

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.18.006
文章编号: 1005-8982(2019)18-0030-06

胆汁及胆囊黏膜中骨桥蛋白、瘦素、内脂素及脂联素的表达及意义

邹旺生¹, 陈健¹, 张宏²

(1. 铜陵市人民医院 急诊外科, 安徽 铜陵 244000; 2. 贵州医科大学附属医院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 目的 通过检测胆固醇结石患者胆汁成分和胆囊黏膜基因的表达以探索胆固醇结石的成因。**方法** 采用酶联免疫吸附总试验、氧化酶法和咖啡因法检测胆固醇结石患者胆汁中胆固醇、瘦素、内脂素、脂联素、磷脂、总胆汁酸、胆固醇饱和指数(CSI)水平;免疫组织化学、Western blotting检测胆囊黏膜组织中骨桥蛋白(OPN)的表达。**结果** 观察组患者胆汁CSI、胆固醇、胆固醇百分比、总脂、瘦素及内脂素浓度较对照组升高($P < 0.05$),总胆汁酸、磷脂和脂联素较对照组下降($P < 0.05$);观察组胆囊黏膜中OPN的平均光密度值和蛋白相对表达量较对照组高($P < 0.05$)。**结论** OPN、内脂素、脂联素可能是胆固醇结石形成的共同因素。

关键词: 胆汁; 骨桥蛋白; 瘦素

中图分类号: R657.42

文献标识码: A

Expression and significance of osteopontin, leptin, visfatin and adiponectin in bile and gallbladder mucosa

Wang-sheng Zou¹, Jian Chen¹, Hong Zhang²

(1. Department of Emergency Surgery, Tongling People's Hospital, Tongling, Anhui 244000, China;
2. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To explore the cause of cholesterol gallstones through detecting the composition of bile and expression of genes of gallbladder mucosa in patients with cholesterol gallstone. **Methods** We analyzed the composition of bile including leptin, visfatin, adiponectin, phospholipid, bile acid, cholesterol and cholesterol saturation index (CSI) in patients with cholesterol gallstone by ELISA method, oxidase-peroxidase method and caffeine method, and the expression of osteopontin in gallbladder mucosa was detected by immunohistochemistry and Western blot assay. **Results** The CSI, percentage of cholesterol and concentration of cholesterol, total lipid, leptin and visfatin in gallstone group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$); concentration of phospholipid, bile acid and ADPN were lower than those in control group ($P < 0.05$); expression of OPN for gallbladder mucosa in gallstone group were significantly enhanced ($P < 0.05$). **Conclusions** OPN, Leptin, Visfatin and ADPN may be the common factors of cholesterol stone formation.

Keyword: bile; osteopontin; leptin

胆囊结石是胆道系统中一种常见的良性疾病, 综合发病率约为 10%^[1]。其中最常见的类型为胆固醇结

石, 约占 90%^[2-3]。胆固醇结石的形成可能与胆汁胆固醇过饱和, 胆固醇结晶成核时间, 胆囊运动减弱, 基

收稿日期: 2019-03-09

[通信作者] 张宏, E-mail: homchang@vip.qq.com; Tel: 0851-86771326

因和环境等因素共同作用有关^[4]。目前国内外对结石形成与发展所处的内环境(胆汁)及胆囊黏膜的研究相对缺乏。本研究旨在通过检测胆汁及胆囊黏膜中瘦素、内脂素、脂联素及骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)等指标或表达差异,为临床胆固醇结石的进一步防治提供潜在可能。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月—2018 年 12 月在贵州医科大学附属医院肝胆外科行腹腔镜胆囊切除术的 74 例患者作为观察组,术后均证实为胆固醇结石。其中,男性 21 例,女性 53 例。另选取 30 例手术切除胆囊的非胆囊结石患者作为对照组。其中,男性 9 例,女性 21 例;根据胆囊是否有息肉将对照组分为对照息肉组和对照正常组,分别为 22 和 8 例。对照组患者术前均无胆囊结石病史,术中确认胆囊无结石、结晶及胆汁淤积、肿瘤侵袭等。

