

# 茵栀黄注射液基于 FXR 调控 MDR3 治疗 肝内胆汁淤积的作用机制

李琦<sup>1</sup>, 余世锋<sup>2\*</sup>, 曹敏<sup>1</sup>, 兰绍阳<sup>2</sup>, 王家传<sup>3</sup>, 李慧<sup>4</sup>, 谭梅傲<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405;  
3. 深圳市中医院, 广东深圳 518033; 4. 长治医学院, 山西长治 046000)

**[摘要]** **目的:**通过研究茵栀黄注射液(Yinzhihuang injection, YZH)对人正常肝细胞系 HL-7702 细胞的法尼酯 X 受体(farnesoid X receptor, FXR), 多药耐药相关蛋白 3(multidrug resistance associated protein 3, MDR3) 基因表达的影响, 探讨茵栀黄注射液调控肝脏胆汁酸代谢的作用靶点及机制, 为茵栀黄注射液治疗肝内胆汁淤积的临床应用提供实验依据。**方法:**不同浓度茵栀黄注射液干预 HL-7702, 采用细胞活性检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)探索茵栀黄注射液对 HL-7702 的活性影响, 结合实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法确定茵栀黄注射液的理想干预浓度和时间; 用 GW4064(FXR 激动剂)促进 FXR 基因的表达, 分为茵栀黄注射液组, GW4064 组, GW4064 + 茵栀黄注射液组, 正常组, DMSO 组; 小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)沉默 FXR 基因, 分为 siRNA 组, siRNA + 茵栀黄注射液组, 正常组, 阴性组。Real-time PCR 法、蛋白质免疫印迹(Western blot)法分别检测 FXR, MDR3 mRNA 及蛋白质的相对表达量, 免疫荧光(IF)检测 FXR 蛋白的表达。**结果:**研究表明茵栀黄注射液对 HL-7702 的理想干预浓度 1.08%, 理想干预时间为 15.47 h; 茵栀黄注射液对 HL-7702 活性影响呈剂量依赖性; 与正常组比较, GW4064 组促进 FXR, MDR3 mRNA 和蛋白的表达( $P < 0.01$ ); 与正常组比较, siRNA 组抑制 FXR, MDR3 mRNA 和蛋白的表达( $P < 0.01$ ); 与 GW4064 组比较, GW4064 组 + 茵栀黄注射液组促进 FXR, MDR3 mRNA 和蛋白的表达( $P < 0.01$ ); 与 siRNA 组比较, siRNA + 茵栀黄注射液组促进 FXR, MDR3 mRNA 和蛋白的表达( $P < 0.01$ )。**结论:**茵栀黄注射液促进 FXR, MDR3 mRNA 和蛋白的表达, 茵栀黄注射液通过 FXR 促进 MDR3 mRNA 和蛋白的表达来调控肝脏胆汁酸的代谢, 本实验为其临床应用于治疗肝内胆汁淤积提供实验依据。

**[关键词]** 茵栀黄注射液; 法尼酯 X 受体; HL-7702; 多药耐药相关蛋白 3; 胆汁酸; 肝内胆汁淤积

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)13-0145-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017130145

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.1102.042.html>

**[网络出版时间]** 2017-04-20 11:02

## Mechanism of Yinzhihuang Injection in Regulating MDR3 in Treatment of Hepatic Cholestasis Based on FXR

LI Qi<sup>1</sup>, SHE Shi-feng<sup>2\*</sup>, CAO Min<sup>1</sup>, LAN Shao-yang<sup>2</sup>, WANG Jia-chuan<sup>3</sup>, LI Hui<sup>4</sup>, TAN Mei-ao<sup>1</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional

Chinese Medicine (TCM), Guangzhou 510405, China; 3. Shenzhen TCM Hospital,

Shenzhen 518033, China; 4. Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study gene expressions of farnesoid X receptor (FXR) and multidrug resistance associated protein3 (MDR3) in human normal hepatocytes HL-7702 cell through the effect of

