

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.18.014

大黄灵仙方对胆道炎症模型大鼠胆管组织 miRNA-30b 表达及炎症-纤维化相关因子的影响

居燕飞¹, 陈雅璐², 蒙健林¹, 劳永彩¹, 王清坚²✉

1. 广西中医药大学, 广西壮族自治区南宁市青秀区五合大道 13 号, 530200; 2. 广西中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 探讨大黄灵仙方减轻胆道炎症防治胆石症的可能作用机制。**方法** 将 50 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、大黄灵仙组、大黄灵仙+空白抑制剂组、大黄灵仙+抑制剂组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组均采用脂多糖 (LPS) 诱导构建大鼠胆道炎症动物模型。大黄灵仙组、大黄灵仙+空白抑制剂组、大黄灵仙+抑制剂组三组大鼠制备胆道炎症模型前 3 天开始中药灌胃, 给药剂量为 320 mg/(kg·d), 空白组、模型组大鼠给予 2 ml/100 g 蒸馏水灌胃, 每天 2 次, 连续干预 6 天。采用 HE 染色观察各组胆管病理形态改变, 免疫组化法检测胆管核因子 κ B (NF- κ B) 蛋白表达, ELISA 法检测大鼠血清白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达水平, 实时 PCR 法检测胆管组织中微小核糖核酸-30b (miRNA-30b) 及转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 和骨形态发生蛋白 2 (BMP2) mRNA 表达, Western blot 法检测 TGF- β 1、NLRP3 以及 BMP2 蛋白表达量。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠胆管结构异常, 汇管区内可见大量淋巴细胞、浆细胞浸润以及胆小管扩张, NF- κ B 蛋白阳性表达增加, 出现核浸润, 血清炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达明显升高, 胆管组织中 TGF- β 1、NLRP3、BMP2 mRNA 以及蛋白表达量显著增加, miRNA-30b 表达水平明显下降 ($P<0.01$)。与模型组比较, 大黄灵仙组和大黄灵仙+空白抑制剂组胆管病理形态均改善, 炎性细胞浸润减少, NF- κ B 阳性表达降低, 同时核浸润减轻, 血清炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达水平下降, 胆管组织中 TGF- β 1、NLRP3、BMP2 mRNA 以及蛋白表达量均降低, miRNA-30b 表达水平均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而大黄灵仙+抑制剂组各指标改善不明显 ($P>0.05$)。大黄灵仙组和大黄灵仙+空白抑制剂组各指标差异亦无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 大黄灵仙方可能通过调控 miRNA-30b 及炎症-纤维化相关因子表达, 起到延缓胆石症病程进展的作用。

[关键词] 胆石症; 胆道炎症; 纤维化; 大黄灵仙方; miRNA-30b

胆石症以右上腹剧痛、高热寒战、黄疸为主要临床表现, 可伴有恶心呕吐、腹泻等消化道症状。流行病学调查显示, 全球范围内胆石症患者的比例约为 20%, 女性多发且随年龄增长而增加^[1]。胆石症是我国常见的良性胆道疾病, 病因繁多, 病变复杂, 严重的可并发肝叶萎缩、胆汁性肝硬化、肝脓肿, 甚则胆管细胞癌等^[2]。已有研究^[3]证明, 长期反复发作的胆道炎症是胆石形成的主要机制之一。微小核糖核酸 (miRNA) 是一类内源性非编码

单链 RNA 分子, 经转录后能够调节多个蛋白质编码基因的表达和多种生物学过程。研究^[4]发现微小核糖核酸-30b (miRNA-30b) 可通过靶向轻肽神经丝蛋白 (NEFL)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路减轻炎症反应。转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 和骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 与炎症反应密切相关, 通过参与炎症-纤维化级联反应, 触发纤维化进程^[5-6], 致使胆道狭窄, 胆汁淤积, 进而加速胆石形成。

大黄灵仙方是广西中医药大学第一附属医院研发的院内制剂, 以疏肝利胆为治则, 辅以通腑泄

基金项目: 国家自然科学基金 (82060867); 广西壮族自治区研究生教育创新计划项目 (YCSW2022350)

✉ 通讯作者: wqj05568@163.com

热^[7]。课题组多年临床研究结果证实, 大黄灵仙方在胆石症防治方面疗效显著^[8-10]。根据前期项目组差异表达基因聚类分析等初步筛选的结果^[11], 本研究从 miRNA-30b 及炎症-纤维化相关因子角度进一步探讨大黄灵仙方防治胆石症的可能作用机制。实验方案经广西中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号: DW20221024-203)。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 8~10 周龄, 体重(250±10) g, 由广西医科大学动物实验中心提供, 实验动物合格证号: SYXK 桂 2020-0004。饲养于广西中医药大学科学实验中心, 温度 20~23℃, 湿度 50%~60%, 12 h 灯光昼夜交替。

1.2 药品

大黄灵仙方组成: 大黄 15 g, 威灵仙 30 g, 黄芪 30 g, 金钱草 30 g, 芒硝 10 g, 鸡内金 10 g, 北柴胡 12 g, 泽兰 15 g, 磁石 12 g, 郁金 12 g, 枳壳 12 g, 甘草 5 g。由广西中医药大学第一附属医院提供中药配方颗粒剂(1 g 颗粒剂≈7.6 g 生药)。

