

本文引文格式:周洋,卓臣义,唐乾利,等. 大黄灵仙胶囊调控小鼠胆囊结石形成机制中 BSEP、NTCP 基因表达的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(4): 401-405.

【论著与临床报道】

## 大黄灵仙胶囊调控小鼠胆囊结石形成机制中 BSEP、NTCP 基因表达的研究

周洋<sup>1</sup>, 卓臣义<sup>1</sup>, 唐乾利<sup>2</sup>, 冯时<sup>1</sup>, 岑小宁<sup>1</sup>, 包崇婵<sup>1</sup>, 黄丽芳<sup>3</sup>, 许彦<sup>3</sup>

- (1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000;
3. 广西中医药大学研究生学院, 广西 南宁 530001)

**摘要:**目的 研究大黄灵仙胶囊调控小鼠肝胆管侧膜细胞上胆盐输出泵(BSEP)、钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(NTCP)的蛋白及 mRNA 表达水平, 干预胆囊结石形成的作用机制。方法 将 60 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠随机分为普食组(P 组)、致石组(Z 组)、致石+灌水组(Z+S 组)、致石+大黄灵仙胶囊组(Z+D 组)、致石+熊去氧胆酸组(Z+X 组), 每组各 12 只, 喂养 8 周, 1 天/次。采取小鼠胆囊组织观察造模情况, 运用 Western Blotting 及 RT-PCR 技术对肝脏组织中 BSEP、NTCP 的蛋白及 mRNA 表达量进行分析并对比其差异。结果 Z 组结石形成数多于 P 组, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。Western Blotting: Z+D 组和 Z+X 组 BSEP、NTCP 蛋白表达水平无明显差异( $P > 0.05$ ), Z+D 组高于 Z+S 组, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。RT-PCR: Z+S 组、Z+D 组与 Z+X 组 BSEP、NTCP mRNA 的转录水平存在差异, Z+S 组  $<$  Z+D 组、Z+S 组  $<$  Z+X 组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 致石性饲料喂养可致小鼠胆囊结石形成, 大黄灵仙胶囊可以增强小鼠肝胆管侧膜细胞上 BSEP、NTCP 的蛋白及 mRNA 表达水平干预胆囊结石形成。

**关键词:** 胆囊结石病; 大黄灵仙胶囊; BSEP; NTCP

中图分类号: R575.621 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2020)04-0401-05  
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.04.001

### Dahuang Lingxian Capsule in regulation of BSEP and NTCP gene expressions in the gallstone formation mechanism of mice

Zhou Yang<sup>1</sup>, Zhuo Chenyi<sup>1</sup>, Tang Qianli<sup>2</sup>, Feng Shi<sup>1</sup>, Cen Xiaoning<sup>1</sup>,  
Bao Chongchan<sup>1</sup>, Huang Lifang<sup>3</sup>, Xu Yan<sup>3</sup>

- (1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
3. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To study the mechanism of how Dahuang Lingxian Capsules regulate the protein

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81860851); 2017 年广西科学研究与技术开发计划项目(桂科 AB17195071、桂科 AD17129025); 广西自然科学基金重点项目(2018GXNSFDA281017); 2019 年广西研究生创新项目(YCSW2019217); 广西特聘专家专项资助(桂人才通字[2019]13 号)

**第一作者简介:** 周洋(1990-), 男, 在读硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 普外科疾病的基础与临床研究, E-mail: 284743092@qq.com