**[收稿日期]** 20170119(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81173437)

**[第一作者]** 李琦, 硕士, 从事肝胆脾胃疾病的基础和临床的研究, Tel:18670341236, E-mail:819183497@qq.com

**[通讯作者]** \*余世锋, 博士, 教授, 主任中医师, 博士生导师, 从事肝胆脾胃疾病的基础和临床的研究, Tel:18028690165, E-mail:sheshifeng@Hotmail.com

Yinzhihuang injection (YZH), in order to explore the target and mechanism of YZH injection in regulating hepatic bile acid metabolism, and provide an experimental basis for the clinical application of YZH in the treatment of intrahepatic cholestasis. **Method:** HL-7702 was treated with different concentrations of YZH. The effect of YZH on the activity of HL-7702 was explored by cell counting kit-8 (CCK-8). Real-time PCR was used to determine YZH's ideal intervention concentration and time. The gene expression of FXR was up-regulated by GW4064 (agonist of FXR), and divided into YZH group, GW4064 group, GW4064 + YZH group, normal group and DMSO control group. The gene expression of FXR was silenced by small interfering RNA (siRNA) and divided into siRNA group, siRNA + YZH group, normal group and negative group. Relative mRNA and protein expressions of FXR and MDR3 were detected by real-time quantitative PCR and Western blot, and the protein expression of FXR was detected by immunofluorescence (IF). **Result:** The ideal intervention concentration of YZH on HL-7702 was 1.08%, the ideal intervention time was 15.47 h, and YZH had an effect on the activity of HL-7702 in a dose-dependent manner. Compared with the normal group, GW4064 group promoted the mRNA and protein expressions of FXR and MDR3 ( $P < 0.01$ ). Compared with the normal group, siRNA group inhibited FXR and MDR3 mRNA and protein expressions ( $P < 0.01$ ). Compared with GW4064 group, GW4064 group + YZH group promoted the mRNA and protein expressions of FXR and MDR3 ( $P < 0.01$ ). Compared with siRNA group, siRNA + YZH group promoted the mRNA and protein expressions of FXR and MDR3 ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** YZH promotes FXR and MDR3 mRNA and protein expressions. YZH regulates hepatic bile acid metabolism by promoting the expression of MDR3 mRNA and protein with FXR. This study provides an experimental basis for its clinical application in the treatment of intrahepatic cholestasis.

[**Key words**] Yinzhihuang injection; farnesoid X receptor (FXR); HL-7702; multidrug resistance associated protein 3 (MDR3); bile acid; hepatic cholestasis

肝内胆汁淤积(IC)是指各种病因导致肝内胆汁酸代谢和转运异常,早期常无不适症状,仅表现为血清碱性磷酸酶(ALP),和 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT)升高,若不及时干预,随着病情的进展可有乏力、瘙痒、尿色加深和黄疸等临床表现。IC属于中医黄疸的范畴,茵陈蒿汤为治疗黄疸的基本方,茵陈蒿注射液源于《伤寒论》中的茵陈蒿汤,功效为清热、解毒、利胆、退黄。近年来对茵陈蒿注射液的研究渐渐深入,其成分越来越清楚<sup>[1]</sup>,研究发现茵陈蒿注射液作用广泛<sup>[2-3]</sup>,能降低胆红素,增加胆汁流,调控胆汁酸的代谢,临床上主要用于治疗肝内胆汁淤积<sup>[4]</sup>,但是茵陈蒿注射液治疗黄疸的具体作用靶点和分子机制尚不明确。肝脏胆汁酸代谢主要通过法尼酯X受体(FXR)信号通路调节<sup>[5]</sup>,多药耐药相关蛋白3(MDR3)主要负责磷脂酰胆碱(PC)的转运,转运胆汁酸和胆固醇形成的混合微胶粒,保护胆道系统免于毒胆汁酸和胆盐的损害<sup>[6]</sup>。FXR,MDR3可能是茵陈蒿注射液作用的重要靶点之一,目前大部分茵陈蒿注射液治疗肝内胆汁淤积的研究将FXR及MDR3等膜转运体作为同一层次的指标,忽略了FXR是上游受体,MDR3转运体家族是下游靶基因的关系,对这2个层次的相关性中医药研究

不多。

GW4064是一种人工合成的FXR配体,属于FXR特异性激动剂,其作用是促进FXR的表达,常用DMSO溶解。siRNA介导的RNA干扰机制可以分为启动阶段和效应阶段。启动阶段是指RNaseIII核酶家族的Dicer与双链RNA结合,并将其剪切成21~23nt及37端突出的小分子RNA片段,即siRNA。效应阶段是指siRNA与若干个蛋白组成的RNA诱导沉默复合体结合,并解旋成单链,(RISC)被活化后,活化型RISC受已成单链的siRNA引导,序列特异性地结合在靶基因mRNA上,并切断其mRNA,导致其特异性分解,从而沉默靶基因<sup>[7]</sup>。因此,本课题组选用GW4064和siRNA调控细胞FXR的表达。本课题组前期研究发现茵陈蒿注射液可以调控FXR及胆汁酸膜转运体的表达<sup>[8-10]</sup>,但具体分子机制有待完善。故本实验旨在继续通过细胞分子实验研究茵陈蒿注射液对HL-7702的活性及其FXR,MDR3表达的影响,通过调控FXR的表达,探讨茵陈蒿注射液治疗肝内胆汁淤积的具体作用靶点和分子机制,为其临床应用于提供实验依据。

## 1 材料

1.1 细胞株 HL-7702细胞购自南京科柏生物科

技有限公司,批号 CBP60224。

**1.2 药物及试剂** siRNA 由上海生工生物工程有限公司设计并合成;茵栀黄注射液购自广州中医药大学第一附属医院,石家庄神威药业生产,批号 130113D1;活性检测试剂盒(CCK-8)试剂盒(日本同仁化学研究所,批号 CK04);Anti-Bile Acid Receptor NR1H4 抗体, Anti-ABCB4 抗体及 Anti-Rabbit IgG 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab28676, ab71792, ab150077);TRIzol(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026);BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司,批号 23225);显影试剂盒(德国 Millipore 公司,批号 WBKLS0100);反转录试剂盒(美国 Fermentas 公司,批号 K1622);Maxima SYBR Green/ROX 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix(2 ×)(美国 Fermentas 公司,批号 K0221);Lipofectamine 2000(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号 11668019);GW4064(美国 MCE 公司,批号 HY-50108)。

