸测定仪检测所有样品, A260与A280的比

值均在 1.8–2.1 之间。按 Takara 试剂盒说明, 逆转录 mRNA 为 cDNA。琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性。

2.2.2 实时荧光定量法(QRTPCR)检测 AQP8 mRNA 表达量

反应参数: 预变性, 95℃, 15 s; 三步法 PCR, 95℃变性 15 s, 58℃退火 10 s, 72℃延伸 15 s, 并检测荧光信号, 扩增 45 个循环; 溶解度曲线分析扩增特异性, 65℃冷却 15 s 后每秒 0.1℃缓慢升至 95℃, 持续监测信号强度, 用磷酸甘油醛脱氢酶 (Reduced Glyceraldehyde-phosphate Dehydrogenase, GAPDH) 作为内参校正。AQP8 引物序列: 上游 5'-TGCCATGTCCTGGTATGAGC-3', 下游 5'-TTCTCATTGACG-GCACCCAT-3'; GAPDH 引物序列: 上游 5'-AATGTATCCGTTGTGGATCTGA-3', 下游 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCT-3'。逆转录反应体系(表 1), QRTPCR 反应体系(表 2)。

2.3 大鼠肝脏组织 AQP8 蛋白表达水平测定

2.3.1 大鼠肝脏组织蛋白提取、定量及变性

称取肝脏组织, 按照细胞裂解液说明书加入细胞裂解液(RIPA)和蛋白酶抑制剂(Phenylmethanesulfonyl Fluoride, PMSF)的混合物, 反复吹打后移至 1.5 mL 离心管中, 整个过程在冰上操作。4℃、13 000 rpm、离心 30 min, 吸取上清液,

即得到抽提好的总蛋白。BCA 法进行蛋白定量, 按照 BCA 检测试剂盒操作。取蛋白样品 90 μL, 4×SDS 上样缓冲液(加入 1 mol·L⁻¹ DTT 储存液) 30 μL, 100℃恒温金属浴变性 5 min, 蛋白 Marker 同时变性(不加上样缓冲液)。

2.3.2 蛋白免疫印迹(western blotting)

用移液器铺 10% 分离胶, 上加少许无水乙醇, 待分离胶干凝后, 倒去乙醇, 再铺 4% 积层胶, 斜插上梳子, 待胶干后加样。蛋白样品每孔 20 μg, 蛋白 Marker 每孔 3 μL, 预染 Marker 每孔 3 μL, 没有加样的孔用上样缓冲液代替, 100 V 恒压, 溴酚兰走到分离胶底部后电泳结束。小心取下凝胶, 把预先在转膜缓冲液中平衡过的 Whatman 滤纸及硝酸纤维素膜, 按照滤纸 ×3-凝胶-硝酸纤维素膜-滤纸 ×3 的次序叠放一起, 室温下, 45 mA 恒流, 转膜 1 h, 取出硝酸纤维素膜, 丽春红染液染色 5 min, 用蒸馏水洗至膜发白, 可见多条粉红色蛋白条带。将凝胶浸到考马斯亮兰染液中, 室温摇动 4 h 以上, 再用不含考马斯亮兰的甲醇、冰乙酸溶液脱色, 摇动 4–8 h, 其间更换脱色液 3–4 次, 凝胶上无条带显示, 说明转膜完全。在封闭试剂(Tris Buffered Saline, TBS)中加入吐温 20 配成 TBS-T, 洗去丽春红(3 次), 称取脱脂奶粉 1 g, 用 1×TBST 溶解到 20 mL, 使脱脂奶粉浓度为 5%。将硝酸膜浸在 20 mL 封闭液中, 室温摇 2 h, 一抗杂交孵育, 4℃过夜。吸弃一抗稀释液, 用 1×TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 将膜置于二抗稀释液中, 室温振荡孵育 2 h 后压片显影, 检测蛋白。

2.4 数据统计学分析

所有数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 两组间差异比较采用 *t* 检验, 加味茵陈蒿汤高、中和低剂量组间差异比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠肝脏组织 AQP8 mRNA 表达变化

