

· 基础研究 ·

大黄灵仙胶囊对胆结石小鼠模型法尼醇 X 受体的影响

卓臣义¹ 包崇婵² 冯 时² 姜 艳³ 周 洋² 唐乾利⁴

摘要 **目的** 探究大黄灵仙胶囊对胆结石小鼠模型法尼醇 X 受体 (FXR) 基因转录及其蛋白表达的影响。**方法** 将 60 只成年 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为 5 组: 空白对照组 (P 组)、致石组 (Z 组)、注水组 (W 组)、熊去氧胆酸胶囊组 (U 组)、大黄灵仙胶囊组 (D 组), 每组 12 只。采用高脂、高热量、高胆固醇饲料喂养诱导方法造模创建胆结石模型, 造模过程当中 U、D 组分别予 130 g/kg 熊去氧胆酸胶囊干粉溶液、13 g/kg 大黄灵仙胶囊干粉溶液每日灌胃, 持续 8 周, W 组予同体积生理盐水持续 8 周每日灌胃。运用蛋白免疫印迹法 (Western Blot)、实时聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法检测各组肝胆管侧膜细胞胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1)、固醇 12 α -羟化酶 (CYP8B1)、小分子异源二聚体伴侣 (SHP)、肝脏受体同系物 -1 (LRH-1)、胆汁酸盐输出泵基因 (BSEP)、钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白 (NTCPmRNA) 转录水平及其蛋白表达变化情况。**结果** (1) 造模情况: Z、W 组小鼠及其他组胆管内可见颗粒样结石形成或泥沙样结石, 可见胆总管扩张及胆管内泥沙样沉淀物, 而 D、U 组胆管内胆汁呈淡黄色, 清澈透亮, 胆总管解剖清晰, 无扩张及结石形成。(2) 基因表达情况: 与 W 组比较, D、U 组 CYP7A1、CYP8B1、BSEP、NTCPmRNA 及蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), SHP、LRH-1mRNA 及蛋白表达水平降低 ($P<0.05$); 与 U 组作比较, D 组各因子蛋白及 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 大黄灵仙胶囊可以调控上游转录因子核受体 FXR 信号通路, 激活 FXR-CYP7A1/CYP8B1、FXR-BSEP/NTCP 受体系统, 减少肝细胞的“病理性胆汁”分泌, 从而预防胆结石的形成。

关键词 胆结石; 大黄灵仙胶囊; 法尼醇 X 受体

Effect of Dahuang Lingxian Capsule on Farnesol X Receptor in Gallstone Mouse Model

ZHUO Chen-yi¹, BAO Chong-chan², FENG Shi², JIANG Yan³, ZHOU Yang², and TANG Qian-li⁴

1 Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi (533000); 2 Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi (533000); 3 Key Laboratory of High Incidence Disease Control in Western Guangxi, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi (533000); 4 Center of Hepatobiliary Surgery, Guangxi Clinical Research Center for Hepatobiliary Diseases, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi (533000)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Dahuang Lingxian Capsule (DHLXC) on farnesol X receptor (FXR) gene transcription and protein expression in gallstone mouse model. **Methods** Totally 60 SPF male C57BL/6 mice were randomly divided into 5 groups: blank control group (Group P), lithogenic group (Group Z), water injection group (Group W), ursodeoxycholic acid capsule group (Group U), DHLXC group (Group D), 12 mice in each group. The gallstone model was established by feeding high-fat, high calorie, and high cholesterol diet. During the modeling process, mice in group U and group D were daily administered with 130 g/kg ursodeoxycholic acid capsule dry powder solution and 13 g/kg DHLXC dry powder solution by gastrogavage for 8 successive weeks. Mice in group W were daily administered with the same volume of physiological saline by

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81860851); 广西自然科学基金重点项目 (No. 2018JJD140040); 2017 年广西重点研发计划项目 (No. 桂科 AB17195071); 2017 年广西科技基地和人才专项 (No. 桂科 AD17129025)

作者单位: 1. 右江民族医学院附属医院肝胆外科 (广西 533000); 2. 右江民族医学院研究生学院 (广西 533000); 3. 右江民族医学院桂西高发防治重点实验室 (广西 533000); 4. 右江民族医学院广西肝胆疾病临床医学研究中心 (广西 533000)