**1.3 仪器** 371 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),Axio Observer D1 型倒置荧光生物显微镜(德国 Carl Zeiss 公司),PowerPac Basic 型基础电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),7500 型 Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

## 2 方法

**2.1 实验分组** 茵栀黄注射液组药效学研究分组,分别为正常组(只加细胞培养液),0.1%,0.2%,0.4%,0.8%,1.6%,3.2% 茵栀黄注射液组(将茵栀黄注射液直接加入细胞培养液中,按体积比配成不同体积分数的溶液);GW4064 药效研究分组,分别为 0.1% DMSO 组,1,5,10 μmol·L<sup>-1</sup> GW4064 组;茵栀黄注射液组作用机制研究分组:上调 FXR 基因的表达分为茵栀黄注射液组,GW4064 组(FXR 表达上调模型组),GW4064 + 茵栀黄注射液组(造

模后给药组),正常组,DMSO 组;沉默 FXR 基因的表达分为 siRNA 组(FXR 表达沉默模型组),siRNA + 茵栀黄注射液组(沉默后给药组),正常组,阴性组(无干扰效应小 RNA 组即阴性组);免疫荧光实验分为茵栀黄注射液组,GW4064 组,正常组,DMSO 组。

**2.2 细胞培养** HL-7702(正常人肝细胞系)培养在含 10% 的胎牛血清(FBS),100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素以及 100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素的 RPMI 1640 培养基中,37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的恒温恒湿的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。24 h 更换 1 次培养液,48 h 细胞生长可生长至对数生长期,用于后续实验。

**2.3 CCK-8 检测茵栀黄注射液对 HL-7702 增殖与毒性的影响** 3 × 10<sup>3</sup> 个细胞种植在 96 孔板,在 CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后,0.1% ~ 3.2% 茵栀黄注射液加入对应的孔中干预 24 h,3 个复孔,CCK-8 溶液 10 μL 加入各孔,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 2 h,用酶标仪测各孔在 450 nm 的吸光度 A。计算各体积分数的抑制率,抑制率 = [(阴性孔 A - 实验孔 A) / (阴性孔 A - 空白孔 A)] × 100%。实验重复 3 次。利用 Graphad prism 5 软件计算其半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>),用 IC<sub>50</sub> 所对应的茵栀黄注射液浓度探索时间上(3 ~ 24 h,2 倍关系)的 IC<sub>50</sub>。

**2.4 小干扰 RNA(siRNA)调控 FXR,MDR3 mRNA 和蛋白表达** 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞种植在含无抗生素的培养基的 6 孔板中,在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,转染时细胞融合度在 30% ~ 50%,用不含血清的优化培养基稀释转染试剂 Lipofectamine 2000,轻轻混合,室温孵育 5 min,用优化培养基稀释 siRNA,将两者轻轻混合后,室温培养 20 min,将含有 100 nmol·L<sup>-1</sup> 的转染混合液加入对应的孔中,培养 6 h,换成完全培养基,培养 24 h,干预后,检测 FXR,MDR3 mRNA 和蛋白的表达。siRNA 序列见于表 1。

表 1 RNA Oligo 合成序列

Table 1 RNA Oligo synthesis sequence

基因	上游(5'-3')	下游(5'-3')
FXR-homo711	GUGGUACUCUCCUGAAUATT	UAUCCAGGAGAGUACCACTT
FXR-homo1070	CAGGCUUGUUAACUGAAAUTT	AUUUCAGUUAACAAGCCUGTT
FXR-homo1282	CCUCAGGAAUAACAAAUTT	UAUUUGUUAUUCCUGAGGTT
阴性	UUCUCGAACGUGUCAGUTT	ACGUGACACGUCCGAGAATT

**2.5 Real-time PCR 检测 FXR 和 MDR3 mRNA 的表达** Trizol 提取 RNA,严格按照操作手册操作,用 1% 糖脂琼胶跑胶检测 RNA 提取的质量,以提取的

mRNA 3 μg 为模板逆转录为 cDNA,检测 FXR,MDR3 mRNA 的表达。2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法用于计算目的基因的相对表达量。目的基因引物设计利用 Primer 5.0

软件设计,内参引物甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)购自上海生工,具体引物见于(表2)。Real-time PCR仪用于目的基因mRNA的相对定量分析。25 μL反应体系如下,第一链cDNA 2 μL,无RNA/DNA酶水 9 μL,10 μmol·L<sup>-1</sup>浓度的正向引物

0.75 μL和10 μmol·L<sup>-1</sup>浓度的反向引物0.75 μL(终浓度为0.3 μmol·L<sup>-1</sup>),Master Mix(2×)12.5 μL。反应条件为95℃预变性10 min,45个循环的95℃变性15 s,57℃退火15 s,72℃延伸30 s,溶解曲线执行用于检测目的基因的特异性。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	上游(5'-3')	下游(5'-3')
FXR	TGCATGACTTTGTGTGCGAGG	GCGACTGAGAAAAAATGTGAAGC
MDR3	ATGGCCCTACTTTGTCTGTGG	CTGCTTCACTGCATCATCGC

