

大黄灵仙胶囊对胆结石豚鼠肝组织超微结构及 CYP7A1 mRNA 表达的影响

黄名威¹ 唐乾利¹ 赫 军² 俞 渊² 王清坚² 林英辉² 黄 炜¹

(1. 广西中医学院, 广西壮族自治区南宁市明秀东路 179号, 530001; 2. 广西中医学院第一附属医院)

[摘要] 目的 从转录水平探讨大黄灵仙胶囊防治胆结石的可能机制。方法 将60只普通豚鼠随机分为3组, 每组20只。模型组和大黄灵仙胶囊治疗组采用致石饲料诱发胆囊结石。治疗组造模开始即分别按剂量予大黄灵仙胶囊混悬液灌胃, 模型组和正常对照组以等量生理盐水灌胃。8周后统计胆囊结石形成率; 运用实时荧光定量 PCR方法检测各组豚鼠肝组织胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1) mRNA 的表达情况。结果 模型组、治疗组豚鼠的胆囊结石形成率分别为100%和50%, 与模型组相比, 治疗组结石形成率明显降低 ($P < 0.01$)。模型组豚鼠肝组织中的 CYP7A1 mRNA 表达较正常对照组显著减少 ($P < 0.01$), 而治疗组豚鼠肝组织中的 CYP7A1 mRNA 表达是模型组的2.13倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 大黄灵仙胶囊具有较好的预防结石形成的作用, 其机制可能与其具有减轻肝细胞损伤、间接稳定 CYP7A1 mRNA 表达的作用有关。

[关键词] 胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1); 大黄灵仙胶囊; 胆结石; 肝超微结构; 实时荧光定量 PCR

Influence of Dahuang Lingxian Capsule on the Ultrastructure and CYP7A1 mRNA Expression in the Liver of Gallstone Guinea Pigs

HUANG Mingwei¹, TANG Qianli¹, HE Jun², YU Yuan², WANG Qingjian², LIN Yinghui², HUANG Wei¹

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001; 2. The First Affiliated Hospital to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To discuss the possible mechanism of Dahuang Lingxian Capsule (Capsule mainly consisting of rhubarb and clematis chinensis for treating the gallstones) on the prevention and treatment of gallstone from the view point of transcription. **Methods** Sixty general guinea pigs were randomized into 3 groups with 20 in each. The model group and Dahuang Lingxian Capsule treated group (briefed as treated group) were fed with lithogenic diet to induce gallstones. The treated group was administered Dahuang Lingxian suspension by lavage ever since the beginning of model making. The model and control groups were given the equal volume normal saline by lavage. Eight weeks later the gallstone formation rate was determined. Real-time fluorescent quantitative PCR was adopted to detect the expressions of CYP7A1 mRNA in the liver tissues of all groups. **Results** The gallstone formation rate of the model and treated groups were 100% and 50% respectively. Compared with the model group, the gallstone formation rate of the treated group was significantly lower ($P < 0.01$). The expression of CYP7A1 mRNA of model group was significantly decrease than that of the control group ($P < 0.01$), while the CYP7A1 mRNA expression of the treated group was 2.13 times of that of the model group ($P < 0.01$), the difference was significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Dahuang Lingxian Capsule is effective in preventing the gallstone formation, the mechanism may be associated with its function in alleviating the damage of liver cells and stabilizing the expression of CYP7A1 mRNA indirectly.

Key Words Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1); Dahuang Lingxian Capsule (Capsule mainly consisting of rhubarb and clematis chinensis for treating the gallstones); Gallstone; Ultrastructure of the liver; Real-time fluorescent quantitative PCR

大黄灵仙胶囊为治疗胆石病的有效中药制剂, 前期研究表明, 其有降低胆结石形成率并维持胆红素、胆固醇、胆汁酸正常代谢及保护肝脏组织功能^[1]。胆固醇 7 α -羟化酶 (Cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1) 是胆汁酸代谢经典途径的关键酶, 其活性反映机体清除胆固醇及合成胆汁酸的能力^[2]。CYP7A1基因与胆结石的形成具有密切联系, 是胆石病的候选基因之一^[3]。本研究拟从转录水平探讨大黄灵仙胶囊预防治疗胆结石的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

