

# 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

唐乾利<sup>1</sup> 吕震<sup>1,2</sup> 俞渊<sup>3</sup> 王兵<sup>3</sup> 李辉<sup>1,2</sup> 金萌<sup>1,2</sup> 王宇<sup>1</sup> 王澍<sup>1</sup>

**摘要 目的** 通过 Western blot 法和气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术观察大黄灵仙胶囊对小鼠胆结石肝细胞转运蛋白表达及胆汁代谢谱的影响,探讨其可能机制。**方法** 将 50 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为正常对照组(N 组)、模型组(M 组)、熊去氧胆酸(UDCA)对照组(U 组)、药物对照组(Y 组)及大黄灵仙胶囊治疗组(D 组),每组 10 只。N 组和 Y 组小鼠普通饲料喂养,M、U、D 组给予高脂、高热量、高胆固醇饲料诱导胆结石的形成。同时 U 组每天给予 130 mg/kg UDCA 溶液灌胃;Y 组和 D 组每天给予大黄灵仙胶囊汤药 13 g/kg 灌胃,N 组和 M 组给予相同体积的生理盐水灌胃。干预 8 周后,观察小鼠成石率,利用 Western blot 法观察肝胆管侧膜细胞转运蛋白三磷酸腺苷结合盒转运子 B 亚族成员 11 (ATP binding cassette subfamily B member 11, Abcb11)和三磷酸腺苷结合盒转运体 c2 (ATP binding cassette subfamily C member 2, Abcc2)变化,GC-MS 技术检测小鼠胆汁代谢组学特征。**结果** 造模期间因灌胃操作不慎,U 组 1 只小鼠挣扎时灌胃针扎破小鼠食管导致死亡。M 组成石率为 100.00%,高于 N 组和 Y 组(均为 0.00%, $\chi^2 = 20.00, P < 0.01$ );与 M 组比较,U 组及 D 组成石率降低(44.44%, $\chi^2 = 7.54, P = 0.011$ ;30.00%, $\chi^2 = 10.77, P = 0.003$ )。经红外光谱分析检测后在 2 939、1 446、1 382、1 056  $\text{cm}^{-1}$  处可见胆固醇特有吸收峰。5 组小鼠 Abcb11 和 Abcc2 转运蛋白总体比较差异有统计学意义( $F = 41.89; P < 0.01; F = 90.01, P < 0.01$ )。与 N 组比较,M 组 Abcb11 和 Abcc2 表达降低( $P < 0.01$ );与 M 组比较,U、Y、D 组转运蛋白 Abcb11 和 Abcc2 表达均升高( $P < 0.01$ )。与其他组比较,模型组小鼠胆汁内源性代谢物丙氨酸、柠檬酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、胆固醇、LDL、甘油、苹果酸及丙酮浓度升高,乳酸、谷氨酰胺、胺甘氨酸、胆碱及牛磺酸浓度降低,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论** 大黄灵仙胶囊具有稳定肝胆管侧膜细胞转运蛋白表达、改变或改善病理性胆汁的分泌及其代谢物的作用,从而达到防治胆结石的目的。

**关键词** 三磷酸腺苷结合盒转运子 B 亚族成员 11;三磷酸腺苷结合盒转运体 C 亚族成员 2;代谢组学;胆结石;大黄灵仙胶囊

Mechanism of Dahuang Lingxian Capsule for Regulating and Controlling Expression of Hepatocyte Transporters and Bile Metabolism Spectrum in Gallstone Mice TANG Qian-li<sup>1</sup>, LV Zhen<sup>1,2</sup>, YU Yuan<sup>3</sup>, WANG Bing<sup>3</sup>, LI Hui<sup>1,2</sup>, JIN Meng<sup>1,2</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, and WANG Shu<sup>1</sup> 1 Youjiang Medical University for Nationalities, Key Lab for Treating and Preventing High Incident Diseases in Western Guangxi, Guangxi (533000); 2 Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530001); 3 Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530023)

**ABSTRACT Objective** To observe the effects of Dahuang Lingxian Capsule (DLC) for regulating and controlling expression of hepatocyte transporters and bile metabolism spectrum in gallstone mice using Western blot and gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS), and to explore its possible mechanism. **Methods** Fifty male C57BL/6 mice were randomly divided into five groups, i.e., the normal

基金项目:2014 年国家自然科学基金面上项目(No. 81470198);2014 年广西科学研究与技术开发计划项目(No. 桂科能 14123006-3)

作者单位:1.右江民族医学院/桂西高发防治重点实验室(广西百色 533000);2.广西中医药大学研究生学院(南宁 530001);3.广西中医药大学第一附属医院肝胆外科(南宁 530023)