1.3 主要试剂及仪器

miRNA-30b 干扰质粒(3.9 nmol/管)、miRNA-30b 空白质粒(2.5 nmol/管)表达载体, 上海吉玛制药技术有限公司合成; 白细胞介素 1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α) ELISA 试剂盒(Fine Test 公司, 货号 ER1094、ER1393); 脂多糖(LPS)、苏木素(Sigma 公司, 货号 L4391-1MG、H9627); Trizol(Aidlab 公司, 货号 252250AX); 兔多抗 GAPDH(杭州贤至生物有限公司, 货号 AB-P-R001); 兔单抗核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3, Abcam 公司, 货号 Ab263899); 兔多抗转化生长因子 β1(TGF-β1)、兔多抗骨形态发生蛋白 2(BMP2)(Affinity 公司, 批号 Af1027、Af5163); HRP 标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司, 货号 BA1054); 兔多抗核因子 κB(NF-κB, Proteintech 公司, 货号 10745-1-AP); HRP 标记二抗(安捷伦科技有限公司, 货号 K5007); DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司, 货号 ZLI-9018); ECL 底物液(北京普利莱基因技术有限公司, 货号 P1050); 显影定影试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、磷酸酶抑制剂、SDS 上样缓冲液、RIPA 裂解液(碧云天生物技术有限公司, 批号 P0019、P0010、S1873、30166428、P0013B); 蛋白 marker(10-250 KD, 北京海利克思

科技有限公司, 货号 P12103-2); 2% 戊巴比妥钠、伊红 Y(水溶性)、无水乙醇、中性树胶、盐酸、二甲苯(国药集团化学试剂有限公司, 批号 WS20060401、71014544、10009218、10004160、10011018、10023418); 4% 多聚甲醛(Servicebio 公司, 货号 G1101); PVDF 膜(0.45 μm, Millipore 公司, 货号 IPVH00010)。

全自动酶标仪(Thermo scientific 公司, Multiskan MK3 型); 实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司, Quant Studio 6 型); 分光光度计(上海舜宇恒科学仪器有限公司, 752 型); 微型高速离心机(Labnet 公司, C2500-R-230V 型); PCR 仪(东胜创新生物科技有限公司, EDC-810 型); 水平电泳仪、紫外分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司, 型号分别为 JY300、JY02S); 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, HI650 型); 生物显微镜(Olympus 公司, BX53 型)。

1.4 分组及造模方法

50 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后按随机数字表法分为空白组、模型组、大黄灵仙组、大黄灵仙+空白抑制剂组、大黄灵仙+抑制剂组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠均在胆总管一次性注射 3 mg/kg 的 LPS 构建大鼠胆道炎症动物模型^[12]: 大鼠按 0.3 ml/100 g 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠术前麻醉, 固定于手术板, 腹部消毒后行纵切口入腹, 暴露胆总管; 用 1 ml 注射器针头, 穿刺胆总管, 缓慢注入计算好的 LPS 剂量, 大黄灵仙+抑制剂组大鼠在注射 LPS 处继续注射 10 nmol/μl miRNA-30b 干扰质粒 10 μl, 大黄灵仙+空白抑制剂组则注射 miRNA-30b 空白质粒 10 μl; 小心用镊子阻断胆总管 60 s, 全层缝合腹部, 观察精神状况。本项目组前期预实验已证实, 该方法造模 72 h 后大鼠胆管组织病理学检查可见大量炎性细胞浸润, 说明该方法可成功构建胆道炎症模型。

1.5 干预方法

大黄灵仙组、大黄灵仙+空白抑制剂组、大黄灵仙+抑制剂组大鼠制备胆道炎症模型前 3 天开始中药灌胃, 根据项目组前期研究结果^[13], 大黄灵仙颗粒剂给药剂量为 320 mg/(kg·d), 空白组和模型组大鼠给予每次 2 ml/100 g 蒸馏水灌胃。各组均每日灌胃 2 次, 每次间隔 12 h, 连续干预 6 天。

1.6 观察指标及方法

实验结束后 24 h, 麻醉各组大鼠, 腹主动脉取血 3~4 ml, 室温静置 2 h, 于 4℃、1000 r/min(离

心半径 5.45 cm)离心 20 min, 收集上清液于-20 ℃保存, 用于 ELISA 检测。剪取肝右叶两块大小约 5 mm×5 mm×5 mm 肝组织, 固定于 4% 多聚甲醛中, 用于 HE 染色和免疫组化法检测。分离并摘取完整胆管树, 将胆管组织置于液氮中速冻, -80 ℃保存, 用于实时 PCR 和 Western blot 法检测。

1.6.1 HE 染色观察肝组织内胆管病理形态 各组 10 只大鼠按随机数字表选取置于 4% 多聚甲醛中的 3 只大鼠肝组织, 常规梯度脱水处理后进行石蜡包埋, 切片脱蜡, HE 染色, 用蒸馏水冲洗后加无水乙醇脱水, 风干后中性树胶封片, 显微镜下观察各组肝组织内胆管病理形态改变。