1.2 材料与试剂

1.2.1 标本采集 记录患者年龄、身高、体重,计算 BMI。所有患者胆囊切除后迅速从胆囊中抽取胆汁 5 ~ 10 ml,然后剖开胆囊采集结石。在胆囊床对侧的胆囊壁内(远离电刀分离面),用剪刀沿黏膜下行锐性剥离,取胆囊壁全层约 4 cm²置于 10% 甲醛中留作病理染色使用。胆汁置于 -80℃ 保存,胆石经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)漂洗、烘干后室温存储。

1.2.2 试剂 Western blotting 一抗(美国 Abcam 公司),酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(美国 Rapidbio 公司),氧化酶法试剂盒(南京建成生物工程研究所)

1.2.3 仪器与设备 分光光度计、离心机(德国 Eppendorf 公司),37℃ 水浴锅、95℃ 金属浴锅(北京田园奥瑞生物科技有限公司),胶片曝光机 SRX-101A(日本 Konica Minolta 公司)

1.3 方法

1.3.1 胆汁成分测定 胆汁 3 000 r/min 离心 10 min 取上清,检测瘦素、内脂素、脂联素、胆固醇、磷脂及总胆汁酸等。按 ELISA 试剂盒说明书操作,用 Excel 软件绘制出的标准品线性回归曲线(曲线经校正为直线),按曲线方程计算各样本浓度值。胆汁中胆固醇按总胆

固醇的检测(氧化酶法)试剂盒说明书操作。

1.3.2 胆固醇饱和指数(cholesterol saturation index, CSI)测定 利用胆汁中胆固醇浓度、磷脂和总胆汁酸浓度计算出胆汁总脂浓度和磷脂百分比并通过查 Carey 表算出 CSI^[5]。

1.3.3 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色 常规石蜡包埋和切片:从 10% 甲醛固定标本中剪取部分胆囊全层组织,按冲洗→梯度脱水→透明→浸蜡→包埋→切片→贴片烘片流程操作。切片厚度 5 μm。HE 染色:切片置于 60℃ 温箱烤片熔蜡 30 min,分置二甲苯 I、II 脱蜡各 5 min,无水、95%、85% 及 75% 酒精梯度脱水,苏木精染色 5 min,流水冲洗。0.5% 盐酸酒精分化 20 s,自来水洗 2 min,梯度酒精脱水,0.5% 伊红染色 3 min,蒸馏水速洗。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.3.4 免疫组织化学染色 为进一步观察差异表达基因 OPN 在胆囊黏膜的表达部位,对胆囊组织进行免疫组织化学染色,用 PBS 代替一抗作内参对照。石蜡切片二甲苯 I、II 及 III 脱蜡各 10 min,无水酒精、90% 酒精、80% 及 70% 酒精梯度脱水各 2 min。PBS 漂洗 2 min/次,共 3 次,浸入枸橼酸盐缓冲液中煮沸(微波抗原修复),高火 2 min,再维持 10 min,取出自然冷却后 PBS 漂洗 2 min/次,共 3 次。过氧化氢 H₂O₂ 和甲醇按 1 : 9 比例孵育 5 ~ 10 min(去除内源性过氧化物酶)。切片加 2 滴 5% 胎牛血清白蛋白封闭液封闭。室温放置 20 min 后,轻轻甩去封闭液,不洗,加入抗体稀释液 1 : 200 稀释的一抗 40 μl,置于湿盒中。4℃ 冰箱孵育过夜。PBS 漂洗 5 min/次,共 3 次,加二抗 40 μl,室温孵育 1 h。PBS 漂洗 5 min/次,共 3 次。二氨基苯胺显色,室温下镜下观察 3 ~ 10 min。阳性产物呈棕黄色,观察到阳性产物后立即终止反应。苏木精衬染细胞核,盐酸酒精水洗蓝化,80%、90% 及无水酒精梯度酒精脱水,二甲苯透明 5 min,干燥后用中性树脂封片,镜下观察。所有图片采用 Image pro plus 6.0 软件行光密度(optical density, OD)值分析。