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

DOI: 10.7661/j.cjim.20210321.150

gastrogavage for 8 Successive weeks. Western Blot and RT-PCR were used to detect the transcription and protein expressions of cholesterol 7 α hydroxylase (CYP7A1), sterol 12 α hydroxylase (CYP8B1), small heterodimer partner (SHP), liver receptor homolog-1 (LRH-1), bile salt export pump (BSEP), and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) mRNA. **Results** (1) Modeling: granular stone formation or sand like stone formation, common bile duct dilatation and sand like sediment in gallbladder were found in mice of Z, W, and other groups, while bile juice in gallbladder of D and U groups was light yellow, clear and transparent. Common bile duct anatomy was clear, with no dilatation or stone formation. (2) Gene expression: compared with group W, the mRNA and protein expression levels of CYP7A1, CYP8B1, BSEP and NTCP in group D and U significantly increased ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression levels of SHP and LRH-1 decreased ($P < 0.05$). Compared with group U, the protein and mRNA expression levels of each factor in group D had no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** DHLXC regulated the upstream transcription factor nuclear receptor FXR signaling pathway, activated FXR-CYP7A1/CYP8B1, FXR-BSEP/NTCP receptor system, reduced the "pathological bile" secretion of hepatocytes, so as to prevent the formation of gallstones.

KEYWORDS gallstone; Dahuang Lingxian Capsule; farnesol X receptor

近年来胆石病发病率呈现出上升趋势^[1],其病因尚未完全明确,一般认为胆道感染、胆汁中胆固醇—胆汁酸平衡紊乱、人体肠—肝轴结构破坏和(或)功能紊乱、胆囊运动功能的异常、机体代谢功能失衡以及雌激素的影响相关^[2]。临床治疗以手术治疗方式为主,但是手术取石并不是最终的解决方案,因术后残石率、复发率较高^[3],可能出现手术并发症^[4]。寻求其他有效的治疗方案是必需的。

有研究表明,大黄灵仙胶囊能够有效防治胆结石^[5-8]。有大量的临床及实验研究表明大黄灵仙胶囊通过改善小鼠肝胆管侧壁细胞转运蛋白水平表达而降低胆结石的形成,同时可以修复受损肝细胞,改善兔胆石症的肝功能,使组织肝纤维化减缓^[9, 10]。已有研究发现,法尼醇 X 受体(farnesol X receptor, FXR)具有调节胆汁酸形成,进而影响胆结石的形成^[11]。大黄灵仙胶囊是否能够通过干预小鼠胆石病模型调控上游转录因子核受体 FXR,减少肝细胞“病理性胆汁”分泌机制尚未清楚。

本实验拟通过创建胆结石模型,观察小鼠肝胆管侧膜细胞胆固醇 7 α -羟化酶(cholesterol 7 α hydroxylase, CYP7A1)、胆固醇 12 α -羟化酶(sterol 12 α -hydroxylase, CYP8B1)、小分子异源二聚体伴侣(small heterodimer partner, SHP)、肝脏受体同系物-1(liver receptor homolog 1, LRH-1)、胆汁酸盐输出泵基因(bile salt export pump, BSEP)、钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP) mRNA 转录水平及其蛋白表达变化情况,观察大黄灵仙胶囊后对其影响,现报告如下。

材料与方法

1 动物 健康 5 周龄左右 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 60 只,体重(18 ± 2)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物许可证号:SCXKD(湘)2014-0011。饲养的 SPF 级实验室环境的湿度 $60\% \pm 10\%$,动物房里面的气温处于(25 ± 2)℃之间,室内空气流通保持良好,卫生消毒条件均达标。右江民族医学院动物伦理委员会对本研究动物实验部分进行相应核查并通过审批(No. 20181103007)。

2 药物 大黄灵仙胶囊由广西中医药大学第一附属医院中心药房提供,由生大黄 150 g 威灵仙 300 g 芒硝 100 g 金钱草 300 g 枳壳 120 g 鸡内金 100 g 泽兰 150 g 柴胡 120 g 郁金 120 g 磁石 120 g 黄芪 300 g 甘草 50 g 组成,并按照广西壮族自治区药品监督管理局文件批准的医院内制剂制作等量胶囊。熊去氧胆酸胶囊每粒 0.25 g,由德国霍克公司出产(生产批号: L19215A)。两药按给药剂量使用生理盐水配制成干粉溶液予灌胃使用。