通讯作者:唐乾利, Tel:0776-2827008, E-mail:htmgx@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.08.0953

control group (N), the model group (M), the ursodeoxycholic acid (UDCA) control group (U), the drug control group (Y), the DLC treatment group (D), 10 in each group. Mice in group N and group Y were fed with common forage. Forage with high fat, high calorie, high cholesterol was fed to mice in group M, U, and D to induce cholecystolithiasis. Meanwhile, UDCA solution ( $130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) was administered to mice in group U by gastrogavage. DLC decoction ( $13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) was administered to mice in group Y and D by gastrogavage. Equal volume of normal saline was administered to mice in group N and M by gastrogavage. After 8-week intervention, gallstone formation rate was observed. Changes of ATP binding cassette subfamily B member 11 (Abcb11) and ATP binding cassette subfamily C member 2 (Abcc2) were observed using Western blot. Metabonomic features were detected by GC-MS. Results Improper operation occurred during modeling. One mouse died in group U since its esophagus was pricked by lavage needle. The gallstone formation rate was 100.00%, higher than that in group N and Y (0.00%, 0.00%;  $\chi^2 = 20.00, P < 0.01$ ). Compared with group M, the gallstone formation rate was reduced in group U and D (44.44%,  $\chi^2 = 7.54, P = 0.011$ ; 30.00%,  $\chi^2 = 10.77, P = 0.003$ ). Cholesterol characteristic absorption peak could be seen at 2 939, 1 446, 1 382, and 1 056  $\text{cm}^{-1}$  after infrared spectrum analysis. There was statistical difference in Abcb11 and Abcc2 among the 5 groups ( $F = 41.89, P < 0.01$ ;  $F = 90.01, P < 0.01$ ). Compared with group N, expressions of Abcb11 and Abcc2 transporters significantly decreased in group M ( $P < 0.01$ ). Compared with group M, expressions of Abcb11 and Abcc2 transporters significantly increased in group U, Y, D ( $P < 0.01$ ). Compared with other groups, concentrations of endogenous metabolites such as alanine, citric acid, lysine, methionine, phenylalanine, tyrosine, cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), glycerine, malic acid, acetone increased; concentrations of lactic acid, glutamine, amine glycine, choline, and taurine decreased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Conclusion DLC could stabilize expression of Abcb11 and Abcc2, change or improve pathological secretion of bile and its metabolites, thereby achieving the effect of gallstone prevention and treatment.

**KEYWORDS** ATP binding cassette subfamily B member 11; ATP binding cassette subfamily C member 2; metabonomics; gallstone; Dahuang Lingxian Capsule

胆结石是世界范围内一种常见的消化道疾病,给社会带来了较重的经济和社会负担,是医学界研究关注的重点和难点<sup>[1]</sup>。因此,探求一种有效治疗胆石症的药物显得尤为重要。课题组通过 10 余年的临床运用和基础研究,发现经验方大黄灵仙胶囊在防治胆结石过程中疗效确切,特别是在围手术期的使用可减轻胆囊炎症,提高手术成功率,降低结石复发率<sup>[2,3]</sup>。对于复杂的胆道系统结石患者,服用此中药后可有减少平滑肌痉挛、减轻炎症,促进溶石排石的效果<sup>[2]</sup>。本研究主要探讨大黄灵仙胶囊治疗小鼠胆结石过程中对小鼠肝胆管细胞侧膜转运蛋白及其分泌的胆汁代谢组学改变的影响,从肝细胞分泌状态探索胆结石形成的机制以及病理性胆汁在胆石病形成中的作用,明确大黄灵仙胶囊防治胆结石的作用靶点,为“胆病从肝论治”提供理论依据。

## 材料与方

1 动物 6 周龄左右 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 50 只,体重( $18 \pm 2$ )g,由南京大学模式动物研究所

提供,生产许可证号:SCXK(苏)2010-0001。动物饲养于右江民族医学院实验动物中心,动物房保持 12 h/12 h 光/暗周期,人工控温 24 ~ 26 °C,相对湿度 40% ~ 60%。全营养饲料及自来水喂养,自由采食和饮水。研究方案通过右江民族医学院动物伦理委员会批准。

2 药物 大黄灵仙胶囊药物组成及剂量如下:生大黄,威灵仙,金钱草,芒硝,枳壳,泽兰,柴胡,鸡内金,郁金,磁石,黄芪,甘草,由广西中医药大学第一附属医院中药中心提供,上药按照广西壮族自治区药品监督管理局文件(桂药监注[2002]175号,桂药监注[2003]88号)批准的医院内制剂制作等量胶囊;熊去氧胆酸粉(UDCA)由 Codow 公司生产(生产批号:CD104746,规格: >98%,净含量 25 g)。

3 主要试剂及仪器 胆固醇(购自 Solarbio 公司, Lot.No. 527C105);胆酸(购自 Sigma 公司, code: 101335972);一抗 Rabbit anti-BSEP(ABCB11) Antibody(英国 Biorbyt 公司生产,货号: orb13275);一抗 Rabbit anti-MRP2(ABCC2) Antibody(英国 bior-

byt 公司生产,货号:orb11075);二抗辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(购自上海 Beyotime 生物工程有限公司,产品编号:A0216);内标:L-2-氯苯丙氨酸(CAS:103616-89-3)(购自上海恒柏生物科技有限公司,中国);衍生化试剂:BSTFA(购自 REGIS Technologies, 美国);GC 色谱仪(Agilent 7890A, 美国);MS 质谱仪(LECO Chroma TOF PEGASUS HT, 美国);红外光谱仪(日本导津)。