**通讯作者简介:** 唐乾利(1961-), 男, 医学博士, 二级教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 胆石症、创面修复的基础与临床研究, E-mail: htmgx@163.com

and mRNA expressions of bile salt export pump (BSEP) and  $\text{Na}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in the lateral membrane cells of the hepatic bile ducts of mice for intervening the formation of gallstone. **Methods** Sixty healthy male SPF C57BL/6 mice were randomly divided into 5 groups: general feeding group (group P), lithogenic diet group (group Z), lithogenic diet+water injecting group (Z+S group), lithogenic diet+Dahuang Lingxian Capsule injecting group (Z+D group), lithogenic diet+ursodeoxycholic acid injecting group (Z+X group), with 12 mice in each group, fed once daily for 8 weeks. The gallbladder tissue of mice was collected to observe the modeling. Western blotting and real-time PCR were used to detect and analyze the protein and mRNA expressions of BSEP, NTCP in liver tissue, which would also be compared. **Results** The stones formed in group Z were more than those in group P and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Western Blotting showed that there was no significant difference in protein expressions of BSEP and NTCP between Z+D group and Z+X group ( $P > 0.05$ ). The protein expressions of BSEP and NTCP in Z+D group were higher than those in the Z+S group and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). RT-PCR showed that the mRNA transcription levels of BSEP and NTCP in Z+S group, Z+D group and Z+X group were significantly different. The mRNA levels of the Z+S group were lower than those of the Z+D group, while those of the Z+S group were lower than those of the Z+X group, which showed statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Lithogenic feeding can cause gallstone formation in mice. Dahuang Lingxian Capsules can enhance the protein and mRNA expressions of BSEP and NTCP in the lateral membrane cells of hepatic bile ducts to intervene the formation of gallstone in mice.

**Key words:** cholelithiasis; Dahuang Lingxian Capsule; BSEP; NTCP

胆囊结石是胆道系统最常见疾病,主要为胆固醇结石。从过饱和的胆汁中沉淀出来的胆固醇结晶反应了肝脏中胆固醇分泌的高水平<sup>[1]</sup>,肝细胞分泌功能是通过肝细胞胆小管侧膜的转运蛋白来实现的,在众多的膜转运蛋白中,胆盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)是介导胆盐摄取和排泄最重要的胆盐转运器<sup>[2]</sup>;钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)是位于顶浆膜上介导胆盐的重要因子,也是细胞摄取胆汁酸的主要载体系统<sup>[3]</sup>。BSEP与NTCP的协同作用在胆汁分泌和肝脏功能的正常运作中至关重要,是驱动胆汁酸盐肝肠循环的重要动力。课题组前期证实大黄灵仙胶囊可以调控部分肝胆管侧膜细胞转运蛋白<sup>[4-5]</sup>,据此,本研究探讨大黄灵仙胶囊对BSEP、NTCP蛋白和mRNA表达量调控及防治胆囊结石的作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 动物 5周龄SPF级C57BL/6小鼠,雄性,体重(18±2)g(购于湖南长沙天勤有限公司,许可证号SCXK(湘)2014-0011),饲养于右江民族医学院动物实验室。实验室室内湿度:55%~75%,室内温度:20~25℃,12h黑白环境循环更替,实验一切操作严格遵守美国国立卫生研究院公布的《实验动物护理使用指南》(NIH Pub. No. 85-23,1996修订)。本研究动物实验通过右江民族医学院动物伦理委员会核查并审批。

1.2 药物 大黄灵仙胶囊由广西中医药大学第一附

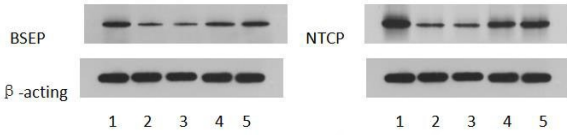
属医院中药中学提供(桂药监注[2003]88号),麻醉药品由中国泰兴市豪申化工贸易有限公司提供(CAS:302-17-0),熊去氧胆酸购于四川科瑞德制药有限公司(国药准字H20123205),致石性饲料购于江苏美迪森生物医药有限公司(GB14924.3-2010)。

1.3 主要试剂 Anti-BSEP抗体购于Thermo Fisher公司, Anti-NTCP抗体购于Thermo Fisher公司,  $\beta$ -actin抗体购于北京索莱宝生物科技股份有限公司,山羊抗兔的二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司, SDS购于上海碧云天生物科技股份有限公司。

