·基础研究·

齐墩果酸对阻塞性胆汁淤积大鼠胆酸转运蛋白 OSTα/β 和 BSEP 的调控作用

柴 进[1],向国春[2],封欣婵[1],张樑君[1],程 英[1],陈文生[1] (1. 第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038;2. 第三军医大学西南医院临床教学管理中心,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 建立胆道结扎大鼠模型,观察胆道结扎所致肝外胆汁淤积时齐墩果酸对肝细胞表面胆酸转运蛋白 OSTα/β 和 BSEP 的调控作用。**方法** 随机将 45 只 SD 大鼠分为 9 组,每组 5 只。假结扎组(Sham 组)、胆道结扎组(BDL 组)和齐墩果酸组(BDL + OA 组)分别用生理盐水、齐墩果酸处理 3 d、7 d、14 d 后收集组织样本,提取肝脏 RNA 和总蛋白,分别在 mRNA 水平和蛋白水平检测 OSTα/β 和 BSEP 的表达变化。**结果** 大鼠胆道结扎后,齐墩果酸干预 3 d,胆酸转运蛋白 OSTβ 在 mRNA 和蛋白水平均增高,随着齐墩果酸干预时间的延长,在第 7 天时,胆酸转运蛋白 BSEP 的表达亦出现增高。第 14 天时,OSTα、OSTβ、BSEP 表达均增高。**结论** 齐墩果酸能够上调阻塞性胆汁淤积胆酸转运蛋白 OSTα、OSTβ、BSEP 的表达。

[关键词] 胆汁淤积;齐墩果酸;胆酸转运蛋白;胆道结扎

[中图分类号] R735.3 + 7 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2016)01-0001-04

Oleanolic acid stimulates the expression of bile acids transporters OSTalpha-beta and BSEP in bile duct -ligation rats

CHAI Jin[1], XIANG Guo-chun[2], FENG Xin-chan[1], ZHANG Liang-jun[1], CHENG Ying[1], CHEN Wen-sheng[1] (1. Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Center of Clinical Teaching Administration, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the function and effect of Oleanolic acid to cholestasis on regulating bile acids transporters. **Methods** A total of 45 rats were divided into 9 groups, 5 rats in each group. The Sham group, Bile duct ligation group and Oleanolic acid group were treated with saline or Oleanolic acid for 3 days, 7 days and 14 days. Then the liver and tested bile acids transporters in mRNA and protein levels were collected. **Results** The expression of bile acids transporter OSTβ with Oleanolic acid was increased after 3 days. The expression of OSTβ and BESP in Oleanolic acid group after 7 days were increased than those in Sham group. Fourteen days later, the increasing tendency of OSTα, OSTβ and BSEP were sensiable. **Conclusion** Oleanolic acid can stimulates the expression of bile acids transporters OSTalpha-beta and BSEP in bile duct-ligation rats.

Keywords: cholestasis; oleanolic acid; blie acids transporter; blie duct-ligation

胆汁淤积(cholestasis)是常见的临床综合征,其典型特点为碱性磷酸酶升高,并随着病情不断发展出现肝纤维化、肝硬化,最终导致肝功能衰竭[1]。我国传统药物"藏茵陈"具有"清热解毒、倾肝沥胆"之功效,其原生植物为川西獐牙菜[2-3]。本课题组前期对川西獐牙菜进行研究,发现川西獐牙菜醇提物能够通过调节肝细胞表面胆酸转运蛋白的表达而发挥肝脏保护作用[4-6]。川西獐牙菜成分复杂,目前已从中提取出 24 种有效成分,包括:齐墩果酸、熊果酸、龙胆苦苷、獐牙菜苦苷等。齐墩果酸(oleanolic acid, OA)又名庆四素、土当归酸,广泛存在于川西獐牙菜、白花蛇舌草、连翘、冬凌草、女贞子、牛膝、乌梅、山茱萸等药物植物中。齐墩果酸是五环三萜类化合物[7-9],具有多种药物活性,如降糖、调脂、抗菌、抗病毒、抗肿瘤及保肝护肝作用[10]。现代药理学研究表明,齐墩果酸能够通过增强丙氨酸活性,减轻肝脏炎症,促进肝细胞再生,使肝脏坏死区迅速修复,从而达到肝脏保护作用[11]。为进一步研究川西獐牙菜治疗胆汁淤积的作用机理,我们对其各单体成分进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

45 只雄性 SD 大鼠,6 ~ 7 周龄,体质量 200 ~ 220 g,购自第三军医大学实验动物中心。齐墩果酸由重庆市中药研究所提供,为 75% 乙醇提取后的浸膏,有效终

doi:10.11659/jjssx.07E015136

[基金项目] 国家自然基金青年项目(81100280),国家自然基金面上项目(81470880)

