

大柴胡汤加减对胆囊胆固醇结石湿热证小鼠 FXR/FGF15/FGFR4信号通路的影响

王素英, 谢玉春, 闵莉*

(福建中医药大学中医证研究基地分子生物实验室, 国家中医药管理局三级科研实验室, 福州 350122)

[摘要] 目的:基于法尼酯衍生物X受体(FXR)/成纤维细胞生长因子15(FGF15)/成纤维细胞生长因子受体4(FGFR4)通路观察大柴胡汤加减对胆囊胆固醇结石(CS)湿热证模型小鼠的影响,以从方证对应的角度,探讨CS湿热证的分子生物学机制。方法:将48只6周龄小鼠随机分为空白组、模型组、大柴胡汤加减组(23.4 g·kg⁻¹)和熊去氧胆酸组(0.12 g·kg⁻¹),每组12只;空白组作为对照,其他3组采用“内湿+外湿+高胆固醇致石饲料”的模式造模12周建立CS湿热证小鼠模型,大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组给予相应的药物灌胃,模型组和空白组给予等量的生理盐水灌胃,共干预4周。造模前后每组小鼠均要进行旷场行为学实验判断其活动度和精神状态,每周观察记录各组小鼠体质量、饮水量、皮毛、二便等一般情况变化以评判其湿热证候表现;干预结束后,取各组小鼠肝脏、胆囊组织进行苏木素-伊红(HE)染色,对血清中 γ -谷氨酰基转移酶(GGT),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL)指标进行生化检测;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测胆汁中总胆固醇(TC),总胆汁酸(TBA)含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠回肠FXR, FGF15,以及肝脏FGFR4,胆固醇7 α -羟化酶(CYP7A1) mRNA与蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组小鼠胆囊增大,胆汁呈褐色浑浊状态,肉眼可见絮状沉淀;湿热证候表现明显;肝脏组织有明显的脂肪样变性,胆囊壁毛糙、增厚;血清肝功能指标ALP,GGT,TBIL水平均显著升高($P<0.01$);胆汁内TC含量显著增多($P<0.01$),TBA含量显著减少($P<0.01$);回肠组织的FXR mRNA与蛋白表达均显著升高($P<0.01$),FGF15 mRNA和蛋白表达均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),肝脏FGFR4 mRNA和蛋白表达量均明显增多($P<0.05$),CYP7A1 mRNA表达显著降低($P<0.01$),蛋白表达量呈降低趋势但差异无统计学意义。与模型组比较,两用药组小鼠胆汁浑浊程度明显降低,其中大柴胡汤加减组小鼠胆汁更为澄澈;干预后大柴胡汤加减组小鼠湿热证候表现明显减轻;两用药组小鼠肝脏、胆囊病变程度均明显降低;两用药组小鼠血清肝功能指标ALP,GGT,TBIL含量均显著降低($P<0.01$),其中就ALP,TBIL两指标的降低程度来看大柴胡汤加减组更为显著($P<0.01$);两用药组小鼠胆汁内TC含量均显著减少,TBA含量均显著增多($P<0.01$),大柴胡汤加减组变化趋势较熊去氧胆酸组更为显著($P<0.01$);大柴胡汤加减组小鼠FXR mRNA和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),FGF15和FGFR4 mRNA表达明显降低($P<0.05$),蛋白表达水平也有降低趋势,CYP7A1 mRNA表达明显增多($P<0.05$),蛋白表达有所升高;熊去氧胆酸组小鼠FXR,FGF15,FGFR4 mRNA与蛋白表达均有降低趋势,其中FXR mRNA表达明显降低($P<0.05$),CYP7A1 mRNA与蛋白表达均有所增加。结论:大柴胡汤加减可明显改善CS湿热证模型小鼠的结石情况、肝功能、胆汁成分、胆固醇-胆汁酸代谢异常及湿热证候表现,其机制可能与调控胆固醇-胆汁酸代谢通路的关键因子FXR,FGF15,FGFR4,CYP7A1 mRNA和蛋白表达水平有关。

[关键词] 胆囊胆固醇结石; 湿热证; 大柴胡汤加减; 胆固醇-胆汁酸代谢; 法尼酯衍生物X受体(FXR)/成纤维细胞生长因子15(FGF15)/成纤维细胞生长因子受体4(FGFR4)通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)03-0015-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220201

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211124.0857.001.html>

[网络出版日期] 2021-11-24 16:50

Effect of Modified Da Chaihutang on FXR/FGF15/FGFR4 Signaling Pathway in Mice with Cholesterol Gallstone Differentiated into Damp-Heat Syndrome

WANG Su-ying, XIE Yu-chun, MIN Li*

[收稿日期] 20210905(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603541);福建省自然科学基金项目(2021J01131533)