1.3.5 Western blotting ①黏膜组织匀浆及样品制备:将组织放入 10 ml 离心管,加入细胞裂解液 1 ml(pH 8.0 的 1 mmol/L Tris-HCl 50 μl, 5 mmol/L NaCl 30 μl; NP-40 10 μl, 0.5 mmol/L EDTA 4 μl, 0.5 mmol/L 去氧胆酸钠 10 μl, 100 mmol/L PMSF 10 μl, 2 mg/ml

Leupeptin 5 μ l, 2 mg/ml Aprotinin 2.5 μ l, 0.5 mmol/L 焦磷酸钠 10 μ l, 10% SDS 10 μ l, 三蒸水定容至 1.0 ml), 充分匀浆, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 去上清分装成 20 μ l/管。分光光度计测浓度, 加入三蒸水使每管浓度为 25 μ g/ml, 再加入等体积的 Sample Buffer (10% SDS 2.0 ml, 甘油 1.0 ml, pH 6.8 的 0.5 mol Tris-HCl 1.6 ml, β -巯基乙醇 0.5 ml, Western blotting protein ladders 10 μ l, 三蒸水定容至 10 ml) 混匀备用。使用前 90 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 短暂离心, 按 25 μ g/孔蛋白上样。②电泳: 垂直电泳槽中加入分离胶 (三蒸水 4 ml, 30% Acrylamide 3.3 ml, pH 8.8 的 1.5 mmol/L Tris-HCl 2.5 ml, 10% SDS 100 μ l, 10% APS 100 μ l, 最后加入 10% TEMED 10 μ l 占下 3/4), 用注射器注入浓缩胶 (三蒸水 1.4 ml, 30% Acrylamide 0.4 ml, pH 6.8 的 0.5 mmol/L Tris-HCl 0.63 ml, 10% SDS 50 μ l, 10% APS 12 μ l, 10% TEMED 5 μ l), 插上梳子, 室温聚合 1 h。待胶完全聚合后取下梳子, 每样上 2 块平行胶, 蛋白上样 70 μ l/孔; 上样完毕后电泳槽中加入电泳缓冲液 (25 mmol/L Tris 3.03 g, 192 mmol/L 甘氨酸 14.42 g, pH 8.0 的 0.1% SDS 1 g), 电泳先以 80 V 电压进行, 待 Protein Ladders 入分离胶后将电压改为 120 V 恒定电压进行, 电泳至 Protein Ladders 到底边处停止电泳, 取出凝胶。③转膜: 电泳完毕将胶取下做好标记, 按塑料孔板 (黑)-海绵-滤纸-电泳凝胶-PVDF 膜-滤纸-海绵-塑料孔板 (白) 的顺序做好三明治, 放于电转膜液中 (甘氨酸 11.26 g, Tris 2.42 g, 20% 甲醇 500 ml, pH 8.0) 转膜, 400 mA 恒电流转移 1.5 h。④抗体孵育: 取下电转移的 PVDF 膜, 1 \times TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 置于 5% BSA 中常温封闭 1 h。加入 1:1 000 稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C 恒温孵育过夜, 取出 PVDF 膜用 1 \times TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入 1:5 000 稀释的相应二抗,

37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1 h, 1 \times TBST 洗膜 3 次, 10 min/次。⑤显影: 取 WestPico Chemiluminescent Substrate ECL 试剂 A、B 液各 1 ml 混匀, 每张 PVDF 膜用 1 ml A、B 混合液浸润约 5 min 后放入暗盒固定, 在暗室以胶片覆盖后关上暗盒 20 s ~ 5 min, 取出胶片后放入显影洗片机中显影, 取出胶片观察结果。Western blotting 图片采用 Image J 软件进行条带灰度值数据处理。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或单因素方差分析, 方差不齐时改用 H 检验, 进一步两两比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较