3 主要试剂 Trizol(美国 Invitrogen 公司,货号: 15596-026); HiFiScriptT 快速去除基因组 cDNA 第一条链合成试剂盒和荧光定量试剂盒(北京康为试剂公司,货号: CW2582M, CW0957H); RIPA 裂解液(北京索来宝公司,货号: R0020); Anti-CYP7A1 抗体和 Anti-CYP8B1 抗体(北京 BLOSS 公司,货号: bs-21429R, bs-14165R); Anti-NR5A2 抗体、Anti-SHP-1 抗体和 ECL 发光试剂盒(美国 Affinity 公司,货号: DF8470, AF6244, KF001); Anti-BSEP 抗体和 Anti-NTCP 抗体(美国 Thermo Fisher 公司,

货号: PA5-78690, PA5-80001); β -actin 抗体、山羊抗兔的二抗、山羊抗兔的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: TA-09, ZB2301, ZB2305)。

4 主要仪器 -80℃超低温冰箱(青岛海尔公司); THZ-C 恒温振荡摇床(苏州培英公司); Purelabultra 型超纯水仪(美国 Elga 公司); 全系列移液枪和生物分光光度计(德国 Eppendorf 公司); 迷你转印电泳槽型、CFX Connect™ 荧光定量仪和半干转膜仪系统(美国 Bio-Rad 公司); 荧光定量 PCR 仪(美国罗氏公司); 多功能化学发光成像系统、全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能公司); 万向脱色摇床(海门其林贝尔公司)。

5 方法

5.1 分组方法 将健康 SPF 级雄性小鼠 60 只按数字随机表法随机均分为 5 组: 空白对照组(简称 P 组)、致石组(即模型组, 简称 Z 组)、注水组(简称 W 组)、熊去氧胆酸胶囊组(简称 U 组)、大黄灵仙胶囊组(简称 D 组), 每组 12 只。

5.2 造模及给药方法 造模参照参考文献[12]方法, 通过给予致石饲料[高脂、高热量、高胆固醇(15% 脂肪、1.5% 胆固醇、0.5% 胆酸)]喂养建立 C57BL/6 小鼠胆结石模型, 并在造模过程中予以相应药物灌胃干预。药物剂量按照小鼠与成人体重等效剂量换算^[13-15]。W 组给予相同体积的生理盐水灌胃; U 组每天给予 130 mg/kg 熊去氧胆酸胶囊(即成人用量的 13 倍, 使用生理盐水配制成干粉溶液)溶液灌胃, 给药 8 周; D 组每天给予 13 g/kg 大黄灵仙胶囊(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 的溶液)溶液灌胃, 给药 8 周; 造模期间各组正常饮水(造模过程中 W 组小鼠由于灌胃操作不当, 造成 1 只小鼠死亡, 怀疑灌入气管)。

5.3 标本取材 喂养 8 周后, 分别将各组小鼠用 5% 水合氯醛(0.1 mL/10 g)麻醉后取小鼠肝脏及胆囊, 观察胆囊及胆总管情况, 并留胆囊观察造模情况, Z、W 组小鼠胆囊内发现结石形成则提示造模成功; 取小鼠肝脏组织 0.3 cm × 0.3 cm × 0.2 cm 存放于 -80℃冰箱用于实时聚合酶链式反应(real-time PCR, RT-PCR)、蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测相关因子 mRNA 转录水平及蛋白表达水平变化。

5.4 观察指标及检测方法

5.4.1 mRNA 转录水平检测 应用 RT-PCR 技术检测各组小鼠肝胆管侧膜细胞 CYP7A1、CYP8B1、SHP、LRH-1、BSEP、NTCP mRNA 转录水平。引物设计见表 1。