[第一作者] 王素英,在读硕士,从事中医证的基础与临床研究,E-mail:532247323@qq.com

[通信作者] * 闵莉,博士,副教授,硕士生导师,从事中医证的基础与临床研究,E-mail:44072083@qq.com

(Fujian University of Traditional Chinese Medicine (TCM), China Molecular Biology Laboratory of TCM Syndrome Research Base, Top Level Laboratory of the State Administration of TCM, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of modified Da Chaihutang on cholesterol gallstone (CS) in mice due to damp-heat based on the farnesoid X receptor (FXR)/fibroblast growth factor 15 (FGF15)/fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) pathway and explore the molecular biological mechanisms of CS differentiated into damp-heat syndrome from the perspective of correspondence between prescription and syndrome. **Method:** Forty-eight six-week-old mice were randomly divided into the blank group, model group, modified Da Chaihutang ($23.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and ursodeoxycholic acid ($0.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, with 12 mice in each group. The ones in the latter three groups were exposed to "internal dampness + external dampness + high-cholesterol diet" for 12 weeks for inducing CS due to damp-heat. Mice in the modified Da Chaihutang group and ursodeoxycholic acid group were gavaged with the corresponding drugs, while those in the model and blank groups with the same amount of normal saline for a total of four weeks. Before and after modeling, mice in each group were subjected to open field tests for determining their activities and mental states. Such general conditions as body mass, food intake, fur, and urine and stool of mice in each group were observed and recorded weekly for judging the damp-heat syndrome. After the intervention, the sampled liver and gallbladder tissues of mice in each group were stained with hematoxylin-eosin (HE) staining, and the serum γ -glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), and total bilirubin (TBIL) were determined. The total cholesterol (TC) and total bile acid (TBA) contents in bile were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expression levels of FXR, FGF15, FGFR4, and cholesterol 7α -hydroxylase gene (CYP7A1) were assayed by real-time fluorescence quantitative polynucleotide chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the model group exhibited enlarged gallbladder, brown turbid bile with flocculent precipitation visible to the naked eye, obvious damp-heat syndrome, lipid degeneration in the liver tissue, rough and thickened gallbladder wall, elevated ALP, GGT, and TBIL in serum ($P<0.01$) and TC in bile ($P<0.01$), reduced TBA ($P<0.01$), up-regulated FXR, FGF15, and FGFR4 mRNA and protein expression in ileum ($P<0.05$, $P<0.01$), and down-regulated CYP7A1 mRNA and protein expression ($P<0.01$). Compared with the model group, the two medication groups displayed improved bile turbidity, and the bile in the modified Da Chaihutang group became clearer. After intervention, the damp-heat syndrome of mice in the modified Da Chaihutang group was significantly alleviated. The liver and gallbladder lesions of mice in the two medication groups were significantly relieved, manifested as reduced serum ALP, GGT, and TBIL ($P<0.01$). The reduction in ALP and TBIL of the modified Da Chaihutang group was more significant ($P<0.01$). The TC contents in the bile of mice from the two medication groups were significantly lowered, whereas the TBA contents were elevated ($P<0.01$), with more significant changes present in the modified Da Chaihutang group ($P<0.01$). The mRNA and protein expression levels of FXR, FGF15, and FGFR4 in the modified Da Chaihutang group were down-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$), while the mRNA and protein expression levels of CYP7A1 rose ($P<0.05$), except that the elevation in FGF15 and FGFR4 protein expression and reduction in CYP7A1 protein expression were not significant. The mRNA and protein expression levels of FXR, FGF15, and FGFR4 in the ursodeoxycholic acid group all decreased, among which the reduction in FXR was remarkable ($P<0.05$), and the mRNA and protein expression levels of CYP7A1 were significantly up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion:** Modified Da Chaihutang significantly improves the stone, liver function, bile composition, abnormal cholesterol-bile acid metabolism, and damp-heat syndrome in the model mice of CS differentiated into damp-heat syndrome, which may be related to its regulation of key factors FXR, FGF15, FGFR4, and CYP7A1 mRNA and protein expression in the cholesterol-bile acid metabolism pathway.

[Keywords] cholesterol gallstone (CS); damp-heat syndrome; modified Da Chaihutang; cholesterol-

bile acid metabolism; farnesoid X receptor (FXR)/fibroblast growth factor 15 (FGF15)/fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) signaling pathway

随着生活节奏的加快,居民膳食结构的改变,胆囊胆固醇结石(CS)发病率呈逐年升高趋势^[1-2],加之临床上存在大量无症状的静止性胆石症患者也对CS的防治带来巨大阻碍,故深入研究CS的发病机制对指导其临床诊疗具有重要意义^[3]。

CS形成机制复杂,胆汁中胆固醇浓度过饱和既是CS突出的病理表现,也是目前公认的其关键发病机制之一^[4-5],肝脏分泌过多胆固醇过饱和胆汁与胆固醇-胆汁酸代谢密切相关^[6-7],法尼酯衍生物X受体(FXR)/成纤维细胞生长因子15(FGF15)/成纤维细胞生长因子受体4(FGFR4)信号通路表达异常是导致胆固醇-胆汁酸代谢紊乱的重要原因,与CS的发生、发展的关系密切^[8-9]。

中医学认为湿热是胆石症重要的发病基础和临床证型表现^[10]。大柴胡汤源自《伤寒论》是和解少阳、泄热祛湿的代表方,胆石症中医诊疗指南(基层医生版)将其作为治疗湿热型胆石症的首选方剂^[11],研究表明,大柴胡汤可调节肝胆湿热型胆总管结石患者术后胆汁的代谢,抑制其病理性胆汁的分泌,中医临床上也常用大柴胡汤加减治疗CS湿热证且疗效显著^[12-14]。因此,本研究基于FXR/FGF15/FGFR4信号通路,从胆固醇-胆汁酸代谢角度研究大柴胡汤加减治疗CS湿热证的作用靶点;立足于方证对应思想,探讨CS湿热证的分子生物学机制。

1 材料

1.1 动物及饲料 选用48只体质量为18~22 g的C57BL/6J雄性小鼠,由杭州子源实验动物科技有限公司提供,生产许可证号SCXK(浙)2019-0004,合格证编号为20201216Abbbb0105000538。小鼠饲养于福建中医药大学SPF级动物房[昼夜平均12 h,温度(20±2)℃,湿度40%~60%]。所有本实验相关动物实验操作均严格按照动物伦理审查标准进行(伦理批号为FJTCMIACUC2020071)。普通饲料(饲料中碳水化合物、蛋白质、脂肪、纤维等其他成分分别占比60%,22%,10%,8%)由福建中医药大学实验动物中心提供,批号2010220913;高胆固醇致石饲料(饲料成分为全价饲料粉料82.5%,牛油15%,胆固醇2%,胆酸0.5%)由无锡帆泊生物技术有限公司提供。所有饲料在进入SPF级屏障前均进行了高温和紫外线照射消毒处理。

1.2 药物及试剂 大柴胡汤在《伤寒论》原方的基础上随证加减,处方组成有柴胡15 g,黄芩10 g,茵陈15 g,郁金15 g,金钱草15 g,厚朴10 g,生大黄6 g,枳实10 g,茯苓15 g,炙甘草6 g。煎药壶中添加适量蒸馏水将中药放入其中浸泡40 min,大火将药物煮沸后调成文火继续煎煮30 min,用4层无菌纱布过滤将煎好的药液倒出,随后重复上一步对中药进行第2次煎煮,将2次煎煮后得到的药液混合、浓缩至100 mL,即药液所含生药量为1.17 g·mL⁻¹,以上所有中药均购自福建中医药大学附属第三人民医院。熊去氧胆酸胶囊(德国Dr.Falk Pharma GmbH公司,250 mg/粒,批号L20182A)。小鼠总胆固醇(TC),小鼠总胆汁酸(TBA)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号均为202101);碱性磷酸酶(ALP), γ -谷氨酰基转移酶(GGT)测定试剂盒(雷杜生命科学股份有限公司,批号分别为20210113,20200219);总胆红素(TBIL)测定试剂盒(长春汇力生物技术有限公司,批号2020003);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号20190430);逆转录试剂盒,SYBR试剂盒(日本Takara公司,批号分别为AK71623A,AK41790A);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗,FGFR4一抗,兔二抗,鼠二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为10015666,0080145,20000250,20000261);FXR一抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号ZP7641BP41);FGF15一抗(英国Abcam公司,批号GR3209600-25);胆固醇7 α -羟化酶(CYP7A1)一抗(美国Affinity Bioscience公司,批号64r9496);聚合酶链式反应(PCR)引物由福州瑞真生物技术有限公司合成,引物序列见表1。

