

清胰 II 号对小鼠胆汁淤积性肝损伤的保护作用

徐亚沙¹, 吴芹¹, 熊庭旺¹, 田应彪², 刘杰^{1*}

(1. 遵义医学院 基础药理省部共建教育部重点实验室, 贵州 563000;

2. 遵义医学院附属医院, 贵州 563000)

[摘要] 目的:本研究旨在探讨清胰 II 号对胆管结扎造成的胆汁淤积性肝损伤的保护作用及其机制。方法:昆明种小鼠随机分为假手术组,模型组,低、高剂量清胰 II 号组(0.5,1.0 g·kg⁻¹),连续 ig 给药 7 d 后,采用胆管结扎(BDL)术制备小鼠肝脏胆汁淤积性肝损伤模型,制模后 72 h 麻醉处死动物,收集血液和肝脏观察各组生化指标和肝组织病理学改变以及实时荧光定量-聚合酶链式反应(qPCR)检测肝脏胆酸代谢通路相关基因的 mRNA 水平的表达。结果:与假手术组比较,模型组丙氨酸氨基转移酶(ALT),碱性磷酸酶(ALP),总胆汁酸(TBA),总胆红素(TBIL)水平均显著增高,肝组织病理显示在大量中性粒细胞浸润、肝细胞水肿、变性和坏死,同时胆酸合成基因胆固醇 7 α -羟化酶(Cyp7a1),甾醇 12 α -羟化酶(Cyp8b1),类法尼酯衍生物 X 受体(FXR),小分子异源二聚体伴侣(SHP),牛磺胆酸钠协同转运蛋白(Ntcp) mRNA 表达均降低($P < 0.05$);与模型组比较,给药组可降低 ALT,ALP 活性和 TBA, TBIL 水平,改善其病理损伤,上调上述基因 mRNA 水平($P < 0.05$)。结论:清胰 II 号对胆汁淤积性肝损伤具有保护作用,通过作用于肝脏中与胆酸合成和转运相关的基因表达,以维持胆汁酸的稳态。

[关键词] 清胰 II 号;胆管结扎;胆汁淤积性肝损伤;胆汁酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0166-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080166

Protective Effect of Qingyi II on BDL-Induced Cholestatic Liver Injury in Mice

XU Ya-sha¹, WU Qin¹, XIONG Ting-wang¹, TIAN Ying-biao², LIU Jie^{1*}

(1. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Guizhou 563000, China; 2. Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of Qingyi II (QY) on the bile-duct ligation (BDL)-induced cholestatic liver injury. **Method:** Kunming mice were randomly divided into the sham operation group, model group, QY-0.5 group (0.5 g·kg⁻¹) and QY-1.0 group (1.0 g·kg⁻¹), and orally administered for 7 days. On the 7th day, mice received BDL to prepare the cholestatic liver injury model. Livers and blood were collected 72 hours later after BDL. Serum enzyme biochemical indexes, histopathological changes and genes expression were determined. **Result:** Compared with sham operation group, there were significant increases in serum alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP), increased total bile acid (TBA) and total bilirubin (TBIL) in model group. According to hepatic tissue pathological indexes, neutrophil infiltration and hepatocyte necrosis were apparent, the expression of cholesterol-7 α -hydroxylase (Cyp7a1), 12 α -hydroxylase (Cyp8b1), farnesoid X receptor (FXR), small heterodimer partner (SHP) and Ntcp mRNA expression were decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, QY decreased ALT, ALP activities and TBA, TBIL levels, alleviated the pathological injury, and up-regulated the expression of above genes ($P < 0.05$). **Conclusion:** QY II could protect against cholestatic liver injury, and maintain the stability of bile acid by regulating gene expressions

[收稿日期] 20150708(015)

[基金项目] 遵义市红花岗区科学技术项目(遵红科合社字(2013)09号);遵义市汇川区局项目(E-120)

[第一作者] 徐亚沙,在读硕士,从事药物代谢与毒理研究,Tel:0851-28642303,E-mail:xuyasha2008@163.com

[通讯作者] *刘杰,博士,研究员,从事药物代谢与毒理研究,Tel:0851-28642303,E-mail:jie@liuonline.com

related to bile acid synthesis and transport in liver.