**4 分组及造模方法** 将 50 只 SPF 级 6 周龄 C57BL/6 雄性小鼠运用统计软件随机分为 5 组:正常对照组(N 组)、模型组(M 组)、熊去氧胆酸对照组(U 组)、正常药物对照组(Y 组)及大黄灵仙胶囊治疗组(D 组),每组 10 只。适应性喂养 1 周后,N 组和 Y 组小鼠普通饲料喂养,M、U、D 组给予高脂、高热量、高胆固醇<sup>[4]</sup>(15.0%脂肪、1.0%胆固醇、0.5%胆酸)饲料诱导胆囊结石的形成,建模 8 周。造模同时用药干预,药物剂量根据小鼠与成人体重等效剂量换算<sup>[5]</sup>估算小鼠药物等效剂量用量约是 60 kg 体重成人的 13 倍,这与前期预实验所得的量效关系剂量相符。造模期间 U 组每天给予 130 mg/kg UDCA(即成人用量的 13 倍,利用生理盐水配制成干粉溶液)溶液灌胃,给药 8 周;Y 组和 D 组每天给予大黄灵仙胶囊汤药灌胃,大黄灵仙胶囊灌胃剂量为 13 g/kg(即成人用量的 13 倍,将大黄灵仙胶囊制剂浓煎成浓度为 0.65 g/mL 的汤药),给药 8 周;N 组和 M 组则分别给予相同体积的生理盐水灌胃。

**5 标本采集** 喂养 8 周后,分别将各组小鼠用 5%水合氯醛(0.1 mL/10 g)麻醉后,取小鼠腹部正中切口,找到肝脏及胆囊,结扎并摘取胆囊存于 -80 °C 冰箱,胆总管插管引流胆汁 1~2 h 存于 -80 °C 冰箱,以上标本用于 GC-MS 分析法检测胆汁代谢谱,在收集胆汁过程中用加热灯和温度计保持小鼠体温的正常<sup>[6]</sup>。取小鼠肝脏组织 0.3 cm × 0.3 cm × 0.2 cm 存放于 -80 °C 冰箱用于 Western blot 法检测其肝胆管细胞转运蛋白的表达变化。

**6 胆结石成石判定及定性分析** 肉眼观察小鼠肝胆管及胆囊内有颗粒状或泥沙状沉积物,即可判定为结石形成且造模成功<sup>[7]</sup>。采用溴化钾压片红外光谱分析法对小鼠胆结石样品定性分析成分<sup>[8]</sup>:将成石小鼠胆囊内沉淀物干燥成粉末后取 1~2 mg 与溴化钾粉末 200 mg 混匀研细,装入压模,抽真空 2 min 后,放入红外光谱仪检测。

**7 肝胆管细胞转运蛋白的表达检测** 采用 Western blot 法检测肝胆管细胞转运蛋白三磷酸腺

苷结合盒转运子 B 亚族成员 11(ATP binding cassette subfamily B member 11, Abcb11)和三磷酸腺苷结合盒转运体 C 亚族成员 2(ATP binding cassette subfamily C member 2, Abcc2)。肝组织用 RIPA 裂解液(每 100 μL 中加入 1 μL PMSF 抑制剂)提取总蛋白;使用 BCA 法进行蛋白定量;8% SDS-PAGE 电泳(保证蛋白上样量均衡约 70 μg),电泳结束后行 BIO-RAD 蛋白电转移(PVDF 膜,350 mA, 60 min);5%BSA 封闭 60 min;加入兔抗小鼠一抗和兔抗小鼠多克隆内参 β-actin 抗体<sup>[9]</sup>;4 °C 封闭过夜,第 2 日 TBST 缓冲液洗涤 4 × 10 min 后加入羊抗兔辣根过氧化物标记二抗(1:5 000)反应 90 min;TBST 洗涤 8 × 10 min,暗室中 ECL 发光液检测试剂盒显示结果于 X 胶片;胶片扫描后灰度值分析运用 Alpha Ease FC 软件分析统计。

**8 胆汁气相色谱-质谱分析代谢组学** 首先将胆汁代谢物萃取,加入 0.2 mL 甲醇,再加入 10 μL L-2-氯苯丙氨酸,漩涡混匀;紧接着将样本 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min;小心地取出 0.21 mL 上清于 2 mL 进样瓶(甲烷硅基化)中。然后胆汁代谢物衍生化:在真空浓缩器中干燥提取物 37 °C, 大约 2 h;向干燥后的代谢物加入 30 μL 甲氧胺盐试剂(甲氧胺盐酸盐,溶于吡啶 20 mg/mL),轻轻混匀后,放入烘箱中 80 °C 孵育 20 min;向每个样品中迅速加入 40 μL BSTFA(含有 1% TCMS, v/v),将混合物 70 °C 孵育 1 h。上机:进样量:1 μL,不分流模式;载气:氦气;前进样口吹扫流速:3 mL/min;柱流速:1 mL/min;柱温:60 °C 保持 1 min,以 10 °C 每分钟的速率上升至 330 °C,保持 10 min;前进样口温度:280 °C;传输线温度:280 °C;离子源温度:220 °C;电离电压:-70 eV;扫描方式:85~600 m/z;扫描速率:20 spectra/s;溶剂延迟:276 s。