表 1 目的基因引物序列

基因名称	引物序列	引物长度 (bp)
CYP7A1	上游 5'-AAACTCCCTGTCATACCACAAAG-3' 下游 5'-TTTCCATCACTTGGGTCTATGC-3'	120
CYP8B1	上游 5'-CACGGGGATGTCTTCACGG-3' 下游 5'-TGAGCACCAGTTCTTTTGCATAG-3'	136
SHP	上游 5'-TGGGTCCCAAGGAGTATGC-3' 下游 5'-GCTCCAAGACTTCACACAGTG-3'	132
LRH-1	上游 5'-TGTGTGGCGATAAAGTGTCTG-3' 下游 5'-TCGACAGTAGGGACATCGTTT-3'	164
BSEP	上游 5'-CTGGCATCTACGCAGGAGTT-3' 下游 5'-TGACGAGCCCCAGTGATTAC-3'	85
NTCP	上游 5'-ATTGTGATGCCACCTGCTCC-3' 下游 5'-CTCCGTCGTATTCTTGC-3'	88
β -actin	上游 5'-GGCACCACACCTTCTAC-3' 下游 5'-CTGGGTCATCTTTTCAC-3'	107

利用 Trizol 提取小鼠肝胆管侧膜细胞中总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶完成电泳, 以检测 RNA 的完整性。检测后使用 TIANScript RT KIT 完成反转录, 实验操作严格按照产品说明书进行。分别用内参基因引物和目的基因引物进行扩增。反应体系总体积为 20 μ L, 程序为反应液在 95℃下预变性 15 min, 1 个循环, 95℃下变性 10 s, 58℃退火 30 s 后在 72℃延伸 30 s, 40 个循环。同时在 60~90℃进行溶解曲线分析。以 P 组为对样本组, 用荧光定量 PCR 仪, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据的相对定量分析。

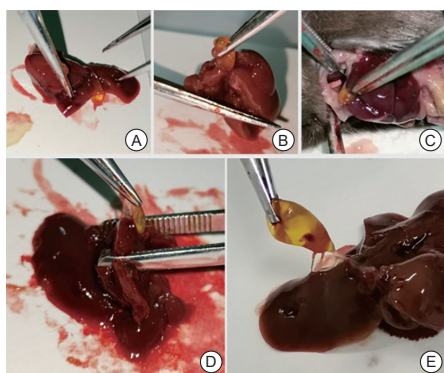
5.4.2 蛋白表达水平检测 采用 Western Blot 法检测造模后各组小鼠肝胆管侧膜细胞 CYP7A1、CYP8B1、SHP、LRH-1、BSEP、NTCP 的蛋白表达水平。用 RIPA 强效组织裂解液提取小鼠肝脏组织总蛋白; 应用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度; 通过组织裂解液将各组蛋白进行配平, 取同样体积的样品加到 4× 蛋白质上样缓冲液, 缓慢混合, 沸水煮沸 5 min, 室温平衡; 将样品准确的加至制备好的凝胶孔中, 电泳(80 V, 30 min, 120 V, 1 h), 转膜(250 mA, 60 min); 常温封闭 2 h; 一抗孵育, 4℃过夜; 洗膜; 孵育二抗, 室温 60 min; 洗膜; 化学发光; 采用 Image J 软件对条带进行灰度值测定、分析。

5.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。造模结石情况为计数资料以 χ^2 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 依据方差齐和不齐时分别使用 LSD 法和 Games-Howell 法进行两组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠结石形成情况比较(图 1、2) P 组:

小鼠无胆囊结石形成,无肝内外胆管结石形成,胆总管未见扩张;Z、W 组:小鼠胆囊内可见颗粒样结石形成或泥沙样结石,胆总管扩张及胆管内泥沙样沉淀物;D、U 组:胆囊内胆汁呈淡黄色,清澈透亮,胆总管解剖清晰,无扩张及结石形成(图 1),不仅如此,所有致石饲料喂养的小鼠胆囊直径大于 P 组(图 2)。P 组小鼠无胆囊结石形成;Z 组有 11 只小鼠形成胆囊结石,成石率为 91.7% (11/12);W 组在造模过程中死亡 1 只小鼠,有 10 只小鼠形成胆囊结石,成石率为 90.9% (10/12);U 组有 2 只小鼠形成胆囊结石,成石率为 16.7% (2/12);D 组有 3 只小鼠形成胆囊结石,成石率为 25.0% (3/12)。统计学分析



