

升清胶囊对胆固醇结石小鼠胆固醇及肝脏 B 类清道夫受体的影响

李 炯¹ 陆 巍² 梁晓强³ 林天碧¹ 蒋海涛¹

摘要 **目的** 观察升清胶囊对胆固醇结石小鼠血清 TC、LDL-C、HDL-C 含量及肝脏 B 类清道夫受体—B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor B I, SRB I) 和 CD36 的影响。**方法** 将 80 只小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、西药组、中药组, 每组 20 只。正常组喂饲普通饲料, 其他 3 组喂饲致石饲料, 各给药组同时灌胃相应药物 [升清胶囊 0.35 g/(kg·d) 或熊去氧胆酸片 39.55 mg/(kg·d)] 7 周, 观察小鼠一般状态和成石率, 检测小鼠血清 TC、LDL-C、HDL-C 含量 (氧化酶法) 及肝脏 SRB I 和 CD36 蛋白表达 (免疫印迹法)。**结果** 正常组未形成结石, 模型组 15 只形成结石, 成石率为 75%。与正常组比较, 模型组小鼠血清 TC 与 LDL-C 含量及 SRB I、CD36 蛋白表达升高, HDL-C 含量降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 西药组和中药组成石率 [西药组: 7 只 (35%); 中药组: 6 只 (30%)] 降低 ($P < 0.05$), TC 与 LDL-C 含量及 SRB I、CD36 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), HDL-C 含量升高 ($P < 0.01$)。与西药组比较, 中药组 TC 含量及 SRB I、CD36 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** 升清胶囊可能通过降低肝脏 SRB I 和 CD36 防治胆囊结石。

关键词 升清胶囊; 胆固醇结石; 胆囊结石; B 类清道夫受体

Effect of Shengqing Capsule on Serum Cholesterol Content and Hepatic Scavenger Receptor Class B of Rats with Cholesterol Calculus LI Jiong¹, LU Wei², LIANG Xiao-qiang³, LIN Tian-bi¹, and JIANG Hai-tao¹ 1 Department of General Surgery, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai (200032); 2 Department of Emergency, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai (200032); 3 Institute of TCM Surgery, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Shengqing Capsule (SC) on serum contents of TC, LDL-C, and HDL-C, hepatic scavenger receptor B I (SRB I), and CD36 in rats with cholesterol calculus. **Methods** Totally 80 mice were divided into 4 groups according to random number table, i.e., the normal group, the model group, the Western medicine (WM) group, and the Chinese medicine (CM) group, 20 in each group. Mice in the normal group were fed with common forage, while mice in the other 3 groups were fed with lithogenic diet. Mice in the CM group and the WM group were fed with SC (at the daily dose of 0.35 g/kg) and Ursodeoxycholic Acid Tablet (UDCA, at the daily dose of 39.55 mg/kg) respectively for 7 weeks. The general condition and gallstone formation rate were observed. Serum contents of TC, LDL-C, and HDL-C, and protein expressions of SBR I and CD36 were detected by oxidase method and Western blot respectively. **Results** No gallbladder stone formed in the normal group, and gallstone formed in 15 mice of the model group with gallstone formation rate of 75%. Compared with the normal group, serum contents of TC and LDL-C and protein expressions of SRB I and CD36 increased, HDL-C content decreased in the model group ($P < 0.01$). The gallstone formation rate was 35% (7 mice)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173267); 上海市高级中西医结合人才培养项目 (No. ZYSN XD012-RC-ZXY007); 上海市自然科学基金资助项目 (No. 15ZR1441800); 海派中医顾氏外科流派建设项目 (No. ZYSN XD-CC-APGC-JD002); 第五批全国老中医药专家学术经验继承工作项目

作者单位: 1. 上海中医药大学附属龙华医院普外科 (上海 200032); 2. 上海中医药大学附属龙华医院急诊科 (上海 200032); 3. 上海中医药大学附属龙华医院中医外科研究所 (上海 200032)

通讯作者: 李 炯, Tel: 021-64385700 转 2222, E-mail: joe8989@sohu.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.11.1369

in the WM group and 30% (6 mice) in the CM group, lower than that of the model group (75%; $P < 0.05$). Contents of TC and LDL-C, and protein expressions of SRB I and CD36 decreased, HDL-C content increased in the WM group and the CM group ($P < 0.01$). Compared with the WM group, TC content and protein expressions of SRB I and CD36 decreased in the CM group ($P < 0.01$). Conclusion SC could prevent and treat gallbladder stone possibly through lowering expression levels of SRB I and CD36.

