

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.02.004  
文章编号: 1005-8982(2019)02-0018-05

## 骨桥蛋白对小鼠胆囊结石形成的作用及其机制探讨

郭满, 张浩, 李伟汉

(郑州大学附属南阳医院 乳腺甲状腺外科, 河南 南阳 473009)

**摘要: 目的** 研究骨桥蛋白(OPN)基因敲除对小鼠胆囊结石形成的影响及其作用机制。**方法** 选取7只OPN基因敲除小鼠和7只C57BL/6J普通小鼠致石饮食喂养8周, 分别作为敲除组和对照组。观察两组小鼠胆结石形成率, 检测胆汁胆固醇含量、ATP结合盒转运子G亚家族成员5(ABCG5)、ABCG8 mRNA和蛋白在胆囊组织中的表达。**结果** 敲除组小鼠结石形成率(14.29%)低于对照组(85.71%)( $P < 0.05$ )。敲除组小鼠胆汁胆固醇含量( $5.35 \pm 1.08$ )低于对照组( $9.34 \pm 0.85$ )( $P < 0.05$ )。敲除组小鼠ABCG5、ABCG8 mRNA和蛋白表达水平低于对照组( $P < 0.05$ )。**结论** OPN基因敲除小鼠胆结石形成率较普通小鼠低, 可能与OPN敲除后胆囊胆固醇转运蛋白ABCG5、ABCG8表达受抑制, 导致胆囊胆汁中胆固醇含量降低有关。

**关键词:** 胆结石病; 骨桥蛋白; 胆固醇; ABCG5/腺苷三磷酸; ABCG8/腺苷三磷酸; 小鼠  
**中图分类号:** R657.42 **文献标识码:** A

## Effect of osteopontin on gallstone formation in mice and its mechanism

Man Guo, Hao Zhang, Wei-han Li

(Department of Breast and Thyroid Surgery, Nanyang Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan 473009, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of osteopontin(OPN) gene knockout on gallstone formation in mice and the mechanism. **Methods** In this study 7 OPN knockout mice(OPN knockout group) and 7 C57BL/6J mice(control group) were fed with lithogenic diet for 8 weeks. Then gallstone formation rate, bile cholesterol concentration, and mRNA and protein expressions of ATP binding cassette transporter subfamily G member 5 and 8(ABCG5 and ABCG8) in gallbladder tissue were observed. **Results** The stone formation rate of the OPN knockout group was significantly lower than that in the control group(14.29 vs. 85.71%), the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). The bile cholesterol concentration in the OPN knockout group was significantly lower than that in the control group [ $(5.35 \pm 1.08)$  vs.  $(9.34 \pm 0.85)$ ], the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). The expressions of ABCG5 and ABCG8 mRNAs and proteins in the OPN knockout group were significantly lower than those in the control group( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The phenomenon that gallstone formation rate in OPN knockout mice was lower than that in normal mice, may be related to decrease of cholesterol transporters ABCG5 and ABCG8 in gallbladder tissue which results in lower cholesterol concentration in gallbladder bile.

**Keywords:** gallstones; osteopontin; cholesterol; ATP binding cassette transporter, subfamily G, member 5; ATP binding cassette transporter, subfamily G, member 8

胆囊结石是常见的消化系统疾病, 随着人们生活方式的改变, 胆囊结石尤其胆固醇结石发病率呈不断升高趋势<sup>[1]</sup>。人体胆固醇代谢和转运失衡可导致胆囊胆固醇结石患病率升高<sup>[2]</sup>。既往研究发现, 骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 可以影响肝脏胆固醇的合成、转运及小肠胆固醇吸收, 从而影响胆固醇结石的形成<sup>[3-4]</sup>。胆固醇结石形成是一个多步骤、多环节的代谢疾病, 胆囊的病理生理状态对胆结石的形成亦有至关重要的影响。因此, 本实验研究 OPN 敲除对胆囊胆固醇转运的影响, 以期进一步理清 OPN 调节胆囊胆固醇结石形成的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及标本采集

7 只 C57BL/6J 小鼠购于复旦大学作为对照组, 7 只相同背景 OPN 敲除小鼠购自美国杰克逊实验室作为敲除组。室温 (22 ± 2) °C、湿度 (60 ± 10) % 环境饲养。适应性饲养 1 周后开始实验。两组小鼠相同环境分笼饲养, 敲除组小鼠喂养致石饲料 (普通小鼠饲料添加 15% 脂肪, 2% 胆固醇, 0.5% 胆酸), 投食 3 或 4 次/d, 不限饮水, 饲料由上海史莱克公司提供。喂养 8 周后, 收集胆囊胆汁, 肉眼及偏光显微镜 (日本奥林巴斯公司) 下观察胆汁成石及胆固醇结晶情况。剩余胆汁 4 °C、15 000 r/min 离心 15 min, 加入胆汁保存液, 置于 -70 °C 冷冻保存备用。收集胆囊组织液氮速冻用于蛋白质和 RNA 提取。本实验经郑州大学附属南阳医院动物伦理委员会审核批准。