两组患者男女性构成比、年龄、BMI 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 两组患者胆汁成分比较

两组患者胆固醇、磷脂、总胆汁酸、胆固醇百分比、总脂及 CSI 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 观察组胆固醇、胆固醇百分比、总脂及 CSI 高于对照组, 观察组磷脂、总胆汁酸低于对照组。见表 2。

表 1 两组患者一般资料比较

组别	n	男/女/例	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	BMI/(kg/m^2 , $\bar{x} \pm s$)
观察组	74	21/53	49.9 \pm 4.3	26.4 \pm 0.6
对照组	30	9/21	46.2 \pm 1.3	21.3 \pm 0.4
χ^2/t 值		0.027	8.246	6.122
P 值		0.869	0.599	0.026

表 2 两组患者胆汁成分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胆固醇/ (mmol/L)	磷脂/(mmol/L)	总胆汁酸/ (mmol/L)	胆固醇 百分比/%	磷脂百分比/%	总胆汁酸 百分比/%	总脂/(g/dl)	CSI
观察组	74	18.87 \pm 1.64	37.42 \pm 5.45	119.07 \pm 11.20	10.16 \pm 0.60	21.17 \pm 0.76	68.8 \pm 1.25	16.93 \pm 1.49	1.72 \pm 0.37
对照组	30	10.55 \pm 1.03	59.77 \pm 6.03	176.53 \pm 14.23	4.05 \pm 0.22	24.21 \pm 1.07	71.80 \pm 1.14	11.76 \pm 1.16	0.95 \pm 0.15
t 值		10.273	24.511	56.581	5.311	7.870	30.435	8.122	2.290
P 值		0.005	0.041	0.033	0.028	0.093	0.115	0.012	0.006

2.3 两组患者胆汁中瘦素、内脂素及脂联素比较

两组患者胆汁中瘦素、内脂素及脂联素比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 观察组胆汁中瘦素、内脂素高于对照组, 观察组胆汁中脂联素低于对照组。见表 3。

表 3 两组患者胆汁中瘦素、内脂素及脂联素比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	瘦素 / (ng/ml)	内脂素 / (ng/ml)	脂联素 / (μ g/ml)
观察组	74	7.14 \pm 3.75	12.02 \pm 3.39	7.4 \pm 1.65
对照组	30	3.08 \pm 1.27	8.15 \pm 2.45	11.3 \pm 3.26
<i>t</i> 值		4.239	6.625	5.331
<i>P</i> 值		0.008	0.038	0.005

2.4 各组胆囊黏膜 HE 染色结果

观察组胆固醇结石患者近 3 个月无急性发作史, 胆囊黏膜呈慢性胆囊炎表现, 没有黏膜萎缩, 囊壁增厚不明显。镜下见黏膜有增生, 单核细胞浸润。部分黏膜下可见泡沫细胞, 表明有胆固醇沉积。少数黏膜内可见淋巴结以及杯状细胞, 提示肠化。对照息肉组患者与对照正常组患者镜下见胆囊黏膜炎症细胞浸润较轻。见图 1。

2.5 各组胆囊黏膜中 OPN 的表达

免疫组织化学结果显示, 观察组患者胆囊黏膜 OPN 主要表达在胆囊黏膜上皮细胞的顶端膜上, 部分胞浆内也可看到表达的颗粒。对照息肉组患者胆囊黏膜中较少表达, 对照正常组患者胆囊黏膜中无表达。见图 2。