1.4 分组及造模 小鼠先于SPF级动物实验室饲养1周以适应饲养环境并确定小鼠健康状况,将60只小鼠随机均分为5组:普食组(P组)、致石组(Z组)、致石+灌水组(Z+S组)、致石+大黄灵仙胶囊组(Z+D组)、致石+熊去氧胆酸组(Z+X组)。普食组予以普通饲料喂养,余4组均予以致石饲料喂养[高脂、高热量、高胆固醇(15%脂肪、1.5%胆固醇、0.5%胆酸)]诱导方法造模8周,建立小鼠胆囊结石模型,此造模方法已被多次验证成功<sup>[6-8]</sup>。Z+D组给予大黄灵仙胶囊汤药灌胃,Z+X组给予熊去氧胆酸胶囊溶液灌胃,Z+S组则给予相同体积的生理盐水灌胃,药物剂量根据小鼠与成人体重等效剂量换算。取胆囊组织观察结石形成情况,小鼠胆囊内有颗粒状或泥沙状沉积物可判断为结石形成;取小鼠肝脏组织0.3cm×0.3cm×0.2cm装入EP管中暂时存放于液氮罐中,标本采取完成

后统一保存至-80℃冰箱可进行下一步实验。

1.5 Western-Blotting 检测小鼠肝脏组织 BSEP、NTCP 蛋白表达 提取小鼠肝脏组织蛋白并测定蛋白浓度,配平→蛋白质变性→制备 SDS-PAG 凝胶→上样、电泳→转膜→封闭、洗膜→一抗、二抗孵育→曝光→灰度值分析。蛋白条带见图 1。



注:1为Z组;2为P组;3为Z+S组;  
4为Z+D组;5为Z+X组。

图1 小鼠肝脏组织中 BSEP、NTCP 蛋白条带图

1.6 RT-PCR 检测小鼠肝脏组织 BSEP、NTCP 基因转录水平 引物的设计与合成→组织标本 RNA 的提取→RNA 浓度的测定→将符合标准逆转录反应→将提取好的 DNA 进行上机→进行 Real Time PCR 反应。采用两步法 PCR 扩增标准程序→计算出各样品的目的基因相对定量结果,即其他各个样品相对于对照样品(以 P 为对照样本),目的基因 mRNA 转录水平的差异。

1.7 琼脂糖凝胶电泳结果 浓度测定后应用琼脂糖凝胶电泳测定所提取 RNA 完整度,结果见图 2。紫外灯下可见各组样本 28s、18s rRNA 两条条带,条带清晰、明亮、边缘完整,且 28s 条带宽度约为 18s 条带的两倍。所以认定所提取的 RNA 完整性好,无污染,无降解。

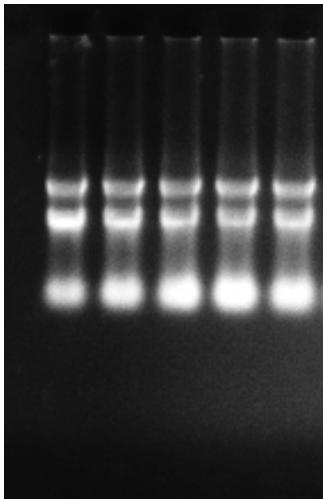


图2 各组琼脂糖凝胶电泳结果

1.8 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,造模情况为计数资料,蛋白及 mRNA 表达量为计