**2.6 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测FXR和MDR3蛋白的表达** Western blot根据标准操作手册操作,干预后的细胞用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗2遍,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液打散细胞,冰上孵育10 min。超声细胞破碎仪粉碎,在冰上放置10 min,于4℃条件下13 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清液,蛋白定量,后将已定量的蛋白样品与2×加样缓冲液按1:1的比例混合,把样品在90℃的金属浴中煮5 min使蛋白充分变性。30 μg提取的蛋白用10%~12%的SDS-PAGE电泳分离,随后转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。含5%牛血清蛋白(BSA)和0.1%聚山梨酯-20(Tween-20)的PBS在室温下摇床上孵育1 h,加入1抗后,4℃孵育过夜。洗涤缓冲液(TBST)洗3次,每次10 min,2抗室温下孵育2 h(1抗和2抗的浓度见表3)。随后用加增强化学发光显色剂显色,在显影仪下拍摄。

用两独立样本T检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验,不符合正态分布则采用未假定方差齐性下面的Tamhane's T2检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 茵栀黄注射液对HL-7702的增殖和毒性影响** 0.1%,0.2%,0.4%,0.8%,1.6%,3.2%茵栀黄注射液干预24 h,IC<sub>50</sub>为1.08%。1.2%茵栀黄注射液干预细胞系探索干预时间上的IC<sub>50</sub>为15.47 h。

**3.2 茵栀黄注射液,GW4064及siRNA对HL-7702的FXR,MDR3 mRNA表达的影响**

**3.2.1 茵栀黄注射液对HL-7702的FXR mRNA表达水平的影响** 茵栀黄注射液干预HL-7702细胞16 h,GW4064,0.1% DMSO干预细胞24 h,0.6%及1.2%茵栀黄注射组FXR mRNA表达较正常组比明显升高,0.3%及2.4%茵栀黄注射液组FXR基因表达较正常组比未见明显升高。DMSO组与正常组比较,FXR mRNA未见明显升高,表明DMSO溶剂不影响GW4064对FXR mRNA的调控。5,10 μmol·L<sup>-1</sup> GW4064组FXR mRNA表达较DMSO组比显著升高(P<0.01)。0.6%及1.2%茵栀黄注射液,10 μmol·L<sup>-1</sup> GW4064用于后续实验。见表4,5。

表3 抗体使用浓度

Table 3 Antibody use concentration

抗体	WB抗体浓度	相对分子质量/kDa
FXR	1:2 000	50
MDR3	1:300	160
β-actin	1:2 000	40

**2.7 免疫荧光检测FXR基因蛋白质的表达** 细胞种植在细胞爬片上24 h,干预后用4%多聚甲醛室温固定,0.2% Triton X-100透化,正常非免疫血清(羊)室温封闭,1抗(1:600)在4℃孵育过夜,2抗(1:1 200)室温孵育30 min,闭光1抗和2抗浓度见表3,DAPI(含甘油)试剂染核,蔡司倒置荧光显微镜拍摄,Photoshop处理图片。

表4 茵栀黄注射液的FXR mRNA表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 4 Effect of Yinzhihuang injection (YZH) on expression of FXR mRNA in HL-7702 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	FXR
正常	-	1.02 ± 0.23
茵栀黄注射液	0.3	0.81 ± 0.30
	0.6	8.21 ± 1.80 <sup>1)</sup>
	1.2	4.97 ± 1.33 <sup>1)</sup>
	2.4	0.80 ± 0.28

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与DMSO组比较<sup>2)</sup>P<0.01(表5同)。

表 5 GW4064 对 HL-7702 的 FXR mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 5 Effect of GW4064 on expression of FXR mRNA in HL-7702 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FXR
正常	-	1.01 ± 0.07
DMSO	-	1.00 ± 0.05
GW4064	1	0.39 ± 0.06 <sup>2)</sup>
	5	1.82 ± 0.02 <sup>2)</sup>
	10	1.78 ± 0.02 <sup>2)</sup>

**3.2.2 茵栀黄注射液对 HL-7702 的 MDR3 mRNA 表达水平的影响** 1.2% 茵栀黄注射液组 MDR3 mRNA 较正常组比显著升高 ( $P < 0.01$ )。1.2% 茵栀黄注射液用于后续实验。见表 6。

表 6 茵栀黄注射液对 HL-7702 的 MDR3 mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 6 Effect of YZH on expression of MDR3 mRNA in HL-7702 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	体积分数/%	MDR3
正常组	-	1.00 ± 0.01
茵栀黄注射液	0.6	0.70 ± 0.04 <sup>1)</sup>
	1.2	1.53 ± 0.06 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2.3 GW4064 和茵栀黄注射液对 HL-7702 的 FXR, MDR3 mRNA 表达水平的影响** GW4064 组为 GW4064 干预 24 h, 茵栀黄注射液组为茵栀黄注射液干预 16 h, GW4064 + 茵栀黄注射液组为 GW4064 干预 24 h 后, 茵栀黄注射液干预 16 h。DMSO 组与正常组比较, FXR, MDR3 mRNA 未见明显升高, 表明 DMSO 溶剂不影响 GW4064 对 FXR 和 MDR3 的调控。茵栀黄注射液组及 GW4064 组 FXR, MDR3 mRNA 表达较 DMSO 组显著升高 ( $P < 0.01$ ), 实验结果表明 FXR 上调细胞造模成功。GW4064 + 茵栀黄注射液组 FXR, MDR3 mRNA 表达较 GW4064 组显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 7。