KEYWORDS Shengqing Capsule; cholesterol calculus; gallbladder stone; scavenger receptor class B

在全球范围内,胆囊结石是一种常见病、多发病、难治病,为肝胆系统主要和重要疾病,可以作为诱因导致胰腺炎、胆道恶性肿瘤等严重疾病的发生,对人类健康构成严重威胁。在我国与脂代谢异常相关的胆固醇结石的发病率明显上升,以胆固醇为主要成分的胆囊结石已成为我国胆石病发病的主要类型。参与胆固醇代谢的 B 类清道夫受体在胆囊结石生成中的作用已日益受到重视。本实验拟通过升清胶囊干预来研究其对胆囊胆固醇结石小鼠血清胆固醇含量及肝脏 B 类清道夫受体——B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor B I, SRB I) 和 CD36 的影响,及其在胆囊结石防治中的作用。

材料与方法

1 动物 SPF 级 C57 BL/6J 小鼠,雌性,10 周龄,体重(20 ± 2)g,共 80 只,由上海市斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号: SCKX(沪)2012-0002,合格证编号:2007000537867。饲养于上海中医药大学附属龙华医院 SPF 级动物房,室内温度 25°C ,相对湿度 35%,12/12 h 明暗周期。常规适应性喂养。

2 药物 升清胶囊:由生大黄、陈皮、虎杖组成,上海中医药大学龙华医院制剂室生产,0.3 g/粒,每粒胶囊含生药 1.77 g,批号:20120401。熊去氧胆酸片,50 mg/粒,上海三维长江生化制药厂生产,批号:20120402。

3 主要试剂及仪器 罗氏 Modular 全自动生化分析仪及配套试剂盒(ROCHE 公司,USA);内参(GAPDH)—抗(Boster 公司);HRP 抗鼠二抗(Jackson 公司,USA);LRH-1 一抗(Santa 公司,USA);PowerPac 通用电泳仪(Bio-Rad 公司,USA);Mini-PROTEANR Tetra 电泳槽(Bio-Rad 公司,USA);小型 Trans-Blot 转印槽(Bio-Rad 公司,USA);离心机飞鸽牌 TGL-16B(上海安亭科学仪器厂);隔水式恒温培养箱 GHP-9080(上海一恒科学仪器有限公司);超声波细胞破碎仪 JY88-II(宁波新芝超声设备有限公司);杜恩斯组织匀浆器(玻璃仪器经营部);振荡器 TS-1(海

门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

4 动物分组、造模及干预方法 将 80 只小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、西药组、中药组,每组 20 只。各组造模期间不限饮水、饮食。正常组喂饲普通饲料,模型组、西药组、中药组喂饲致石饲料,致石饲料配方^[1]为普通啮齿科饲料中加入 15% 脂肪(猪油)、1% 胆固醇和 0.5% 胆酸,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。各治疗组造模同时灌胃相应药物。药物以成人用药剂量按体表面积法换算,西药组熊去氧胆酸片用成人用药剂量 $[300 \text{ mg}/60 (\text{kg} \cdot \text{d})]$ 计算其标准剂量为 $39.55 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$;中药组升清胶囊以成人用药剂量 $[2.7 \text{ g}/60 (\text{kg} \cdot \text{d})]$ 计算其标准剂量为 $0.35 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[2]。模型组灌胃等量生理盐水,每日分 2 次灌胃,连续 7 周。期间每周称取体重 1 次,以调整给药剂量。