[通讯作者] 陈文生,E-mail:wenshengchen@hotmail.com

[收稿日期] 2015-06-29 [修回日期] 2015-07-13

浓度为 50%,使用时用无菌生理盐水溶解。RIPA Lysis Buffer 购自 Sigma 公司;蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂购自 Roche 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒、蛋白标准品购自 Fermentus 公司;PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;OSTα、OSTβ、BSEP 抗体购自 Abcam 公司;GAPDH、山羊抗兔二抗购自 Epitomics 公司;BCA 蛋白定量试剂盒、Supersingnal West Femto maximum sensitivity substrate Kit 购自 Pierce 公司。引物设计、合成、测序由上海吉凯基因化学技术有限公司提供。

1.2 胆道结扎大鼠胆汁淤积模型的建立

SD 大鼠由第三军医大学实验动物中心买回后寄养于本院动物实验中心,寄养 1 周,使大鼠完全适应环境后,参照文献[12]构建胆道结扎的大鼠胆汁淤积模型。将 45 只雄性 SD 大鼠随机分为 9 组,每组 5 只,分组及处理情况见表 1,灌胃生理盐水按 100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 标准执行。分别在 3 d、7 d、14 d 后处死大鼠,收取大鼠肝脏组织,一部分保存于液氮中,另一部分固定于 4% 多聚甲醛中,备用。

表 1 45 只 SD 大鼠分组及处理情况

组别	3 d	7 d	14 d
Sham 组	假结扎 + 灌胃生理盐水	假结扎 + 灌胃生理盐水	假结扎 + 灌胃生理盐水
BDL 组	胆道结扎 + 灌胃生理盐水	胆道结扎 + 灌胃生理盐水	胆道结扎 + 灌胃生理盐水
BDL + OA 组	胆道结扎 + 灌胃齐墩果酸	胆道结扎 + 灌胃齐墩果酸	胆道结扎 + 灌胃齐墩果酸

1.3 RT-PCR

从液氮中取出保存的大鼠肝脏组织,切取黄豆粒大小(约 100 mg),迅速使用液氮将其研磨成粉末,加入 0.5 mL TRIzol 继续研磨,直至肝脏组织成为粉红色的浆液。之后按照 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂说明书提取大鼠肝脏组织 RNA。将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 反应体系:20 μl 体系中 5'端和 3'端引物各 0.4 μl(10 μmol/L)、dNTPs 1.6 μl(2.5 μmol/L)、Template 1 μl(10 ng/μL)、Taq polymerase 0.2 μl、5 × Taq Buffer 4 μl、ddH_2O 12.4 μl,反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min 30 个循环,72 ℃ 10 min。引物序列见表 2。

表 2 PCR 基因序列

基因名称	序列号	Sense Primer(5'-3')	Antisense Primer(5'-3')
OSTα	NM_001107087.1	AAGTCGGAAGGGTTGGGTAG	ATCCTCTGCTGTGCCATCTC
OSTβ	XM_001076555.1	TTTGGTATTTCCGTTCAGAGG	GCATTCCGTTGTCTTGTGG
BSEP	NM_031760.1	CGTGCTTGTGGAAGAAGTTG	GGGAGTAGATGGGTGTGACTG

1.4 蛋白免疫印迹反应

按照 Sigma 公司 RIPA Buffer 试剂说明书提取大鼠组织总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。5% 浓缩胶和 10% 分离胶中进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,上样量每孔 80 μg。浓缩胶 60 V 电泳直至 Marker 完全分开,清晰可见,转换电压至 100 V,继续电泳,直至溴酚蓝完全泳出凝胶。常规湿法转膜后室温封闭 2 h,孵育一抗过夜(>16 h,OSTα 1∶1 000,OSTβ 1∶1 000,BSEP 1∶2 500,GAPDH 1∶50 000),回收一抗,室温孵育二抗 90 min(山羊抗兔抗体 1∶50 000)。ECL 法曝光。

1.5 统计分析

使用 SPSS 17.0 软件,应用多因素方差分析进行统计,统计结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