注: A 为 P 组肝脏及胆囊; B 为 Z 组胆囊及肝脏; C 为 W 组肝脏及胆囊; D 为 U 组肝脏及胆囊; E 为 D 组肝脏及胆囊; 图 2 同

图 1 各组小鼠胆囊结石形成情况

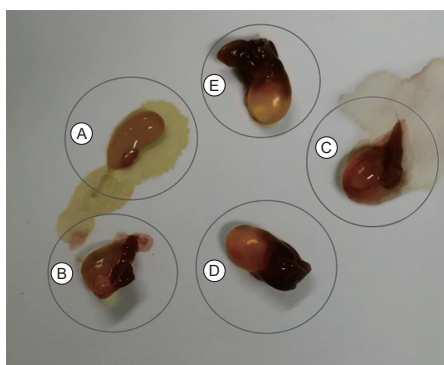
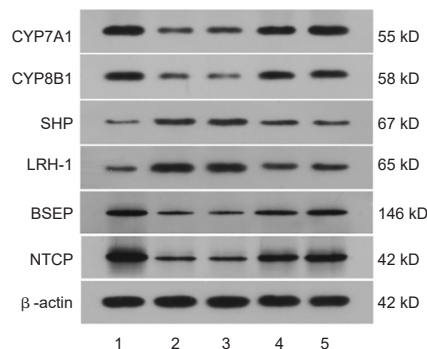


图 2 各组小鼠胆囊

发现,与 P 组比较,通过确切概率法分析,Z 组差异有统计学意义 ($P<0.01$),造模成功;与 W 组比较,D 组差异亦有统计学意义 ($P<0.01$)。

2 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 CYP7A1、CYP8B1、SHP、LRH-1、BSEP、NTCP mRNA 水平比较(表 2) 与 P 组比较,Z、W 组的 CYP7A1、CYP8B1、BSEP、NTCP mRNA 表达水平均明显降低,SH P、LRH-1 mRNA 表达水平明显升高,差异均有统计学意义 ($P<0.01$);与 W 组比较,U、D 组的 CYP7A1、CYP8B1、BSEP、NTCP mRNA 表达水平均明显升高,SH P、LRH-1 mRNA 表达水平明显降低,差异均有统计学意义 ($P<0.01$);与 U 组比较,D 组的 6 个基因 mRNA 表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 CYP7A1、CYP8B1、SHP、LRH-1、BSEP、NTCP 蛋白表达水平比较(表 3, 图 3) 与 P 组比较,Z、W 组 BSEP、NTCP、CYP7A1、CYP8B1 蛋白表达量均明显降低,SH P、LRH-1 蛋白表达量均明显升高,差异均有统计学意义 ($P<0.01$);造模 8 周后,与 W 组比较,U、D 组 BSEP、NTCP、CYP7A1、CYP8B1 蛋白表达量均明显高于 W 组;SH P、LRH-1 蛋白表达量均明显低于 W 组,差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。



注: 1 为 P 组; 2 为 Z 组; 3 为 W 组; 4 为 U 组; 5 为 D 组

图 3 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 CYP7A1、CYP8B1、SHP、LRH-1、BSEP、NTCP 蛋白电泳图

表 2 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 BSEP、NTCP、CYP7A1、CYP8B1、SHP、LRH-1 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BSEP	NTCP	CYP7A1	CYP8B1	SHP	LRH-1
P	12	0.975 ± 0.104	0.990 ± 0.097	0.990 ± 0.090	1.006 ± 0.091	0.984 ± 0.052	1.073 ± 0.134
Z	12	0.197 ± 0.018*	0.147 ± 0.016*	0.107 ± 0.024*	0.121 ± 0.013*	9.756 ± 0.663*	6.348 ± 0.550*
W	11	0.194 ± 0.068*	0.141 ± 0.047*	0.132 ± 0.031*	0.141 ± 0.050*	8.575 ± 1.072*	5.868 ± 0.812*
U	12	0.629 ± 0.100 [△]	0.590 ± 0.111 [△]	0.483 ± 0.087 [△]	0.719 ± 0.111 [△]	3.343 ± 0.905 [△]	2.421 ± 0.550 [△]
D	12	0.620 ± 0.119 [△]	0.571 ± 0.084 [△]	0.464 ± 0.065 [△]	0.656 ± 0.102 [△]	3.510 ± 0.885 [△]	2.854 ± 0.528 [△]

