

doi:10.3969/j.issn.1005-0264.2019.01.019

黛矾散对原发性胆汁性胆管炎小鼠肝细胞膜多重药物抗性相关蛋白 2 的影响*

程良斌¹ 严骏松² 周金辉³

1. 湖北省中医院肝病研究所 (湖北 武汉, 430061) 2. 武汉市第六医院消化科 3. 上海市闵行区中医院消化科

摘要 **目的:**观察黛矾散及其各组分对用聚肌胞苷酸(Poly I:C)建立的原发性胆汁性胆管炎(PBC)小鼠多重药物抗性相关蛋白 2(MRP2)的影响,以进一步探究黛矾散治疗 PBC 的机理。**方法:**将 60 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分成正常组、模型组、青黛组、明矾组、黛矾散组、熊去氧胆酸(UDCA)组,应用 Poly I:C 建立 PBC 模型,观察黛矾散及其组分对 PBC 小鼠血清生化指标、肝组织学及肝细胞膜转运体 MRP2 的影响。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠 AMA、ALP 显著升高($P < 0.05$),MRP2 mRNA 及蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组小鼠 AMA、ALP 显著降低($P < 0.05$),MRP2 mRNA 及蛋白表达水平分别有不同程度的升高,其中黛矾散组及熊去氧胆酸组升高最为显著($P < 0.05$)。病理结果显示正常组小鼠肝细胞排列整齐,无炎症细胞浸润及胆管增生;模型组小鼠肝小叶结构存在,肝细胞普遍中-重度变性,门管区炎症细胞浸润及纤维组织轻度增生,向周围肝组织穿插,呈早期肝硬化趋势;治疗组小鼠肝脏炎症细胞浸润及胆管增生有不同程度减轻。**结论:**黛矾散及其组分能不同程度改善 PBC 模型小鼠的肝组织病理变化、提高 MRP2 基因的转录和蛋白表达水平。

关键词 原发性胆汁性肝硬化;聚肌胞苷酸;黛矾散;多重药物抗性相关蛋白 2

Effects of Daifansan on liver cell membrane transporter MRP2 with primary biliary cirrhosis animal models

CHENG Liang-bin¹, YAN Jun-song², ZHOU Jin-hui³. 1. Hepatology Institute, the Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (Wuhan Hubei, 430061) China

Abstract Objective: To observe the effect of Daifansan and its components on primary biliary cirrhosis (PBC) animal model which induced by polyinosinic acid (Poly I:C), to further explore the mechanism of daifansan treatment of primary biliary cirrhosis. **Methods:** Sixty female C57BL-6 mice were randomly divided into normal group, model group, Qingdai group, alum group, Daifansan group, ursodeoxycholic acid (UDCA) group, using Poly I:C to establish PBC animal model to observe effects of Daifansan and its components on serum biochemical indexes, pathological changes of the liver and liver cell membrane transporters MRP2. **Results:** compared with the normal group, AMA, ALP in model group significantly increased ($P < 0.05$), the level of mRNA and MRP2 protein significantly decreased ($P < 0.05$); compared with the model group, AMA, ALP in treatment group decreased significantly ($P < 0.05$), the level of mRNA and MRP2 protein increased in different degrees, among them, Daifansan group and ursodeoxycholic acid group increased significantly ($P < 0.05$). The pathological results showed that hepatic cells of normal group arranged neatly, no inflammatory cell infiltration and hyperplasia of bile duct; hepatic lobules structure existed in model group, hepatocytes were commonly in moderate to severe degeneration, inflammatory cell infiltrated in portal area, fibrous tissue hyperplasia slightly and inserted into surrounding liver tissue, showing the tendency of early liver cirrhosis; in treatment group, inflammatory cell infiltration and hyperplasia of bile duct were alleviated. **Conclusion:** Daifansan and its components can promote MRP2 gene transcription and protein expression of PBC mice model established by Poly I:C.