5 检测指标及方法 动物禁食 12 h,以 15% 乌拉坦($100 \text{ mg}/100 \text{ g}$)腹腔注射麻醉后,摘除眼球采血 1.5 mL,新洁尔灭酞消毒腹部皮肤后,打开腹腔,止血钳夹住胆囊管,肉眼观察胆汁中成石情况,然后迅速摘取胆囊和肝脏。迅速放于冰盘上,用 1 mL 皮试针筒穿刺胆囊抽取后收集胆汁。并于 4°C 预冷的生理盐水中洗去余血,置 -80°C 冰箱保存备测。此外,将采集到的血液在室温中静置 2 h 后, 4°C 4 000 r/min 离心 10 min,取血清置于 -80°C 冰箱内备测。

5.1 小鼠一般状态观察 观察干预期间小鼠饮食、体重、皮毛、反应能力、活动能力等一般状态。

5.2 小鼠胆囊成石率 肉眼可见胆囊有泥砂样或絮状沉淀,可视作胆囊结石生成。胆囊成石率(%) = 每组生成胆囊结石小鼠数/每组小鼠数 $\times 100\%$ 。胆囊结石经过采用溴化钾压片法红外光谱检测分析为胆固醇型结石。

5.3 TC、LDL-C、HDL-C 检测 取血清,采用氧化酶法测定小鼠血清 TC、LDL-C、HDL-C。

5.4 SRB I、CD36 蛋白表达检测 取血清,采用免疫印迹法测定小鼠肝脏 SRB I、CD36 蛋白表达。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般状态比较 正常组小鼠体重自然增加,反应灵活,活动敏捷,皮光泽,毛紧贴皮肤,密集,鼻、唇湿润干净,眼睛明亮,大小便正常。模型组小鼠饮食减少,生长缓慢,毛蓬松、干枯,且有脱落,活动迟缓,反应迟钝。与模型组比较,西药组和中药组小鼠体重和营养状况、行为学表现等方面改善,但仍未能达到正常组水平。实验过程中未发生动物死亡。

2 各组小鼠胆囊成石率比较 模型组 15 只形成胆固醇结石,成石率为 75%。而正常组没有形成结石。两组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,西药组和中药组成石率[西药组:7 只(35%);中药组:6 只(30%)]降低($P < 0.05$)。

3 各组小鼠血清 TC、LDL-C、HDL-C 比较(表 1) 与正常组比较,模型组小鼠血清 TC 与 LDL-C 含量升高,而 HDL-C 含量降低($P < 0.01$)。与模型组比较,西药组和中药组 TC 与 LDL-C 含量降低($P < 0.01$),HDL-C 含量升高($P < 0.01$)。与西药组比较,中药组 TC 含量降低($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠血清 TC、LDL-C 和 HDL-C 含量比较
(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC	LDL-C	HDL-C
正常	20	2.13 ± 0.26 *	1.76 ± 0.21 *	1.73 ± 0.19 *
模型	20	3.27 ± 0.32	2.59 ± 0.23	1.07 ± 0.32 *
西药	20	2.46 ± 0.27 *	1.90 ± 0.16 *	1.84 ± 0.18
中药	20	2.17 ± 0.32 * [△]	1.81 ± 0.19 *	1.72 ± 0.26 *

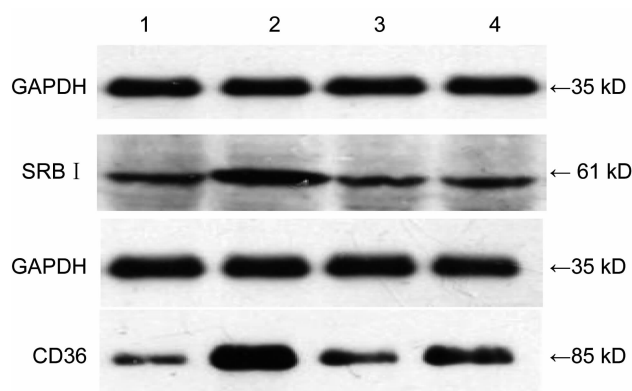
注:与模型组比较, * $P < 0.01$;与西药组比较, [△] $P < 0.01$

