

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.24.008

文章编号: 1005-8982(2016)24-0039-04

临床论著

胆固醇结石症患者与正常人胆汁骨桥蛋白 抑成核活性的比较*

郭满¹, 张浩¹, 李伟汉¹, 陈进宏²

(1. 郑州大学附属南阳医院 乳腺甲状腺外科, 河南 南阳 473003;

2. 复旦大学附属华山医院 普外科, 上海 200040)

摘要:目的 比较胆固醇结石症患者与正常人胆汁骨桥蛋白(OPN)抑成核活性及浓度的差异。**方法** 利用超速离心法结合凝胶电泳从胆固醇结石症患者及正常人胆汁中分离、纯化 OPN 蛋白。通过 HOLAN 法测定两组 OPN 的成核时间及成核活性。通过 ELISA 法检测胆固醇结石症患者与正常人胆汁中 OPN 浓度差异。**结果** 胆固醇结石症患者胆汁 OPN 蛋白较正常人具有较短的成核时间[(17.7±1.07)d vs (20.4±1.90)d], 较弱地抑制胆固醇结晶成核活性; 且胆固醇结石症患者胆汁 OPN 蛋白浓度低于正常人胆汁 OPN 蛋白浓度[(69.60±5.41)ng/ml vs (82.08±5.63)ng/ml], 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 与正常人比较, 胆固醇结石症患者胆汁 OPN 蛋白抑制胆固醇成核活性较弱、浓度较低。

关键词: 胆固醇结石; 骨桥蛋白; 抑成核活性

中图分类号: R657.4

文献标识码: A

Comparison of anti-nucleation activity of biliary osteopontin from cholesterol gallstone patients and normal individuals*

Man Guo¹, Hao Zhang¹, Wei-han Li¹, Jin-hong Chen²

(1. Department of Galactophore and Thyroid Surgery, Nanyang Hospital of Zhengzhou University, Nanyang, Henan 473003, China; 2. General Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Objective To compare cholesterol nucleation inhibiting activity and concentration of biliary osteopontin (OPN) protein from patients with cholesterol gallstone disease and normal individuals. **Methods** Biliary OPN protein were separated and purified from cholesterol gallstone patients and normal individuals using ultracentrifugation method combined with gel electrophoresis. Nucleation time and nucleation activity of OPN protein from the two groups were determined by HOLAN method. Concentration of biliary OPN protein of cholesterol gallstone patients and normal individuals were detected by Elisa method. **Results** Compared with normal individuals, the biliary OPN protein of cholesterol gallstone patients had shorter nucleation time (17.7±1.07 vs 20.4±1.90) d, and weaker cholesterol crystal nucleation inhibiting activity. Biliary OPN protein concentration in cholesterol gallstone patients were lower than in normal individuals (69.60±5.41 vs 82.08±5.63)ng/ml, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Comparing with normal individuals, cholesterol gallstone patients have lower biliary OPN concentration and weaker cholesterol nucleation inhibiting activity.

Keywords: cholesterol gallstone; osteopontin; anti-nucleation activity

收稿日期: 2016-02-26

* 基金项目: 国家自然科学基金: (No: 81270536)

[通信作者] 陈进宏, E-mail: jinhongch@hotmail.com; Tel: 13801977742

胆石症是消化系统常见疾病,随着近年来人们生活方式和饮食结构等的改变,目前胆石症发病率呈现出逐渐增高的趋势,其中以胆固醇结石增长最为迅速。胆固醇结石形成的首要条件是胆固醇从胆汁中析出结晶,再此过程中许多对胆固醇成核具有抑制或促进作用的因子发挥重要的调节作用。骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)是一种磷酸化糖蛋白,约含 314 个氨基酸残基,相对分子质量约为 44 kD,广泛地分布于多种组织和细胞中,与多种人类疾病相关^[1-2]。本课题组前期研究发现,胆汁中 OPN 作为重要的抑成核因子,具有延长胆固醇结晶、成核的作用^[3]。本研究旨在进一步研究胆固醇结石症患者与正常人胆汁 OPN 蛋白浓度及对胆固醇成核活性影响的差异,以求更进一步探索 OPN 在胆固醇结石形成过程中所发挥的作用及机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

