

大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠保护作用机制研究

喻斌¹, 阮鸣², 张志芬³, 王兆龙³, 卢金福¹, 吕高红¹, 许惠琴^{1*}

1. 南京中医药大学 中药药理学省部共建重点实验室, 江苏 南京 210046

2. 南京晓庄学院生物化工环境工程学院, 江苏 南京 211171

3. 南通精华制药股份有限公司, 江苏 南通 226005

摘要: **目的** 观察大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠胆囊黏膜表皮生长因子(EGF)表达水平, 肝、胆超微结构, 肝组织胆固醇 7 α -羟化酶(CYP7A1) mRNA 水平以及胆盐转运子 BSEP、MRP2 表达水平的影响, 明确其对胆色素结石豚鼠的保护作用机制。**方法** 采用饲料法复制胆色素结石豚鼠模型, 免疫组化法观察大柴胡颗粒(1.1、2.2、4.4 g/kg)对胆色素结石豚鼠的胆囊 EGF 水平的影响, 透射电镜观察肝胆组织超微结构的改变, RT-PCR 法检测肝组织 CYP7A1 基因表达水平, Western blotting 法检测肝脏中 BSEP、MRP2 表达水平, 以熊去氧胆酸作为阳性对照。**结果** 大柴胡颗粒对胆结石豚鼠胆囊黏膜 EGF 表达影响不明显, 但较好地改善其肝胆超微结构, 其 2.2、4.4 g/kg 剂量组还能增加肝脏组织 CYP7A1 的基因转录($P < 0.05$ 、 0.01)和 BSEP、MRP2 蛋白表达水平($P < 0.05$)。**结论** 大柴胡颗粒抑制豚鼠胆色素结石形成可能与其影响豚鼠胆汁酸代谢、促进胆盐转运子功能、保护肝胆细胞器结构有关, 而与胆囊黏膜 EGF 功能无明显关系。

关键词: 大柴胡颗粒; 胆色素结石; 表皮生长因子; 胆固醇 7 α -羟化酶; 胆盐转运子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)10-1309-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.020

Protection of Dachaihu Granule on guinea pigs with bile pigment stones and its mechanism

YU Bin¹, RUAN Ming², ZHANG Zhi-fen³, WANG Zhao-long³, LU Jin-fu¹, LV Gao-hong¹, XU Hui-qin¹

1. Province and Ministry Cooperation Laboratory of Pharmacology of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing 211171, China

3. Nantong Jinghua Pharmaceutical Co., Ltd., Nantong 226005, China

Abstract: **Objective** To study the effect of Dachaihu Granules (DG) on the expression of epidermal growth factors (EGF) of gallbladder mucosa in guinea pigs with bile pigment stones (BPS), the ultrastructure of liver and gallbladder epithelial cells, the level of cholesterol 7 α -hydrolase (CYP7A1) mRNA, and the expression of bile salt transporters, BSEP and MRP2, in liver cells for explaining the protective mechanism of the drug further. **Methods** The guinea pigs with BPS were established by fodder method. With the interference of DG (1.1, 2.2, and 4.4 g/kg), the expression of EGF locating on the bile gallbladder was detected by immunohistochemistry. The ultrastructure of liver and gallbladder epithelial cells was detected by transmission electron microscopy (TEM). The CYP7A1 mRNA expression level in liver was detected by RT-PCR and the expression levels of BSEP and MRP2 in liver were detected by Western blotting with the ursodeoxycholic acid as positive control. **Results** There was no obvious change on the expression of EGF in the bile gallbladder with the administration of DG. However, the ultrastructure of liver and gallbladder epithelial cells was improved obviously. In addition, in 2.2 and 4.4 g/kg DG groups the transcription of CYP7A1 mRNA ($P < 0.05$, 0.01) and expression of BSEP and MRP2 ($P < 0.05$) in liver cells were increased. **Conclusion** The mechanism of DG inhibiting the formation of BPS is related to influencing the bile acid metabolism, improving the bile salt transporter function, and protecting the organelles of liver and gallbladder epithelial cells. While EGF in bile gallbladder might not be involved in the mechanism.