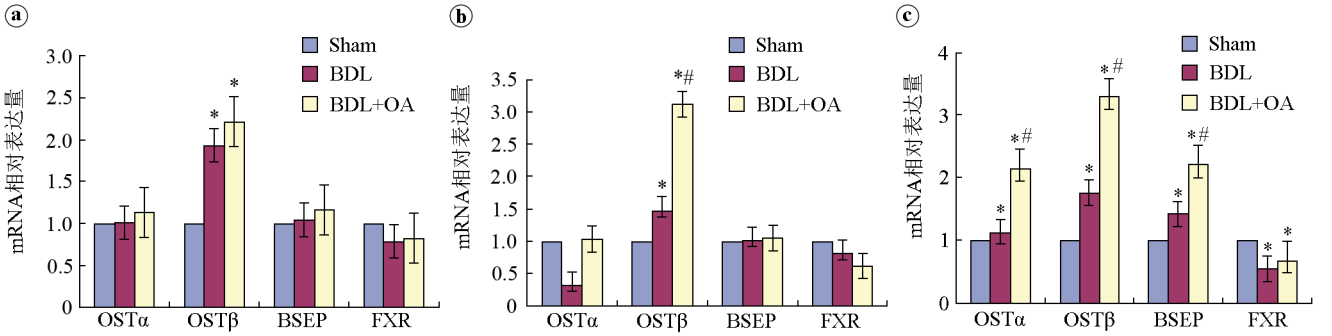
2 结果

2.1 齐墩果酸对 OSTα、OSTβ、BSEP、FXR mRNA 水平的影响

收集大鼠肝脏组织后提取肝脏组织 RNA,逆转录后利用 RT-PCR 技术检测胆汁淤积时,齐墩果酸对大鼠肝细胞表面胆酸转运蛋白和相应核受体 mRNA 水平的影响。结果发现:与 Sham 组比较,BDL 组和 BDL + OA 组 OSTβ 的在胆道结扎 3 d、7 d、14 d 时 mRNA 相对表达量均明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 Sham 组比较,在胆道结扎 14 d 时,BSEP 的表达量明显增高,而 FXR 的表达量明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 齐墩果酸对 OSTα、OSTβ、BSEP、FXR 蛋白水平的影响

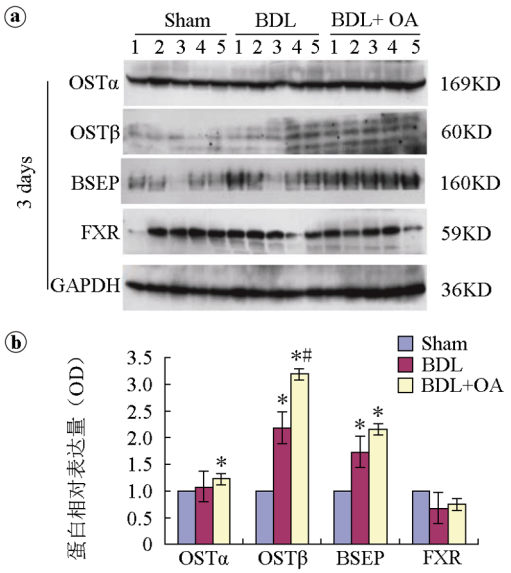
45 只雄性 SD 大鼠做相应处理后,分别在 3 d、7 d、14 d 处死大鼠,收集大鼠肝脏组织,提取肝脏组织总蛋白。利用 Western Blot 技术检测大鼠肝细胞表面胆酸转运蛋白、核受体的表达变化。结果发现:胆道结扎 3 d 时(图 2),与 Sham 组比较,OSTβ 和 BSEP 在 BDL 组和 BDL + OA 组均表达升高,BDL 组 OSTβ 蛋白表达增高 2.18 倍,BESP 表达增高 1.74 倍;BDL + OA 组 OSTβ 蛋白表达增高 3.19 倍,BESP 表达增高 2.16 倍,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。与BDL组比较,