3.1.1 各组大鼠肝脏组织总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

各组大鼠肝脏组织 1% 琼脂糖凝胶电泳均可见 28S 和 18S 条带, 表明 RNA 完整性良好。见图 1。

3.1.2 各组大鼠肝脏组织 AQP8 mRNA 水平比较

与 N 组比较, M 组大鼠肝脏组织 AQP8 mRNA 水平明显降低 (*P* < 0.01)。高(Zg)、中(Zz)、低剂量

表 1 逆转录反应体系

试剂	使用量/μL	终浓度
5×PrimeScript™ Buffer	2	1×
PrimeScript™ RT Enzyme Mix 1	0.5	
Oligo dT Prime (50 μmol)	0.5	25 pmol
Random 6 mers (100 μmol)	0.5	50 pmol
Total RNA		
RNase Free dH ₂ O	补足至 10	

表 2 QRTPCR 反应体系

试剂	使用量/μL	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq™ (2×)	10.0	1×
上游引物	0.8	0.4 μmol
下游引物	0.8	0.4 μmol
cDNA 模板	2.0	
dH ₂ O (灭菌)	6.4	
Total	20.0	

(Zd) 的加味茵陈蒿汤干预后, AQP8 mRNA 的表达增加, 与 M 组比较, 结果均具有统计学意义 ($P<0.05$)。并且, 随着加味茵陈蒿汤给药剂量的增加, 其上调 AQP8 mRNA 表达的作用增强, 高、中和低剂量组间比较, 结果具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 2。

3.2 各组大鼠肝脏组织 AQP8 蛋白表达水平比较

与 N 组比较, M 组大鼠肝脏组织 AQP8 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。高 (Zg)、中 (Zz)、低剂量 (Zd) 的加味茵陈蒿汤干预后, AQP8 蛋白表达增加, 与 M 组比较, 结果均具有统计学意义 ($P<0.05$)。并且, 随着加味茵陈蒿汤给药剂量的增加, 其增加 AQP8 蛋白表达水平的作用增强, 高、中和低剂量组间比较, 结果具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3。

4 讨论

胆汁的形成是一个渗透性的分泌过程, 溶质转运产生的渗透梯度促使水转运至胆管。水分子在肝上皮细胞主要通过两个途径转运, 一个是通过邻近细胞间的紧密连接即细胞旁通路, 另一个则通过细胞间的跨细胞通路转运。水通道蛋白家族 AQP8 是调控肝细胞胞浆和细胞膜水分子转运的主要蛋白家族之一, 其中 AQP8 主要负责水分子在肝小管的限速转运^[11]。

妊娠肝内胆汁淤积症常发生在妊娠中晚期, 雌激素合成的高峰阶段^[12]。许多研究表明, 雌激素代谢产物可通过干扰与胆汁分泌和转运过程有关蛋白的表达, 促使肝细胞内胆汁淤积的发生^[13]。与其他研究者的研究结果一致^[10], 本课题组的研究也发现, 在雌激素诱导的肝内胆汁淤积症模型大鼠肝脏组织中的 AQP8 表达下降, 提示雌激素可能通过下调 AQP8 的表达, 影响胆汁的分泌, 导致肝细胞胆汁淤积。因此, 通过抑制或逆转 AQP8 的表达下降, 有可能成为改善肝细胞分泌胆汁功能的重要分子靶点。

加味茵陈蒿汤是在“茵陈蒿汤”基础上^[14,15], 根据中医对妊娠期肝内胆汁淤积症患者特有的“脾肾两虚”、“湿热内盛”的病理机制, 酌加补肾药“杜仲”、健脾利湿药“茯苓”和清热退黄药“黄芩”等化裁而成的方剂, 用于临床妊娠肝内胆汁淤积症的治疗已有 20 余年。临床观察表明, 加味茵陈蒿汤可明显改善妊娠肝内胆汁淤积症患者的瘙痒、黄疸症状, 降低血清甘胆酸水平, 患者依从性高, 母婴安全性良好^[6]。前期的实验研究结果发现, 加味茵陈蒿