1.6.2 免疫组化法测定肝组织内胆管 NF-κB 表达 将 HE 染色 3 只大鼠剩余肝组织常规石蜡包埋、切片、脱蜡后, 高温高压抗原修复 15 min, 冷却后予 PBS (PH 7.4) 冲洗 3 次, 每次 3 min; 滴入配制好的 3% 过氧化氢进行室温孵育, 持续 15 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。血清室温封闭 30 min 后加一抗(稀释比例 1:100)孵育过夜, 加二抗(即用型)于 37 ℃孵育 30 min。PBS 冲洗 4 次后加入 DAB 显色, 复染脱水后封片, 置于显微镜下观察肝组织内胆管并拍照, 棕黄色或棕褐色为阳性表达。

1.6.3 ELISA 检测相关炎症因子水平 各组 10 只大鼠按随机数字表选取 5 只大鼠血清样品, 根据 ELISA 试剂盒说明书步骤测定各组大鼠血清 IL-1β、TNF-α 表达水平。

1.6.4 实时 PCR 检测胆管组织 TGF-β1、NLRP3、BMP2 mRNA 以及 miRNA-30b 表达 各组 10 只大鼠再采用随机数字表法选取 3 只大鼠胆管组织进行实时 PCR 检测。称取胆管组织 20~40 mg, 加入 Trizol 试剂提取总 RNA, DEPC 水稀释 200 倍后检测 RNA 纯度和浓度; 依据比值结果估计 RNA 质量, 要求在 1.8~2.0 之间。RNA 逆转录成 cDNA, 步骤参照试剂盒, 反应条件: 25 ℃ 5 min, 50 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 min, 4 ℃ 10 min。按照 PCR 试剂盒说明扩增, cDNA 稀释 10 倍, 反应条件: 50 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 30 sec, 60 ℃ 30 sec, 40 个循环。引物序列见表 1, TGF-β1、NLRP3、BMP2 表达以 β-actin 为内参, miRNA-30b 表达以 U6 为内参, PCR 引物由北京擎科生物科技有限公司设计合成; 反应完成后绘制溶解曲线, 最终数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行分析。

1.6.5 Western blot 法检测胆管组织 TGF-β1、NLRP3 以及 BMP2 蛋白表达 将 1.6.4 部分中选取的 3 只

表 1 引物序列表

Table 1 List of primers

名称	序列 (5' to 3')	扩增长度/bp
β-actin	正向 CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240
	反向 TAAAGACCTCTATGCCAACACACT	
TGF-β1	正向 GTGGCTGAACCAAGGAGACGGAATA	118
	反向 ACCTCGACGTTTGGGACTGATC	
NLRP3	正向 CTGCTGAAGTGATCGAAGTG	187
	反向 TGCAAAAGGAAGAAACCACGT	
BMP2	正向 GGAAGCAGGTGACAACCATT	236
	反向 CGCCTAAGAGCAGGATCAAC	
U6	正向 CGCTTCGGCAGCACATATAC	82
	反向 AAATATGGAACGCTTCACGA	
miRNA-30b	正向 TGCCTGTAAACATCTACACT	60
	反向 GTCGTATCCACTGCAGGCTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGAC AGCTGAG	

注: TGF-β1, 转化生长因子 β1; NLRP3, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; BMP2, 骨形态发生蛋白 2; miRNA-30b, 微小核糖核酸-30b。

大鼠剩余胆管组织置于 2 ml EP 管中, 加入裂解液(含 PMSF) 300 μl, 匀浆完成后于冰上充分裂解 30 min 后转至 1.5 ml 离心管; 提前开离心机预冷, 于 4 ℃、12 000 r/min(离心半径 5.45 cm)离心 5 min, 上清储存于 0.5 ml 离心管于-20 ℃保存备用; 将蛋白样品和 BSA 标准品进行适当稀释, 按 50:1 比例 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后煮沸变性, 制备电泳胶并进行电泳分离, 恒压 80 V 再 120 V, 此过程用时约 1.5 h; 电泳结束后转膜(GAPDH、TGF-β1、BMP2: 200 mA, 90 min; NLRP3: 200 mA, 120 min 后 300 mA, 30 min), 使用 TBST(含 5% 脱脂奶粉)浸泡 PVDF 膜, 室温条件下封闭 2 h; TBST 稀释相应的一抗(稀释比例均为 1:1000), 4 ℃孵育过夜, 洗涤 5 或 6 次, 每次 5 min, 加入二抗(稀释比例 1:50 000)在室温条件下进行孵育, 持续 2 h, 洗去多余二抗; 采用 ECL 显色曝光, BandScan 5.0 软件进行灰度值分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 计量资料均满足正态分布用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)描述, 方差齐时多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Tamhane's T^2 检验, 非正态分布用中位数和四分位数描述 [$M(P_{25}, P_{75})$], 采用 Kruskal-Wallis 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