1.3 仪器 LRH-800-GSI型人工气候箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司);YC-D209型亚都超声波加湿器(北京亚都室内环保科技有限公司);5424R型微型冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Histocore Pearl型全封闭组织脱水机,EG1150H型生物组织包埋机,RM2245型石蜡切片机(德国Leica公司);SB80型摊片机,SW85型烤片机(德国Microm公司);Axio Imager A2型显微镜(德国Carl Zeiss公司);SZ66型体视显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);Infinite M200 Pro型多功能酶标仪(奥地利

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	151
CYP7A1	ACCTCCGGGCCTTCCTAAA	TCAAACATCACTCGGTAGCAGAA	81
FXR	CAGAAATGGCAACCAGTCATGTA	AAATCTCCGCCGAACGAA	144
FGF15	ATGGCGAGAAAGTGGAACGG	CTGACACAGACTGGGATTGCT	108
FGFR4	GCTCGGAGGTAGAGGTCTTGT	CCACGCTGACTGGTAGGAA	107

Tecan公司);SHP-250型生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司);QuantStudio6 Flex型ABI实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪,Veriti型基因扩增仪(美国Applied Biosystems公司);Chemray 240和Chemray 800型全自动生化分析仪(雷杜生命科学股份有限公司);NANODROP 2000型超微量紫外分光光度计(美国Thermo Scientific公司);Power Pac™ Universal Power Supply型电泳仪,Power Pac™ Basic型湿转膜仪,ChemiDoc™ MXRS+型化学发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与干预给药 将适应性喂养1周后无异常的48只雄性C57BL/6J小鼠,随机分为空白组(12只)、模型组(12只)、大柴胡汤加减组(12只)、熊去氧胆酸组(12只),参照并改进“内湿+外湿+致病因素”塑造湿热证动物模型的方法^[15-17],采用“内湿+外湿+高胆固醇致石饲料”的方法塑造CS湿热证小鼠模型。空白组全程在SPF级条件下正常饲养;模型组、大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组小鼠造模期间全天候给予高胆固醇致石饲料让其自由摄食,在造模第10~13周,进入人工气候箱[温度(32±1)℃,湿度95%]10 h/d,在湿热环境内给予20%蔗糖水让其自由饮用,其余时间换成正常饮用水。在造模结束后,大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组小鼠给予相应的药物灌胃干预,所有药物剂量均根据小鼠与成人质量等效剂量换算,即成人剂量的12倍,故大柴胡汤加减组小鼠每日用药量为23.4 g·kg⁻¹,熊去氧胆酸组用药量为0.12 g·kg⁻¹,空白组和模型组则给予等量的生理盐水灌胃,共给药干预4周。

2.2 样本采集预处理 末次给药干预后,禁食不禁水12 h,对各组小鼠进行摘眼球取血法收集血液样本,取血后对小鼠进行脱颈处死,摘下完整的胆囊,体视镜拍照后,收集胆汁,保留胆囊壁,摘取肝脏、回肠并用生理盐水清理干净;血液3000 r·min⁻¹离心

15 min(离心半径5 cm,下同)后收取血清收集在200 μL的微型离心管内,胆汁也存放200 μL的微型离心管内做好标记,将肝脏、回肠清理干净后切成大小均匀的组织块放于2 mL的微型离心管内做好标记备用;将一部分肝脏组织切成形状规整的方形组织块,泡在4%多聚甲醛固定液中,胆囊壁也存放在4%多聚甲醛固定液中以备后续进行HE染色。

2.3 一般情况的观察 造模前、造模后和干预后均需要对所有小鼠进行旷场行为学实验,即观察记录小鼠5 min内在规格为50 cm×50 cm×50 cm,底面用黑色签字笔均匀划分成有25个正方形格子的白色场箱内的水平穿越格子数、直立次数和静止时间,以判断其活跃程度,并每周记录其体质量、饮食、二便、皮毛、精神状态、活动度等一般情况以观察小鼠的湿热证候表现。

2.4 结石情况观察及ELISA检测胆汁TC, TBA含量 小鼠处死后,开腹将胆囊完整取下,清理表面污物后,放在体视镜下观察拍照,记录各组小鼠结石情况。根据相关ELISA试剂盒的操作说明,往包被相关抗体的微孔中,依次加入标准品、胆汁样本及辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体,经37℃温育后洗涤,用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度A,并计算样品浓度。

2.5 生化检测小鼠血清ALP, GGT, TBIL含量 小鼠血液收集在1.5 mL微型离心管内,静置4~6 h后,3 000 r·min⁻¹离心15 min,分离血清,将血清收集在200 μL管内,放入-80℃冰箱内保存,待用时将血清置于干冰盒内送往塞维尔生物科技有限公司,使用全自动生化分析仪检测。

2.6 HE染色观察小鼠肝脏、胆囊组织形态变化 将泡在固定液中的组织进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明后,浸蜡包埋,用切片机切成4~6 μm厚度的切片,再经脱蜡、水化后,苏木素染色5~10 min,伊红染色20~30 s,最后制成封片放于显微镜下观察肝脏、胆囊组织的病理变化。