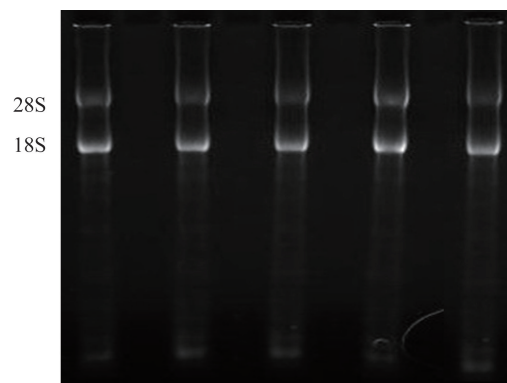


图1 大鼠肝脏组织总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

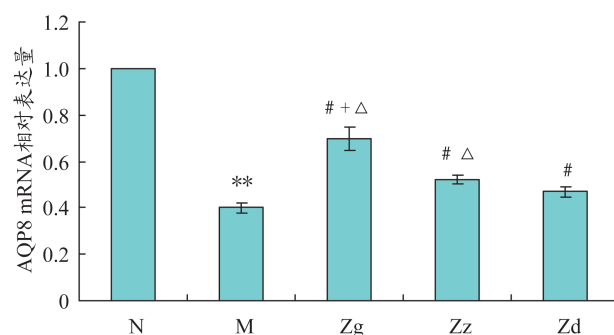


图2 加味茵陈蒿汤对肝内胆汁淤积症大鼠肝脏组织 AQP8 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

注: 与 N 组比较, ** $P<0.01$; 与 M 组比较, # $P<0.05$; 与 Zz 比较, + $P<0.05$; 与 Zd 组比较, Δ $P<0.05$ 。

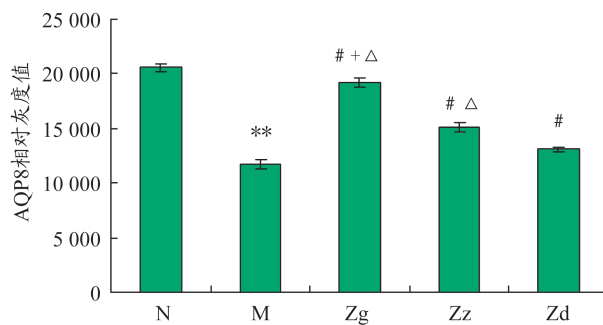
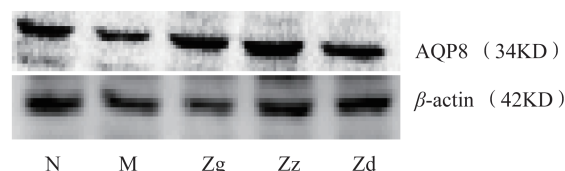


图3 加味茵陈蒿汤对肝内胆汁淤积症大鼠肝脏组织 AQP8 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

注: 与 N 组比较, ** $P<0.01$; 与 M 组比较, # $P<0.05$; 与 Zz 比较, + $P<0.05$; 与 Zd 组比较, Δ $P<0.05$ 。

汤可能通过调节胆汁酸转运过程的主要蛋白 BSEP 和 MRP2 的表达, 对抗雌激素致胆汁淤积的作用^[7,8]。

由于胆汁酸转运过程的复杂性和中药复方作用的多靶点性, 本研究在前期研究结果基础上, 进一步观察了加味茵陈蒿汤对在胆汁形成过程中起主要作用的 AQP8 分子表达的作用。研究结果发现, 加味茵陈蒿汤可上调雌激素致肝内胆汁淤积症模型大鼠肝细胞 AQP8 的表达, 并且这一调节作用随

着加味茵陈蒿汤给药剂量的增加而逐渐增强, 显示出剂量依赖型关系。据此, 本课题组推测, 加味茵陈蒿汤可能通过增加 AQP8 的表达对抗雌激素致胆汁淤积作用, 为临床运用加味茵陈蒿汤治疗妊娠肝内胆汁淤积症提供了实验研究基础。然而, 加味茵陈蒿汤是通过何种途径调节 AQP8 的表达, 其调节 MRP2 和 BSEP 的作用与上调 AQP8 的表达是否有关还需要进一步的实验研究论证。