普通豚鼠 250g 左右, 雌雄不限, 由广西医科大学实验动物中心提供 (动物许可证号: SCXK桂 2003-0003); 大黄灵仙胶囊由广西中医学院第一附属医院中心药房提供, 主要药物组成: 大黄 150g, 威灵仙 300g, 芒硝 100g, 金钱草 300g, 枳壳 120g, 鸡内金 100g, 泽兰 150g, 柴胡 120g, 郁金 120g, 磁石 120g, 黄芪 300g, 甘草 50g。上药按照广西壮族自治区药品监督管理局文件 [桂药监注 (2002) 175号] 批准的医院内制剂制作胶囊 600粒。组织总 RNA 抽提试剂盒、柱式胶回收试剂盒购自美国 Bio Basic Inc 公司; 逆转录试剂盒、荧光定量

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30660232)

通讯作者: 唐乾利, htmgx@163.com, (0771) 3137353

PCRmix购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 分组与造模、给药方法

普通健康豚鼠 60只,随机分为模型组 20只、治疗组 20只、正常对照组 20只。模型制备参照文献 [4]方法给予致石饲料喂养,正常对照组给常规饲料喂养。各组动物饲养期间适量补充青饲料。造模开始后治疗组每日予大黄灵仙胶囊(制作成悬液)按参考剂量^[5-6]灌胃 1次,模型组和正常对照组以等体积生理盐水灌胃。造模及治疗时间总共 8周。

1.3 标本采集方法

饲养过程观察记录不同时期各组动物的营养及体重情况,每周 1次;采集标本前禁饮食 12h,以水合氯醛腹腔注射麻醉后剖腹,观察肝脏、胆囊大体病理,记录胆囊结石性状并计算成石率。取肝组织投入装有预冷的 2%戊二醛的小瓶中送电镜室制作切片观察,而后每只动物在相同部位切取约 50mg 的新鲜肝组织提取总 RNA,同时适量备份肝组织液氮保存。

1.4 肝组织总 RNA 的提取

参照试剂盒说明进行操作。将提取的 RNA 用 1.2% 琼脂糖电泳(图 1-a),紫外分光光度仪测浓度及纯度。

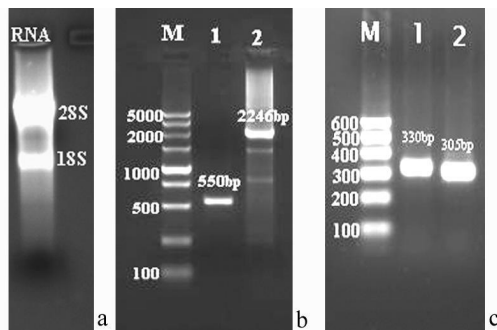


图 1 肝组织基因电泳图

(a.柱式总 RNA 抽提试剂盒提取肝组织后用 1.2% 琼脂糖进行电泳结果。其中 28s 和 18s 核糖体 RNA 的条带清晰可见,比例 2:1,说明提取的 RNA 完整无降解。b.图中第 1 道为以 cyp1 cyp2 引物扩增获得的豚鼠 CYP7A1 基因片段;第 2 道是 3'RACE 产物电泳图,经测序证实两个产物长度分别为 550bp 和 2246bp。c.图中第 1、2 道分别是荧光定量 PCR 后 CYP7A1 和内参基因 β -actin 的扩增产物电泳条带)

1.5 豚鼠 CYP7A1 基因 mRNA 序列的获得及特异引物设计

由于 GenBank 上豚鼠 CYP7A1 基因序列尚未公布,为进行该基因的表达分析,我们首先利用同源性比对的方法从豚鼠的基因组序列(LOCUS 为 AAKN02048714)中定位该基因的大致范围,利用 GENSCAN 工具预测基因的结构,根据结果在预测的保守区设计上下游引物。cyp15'CCC TGA AGC AAT