2.7 Real-time PCR 检测 FXR, FGF15, FGFR4, CYP7A1 mRNA 表达水平 分别将回肠、肝脏研磨匀浆,提取组织内RNA并测定其纯度和浓度,依照逆转录试剂说明,将RNA逆转录为cDNA,将逆转录的cDNA与所测目的基因混合加样,在SYBR试剂盒的说明下操作,两步法进行PCR扩增,95℃预变性30s;95℃变性5s,60℃退火30s,40个循环。以GAPDH为内参对照,得到各样本的 C_t 值,计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,算出各基因的mRNA相对表达量,进行统计学分析。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 FXR, FGF15, FGFR4, CYP7A1 蛋白表达水平 提取小鼠肝脏、回肠组织总蛋白并进行BCA测定其浓度,据蛋白表达量配置相应浓度的凝胶继而加样、电泳并转移蛋白至PVDF膜上,后经GAPDH, FXR, FGF15, FGFR4一抗(1:6000, 1:2000, 1:3000, 1:1000)4℃孵育过夜,兔、鼠二抗(1:5000)孵育2h,ECL避光条件下显影、成像,最后以条带上目的蛋白的灰度值/内参GAPDH蛋白的灰度值作为相应因子的蛋白表达情况,进行统计学分析。

2.9 统计学方法 使用SPSS 25.00软件对本研究所有数据进行统计分析,GraphPad Prism 8.0.2软件作图。本实验所有数据均为计量资料,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,若数据符合正态分布则用单因素方差分析(ANOVA),根据方差齐性选择最小显著性差异法(LSD)或Games-Howell做组间比较;若数据不符合正态分布则进行非参数检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表2 大柴胡汤加减对CS小鼠体质量增长的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	造模9周体质量增长率	造模10~13周体质量增长率	干预前后体质量增长率
空白		36.57±5.22	2.20±1.92	-1.80±1.92
模型		44.91±3.48 ²⁾	-6.50±3.87 ²⁾	-5.43±3.60 ¹⁾
大柴胡汤加减	23.4	42.38±3.66 ¹⁾	-3.83±2.32 ²⁾	-0.50±1.87 ^{4,6)}
熊去氧胆酸	0.12	45.00±5.72 ²⁾	-4.17±3.19 ²⁾	-5.33±2.16

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与熊去氧胆酸组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表3~7同)。

3.2 对CS小鼠胆囊结石情况及胆汁内TC, TBA含量变化的影响 空白组小鼠胆汁淡黄、透明,胆囊较小;模型组小鼠胆汁浑浊呈黄褐色,可见絮状物质沉淀,胆囊体积增大;大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组小鼠胆汁较空白组浑浊,但与模型组比较,浑浊度有不同程度的减轻,胆囊体积也有缩小,大柴胡汤加减组小鼠胆汁相对于熊去氧胆酸组来说

3 结果

3.1 一般情况观察 空白组小鼠饮食状况良好,体质量逐日增加,好攀爬、直立,精神状态好,大便灰褐色麦粒状,小便淡黄清透,皮毛柔顺紧密;模型组、大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组小鼠在造模前期(1~9周)饮食量较大,体质量增长较快($P<0.05$, $P<0.01$),在造模第7周开始陆续出现懒动,眊多,小便色黄,大便细软,皮毛油腻、粗糙等现象,造模后期(10~13周)3组小鼠嗜睡懒动,好聚堆,大便质稀,小便色深黄,摄食量减少,体质量增长缓慢甚至负增长($P<0.01$)等明显的湿热证候表现;干预后,大柴胡汤加减组小鼠湿热证候较模型组和熊去氧胆酸组明显改善,大柴胡汤加减组体质量有显著增长趋势($P<0.01$)。造模前各组小鼠旷场行为学实验结果差异无统计学意义;造模结束后,与空白组比较,模型组、大柴胡汤加减组、熊去氧胆酸组水平穿越格子数和直立次数均显著减少($P<0.01$),静止时间均明显延长($P<0.05$)。干预后,与空白组比较,模型组小鼠水平穿越格子数、直立次数依旧显著减少,静止时间仍显著增多($P<0.01$);与模型组比较,大柴胡汤加减组小鼠水平穿越格子数显著增多、静止时间显著缩短($P<0.01$),直立次数明显增多($P<0.05$),活动次数增多,食欲有所恢复,精神状态较好,体质量显著升高($P<0.01$);与熊去氧胆酸组比较,大柴胡汤加减组小鼠水平穿越格子数、直立次数均明显增多($P<0.05$),静止时间显著缩短($P<0.01$),活跃度增强,小便色淡,眊少,体质量显著升高($P<0.01$),差异有显著统计学意义。见表2,3,图1,2。

更清透。见图3。与空白组比较,模型组小鼠胆汁内TC含量显著升高,TBA含量降低显著($P<0.01$);与模型组比较,大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组小鼠胆汁内TC含量均显著降低,TBA含量均显著增高($P<0.01$);与熊去氧胆酸组小鼠比较,大柴胡汤加减组小鼠胆汁内TC含量显著减少,TBA含量显著增多($P<0.01$)。见表4。

表3 大柴胡汤加减对CS小鼠旷场行为学实验的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Effect of modified Da Chaihutang on mice's open field behavior experiment in CS mice ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	水平穿越格子数/个		
		造模前	造模后	干预后
空白		121.50±16.06	118.00±11.66	112.20±14.03
模型		115.80±13.92	54.80±13.73 ²⁾	54.50±12.08 ²⁾
大柴胡汤加减	23.4	115.10±17.85	55.20±11.98 ²⁾	108.40±37.02 ^{4,5)}
熊去氧胆酸	0.12	115.20±22.82	56.50±9.92 ²⁾	61.70±12.43

组别	剂量/g·kg ⁻¹	直立次数/次		
		造模前	造模后	干预后
空白		30.20±5.51	23.70±6.67	12.60±2.95
模型		28.10±4.68	9.60±4.62 ²⁾	7.50±3.03 ²⁾
大柴胡汤加减	23.4	27.70±5.81	10.10±4.48 ²⁾	14.40±6.43 ^{3,5)}
熊去氧胆酸	0.12	27.10±5.55	9.30±4.76 ²⁾	6.80±2.94

组别	剂量/g·kg ⁻¹	静止时间/s		
		造模前	造模后	干预后
空白		57.40±16.70	119.80±24.72	87.90±14.05
模型		61.40±17.01	150.40±30.42 ¹⁾	189.50±19.51 ²⁾
大柴胡汤加减	23.4	55.70±17.88	147.20±27.26 ¹⁾	107.20±22.63 ^{4,6)}
熊去氧胆酸	0.12	61.80±17.27	151.50±24.39 ¹⁾	196.10±23.69

