

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.01.002

大黄灵仙胶囊调控 ABCB11 和 ABCC2 干预胆结石形成的作用机制研究*

唐乾利¹, 吕震², 王兵³, 王宇¹, 王澍¹, 舒清峰¹, 葛斌¹, 谢思圳³

(1. 右江民族医学院/桂西高发病防治重点实验室, 广西百色 533000; 2. 浙江省诸暨市中医医院普外科 311800; 3. 广西中医药大学第一附属医院普外科, 南宁 530023)

[摘要] **目的** 探究大黄灵仙胶囊调控腺苷三磷酸结合盒转运子 B 亚族成员 11(ABCB11)和腺苷三磷酸结合盒转运体 C 亚组 2(ABCC2)表达水平干预胆结石形成的作用机制。**方法** 将 40 只雄性 C57BL/6 小鼠分为正常组(N 组)、模型组(M 组)、熊去氧胆酸对照组(U 组)和大黄灵仙胶囊治疗组(D 组), 每组 10 只。N 组予普通饲料喂养, M 组、U 组和 D 组予致石饲料喂养 8 周, 同时 U 组和 D 组分别予药物干预, 1 次/d, 连续灌胃给药 8 周。造模成功后, 分别采用荧光定量 PCR 和免疫组织化学法检测 ABCB11、ABCC2 的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** M 组小鼠 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 和蛋白表达水平均较其余 3 组明显降低 ($P < 0.00$); 而 D 组小鼠 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 和蛋白表达水平与 N 组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 大黄灵仙胶囊可通过调控 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 和蛋白的表达预防胆结石的形成。

[关键词] 胆结石; 大黄灵仙胶囊; ABCB11; ABCC2

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)01-0004-03

Study on mechanism of Dahuanglingxian Capsule for intervening gallstone formation by regulating ABCB11 and ABCC2*

TANG Qianli¹, LV Zhen², WANG Bing³, WANG Yu¹, WANG Shu¹, SHU Qingfeng¹, GE Bin¹, XIE Sizhen³

(1. Youjiang Medical University for Nationalities/Key Laboratory of Western Guangxi High Incidence Disease, Baise, Guangxi 533000, China; 2. Department of General Surgery, Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhuji, Zhuji, Zhejiang 311800, China; 3. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530023, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of Dahuanglingxian Capsule for intervening gallstone formation by regulating the expression levels of ABCB11 and ABCC2 mRNA and protein. **Methods** Forty male C57BL/6 mice were divided into the normal group (group N), model group (group M), ursodeoxycholic acid group (group U) and Dahuanglingxian Capsule treatment group (group D), 10 cases in each group. The group N was fed with normal diet, while the group M, U and D were fed with lithogenic fodder for 8 weeks. Meanwhile the group U and D were given the medication intervention, once daily, for continuous 8 weeks of gavage. After successful modeling, mRNA and protein expression levels of ABCB11 and ABCC2 were detected by RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** Compared with the other three groups, the expressions of ABCB11 and ABCC2 mRNA gene and protein in M group were significantly reduced ($P < 0.01$); while, there was no statistical difference in the expressions of ABCB11 and ABCC2 mRNA and protein between the group D and N ($P > 0.05$). **Conclusion** Dahuanglingxian Capsule can prevent the gallstone formation by regulating the expression of ABCB11 and ABCC2 mRNA and protein.

[Key words] gallstone; Dahuanglingxian Capsules; ABCB11; ABCC2

临床上胆石病的发生机制尚不明确, 目前研究多以转运蛋白的表达改变为主^[1]。本课题组前期证实大黄灵仙胶囊可改善小鼠肝胆管侧膜细胞转运蛋白腺苷三磷酸结合盒转运子 B 亚族成员 11(ATP binding cassette subfamily B member 11, ABCB11)和腺苷三磷酸结合盒转运体 C 亚组 2(ATP binding cassette subfamily C member 2, ABCC2)蛋白水平表达降低的病理状态^[2], 但尚未清楚是否因通过调控 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 转录而改变转运蛋白的表达从而减少胆结石的形成。据此, 本研究分析大黄灵仙胶囊对 ABCB11 和 ABCC2 转录因子 mRNA 和蛋白表达的调控及协同作用, 同时探索其对 BSEP/ABCB11 和 MRP2/ABCC2 信号通路上游的干预作用,