GGA AGC 3' cyp25'CCG AGA CTG GTC CAA AGG 3';以肝组织提取的总 RNA 进行反转录获得第一链 cDNA 并以此为模板进行 PCR 扩增,扩增得到的片段进行克隆测序并进行同源性比对。利用已知片段序列进一步进行 3'RACE (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 实验(5'端序列因 GC 含量较高导致 5'RACE 实验未能成功),经序列拼接后获得完整的豚鼠 CYP7A1 基因 mRNA 3'端序列共 2379 bp(图 1-b)。利用获得的豚鼠 CYP7A1 基因 mRNA 序列,使用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计特异引物 cyp35 TGG AGA AGG CAG GTC AA3' 和 cyp45'CCA TTA CTG TAG AAG GTG GTC 3'进行实时荧光定量 PCR 检测。同时根据豚鼠 β -actin mRNA 序列设计内参基因扩增引物 actin15'AGC GTG GCT ACA GTT TCA 3' 和 actin25'GTT GGC ATA GAG GTC CTT AC3'。

1.6 豚鼠 CYP7A1 基因 mRNA 表达的定量检测

采用 SYBR Green I 染料法进行检测。按前述方法提取各样本总 RNA 进行反转录,获得的 cDNA 以 5'等比稀释上机摸索最佳模板浓度和扩增效率。反应条件为 95℃, 30s; 94℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 30s; 40 个循环;反应结束后 72℃, 3min 稳定产物,55℃ 起始进行融链反应,每升高 0.5℃ 收集 1 次荧光,直至 95℃ 结束。由软件自动生成扩增曲线和融解曲线并设定基线。融解曲线表明反应过程无引物二聚体和非特异扩增,将扩增产物进行电泳验证表明无非特异扩增(图 1-c),保证数据的可靠性。本次实验数据统计采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法进行。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件处理,计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 q 检验 (SNK 法)。

2 结果

2.1 营养及体重情况

各组动物实验过程中均有不同程度的体重下降,以模型组体重下降最明显。以致石饲料喂养的各组动物第 4 周后开始出现体毛失去光泽,进食明显减少,伴有或无腹泻。正常对照组动物毛发相对理顺有光泽,进食量减少不明显。至采集标本时模型组动物死亡 5 只,治疗组死亡 3 只,正常组无死亡。经确切概率分析治疗组和模型组动物死亡无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.2 胆囊结石形成情况

结石形成的判定以胆囊内有肉眼可见的泥沙或团块状结石为准。结果显示,模型组豚鼠结石形成率达到 100% (死亡动物经解剖检查全部都有泥沙样结石形

成,统计时列入结石形成例数,下同),而治疗组则为50%(10只),结石形成率差异有统计学意义($P < 0.01$)。所有模型动物的胆囊结石均为松软的团块或泥沙样,黄绿色或黑褐色,经红外光谱分析为胆红素盐类色素型结石。而从结石形成的质量分析,模型组结石量大且几乎为团块状,而治疗组动物的结石均为泥沙样,结石形成量少。

2.3 各组豚鼠 CYP7A1 mRNA 表达的比较

表1,模型组 CYP7A1基因 mRNA平均表达量仅为正常组的47%,表达量差异有统计学意义($P < 0.01$),治疗组 CYP7A1基因 mRNA平均表达量是模型组的2.13倍,二者有统计学差异($P < 0.01$)。

表1 各组豚鼠肝组织 CYP7A1 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CYP7A1	β -actin
正常对照组	20	21.82 $\pm$ 1.01	14.10 $\pm$ 0.95
模型组	15	23.25 $\pm$ 1.19 [△]	14.31 $\pm$ 0.97
治疗组	17	22.44 $\pm$ 0.79 [*]	14.56 $\pm$ 0.67

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, Δ $P < 0.01$

2.4 各组豚鼠肝脏超微病理结构变化的比较

结果显示,模型组和治疗组豚鼠肝组织超微结构均有不同程度改变,主要表现为细胞水肿,核膜不规则,核旁细胞器减少,线粒体肿胀,脊模糊不清,内质网扩张,毛细胆管扩张,腔内绒毛脱落减少甚至消失。但从改变的程度分析,治疗组肝组织仍然保持较好的超微结构,明显优于模型组(图2),说明大黄灵仙胶囊具有较好的保护肝组织的作用。

