龙胆泻肝丸对胆汁淤积大鼠肝脏多药耐药蛋白及中性粒细胞 CD18 表达影响的研究

董伟,梁爱华*,李春英,汤喜兰,王金华,薛宝云,王秀坤
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

[摘要] **目的**:从与胆汁分泌有关的转运蛋白及中性粒细胞 CD18 分子的角度探讨龙胆泻肝丸(LD)清肝胆,利湿热的可能作用机制。**方法**:将 20 只大鼠分为 4 组:对照组,模型组,LD 5.0,2.5 $g.kg^{-1}$(按生药计算)组。给药组每日 ig 给药 1 次,连续 8 d,对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水。其中第 5 天给药 1 h 后,除对照组 ig 花生油外,其他各组大鼠按 100 $mg·kg^{-1}$ 1 次性 ig α-萘异硫氰酸酯(ANIT)花生油。第 8 天摘取大鼠肝脏,提取肝脏总 RNA,RT-PCR 检测多药耐药蛋白 MDR1a,MDR1b,MDR2 和多药耐药相关蛋白 MRP1 mRNA,MRP2 mRNA 的表达;眼眶静脉取抗凝血,流式细胞仪测定中性粒细胞 CD18 表达,血细胞计数仪测定白细胞及粒细胞总数。**结果**:模型组大鼠肝组织 MDR1a,MDR1b mRNA 表达显著增加($P<0.05$,$P<0.01$),MDR2 mRNA,MRP2 mRNA 分别有表达增加或降低的趋势,MRP1 mRNA 的表达无明显变化。LD 5.0,2.5 $g·kg^{-1}$对胆汁淤积大鼠的肝组织 MDR1a,MDR1b,MDR2,MRP1,MRP2 mRNA 表达均无明显影响。LD 各给药组白细胞总数以及粒细胞总数有下降趋势,CD18 荧光强度明显低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论**:龙胆泻肝丸对 ANIT 诱导的胆汁淤积(类肝胆湿热证)具有利胆保肝作用,其作用机制主要与其抑制白细胞黏附,降低胆管炎症反应,减轻胆管损伤,从而有利于胆汁排泄有关,而与胆管上皮的转运体蛋白分子 MDR,MRP 关系可能不大。

[关键词] 龙胆泻肝丸;胆汁淤积;多药耐药蛋白;多药耐药相关蛋白;CD18
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)21-0214-04

Effects of Longdan Xiegan Pill on Expression of Multidrug Resistance Protein and Neutrophil CD18 in Cholestatic Rats

DONG Wei, *LIANG Ai-hua* *, *LI Chun-ying*, *TANG Xi-lan*, *WANG Jin-hua*, *XUE Bao-yun*, *WANG Xiu-kun*
(*Institute of Chinese Materia Medica*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To observe the effect of Longdan Xiegan pill (LD) on expression of multidrug resistance protein and neutrophil CD18 and tclarify the possible mechanism of LD to clear dampness-heat of liver and gallbladder. **Method**: Twenty healthy Wistar rats were randomly divided into 4 groups: control group, ANIT-treated model group, LD 5.0 $g·kg^{-1}$ group and LD 2.5 $g·kg^{-1}$ group. LD groups were administered orally for 8 days, while control group and model group were administered orally with equal distilled water, once daily. After the last administration for 1 h, model group and LD groups were treated with 100 $mg·kg^{-1}$ ANIT, while control group was administered with equal peanut oil. After administration of ANIT 72 hours, The liver total RNA of all rats wwas extracted and the levels of MDR1a, MDR1b, MDR2, MRP1 and MRP2 mRNA in liver tissue were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of CD18 was measured by using flow cytometer. Total leukocytes and granular leukocytes were counted by using microcomputer controlled hematology analyzer. **Result**: The expression of MDR1a, MDR1b mRNA in model group wwas significantly higher than that of control group ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression of MDR2, MRP1, MRP2 mRNA was not obviously changed.

[收稿日期] 20110316(019)
[通讯作者] *梁爱华,Tel:010-64288601,E-mail:liangaihua@ sina. com

LD 5.0,2.5 g·kg^{-1} group had no obvious effects on expression of multidrug resistance protein in cholestatic rats. LD groups could reduce total leukocytes granular leukocytes and CD18 fluorescence intensity. **Conclusion**: LD has protection in ANIT-induced cholestatic rats, which is similar to the syndrome of dampness-heat of liver and gallbladder. The protection mechanism maybe mainly related to inhibiting endothelial-leukocyte adhesion, inhibiting inflammatory responses in bile ducts, alleviating biliary injuries, increasing bile flow of intrahepatic bile ducts, not related to the expresion of MRP1 and MRP2 mRNA in biliary epithelial cells.