Key Words: primary biliary cirrhosis; poly I:C; Daifansan; MRP2

* 基金项目:湖北省教育厅重点项目(No. D20112001);武汉市应用基础研究计划项目(No. 2015061701011646)

原发性胆汁性胆管炎(PBC),又名原发性胆汁性肝硬化,是一种病因不明的慢性进行性的胆汁淤积性肝病,其典型病理表现为非化脓性胆管炎或肉芽肿性胆管炎,以小胆管破坏为主。治疗方面,除熊去氧胆酸(UDCA)的疗效受到肯定外暂无特效治疗;而中药在治疗该病的临床实践中取得了一定疗效。根据PBC的临床表现,本病当属中医黄疸病的“瘀黄疸”范畴,血瘀血热、瘀热交阻常为胆汁淤积的成因。我们前期的研究证实,中药黛矾散及组分能不同程度拮抗 α -奈异硫氰酸脂所致胆管损伤引起的肝内胆汁淤积^[1]。为进一步探究黛矾散治疗PBC的机理,我们拟采用聚肌胞苷酸(Poly I:C)诱导PBC小鼠模型,观察黛矾散及其各组分对其肝脏血清学生化、肝脏组织学改变及肝细胞多重药物抗性相关蛋白2(MRP2)的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雌性C57BL/6小鼠60只,体重(20±2)g,由湖北省医学科学院实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(鄂)2015-0018。

1.2 主要试剂及药物 Poly I:C购自美国Sigma公司(批号:31852-29-6),用之前以无菌PBS稀释至1mg/ml;黛矾散(青黛和明矾比例1:8)由湖北省中医院药剂科提供,用之前以1%阿拉伯胶配成相应浓度,熊去氧胆酸(UDCA)为德国LosanPharma GmbH产品(批号:H20050181),用之前以1%阿拉伯胶配成5mg/ml溶液。

1.3 分组与处理 实验动物随机分为6组,每组10只,分别为正常组(A)、模型组(B)、明矾组(C)、青黛组(D)、黛矾散组(E)及熊去氧胆酸组(F)。除A组小鼠外,其余5组小鼠以poly I:C腹腔注射(5mg/kg),1次/3天,A组小鼠以等体积的生理盐水腹腔注射,连续16周。A、B组小鼠以1%阿拉伯胶灌胃(0.1ml/kg/d),C组小鼠以青黛灌胃(0.12g/kg/d),D组小鼠以明矾灌胃(0.96g/kg/d),E组以黛矾散灌胃(1.08g/kg/d),F组以熊去氧胆酸灌胃(15mg/kg/d),连续16周。16周后处置动物,采血分离血清,留取肝组织制备肝匀浆和病理切片。

1.4 检测指标及方法 常规生化检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBil)、碱性磷酸酶(ALP);采用酶联免疫吸附剂测定法(ELISA)检测抗线粒体抗体(AMA),观察肝组织病理变化,采用RT-PCR方法检测多重药物抗性相关蛋白2(MRP2)mRNA表达水平,采用Western-blot方法检测MRP2蛋白表达水平。

1.5 统计学方法 所有数据使用SPSS20.0软件进行处理分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布的多组计量资料组间比较采用单因素ANOVA分析(多重比较方差齐性者采用LSD检验,方差不齐者采用Dunnnett's T3检验)。P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清生化指标检测结果 见表1。

2.2 各组小鼠MRP2基因mRNA水平 见表2。

表1 各组小鼠生化指标检测结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	AMA(U/L)	ALP(U/L)	ALT(U/L)	TBil(mmol/L)
正常组	19.56 ± 1.76	81.80 ± 10.96	36.40 ± 10.41	4.38 ± 0.94
模型组	38.04 ± 1.41*	167.20 ± 10.57*	42.60 ± 9.63	4.84 ± 1.16
青黛组	34.90 ± 1.06* Δ	144.60 ± 10.36* Δ	42.00 ± 12.59	4.62 ± 0.83
明矾组	30.19 ± 1.25* Δ	140.20 ± 11.05* Δ	40.60 ± 11.61	4.58 ± 1.19
黛矾散组	28.56 ± 1.37* Δ	111.40 ± 11.46* Δ	39.20 ± 8.29	4.42 ± 0.39
熊去氧胆酸组	27.00 ± 1.26* Δ	108.80 ± 12.49* Δ	37.00 ± 7.42	4.46 ± 0.86

与正常组比较,*P<0.05;与模型组比较, Δ P<0.05

表2 各组小鼠MRP2基因mRNA比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MRP2
正常组	10	31.25 ± 4.96 22.67 ±
模型组	10	44.12 ± 5.2 ±
青黛组	10	46.36 ± 7.4 ±
明矾组	10	48.43 ± 4.3 ±
黛矾散组	10	48.75 ± 6.2 ±
熊去氧胆酸组	10	4.86 Δ

与正常组比较,*P<0.05;与模型组比较, Δ P<0.05

2.3 各组小鼠MRP2蛋白表达情况 与正常组比较,模型组MRP2水平显著降低(P<0.05);与模型组比较,各治疗组分别有不同程度的升高,其中黛矾散组和熊去氧胆酸组升高显著(P<0.05),见图1。