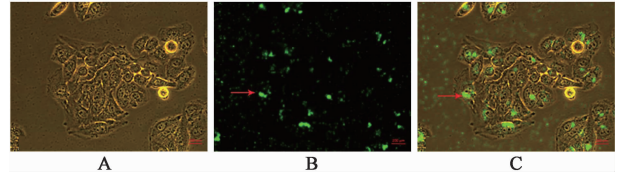
表 7 GW4064 和 YZH 对 HL-7702 的 FXR 和 MDR3 mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 7 Effect of GW4064 and YZH on expression of FXR and MDR3 mRNA in HL-7702 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	FXR	MDR3
正常	1.01 ± 0.07	1.00 ± 0.11
DMSO	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06
茵栀黄注射液	4.97 ± 0.43 <sup>1)</sup>	1.53 ± 0.06 <sup>1)</sup>
GW4064	1.78 ± 0.02 <sup>1)</sup>	1.89 ± 0.11 <sup>1)</sup>
GW4064 + 茵栀黄注射液	4.84 ± 0.25 <sup>1,2)</sup>	3.26 ± 0.07 <sup>1,2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; GW4064 + 茵栀黄注射液组与 GW4064 组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2.4 siRNA 转染** siRNA 转染 24 h 后, 光学显微镜显示细胞转染前生长状态良好, FAM 标记的 siRNA 表明同一区域细胞的转染状态, 融合之后, 结果表明绿色荧光标记的 siRNA 转染至细胞核, 转染效率佳。见图 1。



A. 光学对照图; B. FAM 标记的 siRNA; C. 融合

图 1 siRNA 转染效果 (免疫荧光,  $\times 400$ )

Fig. 1 Transfection effect of siRNA (IF,  $\times 400$ )

**3.2.5 siRNA 下调 FXR 基因表达后, 茵栀黄注射液对 HL-7702 的 FXR, MDR3 mRNA 表达水平的影响** siRNA 转染 24 h 后, 茵栀黄注射液干预 16 h, NC 组 FXR, MDR3 mRNA 表达较之正常组未见明显变化, 结果表明合成 siRNA 具有特异性, 试剂可靠。siRNA 组 FXR, MDR3 mRNA 表达较正常组显著降低 ( $P < 0.01$ ), 结果表明 FXR 沉默细胞造模成功。siRNA + 茵栀黄注射液组 FXR, MDR3 mRNA 表达较 siRNA 组显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 8。

表 8 siRNA 下调 FXR 基因表达后, 茵栀黄注射液对 HL-7702 的 FXR, MDR3 mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 8 siRNA down-regulated expression of FXR, effect of YZH on expression of FXR and MDR3 mRNA in HL-7702 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	FXR	MDR3
正常	1.01 ± 0.04	1.06 ± 0.06
阴性	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.06
siRNA	0.31 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.59 ± 0.01 <sup>1)</sup>
siRNA + 茵栀黄注射液	0.91 ± 0.11 <sup>1,2)</sup>	0.72 ± 0.03 <sup>1,2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与 siRNA 组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.3 Western blot 检测茵栀黄注射液, GW4064 及 siRNA 对 HL-7702 的 FXR, MDR3 的蛋白相对表达量的影响**

**3.3.1 GW4064, 茵栀黄注射液对 HL-7702 的 FXR, MDR3 蛋白质表达水平的影响** GW4064 组为 GW4064 干预 24 h, 茵栀黄注射液组为茵栀黄注射液干预 16 h, GW4064 + 茵栀黄注射液组为 GW4064 干预 24 h 后加入茵栀黄注射液干预 16 h。DMSO 组与正常组比较, FXR, MDR3 未见明显升高, 表明 DMSO 溶剂不影响 GW4064 对 FXR 和 MDR3 的调控。茵栀黄注射液组及 GW4064 组 FXR, MDR3 蛋白质表达较 DMSO 组显著升高 ( $P < 0.01$ ), 实验结果表明 FXR 上调细胞造模成功。GW4064 + 茵栀黄