Key words: Dachaihu Granules; bile pigment stones; epidermal growth factor; cholesterol 7 α -hydrolase; bile salt transporters

收稿日期: 2012-08-12

基金项目: 江苏省科技成果转化专项课题(BA2010094)

作者简介: 喻斌(1978—), 男, 江西鄱阳人, 博士, 讲师, 主要从事中药药理学研究。Tel: (025)85811933 E-mail: nzyubin@163.com

*通信作者 许惠琴 Tel: (025)85811933 E-mail: hqxu309@yahoo.com.cn

大柴胡颗粒是在张仲景“大柴胡汤”的基础上研制而成的现代中药复方制剂,具有外解少阳、内泻热结的功效,主治少阳兼里实之证,临床上常用于治疗属湿热证范畴的胆系感染和胆结石症^[1-3]。大柴胡颗粒具有促进大鼠胆汁分泌、利胆作用^[4]。前期研究发现,大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠具有一定的保护作用,且该作用可能与其减少肝、胆细胞损伤,调节胆汁成分,促进胆汁分泌等相关^[5],但具体作用机制尚未完全清楚。胆固醇 7 α -羟化酶(cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)是胆汁酸代谢经典途径的关键酶,其活性反映机体清除胆固醇及合成胆汁酸的能力,其基因与胆结石的形成有密切联系^[6]。胆汁中胆盐的分泌、形成与肝细胞上的胆盐转运子密切相关,其中 BSEP、MRP2 是目前较为明确的胆盐转运子^[7]。表皮生长因子(epidermal growth factors, EGF)具有加强胃肠功能、促进消化酶分解的效应^[8]。本实验在前期研究基础上,进一步探讨大柴胡颗粒对胆色素结石防治的作用机制。

1 材料

1.1 药品和试剂

大柴胡颗粒,南通精华制药股份有限公司,批号 100103。熊去氧胆酸片,上海黄河利业制药有限公司生产,批号 100801。Trizol 液,美国 Invitrogen 公司;内参一抗(兔 β -actin)、二抗(羊抗兔 IgG),南京凯基生物科技发展有限公司;BSEP 一抗,美国 Santa Cruz 公司;MRP2 一抗,美国 Santa Cruz 公司;磷酸盐缓冲液(PBS),南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器

H7650 型透射电镜,日本日立公司;MultiGene Gradient 型 PCR 循环仪,美国 Labnet 公司;D—37520 型高速冷冻离心机,德国 Sorvall 公司;UV—2450 型紫外光度仪,日本 Shimadzu 公司;Gel Doc XR 型凝胶成像仪、America 164—5051 型 Western 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;SW—CJ—1FD 型超净工作台,苏州净化设备有限公司;XD—101 型 CO₂ 培养箱, Sanyo 公司;DELTA320 型 pH 计,梅特勒-托利多仪器公司;HY—4 型多用脱色摇床,江苏金坛市正基仪器厂。

1.3 动物

豚鼠,350~450 g,雌雄各半,南京市江宁区汤山青龙山动物繁殖场提供,生产许可证号:SCXK(苏)2007-0008。普通饲料、致结石饲料(在普通

饲料中加入酪蛋白 2%、蔗糖 3%、猪油 2%、纤维素 2%、胆酸 0.04%、胆固醇 0.1%),由南京市江宁区汤山青龙山动物繁殖场提供。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

豚鼠随机分成 5 组,即模型组,阳性对照熊去氧胆酸(50 mg/kg)组,大柴胡颗粒低、中、高剂量(1.1、2.2、4.4 g/kg)组,每组 8 只;另取 8 只豚鼠作为对照组,各豚鼠组均雌雄各半。除对照组外,其他各组豚鼠连续 8 周喂饲致结石饲料^[9]。各给药组豚鼠在造模第 5 周开始 ig 给药,每日 1 次,连续 4 周,给药体积(以生理盐水为溶剂)10 mL/kg。模型组和对照组给予同体积生理盐水。

2.2 指标检测

连续给药 4 周后,大鼠脱颈椎处死,立即取出肝脏和胆囊组织,用于下列指标检测。

2.2.1 免疫组化法检测豚鼠胆囊黏膜 EGF 的表达 取部分肝脏固定于 10%甲醛中,SP 免疫组化试剂盒染色,按试剂盒说明检测。阴性对照以 PBS 代替进行。EGF 阳性表达面积采用 IPP 6.0 进行分析,EGF 相对表达量以积分光密度值表示。