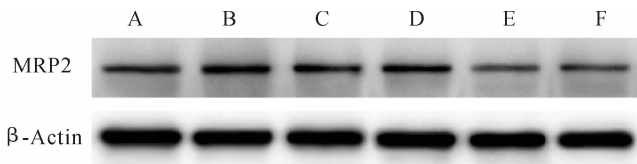


图1 各组小鼠MRP2蛋白电泳图

2.4 各组小鼠肝组织病理学变化 A组小鼠肝细胞排列整齐,门管区无明显病变;B组小鼠肝小叶结构存在,肝细胞普遍中-重度变性,门管区炎症细胞浸润及纤维组织轻度增生,向周围肝组织穿插,呈早期肝硬化趋势;C组小鼠肝小叶结构存在,肝细胞普遍中-重度变性,门管区炎症细胞浸润;D组小鼠肝小叶结构存在,肝细胞普遍中-重度变性,门管区炎症细胞浸润、血管扩张;E组小鼠肝小叶结构存在,肝细胞普遍中-重度变性,门管区炎症细胞浸润、纤维组织轻度增生;F组小鼠肝小叶结构存在,肝细胞普遍中-重度变性,门管区少许炎症细胞浸润、小胆管增生。见插图彩图2。

3 讨论

PBC的发病机制尚未完全阐明,目前已知其机制与免疫、遗传易感性、化学物质及感染因素相关。在治疗方面,目前UDCA是唯一被国际指南均推荐用于治疗PBC的药物^[2],对UDCA生物化学应答欠佳的患者,目前尚无统一治疗方案^[3],奥贝胆酸(obeticholic acid)是近年来研究的治疗PBC的新药,可显著改善PBC患者的生化指标,但严重不良事件的发生率也较高^[4],肝脏移植是治疗终末期PBC唯一有效的方式。我国有关

(下转第68页)

术健脾行气利水,与利胆退黄之郁金配伍,常用于 HCC 肝郁脾虚或有黄疸见证者。龙葵、车前子均为利水渗湿药,龙葵以清热通利为用,兼抗肿瘤^[8]、补虚之功,车前子善利水道通小便,两者相须而用,对晚期 HCC 腹水严重者疗效较佳。绿萼梅味酸涩性平,归肝胃经,有疏肝和胃、调畅气机之功,配合仙灵脾有“肝肾同源”、“补肾先调肝”之意。金钱草与葛根合用,外散风热、内清肝胆,解毒散结之力强,用于攻伐 HCC 实体肿块。知母性苦寒,清热泻火,滋阴润燥,同甘寒之生地共奏养阴清热生津之功,性寒入肾,生水之剂,水盛则火熄,补寒水之不足,益五脏之阴气,主要针对 HCC 肝肾阴虚患者及化疗引起的阴虚内热症状。青蒿与黄芩、金银花与三叶青均有清热解毒的功效,防止热毒伤阴,现代药理研究亦证明清热解毒药具有直接抑制肿瘤、诱导凋亡、调节免疫等作用^[9-10],是吴老的常用药类。柴胡、莪术、香茶菜联合使用乃根据内经“肝欲散,急食辛以散之”的治疗原则,达到疏肝行气,散结消肿的目的。

第 11-13 类药包含 3 种单味中药:麦冬、石斛、大枣。麦冬养阴生津,清心除烦,石斛甘寒生津,益胃滋阴,都是吴师治疗 HCC 常用的滋阴类药;再加红枣补中益气,养血安神,甘味和药。吴师治疗 HCC 用药性味相伍,效用互佐,寒热平调,病证结合,随症加减。

(上接第 58 页)

PBC 的研究正处于起步阶段,PBC 患者的临床表现多以乏力及皮肤瘙痒最为常见,当属中医“瘀黄疸症”的范畴,血瘀、血热、瘀热交阻常为胆汁淤积的成因^[5]。我们前期的临床研究表明,运用中药黛矾散在治疗肝内胆汁淤积症具有良好的临床疗效及安全性^[6];而我们前期的动物实验结果表明,黛矾散能显著降低雌激素所致肝内胆汁淤积大鼠的 TBA、TBil、ALT 及 ALP 水平,增强肝匀浆及肝窦膜中 Na⁺-K⁺-ATPase、Mg²⁺-ATPase 活性,且可加强肝细胞窦膜及毛细胆管膜的流动性^[7,8];黛矾散及其组分能不同程度拮抗 ANIT 所致胆管损伤所导致的肝内胆汁淤积^[1]。