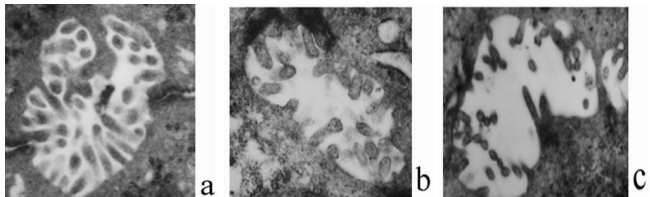


图2 各组豚鼠肝组织毛细胆管透射电镜表现($\times 17000$ 倍)(a为正常对照组毛细胆管,可见管壁有丰富的绒毛深入管腔中;b为治疗组,可见毛细胆管管腔大小正常,腔内仍有较多的微绒毛伸入;c为模型组,可见毛细胆管管腔扩张,腔内微绒毛脱落、消失)

3 讨论

大黄灵仙胶囊为本课题组治疗胆石病的有效经验方,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,又有理气祛痰之效;鸡内金、金钱草、威灵仙为排石佳品;威灵仙、磁石为经验用药;黄芪、甘草意在益气补虚,保护胃气。诸药合用共奏疏肝利胆、攻下排石之效^[1]。其预防胆结石的作用与其保护肝细胞和胆囊组织,维持胆汁有形成分代谢的正常化以及抑菌抗菌等多重作用有关^[6]。

本研究结果显示,模型组和治疗组豚鼠胆囊结石形成率分别是100%和50%。然而在实验过程中模型组和治疗组死亡动物胆囊均有结石形成。其死亡原因主要与造模时间过长(死亡的动物主要集中在第7~8周)有关。致石因素的持续作用可能对豚鼠的重要器官产生损害,同时胆囊结石形成也可引起胆道感染致使动物死亡。

现代医学研究表明,CYP7A1基因的表达水平会直接影响到胆汁的稳定性,从而影响胆结石的形成^[7]。结果表明,模型组豚鼠肝组织 CYP7A1 mRNA表达较正常对照组有明显的下调,而治疗组豚鼠肝组织 CYP7A1 mRNA表达却是模型组的2.13倍。结合肝脏病理的研究推测在致石因素的持续影响下,肝细胞的代谢出现紊乱,甚至出现肝细胞的变性坏死^[8],肝细胞器的损伤可能直接导致 CYP7A1基因表达下调^[9],胆固醇代谢和胆汁酸生成障碍,胆汁成分失衡,最终引起胆囊结石形成。而大黄灵仙胶囊对组织保护的作用稳定了 CYP7A1 mRNA的表达,从而间接起到预防结石形成的作用。

参考文献

[1]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.
[2]Kovar J, Lenicek M, Zimolova M, et al. Regulation of diurnal variation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) activity in healthy subjects[J]. Physiol Res, 2010, 59(2): 233-238.
[3]Figge A, Matern S, Lammert F. Molecular genetics of cholesterol cholelithiasis: identification of human and murine gallstone genes[J]. Z Gastroenterol, 2002, 40(6): 425-432.
[4]邵移海.中医实验动物学[M].广州:暨南大学出版社,1999:131.
[5]徐叔云.临床药理学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2001:207.
[6]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.
[7]Xie Y, Newberry EP, Kennedy SM, et al. Increased susceptibility to diet-induced gallstones in liver fatty acid binding protein knockout mice[J]. J Lipid Res, 2009, 50(5): 977-987.
[8]黄名威,唐乾利,赫军,等.慢性肝损伤与胆结石形成相关性研究[J].广西医科大学学报,2008,25(6):876-878.
[9]Zhang L, Huang X, Meng Z, et al. Significance and mechanism of CYP7A1 gene regulation during the acute phase of liver regeneration[J]. Mol Endocrinol, 2009, 23(2): 137-145.

(收稿日期:2009-08-26;修回日期:2010-07-21)

[编辑:行之]