积分光密度=EGF 阳性面积 $\times$ 平均光密度

2.2.2 电镜观察豚鼠肝脏和胆囊病理改变 将部分肝脏和胆囊切成 1.0 mm³ 组织块,固定于 3%的多聚甲醛中,用于电镜观察($\times 200$)。

2.2.3 RT-PCR 检测肝组织 CYP7A1 mRNA 转录水平 按 Trizol RNA 提取试剂操作说明提取肝组织总 RNA。用紫外分光光度法测定 RNA 的量及纯度。GAPDH (352 bp) 引物序列:正义引物 5'-AAGGTC GGAGTCAACGGATTT-3',反义引物 5'-AGATGAT GACCCTTTTGGCTC-3'; CYP7A1 (467 bp) 引物序列:正义引物 5'-TGCCTCCCTGAACATC-3',反义引物 5'-CCCCTTTCTAACCACAC-3'。应用逆转录试剂盒得到总 cDNA,取 0.2 mL 于离心管,在冰上依次加入灭菌双蒸水至总体积 50 μ L、10 $\times$ Taq Buffer 5 μ L、10 mmol/L dNTPs 1 μ L、10 mmol/L 引物各 2 μ L、cDNA 模板 2 μ L、Taq DNA Polymerase 0.5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C,预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C、40 s,55 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、35 s,32 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C、10 min 终止反应。反应结束后,取反应液 5 μ L 进行 1%琼脂糖凝胶电泳,确认 PCR 反应产物,以 CYP7A1/GAPDH 的灰度比值进行半定量分析。

2.2.4 Western blotting 法检测肝组织 BSEP 蛋白及 MRP2 蛋白表达 取豚鼠肝脏组织, 胰酶消化后于冷 PBS 中洗涤 2 次, 各加入 200 μL 冰预冷裂解缓冲液, 混匀后冰浴 30 min, 每隔 5 min 涡旋震荡 10 s, 充分裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 $13\,000\times g$ 离心 10 min。将上清分装, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备检。

以考马斯亮蓝法测定蛋白。将样本用裂解缓冲液稀释相同浓度, 取等量上样缓冲液于试管中, 蛋白量为 70 μg , 95~100 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min 后冰上冷却上样。电泳条件: 浓缩胶恒压 80 V 约 30 min, 分离胶 100 V 约 90 min。电转移到 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭液中封闭 (4 $^{\circ}\text{C}$, 过夜)。按 0.1 mL/cm^2 的量加入封闭液和适量一抗 MRP2 抗体 (1:400)、BSEP 抗体 (1:200), 摇床振荡孵育 (4 $^{\circ}\text{C}$, 过夜)。PBST 漂洗滤膜 4 次, 每次 10 min。将膜与辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的二抗 (HRP 标记抗体, 二抗用封闭液稀释 1:5 000) 在室温下振荡孵育 2 h, 用 PBST 充分洗膜, 漂洗 4 次, 每次 10 min。按 0.1 mL/cm^2 显影液计算用量, 将显影液加于 PVDF 膜上, 室温放置 1 min, 暗室中迅速将膜蛋白贴在 X 光胶片上曝光, 显影、洗像, 调整曝光时间直至出现最佳条带。

2.3 统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 统计分析均采用 SPSS 13.0 软件。

3 结果

3.1 对胆色素结石豚鼠胆囊 EGF 表达的影响

对照组豚鼠胆囊仅见少量 EGF 表达。模型组豚鼠胆囊黏膜 EGF 表达较对照组明显增加。与模型组相比, 熊去氧胆酸组以及大柴胡颗粒 3 个剂量组豚鼠胆囊可见 EGF 表达略减少, 但差异不显著。结果见图 1、表 1。

3.2 对胆色素结石豚鼠肝脏、胆囊超微结构的影响

3.2.1 对肝脏超微结构的影响 对照组豚鼠肝细胞呈多边形, 胞质丰富, 胞质内大量糖原颗粒、线粒体及粗面内质网, 细胞核圆、规则, 异染色质丰富。模型组豚鼠肝脏部分细胞内出现小泡状脂滴。熊去氧胆酸组豚鼠肝细胞内出现大小不一的脂肪空泡, 其他细胞器结构尚好。大柴胡颗粒低剂量组豚鼠肝细胞内出现小脂滴; 中剂量组豚鼠少部分肝细胞溶解坏死; 高剂量组豚鼠肝细胞胞质内低电子密度物质沉积, 少部分肝细胞溶解坏死。提示大柴胡颗粒对肝脏超微结构具有一定的保护作用。结果见图 2。