a:齐墩果酸干预 3 d;b:齐墩果酸干预 7 d;c:齐墩果酸干预 14 d

*:与 Sham 组比较,$P<0.05$,#:与 BDL 组比较,$P<0.05$

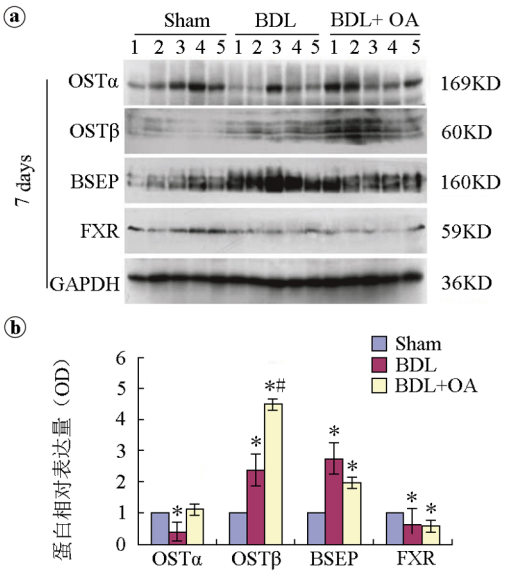
图 1 齐墩果酸干预后,大鼠肝脏组织胆酸转运蛋白的表达



a:蛋白免疫印迹反应 b:蛋白相对表达量

*:与 Sham 组相比,$P<0.05$,#:与 BDL 组相比,$P<0.05$

图 2 胆道结扎后 OA 干预 3 d,肝组织蛋白表达

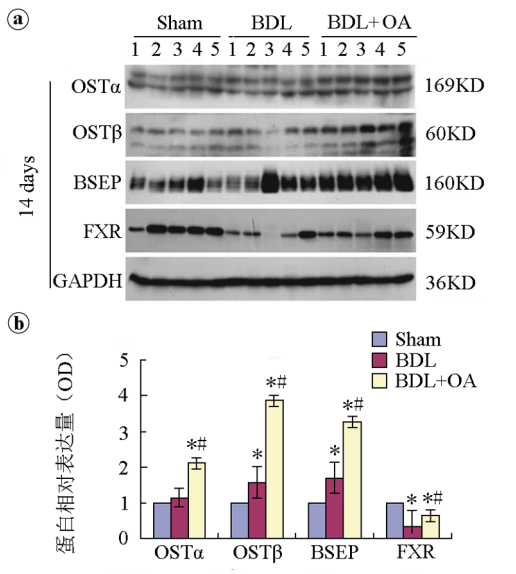


a:蛋白免疫印迹反应;b:蛋白相对表达量

*:与 Sham 组相比,$P<0.05$,#:与 BDL 组相比,$P<0.05$

图 3 胆道结扎后 OA 干预 7 d,肝组织蛋白表达

BDL + OA 组 OSTβ 蛋白表达增高 1.00 倍,差异具有统计学意义($P<0.05$),而 OSTα 和 FXR 则无明显变化。胆道结扎 7 d 时(图 3),与 Sham 组比较,BDL 组 OSTβ 蛋白表达增高 2.36 倍,BESP 表达增高 2.74 倍;OSTα 表达降低至 0.38 倍,FXR 表达降低至 0.64 倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 Sham 组比较,BDL + OA 组 OSTβ 蛋白表达增高 4.49 倍,BESP 表达增高 1.96 倍,FXR 表达降低至 0.58 倍,差异具有统计学意义($P<0.05$)。胆道结扎 14 d 时(图 4),以 Sham 组为对照,BDL 组 OSTβ 表达增高 1.56 倍,BSEP 表达增高 1.68倍,FXR 表达降低至 0.34 倍,差异具有统计学意义($P<0.05$)。OSTα 表达变化不明显。BDL + OA 组,OSTα 表达增高 2.13 倍,OSTβ 表达增高 3.89 倍,BSEP 表达增高 3.26 倍,FXR 表达降低至 0.64 倍,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与 BDL 组相比,BDL + OA 组 OSTβ 的表达变化具有统计学意义($P<0.05$)。



a:蛋白免疫印迹反应;b:蛋白相对表达量

*:与 Sham 组相比,$P<0.05$,#:与 BDL 组相比,$P<0.05$

图 4 胆道结扎后 OA 干预 14 d,肝组织蛋白表达

3 讨论

临床治疗胆汁淤积缺乏有效的药物,目前常用且唯一得到国际认可的药物只有“优思弗”,但其疗效有限、个体差异较大。因此,临床亟需开发新的治疗胆汁淤积的有效药物。然而,新药的研发不仅耗费大量的人力、物力、财力,且从开发到真正的临床应用耗时过长。因此,本文选取了我国传统治疗肝病的中草药——川西獐牙菜进行研究。一方面能够对其治疗胆汁淤积的分子机制进行研究,寻找其中的有效成分,为临床治疗胆汁淤积提供线索,以最小的投入获得最大的效益;另一方面,为保护祖国传统医药尽绵薄之力。

目前,关于胆汁淤积的发生机制,学者们一直认为与肝细胞表面胆酸转运蛋白相关,胆汁淤积发生后肝细胞发生代偿性反应,通过核受体的调节使在生理情况下表达较低或不表达的胆酸转运蛋白表达增高[13-15]。BSEP 是 ABC 转运蛋白家族的重要成员,位于肝细胞胆管膜面,主要将肝细胞内的各种结合胆盐转运至胆管。有研究表明,胆汁淤积时 BSEP 在肝细胞胆管膜面的表达明显降低,同时肝细胞基底膜面的胆汁酸转运蛋白 OSTα 和 OSTβ 表达亦降低[16-19]。