MRP2 主要在肝细胞表达,定位于毛细胆管面,主要负责胆红素和其它胆汁成分的排泄。各种因素导致其缺陷可引起高胆红素血症和胆汁流的障碍。陈应果^[9]等人的研究表明,梗阻性黄疸大鼠其 MRP2 在转录和蛋白表达水平均明显降低,肝细胞对胆红素的排泄障碍,导致或进一步加重机体的高胆红素血症;国外研究也表明,在胆汁淤积模型中,MRP2 的转录和表达均降低^[10]。本文的实验结果表明,青黛组、矾石组、黛矾散组及 UDCA 组 AMA、ALP 均较模型组显著降低,MRP2 的转录和表达水平较模型组也有不同程度的升高;病理结果显示:黛矾散及其组分能不同程度拮抗 Poly I : C 诱导的门管区炎症及胆管上皮损伤。综上所述,黛矾散及其组分能不同程度促进应用 Poly I : C 建立的 PBC 小鼠模型的 MRP2 基因的转录和蛋白表达,这可能是黛矾散治疗 PBC 的药理学作用机制之一。

参考文献

[1] 周金辉,严俊松,程良斌.黛矾散对 α-萘异硫氰酸脂诱导的大鼠肝

参考文献

[1] 毕承明.肝癌证治规律文献研究[D].南京中医药大学,2015.
 [2] 林洁涛,林丽珠.肿瘤的姑息治疗与中医药临床优势[J].中医杂志,2015,56(14):1198-1201.
 [3] 钟赣生.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2012:1-482.
 [4] 任凤梅,黄龙军.解毒法抗肝癌的理论探讨[J].中华中医药杂志,2014,29(4):1187-1189.
 [5] 王靖思,孙桂芝,赵杰.孙桂芝“益气活血软坚解毒法”论治原发性肝癌经验介绍[J].中华中医药杂志,2015,30(1):112-114.
 [6] 周岱翰.原发性肝癌的姑息治疗与经方应用[J].中医杂志,2012,53(15):1288-1290.
 [7] 孙磊涛,郑梦梦,沈敏鹤,等.沈敏鹤主任医师运用升降浮沉论治肿瘤经验[J].新中医,2015,47(5):17-18.
 [8] Bing Hu, Shuang-Shuang Wang, and Qin Du, et al. Traditional Chinese medicine for prevention and treatment of hepatocarcinoma: From bench to bedside[J]. World J Hepatol, 2015, 7(9): 1209-1232.
 [9] Li C, Yang M, Zhu L, et al. Honeysuckle flowers extract loaded Bombyx mori silk fibroin films for inducing apoptosis of HeLa cells[J]. Microsc Res Tech, 2017, 80(12): 1297-1303.
 [10] Xiong Y, Wu X, Rao L. Tetrastigma hemsleyanum (Sanyeqing) root tuber extracts induces apoptosis in Human cervical carcinoma HeLa cells. [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 165: 46-53.

(修回日期:2018-11-22 编辑:肖明中)

内胆汁淤积的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2016, 26(01): 32-33.

[2] Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines[J]. Hepatology, 2000, 31(4): 1005-1013.
 [3] 中华医学会肝病学会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 原发性胆汁性肝硬化(又名原发性胆汁性胆管炎) 诊断和治疗共识(2015)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12): 1980-1988.
 [4] 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.
 [5] 刘平. 现代中医肝脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 243.
 [6] 程良斌, 余晓丽. 黛矾散治疗肝内胆汁淤积症的临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(1): 10-12.
 [7] 程良斌, 赵友云, 汪晖, 孔锐. 黛矾散对雌激素诱导的大鼠肝内胆汁淤积的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2003, 19(6): 370-371.
 [8] 程良斌, 赵友云, 汪晖, 孔锐. 黛矾散对雌激素诱导的大鼠肝内胆汁淤积肝细胞膜流动性的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2004, 20(6): 359-360.
 [9] 陈应果, 别平, 祝建勇. 胆红素主要转运子 MRP2 在大鼠梗阻性黄疸肝脏中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(16): 1420-1431.
 [10] Aleksandrova M I, Sirotnina N S, Smirnova O V. Expression of Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2) in the Liver and Kidney Cells of Female Rats with Modeled Cholestasis of Pregnancy[J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2015, 158(6): 748-752.

(收稿日期:2018-12-10 编辑:高翔)