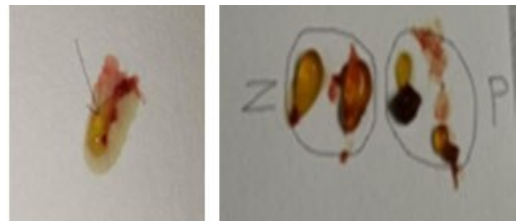
量资料;计数资料(样本量少)采用四格表资料的 Fisher 确切概率法检验,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,多个样本间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),根据方差齐性检验,方差齐否分别使用 LSD 法和 Games-Howell 法,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 结石形成情况 小鼠胆囊内有颗粒状或泥沙状沉积物可判断为结石形成,本次实验显示多为泥沙状沉积物,个别为颗粒状(见表 1、图 3)。不仅如此,所有致石饲料喂养的小鼠胆囊直径大于对照组(图 3:Z 为造模组, P 为普通喂养组)。通过统计学分析发现: P 组与 Z 组差异有统计学意义( $\chi^2 = 20.308, P < 0.001$ ),造模成功; Z+S 组与 Z+D 组比较,两组差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.224, P < 0.05$ ), Z+X 组与 Z+D 组比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.000, P > 0.05$ ),说明大黄灵仙胶囊、熊去氧胆酸具有防治胆囊结石形成作用,且两种药作用结果相当。

表1 5组造模结果

组别	饲养/只	成石/只	死亡/只	成石率/%
P组	12	0	0	0
Z组	12	11	0	91.66
Z+S组	12	10	1	53.33
Z+D组	12	3	0	25.00
Z+X组	12	2	0	16.66



注:颗粒状结石(箭头指向);  
Z为造模组,P为普通喂养组。

图3 胆囊结石造模图

2.2 小鼠肝脏组织中 BSEP、NTCP 的蛋白表达水平 造模 8 周后,对比 Z+X 组、Z+D 组、Z+S 组肝脏组织中 BSEP、NTCP 的蛋白表达量发现: Z+D 组 > Z+S 组、Z+X 组 > Z+S 组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),但 Z+D 组与 Z+X 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2、图 4、图 5。(注:此次实验分为 5 组, P 组和 Z 组比较用于验证造模, Z+S 组、Z+D 组和 Z+X 三组比较用于验证 BSEP、NTCP 蛋白、mRNA 转录表达水平,故下列只列出 Z+S 组、Z+D 组、Z+X 组信息。)

表2 小鼠肝脏组织 BSEP、NTCP 的蛋白表达水平对比

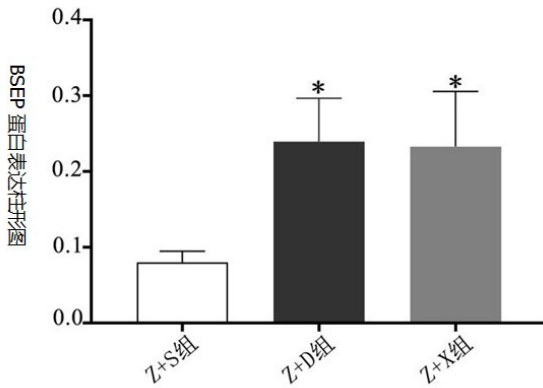
组别	n	BSEP	NTCP
Z+S组	11	0.080±0.015	0.117±0.038
Z+D组	12	0.240±0.057 <sup>a</sup>	0.360±0.064 <sup>a</sup>
Z+X组	12	0.233±0.073 <sup>a</sup>	0.321±0.069 <sup>a</sup>
F		92	55
P		<0.05	<0.05

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示;②与Z+S组比较, a:  $P < 0.05$ 。