[Key words] Qingyi II; bile-duct ligation; cholestatic liver injury; cholic acid

清胰 II 号是遵义医学院院内制剂,具有利胆、消炎、排石、攻下等功效,方中君药大黄功能逐瘀通经、凉血解毒、清热泻火,临床上常用于治疗急性胰腺炎,且疗效显著^[1]。目前已有研究表明,清胰 II 号的治疗作用是多方面的,包括保护胰腺细胞、调节细胞因子的释放、保护肠黏膜、中和体内毒素、防止肠道细菌和内毒素的移位等^[2]。同时在急性胰腺炎的临床治疗中,观察到其还具有利胆退黄的功效。胆汁淤积属于中医“黄疸”范畴^[3-4]。胆汁形成、分泌和(或)胆汁排泄异常都会导致胆汁淤积性肝损伤,进而引起各种肝病^[4-5]。目前治疗胆汁淤积的方法主要有药物治疗、手术和中药制剂。熊去氧胆酸(UDCA)是公认疗效确切的药物,S 腺苷蛋氨酸(SAME)是治疗肝内胆汁淤积的创新药物,上世纪 80 年代用于治疗孕妇的肝内胆汁淤积;但并非对所有患者有效^[3,6]。利用清胰 II 号具有退黄利胆的功效,观察其治疗或预防胆汁淤积性肝损伤作用,对于清胰 II 号的进一步开发具有重要意义。因此笔者拟采用胆管结扎模型造成的胆汁淤积性肝损伤,探究清胰 II 号是否通过影响胆汁酸合成,维持胆汁酸稳态,进而保护肝脏,从而为该制剂的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康昆明种小鼠 32 只,SPF 级,合格证号 SCXK(贵)2014-0002,体重(22 ± 2) g,适应性喂养 1 周后。

1.2 药物及试剂 清胰 II 号汤剂(遵义医学院附属医院自制,大黄 40 g,赤芍 40 g,芒硝 10 g,木香 15 g,延胡索 15 g,厚朴 15 g,牡丹皮 15 g,栀子 15 g,方剂水煎 1 次,去渣取汁),RNAiso plus[TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司,批号 A9501-1],Power SYBR Green(美国 Bio-Rad 公司,批号 4206381AP),Prime Script™ RT reagent Kit[TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司,批号 AK4801],引物由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成,异丙醇、三氯甲烷、无水乙醇(成都市科龙化工试剂厂,批号分别为 20090220,20120525,2014011401);丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测试剂盒(批号 20140912),碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(批号 20140321),总胆汁酸(TBA)检测试剂盒(批号 20140328),总胆红素(TBIL)检测试剂盒(批号

20140328),均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 985370 型手持式匀浆机(美国 Biospec 公司),Micofuge 20R 型高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),ND-2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo 公司),CFX-R 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);RM2245 型转轮式切片机,TP1020 型自动组组脱水机,EG1150 型石蜡包埋机,DM4000B 型生物显微镜,均购自德国 Leica 公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药 健康小鼠 32 只,随机分为假手术组,模型组,低剂量给药组(0.5 g·kg⁻¹),高剂量给药组(1.0 g·kg⁻¹),预防给药 7 d,假手术组给予等剂量的蒸馏水,第 7 天采用胆管结扎术制备模型,模型成功后 72 h 采集小鼠血液,切取一块肝组织,用 4% 甲醛固定后制备石蜡切片,另取小块于装有 Trizol 的 EP 管中,用于总 RNA 提取。

2.2 血清学指标检测 采用生化试剂盒,按照说明书操作检测 ALT,ALP,TBA 和 TBIL。

2.3 肝病理组织学观察 肝组织固定,石蜡包埋,5 μm 切片,常规 HE 染色,光学显微镜下观察病理变化。

2.4 实时荧光定量-聚合酶链式反应(qPCR)法检测小鼠肝脏胆酸代谢通路相关基因的表达 采用 Trizol 抽提总 RNA,Nano 微量分光光度计检测并鉴定总 RNA 的浓度和纯度。从 NCBI 中查出相关基因序列,由 TaKaRa 生物工程公司设计合成,见表 1。采用两步法逆转录-聚合酶链反应,PCR 反应体系为 15 μL,95 °C 3 min 预变性,95 °C 10 s 变性,60 °C 1 min 退火,40 循环。结果采用相对定量法进行统计。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠血清 ALT,ALP 活性的影响 与假手术组比较,BDL 模型组血清中 ALT,ALP 酶活性明显增高($P < 0.05$),给药组中 ALT,ALP 水平较模型组均有所降低,且高剂量更加显著($P < 0.05$)。见图 1。