采用 LECO 公司的 Chroma TOF4.3X 软件和 LECO-Fiehn Rtx5 数据库处理数据。主要使用于原始峰识别,过滤噪音和校正基线,峰对齐,谱图去卷积解析,并将峰面积定量统计分析,经标准化后进行主成份分析(PCA)。将代谢物数据相对峰面积导入 SIM-CA 软件,经标准化后进行主成份分析(PCA),观察 PCA 模型中个样本的分布情况和可信度。

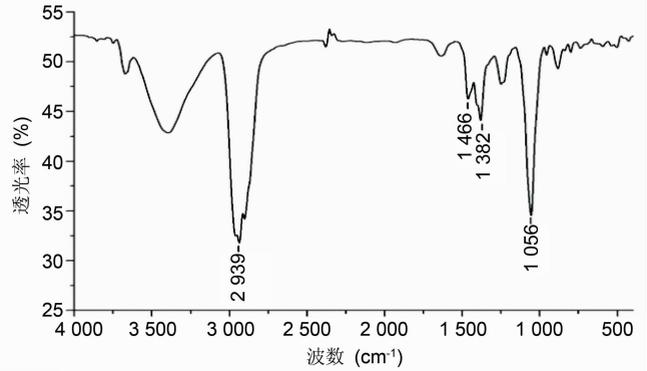
**9 统计学方法** 采用 SPSS 18.0 统计分析软件分析结果,计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数比较采用方差分析,组间多重比较采用 LSD 法统计,方差不齐采用秩和检验。检验标准取  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1 各组胆结石成石率比较 造模期间因灌胃操作不慎,U 组 1 只小鼠挣扎时灌胃针扎破小鼠食管导致死亡。N 组与 Y 组小鼠未见胆结石;模型组及其他组成石小鼠胆囊内可见颗粒样或泥沙样沉淀,形状不规则,色黄白,可透过胆囊壁清晰辨别,胆汁稍浑浊;正常组及其他未成石小鼠胆汁均清亮、呈淡黄色。模型组小鼠 10 只均成石,成石率 100%,高于正常对照组和药物对照组 ( $\chi^2 = 20.00, P < 0.01$ );U 组 9 只小鼠中有 4 只小鼠成石,成石率是 44.44%,D 组 10 只有 3 只小鼠成结石,成石率 30.0%,均明显低于模型组 ( $\chi^2 = 7.54, P = 0.011$ ;  $\chi^2 = 10.77, P = 0.003$ ),D 组与 U 组差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.43, P = 0.65$ )。

2 胆结石成分定性分析(图 1) 经红外光谱分析检测后在 2 939、1 446、1 382、1 056  $\text{cm}^{-1}$  处可见胆固醇特有吸收峰。因此可确定模型为胆固醇结石。

3 各组 Abcb11 和 Abcc2 转运蛋白表达比较(图 2) 5 组小鼠 Abcb11 和 Abcc2 转运蛋白总体比较差异有统计学意义 ( $F = 41.89; P < 0.01; F = 90.01, P < 0.01$ )。与 N 组比较,M 组 Abcb11 和 Abcc2 表达降低 ( $P < 0.01$ );与 M 组比较,U、Y、D 组转运蛋白 Abcb11 和 Abcc2 表达均升高,差异有统计



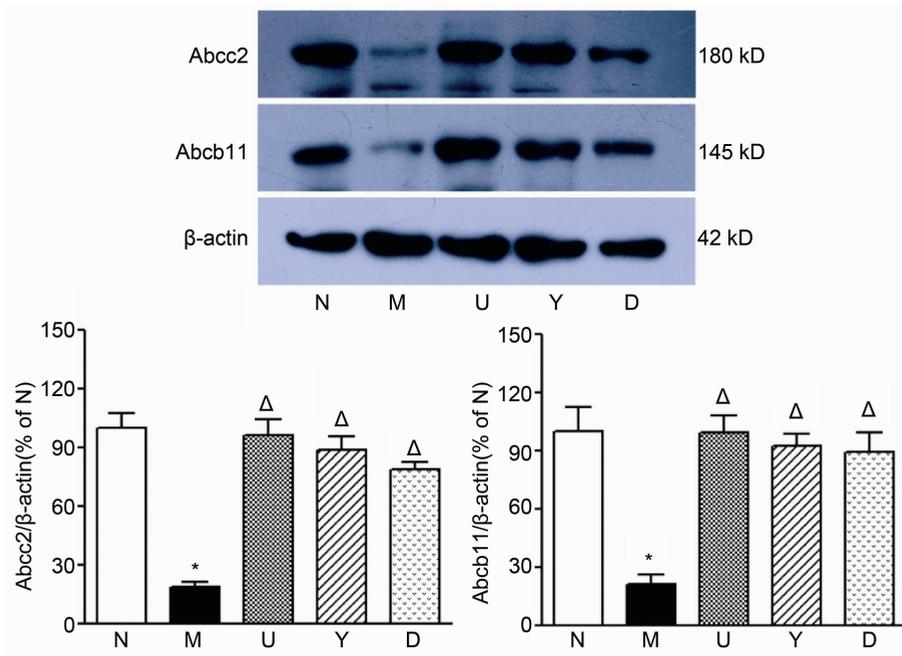
注:在 2 939、1 446、1 382、1 056  $\text{cm}^{-1}$  处可见胆固醇特有吸收峰值