注射液组 FXR, MDR3 蛋白质表达较 GW4064 组显著升高( $P < 0.01$ )。见图 2, 表 9。

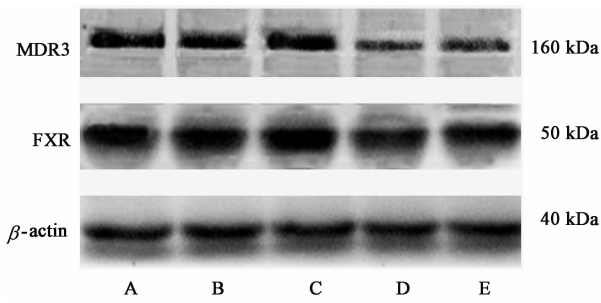


图 2 GW4064, 茵陈黄注射液对 HL-7702 的 FXR, MDR3 蛋白表达水平的影响

表 9 GW4064, 茵陈黄注射液对 HL-7702 的 FXR, MDR3 蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	FXR	MDR3
正常	1.02 ± 0.03	1.00 ± 0.03
DMSO	1.02 ± 0.06	0.93 ± 0.15
茵陈黄注射液	1.30 ± 0.09 <sup>1)</sup>	1.51 ± 0.19 <sup>1)</sup>
GW4064	1.26 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.45 ± 0.09 <sup>1)</sup>
GW4064 + 茵陈黄注射液	1.51 ± 0.09 <sup>1,2)</sup>	1.65 ± 0.13 <sup>1,2)</sup>

注:与 DMSO 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; GW4064 + 茵陈黄注射液组与 GW4064 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3.2 siRNA 下调 FXR 基因表达后, 茵陈黄注射液对 HL-7702 的 FXR, MDR3 蛋白相对表达量水平的影响** siRNA 转染 24 h 后, 茵陈黄注射液干预 16 h, NC 组 FXR, MDR3 蛋白表达较之正常组未见明显变化, 结果表明合成 siRNA 具有特异性, 试剂可靠。siRNA 组 FXR, MDR3 蛋白表达较正常组显著降低( $P < 0.01$ ), 结果表明 FXR 沉默细胞造模成功。siRNA + 茵陈黄注射液组 FXR, MDR3 蛋白表达较 siRNA 组显著升高( $P < 0.01$ )。见图 3, 表 10。

**3.4 IF 检测茵陈黄注射液和 GW4064 对 HL-7702 的 FXR 蛋白的影响** 茵陈黄注射液干预 HL-7702 细胞 16 h, GW4064 干预细胞 24 h 后, 显示正常组 FXR 蛋白表达较弱, DMSO 组 FXR 蛋白表达比正常组更弱, GW4064 组 FXR 蛋白表达较正常组显著增强, 茵陈黄注射液组 FXR 蛋白表达较正常组显著增强, 茵陈黄注射液组 FXR 蛋白表达多于 GW4064 组。见图 4。

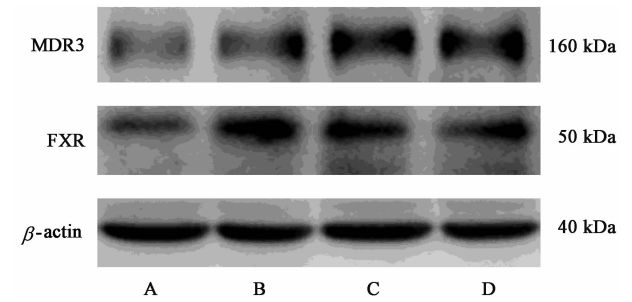


图 3 siRNA 下调 FXR 基因表达后, 茵陈黄注射液对 HL-7702 的 FXR, MDR3 蛋白表达水平的影响

表 10 siRNA 下调 FXR 基因表达后, 茵陈黄注射液对 HL-7702 的 FXR, MDR3 蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

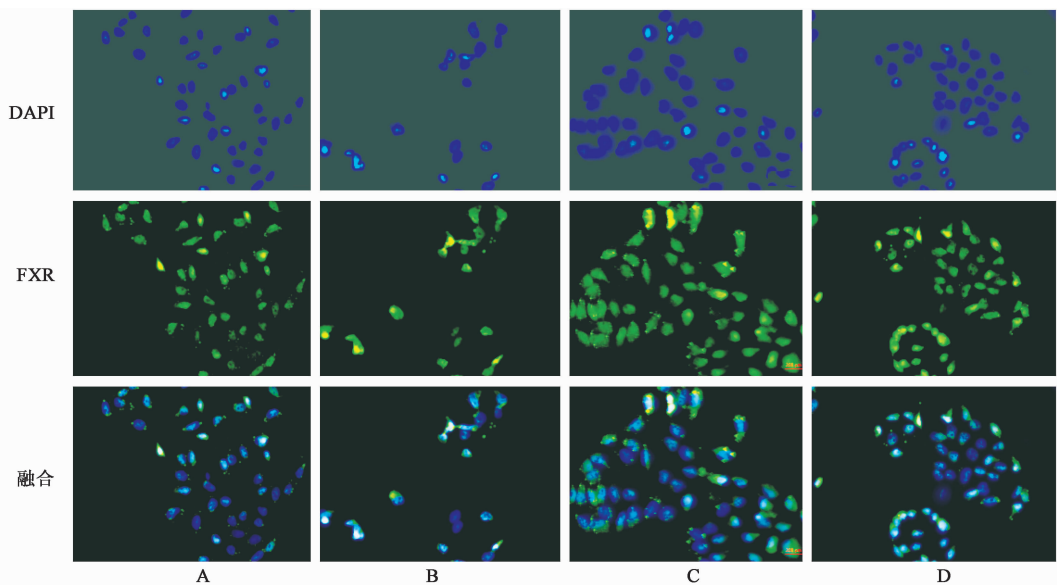
组别	FXR	MDR3
正常	1.02 ± 0.03	1.01 ± 0.03
阴性	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02
siRNA	0.38 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.47 ± 0.05 <sup>1)</sup>
siRNA + 茵陈黄注射液	0.72 ± 0.08 <sup>1,2)</sup>	0.65 ± 0.08 <sup>1,2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 siRNA 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