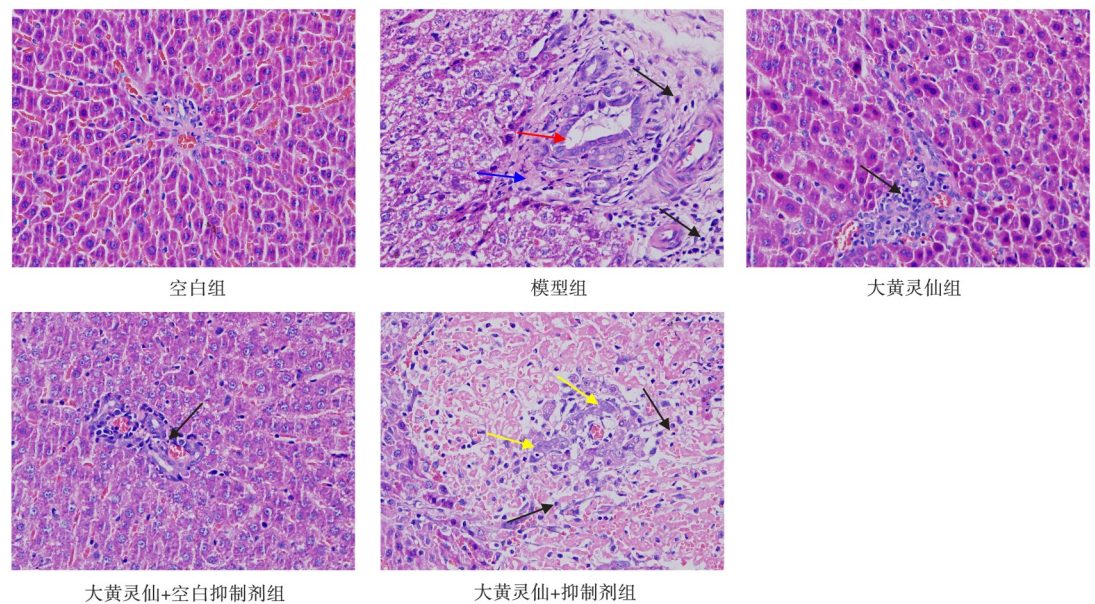
2.1 各组大鼠肝组织内胆管病理形态改变

图 1 示，空白组大鼠胆管结构完整，胆管细胞形态正常，无变性增生和坏死，未见炎性细胞分布。模型组胆管细胞形态异常，胶原纤维明显增生，汇管区内可见大量淋巴细胞、浆细胞浸润以及胆小管扩张。大黄灵仙组和大黄灵仙+空白抑制剂组胆管细胞坏死少见，炎性细胞浸润情况明显改

善，两组病理形态无明显差异。大黄灵仙+抑制剂胆管细胞失去正常结构，胆小管变形、萎缩严重，淋巴细胞、浆细胞浸润增强。

2.2 各组大鼠肝组织内胆管 NF-κB 表达比较

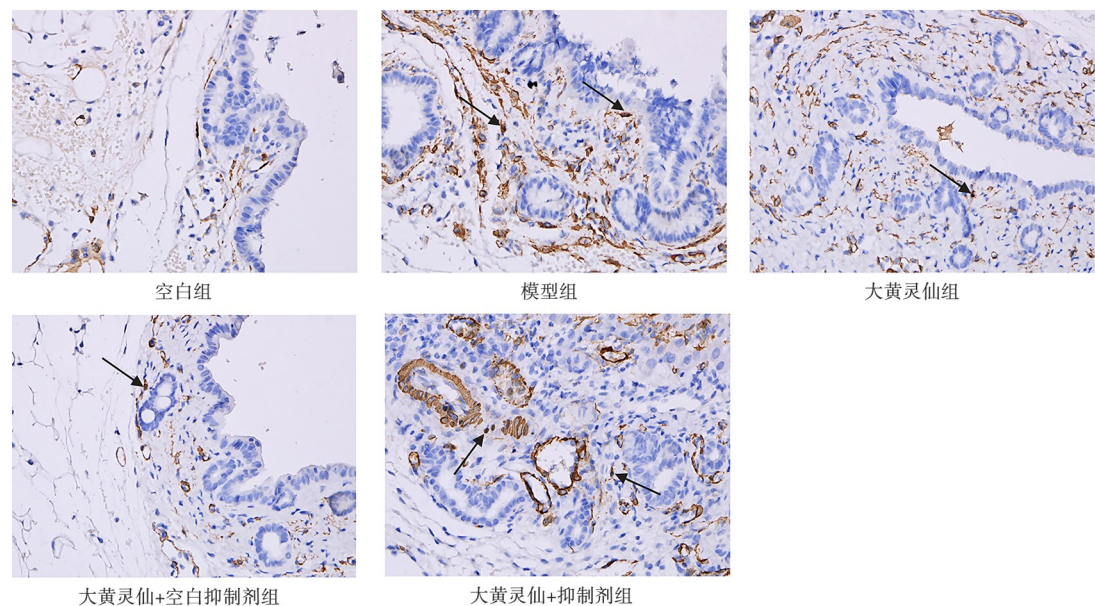
图 2 示，NF-κB 免疫组化结果显示，NF-κB 蛋白阳性，棕黄色颗粒定位于细胞膜。空白组细胞膜 NF-κB 阳性染色较少，未见核浸润。模型组阳性染色明显增多，出现核浸润。大黄灵仙组和大黄灵