[**Key words**] Longdan Xiegan pill; cholestasis; multidrug resistance protein; multidrug resistance-associated protein; CD18

龙胆泻肝丸由龙胆、柴胡、黄芩、栀子、泽泻、木通、车前子、当归、地黄、炙甘草组成。临床用于治疗肝胆湿热。已有研究表明含有木通的龙胆泻肝丸能显著增加 α-萘异硫氰酸酯(ANIT)所致胆汁淤积大鼠的胆汁分泌量,并降低肝损伤及胆管损伤的程度,有降低血清 TBil,DBil 水平的趋势[1]。

多药耐药蛋白(MDR)和多药耐药相关蛋白(MRP)属于 ABC 结合盒转运体(ATP binding cassette transporter, ABC)家族,后者是一组跨膜蛋白,与 ATP 结合在胞膜、内质网、过氧化物酶体、线粒体等细胞器膜上,介导氨基酸、脂质、脂多糖、无机离子、多肽、糖类、各种药物等多种分子的耗能转运。ABC 转运体的变异可以相应引起多种疾病[2]。分布在胆小管的 ABC 转运体调节胆小管胆汁的分泌,胆小管分泌量占人日胆汁分泌量的大约 75%。大多数分泌有机阴离子和脂质的胆小管转运蛋白是 ABC 转运蛋白,如 MDR 和 MRP[3]。细胞黏附分子是一类能介导细胞基质黏附的糖蛋白,除参与免疫调节、免疫损伤等生理和病理过程外,还在炎症应答过程中起重要作用。淤胆性肝疾病时胆汁淤积致肝的损伤、功能障碍及感染与细胞黏附分子有一定关系。CD11b/CD18 是中性粒细胞表达的重要的黏附分子,介导激活中性粒细胞与内皮细胞的早期黏附[4]。

本实验通过 ANIT 造成大鼠胆汁淤积模型,观察龙胆泻肝丸(LD)对 MDR 和 MRP 及中性粒细胞 CD18 的影响,探讨 LD 的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雄性,20 只。体重(240 ± 20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2002-0003。

1.2 药品 龙胆泻肝丸药味组成及方中药物比例与《中国药典》2005 年版相同,其中木通为三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.。每 100 g 生药得提取物 11 g,由北京同仁堂集团公司提供。

1.3 仪器 Centrifuge 5810R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);GeneQuant Ⅱ 核酸定量仪(美国 Pharmacia 公司);GeneAmp PCR System 9700 PCR 仪(美国 ABI 公司);凝胶成像系统(英国 Syngene 公司);DYY-Ⅲ31B 型电泳仪(北京市六一仪器厂);EPICS XL 流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司);MEK-6318 血球计数仪(日本光电公司)。

1.4 试剂 ANIT,由美国 Sigma 公司生产。TRIZOL Reagent, Super Script™ Ⅲ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Platinum *Taq* DNA Polymerase, 10 mmol·L^{-1} dNTP Mix, Low DNA Mass Ladder,由美国 Invitrogen 公司生产。琼脂糖,由英国 Oxoid 公司生产。荧光标记的 Mouse Anti Rat CD18 (MCA775PE),由英国 Serotec 公司生产。肝素钠(批号 20040607),由国药集团化学试剂有限公司生产。其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 分组及给药 将大鼠按体重随机分成 4 组:对照组,模型组,LD 5, 2.5 g·kg^{-1}组,每组 5 只。大鼠每日 ig 给药 1 次,连续 8 d。对照组和模型组给予等体积蒸馏水。于第 5 d 给药 1 h 后,模型和给药组大鼠按 100 mg·kg^{-1} 1 次性 ig ANIT 花生油(10 g·L^{-1}),对照组大鼠 ig 等体积花生油。第 8 d 给药后 1 h,以 20% 乌拉坦(0.5 mL/100 g) ip 麻醉,取血和肝脏。第 8 d 实验前动物禁食不禁水 16 h。

2.2 MDR 和 MRP mRNA 表达 将肝脏置于预冷的研钵中,在液氮冷冻条件下将肝脏捣碎成粉末,待液氮自然挥干后,按试剂盒说明用 TRIzol 试剂提取大鼠肝组织总 RNA。参照文献[5]合成大鼠 MRP1, MRP2, MDR1a, MDR1b, MDR2 目标基因引物和 GAPDH 看家基因引物(表 1)。按照试剂盒说明书,先用提取的总 RNA 反转录出 cDNA。再用 cDNA 进

行 PCR 扩增,反应总体积为 50 μL。MDR1a,MDR1b,MDR2,MRP2 反应条件:94 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,完成 30 个循环,72 ℃再延伸 5 min 获得基因片段;MRP1 的反应条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,完成 35 个循环,72 ℃再延伸 5 min 获得基因片段。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后进行吸光度扫描,将 MDR1a,MDR1b,MDR2,MRP1,MRP2 mRNA 扩增条带的吸光度值与 GAPDH 的吸光度值之比作为衡量参数,分析其各自表达。