图 1 小鼠胆结石成分红外光谱定性分析图谱

学意义 ( $P < 0.01$ );除 M 组外,其余各组两个蛋白两两比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

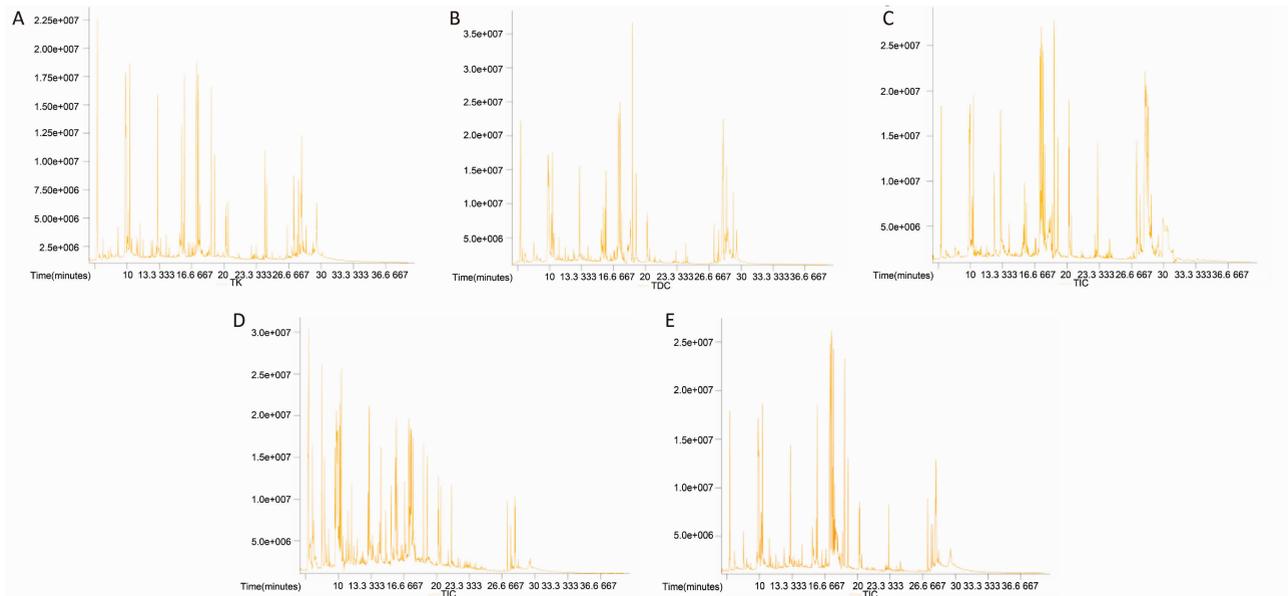
#### 4 胆汁代谢组学检测

4.1 GC-MS 胆汁代谢物检测图谱(图 3) 利用 GC-MS 仪检测小鼠胆汁代谢物得到三维数据图谱,含峰强度(面积)、时间、质谱图等,经原始峰识别,过滤噪音和校正基线,峰对齐,采用 LECO 公司的 Chroma TOF4. 3X 软件和 LECO-Fiehn Rtx5 数据库处理数据,利用峰保留时间和匹配度确定相应的代谢化合物,并确认本实验操作过程中样品质量、试验方法、系统平台良好,观察到 M 组小鼠图谱峰面积变化趋势与其他 4 组明显不同。



注:与 N 组比较,\* $P < 0.01$ ;与 M 组比较,Δ $P < 0.01$

图 2 各组小鼠转运蛋白表达量比较



注:图谱横坐标为代谢物峰保留时间,纵坐标为代谢物峰强度;A 为 N 组;B 为 Y 组;C 为 U 组;D 为 M 组;E 为 D 组

图 3 各组胆汁代谢物图谱

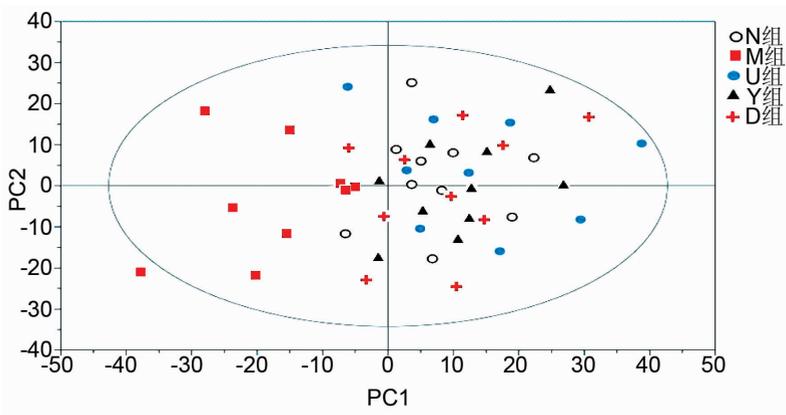


图 4 各组样本 GC-MS 代谢物数据主成分分析得分图

#### 4.2 胆汁内源性代谢物数据 PCA 统计(图 4)

从得分图中可发现主成份积分集中分布与椭圆形 95%CI 内,模型组与正常对照组及治疗组样本主要分别分布在左右两侧,说明模型组与其他组样本代谢图谱有显著差异;而正常组与治疗组样本都平均分布在右侧上下两个象限内,说明其代谢图谱差异性较小。