注：蓝色箭头指示为胶原纤维增生；红色箭头指示为胆小管扩张；黑色箭头指示为炎性细胞浸润；黄色箭头指示为胆小管变形、萎缩。

图 1 各组大鼠肝组织内胆管病理形态 (HE, ×400)

Figure 1 Pathological morphology of bile duct in liver tissue of rats in each group (HE, ×400)



注：黑色箭头指示为核浸润。

图 2 各组大鼠肝组织内胆管核因子 κB 免疫组化表达 (×400)

Figure 2 Immunohistochemical expression of biliary nuclear factor κB in liver tissue of rats in each group (×400)

仙+空白抑制剂组 NF- κ B 阳性染色低,同时核浸润减轻,两组 NF- κ B 阳性表达与核浸润情况无明显差异。大黄灵仙+抑制剂组 NF- κ B 阳性染色明显增多,且核浸润增强。

2.3 各组大鼠血清炎症因子水平比较

表2示,与空白组比较,模型组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平明显上升 ($P<0.01$);与模型组比较,大黄灵仙组和大黄灵仙+空白抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平均下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),大黄灵仙+抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$);与大黄灵仙组比较,大黄灵仙+空白抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),大黄灵仙+抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与大黄灵仙+空白抑制剂组比较,大黄灵仙+抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表2 各组大鼠血清炎症因子水平比较

Table 2 Comparison of serum inflammatory factor levels of rats in each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β	TNF- α
空白组	5	41.15 $\pm$ 12.34	86.10 $\pm$ 12.69
模型组	5	131.11 $\pm$ 19.33 ^{a)}	283.57 $\pm$ 47.45 ^{a)}
大黄灵仙组	5	80.67 $\pm$ 11.15 ^{b)}	157.83 $\pm$ 31.51 ^{c)}
大黄灵仙+空白抑制剂组	5	86.27 $\pm$ 13.81 ^{b)}	164.67 $\pm$ 33.28 ^{c)}
大黄灵仙+抑制剂组	5	169.74 $\pm$ 34.18 ^{d)}	340.65 $\pm$ 69.53 ^{e)}

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与大黄灵仙组比较, $P<0.05$; e) 与大黄灵仙组比较, $P<0.01$; f) 与大黄灵仙+空白抑制剂组比较, $P<0.05$; g) 与大黄灵仙+空白抑制剂组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠胆管组织 TGF- β 1、NLRP3、BMP2 mRNA 以及 miRNA-30b 表达比较

表3示,与空白组比较,模型组 TGF- β 1、NLRP3

表3 各组大鼠胆管组织 TGF- β 1、NLRP3、BMP2 mRNA 及 miRNA-30b 表达比较

Table 3 Comparison of TGF- β 1, NLRP3, BMP2 mRNA expression and miRNA-30b expression in bile duct tissue of rats in each group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TGF- β 1 mRNA	NLRP3 mRNA	BMP2 mRNA	miRNA-30b
空白组	3	1.02 $\pm$ 0.16	1.12 $\pm$ 0.11	1.03 $\pm$ 0.13	1.04 $\pm$ 0.15
模型组	3	2.96 $\pm$ 0.24 ^{a)}	3.85 $\pm$ 0.17 ^{a)}	2.61 $\pm$ 0.21 ^{a)}	0.28 $\pm$ 0.06 ^{a)}
大黄灵仙组	3	2.10 $\pm$ 0.22 ^{b)}	2.82 $\pm$ 0.24 ^{b)}	1.82 $\pm$ 0.23 ^{b)}	0.64 $\pm$ 0.09 ^{b)}
大黄灵仙+空白抑制剂组	3	2.08 $\pm$ 0.31 ^{b)}	2.87 $\pm$ 0.33 ^{b)}	1.88 $\pm$ 0.23 ^{b)}	0.61 $\pm$ 0.06 ^{b)}
大黄灵仙+抑制剂组	3	2.81 $\pm$ 0.23 ^{c)}	4.15 $\pm$ 0.30 ^{c)}	2.99 $\pm$ 0.35 ^{c)}	0.30 $\pm$ 0.05 ^{c)}

注: TGF- β 1, 转化生长因子 β 1; NLRP3, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; BMP2, 骨形态发生蛋白 2; miRNA-30b, 微小核糖核酸-30b。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与大黄灵仙组比较, $P<0.01$; d) 与大黄灵仙+空白抑制剂组比较, $P<0.01$ 。

及 BMP2 mRNA 表达量显著增加, miRNA-30b 表达量明显降低 ($P<0.01$);与模型组比较,大黄灵仙组和大黄灵仙+空白抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 mRNA 表达量均明显降低, miRNA-30b 表达量均显著增加 ($P<0.01$),大黄灵仙+抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 mRNA 和 miRNA-30b 表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$);与大黄灵仙组比较,大黄灵仙+空白抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3、BMP2 mRNA 和 miRNA-30b 表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$),大黄灵仙+抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3、BMP2 mRNA 表达量显著增加, miRNA-30b 表达量明显降低 ($P<0.01$);与大黄灵仙+空白抑制剂组比较,大黄灵仙+抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 mRNA 表达量显著增加, miRNA-30b 表达量明显降低 ($P<0.01$)。