3.2 对小鼠血清 TBA, TBIL 水平的影响 与假手术组比较,BDL 模型组血清中 TBA, TBIL 水平明显

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因 | 上游引物 5'-3' | 下游引物 5'-3' | 片段大小/bp |
|----------------|--------------------------|-----------------------|---------|
| β -actin | CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC | ATGGAGCCACCGATCCACA | 171 |
| Cyp7a1 | GGCTAGCATAGCCAACTTGC | TGCCCTTCTGAAGCTCATCT | 98 |
| Cyp8b1 | AGTACACATGGACCCCGACATC | GGGTGCCATCAGGGTTGAG | 77 |
| FXR | CTGACCCTGCCATCCAAGT | TCAGAAGCCGATGTTCTCTCT | 123 |
| SHP | CTCATGGCCTCTACCCTCAA | GGTCACCTCAGAAAAGCAT | 122 |
| Ntcp | GGTGCCCTACAAAGGCATTA | ACAGCCACAGAGAGGGAGAA | 147 |
| Bsep | GGACAATGATGTGCTTGTGG | CACACAAAGCCCTACCAGT | 104 |
| Mrp2 | TCCTAGACAGCGCAAGATT | GCTAGAGCTCCGTGTGTTTC | 123 |

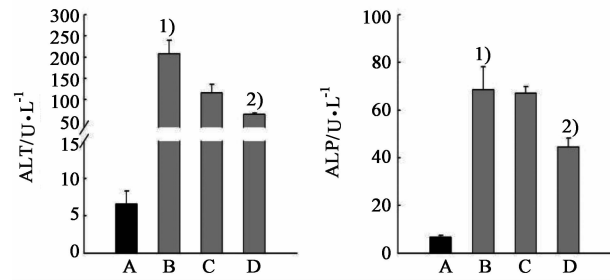


图 1 清胰 II 号对小鼠血清中 ALT 和 ALP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of Qingyi II on ALT and ALP activity in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

增高 ($P < 0.05$), 给药组 TBA, TBIL 水平较模型组均有所降低, 且高剂量更加显著 ($P < 0.05$)。见图 2。

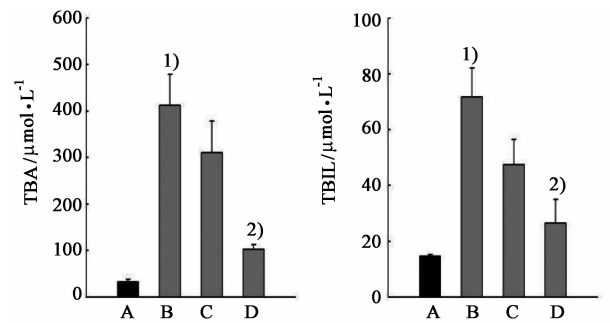


图 2 清胰 II 号对小鼠血清中 TBA 和 TBIL 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of Qingyi II on levels of TBA and TBIL in mice serum ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 对小鼠肝脏组织形态学的影响 假手术组中, 肝小叶结构清晰, 肝细胞完整, 但在模型组中肝细胞排列紊乱, 可见炎性细胞浸润, 肝细胞散在变性、坏死, 小叶周边部出现小胆管样上皮细胞并增生的肝

脏中。清胰 II 号汤剂可改善胆管结扎造成这些病理改变, 尤其是在高剂量给药组, 可见肝细胞炎性细胞及细胞坏死明显减少。见图 3。

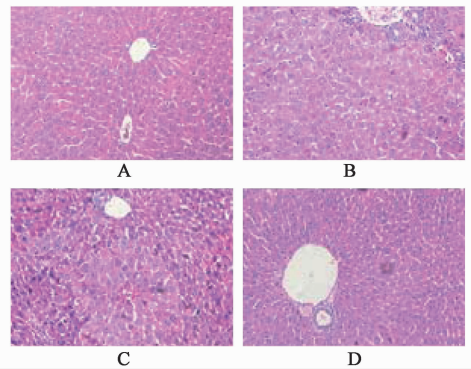


图 3 清胰 II 号对小鼠肝脏组织形态学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of Qingyi II on morphology of liver in mice (HE, $\times 200$)

3.4 对小鼠肝脏胆酸代谢相关基因 mRNA 水平表达的影响

3.4.1 对小鼠胆核受体 FXR, SHP mRNA 表达的影响 与假手术组比较, 模型组 FXR, SHP 的 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 给药后, mRNA 水平较模型组升高, 且随给药剂量的增大而增加, 高剂量增加显著 ($P < 0.05$)。见图 4。