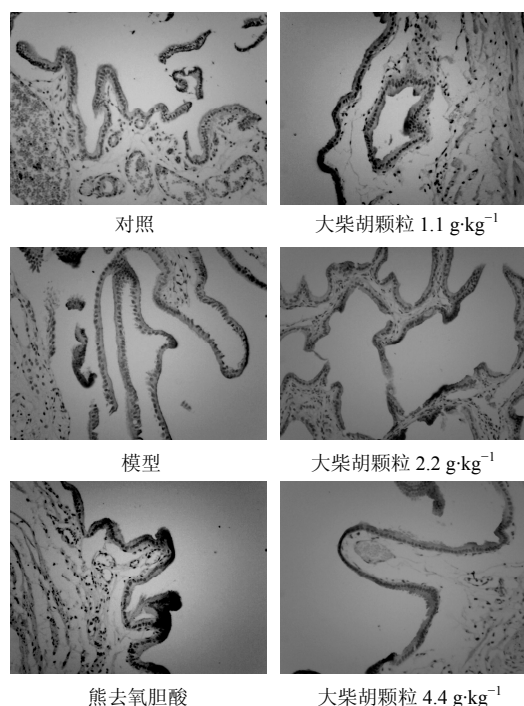


图 1 大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠胆囊黏膜 EGF 表达的影响

Fig. 1 Effect of DG on expression of EGF in gall bladder mucosa of guinea pigs with BPS

表 1 大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠胆囊黏膜 EGF 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of DG on expression of EGF in gallbladder mucosa of guinea pigs with BPS ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组 别	剂量 / ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	EGF 相对表达量
对照	—	128.96 $\pm$ 55.98
模型	—	533.84 $\pm$ 234.85 ^{▲▲}
大柴胡颗粒	1.1	334.33 $\pm$ 101.62
	2.2	289.51 $\pm$ 175.80
	4.4	298.94 $\pm$ 110.83
熊去氧胆酸	0.05	205.02 $\pm$ 264.81

与对照组比较: ^{▲▲} $P<0.01$

^{▲▲} $P<0.01$ vs control group

3.2.2 对胆囊超微结构的影响 对照组豚鼠胆囊上皮细胞呈柱状, 单层, 排列规则, 细胞间较紧密, 细胞核较规则。模型组豚鼠胆囊细胞间腔面的紧密连接结构不清, 细胞器结构紊乱, 出现少量脂褐素。熊去氧胆酸组豚鼠胆囊上皮细胞呈柱状, 单层排列, 细胞间分离, 胞质电子密度降低, 细胞核卵圆形, 异染色质减少。大柴胡颗粒低剂量组豚鼠胆囊上皮细胞呈多边形, 细胞层次增加, 细胞核形态不规则;

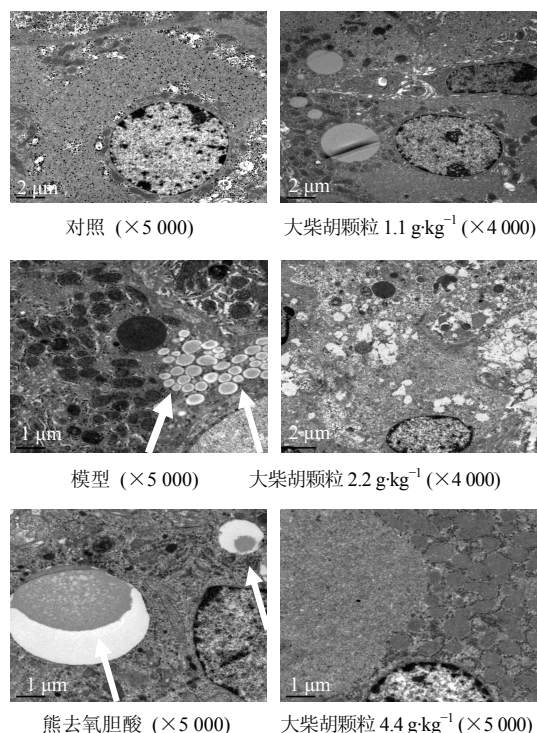


图2 各组豚鼠肝组织病理学电镜观察 (箭头所示为脂肪空泡)
Fig. 2 Pathological observation of liver in guinea pigs with BPS in each group by TEM (arrow indicate fat vacuoles)

中剂量组豚鼠胆囊上皮细胞呈多边形, 细胞核形态不规则; 高剂量组豚鼠胆囊细胞排列比较紧密, 细胞器结构尚好, 细胞核基本规则。提示大柴胡颗粒对胆囊超微结构有一定的保护作用。结果见图3。