#### 4.3 小鼠胆汁内源性代谢物鉴定(表 1) 利用

LECO-Fiehn Rtx5 数据库对检测的图谱进行鉴定,鉴定结果中可见小鼠胆汁内源性代谢物峰的匹配度均较高,结果较为可信(Similarity 在 800~1 000 之间)。

#### 4.4 内源性代谢物浓度统计(表 2) 以各组样

本图谱峰与内标峰间的相对峰面积代表代谢物浓度,并运用统计方法考察不同组内源性代谢物浓度差异。与其他组比较,模型组小鼠胆汁内源性代谢物丙氨酸、

表 1 小鼠胆汁内源性代谢物鉴定结果

内源性代谢物	R. T. (min)	Similarity
丙氨酸	7.506 42	885.300 0
柠檬酸	16.351 40	783.000 0
乳酸	6.903 33	862.000 0
丙酮	9.587 00	800.200 0
谷氨酸	14.211 50	835.000 0
赖氨酸	17.411 70	916.000 0
甘氨酸	7.811 20	840.777 8
蛋氨酸	13.059 20	846.250 0
苯丙氨酸	13.609 40	917.777 8
酪氨酸	17.229 60	905.000 0
谷氨酰胺	15.171 70	816.000 0
胆固醇	27.366 70	930.000 0
低密度脂蛋白	29.308 46	872.000 0
甘油	9.833 33	787.000 0
苹果酸	12.637 80	882.500 0
胆碱	9.028 54	805.200 0
牛磺酸	14.958 30	764.000 0

表 2 各组小鼠胆汁代谢物浓度统计 ( $\bar{x} \pm s$ )

内源性代谢物	N	M	U	Y	D
丙氨酸	0.038 ± 0.010	0.843 ± 0.240 **	0.012 ± 0.005 <sup>△</sup>	0.096 ± 0.032 <sup>△</sup>	0.015 ± 0.001 <sup>△</sup>
柠檬酸	0.518 ± 0.131	1.084 ± 0.310 *	0.265 ± 0.051 <sup>△</sup>	0.634 ± 0.101 <sup>△▲▲</sup>	0.620 ± 0.074 <sup>△▲▲</sup>
赖氨酸	0.279 ± 0.068	0.844 ± 0.183 *	0.790 ± 0.120 <sup>△</sup>	0.275 ± 0.045 <sup>△▲▲</sup>	0.142 ± 0.029 <sup>△▲▲</sup>
蛋氨酸	0.246 ± 0.034	0.301 ± 0.095 **	0.015 ± 0.004 <sup>△</sup>	0.096 ± 0.004 <sup>△▲</sup>	0.027 ± 0.004 <sup>△</sup>
苯丙氨酸	0.804 ± 0.105	3.958 ± 0.820 **	0.107 ± 0.015 <sup>△</sup>	0.061 ± 0.007 <sup>△</sup>	0.039 ± 0.008 <sup>△</sup>
酪氨酸	0.689 ± 0.110	12.370 ± 1.513 **	0.048 ± 0.005 <sup>△</sup>	0.429 ± 0.064 <sup>△</sup>	0.858 ± 0.168 <sup>△</sup>
胆固醇	0.923 ± 0.204	4.790 ± 0.984 **	0.103 ± 0.035 <sup>△</sup>	0.251 ± 0.040 <sup>△</sup>	0.218 ± 0.035 <sup>△</sup>
LDL	1.105 ± 0.274	5.904 ± 0.924 *	1.162 ± 0.236 <sup>△</sup>	0.614 ± 0.097 <sup>△</sup>	0.895 ± 0.174 <sup>△</sup>
甘油	0.203 ± 0.045	6.553 ± 1.240 **	0.233 ± 0.055 <sup>△</sup>	0.401 ± 0.064 <sup>△</sup>	0.062 ± 0.006 <sup>△</sup>
苹果酸	2.468 ± 0.423	11.612 ± 2.547 **	0.756 ± 0.103 <sup>△</sup>	1.134 ± 0.213 <sup>△</sup>	0.773 ± 0.127 <sup>△</sup>
丙酮	1.109 ± 0.225	4.619 ± 0.996 *	0.286 ± 0.045 <sup>△</sup>	0.267 ± 0.544 <sup>△</sup>	0.475 ± 0.065 <sup>△</sup>
乳酸	12.151 ± 2.353	0.196 ± 0.022 **	1.961 ± 0.244 <sup>△</sup>	1.944 ± 0.189 <sup>△</sup>	4.355 ± 0.576 <sup>△</sup>
谷氨酰胺	0.054 ± 0.006	0.010 ± 0.001 *	0.045 ± 0.006 <sup>△</sup>	0.036 ± 0.004 <sup>△</sup>	0.061 ± 0.007 <sup>△</sup>
甘氨酸	1.070 ± 0.158	0.102 ± 0.022 **	1.312 ± 0.200 <sup>△</sup>	1.392 ± 0.211 <sup>△</sup>	1.146 ± 0.155 <sup>△▲</sup>
胆碱	0.944 ± 0.143	0.204 ± 0.036 *	0.486 ± 0.048 <sup>△</sup>	0.734 ± 0.077 <sup>△▲▲</sup>	0.794 ± 0.099 <sup>△▲▲</sup>
牛磺酸	0.949 ± 0.191	0.161 ± 0.027 **	1.238 ± 0.277 <sup>△</sup>	3.534 ± 0.384 <sup>△</sup>	1.117 ± 0.191 <sup>△</sup>