表 1 引物序列及预计 PCR 产物大小

引物	正义与反义序列	PCR 产物 /bp
MRP1	5′-TTCTAGTGTTGGACGAGGCT-3′ 5′-TGGCCATGCTATAGAAGACG-3′	227
MRP2	5′-ACCTTCCACGTAGTGATCCT-3′ 5′-GATTTCCCAGAGCCTACAGT-3′	1 084
MDR1a	5′-GATGGAATTGATAATGTGGACA-3′ 5′-AAGGATCAGGAACAATAAA-3′	351
MDR1b	5′-GAAATAATGCTTATGAATCCCAAAG-3′ 5′-GGTTTCATGGTCGTCGTCTCTTGA-3′	325
MDR2	5′-AAGAATTTGAAGTTGAGCTAAGTGA-3′ 5′-TGGTTTCCACATCCAGCCTAT-3′	143
GAPDH	5′-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3′ 5′-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3′	576

2.3 外周血白细胞计数及中性粒细胞 CD18 表达 大鼠眼眶静脉丛取血,采用血球计数仪测定白细胞及粒细胞总数。取抗凝血 100 μL,加入 PE 标记的 Mouse Anti Rat CD18 抗体 5 μL 混匀,加入红细胞溶解液 3 mL,反应 4 min。1 500 $r \cdot min^{-1}$ 离心 3 min。加入 PBS 3 mL,1 500 $r \cdot min^{-1}$ 离心 3 min,弃上清。再次加入 PBS 3 mL,1 500 $r \cdot min^{-1}$ 离心 3 min,弃上清。加入 PBS 0.5 mL,摇匀,用流式细胞仪进行检测。CD18 的表达用平均荧光强度以及粒细胞阳性表达率表示。

2.4 统计学处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 13.0 软件采用单因素方差分析进行统计,组间比较采用 LSD-*t* 检验。$P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 肝组织 MDR1a,MDR1b,MDR2 和 MRP1,MRP2 mRNA 表达半定量分析 与对照组相比,模型组大鼠一次性 ig ANIT 72 h 后,肝组织 MDR1a,MDR1b mRNA 表达显著增加($P < 0.05$,$P < 0.01$),MDR2 mRNA 也有增加趋势但未达统计学意义,MRP1 mRNA 和 MRP2 mRNA 的变化表达无统计学差异。与模型相比较,LD 5.0,2.5 $g \cdot kg^{-1}$ 组对 MDR1a,MDR1b,MDR2,MRP1,MRP2 mRNA 表达无明显影响。见表 2。

3.2 对胆汁淤积大鼠中性粒细胞 CD18 表达的影响 与对照组相比,模型组大鼠一次性 ig ANIT 72 h 后,白细胞总数以及粒细胞总数显著增高($P < 0.05$,$P < 0.01$),CD18 荧光强度无明显变化;LD 各给药组白细胞总数以及粒细胞总数有下降趋势,但与模型组比较无明显差异;LD 各给药组 CD18 荧光强度比模型组小($P < 0.05$,$P < 0.01$)。各组 CD18 粒细胞阳性表达百分数为 98% 左右,没有明显变化。结果见表 3。

表 2 龙胆泻肝丸对胆汁淤积大鼠 MDR1a,MDR1b,MDR2 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$,$n = 5$)

组别	剂量/$g \cdot kg^{-1}$	MDR1a/GAPDH	MDR1b/GAPDH	MDR2/GAPDH	MRP1/GAPDH	MRP2/GAPDH
对照	-	0.104 ± 0.150	-	0.317 ± 0.290	0.542 ± 0.282	0.916 ± 0.329
模型	-	0.451 ± 0.232[1)]	0.590 ± 0.234[2)]	0.682 ± 0.378	0.516 ± 0.295	0.590 ± 0.426
LD	5.0	0.638 ± 0.245	0.792 ± 0.328	0.555 ± 0.652	0.554 ± 0.281	0.580 ± 0.372
	2.5	0.569 ± 0.147	0.621 ± 0.068	0.574 ± 0.370	0.535 ± 0.369	0.603 ± 0.437

注:与对照组比较,1) $P < 0.05$,2) $P < 0.01$ “-”:未见表达。

表 3 龙胆泻肝丸对胆汁淤积大鼠白细胞总数及粒细胞数的影响($\bar{x} \pm s$,$n = 5$)