### 1.2 胆结石形成分析与胆汁生化检测

胆固醇结石定义为胆囊内肉眼可见。胆固醇晶体定义为偏光显微镜 (日本奥林巴斯公司) 可见。胆汁胆固醇、胆汁酸和三酰甘油含量测定按 ELISA 试剂盒说明书进行, 胆固醇过饱和指数 (cholesterol saturation index, CSI) 按照 Carey 表格计算。

### 1.3 实时荧光定量聚合酶链反应

采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 测定 ATP 结合盒转运子 G 亚家族成员 5/8 (ATP binding cassette transporter sub-family G member 5/8, ABCG5/ABCG8) 及肝脏 X 受体 (liver X receptor, LXR) 在胆囊组织中的表达。按 Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 说明书提取组织标本的 RNA。mRNA 测定按 qRT-PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 说明书进

行, 检测采用 ABI 7900HT 快速 qRT-PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。反应条件: 94 °C 预变性 30 s, 60 °C 变性 30 s, 72 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 10 min, 共 40 个循环。阈值循环 (Ct) 为在该荧光通过的固定阈值的分数循环数, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法, 以 GAPDH 为对照, 计算相对表达量。PCR 引物设计见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
ABCG5	正向: 5' -AGGGCCTCACATCAACAGAG -3'	109
	反向: 5' -GCTGACGCTGTAGGACACAT -3'	
ABCG8	正向: 5' -TGCCCACCTTCCACATGTC -3'	73
	反向: 5' -ATGAAGCCGGCAGTAAGGTAGA -3'	
LXR	正向: 5' -GATAGGTTGGACTCAGCA -3'	520
	反向: 5' -GGAGCGCCTGTACACTGTT -3'	
GAPDH	正向: 5' -TGTGTCCTCGTGATCTGA -3'	77
	反向: 5' -CCTGCTCACCACCTTCTGAT -3'	

### 1.4 Western blotting 检测

采用蛋白提取试剂盒提取胆囊组织总蛋白。使用 BCA 法测定蛋白浓度。参照试剂盒说明书进行 Western blotting 检测。抗体稀释度如下: 抗 ABCG5 (1 : 1 000), 抗 ABCG8 (1 : 1 000), 抗 LXR (1 : 1 000), 抗 β-actin (1 : 500)。Western blotting 检测结果用化学发光法暴露于照相胶片。免疫反应带采用 Image J 软件参照 β-actin 进行量化。

### 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用 *t* 检验; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 Fisher 确切概率法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

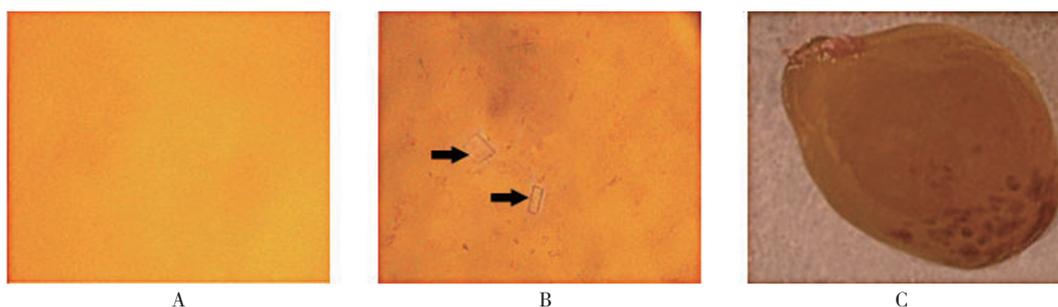
## 2 结果

### 2.1 胆囊成石情况

致石饮食饲养 8 周后, 对照组小鼠胆囊成石率为 85.71% (6/7), 敲除组为 14.29% (1/7), 经 Fisher 确切概率法, 差异有统计学意义 (*P* = 0.029)。采用偏光显微镜观察敲除组小鼠胆汁清亮, 而对照组小鼠胆汁浑浊且存在大量胆固醇结晶。见图 1。