2.5 各组大鼠胆管组织 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 蛋白表达比较

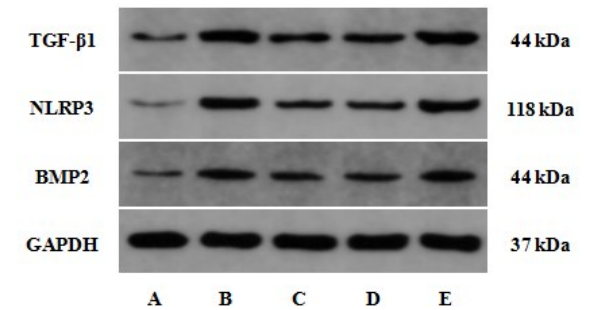
表4示,与空白组比较,模型组 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 蛋白表达量显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,大黄灵仙组和大黄灵仙+空白抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 蛋白表达量均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),大黄灵仙+抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$);与大黄灵仙组比较,大黄灵仙+空白抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$),大黄灵仙+抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 蛋白表达量增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与大黄灵仙+空白抑制剂组比较,大黄灵仙+抑制剂组 TGF- β 1、NLRP3 及 BMP2 蛋白表达量增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠胆管组织 TGF- β 1、NLRP3、BMP2 蛋白表达电泳见图3。

表 4 各组大鼠胆管组织 TGF-β1、NLRP3、BMP2 蛋白表达比较

Table 4 Comparison of TGF-β1, NLRP3 and BMP2 protein expression in bile duct tissue of rats in each group (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF-β1	NLRP3	BMP2
空白组	3	0.28±0.02	0.12±0.04	0.21±0.05
模型组	3	0.81±0.13 ^{a)}	0.55±0.10 ^{a)}	0.56±0.10 ^{a)}
大黄灵仙组	3	0.57±0.06 ^{b)}	0.38±0.09 ^{b)}	0.39±0.03 ^{c)}
大黄灵仙+空白抑制剂组	3	0.58±0.09 ^{c)}	0.37±0.09 ^{c)}	0.39±0.06 ^{c)}
大黄灵仙+抑制剂组	3	0.78±0.11 ^{d) f)}	0.63±0.13 ^{e) g)}	0.61±0.11 ^{e) g)}

注：TGF-β1，转化生长因子β1；NLRP3，核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3；BMP2，骨形态发生蛋白2。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与模型组比较， $P<0.01$ ；f) 与模型组比较， $P<0.05$ ；g) 与模型组比较， $P<0.01$ 。



注：A，空白组；B，模型组；C，大黄灵仙组；D，大黄灵仙+空白抑制剂组；E，大黄灵仙+抑制剂组；TGF-β1，转化生长因子β1；NLRP3，核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3；BMP2，骨形态发生蛋白2。

图 3 各组大鼠胆管组织 TGF-β1、NLRP3、BMP2 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of TGF-β1, NLRP3 and BMP2 protein expression in bile duct tissue of rats in each group

3 讨论

胆石症属中医学“胁痛”“胆胀”“黄疸”等范畴，指热、湿、浊、毒相互交结成石，淤塞胆道而发病。《类经·藏象类》云：“胆附于肝，相为表里，肝气虽强，非胆不断，肝胆相济，勇敢乃成。”本团队以“调肝治胆”理论为指导，认为本病病位虽在胆，但与肝关系密切^[14]。一方面，肝血充足可滋养胆腑，促进胆汁分泌，不足则胆汁化生乏源，生成病理性胆汁；另一方面，肝主疏泄可调畅气机，促进胆汁排泄；肝失疏泄，则胆汁排泄受阻，淤滞而形成结石^[15]。大黄灵仙方中大黄、芒硝通腑导滞；鸡内金、金钱草化石消积；威灵仙祛湿通经；枳壳、柴胡、泽兰、郁金配伍，疏肝理气，又可清热化湿祛痰；磁石性寒味咸，归心肝肾经，功专平肝潜阳；黄芪取其益气补虚之意，甘草调和诸药，保护胃气。全方共奏疏利肝胆、通腑排石之功。

本研究病理学结果显示，模型组大鼠胆管细胞

形态异常，胶原纤维明显增生，汇管区内可见大量淋巴细胞、浆细胞浸润以及胆小管扩张；大黄灵仙组胆管细胞坏死少见，炎性细胞浸润情况明显改善；大黄灵仙+空白抑制剂组较大黄灵仙组病理形态无明显差异，表明转染对细胞几乎没有影响；反向抑制 miRNA-30b 后，细胞损伤及炎性浸润情况更为严重，提示大黄灵仙方可能通过促进 miRNA-30b 表达从而改善胆管细胞的病理炎症结构。有研究显示，NF-κB 能够参与胆管免疫应答，促进相关炎症因子释放加重炎症反应，继发纤维化而诱发胆石形成^[16]。本研究免疫组化结果显示，大黄灵仙方对胆管 NF-κB 表达具有显著调节作用，可能通过调控 miRNA-30b 抑制 NF-κB 炎性浸润，从而减缓胆石症的进展。