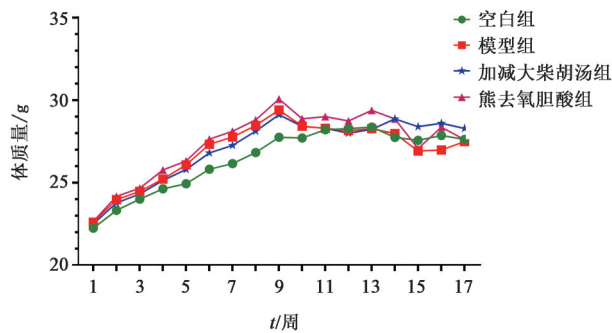


图1 大柴胡汤加减对CS小鼠体质量增长的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Fig. 1 Effect of modified Da Chaihutang on weight gain of CS mice ($\bar{x}\pm s, n=12$)

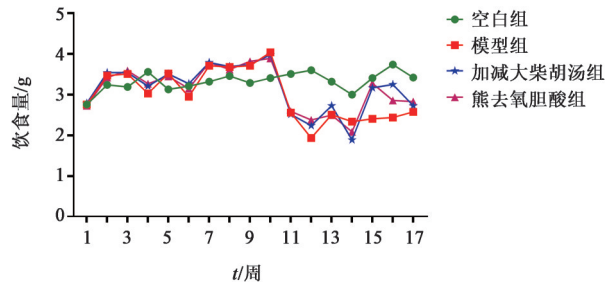
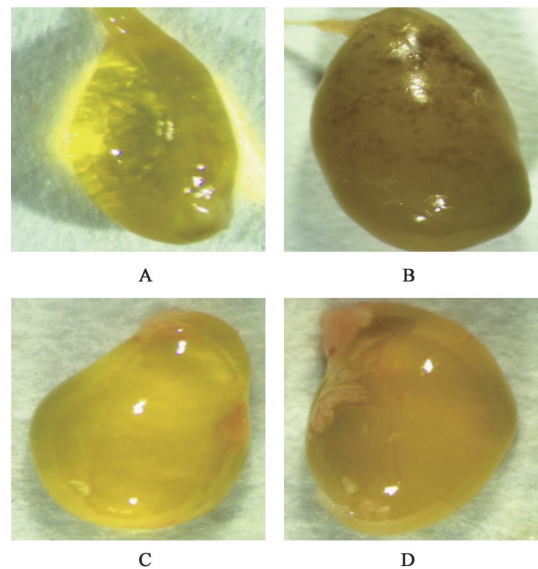


图2 大柴胡汤加减对CS小鼠饮食量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Fig. 2 Effect of modified Da Chaihutang on food intake of CS mice ($\bar{x}\pm s, n=12$)

3.3 对CS小鼠肝脏、胆囊组织形态变化的影响

空白组小鼠肝脏细胞排列紧密,细胞核大而居中;模型组小鼠肝脏组织内充斥大量脂滴空泡,有



A. 空白组; B. 模型组; C. 大柴胡汤加减组; D. 熊去氧胆酸组(图4~7同)

图3 大柴胡汤加减对CS小鼠胆囊结石情况的影响

Fig. 3 Effect of modified Da Chaihutang on gallstones in CS mice

明显的脂肪样变性,细胞核大小不一,位置偏颇,细胞排列杂乱;与模型组比较,大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组小鼠肝脏脂肪样变相程度明显减轻,细胞排列相对整齐。见图4。空白组、大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组3组小鼠胆囊壁肌层较薄,浆膜结构基本完整,形态无明显异常;模型组小鼠胆囊

表4 大柴胡汤加减对CS小鼠胆汁TC, TBA含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 4 Effect of modified Da Chaihutang on content of TC and TBA in CS mouse bile ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	TC/ $mmol\cdot L^{-1}$	TBA/ $\mu mol\cdot L^{-1}$
空白		5.01±0.52	19.66±0.83
模型		9.48±0.78 ²⁾	13.00±1.27 ²⁾
大柴胡汤加减	23.4	6.79±0.58 ^{4,6)}	17.67±1.48 ^{4,6)}
熊去氧胆酸	0.12	8.00±0.91 ⁴⁾	15.49±1.07 ⁴⁾

黏膜上皮凸出较多,浆膜完整性被破坏,胆囊壁明显增厚、毛糙。见图5。

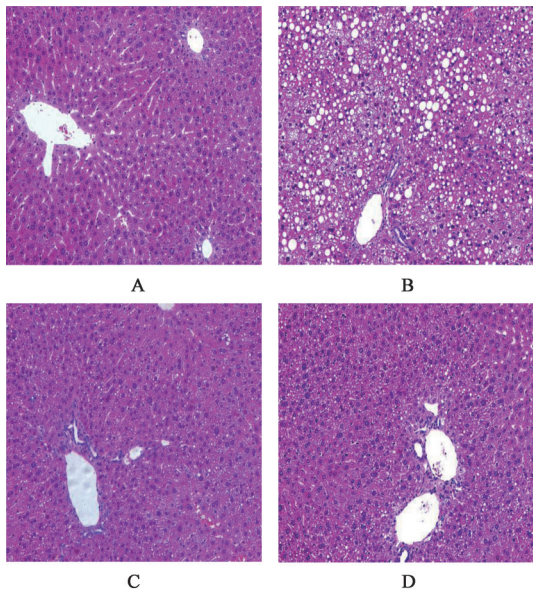


图4 大柴胡汤加减对CS小鼠肝脏组织形态的影响(HE, ×200)
Fig. 4 Effect of modified Da Chaihutang on morphology of liver tissue in CS mice (HE, ×200)

3.4 对CS小鼠血清ALP, GGT, TBIL含量的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清ALP, GGT, TBIL含量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组小鼠血清ALP, GGT, TBIL含量均显著降低($P<0.01$);与熊去氧胆酸组比较,大

表5 大柴胡汤加减对CS小鼠血清ALP, GGT, TBIL含量的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 5 Effect of modified Da Chaihutang on contents of serum ALP, GGT and TBIL in CS mice ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	ALP/ $U\cdot L^{-1}$	GGT/ $U\cdot L^{-1}$	TBIL/ $\mu mol\cdot L^{-1}$
空白		81.88±13.70	2.26±0.93	8.98±1.14
模型		142.69±12.34 ²⁾	13.07±5.33 ²⁾	16.24±1.47 ²⁾
大柴胡汤加减	23.4	102.22±13.53 ^{4,6)}	3.74±1.14 ⁴⁾	8.10±1.41 ^{4,6)}
熊去氧胆酸	0.12	124.16±8.16 ⁴⁾	4.64±1.19 ⁴⁾	13.38±1.43 ⁴⁾