以期揭示大黄灵仙胶囊防治胆结石的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 1-14K 高速冷冻离心机(北京五洲东方科技发展有限公司); Cary 60 UV-Vis 紫外可见分光光度计(美国 Agilent Technologies 公司); PTC-200 普通梯度仪、IQ5 实时荧光定量 PCR 仪(上海伯乐生命医学产品有限公司); HPIAS-1000P 彩色病理图文分析系统(同济千屏影像公司)。

1.1.2 药品与试剂 胆酸(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: 101335972, 剂型: 粉剂, 规格: 20 g, 纯度: 98%); 胆固醇(北京索莱宝科技有限公司, 批号: 527C105, 剂型: 粉剂, 规格: 100 g,

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81470198); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科 2017AB45053)。 作者简介: 唐乾利(1961—), 教授、主任医师, 博士, 主要从事中西医结合外科学、胆石病防治研究。

纯度:99%);总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 反应试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (日本 TaKaRa Bio Group 公司,批号分别为:RR9767、RR047A、RR820A);兔源性 ABCB11 一抗、兔源性 ABCC2 一抗(英国 Biorbyt 公司,批号分别为:ORB13275、ORB11075);SV0002-兔酶标抗体两步法免疫组织化学检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:10A23C02)。

1.1.3 受试药物 大黄灵仙胶囊(广西中医药大学第一附属医院,桂药监注[2003]88号),主要成分包括:生大黄、鸡内金、威灵仙、金钱草、芒硝、枳壳、泽兰、柴胡、郁金、磁石、黄芪和甘草,按照广西壮族自治区药品监督管理局文件由广西中医药大学第一附属医院中心药房提供标准院内制剂(每颗胶囊含相当于 3.75 g 生药);熊去氧胆酸(广州 Codow 有限公司,批号:CD104746;剂型:粉剂;规格:25 g;纯度:>98%)。

1.1.4 实验动物 无特殊病原体(SPF)级 C57BL/6 小鼠 40 只,雄性,7 周龄,体质量 18.0~21.0 g,购于南京大学模式动物研究所[动物许可证号:SCXK(苏)2010-0001]。饲养于右江民族医学院实验动物中心,保持 12 h:12 h 光/暗周期,温度为 24~26 °C,相对湿度 40%~60%,动物自由进食和饮水。本研究方案经右江民族医学院动物伦理委员会批准,符合相关伦理学要求。

1.2 方法

1.2.1 造模及干预方法 将 40 只小鼠分为 4 组:正常组(N 组)、模型组(M 组)、熊去氧胆酸对照组(U 组)、大黄灵仙胶囊治疗组(D 组),每组各 10 只。N 组小鼠予以普通饲料喂养,M 组、U 组、D 组分别给予高脂、高热量、高胆固醇(15.0%脂肪、1.0%胆固醇、0.5%胆酸)饲料(致石饲料)喂养 8 周。同时,U 组和 D 组分别予以熊去氧胆酸和大黄灵仙胶囊干预。药物剂量根据小鼠与成人体质量等效剂量换算^[3],估算小鼠药物等效剂量约是 60 kg 体质量成人的 13 倍,这与课题组前期实验量效关系剂量相符^[4-6];熊去氧胆酸用量 130 mg·kg⁻¹·d⁻¹,利用等渗盐水配制干粉溶液,根据小鼠体质量灌胃 8 周,1 次/d;大黄灵仙胶囊灌胃剂量为 13 g·kg⁻¹·d⁻¹(将大黄灵仙胶囊内药液煎成相当于含生药水平为 0.65 g/mL 的汤药),据小鼠体质量灌胃给药,1 次/d,处理 8 周;N 组和 M 组则分别给予等量体积的等渗盐水灌胃。肉眼观察 M 组小鼠胆囊内有颗粒状或泥沙状沉积物,即可判定为造模成功。

1.2.2 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 水平检测 ABCB11、ABCC2 基因及内参基因 GAPDH 引物采用 Primer 5.0 软件设计,见表 1。

表 1 目的基因荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列
ABCB11	上游 5'-TCGGATGGTTTGACTGCACTTC-3'
	下游 5'-TCTGGTCGGCAATGGCTTC-3'
ABCC2	上游 5'-AACTTTGCACAGGCAGCTGTTA-3'
	下游 5'-GGAGTGTGTCTGCCACCGTA-3'
GAPDH	上游 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
	下游 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