胆固醇结石症患者的胆汁 22 份(标本取自郑州大学附属医院南阳医院 2014 年 2 月~2014 年 7 月入院接受治疗的胆固醇结石症患者,结石分类参照傅培彬法^[4]),正常人的胆汁 10 份(标本取自该院同期入院接受治疗的腹部外伤和肝移植手术患者),本实验经医院伦理委员会批准并获得患者知情同意。胆汁标本按照 STRASBERG^[5]所述的方法分装于无菌管中,4℃、10 000 r/min 离心 15 min,去除杂质,然后加入胆汁保存液(0.05% 氯霉素、3 mmol/L 叠氮钠、1 mmol/L 亮抑酶肽和 5 mmol/L 依地酸钠)置于 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 胆汁泡的制备 取胆固醇结石症患者和正常人胆汁各 5 ml,25 000 r/min 离心 10 min(5415D, Eppendorf, 德国)。抽取上层清液,并以 0.22 μm 滤膜过滤杂质,滤得清液后加入甲泛葡胺(Sigama)形成密度梯度,然后以 45 000 r/min 超速离心 3 h,针吸法收集上层半透明液即为胆汁泡。

1.2.2 胆汁 OPN 蛋白的分离和鉴定 取 100 μl 胆汁泡,加丙酮 200 μl 充分混匀,2 500 r/min 离心 15 min,针吸法抽弃上清液,留取沉淀物溶解于样品缓冲液中。微量加样器将两组样品分别加于十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)梳齿中,50 mA 恒定电流下电泳。电泳完毕后,凝胶以 1% 考马斯亮蓝 R250 染色 6 h,之后脱色。切取 44 kD 相

对分子质量标准蛋白及其所对应电泳条带,取其中 1 份转膜采用鼠抗人 OPN 抗体(Abcam)用 Western blot 法鉴定提取蛋白性质。另外部分置入透析袋 50 mA 恒定电流 3 h,浓缩,脱盐,冻干备用。

1.3 胆固醇结石症患者与正常人胆汁 OPN 蛋白抑成核活性比较

参照改良的 KIBE 法^[6],控制总脂肪浓度(胆盐 + 卵磷脂 + 胆固醇)为 100 g/L,胆固醇饱和指数为 1.2,胆盐/磷脂为 4。具体成分:胆盐 129.54 mmol/L,卵磷脂 32.38 mmol/L,胆固醇 13.56 mmol/L。取胆固醇结石症患者、正常人 OPN 蛋白及人标准白蛋白,分别加入模拟胆汁中,控制蛋白浓度 50 μg/ml,每组重复 8 份,置于 37℃ 恒温保存。连续 30 d 每日同一时间,在偏光显微镜下观察胆固醇结晶析出情况。参照 HOLAN 法^[7]计算成核时间,即从试验开始到出现镜下可见结晶的时间;一般认为白蛋白无明显成核活性,以胆固醇结石症患者与正常人胆汁 OPN 蛋白组成核时间/白蛋白组成核时间计算成核活性。

1.4 胆固醇结石症患者与正常人胆汁 OPN 蛋白浓度比较

建立 OPN 蛋白 ELISA 标准曲线,采用倍比稀释法将包被液纯化的 OPN 蛋白抗体依次加到酶标板中,每孔 100 μl,37℃ 包被 2 h,然后用 2% 牛血清白蛋白 37℃ 封闭 2 h 后拍净。将系列稀释度 OPN 蛋白标准品依次加入酶标板孔,每孔 100 μl,45℃ 反应 1 h 后拍净。接着每孔加入 HRP 100 μl (1:40 稀释),37℃ 反应 1 h 后每孔加入新鲜酶标底物液 100 μl,37℃ 下置暗处 15 min,加终止液,取 450 nm 波长滤光片,于酶标仪上读取每孔 OD 值,建立 OPN 蛋白浓度标准曲线,推导曲线方程。然后以 ELISA 法检测胆固醇结石症患者及正常人胆汁中 OPN 蛋白浓度。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,成核实验数据采用方差分析,方差分析有意义的基础上,再用 LSD 检验法进行两两比较;胆汁 OPN 浓度数据采用独立样本 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