注:与 N 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与 M 组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$ ;与 U 组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

柠檬酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、胆固醇、LDL、甘油、苹果酸及丙酮浓度升高,乳酸、谷氨酰胺、甘氨酸、胆碱及牛磺酸浓度降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),与 U 组比较,Y 组柠檬酸、蛋氨酸、胆碱浓度升高,赖氨酸、谷氨酰胺浓度降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),D 组柠檬酸、乳酸、谷氨酰胺、胆碱浓度升高,赖氨酸、甘氨酸浓度降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

## 讨 论

中医学认为胆病多源于肝,主张胆病从肝论治,且此原则应贯彻到胆结石防治的全过程。中医药可从多靶点、多方面、多层次作用于肝细胞,达到“正本清源”之目的,有望从病理性胆汁形成这一中心环节治愈胆结石病,由此可见中医学对于胆病发病机制的认识,并揭示了胆结石形成与肝脏的密切联系。本实验方中大黄、芒硝攻下导滞、利胆排石;金钱草、郁金、柴胡、枳壳、泽兰相伍,既有清热利湿之功,又有理气祛痰之效;威灵仙、鸡内金、金钱草为排石佳品;威灵仙、磁石为经验用药;黄芪、甘草意在益气补虚,保护胃气。诸药合用共奏疏肝利胆,攻下排石的功效。所以 D 组小鼠的成石率得到有效控制,比 U 组成石率有所改善。

Abcb11 蛋白是 ATP 结合盒(ATP binding cassette, ABC)超家族成员之一的胆汁酸盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)是肝细胞分泌胆汁酸的重要蛋白<sup>[10]</sup>。BSEP 主要转运一价胆盐,包括原发性胆汁盐的牛磺酸和甘氨酸结合物胆酸(CA)、鹅去氧胆酸(CDCA)、次级胆汁盐脱氧胆酸(DCA)及熊去氧胆酸(UDCA)<sup>[11]</sup>。因此 Abcb11 基因的变异及缺陷导致

BSEP 表达异常直接影响肝胆管细胞侧膜运输胆汁盐正常输出并增强肠内胆固醇、脂质的吸收,导致病理性胆汁的分泌,改变胆囊内胆盐/胆固醇比例的生理状态,从而有利于胆固醇结石产生<sup>[12, 13]</sup>。Abcc2 主要介导多种有机阴离子从肝细胞分泌进入胆汁,包括结合胆红素、胆酸硫酸盐等二价胆盐转运。国内学者观察胆囊胆固醇结石患者肝细胞胆小管侧膜 MRP2 基因及蛋白的表达,发现 MRP2 表达减低可能与胆囊胆固醇结石形成有关<sup>[14]</sup>。说明 Abcc2 蛋白表达的缺陷影响肝胆管侧膜细胞二价胆盐的分泌从而影响胆汁内环境的改变,影响胆固醇/胆色素比例失衡造成胆盐胆固醇结晶容易析出成石。

有实验研究表明,高脂、高胆固醇饮食可诱导肝胆管细胞侧膜 BSEP、MRP2 基因表达异常,从而直接导致病理性胆汁分泌引起结石产生<sup>[15]</sup>。在本研究中发现模型组小鼠胆汁较浑浊,高脂高胆固醇饮食可诱导下调 Abcb11 和 Abcc2 蛋白的表达,导致胆管侧膜细胞一价胆盐和二价胆盐的分泌减少,模型组小鼠的两个蛋白表达量相对较低,正常组和治疗组小鼠的蛋白表达相对正常,所以笔者推测大黄灵仙胶囊可通过改变小鼠肝胆管侧膜细胞的胆汁盐输出泵表达降低的病理性状态,使之趋于正常水平从而改变病理性胆汁分泌,达到预防及治疗结石的作用。实验结果发现药物对照组小鼠的转运蛋白表达及成石率情况均与正常组无统计学意义,因此大黄灵仙胶囊本身并不会引起正常小鼠致石基因的改变,从而不会引起致石胆汁的分泌。