### 2.2 胆囊炎症情况

致石饮食饲养 8 周后, 对照组小鼠胆囊黏膜增厚且局部有大量炎症细胞浸润, 而敲除组小鼠黏膜未见上述表现。见图 2。



A: 正常胆汁 (×10); B: 胆固醇结晶 (×10); C: 胆囊内胆固醇结石 (×5)

图 1 小鼠胆汁胆固醇结晶及胆固醇结石

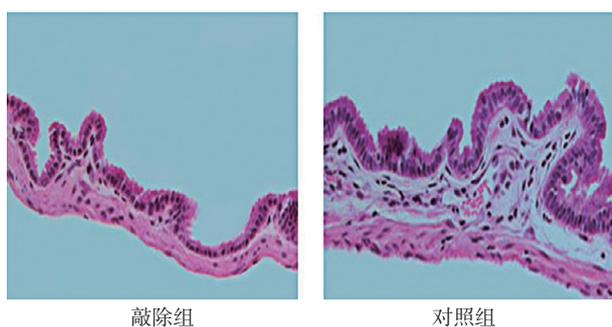


图 2 两组小鼠胆囊黏膜 (HE × 100)

### 2.3 OPN 敲除改变胆汁胆固醇含量和 CSI 指数

实验前两组小鼠胆囊体积、胆汁胆固醇、磷脂含量、胆汁酸含量及 CSI 比较, 经  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。喂食致石饮食 8 周后, 两组小鼠胆囊体积、胆汁磷脂含量和胆汁酸含量比较, 经  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。两组小鼠胆汁胆固醇含量比较, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 敲除组较对照组低。两组小鼠 CSI 比较, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 敲除组较对照组低。见表 2。

表 2 两组小鼠胆囊体积, 胆汁胆固醇、磷脂、胆汁酸含量及 CSI 比较 ( $n = 7, \bar{x} \pm s$ )

组别	胆囊体积 / $\mu\text{l}$	胆汁胆固醇含量 / (mmol/L)	磷脂含量 / (mmol/L)	胆汁酸含量 / (mmol/L)	CSI
<b>敲除组</b>					
实验前	23.2 ± 5.01	2.75 ± 0.77	24.19 ± 2.75	56.68 ± 8.34	0.47 ± 0.09
实验后	26.9 ± 7.62	5.35 ± 1.08	26.31 ± 2.21	84.07 ± 5.97	0.55 ± 0.07
<b>对照组</b>					
实验前	24.6 ± 7.45	2.31 ± 0.46	23.76 ± 2.21	61.37-7.63	0.45 ± 0.10
实验后	23.5-5.31	9.34±0.85	28.40 ± 3.49	77.81 ± 8.21	1.09 ± 0.12
$t_1$ 值	0.472	1.283	0.323	1.098	0.409
$P_1$ 值	0.645	0.225	0.752	0.294	0.691
$t_2$ 值	0.964	7.134	1.563	1.695	8.621
$P_2$ 值	0.354	0.001	0.144	0.113	0.002

注:  $t_1$ 、 $P_1$  为两组实验前比较,  $t_2$ 、 $P_2$  为两组实验后比较

### 2.4 OPN 敲除对胆囊 ABCG5、ABCG8 及 LXR 表达的影响

**2.4.1 mRNA** 实验前两组小鼠 ABCG5、ABCG8 及 LXR mRNA 表达水平比较, 经  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。致石饮食饲养后敲除组和对照组小鼠胆囊 ABCG5 mRNA 相对表达量分别为(0.47 ± 0.08) 和 (1.01 ± 0.07), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 13.172, P = 0.001$ )。敲除组和对照组小鼠胆囊 ABCG8 mRNA 相对表达量分别为 (0.53 ± 0.07) 和 (1.04 ± 0.11), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 13.714,$

$P = 0.001$ )。敲除组和对照组小鼠胆囊 LXR mRNA 相对表达量分别为 (0.49 ± 0.08) 和 (1.01 ± 0.06), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 10.473, P = 0.002$ )。见图 3。

**2.4.2 蛋白** 致石饮食饲养后敲除组和对照组小鼠胆囊 ABCG5 蛋白相对表达量分别为 (0.51 ± 0.06) 和 (1.03 ± 0.08), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 11.838, P = 0.002$ )。敲除组和对照组小鼠胆囊 ABCG8 蛋白相对表达量分别为 (0.48 ± 0.07) 和 (1.01 ± 0.10), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 12.913, P = 0.001$ )。敲

除组和对照组小鼠胆囊 LXR 蛋白相对表达量分别为  $(0.58 \pm 0.09)$  和  $(0.99 \pm 0.07)$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=8.127, P=0.003$ )。见图 4。