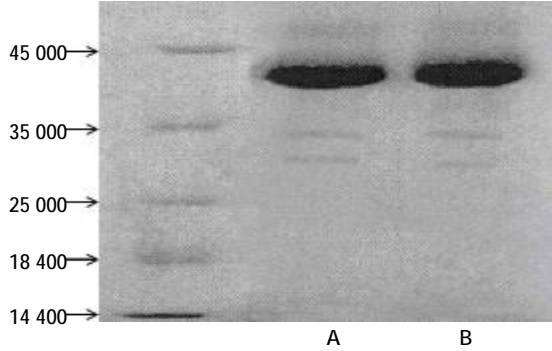
2.1 胆汁 OPN 蛋白的分离、纯化结果

SDS-PAGE 电泳结果显示,胆固醇结石症患者和正常人胆汁中 OPN 蛋白的分离、纯化效果良好。见

图 1。

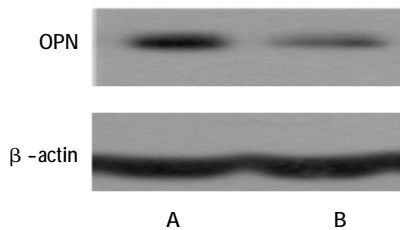
2.2 胆汁 OPN 蛋白的鉴定结果

Western blot 结果显示,实验中从 44 kD 相对分子质量所对应电泳条带中提取的蛋白为骨桥蛋白。见图 2。



A: 正常人胆汁;B:胆固醇结石患者胆汁

图 1 胆固醇结石症患者和正常人胆汁 OPN 蛋白 SDS-PAGE 电泳结果



A: 正常人胆汁;B:胆固醇结石患者胆汁

图 2 胆固醇结石症患者和正常人胆汁中骨桥蛋白鉴定结果

2.3 胆固醇结石症患者和正常人胆汁 OPN 蛋白成核活性比较

根据 HOLAN 法计算人标准白蛋白、胆固醇结石症患者和正常人胆汁 OPN 蛋白成核时间分别为 $(15.0 \pm 1.64)d$ 、 $(17.7 \pm 1.07)d$ 和 $(20.4 \pm 1.90)d$, 差异有统计学意义 ($F=21.431, P=0.007$)。胆固醇结石症患者和正常人胆汁 OPN 蛋白成核时间与入标准白蛋白组比较,经 LSD 检验,差异有统计学意义 ($P=0.023$ 和 0.009); 胆固醇结石症患者胆汁 OPN 蛋白成核时间和正常人胆汁 OPN 蛋白成核时间比较,经 LSD 检验,差异有统计学意义 ($P=0.014$)。以胆固醇结石症患者与正常人胆汁 OPN 蛋白组成核时间/白蛋白组成核时间计算成核活性,胆固醇结石症患者胆汁 OPN 蛋白成核活性中位数为 1.18, 低于与正常人 1.36。见表 1。

2.4 胆固醇结石症患者和正常人胆汁 OPN 蛋白浓度比较

由 ELISA 法得到标准蛋白系列稀释吸光度,建立曲线方程为: $Y=0.037X$ (Y : 吸光度; X : OPN 蛋白

浓度 mg/ml, 相关系数 $r=0.99$)。由 ELISA 法测得胆固醇结石症患者和正常人胆汁 OPN 蛋白含量分别为 $(69.60 \pm 5.41)ng/ml$ 和 $(82.08 \pm 5.63)ng/ml$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 1 胆固醇结石症患者和正常人胆汁 OPN 蛋白成核时间和成核活性

| 组别 | 浓度 / ($\mu g/ml$) | 成核时间 / ($d, \bar{x} \pm s$) | 成核活性 |
|---------|---------------------|-------------------------------|------|
| 白蛋白组 | 50 | 15.0 ± 1.64 | 1.00 |
| 胆固醇结石症组 | 50 | $17.7 \pm 1.07^{1)2)}$ | 1.18 |
| 正常人组 | 50 | $20.4 \pm 1.90^{1)}$ | 1.36 |

注:1)与白蛋白组比较, $P<0.05$; 2)与正常人组比较, $P<0.05$

表 2 胆固醇结石症患者和正常人胆汁 OPN 蛋白含量测定

| 组别 | 胆汁 OPN 浓度 / ($ng/ml, \bar{x} \pm s$) | t 值 | P 值 |
|--------------------|--|--------|-------|
| 胆固醇结石症组 ($n=22$) | 69.60 ± 5.41 | 10.971 | 0.004 |
| 正常人组 ($n=10$) | 82.08 ± 5.63 | | |

3 讨论

OPN 作为一种分泌型磷酸化糖蛋白,在人体多种病理生理过程中发挥重要调节作用。早期研究即已发现,OPN 在肝脏、胆囊及胆汁中有丰富表达^[9]。然而直到近年来 OPN 参与胆石症形成的一些机制才逐渐为人们所知^[9-10]。NAKAI 等^[11]研究发现,肝内结石患者肝内胆管、腺体及结石中都有 OPN 的表达。ICHIKAWA 等^[12]也发现,胆固醇结石症患者胆囊壁富含 OPN 蛋白及高表达 OPN 的巨噬细胞浸润,且胆固醇结石核心存在高表达 OPN 的巢式膜状结构成分。本课题组前期研究观察到 OPN 能抑制模拟胆汁和入胆汁胆固醇结晶生长, 稳定胆固醇 / 磷脂泡, 抑制胆固醇析出^[13]。动物实验研究发现,随着胆固醇摄入的增加,豚鼠肝脏和胆囊 OPN 的表达逐渐增加, 6 周后降至基线水平, 通过对该动态过程的分析, 本研究认为胆囊和肝脏通过影响和调节 OPN 分泌, 进而影响胆固醇结石的形成^[14]。人体实验研究结果显示, 胆囊胆固醇结石症患者胆囊高表达 OPN 及其受体整合素的纤维化、萎缩的上皮细胞, 且胆固醇结石症血清及胆汁 OPN 浓度较正常人低^[15]。因此, 本研究认为, OPN 在胆囊胆固醇结石形成过程中发挥抑制成核的作用。本实验通过 ELISA 法进一步证实, 胆固醇结石症患者胆汁 OPN 蛋白含量低于正常人 ($P<0.05$); 同时发现, 胆固醇结石症患者胆汁 OPN 蛋白具有较弱的抑成核作用, 其成核时间, 抑制胆固醇结晶形成的作用低于正常人胆汁 OPN 蛋