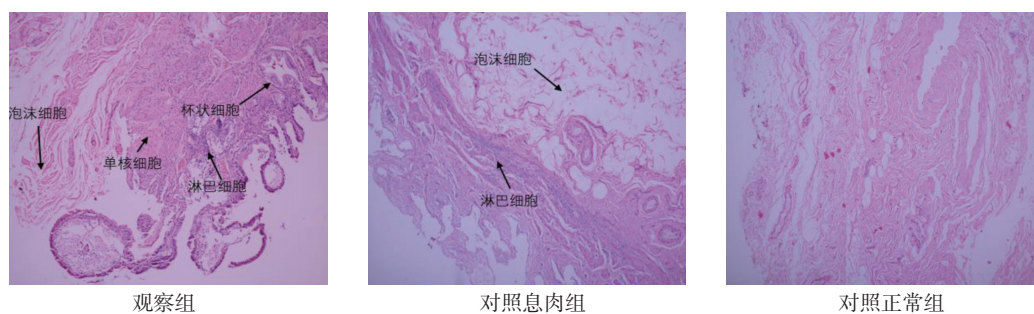


图 1 各组胆囊黏膜 (HE 染色 $\times 200$)

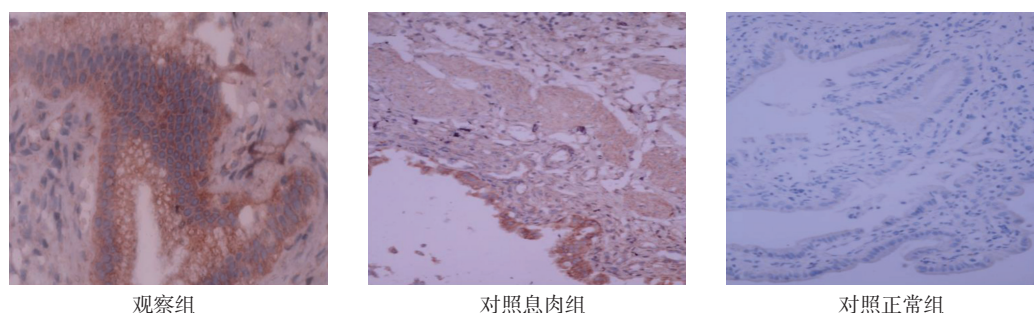
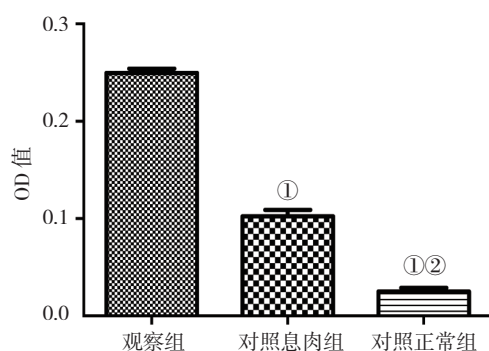


图 2 各组胆囊黏膜中 OPN 的表达 ($\times 200$)

2.6 各组 OPN 的 OD 值比较

观察组 OPN 的 OD 值为 (0.27 ± 0.04), 对照息肉组为 (0.11 ± 0.06), 对照正常组为 (0.03 ± 0.01), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 3.876$, $P = 0.020$), 但方差齐性 levene 检验结果 $P = 0.012$, 提示方差不齐, 故改用非参数检验 H 检验, 差异有

统计学意义 ($Z = 12.283$, $P = 0.029$); 进一步两两比较, 观察组与对照息肉组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 0.246$, $P = 0.012$); 观察组与对照正常组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 0.092$, $P = 0.003$); 对照息肉组与对照正常组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 0.179$, $P = 0.035$)。见图 3。



①与观察组比较, $P < 0.05$; ②与对照息肉组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 各组 OPN 的 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.7 各组 OPN 蛋白相对表达量比较

Western blotting 结果显示, 观察组 OPN 蛋白相对表达量为 (0.88 ± 0.13), 对照息肉组为 (0.33 ± 0.07), 对照正常组为 (0.08 ± 0.05) 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 5.374$, $P = 0.039$), 但方差齐性 levene 检验结果 $P = 0.025$, 提示方差不齐, 故改用非参数检验 H 检验, 差异有统计学意义 ($Z = 29.845$, $P = 0.017$); 进一步两两比较, 观察组与对照息肉组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 0.133$, $P = 0.027$); 观察组与对照正常组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 0.034$, $P = 0.008$); 对照息肉组与对照正常组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 0.291$, $P = 0.015$)。见图 4、5。