胆石症形成过程十分复杂，其病理实质为胆道长期低烈度炎症反应导致的胆道狭窄，胆道纤维环的形成是胆石症主要病理特征。研究发现 miRNA-30b 不仅在炎症反应中发挥了巨大作用，还在纤维化进程中扮演着重要角色，miRNA-30b 可通过直接靶向锌指转录因子 1(SNAI1)从而调节糖尿病肾病肾上皮-间质转化^[17]。因此，我们推测 miRNA-30b 可能和胆道纤维化也存在一定关系。TGF-β1、BMP2 均为 TGF-β 超家族的成员，TGF-β1/Smad3 信号传导通路被激活可以促进胆管上皮细胞发生上皮细胞-间充质转化 (EMT)，引起胆道纤维化，触发胆道病理性重塑，胆道狭窄致胆汁排出不畅，继而加速胆石形成^[18]。BMP2 通过激活 PI3K/Akt 通路诱导结肠癌 EMT 和侵袭^[19]。BMP2、BMP6 和 TGF-β1 等从肝窦状内皮细胞释放，通过旁分泌与邻近肝细胞、肝星状细胞进行信息交流，激活 TGF-β/BMP 信号通路参与控制全身铁稳态和纤维化过程^[20]。NLRP3 炎症小体不仅介导炎症反应，而且与线粒体调节和成纤维细胞分化有关^[21]。当机体受到不同病原体

或疾病侵犯时, NLRP3 炎症小体被激活, 并通过 IL-1 β 和白细胞介素 18 (IL-18) 的慢性上调以及随后的自分泌信号维持激活的炎症小体, 推动成纤维细胞分化为肌成纤维细胞^[22]。

本研究结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠胆管组织 TGF- β 1、NLRP3、BMP2 mRNA 及蛋白, 血清炎症相关因子 IL-1 β 、TNF- α 水平明显升高, miRNA-30b 表达水平显著降低, 大黄灵仙方干预后 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、NLRP3、BMP2 mRNA 及蛋白表达水平下降, miRNA-30b 表达水平显著升高。加入 miRNA-30b 干扰质粒后血清 IL-1 β 、TNF- α 水平, TGF- β 1、NLRP3、BMP2 mRNA 及蛋白表达水平增加, miRNA-30b 表达水平明显降低。以上结果表明 miRNA-30b 可能是治疗胆道炎症的一个重要靶点, 大黄灵仙方可能通过调控 miRNA-30b 及炎症-纤维化相关因子的表达, 进而发挥减轻炎症反应, 防治胆石症的作用。

综上所述, 大黄灵仙方能在一定程度上改善胆管病理组织形态学, 其作用机制可能是通过调控 miRNA-30b 减轻胆道炎症, 拮抗胆道纤维化进程, 达到延缓胆石症发生发展的效果。但本研究仅设定了一种中药浓度, 缺少不同剂量的对比; 另外, 本实验样本数量较少。后续我们将扩大样本量, 深入探索这些因子之间相互影响的复杂网络关系, 进一步明确其在炎症-纤维化级联反应中的具体作用, 寻找大黄灵仙方缓解胆道炎症治疗胆石症的关键效应靶点。

参考文献

- [1] GUTT C, SCHLAFFER S, LAMMERT F. The treatment of gallstone disease [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2020, 117(9): 148-158.
- [2] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 胆石症中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26(2): 132-138.
- [3] MATYJAST, KACZKA K, WITAS H, et al. Cholelithiasis-always infected? [J]. *Pol Przegl Chir*, 2017, 89(3): 23-26.
- [4] ZHANG H, WANG D, TONG J, et al. MiR-30b-5p attenuates the inflammatory response and facilitates the functional recovery of spinal cord injury by targeting the NEFL/mTOR pathway [J]. *Brain Behav*, 2022, 12(12): e2788.
- [5] LIU W, HAN X, LI Q, et al. Igaratimod ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting the EMT process and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113460. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113460.
- [6] WANG B, LIU T, WU JC, et al. STAT3 aggravates TGF- β 1-induced hepatic epithelial-to-mesenchymal transition and migration [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 214-221. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.035.
- [7] 唐乾利, 黄名威, 俞渊, 等. “胆病从肝论治”在防治胆结石实验研究中的应用 [J]. *中医药信息*, 2010, 27(1): 16-19.
- [8] 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.
- [9] 李泉, 俞渊, 黄欣, 等. 大黄灵仙胶囊预防保胆取石术后结石复发的基础与临床研究 [J]. *右江民族医学院学报*, 2014, 36(2): 161-164.
- [10] 周薇, 唐乾利, 赫军, 等. “大黄灵仙汤”治疗胆石症 29 例临床观察 [J]. *江苏中医药*, 2008, 40(6): 44-45.
- [11] 王清坚, 王明刚, 王兵, 等. 基于 miRNA 芯片技术探索大黄灵仙胶囊对炎性胆管细胞的多维调控 [J]. *广州中医药大学学报*, 2018, 35(2): 289-296.
- [12] 赵礼金. LPS 诱导胆管上皮细胞上皮-间叶样表型转化及其分子机制初步探讨 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2010.
- [13] 吴华帅, 俞渊, 陈金梅, 等. 基于 TLR4/MyD88 信号通路探讨大黄灵仙方缓解胆管细胞炎症反应的作用研究 [J]. *中医药学报*, 2020, 48(5): 9-13.
- [14] 黄汉基, 唐乾利. “胆病从肝论治”理论探析与运用创新 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(93): 268-269.
- [15] 臧西国, 李轩, 陈希琦. 胆总管结石中西医结合治疗的研究进展 [J]. *中国疗养医学*, 2022, 31(8): 841-845.
- [16] VESTERHUS M, KARLSEN TH. Emerging therapies in primary sclerosing cholangitis: pathophysiological basis and clinical opportunities [J]. *J Gastroenterol*, 2020, 55(6): 588-614.
- [17] WANG Y, LIU Y, ZHANG L, et al. miR-30b-5p modulate renal epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy by directly targeting SNAI1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 535: 12-18. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.096.
- [18] LIU ZY, CAO J, ZHANG JT, et al. Ring finger protein 125, as a potential highly aggressive and unfavorable prognostic biomarker, promotes the invasion and metastasis of human gallbladder cancers via activating the TGF- β 1-SMAD3-ID1 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49897-49914.
- [19] KANG MH, KANG HN, KIM JL, et al. Inhibition of PI3 kinase/Akt pathway is required for BMP2-induced