表3 小鼠肝脏组织 BSEP、NTCP 的 mRNA 表达水平对比

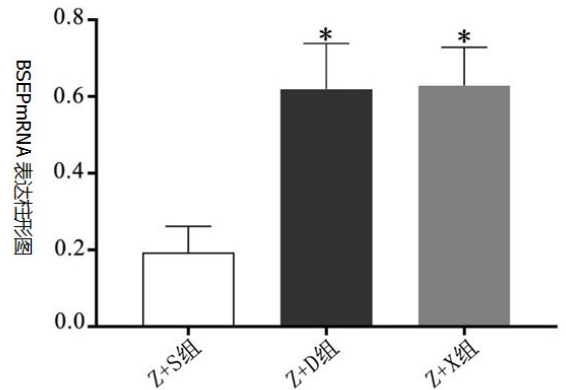
组别	n	BSEP	NTCP
Z+S组	11	0.194±0.068	0.141±0.047
Z+D组	12	0.620±0.119 <sup>a</sup>	0.571±0.084 <sup>a</sup>
Z+X组	12	0.629±0.100 <sup>a</sup>	0.590±0.111 <sup>a</sup>
F		99	71
P		<0.05	<0.05

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示;②与Z+S组比较, a:  $P < 0.05$ 。



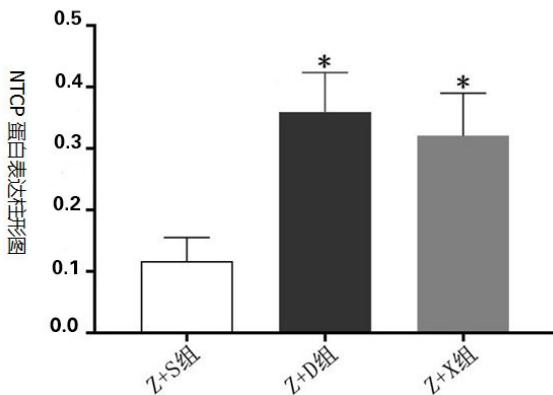
注:“\*”表示与Z+S组比较 BSEP 蛋白表达量有统计学差异。

图4 小鼠肝脏组织中 BSEP 蛋白表达量柱形图



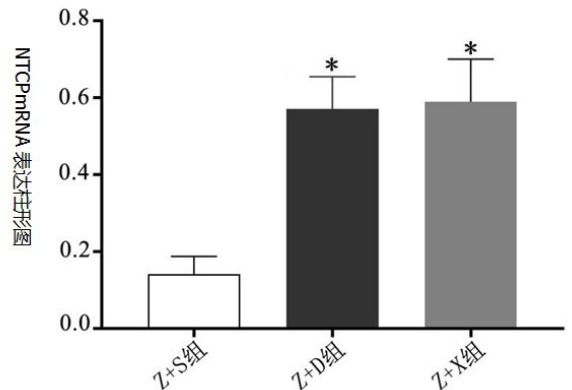
注:“\*”表示与Z+S组比较 BSEP mRNA 转录水平有统计学差异。

图6 小鼠肝脏组织中 BSEP mRNA 转录柱形图



注:“\*”表示与Z+S组比较 NTCP 蛋白表达量有统计学差异。

图5 小鼠肝脏组织中 NTCP 蛋白表达量柱形图



注:“\*”表示与Z+S组比较 NTCP mRNA 转录水平有统计学差异。

图7 小鼠肝脏组织中 NTCP mRNA 转录柱形图

2.3 小鼠肝脏组织中 BSEP、NTCP 的 mRNA 表达水平 造模 8 周后,对比 Z+X 组、Z+D 组、Z+S 组肝脏组织中 BSEP、NTCP mRNA 转录水平发现:Z+D 组>Z+S 组、Z+X 组>Z+S 组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),但 Z+D 组与 Z+X 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3、图 6、图 7。

### 3 讨论

大黄鼠仙胶囊具有较好的预防结石形成的作用,本研究证实其调控小鼠肝胆管侧膜细胞上 BSEP、NTCP 的蛋白及 mRNA 表达水平干预胆囊结石形成,另一可能机制为抑制胆囊黏膜炎症及上调肝组织中 CYP7A<sup>[9-10]</sup>,李泉等<sup>[9]</sup>在临床实验中,通过 B 超随访提示患者胆囊收缩功能较术前明显改善,综合实验研究与临床观察结果表明,在保胆取石术后病人中,大