茵陈黄注射液对 HL-7702 的干预浓度目前尚无相关文献报导, 谭桢等<sup>[2]</sup> 在脾细胞增殖实验中发现, 茵陈黄注射液对脾细胞增殖的抑制作用呈剂量依赖性。本实验采用 CCK-8, Real-time PCR 法探索不同浓度的茵陈黄注射液对 HL-7702 的活性影响, 实验结果表明 1.2% 的茵陈黄注射液干预 16 h 较为理想。对于 GW4064 干预 HL-7702 的浓度和作用时间, 尚无文献记录, 本实验发现 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GW4064 干预 24 h 可以促进 FXR 基因的表达。FXR 基因常见的调控方法 shRNA, siRNA, 激动剂, 拮抗剂, 基因敲除等, 本研究采用 GW4064, siRNA 调控 FXR 表达是一个较为成熟的造模方案。

FXR 是孤儿核受体家族成员, 最早由 Forman 等<sup>[11]</sup> 于 1995 年在大鼠肝脏 cDNA 文库中克隆发现。1999 年多个课题组报道生理浓度下胆汁酸是 FXR 内源性配体<sup>[12]</sup>。FXR 内源性配体有鹅脱氧胆酸、石胆酸、脱氧胆酸和胆酸。人工合成激动剂有 GW4064, fexaramine, AGN34, 6-ECDCA, 以及雄甾酮、咖啡醇、拟雌内酯等<sup>[13]</sup>。本研究发现茵陈黄注射液可以促进 HL-7702 细胞 FXR 表达, 茵陈黄注射



A. 正常组; B. DMSO 组; C. GW4064 组; D. 茵栀黄注射液组

图 4 茵栀黄注射液, GW4064 对 HL-7702 的 FXR 蛋白表达的影响(免疫荧光,  $\times 400$ )

Fig. 4 YZH and GW4064 on expression of FXR protein in HL-7702 cells(IF,  $\times 400$ )

液可能含有 FXR 配体成分。尽管目前已有多种 FXR 的激动剂被发现,但这些化合物都存在着一定的缺陷,特别是药代动力学性质较差,由于 FXR 和下游的多条靶基因通路相关,单纯的激活和抑制 FXR 的活性,都会导致副作用,故而其临床应用受到限制。虽然 6-ECDCA 已经应用于临床试验,但是其副作用不明,疗效尚不确切,市场经济等社会因素也有待考察。最新的一项为期 1 年的随机、双盲、安慰剂对照的 III 期临床试验显示,FXR 激动剂 OCA 治疗组相较于安慰剂对照组,其 AKP 和总胆红素水平有显著下降,但均未发现其对肝脏组织学有改善作用,OCA 治疗患者发生皮肤瘙痒较安慰剂组更多<sup>[14]</sup>,长期应用 OCA 的安全性仍有待进一步研究。因此,探索发现可以激活 FXR 并选择性地调节 FXR 下游基因的表达的化合物是必要的。从目前茵栀黄注射液应用的临床效果和不良反应来评价,结合本实验的结果,为开发此种类型化合物提供了可能的方向。

MDR3 专业学名为 ABCB4,位于常染色体 7q21.1。编码的 MDR3 型糖蛋白是一种磷脂翻转酶,主要在肝细胞毛细胆管膜上表达,负责 PC 的转运,转运胆汁酸和胆固醇形成的混合微胶粒,保护胆道系统免于毒胆汁酸和胆盐的损害<sup>[15]</sup>。当其基因突变,令编码的糖蛋白丢失或功能丧失,以致胆道内磷脂浓度降低,缺乏磷脂的胆汁成分可能导致胆管受损,胆石沉积,诱发炎症并进一步导致各种肝脏疾病。MDR3 基因缺陷会导致 3 型进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC-3)和妊娠期肝内胆汁淤积症

(ICP),超过 45 个 MDR3 基因的致病突变已经被发现,与 PFIC-3 相关的达 30 余种<sup>[16]</sup>。熊脱氧胆酸是治疗 MDR3 的首选药物,尤其对 MDR3 发生错义突变的患者疗效更为确切。但是不同患者对于熊脱氧胆酸的疗效反应不一,存在突变类型的依赖性,熊脱氧胆酸对提前生成终止密码子导致截断蛋白产生的患者几乎无效。尽管这部分患者可以选择部分胆汁分流术治疗,但持续性的胆汁引流会导致水、电解质及酸碱平衡的紊乱,造瘘口出现出血、感染等并发症可能导致部分患者接受二次手术,最终还是选择肝移植治疗,不一定能改变该病的最终结局。因此,寻找一种比熊脱氧胆酸疗效更好的,其疗效不依赖 MDR3 基因突变型的药物更为理想。本研究发现茵栀黄注射液可以促进 MDR3 表达,但是 YZH 基于此思路是否可行还有待进一步研究和证明。