3.3 对胆色素结石豚鼠肝组织 CYP7A1 mRNA 表达水平的影响

模型组豚鼠肝组织 CYP7A1 mRNA 表达显著低于对照组 ($P<0.01$); 与模型组比较, 大柴胡颗粒中、高剂量豚鼠肝组织 CYP7A1 mRNA 表达显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表2、图4。

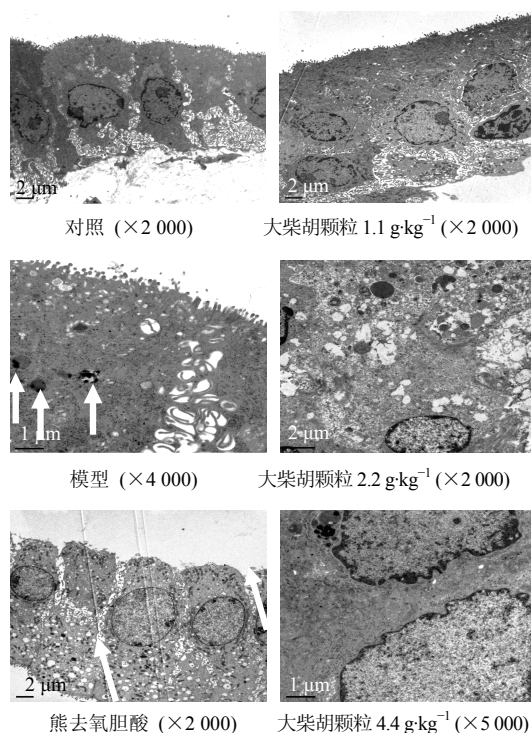


图3 各组豚鼠胆囊组织病理学电镜观察 (箭头所示为脂褐素)
Fig. 3 Pathological changes in gall bladder of guinea pigs with BPS in each group by TEM (arrow indicate lipofuscins)

3.4 对胆色素结石豚鼠肝组织 BSEP、MRP2 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组豚鼠肝组织胆盐转运子 BSEP 和 MRP2 蛋白表达显著减少 ($P<0.01$)。与模型组相比, 大柴胡颗粒中、高剂量组 BSEP 和 MRP2 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$)。结果见表2、图5。

4 讨论

胆囊癌与胆结石、胆囊炎的关系密切, 由于胆结石的长期刺激, 可引起机体内 EGF 及其受体 (EGFR)

表2 大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠肝组织 CYP7A1 mRNA、BSEP 和 MRP2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of DG on expression of CYP7A1 mRNA, BSEP, and MRP2 protein in liver of guinea pigs with BPS ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	CYP7A1 基因相对表达量	BSEP 蛋白相对表达量	MRP2 蛋白相对表达量
对照	—	1.35 ± 0.37	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.04
模型	—	0.62 ± 0.53 ^{▲▲}	0.09 ± 0.06 ^{▲▲}	0.08 ± 0.04 ^{▲▲}
大柴胡颗粒	1.1	0.44 ± 0.35	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.03
	2.2	0.71 ± 0.33 [*]	0.16 ± 0.05 [*]	0.13 ± 0.03 [*]
	4.4	1.03 ± 0.34 ^{**}	0.17 ± 0.05 [*]	0.14 ± 0.05 [*]
熊去氧胆酸	0.05	1.14 ± 0.38 ^{**}	0.18 ± 0.05 ^{**}	0.13 ± 0.04 [*]

与对照组比较: ^{▲▲} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

^{▲▲} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

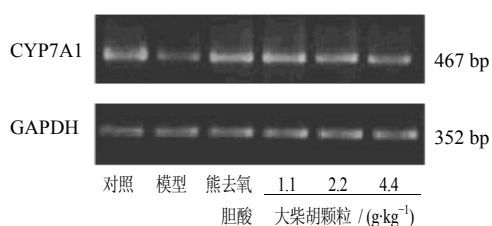


图4 大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠肝组织 CYP7A1 基因表达的影响

Fig. 4 Effect of DG on expression of CYP7A1 mRNA in liver of guinea pigs with BPS