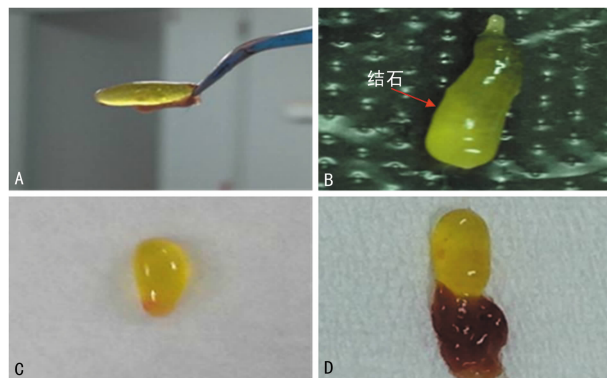
提取小鼠肝胆管侧膜细胞组织总 RNA,测定水平后利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,采用荧光定量 PCR 反应试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II 于 IQ5 PCR 检测目的基因 mRNA 表达水平,PCR 扩增后选择基线,以 N 组小鼠为校正对象,根据 Ct 值依次计算基因的相对表达水平,采用 2^{-ΔΔCt}法计算结果。8 连管内总体积 20 μL 的反应液于 95 °C 下预变性 30 s,1 个循环;95 °C 变性 5 s,61 °C 延伸 30 s,40 个循环,55 °C 退火 30 s,81 个循环。

1.2.3 ABCB11 和 ABCC2 免疫组织化学检测 将石蜡包埋肝组织切片,通过脱水、去除外源性过氧化物酶、抗原修复、封闭、一抗 4 °C 过夜、孵育二抗、二氨基联苯胺(DAB)显色、复染、返蓝、脱水、透明、封片等步骤后,置于显微摄像系统上观察并采集图片。棕褐色颗粒沉着定为免疫组织化学阳性表现,利用 Image J1.8.0_112 多功能图文分析软件进行定量分析,每张切片取 4 个高倍镜视野,测定和分析积分光密度值(IOD 值)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD-*t* 检测,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 中药干预药效评价结果 N 组小鼠未见结石,M 组及其他组成石小鼠胆囊内可见泥沙样或颗粒样沉淀;N 组及其他组未成石小鼠胆汁均清亮,呈淡黄色,见图 1。



A:N 组胆囊;B:M 组胆囊;C:U 组胆囊;D:D 组胆囊

图 1 各组小鼠胆囊结石形成情况

表 3 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ABCB11	ABCC2
N 组	10	1.00±0.00	1.00±0.00
M 组	10	0.30±0.10 ^a	0.34±0.08 ^a
U 组	9	0.72±0.09 ^{ab}	1.00±0.17 ^b
D 组	10	0.96±0.14 ^b	0.80±0.15 ^b
<i>F</i>		103.32	65.91
<i>P</i>		0.001	0.001

^a:*P*<0.01,与 N 组比较;^b:*P*<0.01,与 M 组比较

2.2 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 表达水平比较 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 表达水平比较差异均有统计学意义(均 *P*<0.01);LSD-*t* 检验显示:与 N 组相比,M 组两个基因 mRNA 表达水平

差异有统计学意义($P < 0.01$);与 M 组相比,U 组、D 组两个基因 mRNA 表达水平差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);与 N 组相比,U 组 ABCB11 mRNA 表达水平差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 3。

2.3 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 ABCB11 和 ABCC2 蛋白表达 IOD 值比较 各组小鼠肝胆管侧膜细胞组织 ABCB11 和 ABCC2 蛋白表达水平差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);与 N 组相比,M 组两个蛋白表达水平差异有统计学意义($P < 0.01$);与 M 组相比,U 组、D 组两个蛋白表达水平差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 U 组相比,D 组 ABCC2 蛋白表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4、图 2。

表 4 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 ABCB11 和 ABCC2 蛋白表达 IOD 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ABCB11	ABCC2
N 组	10	1.00 ± 0.09	0.96 ± 0.11
M 组	10	0.28 ± 0.06 ^a	0.28 ± 0.03 ^a
U 组	9	0.94 ± 0.12 ^b	1.03 ± 0.13 ^b
D 组	10	0.89 ± 0.15 ^b	0.94 ± 0.11 ^{bc}
F		91.87	108.61
P		0.001	0.001