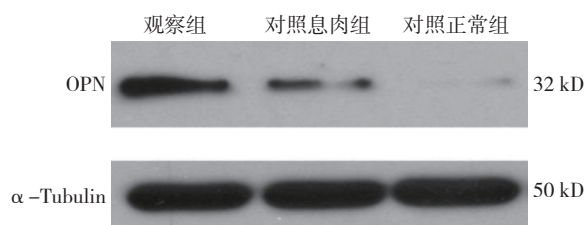
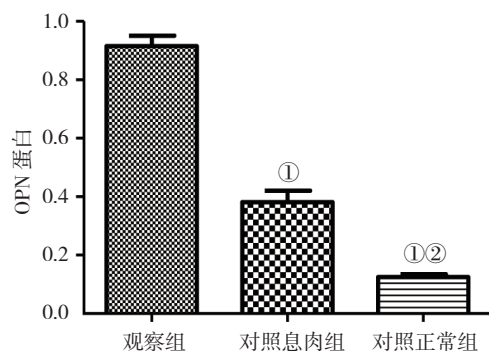


图 4 各组 OPN 蛋白的表达



①与观察组比较, $P < 0.05$; ②与对照息肉组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 各组 OPN 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

瘦素由人体脂肪细胞分泌, 它可以通过调节脂质代谢, 影响胆囊收缩功能, 并通过调节胆汁蛋白成分等机制促进胆固醇结石的形成^[6]。脂联素由人体脂肪组织合成, 具有 Adipo1 (R1)、Adipo2 (R2) 两种受体, R1 多在骨骼肌表达, 而 R2 主要在肝脏表达。胰岛素可抑制胆盐合成限速酶 7 α 羟化酶, 使胆汁酸减少分泌, 同时也使胆汁中钙离子升高, 黏多糖增多, 打破了胆汁抗成核及促成核因子的动态平衡^[7-8]。目前有研究认为胆固醇结石患者体内脂联素的水平较低, 这在一定程度上降低了胰岛素的敏感性并使胰岛素抵抗增加, 胰岛素的水平相对增高。胰岛素与脂联素的关系密切, 两者协同作用, 共同参与了胆固醇结石的形成^[9]。内脂素可通过下调 THP-1 源性巨噬细胞的人源脂类外向转运蛋白 ABCA1 的表达, 减少细胞内游离胆固醇外流, 同时使乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 1 表达增高, 增加了细胞内胆固醇的合成, 促进了泡沫细胞的形成^[10-11]。脂肪细胞中的胆固醇负荷增加, 可使脂肪细胞分泌内脂素增加, 其机制可能与脂肪细胞的内质网应激增强有关^[12]。这也为内脂素导致胆固醇性结石形成的机制研究提供了新的理论依据。而笔者实验中观察组相对于对照组, 胆汁中的瘦素、内脂素水平升高, 脂联素降低, 基本与以上理论相吻合。

水溶性极差的胆固醇在胆汁中主要以胆固醇、胆盐及磷脂混合的微胶粒相形式存在^[13]。有研究通过检测胆囊结石患者的胆汁发现, 胆盐和磷脂可以影响胆固醇在胆汁中的溶解度, 它们之间存在热力学平衡。结石患者的胆汁中胆固醇出现热力学失衡, 更易过饱和析出产生结晶, 最终导致胆囊结石的形成^[14]。笔者的实验结果中, 观察组相对于对照组, 胆汁中的胆固醇浓度, CSI 升高, 总胆汁酸和磷脂的浓度降低, 由此推测胆汁中胆盐减少, 形成的微胶粒绝对不足, 影响了胆固醇的溶解度, 同时由于胆固醇浓度增高, 形成的微胶粒相对不足, 影响了其在胆汁中的溶解度, 两种原因共同导致胆固醇呈过饱和状态并析出结晶形成结石。