3.4.2 对小鼠肝脏胆汁酸合成基因 Cyp7a1, Cyp8b1 mRNA 的影响 与假手术组比较, 模型组 Cyp7a1, Cyp8b1 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), 给药后, 表达水平较模型组升高, 且随给药剂量的增大而增加, 高剂量增加显著 ($P < 0.05$)。见图 5。

3.4.3 对小鼠肝脏胆汁酸转运体 Ntcp, Bsep, Mrp2 mRNA 的影响 与假手术组比较, 模型组 Ntcp mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), 给药后, 表达水平较模型组升高, 且随给药剂量的增大而增加, 高剂量增加显著 ($P < 0.05$), 而对 Bsep, Mrp2 的表达基本

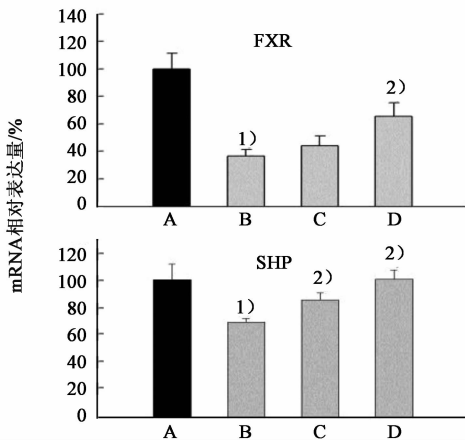


图 4 清胰 II 号对小鼠胆核受体 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 4 Effect of Qingyi II on expression of nuclear receptor mRNA in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

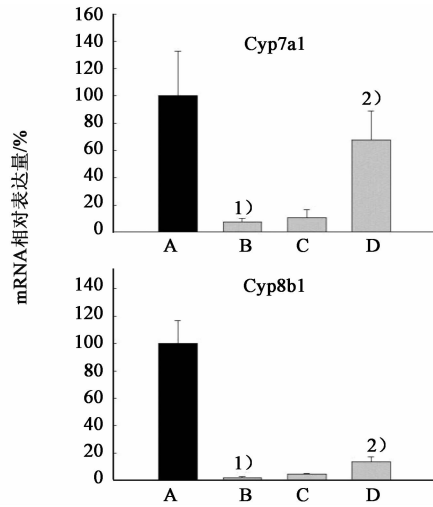


图 5 清胰 II 号对小鼠胆汁酸经典合成通路基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 5 Effect of Qingyi II on expression of classical acid synthesis pathway genes mRNA in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

没有影响。见图 6。

4 讨论

研究结果显示,模型组肝细胞出现水肿、坏死,APT 和 ALP 活性及 TBA, TBIL 水平显著升高,提示清胰 II 号对胆汁淤积性肝损伤具有保护作用;并能明显降低胆汁酸经典合成通路基因 Cyp7a1, Cyp8b1, 调控胆汁酸合成的核受体法尼醇 X 受体 (FXR), 小分子异源二聚体 (SHP) 和胆汁酸转运体钠离子/牛磺胆酸共转运蛋白 (Ntcp) 的 mRNA 表达。清胰 II 号可明显抑制肝细胞的水肿及坏死,降低模型组中 ALT, ALP 的活性以及 TBA, TBIL 水平,不同程度的上调胆酸合成基因 Cyp7a1, Cyp8b1, 核受体 FXR, SHP 和 Ntcp mRNA 表达,提示清胰 II 号对胆汁淤积性肝损伤的保护作用,其机制可能是通

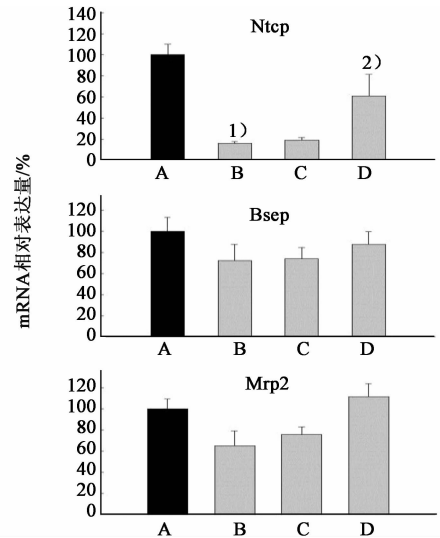


图 6 清胰 II 号对小鼠胆汁酸转运体 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of Qingyi II on expression of bile acid transporters mRNA in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