^a: $P < 0.01$,与 N 组比较;^b: $P < 0.05$,与 M 组比较;^c: $P < 0.05$,与 U 组比较

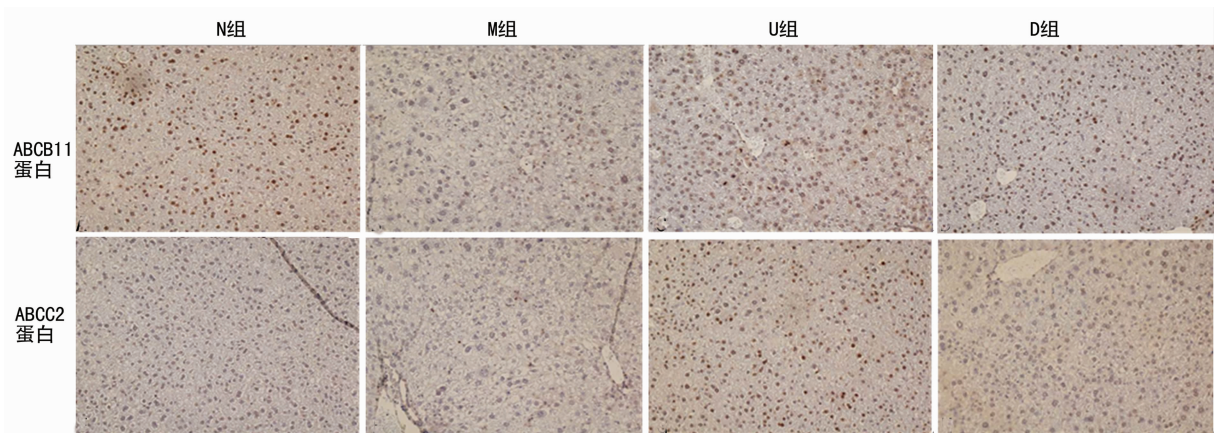


图 1 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 ABCB11 和 ABCC2 蛋白表达情况(200×)

3 讨 论

本研究结果显示,D 组小鼠的防治有效率较 U 组有所改善,且胆汁均清亮、呈淡黄色,说明该两种药物均可有效改善结石形成微环境,减少病理性胆汁分泌,进而减少结石形成,但二者疗效差异不甚明显。荧光定量 PCR 和免疫组织化学实验结果显示,与 M 组比较,其他各组 ABCB11 和 ABCC2 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高;与 N 组比较,D 组小鼠 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。这两种检测方法得出结果均表现出相同的变化趋势,该结果从不同的实验方法及角度再次验证了课题组前期阐述的观点。

所有生物的遗传信息都是以基因的形式储存在细胞内的 DNA 分子中,而蛋白是生物功能的执行者亦是基因的产物,从 mRNA 到蛋白质的合成过程包括翻译的起始、肽链的延伸、肽链的终止和释放 3 个过程,该过程是由核糖体、tRNA、氨基酸、酶、腺苷三磷酸等多种物质共同参与的复杂途径^[7-8]。从基因表达角度来说,mRNA 的转录表达决定了蛋白表达水平。相关研究表明胆结石的形成与 MRP2/ABCC2 和 BSEP/ABCB11 密切相关,与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 表达密切相关^[9-10]。MRP2/ABCC2 mRNA 经 TNF- α 、IL-6 调控表达水平降低,而蛋白表达水平经 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 调控减少;BSEP/ABCB11 mRNA 和蛋白表达水平经 TNF- α 、IL-1 β 调控均明显降低。由此推断大黄灵仙胶囊可以改变炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达水平,进而稳定 ABCB11 和 ABCC2 mRNA 的转录,使转运蛋白的表达趋于生理水平,最终减少病

理性胆汁的分泌,维持胆汁酸池的平衡及肝细胞正常的分泌胆汁功能。然而大黄灵仙胶囊干预结石形成机制是直接调控 mRNA 的表达还是参与影响从 mRNA 到转运蛋白的表达过程,或是经过上游 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 调控作用的结果,下一步本课题组将尝试通过该条信号通路的上游进行深入探究,进一步明确复方中药防治胆石病的作用靶点,以期达到防治结石的目的。

参考文献

- [1] PAN S, LI X, JIANG P, et al. Variations of ABCB4 and ABCB11 genes are associated with primary intrahepatic stones[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 434-46.
- [2] 唐乾利, 吕震, 俞渊, 等. 大黄灵仙胶囊调控胆结石小鼠肝细胞转运蛋白表达及胆汁代谢谱的机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(8): 827-834.
- [3] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [4] 吕震, 俞渊, 王兵, 等. 大黄灵仙胶囊对小鼠胆结石形成及肝病理和血液生化指标的影响[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(6): 577-581.
- [5] 唐乾利, 黄欣, 俞渊, 等. 兔胆石症的代谢组学特征及大黄灵仙胶囊的干预作用[J]. 医学导报, 2013, 32(12): 1538-1542.
- [6] 唐乾利, 俞渊, 黄欣, 等. 大黄灵仙胶囊防(下转第 10 页)