4 各组小鼠肝脏 SRB I、CD36 蛋白表达比较(表 2,图 1) 与正常组比较,模型组 SRB I、CD36 蛋白表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,西药组和中药组小鼠肝脏 SRB I、CD36 蛋白表达均降低($P < 0.01$)。与西药组比较,中药组 SRB I、CD36 蛋白表达降低($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠肝脏 SRB I、CD36 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SRB I	CD36
正常	3	0.305 ± 0.010 *	0.158 ± 0.025 *
模型	3	0.807 ± 0.020	1.460 ± 0.085
西药	3	0.317 ± 0.008 *	0.877 ± 0.106 *
中药	3	0.231 ± 0.011 * [△]	0.313 ± 0.018 * [△]

注:与模型组比较, * $P < 0.01$;与西药组比较, [△] $P < 0.01$



注:1 为正常组;2 为模型组;3 为中药组;4 为西药组

图 1 各组小鼠肝脏 SRB I、CD36 蛋白表达

讨 论

胆结石形成的病理机制迄今虽未完全明了,但研究表明,导致胆囊胆固醇结石的成因包括:胆汁胆固醇过饱和、胆囊功能异常、胆固醇成核过程异常和肠道胆固醇来源增多四个方面^[3]。胆囊胆固醇结石形成的先决条件是胆汁中胆固醇的非生理性过饱和。

肝脏作为机体进行胆固醇代谢的重要脏器,是胆固醇合成、酯化以及清除的重要组织,从血浆脂蛋白中获取胆固醇及分泌胆固醇入血,是引起胆汁胆固醇过饱和、胆囊胆固醇结石形成的首要条件。

B 类清道夫受体参与调节脂质代谢,包括 TC 与 HDL-C 的代谢。B 类清道夫受体包括 SRB I 和 CD36 两种亚型。SRB I 是一种位于细胞表面的糖蛋白,与 CD36 均属于多配体结合受体,为 HDL-C 的唯一受体,能够直接与多种蛋白质和脂质发生作用参与介导高密度脂蛋白、胆固醇的选择性摄取和胆固醇的逆向转运^[4,5]。研究表明 SRB I 基因在胆囊胆固醇结石形成过程中起着重要的作用^[6]。SRB I 参与肝细胞获取血清中 HDL-C,并且是胆汁中胆固醇的重要来源。SRB I 是促进胆固醇分泌入胆汁的作用因素之一,有实验表明 SRB I 基因剔除小鼠中胆固醇的分泌会有部分减少^[7]。有临床试验发现胆囊胆固醇结石患者的肝脏 SRB I mRNA 表达升高,提示 SRB I 可能参与了胆汁胆固醇过饱和过程,并且促进了胆囊胆固醇结石的产生^[8]。另有实验证实,在小鼠肝脏中 SRB I 的表达下调或过度表达分别会引起肝脏摄取 HDL-C 的明显减低和增加^[9]。陈玉杰等^[10]通过临床试验,认为肝脏 SRB I 过度表达可能与胆汁胆固醇过饱和有关,是胆固醇结石病的重要遗传因素。另有李阳等^[11]过采用基因芯片方法评价胆石病 C57 小鼠肝脏基因表达情况,结果发现 CD36 在胆囊胆固醇结石模

型组中出现高表达,提示 CD36 在肝脏的高表达与胆囊胆固醇结石的产生有着密切的关系。

龙华医院胆道专家朱培庭教授认为胆石病的治疗必须尊崇“从肝论治”原则,才能做到正本清源,并在此基础上提出了“胆病从肝论治”的治疗胆石病学术思想。基于“胆病从肝论治”理论及病机的中药新药,疏肝利胆法代表药物升清胶囊(国药证字 Z20030053,曾用名胆石净胶囊、清胆胶囊)经实验和临床验证有较好的防治胆石病的作用。该药由大黄、陈皮和虎杖组成,共奏疏肝解郁、利胆通腑之功效,主治肝胆气郁型的胆石病。前期系列研究显示,升清胶囊具有降低胆囊内胆汁黏度、修复胆囊收缩功能以及影响胆囊结石形成相关基因表达和胃肠激素及其受体水平的效果,并具有逆转异常变化的肝细胞超微结构、减轻肝细胞变性以及加速肝细胞再生等作用^[12-14]。