前期研究中笔者将胆结石兔血浆样本进行了代谢组学的研究,发现了该技术的优势<sup>[16, 17]</sup>。本研究利用气相色谱-质谱连用(GC-MS)技术检测胆汁代谢谱,

结果发现模型组丙氨酸和柠檬酸浓度升高,而乳酸下降,而丙氨酸参与多种代谢,是能量来源的途径之一,且丙氨酸能比较准确的反映出体内结石情况,当机体内含含有结石或发生梗阻性黄疸等疾病时丙氨酸浓度增高<sup>[17]</sup>。乳酸是糖代谢的产物,其浓度的改变是能量代谢紊乱的标志之一,说明模型组小鼠存在明显的能量代谢异常;丙酮是脂质代谢的产物,模型组丙酮浓度上升,说明与其他组比较,模型组存在明显的脂质代谢紊乱;模型组中赖氨酸、蛋氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸均升高,说明其小鼠蛋白代谢存在紊乱;模型组脂类代谢、蛋白代谢及能量代谢出现紊乱,从而引起病理性胆汁分泌造成结石产生。结果表明模型组谷氨酰胺水平下降,可能引起胆汁葡萄糖醛酸酶活性改变,促进病理性胆汁分泌后引起胆囊结石<sup>[18]</sup>。牛磺酸能溶解胆固醇结石,并对胆汁淤积性胆石病具有很好的疗效<sup>[19]</sup>,本研究发现模型组和治疗组中牛磺酸的浓度变化水平刚好与国外相关报道相符合。因此本实验清晰地区分大黄灵仙胶囊治疗组与模型组代谢组学特征,表明大黄灵仙胶囊能降低 LDL、丙氨酸、甘油、胆固醇等浓度,并提高牛磺酸、胆碱、乳酸、谷氨酰胺等代谢物浓度,保护肝细胞的结构和功能完整及生理性胆汁分泌。治疗组中个别指标浓度差异与总体趋势出现出入,其具体原因尚未明确,有待于进一步研究,可能成为探讨胆石症的重要代谢组学参考指标。

### 参 考 文 献

- [1] Agostino Di Ciaula, David QH Wang, Helen H Wang, et al. Targets for current pharmacological therapy in cholesterol gallstone disease[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2010, 39(2): 245 - 250.
- [2] 唐乾利,刘祖军,伍松合,等. 大黄灵仙胶囊降低胆石术后残石率及复发率疗效观察[J]. *新中医*, 2002, 34(6): 17 - 19.
- [3] 唐乾利,俞渊,黄名威,等. 大黄灵仙胶囊对慢性肝损伤后胆结石形成的干预作用研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(11): 2661 - 2664.
- [4] Song XY, Xu S, Hu JF, et al. Piperine prevents cholesterol gallstones formation in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 751: 112 - 117.
- [5] 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.
- [6] Helen H Wang, Frank Lammert, Anne Schmitz, et al. Transgenic over-expression of Abcb11 enhances biliary bile salt outputs, but does not affect cholesterol cholelithogenesis in mice[J]. *Eur J Clin Invest*, 2010, 40(6): 541 - 551.
- [7] 钱英,胡姗姗,陈泽慧,等. 胆石六号汤对小鼠胆固醇结石的影响[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(3): 147 - 150.
- [8] Liu G, Xing D, Wang HM, et al. Vibrational spectroscopic study of human pigment gallstones and their insoluble materials[J]. *J Molec Structure*, 2002, 616(1): 187 - 191.
- [9] Liu HM, Chen YH, Yan F, et al. Ultrasound molecular imaging of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression for endometrial receptivity evaluation[J]. *Theranostics*, 2015, 5(2): 206 - 217.
- [10] 吕震,俞渊,唐乾利,等. ABCB11 基因在胆石病中的作用及其研究进展[J]. *右江民族医学院学报*, 2015, 37(3): 493 - 495.
- [11] Stieger B. The role of the sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation[J]. *Handbook Exp Pharmacol*, 2011(201): 205 - 259.
- [12] Dijkers A, Tietge UJ. Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(45): 5936 - 5945.
- [13] Fickert P, Fuchs bichler A, Wagner M, et al. Regurgitation of bile adds from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis Mdr2 (Abcb4) knockout mice[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(1): 261 - 274.
- [14] 喻斌,阮鸣,张志芬,等. 大柴胡颗粒对胆色素结石豚鼠保护作用机制研究[J]. *中草药*, 2013, 44(10): 1309 - 1313.
- [15] Kong J, Liu BB, Wu SD, et al. Enhancement of interaction of BSEP and HAX-1 on the canalicular membrane of hepatocytes in a mouse model of cholesterol cholelithiasis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(4): 1644 - 1650.
- [16] 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.
- [17] 俞渊,唐乾利,黄欣,等. 大黄灵仙胶囊防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.
- [18] Zhan CZ, Zhang JX, Zang AL, et al. miR-221 and miR-222 target Puma to induce cell survival in glioblastoma[J]. *Molec Cancer*, 2010, 9(1): 229 - 236.
- [19] Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, et al. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(9): 1721 - 1734.