OPN 可以通过调节胆汁代谢, 改变胆汁的稳态, 导致胆固醇结石的发生。其机制是肝脏内的 OPN 降低了肝脏中胆汁酸合成代谢的限速酶 CYP7A1 的表达, 并增加了与胆固醇形成相关的基因 *SHP*、*ATP8B1*、*SR-B1* 及 *SREBP-2* 的表达, 导致胆汁酸合

成减少, 胆固醇合成增加, 加速了胆汁的成核作用。有研究报道, OPN 的缺乏可抑制肠道胆固醇转运关键蛋白 NPC1L1, 而 NPC1L1 与胆固醇在肠道的吸收密切相关, NPC1L1 在肠道的表达减少可以导致胆固醇在肠道的吸收下降, 间接使胆汁中胆固醇的含量降低, 从而减少胆固醇结石的形成^[15]。本实验中, 观察组胆囊黏膜中 OPN 的表达高于对照组, 可能与以上机制有关。

参 考 文 献:

- [1] SHIRAH B H, SHIRAH H A, ZAFAR S H, et al. Clinical patterns of postcholecystectomy syndrome[J]. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2018, 22(1): 52-57.
- [2] LAURIDSEN B K, STENDER S, FRIKKE-SCHMIDT R, et al. Genetic variation in the cholesterol transporter NPC1L1, ischaemic vascular disease, and gallstone disease[J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(25): 1601-1608.
- [3] CHEN H, CHEN S, HUANG Z, et al. Relationship between blood parameters and clonorchis sinensis infection: a retrospective single center study[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 1(59): 120-126.
- [4] CHENG S, ZOU M, LIU Q, et al. Activation of constitutive androstane receptor prevents cholesterol gallstone formation[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(4): 808-818.
- [5] MC C. Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile[J]. *J Lipid Res*, 1978, 9(8): 945-955.
- [6] LIN I C, YANG Y W, WU M F, et al. The association of metabolic syndrome and its factors with gallstone disease[J]. *BMC Fam Pract*, 2014, 15: 138.
- [7] LIU Z Q, ZHANG M X, WANG J, et al. Analysis of correlation between the mild cognitive impairment (MCI) and level of adiponectin in elderly patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM)[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(23): 5471-5477.
- [8] SUN P, LIU L, CHEN J, et al. The polymorphism of rs266729 in adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: a Meta-Analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(47): 1-8.
- [9] KO C W, NAPOLITANO P G, LEE S P, et al. Physical activity, maternal metabolic measures, and the incidence of gallbladder sludge or stones during pregnancy: a randomized trial[J]. *Am J Perinatol*, 2014, 31(1): 39-48.
- [10] DOGRU T, KARA M, ERCIN C N, et al. Visfatin and gallstone disease[J]. *Am J Surg*, 2012, 203(3): 410.
- [11] BIELICKI J K. ABCA1 agonist peptides for the treatment of disease[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2016, 27(1): 40-46.
- [12] OWCZAREK A J, OLSZANECKA-GLINIANOWICZ M, KOCELAK P, et al. The relationship between circulating visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase, obesity, inflammation and lipids profile in elderly population, determined by structural equation modeling[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2016, 76(8): 632-640.
- [13] RAGHAVENDRA C K, SRINIVASAN K. Influence of dietary tender cluster beans (*Cyamopsis tetragonoloba*) on biliary proteins, bile acid synthesis and cholesterol crystal growth in rat bile[J]. *Steroids*, 2015, 94: 21-30.
- [14] SASAKI K, TACHIKAWA M, UCHIDA Y, et al. ATP-binding cassette transporter a subfamily 8 is a sinusoidal efflux transporter for cholesterol and taurocholate in mouse and human liver[J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(2): 343-355.
- [15] 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.

(李科 编辑)