白, 两组平均成核时间分别为 $(17.7 \pm 1.07)d$ vs $(20.4 \pm 1.90)d$, 成核活性为 $(1.18$ vs $1.36)$, 差异有统计学意义, 该结果提示, 胆固醇结石症患者胆汁 OPN 蛋白可能与正常人胆汁 OPN 蛋白存在结构上的差异, 由此导致胆固醇结石症患者胆汁中 OPN 蛋白抑制胆固醇成核活性较正常人胆汁中 OPN 蛋白差。

综上所述, 胆固醇结石症患者胆汁中 OPN 浓度的减少及结构功能的差异共同参与胆固醇结石的形成和发展, 后续实验有待于进一步研究胆固醇结石症患者与正常人胆汁 OPN 蛋白结构的差异及其结构差异影响 OPN 蛋白抑制成核活性的具体机制。

参 考 文 献:

- [1] LEAVENWORTH J W, VERBINNEN B, WANG Q, et al. Intracellular osteopontin regulates homeostasis and function of natural killer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 112(2): 494-499.
- [2] ZHANG H, GUO M, CHEN J H, et al. Osteopontin knockdown inhibits alpha_vbeta₃ integrin-induced cell migration and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by inducing autophagy and inactivating the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(4): 991-1002.
- [3] 陈进宏, 杨林, 蔡端, 等. 骨桥蛋白在不同胆汁体系中的成核作用研究[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2012, 18(9): 704-708.
- [4] 傅培彬, 张圣道, 戴坤扬, 等. 以胆石剖面结构及化学成分为基础的胆石分类法[J]. *中华外科杂志*, 1984, 22(5): 258-260.
- [5] STRASBERG S M, HARVEY P R, HOFMANN A F. Bile sampling, processing and analysis in clinical studies[J]. *Hepatology*, 1990, 12(3/2): S176-180.
- [6] KIBE A, DUDLEY M A, HALPERN Z, et al. Factors affecting cholesterol monohydrate crystal nucleation time in model systems of supersaturated bile[J]. *J Lipid Res*, 1985, 26(9): 1102-1111.
- [7] HOLAN K R, HOLZBACH R T, HERMANN R E, et al. Nucleation time: a key factor in the pathogenesis of cholesterol gallstone disease[J]. *Gastroenterology*, 1979, 77(4/1): 611-617.
- [8] BROWN L F, BERSE B, VAN DE WATER L, et al. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces[J]. *Mol Biol Cell*, 1992, 3(10): 1169-1180.
- [9] 朱斌, 袁岱岳, 邵伟斌, 等. 骨桥蛋白在胆固醇结石患者胆囊黏膜上皮中的表达及意义[J]. *实用临床医药杂志*, 2013, 17(17): 27-28.
- [10] 袁岱岳, 朱斌, 严栋梁. 骨桥蛋白在胆固醇结石患者胆汁中的表达及其意义[J]. *南通大学学报(医学版)*, 2013(6): 535-536.
- [11] IMANO M, SATOU T, ITOH T, et al. An immunohistochemical study of osteopontin in pigment gallstone formation[J]. *Am Surg*, 2010, 76(1): 91-95.
- [12] ICHIKAWA H, IMANO M, TAKEYAMA Y, et al. Involvement of osteopontin as a core protein in cholesterol gallstone formation[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2009, 16(2): 197-203.
- [13] YANG L, CHEN J H, CAI D, et al. Osteopontin plays an anti-nucleation role in cholesterol gallstone formation[J]. *Hepatol Res*, 2011, 41(5): 437-445.
- [14] 陈进宏, 杨林, 林晶, 等. 骨桥蛋白在豚鼠胆囊胆固醇结石模型中的动态变化[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2014, 20(7): 528-531.
- [15] YANG L, CHEN J H, CAI D, et al. Osteopontin and integrin are involved in cholesterol gallstone formation[J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18(1): R16-23.

(张西倩 编辑)