本研究结果提示升清胶囊对胆囊胆固醇结石的防治作用可能表现在其影响自身的胆固醇代谢,从而降低胆汁和血清内的胆固醇含量,同时使胆汁中胆固醇的非生理性过饱和的发生率下降,减少胆石的形成。

本研究肉眼观察胆囊成石情况,结果提示造模成功,通过高胆固醇饮食干预引起 C57 BL/6J 小鼠的胆固醇结石模型造模方法是可靠的。模型组小鼠肝脏 SRB I 和 CD36 蛋白含量表达均升高($P < 0.01$),结合各组小鼠血清胆固醇含量,推测肝脏 SRB I 和 CD36 表达增加,从而使胆囊胆固醇结石小鼠血清胆固醇含量增加,增加了胆囊结石形成的几率。经过升清胶囊的治疗后,小鼠肝脏 SRB I 和 CD36 蛋白含量表达均出现下降,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),表明升清胶囊具有防治胆石病的作用,其可能通过降低肝脏 SRB I 和 CD36 的表达,从而降低血清胆固醇含量,降低胆汁中胆固醇浓度,发挥其防治胆石病的作用。

本实验是探明胆固醇结石的发病机理以及升清胶囊的作用机理大量研究工作中的一部分,初步提示升清胶囊可能通过降低肝脏 SRB I 和 CD36 的表达来发挥其防治胆石病的作用,但具体如何影响肝脏 SRB I 和 CD36 的表达及其中可能起作用的成分尚有待进一步观察。本次实验只是提供一些基础和提示,望能为中医药防治胆囊胆固醇结石提供更客观的、更科学的依据。

参 考 文 献

[1] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified

diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet [J]. J Nutr, 1993, 123(11): 1939-1951.

[2] 陈奇主编. 中药药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1994: 264.

[3] Wang HH, Portincasa P, Wang DQ. Molecular pathophysiology and physical chemistry of cholesterol gallstones [J]. Front Biosci, 2008, 13(4): 401-423.

[4] Acton S, Rigotti A, Landsehlz KT, et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor [J]. Science, 1996, 271(5248): 518-520.

[5] Arai T, Wang N, Bezouevski M, et al. Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene [J]. J Biol Chem, 1999, 274(4): 2366-2371.

[6] 韩天权. 胆石病人肠肝循环途径脂质代谢异常的分子生物学研究进展[J]. 中华肝胆外科杂志, 2008, 14(4): 219-220.

[7] Mardones P, Quiñones V, Amigo L, et al. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I deficient mice [J]. Lipid Res, 2001, 42(2): 170-180.

[8] 胡海, 所广军, 杨士勇, 等. 胆固醇结石病人肝脏 SRBI 及其转录调节因子 LRH-1 基因表达的研究[J]. 外科理论与实践, 2006, 11(4): 333-336.

[9] Parhofer KG. Beyond LDL-cholesterol: HDL-cholesterol as a target for atherosclerosis prevention [J]. Exp Clin End Diab, 2005, 113(8): 414-417.

[10] 陈玉杰, 张明威, 陈国斌. 胆固醇结石与肝脏 SRBI 基因表达关系的探讨[J]. 当代医学, 2010, 16(4): 195.

[11] 李阳, 梁晓强, 张静喆, 等. 清胆胶囊对胆石病 C57 小鼠肝脏基因表达谱的影响[J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(5): 78-81, 86.

[12] 张静喆, 梁晓强, 顾宏刚, 等. 不同治则中药对胆囊胆固醇结石小鼠模型的成石影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2009, 15(3): 291-294.

[13] 梁晓强, 顾宏刚, 章学林, 等. 清胆胶囊对豚鼠胆色素结石模型的生化影响[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(10): 1607-1608.

[14] 朱培庭, 张静喆, 章学林. 升清胶囊对豚鼠胆石病相关基因的影响[J]. 中西医结合学报, 2005, 3(3): 207-210.

(收稿:2014-03-17 修回:2016-07-19)