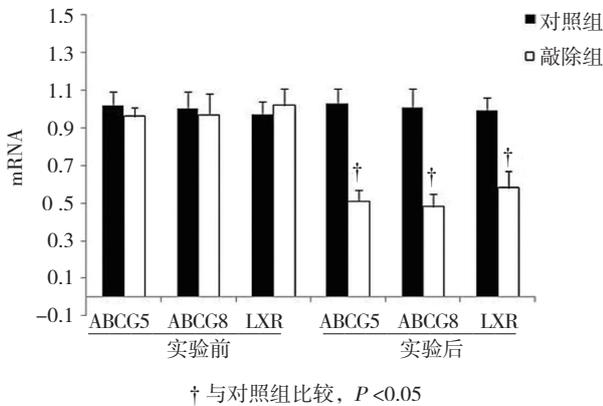
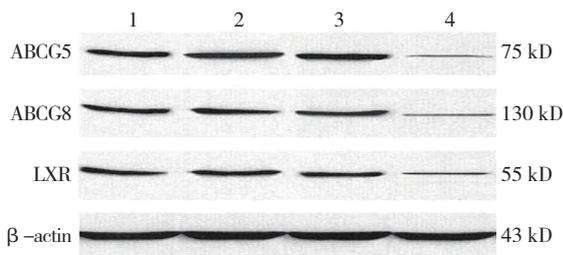


图3 实验前后两组小鼠 ABCG5、ABCG8 和 LXR mRNA 表达水平比较 ( $n=7, \bar{x} \pm s$ )



1: 对照组实验前; 2: 敲除组实验前; 3: 对照组实验后; 4: 敲除组实验后

图4 两组小鼠实验前后 ABCG5、ABCG8 和 LXR 蛋白的表达

### 3 讨论

本研究发现, *OPN* 敲除小鼠具有更低的胆汁胆固醇含量, 更低的饮食诱发胆结石形成率。本研究还发现, 致石饮食喂养 8 周后两组小鼠胆囊容积无差异, 表明 *OPN* 敲除并未对小鼠胆囊运动、排空功能产生影响。生化分析显示, *OPN* 敲除小鼠胆汁中胆固醇含量较 C57BL/6J 小鼠降低, 而胆汁酸和磷脂含量无明显变化, 使敲除组小鼠胆囊胆汁具有更低的 CSI, 表明 *OPN* 敲除对小鼠胆囊结石形成的保护作用来自于降低了胆汁中胆固醇的含量。

胆固醇在机体内的代谢是一个多器官、多步骤的过程。ABCG5 和 ABCG8 是三磷酸腺苷结合盒 (ABC) G 亚家族中超家族成员, 两者在细胞内以异二聚体方式结合, 组成跨膜转运蛋白, 参与胆固醇代谢, 调节胆囊胆固醇结石形成<sup>[5]</sup>。肝脏组织过表达 ABCG5 和

ABCG8 可导致肝脏胆汁中胆固醇过饱和<sup>[5]</sup>。胆囊胆固醇结石患者胆囊组织中也存在 ABCG5 和 ABCG8 过表达的现象<sup>[6]</sup>。研究发现, 胆囊组织表达 ABCG5 和 ABCG8 的功能是将胆固醇从胆囊上皮细胞排泄至胆囊腔内, 起到提高和维持胆汁胆固醇浓度的作用<sup>[7-8]</sup>。因此, 肝脏胆固醇代谢失衡是导致胆汁胆固醇过饱和的起始条件, 而胆囊组织胆固醇代谢失衡, 则使胆囊胆汁中过饱和的胆固醇得以维持和继续, 并最终促使胆囊中胆固醇的析出、结晶, 以至最终胆囊胆固醇结石的形成。*OPN* 参与胆固醇结石形成的调节, 然而确切机制仍不明确。*NUNEZ-GARCIA* 等<sup>[9]</sup> 研究发现, *OPN* 敲除小鼠体内的胆固醇代谢酶 *CYP7A1* 表达升高, 而且体外细胞学实验发现 *OPN* 对肝细胞内 *CYP7A1* 的抑制作用是通过 *FAK-Akt* 信号通路实现的。本研究发现, *OPN* 敲除小鼠较对照组具有更低的胆囊 ABCG5/ABCG8 蛋白和 mRNA 表达水平, 而胆囊组织中 ABCG5/ABCG8 的表达减少导致胆囊细胞向胆汁中排泄胆固醇减少。*LXR* 是核受体家族成员, 对机体胆固醇代谢有重要调节作用<sup>[10]</sup>。在饮食诱导胆固醇结石的研究中发现, *LXR* 对 ABCG5、ABCG8 和 *CYP7A1* 等胆固醇代谢关键因子发挥调节作用<sup>[11-12]</sup>。本研究发现, *OPN* 敲除小鼠胆囊组织 *LXR* 表达水平较对照组降低, 表明 *OPN* 可能通过作用于 *LXR* 从而调节 ABCG5/ABCG8 的表达。*LIMA-CABELLO* 等<sup>[13]</sup> 研究发现, 非酒精性脂肪肝组织中存在 *LXR*、*OPN* 及炎症调节因子 *TNF-α* 和 *IL-6* 等过度表达。*全莎* 等<sup>[14]</sup> 研究发现, *TNF-α* 可通过调节 *LXR* 启动子活性, 从而抑制 HepG2 细胞内胆固醇外流, 导致肝细胞内脂质异常积聚。本研究对小鼠胆囊进行组织学检查, 结果发现 *OPN* 敲除小鼠较对照组胆囊黏膜炎症较轻, 炎细胞浸润较少, 这提示 *OPN* 下调可以减轻胆囊局部炎症。本研究对 *OPN* 调节胆固醇代谢, 影响胆固醇结石形成的机制进行进一步的探讨, 发现 *OPN* 通过减轻胆囊组织炎症反应, 减少 *LXR* 表达, 减少胆囊 ABCG5、ABCG8 的表达, 降低胆囊胆汁中胆固醇浓度, 最终降低胆结石形成率。