黄灵仙胶囊有提高胆石症手术疗效、降低胆石症术后残石率及复发率的作用。熊去氧胆酸是一种亲水性胆汁酸<sup>[11]</sup>,可以抑制胆固醇在肠道内的重吸收,并且降低其向胆汁中分泌,抑制胆汁中胆固醇过饱和,胆固醇结石逐渐溶解,最终防止胆囊结石生成。大黄灵仙胶囊具有疏肝利胆功效,协调胆道系统功能,且有保护肝脏组织和促进肝功能,即使采用致石性饲料灌胃,由于分泌较多胆汁冲刷胆道,不利于胆固醇成核异常;大黄灵仙胶囊可能保护胆囊功能,不致胆汁淤积,综上,熊去氧胆酸、大黄灵仙胶囊都有抑制结石形成作用。所以 Z+D 组、Z+X 组结石生成率相当,均低于 Z+S 组,差异有统计学意义。

NTCP 作为一种跨膜糖蛋白,介导门脉结合胆汁酸进入肝细胞,维持胆汁酸肝内循环和肝内胆汁酸正常浓度发挥重要作用,在转录水平 NTCP 主要受 FXR 核胆酸受体调控<sup>[12]</sup>。BSEP 是肝内胆汁酸清除的关键因素,胆汁淤积性药物性肝损伤(DILI)患者大多 BSEP 表达显著下调<sup>[13]</sup>。Z+D 组 BSEP、NTCP 蛋白表达及 mRNA 转录都有提高,稳定了胆汁酸转运蛋白表达,抑制胆汁淤积,稳定了胆汁酸池浓度平衡及肝脏分泌胆汁水平。大黄灵仙胶囊防治胆囊结石形成在于影响肝胆管转运蛋白表达,此实验只对 BSEP、NTCP 两个因子蛋白、基因表达水平做研究,如果可以从调控 BSEP、NTCP 两因子的信号通路着手,对基因进行检测,将更具特异性及说明意义。

#### 参考文献:

[1] Gu Qiyun, Zhou Guoqing, Xu Tao. Risk factors for gallstone disease in Shanghai: An observational study. [J]. *Medicine*, 2020, 99(3): e18754.

[2] Carola Dröge, Bonus M, Baumann U, et al. Sequencing of FIC1, BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants[J]. *Journal of Hepatology*, 2017, 67(6): 1253-

1264.

- [3] Lee HW, Park HJ, Jin B, et al. Effect of S267F variant of NTCP on the patients with chronic hepatitis B[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17634-17641.
- [4] 唐乾利, 吕震, 王兵, 等. 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[J]. *重庆医学*, 2018, 47(1): 4-10.
- [5] 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): 953-959.
- [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] 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.
- [8] 唐乾利, 黄炜, 黄名威, 等. 大黄灵仙胶囊对胆结石防治作用机制的实验研究[J]. *中国临床新医学*, 2012, 5(2): 93-97.
- [9] 李泉, 俞渊, 黄欣, 等. 大黄灵仙胶囊预防保胆取石术后结石复发的基础与临床研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2014, 36(2): 161-164.
- [10] 周洋, 卓臣义, 唐乾利. 胆结石形成机制及诊疗现状研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(2): 203-206.
- [11] Schattenberg Jörn M. Prevention of endpoints in primary biliary cholangitis with ursodeoxycholic acid: quantifying the benefit. [J]. *Gut*, 2020(3): 1-2.
- [12] Appelman MD, Robin MJD, Vogels EWM, et al. The Lipid Raft Component Stomatin Interacts with the Na<sup>+</sup> Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) and Modulates Bile Salt Uptake[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 1-13.
- [13] Garzel B, Hu T, Li L, et al. Metformin Disrupts Bile Acid Efflux by Repressing Bile Salt Export Pump Expression[J]. *Pharmaceutical Research*, 2020, 37(2): 1-10.

收稿日期: 2020-05-20; 修回日期: 2020-05-29