过作用于胆汁酸合成和转运途径,维持胆汁酸稳态有关。

实验采用胆管结扎模型制模,造成胆管阻塞性黄疸,使胆汁不能入肠^[3,5-6],进而造成胆汁淤积性肝损伤。本实验发现胆管结扎后,TBA 升高,ALT, ALP 升高,肝脏病理表现为肝细胞水肿、变性和坏死,提示胆管结扎后可造成胆汁淤积性肝损伤。

FXR 作为胆汁酸受体,直接参与了多种与胆汁酸代谢和转运相关的基因调控^[7],其调控机制为通过抑制 Cyp7a1, Cyp8b1, 从而减少胆汁酸的合成,维持肝脏胆汁酸平衡^[8-10];本实验发现清胰 II 号使 Cyp7a1 和 Cyp8b1 的表达增高,可能是由于 FXR 调控其他途径调节胆汁酸的合成,进而起到保护作用。

胆汁酸转运体是维持胆汁酸稳态的重要因素之一,FXR 可通过抑制 Ntcp 转录减少胆汁酸重吸收回肝脏,进一步避免高浓度胆汁酸对肝脏的毒性^[8,11-12]。在本实验研究中,清胰 II 号使其 Ntcp 表达增加,推测肝内淤积的胆汁酸可转化为磺酸化胆汁酸^[13]经由其他转运体^[11,14]转运入血,再经由肾脏排泄^[12]。

Bsep 和 Mrp2 是胆汁酸外排入胆道的重要转运体^[11,13,15],本实验中,清胰 II 号对其没有明显影响,可能与胆管结扎阻断了肝内胆胆汁酸的胆道排泄有关。

综上所述,清胰 II 号汤剂对胆管结扎导致的胆汁淤积性肝损伤具有保护作用,可能与其作用于胆

汁酸合成和转运,维持肝内胆汁酸稳态有关。

[参考文献]

- [1] 田应彪,陈泽慧,杨旭丹,等. 高效液相色谱法测定鼠用清胰Ⅱ号颗粒剂后血中大黄素变化[J]. 药物研究, 2009, 18(7):4-5.
- [2] 兑丹华,高占峰,赵鹏,等. 清胰Ⅱ号和粉防己碱对实验性重症急性胰腺炎的治疗作用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(24):2418-2421.
- [3] 范颖,赵红,谢雯.《胆汁淤积性肝病诊断治疗专家共识2013更新》解读[J]. 中国肝脏病杂志:电子版, 2013, 5(4):69-72.
- [4] 郑婷婷,于芳芳,姚嘉明,等. 大黄浸液对急性肝内胆汁淤积大鼠肝脏NF- κ B表达的影响[J]. 浙江中医杂志, 2013, 48(5):380-381.
- [5] 叶少华,芮景. FXR, BSEP, MRP2在阻塞性黄疸中的作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(2):147-149.
- [6] 孙梅,王洋. 胆汁酸代谢障碍及其相关胆汁淤积性肝病[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(4):246-249.
- [7] 蔡丽君,许红梅. 肝内胆汁淤积性肝炎的治疗进展[J]. 中国医药指南, 2008, 6(12):39-41.
- [8] 缪辉来,林木生,张利强,等. 加味大柴胡汤对阻塞性黄疸大鼠胆汁酸代谢的影响及机制[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(8):934-936.
- [9] 吴晓平,柴进,陈文生. 阻塞性胆汁淤积大鼠肝脏胆固醇7 α -羟化酶和核受体FXR、SHP表达变化[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(12):1398-1401.
- [10] 黄伟炜,郑进方,宫晓光,等. 阻塞性黄疸大鼠肝脏中法尼酯衍生物X受体的表达及CDCA对其影响[J]. 海南医学, 2012, 23(22):20-24.
- [11] 范然,吴硕东,金佟岩,等. 获得性淤胆大鼠肝细胞Bsep, Mrp2, Ntcp表达及S-腺苷蛋氨酸作用观察[J]. 肝胆外科杂志, 2007, 15(6):464-466.
- [12] Liu J, Lu Y F, Zhang Y C, et al. Oleanolic acid alters bile acid metabolism and produces cholestatic liver injury in mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 272(3):816-824.
- [13] Yazen Alnouti. Bile acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification [J]. Toxicol Sci, 2009, 108(2):225-246.
- [14] 方晶,薛博瑜. 中医药治疗肝内胆汁淤积的机制研究进展[J]. 环球中医药, 2014, 7(3):233-236.
- [15] 张利强,林木生. 阻塞性黄疸与胆汁酸受体[J]. 广东医学院学报, 2005, 23(3):326-328.

[责任编辑 周冰冰]