参考文献

- 1 Pusch T, Beuers U. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Orphanet J Rare Dis*, 2007, 2(26): 1-6.
- 2 Lammert F, Reichel C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: new molecular mechanisms and clinical pathways. *Dtsch Med Wochenschr*, 2007, 132(45): 2378-2382.
- 3 Vihma V, Ropponen A, Aittomäki K, et al. Postmenopausal estrogen therapy and serum estradiol fatty acid esters in women with and without previous intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Ann Med*, 2004, 36 (5): 393-399.
- 4 Lee J, Boyer J L. Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis*, 2000, 20(3): 373-384.
- 5 刘莲, 孙晖, 王喜军, 等. 茵陈蒿汤对乙醇诱导的大鼠急性肝损伤的保护作用研究. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(4): 35-40.
- 6 赵翠英, 陈静琴, 陈华, 等. 茵黄合剂治疗妊娠肝内胆汁淤积症的临床研究. 江苏中医, 2000, 21(3): 8-9.
- 7 侯莉莉, 刘佳, 赵翠英. 补肾祛湿方增加大鼠肝细胞 MRP2、BSEP 表达对抗雌激素致胆汁淤积作用. 辽宁中医杂志, 2013, 40(9): 1921-1924.
- 8 刘佳, 侯莉莉, 赵翠英. 茵黄合剂对雌孕激素共诱导妊娠肝内胆汁淤积症大鼠胆汁酸转运蛋白 MRP2 与 BSEP 表达的影响. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 225-229.
- 9 Huebert R C, Splinter P L, Garcia F, et al. Expression and localization of aquaporin water channels in rat hepatocytes. Evidence for a role in canalicular bile secretion. *J Biol Chem*, 2002, 277(25): 22710-22717.
- 10 Carreras F I, Lehmann G L, Ferri D, et al. Defective hepatocyte aquaporin-8 expression and reduced canalicular membrane water permeability in estrogen-induced cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(3): G905-912.
- 11 Marinelli R A, Tietz P S, Caride A J, et al. Water transporting properties of hepatocyte basolateral and canalicular plasma membrane domains. *J Biol Chem*, 2003, 278(44): 43157-43162.
- 12 Arrese M, Macias R I, Briz O, et al. Molecular pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Expert Rev Mol Med*, 2008, 10(e9): 1-18.
- 13 Pauli-Magnus C, Meier P J, Stieger B. Genetic determinants of drug-induced cholestasis and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(2): 147-159.
- 14 吴泽明, 孙晖, 王喜军. 茵陈四逆汤的化学及药理学特性研究现状与未来研究构想. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(6): 7-10.
- 15 彭会巧, 孙世发. 茵陈蒿汤治疗黄疸配伍规律研究. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(3): 607-609.

Effect of Modified Yin-Chen-Hao Decoction on Expression of AQP8 mRNA and Protein in Rats with Estrogen-induced Cholestasis

Liu Jia, Zhao Yu, Hou Lili

(Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing 210004, China)

Abstract: This study was aimed to investigate the effect of modified Yin-Chen-Hao (YCH) decoction on the expression of aquaporin-8 (AQP8) mRNA and protein in rats with estrogen-induced cholestasis, in order to explore the potential mechanism of YCH decoction in the treatment of intrahepatic cholestasis during pregnancy. A total of 50 SD female rats, which were weighed between 180 g to 200 g, were randomly divided into the normal

group (N, $n = 10$) and the model group (M' , $n = 40$). The animal model of intrahepatic cholestasis was induced by subcutaneous injection of 17- α -ethinylestradiol ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 5 days of rats in M' group. The same volume of propylene glycol was subcutaneously injected to rats in N group. Five days later, rats in M' group were divided into the model group (M, $n = 10$), high-dose (Zg, $n = 10$), middle-dose (Zz, $n = 10$) and low-dose (Zd, $n = 10$) modified YCH decoction group. The intragastric administration of normal saline, high-dose, middle-dose and low-dose modified YCH decoction were given to each group for 7 days, respectively. Then, rats were sacrificed and the liver tissues were removed and stored in liquid nitrogen. The expression of AQP8 mRNA and protein were detected by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blotting analysis. The results showed that compared with the normal group (N), the expression of AQP8 mRNA and protein in liver tissues of rats in the model group (M) were decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group (M), the high-dose, middle-dose and low-dose modified YCH decoction can increase the expression of AQP8 mRNA and protein in liver tissues ($P < 0.05$). Moreover, along with the dose increasing of modified YCH decoction, the upregulation of AQP8 mRNA and protein was increased. It was concluded that the molecular mechanism of modified YCH decoction in treatment of intrahepatic cholestasis during pregnancy may be through the increasing of AQP8 mRNA and protein in liver tissues.

Keywords: Estrogen, intrahepatic cholestasis, modified *Yin-Chen-Hao* decoction, AQP8

(责任编辑 :刘馨雨 张志华, 责任译审 :王 晶)