本课题组的前期研究发现川西獐牙菜对胆汁淤积的肝脏组织具有保护作用,为进一步明确川西獐牙菜的肝脏保护作用,我们利用胆道结扎的大鼠模型模拟肝外胆汁淤积,对其单体齐墩果酸进行了研究。借鉴优思弗、利福平、苯巴比妥等药物治疗胆汁淤积的作用机制,我们对肝细胞表面的胆酸转运蛋白及核受体进行研究并发现:胆道结扎的大鼠肝细胞表面胆酸转运蛋白 OSTβ、BSEP 较 Sham 组表达增高,而齐墩果酸干预后,OSTα、OSTβ、BSEP 的表达增高更明显。FXR 较 BDL 组增高。这与目前胆汁淤积的基础理论相一致。因此,我们初步认为胆汁淤积时,齐墩果酸能够刺激胆酸转运蛋白 OSTα、OSTβ、BSEP 的表达增高,而且可能与核受体 FXR 相关。

[参考文献]

[1] Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors in liver disease[J]. Hepatology, 2011, 53(3): 1023 – 1034.

[2] 徐 敏. 藏药川西獐牙菜抗小鼠免疫性肝损伤的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(5): 32 – 36.

[3] 游海青. 川西獐牙菜对小鼠肝损伤的治疗作用[J]. 家庭医药(医药论坛), 2010(9): 617 – 619.

[4] 杜晓煌, 柴 进, 封欣婵, 等. 川西獐牙菜醇提物对大鼠胆汁酸转运蛋白 Mrp4、转录因子 Nrf2 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(10): 957 – 961.

[5] 高 宇, 柴 进, 李绍雪, 等. 川西獐牙菜醇提物对内毒素所致大鼠胆汁淤积肝损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(8): 769 – 773.

[6] 刘 畅, 李绍雪, 高 宇, 等. 川西獐牙菜醇提物上调 HepG2 细胞膜转运蛋白 MRP3 转录因子 SP1 及核受体 CPF、PXR 表达[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(10): 1008 – 1011.

[7] 唐 初, 陈 玉, 柏 舜, 等. 齐墩果酸的结构修饰与生物活性研究进展[J]. 有机化学, 2013, 33(1): 46 – 65.

[8] 郗艳丽, 吴启坤, 冯 威, 等. 齐墩果酸对 CCl4 诱导小鼠急性肝损伤保护作用的实验研究[J]. 吉林医药学院学报, 2015, 36(1): 1 – 3.

[9] 王亚平, 胡 园, 董瑞华, 等. 齐墩果酸和熊果酸的人肝微粒体代谢研究[J]. 军事医学, 2012, 36(5): 368 – 371, 384.

[10] 黄开顺, 朱链链, 刘 丹, 等. 齐墩果酸对肝癌细胞 Hep3B 增殖和凋亡的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5): 531 – 534.

[11] 陈洪轩, 和 平, 徐志杰, 等. 齐墩果酸静脉注射乳剂的制备及大鼠体内药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(13): 1023 – 1026.

[12] 封欣婵. 龙胆苦苷对肝细胞表面膜转运蛋白 MRP3、MRP4 的表达影响[D]. 重庆: 第三军医大学, 2014.

[13] Pauli-Magnus C, Meier PJ. Hepatocellular transporters and cholesta-sis[J]. J Clin Gastroenterol, 2005, 39(Suppl 2): 103 – 110.

[14] Padda MS, Sanchez M, Akhfar AJ, et al. Drug-induced cholestasis[J]. Hepatology, 2011, 53(4): 1377 – 1387.

[15] Claudel T, Zollner G, Waqner M, et al. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(8): 867 – 878.

[16] Susukida T, Sekine S, Ogimura E, et al. Basal efflux of bile acids contributes to drug-induced bile acid-dependent hepatocyte toxicity in rat sandwich-cultured hepatocytes[J]. Toxicol In Vitro, 2015, 29(7): 1454 – 1463.

[17] Ekins S, Clark AM, Wright SH. Making transporter models for drug-drug interaction prediction mobile[J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(10): 1642 – 1645.

[18] Ballatori N, Christian WV, Wheller SG, et al. The heteromeric organic solute transporter, OST-OST/SLC51: a transporter for steroid-derived molecules[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2-3): 683 – 692.

[19] Khan AA, Chow EC, Porte RJ, et al. Expression and Regulation of the bile Acid Transporter, OSTα-OSTβ in Rat and Human Intestine and Liver[J]. Biopharm Drug Dispos, 2009, 30(5): 241 – 258.

(编辑:周小林)