注: 与 P 组比较, * $P<0.01$; 与 W 组比较, [△] $P<0.01$

表 3 各组小鼠肝胆管侧膜细胞 BSEP、NTCP、CYP7A1、CYP8B1、SHP、LRH-1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BSEP	NTCP	CYP7A1	CYP8B1	SHP	LRH-1
P	12	0.295 ± 0.013	0.607 ± 0.024	0.736 ± 0.046	0.556 ± 0.065	0.036 ± 0.013	0.116 ± 0.011
Z	12	0.085 ± 0.012*	0.131 ± 0.013*	0.141 ± 0.019*	0.099 ± 0.025*	0.211 ± 0.019*	0.661 ± 0.027*
W	11	0.080 ± 0.015*	0.117 ± 0.038*	0.144 ± 0.017*	0.091 ± 0.013*	0.193 ± 0.014*	0.626 ± 0.065*
U	12	0.240 ± 0.057 [△]	0.360 ± 0.064 [△]	0.666 ± 0.124 [△]	0.449 ± 0.156 [△]	0.084 ± 0.027 [△]	0.187 ± 0.099 [△]
D	12	0.233 ± 0.073 [△]	0.321 ± 0.069 [△]	0.521 ± 0.117 [△]	0.408 ± 0.028 [△]	0.115 ± 0.018 [△]	0.185 ± 0.071 [△]

注:与 P 组比较, * $P < 0.01$; 与 W 组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

讨 论

大黄灵仙胶囊出自老中医石补天经验方,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,又有理气祛瘀之效;金钱草、威灵仙配合鸡内金、磁石具有排石良效;黄芪、甘草则补气解毒。全方具有疏肝利胆、利尿排石的功效^[5]。

本研究发现,大黄灵仙胶囊组胆管内胆汁呈淡黄色,清澈透亮,胆总管解剖清晰,无扩张及结石形成,说明大黄灵仙胶囊能有效的预防胆结石形成。课题组在前期研究^[16]中对小鼠的血液生化指标及胆汁、胆结石的成分进行了详细分析,由于造模方式一致,为重复性实验,故本实验设计未再次进行复述,重点从分子方面对大黄灵仙胶囊防治胆结石的机制进行研究。

胆石病的致病因素复杂,胆汁淤积,胆汁酸盐等毒性物质潴留,即“病理性胆汁”的形成,导致胆汁代谢异常,从而形成结石。FXR 最先被发现是胆汁酸生理功能相关内源性配体的核受体,激活 FXR 可抑制胆汁酸合成,增加胆汁酸结合、转运和排泄,从而保护肝脏免受胆汁积聚的有害影响^[17]。

FXR 是 FXR-CYP7A1/CYP8B1 受体系统的上游调控受体,其激活后可诱导 SHP 的表达,而 SHP 是调节胆固醇代谢和胆汁酸生成的关键靶点,其对胆汁酸经典合成途径的限速酶 CYP7A1 具有反向调控作用,而 LRH-1 为 CYP7A1 激活的必需启动子^[18, 19]。在肝脏中 FXR 通过诱导 SHP 抑制 CYP7A1, FXR 的结合位点不在 CYP7A1 的启动子上,它是通过诱导一种特殊的孤儿受体 SHP 起作用的。SHP 是核受体家族中的一个比较特殊的受体,缺乏 DNA 结合区,并没有传统意义上的受体功能,主要在多个核受体信号途径中起到抑制作用,通过抑制 DNA 结合和转录发挥调节作用^[20, 21]。SHP 抑制反式激活的 LRH-1 活性抑制 CYP7A1 的转录。当 SHP 蛋白表达上调激活时,与 LRH-1 结合成异源二聚体,并使 LRH-1 失活,而 LRH-1 可以正调控 CYP7A1 的表达,因此

SHP-LRH-1 信号通路的激活可以抑制胆汁酸合成限速酶的生成,进而抑制胆汁酸的合成,造成胆汁淤积^[22]。本实验结果表明大黄灵仙胶囊调控 FXR 受体,稳定小鼠肝胆管侧壁细胞的 SHP、LRH-1、CYP7A1、CYP8B1 mRNA 及蛋白表达水平,避免胆汁淤积,从而减少胆结石的发生。

在近年的研究中表明,在 FXR-BSEP/NTCP 受体系统中,在 FXR 受体的作用下 BSEP 及 NTCP 参与调控胆汁的形成与分泌^[23]。在本研究中表明,大黄灵仙胶囊有效的稳定小鼠肝胆管侧壁细胞的 BSEP、NTCP mRNA 及蛋白表达,增加胆盐的分泌,随着胆汁流量增多加强了胆汁的冲刷作用,降低了胆固醇结石形成的几率。