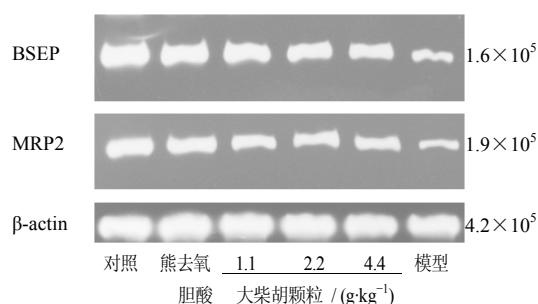


图5 大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠肝脏组织 BSEP、MRP2 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of DG on expression of BSEP and MRP2 in liver of guinea pigs with BPS

的过度表达, 形成刺激胆囊黏膜细胞自身增殖的环路, 最后导致肿瘤形成^[10]。在本实验中, 模型组豚鼠胆囊黏膜可见 EGF 表达增加, 提示可能与结石形成有关。胆结石形成的先决条件是存在胆固醇过饱和, 而人体每日约 50% 的胆固醇经胆汁酸代谢途径排出体外, 所以胆汁酸代谢经典途径关键酶 CYP7α1 的活性或胆汁酸代谢经典途径的缺陷会造成更多的游离胆固醇直接排入胆汁, 形成致石性胆汁^[11]。胆汁中胆盐的分泌、形成与肝细胞上的胆盐转运子密切相关, 其中 BSEP、MRP2 的作用明确, 它们分别转运一价和二价胆盐。如果肝细胞中 BSEP 或 MRP2 mRNA 表达下降, 就会导致其蛋白表达降低, 从而导致肝细胞转运一价或二价胆盐的能力下降, 引起肝细胞分泌胆盐的减少。胆汁中的胆盐减少, 胆盐/胆固醇的比值降低, 将导致胆固醇的非生理性过饱和, 胆固醇水化物结晶沉淀, 进而结晶凝聚形成结石^[12]。

本研究发现, 大柴胡颗粒中、高剂量组大鼠胆

囊黏膜 EGF 表达有降低趋势, 但与模型组相比未见显著差异, 提示大柴胡颗粒对 EGF 表达无明显影响。但电镜观察肝胆超微结构提示, 大柴胡颗粒在维持肝胆细胞器结构, 减少细胞损伤方面有一定作用。此外, 大柴胡颗粒中、高剂量组还能提高肝组织 CYP7A1 基因转录和 BSEP、MRP2 蛋白表达水平。这些结果表明大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠有一定的保护作用, 该作用可能与其减少肝、胆细胞细胞器损伤、脂滴和脂褐素形成, 促进胆汁分泌和胆盐转运, 改善胆固醇代谢途径, 减少胆囊黏膜异常增生等因素相关。

参考文献

- [1] 刘凤民. 大柴胡汤治疗胆系感染 100 例临床疗效分析 [J]. 中医学报, 2010, 29(4): 747.
- [2] 李玲, 刘文全. 大柴胡汤合四金汤加减治疗胆囊泥沙样结石 1 例 [J]. 吉林中医药, 2011, 31(9): 904-905.
- [3] 燕醒狮. 大柴胡汤加减配合针刺治疗肝胆结石 58 例 [J]. 陕西中医, 2010, 31(1): 24-25.
- [4] 卓玉珍, 刘俊红, 李棣华, 等. 不同方法的柴胡提取液对大鼠的利胆作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 1883.
- [5] 喻斌, 阮鸣, 张志芬, 等. 大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1560-1564.
- [6] 黄名威, 唐乾利, 赫军, 等. 大黄灵仙胶囊对胆结石豚鼠肝组织超微结构及 CYP7A1 mRNA 表达的影响 [J]. 中医杂志, 2010, 51(9): 837-839.
- [7] 孔凡民, 隋春阳, 李航宇, 等. 胆结石形成与胆盐转运子 BSEP、MRP2、NTCP 关系的研究 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, 12(3): 161-163.
- [8] 于波, 李世拥, 安萍, 等. 表皮生长因子及其受体与胆囊运动功能及胆结石关系的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 1998, 8(4): 7-8.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [10] 周彦明, 李玉民, 曹农, 等. 慢性胆囊炎和胆囊癌组织中 EGF、EGFR 的表达及其意义 [J]. 癌症, 2003, 22(3): 262-265.
- [11] 邓漾, 韩天权, 商俊, 等. 胆汁酸代谢经典途径酶基因表达与豚鼠胆石病关系的研究 [J]. 外科理论与实践, 2001, 6(3): 149-153.
- [12] Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice [J]. Gastroenterology, 2004, 127(1): 261-274.