3.6 对CS小鼠FXR, FGF15, FGFR4, CYP7A1的蛋白表达水平的影响

与空白组比较,模型组小鼠回

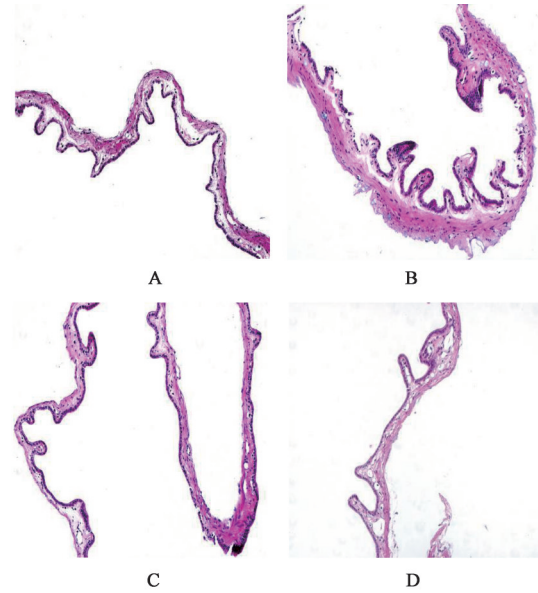


图5 大柴胡汤加减对CS小鼠胆囊组织形态的影响(HE, ×200)

Fig. 5 Effect of modified Da Chaihutang on morphology of gallbladder tissue in CS mice (HE, ×200)

柴胡汤加减组小鼠血清ALP, TBIL含量均显著降低($P<0.01$)。见表5。

3.5 对CS小鼠FXR, FGF15, FGFR4, CYP7A1 mRNA表达水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠回肠组织FXR, FGF15 mRNA表达均显著升高($P<0.01$),肝脏组织FGFR4 mRNA表达明显升高($P<0.05$), CYP7A1 mRNA表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,大柴胡汤加减组小鼠回肠组织FXR mRNA表达量显著降低($P<0.01$), FGF15 mRNA表达量明显降低($P<0.05$),肝脏组织FGFR4 mRNA表达量明显降低, CYP7A1 mRNA表达明显升高($P<0.05$),熊去氧胆酸组小鼠回肠组织FXR mRNA表达量也明显降低($P<0.05$);与熊去氧胆酸组比较,大柴胡汤加减组小鼠肝脏组织FGFR4 mRNA表达明显降低($P<0.05$), CYP7A1 mRNA表达有升高趋势,回肠组织FXR, FGF15 mRNA表达有降低趋势,但差异无统计学意义。见表6。

肠组织FXR蛋白表达水平显著增加($P<0.01$),回肠组织FGF15和肝脏组织FGFR4的蛋白表达水平也

表6 大柴胡汤加减对CS小鼠FXR, FGF15, FGFR4, CYP7A1 mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 6 Effect of modified Da Chaihutang on FXR, FGF15, FGFR4 and CYP7A1 mRNA expression in CS mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FXR	FGF15	FGFR4	CYP7A1
空白		1.00±0.07	0.99±0.05	0.95±0.11	1.06±0.12
模型		7.40±0.76 ²⁾	2.18±1.11 ²⁾	1.58±0.32 ¹⁾	0.27±0.15 ²⁾
大柴胡汤加减	23.4	5.40±0.97 ⁴⁾	1.19±0.07 ³⁾	1.10±0.12 ^{3,5)}	0.60±0.14 ³⁾
熊去氧胆酸	0.12	6.18±0.23 ³⁾	1.53±0.38	1.48±0.22	0.39±0.10

明显升高 ($P<0.05$), 肝脏 CYP7A1 蛋白表达水平呈降低趋势, 但差异无统计学意义; 与模型组比较, 大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组小鼠 FXR, FGF15, FGFR4 的蛋白表达均呈下降趋势, 肝脏组织 CYP7A1 蛋白表达呈升高趋势, 其中大柴胡汤加减

组小鼠回肠组织 FXR 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与熊去氧胆酸组比较, 大柴胡汤加减组小鼠回肠组织 FXR 蛋白量明显降低 ($P<0.05$), FGF15, FGFR4 蛋白表达有降低趋势, 差异无统计学意义。见表7, 图6, 7。

表7 大柴胡汤加减对小鼠FXR, FGF15, FGFR4, CYP7A1蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 7 Effect of modified Da Chaihutang on FXR, FGF15, FGFR4 and CYP7A1 protein expression in mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FXR/GAPDH	FGF15/GAPDH	FGFR4/GAPDH	CYP7A1/GAPDH
空白		0.35±0.02	0.82±0.07	0.39±0.03	0.75±0.49
模型		0.90±0.12 ²⁾	1.56±0.351 ¹⁾	1.11±0.40 ¹⁾	0.26±0.21
大柴胡汤加减	23.4	0.71±0.02 ^{3,5)}	1.10±0.17	0.69±0.17	0.61±0.30
熊去氧胆酸	0.12	0.87±0.07	1.35±0.41	0.91±0.25	0.64±0.50

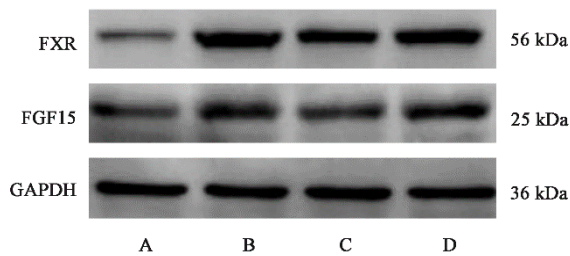


图6 各组小鼠回肠组织FXR, FGF15蛋白表达电泳
Fig. 6 Electrophoresis of FXR, FGF15 protein expression in ileum of mice