综上所述,推断大黄灵仙胶囊可以通过干预小鼠模型调控上游转录因子核受体 FXR,激活 FXR-CYP7A1/CYP8B1、FXR-BSEP/NTCP 受体系统,稳定小鼠肝胆管侧膜细胞 CYP7A1、CYP8B1、SHP、LRH-1、BSEP、NTCP mRNA 转录水平及其蛋白表达,减少肝细胞病理性胆汁的形成,从而预防胆结石形成。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 王云超,张维璐,王新华.我国胆石病相关危险因素概述[J].中华老年多器官疾病杂志,2018,17(8):636-640.
- [2] 周洋,卓臣义,唐乾利.胆囊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):89-92.
- [3] Hua J, Meng HB, Yao L, et al. Five hundred consecutive laparoscopic common bile duct explorations: 5-year experience at a single institution[J]. Surg Endoscopy, 2017, 31(9): 3581-3589.
- [4] Siiki A, Laukkarinen J. Can we prevent post-ERCP pancreatitis?[J]. Duodecim, 2017, 133(3):

- 267–274.
- [5] 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.
- [6] Tang Q, Guan Z, Gao S, et al. Clinical study on Dahuang Lingxian Decoction against postoperative recurrence of cholelithiasis [J]. *Global J Health Sci*, 2009, 1 (1): 23.
- [7] 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 CYP7A1mRNA 表达的影响 [J]. 中医杂志, 2010, 41 (9): 837–839.
- [8] 黄名威, 唐乾利, 赫军, 等. 豚鼠胆汁酸盐输出泵 (BSEP) 基因克隆及其在胆结石豚鼠肝组织中的表达分析 [J]. 基础医学与临床, 2010, 30 (7): 673–676.
- [9] 唐乾利, 吕震, 王兵, 等. 大黄灵仙胶囊调控 ABCB11 和 ABCG2 干预胆结石形成的作用机制研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47 (1): 4–6+10.
- [10] 唐乾利, 王兵, 俞渊, 等. 大黄灵仙颗粒对慢性肝纤维化胆石病兔干预作用 [J]. 武汉大学学报 (医学版), 2017, 38 (1): 6–10.
- [11] Li J, Li T. Bile acid receptors link nutrient sensing to metabolic regulation [J]. *Liver Res*, 2017, 1 (1): 17–25.
- [12] 邹移海主编. 中医实验动物学 [M]. 广州: 暨南大学出版社, 1999: 131.
- [13] 徐叔云主编. 临床药理学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 207.
- [14] 黄名威, 唐乾利, 伍松合, 等. 胆通胶囊预防色素性结石形成的机制研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2005, 13 (4): 248–250.
- [15] 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.
- [16] 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]. 医学研究学报, 2016, 29 (6): 577–581.
- [17] Tully DC, Rucker PV, Chianelli D, et al. Discovery of Tropifexor (LJN452), a highly potent non-bile acid FXR agonist for the treatment of cholestatic liver diseases and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. *J Med Chem*, 2017, 60 (24): 9960–9973.
- [18] Anakk S, Watanabe M, Ochsner SA, et al. Combined deletion of FXR and SHP in mice induces CYP17A1 and results in juvenile onset cholestasis [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121 (1): 86–95.
- [19] Kong B, Wang L, Chiang JY, et al. Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice [J]. *Hepatology*, 2012, 56 (3): 1034–1044.
- [20] Datta S, Wang L, Moore DD, et al. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoter by nuclear receptors liver receptor homologue-1 and small heterodimer partner: a mechanism for differential regulation of cholesterol synthesis and uptake [J]. *Biol Chem*, 2006, 281: 807–812.
- [21] Lee YK, Moore DD. Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologue protein-1 by the orphan small heterodimer partner [J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 2463–2467.
- [22] Lu TT, Makishima M, Repa JJ, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors [J]. *Molec Cell*, 2000, 6 (3): 507–515.
- [23] Cariello M, Piccinin E, Garcia-Irigoyen O, et al. Nuclear receptor FXR, bile acids and liver damage: introducing the progressive familial intrahepatic cholestasis with FXR mutations [J]. *BBA Molec Basis Dis*, 2018, 1864 (4): 1308–1318.

(收稿: 2020-07-01 在线: 2021-05-07)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