组别	给药剂量/$g \cdot kg^{-1}$	白细胞总数/$\times 10^9$/L	粒细胞数/$\times 10^9$/L	CD18 荧光强度	粒细胞 CD18/%
对照	-	13.08 ± 2.59	2.96 ± 0.82	5.07 ± 0.59	98.34 ± 0.72
模型	-	16.84 ± 1.99[1)]	6.76 ± 1.20[2)]	4.59 ± 0.60	97.26 ± 1.87
LD	5	14.26 ± 6.66	5.26 ± 3.13	3.93 ± 0.14[3)]	98.54 ± 0.79
	2.5	15.24 ± 4.27	5.94 ± 1.39	3.54 ± 0.33[4)]	98.62 ± 0.15

注:与对照组比较 1) $P < 0.05$,2) $P < 0.01$;与模型组比较 3) $P < 0.05$,4) $P < 0.01$。

4 讨论

肝胆湿热为中医常见证候之一,所涉及现代医学的病种大多是肝胆系疾病,临床主要表现为身目黄疸,胁肋痛。ANIT 能造成大鼠肝脏胆汁淤积,胆汁排泄减少,其病理形态学改变与人类肝内胆汁淤积病变相似。近年来研究表明,肝细胞和胆小管细胞膜上有许多具有胆汁成分转运功能的分子,当这些转运体蛋白分子的表达或功能受到影响,可能导致胆汁淤积。研究[6]表明 MDR 和 MRP 基因异常与胆汁淤积的发病有关。本研究发现,ANIT 模型组大鼠的 MDR1a,MDR1b 以及 MDR2 mRNA 表达水平升高,而 MRP1 及 MRP2 mRNA 表达水平降低,这说明 ANIT 可以影响 ABC 基因的转录和转录后的调控,导致 ABC 结合盒转运体蛋白 MDR 和 MRP 变异,造成胆汁淤积。LD 是中医治疗肝胆湿热的代表方,本课题组前期研究显示 LD 有明显的利胆和保肝作用[1]。然而,本研究显示 LD 对不同的 MDR 亚型和 MRP 亚型均无明显影响,表明 LD 的利胆作用可能不是通过作用于 MDR 或 MRP 所实现的。

白细胞与炎症的发生发展有密切关系。在炎症过程中,白细胞通过黏附和穿越血管内皮细胞,向炎症部位渗出,并可导致超氧阴离子和活性氧大量产生,从而引起组织损伤。CD18 作为 β_2 整合素黏附分子的共同 β 亚单位,存在于各种类型的白细胞膜上。白细胞表面的黏附因子 CD1lb/CD18 与血管内皮细胞黏附因子 ICAM-1 的结合是白细胞黏附于血管壁的主要原因[7]。本研究显示,ANIT 模型组表现为白细胞总数和粒细胞数明显增高,LD 对 ANIT 造模后的白细胞总数和粒细胞数有一定降低趋势,并可明显降低 CD11b/CD18 表达。提示 ANIT 诱导的肝损伤与白细胞和中性粒细胞所介导的炎症有关,这与文献报道有一致之处[8],且本研究表明 LD 可以通过降低白细胞的黏附,减轻胆管炎症,减轻胆管损伤。因此,本研究认为龙胆泻肝丸对 ANIT 诱导的胆汁淤积(类肝胆湿热证)具有利胆保肝作用,其作用机制主要与其抑制白细胞黏附,降低胆管炎症反应,减轻胆管损伤,从而有利于胆汁排泄有关,而与胆管上皮的转运体蛋白分子 MDR,MRP 关系可能不大。

[参考文献]

[1] 董伟,梁爱华,薛宝云,等. 龙胆泻肝丸(含白木通)对胆汁淤积大鼠利胆保肝作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007,13(10):37.

[2] Schinkel A H, Jonker J W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family an overview[J]. Adv Drug Deliv Rev,2003,55(1):3.

[3] Trauner M, Boyer J L. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation[J]. Physiol Rev,2003,83(2):633.

[4] Schramm R, Menger M D, Schaefers H J, et al. Leukocyte adhesion in aorta and femoral artery *in vivo* is mediated by LFA-1 [J]. Inflamm Res, 2004, 53 (10):523.

[5] Vos T A, Hooiveld G J, Koning H, et al. Up-regulation of the multidrug resistance genes, MRP1 and MDR1b, and down-regulation of the organic anion transporter, MRP2, and the bile salt transporter, spgp, in endotoxemic rat liver[J]. Hepatology, 1998,28(6):1637.

[6] 舒明,彭承宏,陈皓. 胆汁淤积时肝细胞膜转运蛋白转录及其转录后的调控[J]. 中华医学杂志,2005,85(33):2372.

[7] Ramudo L, de Dios I, Yubero S, et al. ICAM -1 and CD11b /CD18 expression during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction: Effect of *N*-acetylcysteine[J]. Exp Biol Med (Maywood),2007, 232 (6):737.

[8] Kodali P, Wu P, Lahiji P A, et al. ANIT toxicity toward mouse hepatocytes *in vivo* is mediated primarily by neutrophils via CD18 [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2006,291 (2):G355.

[责任编辑 聂淑琴]