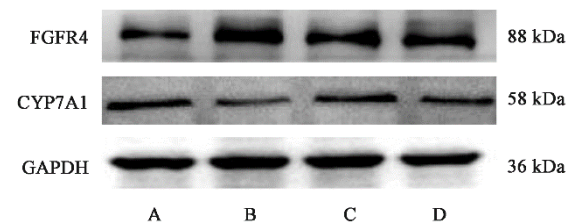


图7 小鼠肝脏组织FGFR4, CYP7A1蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of FGFR4, CYP7A1 protein expression in liver of mice

4 讨论

研究发现, 胆固醇-胆汁酸代谢异常与肝脏分泌过多胆固醇过饱和胆汁继而诱发CS密切相关^[6-7]。胆汁由肝脏分泌, 跟随食物消化进入肠道, 在肠肝系统内胆汁中的胆固醇-胆汁酸伴随着食物的消化、吸收、排泄也完成相应的合成、代谢与外排。实验

研究发现, 高脂高胆固醇饮食会导致FXR, FGF15, FGFR4和CYP7A1异常表达, 进而影响胆固醇-胆汁酸的正常代谢^[9, 18-19]。当回肠内游离胆汁酸浓度升高, 可激活肠道内FXR, 进而促使回肠促进成纤维细胞生长因子19(FGF19, 在啮齿动物中以FGF15的形式存在)表达增强, FGF19/15进入随着血液循环在肝细胞表面结合并激活FGFR4, 抑制CYP7A1的表达, CYP7A1是肝脏内胆固醇代谢为胆汁酸的限速酶, 即肝脏会分泌更多的胆固醇饱和胆汁, 促进胆结石的发生^[8-9]。

经文献研究发现, 湿热蕴结是胆石症的关键病机, 湿热体质偏颇常导致胆石症的易感。饮食不节、偏嗜膏粱厚味加之久居湿热之处, 会令脾胃虚损而运化无力, 酿生湿热, 湿热内结日久交蒸, 熏蒸肝胆, 肝胆疏泄失常, 胆汁排泄不畅, 日久煎熬成石^[20-21]。故HE染色可见模型组肝脏组织结构异常, 出现明显的脂肪变性, 胆囊壁结构完整性也被破坏, 胆囊壁增厚、毛糙; 肝胆疏泄失职同时也提示肝功能受损, 故可见模型组小鼠血清中ALP, GGT, TBIL水平显著升高; 肝胆功能失调, 胆汁的排泄与成分便会出现异常, 因而与空白组比较, 模型组小鼠胆汁中TC含量显著增多, TBA含量显著降低。研究表明, 胆汁成分异常与胆固醇-胆汁酸代谢密切相关^[22-23], 本次研究发现也证实了该说法, 和空白组

相比,模型组小鼠回肠组织 FXR, FGF15 和肝脏组织 FGFR4 mRNA 和蛋白表达水平均呈现异常增加趋势,肝脏组织 CYP7A1 mRNA 和蛋白表达量呈下降趋势。湿热证动物模型的评判目前尚无统一的标准,根据《重订通俗伤寒论·第八章·伤寒兼证第二节·伤寒兼湿》中的记载“兼湿热者,四肢倦怠……面色黄赤如熏油腻……腹满便溏,溲短黄,热甚,或呕吐不纳”,以此类推,可将人在临床中的湿热证候表现作为动物湿热证模型评价的重要借鉴。在造模后期(造模第10~13周)模型组、大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组3组小鼠,出现饮食量下降,体质量增长减缓,好聚堆,嗜睡懒动,皮毛粗糙、油腻,眵多,精神萎靡等状况且旷场行为学实验表明小鼠活跃度降低;表明模型组、大柴胡汤加减组和熊去氧胆酸组3组小鼠表现出的明显湿热证候。

由此可见,湿热是CS显著的病理表现,也是其诱发的重要病理因素;“湿热蕴结”在诱发CS的过程中会进一步导致肝脏、胆囊组织形态异常,肝功能受损,令胆汁中胆固醇成分过高以及影响胆固醇-胆汁酸代谢相关因子 FXR, FGF15, FGFR4, CYP7A1 mRNA 和蛋白的正常表达。

大柴胡汤源于东汉张仲景的《伤寒论》,是治疗胆囊炎、胆石症等少阳阳明合病的代表方,具有清热利湿、利胆排石之效。本实验所用中药方剂根据诊疗意见,在原方基础上有所加减,方中以君药柴胡配臣药黄芩,和解少阳并清其热;茵陈、郁金与金钱草合而重用,共奏清热利湿、利胆排石之效;轻用生大黄、枳实与厚朴以泄阳明热结,燥湿行气;茯苓利水渗湿又可健脾和胃与炙甘草共为佐药,调和诸药,全方攻补兼施,以清热利湿、利胆排石为主,又不忘顾护脾胃,乃治疗CS湿热证之佳剂^[11]。临床研究发^[13-14],大柴胡汤加减对慢性胆囊炎合并胆结石有良好的治疗效果,同时可调节肝胆湿热型胆总管结石患者术后胆汁的代谢,抑制其病理性胆汁的分泌,达到清热利湿、利胆排石的效果。熊去氧胆酸可促进胆汁酸分泌增多,降低胆汁中胆固醇含量,在临床常被用于CS患者的治疗^[24-26]。从实验结果可知,与模型组比,两用药组小鼠胆汁浑浊程度、结石情况均明显好转,肝脏、胆囊组织病理变化有所改善;胆汁中TC含量显著降低,TBA含量显著升高;相关肝功能指标ALP,GGT,TBIL水平降低;回肠组织FXR,FGF15和肝脏组织FGFR,CYP7A1的mRNA和蛋白表达量均有明显降低趋势,说明大柴胡汤加减和熊去氧胆酸都对CS有良好的治疗效

果。但与熊去氧胆酸组小鼠相比,大柴胡汤加减组小鼠,干预后精神状态明显改善,体质量平缓增长,小便颜色变浅,眼眵减少,活跃程度较高,以上结果均显示大柴胡汤加减更具良好的清热利湿效果,能明显改善CS小鼠的湿热证候。此外,肉眼可见大柴胡汤加减组小鼠胆汁透明度明显优于熊去氧胆酸组;与熊去氧胆酸组相比,大柴胡汤加减组小鼠胆汁成分更趋于正常,血清中ALP,TBIL含量也显著降低,FXR,FGF15,FGFR4的mRNA和蛋白表达水平均降低趋势明显,肝脏CYP7A1的mRNA和蛋白表达有升高趋势;可见大柴胡汤加减改善胆汁成分、纠正肝功能异常,逆转FXR,FGF15,FGFR4,CYP7A1的mRNA和蛋白异常表达效果要好于熊去氧胆酸,其清热利湿、利胆排石效果更佳。