Mets, 相对偏低, 可能与本研究入选的冠心病患者中有心肌梗死病史患者比例偏高(53.76%)有关。

综上所述, 本研究观察了不同 PCI 血运重建策略对于多支病变冠心病患者运动耐量的影响, 结果提示, ICR 患者的运动耐量并不逊于 CR 患者。本研究尚存局限性: (1) 样本量偏少, 尚需扩大样本量进一步研究; (2) 本研究入选患者以男性为主(92.47%), 女性患者偏少, 对于血运重建程度对女性患者运动耐量的影响尚需进一步探讨; (3) 本研究仅评估了多支病变冠心病患者 PCI 术后短期内的运动耐量, 而尚缺乏对其临床事件以及远期预后的评估。因此, 尚需进一步扩大样本量并增加随访时间以观察不同血运重建策略对冠心病患者短期及长期预后的影响。

参考文献

- [1] PHYSICIANS A C O C. ATS/ACCP statement on cardiopulmonary exercise testing[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(2): 211-277.
- [2] HANNAN E L, WU C T, WALFORD G, et al. Incomplete revascularization in the era of Drug-Eluting stents impact on adverse outcomes[J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2009, 2(1): 17-25.
- [3] GENSINI G G. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. *Am J Cardiol*, 1983, 51(3): 606-607.
- [4] WINDECKER S, KOLH P, AFONSO F, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology(ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J*, 2014, 35(37): 2541-2619.
- [5] MCLELLAN C S, GHALI W A, LABINAZ M, et al. Association between completeness of percutaneous coronary revascularization and postprocedure outcomes [J]. *Am Heart J*, 2005, 150(4): 800-806.
- [6] HAMBRAEUS K, JENSEVIK K, LAGERQVIST B, et al. Long-Term outcome of incomplete revascularization after percutaneous coronary intervention in SCAAR (Swedish coronary angiography and angioplasty registry) [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2016, 9(3): 207-215.
- [7] ENGSTRÖM T, KELBÆK H, HELQVIST S, et al. Complete revascularisation versus treatment of the culprit lesion only in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and multivessel disease (DANAMI-3-PRIMULTI): an open-label, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2015, 386(9994): 665-671.
- [8] KIM Y H, PARK D W, LEE J Y, et al. Impact of angiographic complete revascularization after Drug-Eluting stent implantation or coronary artery bypass graft surgery for multivessel coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2011, 123(21): 2373-2381.
- [9] JANICKI J S, WEBER K T, MCELROY P A. Use of the cardiopulmonary exercise test to evaluate the patient with chronic heart failure [J]. *Eur Heart J*, 1988, 9: 55-58.
- [10] MYERS J, PRAKASH M, FROELICHER V, et al. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(11): 793-801.
- [11] 中华医学会心血管病学分会, 中国康复医学会心血管病专业委员会, 中国老年学学会心脑血管病专业委员会. 冠心病康复与二级预防中国专家共识 [J]. *中华全科医师杂志*, 2014, 41(5): 340-348.

(收稿日期: 2017-06-22 修回日期: 2017-08-30)

(上接第 6 页)

治兔胆石病的代谢组学及超微病理研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(11): 3359-3362.

- [7] NIU N, XIANG J F, YANG Q, et al. RNA-binding protein SAMD4 regulates skeleton development through translational inhibition of Mig6 expression [J]. *Cell Discov*, 2017, 24(3): 16050-16064.
- [8] CHEN Z, LI Y X, FU H J, et al. Hepatitis B virus core antigen stimulates IL-6 expression via p38, ERK and NF- κ B pathways in hepatocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(1): 91-100.
- [9] CHEN H, HUANG X, MIN J, et al. Geniposidic acid pro-
tected against ANIT-induced hepatotoxicity and acute intrahepatic cholestasis, due to Fxr-mediated regulation of Bsep and Mrp2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 197-207.
- [10] GUYOT C, HOFSTETTER L, STIEGER B. Differential effects of membrane cholesterol content on the transport activity of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) and of the bile salt export pump (ABCB11) [J]. *Mol Pharmacol*, 2014, 85(6): 909-920.

(收稿日期: 2017-06-20 修回日期: 2017-08-28)