- EMT and invasion [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22 (3) : 525-534.
- [20] COLUCCI S, ALTAMURA S, MARQUES O, et al. Liver sinusoidal endothelial cells suppress bone morphogenetic protein 2 production in response to TGF β pathway activation[J]. *Hepatology*, 2021, 74(4) : 2186-2200.
- [21] ZHANG H, WANG Z. Effect and regulation of the NLRP3 inflammasome during renal fibrosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 379. doi: 10.3389/fcell. 2019. 00379.
- [22] ARTLETT CM. The Mechanism and regulation of the NLRP3 inflammasome during fibrosis [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(5) : 634.

Effect of *Dahuang Lingxian Formula* (大黄灵仙方) on miRNA-30b Expression and Inflammation-fibrosis Related Factors in Biliary Duct Tissue of Cholecystitis Model Rats

JU Yanfei¹, CHEN Yalu², MENG Jianlin¹, LAO Yongcai¹, WANG Qingjian²

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, 530200; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of reducing cholecystitis and preventing cholelithiasis by *Dahuang Lingxian Formula* (大黄灵仙方, DLF). **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into blank group, model group, DLF group, DLF + blank inhibitor group, and DLF + inhibitor group, with 10 rats in each group. The rat model of cholecystitis was established by lipopolysaccharide (LPS) induction in all the groups except for the blank group. Rats in DLF group, DLF + blank inhibitor group and DLF + inhibitor group received intragastric administration of 320 mg/ (kg·d) of DLF 3 days before the preparation of cholecystitis model, while those in blank group and model group were given 2 ml/100 g of distilled water by gastric, twice a day, for 6 consecutive days. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathologic changes of bile duct tissues in each group. The expression of nuclear factor κ B (NF- κ B) protein in bile duct tissues was detected by immunohistochemistry. The expression levels of interleukin1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in serum of rats were detected by enzym-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression levels of miRNA-30b, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) in bile duct tissues were detected by real-time PCR, and the protein expression levels of TGF- β 1, NLRP3 and BMP2 were detected by Western blot. **Results** Compared to those in the blank group, the structure of the bile duct in the model group was abnormal, and a large number of lymphocytes, plasma cell infiltration and bile canaliculi dilation were seen in the portal area; the positive expression of NF- κ B protein increased; there was nuclear infiltration; the expressions of serum inflammatory factors IL-1 β and TNF- α , as well as the mRNA and protein expressions of TGF- β 1, NLRP3 and BMP2 in bile duct tissue significantly increased, while the expression level of miRNA-30b significantly decreased ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the pathological morphology of the bile ducts in the DLF group and DLF + blank inhibitor group was improved, and the infiltration of inflammatory cells was reduced, with decreased positive expression of NF- κ B and nuclear infiltration; expression levels of serum inflammatory factors IL-1 β and TNF- α , and the mRNA and protein expressions of TGF- β 1, NLRP3 and BMP2 in bile duct tissue decreased, while the expression level of miRNA-30b significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the model group, those indicators in the DLF + inhibitor group was not significantly improved ($P > 0.05$). There was no significant difference in the indicators between the DLF group and the DLF + blank inhibitor group ($P > 0.05$). **Conclusion** DLF may play a role in delaying the progression of cholelithiasis by regulating the expression of miRNA-30b and inflammation-fibrosis related factors.

Keywords cholelithiasis; cholecystitis; fibrosis; *Dahuang Lingxian Formula* (大黄灵仙方); miRNA-30b

(收稿日期: 2023-04-12; 修回日期: 2023-06-02)

[编辑: 邓媛]