综上所述,“内湿+外湿+高胆固醇致石饲料”可成功诱导CS湿热证小鼠模型的建立,大柴胡汤加减清热利湿、利胆排石可改善CS湿热证小鼠湿热证候、结石情况、胆汁成分、肝功能指标,肝胆组织病理结构及胆固醇-胆汁酸通路中FXR,FGF15,FGFR4,CYP7A1的异常状况,比熊去氧胆酸治疗湿热蕴结型CS更具特异性、优越性,故从方证对应的角度来看,湿热蕴结可能是导致胆固醇-胆汁酸代谢异常的主要原因,回肠FXR,FGF15和肝脏FGFR4,CYP7A1的mRNA与蛋白表达差异导致胆固醇-胆汁酸代谢失常可能是CS湿热证分子生物学机制之一。近年来众多研究发现,肠道微生物生态可影响胆固醇-胆汁酸的代谢且与湿热证发病机制密切相关^[27-31],本次实验未对各组小鼠肠道菌群进行检测分析,没有进一步深入挖掘CS湿热证、胆固醇-胆汁酸代谢与肠道菌群之间的相关性,是此次研究的不足之处,接下来需要进一步的实验进行补充论证,以更深入地挖掘与丰富CS湿热证的分子生物学内涵。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] STINTON L M, SHAFFER E A. EPidemiology of gallbladder disease: cholelithiasis and cancer [J]. Gut Liver, 2012, 6(2): 172-187.
- [2] 杨真真,刘大毛,肖卫东,等. 胆囊结石患病率的性别差异分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(18): 1981-1983.
- [3] 邓其学. 健康体检时发现隐性胆囊结石患者的五年随访分析[J]. 云南医药, 2015, 36(1): 109-111.
- [4] 刘超,薛东波. 胆囊胆固醇结石发生机制的研究进展

- [J]. 医学综述, 2019, 25(11): 2103-2108.
- [5] 李洪柳, 申元英. 胆固醇胆结石形成机制的研究进展[J]. 中国公共卫生管理, 2020, 36(2): 194-196.
- [6] 严豪杰, 崔乃强, 张淑坤, 等. 脂质代谢异常与胆固醇结石相关性研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2015, 21(4): 419-422.
- [7] 蔡强, 韩天权, 蒋兆彦. 胆汁酸代谢与胆固醇结石病[J]. 上海医药, 2015, 36(18): 3-6.
- [8] 姜远, 俞春东. FGFR4对胆汁酸代谢的调控作用[J]. 生命的化学, 2009, 29(2): 202-205.
- [9] 徐路. 基于FXR/FGF15/FGFR4通路研究黄连吴茱萸配伍调控胆汁酸代谢发挥降脂效应的作用机制[D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- [10] 蒋梦婷. 基于数据挖掘的周仲瑛教授胆石症证治研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [11] 时昭红, 任顺平, 唐旭东, 等. 消化系统常见病急慢性胆囊炎、胆石症中医诊疗指南(基层医生版)[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(2): 793-800.
- [12] 于天祥, 于泽荣, 李琳. 刘长运应用大柴胡汤加减治疗胆石症的经验[J]. 中国继续医学教育, 2021, 13(16): 160-165.
- [13] 匡启英. 大柴胡汤加减治疗慢性胆囊炎合并胆结石患者的临床效果分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(25): 157, 159.
- [14] 李东东. 大柴胡汤对肝胆湿热证胆总管结石患者ERCP/ENBD取石术后胆汁代谢的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [15] 王婷, 郑锋玲, 骆欢欢. 岭南温病湿热证小鼠模型的建立及肠道菌群的研究分析[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(6): 1361-1365.
- [16] 常丽萍, 阙铁生, 吕军影, 等. 温病湿热证大鼠模型复制的条件探索[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1243-1246.
- [17] 陈弋, 王琛, 徐秋英, 等. 两种岭南湿热证小鼠模型肠道菌群动态变化的研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(7): 2186-2197.
- [18] 叶露. 疏肝理气、清热利湿对CS豚鼠胆固醇代谢影响的机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2019.
- [19] 贺凯. 黄连生物碱调节高脂C57BL/6J小鼠胆汁酸信号通路和肠道微生物改善血脂异常研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [20] 姜伟, 李润东. 李润东教授辨治胆石症临床经验[J]. 光明中医, 2021, 36(2): 195-197.
- [21] 伊西磊. 胆石症患者中医体质分析研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [22] 王成, 孙培龙. 胆石症成因的研究进展[J]. 肝胆外科杂志, 2018, 26(2): 157-160.
- [23] 申弘, 胡萌, 魏泽辉, 等. 胆汁的生成、分泌、排泄及胆汁淤积发生机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(2): 431-437.
- [24] 孙娜. 熊去氧胆酸对胆固醇的治疗与研究[J]. 中国卫生产业, 2012, 9(29): 115.
- [25] 刘彤, 李楠, 李栋, 等. 消石利胆胶囊联合熊去氧胆酸治疗胆囊结石临床研究[J]. 中国药业, 2019, 28(8): 30-32.
- [26] 王鑫, 陈晓, 时海波, 等. 动物胆汁及胆汁酸的合成、测定及药理作用的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(18): 36-43.
- [27] 宋波, 文国琴, 王茜. 胆汁酸代谢与肠道微生物[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(3): 107-112.
- [28] 曾忠花, 刘容容, 汤俐, 等. 肠道菌群与胆汁酸代谢的互作用[J]. 中国微生物学杂志, 2021, 33(7): 849-856.
- [29] 徐立, 符晶, 方芳, 等. 加味茵陈五苓散治疗湿热蕴结型非乙醇性脂肪性肝病的疗效及对肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 127-132.
- [30] 李玉丽, 袁振仪, 谭周进. 泄泻证候相关肠道菌群的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16): 209-217.
- [31] 张颖龄, 邹本良, 熊伟, 等. 基于肠道菌群探讨先天之本与后天之本在糖尿病发病与治疗中的作用[J]. 世界中医药, 2021, 16(3): 454-457.

[责任编辑 周冰冰]