任永申等<sup>[17]</sup>研究表明茵栀黄注射液中的黄芩苷及香豆素对体外四氯化碳所致肝细胞损伤具有保护作用。张宝芹等<sup>[18]</sup>研究表明茵栀黄注射液联合 UDCA 治疗自身免疫性肝炎具有很好的临床效果,能够促进肝功能改善,还可改善肝纤维化,具有一定的临床推广应用价值。张莉等<sup>[19]</sup>研究表明治疗组中地塞米松与茵栀黄注射液合用治疗妊娠期肝内胆汁淤积症,与对照组比较,总胆汁酸(TAB),总胆红素(TB),直接胆红素(DB),早产,胎儿宫内窘迫,产后出血量均有显著差异。大量的临床试验结果表明茵栀黄注射液在治疗与 FXR,MDR3 相关性疾病所导致的肝内胆汁淤积能取得良好的疗效,但缺乏相

应的机制研究和实验依据。

本研究结果显示茵栀黄注射液通过调控 FXR 的表达来调控 MDR3 的表达,茵栀黄注射液通过作用于 FXR 而在胆汁酸代谢中发挥重要作用。本研究表明茵栀黄注射液基于 FXR 调控 MDR3,完善了其治疗肝内胆汁淤积的具体作用靶点和分子机制,为其临床应用提供了实验依据。

[参考文献]

[1] DU Y, HAN J, SUN S A, et al. Simultaneous determination of 11 components in Yinzhihuang preparations and their Constituent Herbs by high-performance liquid chromatography with diode array detector[J]. J Chromatogr Sci, 2016, 54(4): 625-632.

[2] 谭楨,刘爱明,罗敏,等. 茵栀黄注射液抗胆汁淤积药效成分的筛选及其作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6): 1113-1118.

[3] OU Q Q, QIAN X H, LI D Y, et al. Yinzhihuang attenuates ANIT-induced intrahepatic cholestasis in rats through upregulation of Mrp2 and Bsep expressions[J]. Pediatr Res, 2016, 79(4): 589-595.

[4] WANG X, SHEN S, LI N, et al. Effect of ursodeoxycholic acid on liver cirrhosis with hepatitis B[J]. J Central South Univ (Med Sci), 2010, 35(2): 171-175.

[5] Makishima M, Okamoto A Y, Repa J J, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids[J]. Science, 1999, 284(5418): 1362-1365.

[6] Smit J J, Schinkel A H, Oude Elferink R P, et al. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease[J]. Cell, 1993, 75(3): 451-462.

[7] 刘元宁,常亚萍,李茹,等. 针对 H1N1 病毒的多特征 siRNA 设计[J]. 吉林大学学报:工学版, 2010, 40(3): 776-779.

[8] 兰绍阳,余世锋,张达坤. 茵陈蒿汤对肝内胆汁淤积湿热证大鼠肝组织 NTCP 表达的影响[J]. 中药新药

与临床药理, 2012, 23(3): 279-283.

[9] 吴海滨,余世锋,兰绍阳. 基 FXR 探讨茵栀黄注射液利胆退黄的机制研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(4): 845-848.

[10] 吴海滨,余世锋,兰绍阳. 茵栀黄注射液对肝内胆汁淤积湿热证大鼠 NTCP、BSEP 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(10): 2318-2321.

[11] Forman B M, Goode E, CHEN J, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites[J]. Cell, 1995, 81(5): 687-693.

[12] Parks D J, Blanchard S G, Bledsoe R K, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor[J]. Science, 1999, 284(5418): 1365-1368.

[13] 李卫华,付静,郑明月,等. 核受体 FXR 的配体及复合物结构研究进展[J]. 药学学报, 2012, 47(6): 704-715.

[14] Nevens F, Andreone P, Mazzella G, et al. A placebo-controlled trial of obeticholic acid in primary biliary cholangitis[J]. N Engl J Med, 2016, 375(7): 631-643.

[15] Oude Elferink R P, Paulusma C C. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein) [J]. Pflugers Arch, 2007, 453(5): 601-610.

[16] Trauner M, Fickert P, Wagner M. MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes [J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(1): 77-98.

[17] 任永申,张萍,鄢丹,等. 茵栀黄注射液对体外四氯化碳致肝细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 115-117, 121.

[18] 张宝芹,王柏青,孙光斌. 茵栀黄注射液联合熊去氧胆酸治疗自身免疫性肝炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(11): 1792-1795.

[19] 张莉,许吟. 茵栀黄注射液在妊娠期肝内胆汁淤积症治疗中的辅助应用[J]. 贵阳中医学院学报, 2003, 25(2): 30-31.

[责任编辑 周冰冰]