#### 参考文献:

- [1] 蒋兆彦, 胡海, 韩天权, 等. 胆固醇的肠肝循环: 肝脏和小肠在胆石形成中的作用 [J]. 外科理论与实践, 2017(03): 191-194.
- [2] DI CIAULA A, GARRUTI G, FRUHBECK G, et al. The role of diet in the pathogenesis of cholesterol gallstones [J]. Curr Med Chem, 2017(24): 42-49.

- [3] LIN J, LU M, SHAO W Q, et al. Erratum: osteopontin deficiency alters biliary homeostasis and protects against gallstone formation[J]. *Sci Rep*, 2017, (7): 44962-44972.
- [4] LIN J, SHAO W Q, CHEN Q Z, et al. Osteopontin deficiency protects mice from cholesterol gallstone formation by reducing expression of intestinal NPC1L1[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1785-1792.
- [5] WANG H H, LI X, PATEL S B, et al. Evidence that the adenosine triphosphate-binding cassette G5/G8-independent pathway plays a determinant role in cholesterol gallstone formation in mice[J]. *Hepatology*, 2016, 64(3): 853-864.
- [6] 邓量, 梁明懿, 张昆松, 等. ABCG5 和 ABCG8 基因在胆囊胆固醇结石和胆固醇息肉形成中的作用 [J]. *中华肝脏外科手术学电子杂志*, 2015(02): 125-128.
- [7] LIANG Y, CHEN J, ZUO Y, et al. Blueberry anthocyanins at doses of 0.5 and 1% lowered plasma cholesterol by increasing fecal excretion of acidic and neutral sterols in hamsters fed a cholesterol-enriched diet[J]. *Eur J Nutr*, 2013, 52(3): 869-875.
- [8] GHANBARI-NIAKI A, ZARE-KOOKANDEH N, ZARE-KOOKANDEH A. ABCG5 gene responses to treadmill running with or without administration of *Pistachio atlantica* in female rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(3): 162-171.
- [9] NUNEZ-GARCIA M, GOMEZ-SANTOS B, BUQUE X, et al. Osteopontin regulates the cross-talk between phosphatidylcholine and cholesterol metabolism in mouse liver[J]. *The Journal of Lipid Research*, 2017, 58(9): 1903-1915.
- [10] LI N, WANG X, XU Y, et al. Identification of a novel liver X receptor agonist that regulates the expression of key cholesterol homeostasis genes with distinct pharmacological characteristics[J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 91(4): 264-276.
- [11] YU X H, QIAN K, JIANG N, et al. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 428: 82-88.
- [12] LIU Y, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Medium-chain fatty acids reduce serum cholesterol by regulating the metabolism of bile acid in C57BL/6J mice[J]. *Food Funct*, 2017, 8(1): 291-298.
- [13] LIMA-CABELLO E, GARCIA-MEDIAVILLA M V, MIQUILENA-COLINA M E, et al. Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 120(6): 239-250.
- [14] 仝莎, 陈曜, 赵蕾, 等. TNF- $\alpha$  对 HepG2 细胞 LXR $\alpha$  介导的胆固醇外流的影响及其分子机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013(2): 193-199.

(童颖丹 编辑)