

养肝柔肝中药对胆囊胆固醇结石豚鼠胆囊细胞钙离子浓度的影响

沈平¹, 方邦江², 朱培庭¹, 张静喆¹, 裴新军¹

1. 上海中医药大学龙华医院胆道外科, 上海 200032

2. 上海中医药大学龙华医院急诊科, 上海 200032

目的:通过观察实验豚鼠胆囊细胞钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的变化,探讨胆固醇结石形成与养肝柔肝中药防治胆结石的作用机制。

方法:将 80 只受试豚鼠随机分为正常对照组、模型组、养肝柔肝中药组和熊去氧胆酸组,每组 20 只。后三组采用高胆固醇致石食饵诱发法建立豚鼠胆结石动物模型,其中养肝柔肝中药组、熊去氧胆酸组分别给予相应药物进行防治实验,连续用药 7 周后,分别对实验豚鼠大体情况、胆结石生成情况以及胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化进行观察。

结果:模型组动物胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 明显降低,养肝柔肝中药不仅能明显改善豚鼠行为学体征,降低胆结石的成石率,而且可提高胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 。

结论:胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 降低是导致胆囊的收缩功能降低,胆固醇结石形成的重要因素。提高胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$, 增强胆囊平滑肌细胞的收缩功能,减轻胆汁淤滞,可能是养肝柔肝中药防治胆石病的作用机制之一。

关键词:胆结石;胆固醇;中药;豚鼠

中图分类号: R575.621; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1672-1977(2007)02-0179-04

Effect of traditional Chinese herbs for nourishing the liver on intracellular free calcium level in gallbladder cells of guinea pigs with gallstones

Ping SHEN¹, Bang-jiang FANG², Pei-ting ZHU¹, Jing-zhe ZHANG¹, Xin-jun PEI¹

1. Department of Hepatobiliary Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032

2. Department of Emergency, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032

Objective: To observe the changes of intracellular free calcium level ($[Ca^{2+}]_i$) in gallbladder cells of guinea pigs with gallstones so as to study the mechanisms of gallstone formation and the prevention and treatment function of traditional Chinese herbs for nourishing the liver.

Methods: Eighty guinea pigs were randomly divided into four groups, which were normal control group, untreated group, nourishing-liver Chinese drug (NLCD) group and ursodeoxycholic acid (UDCA) group, with 20 guinea pigs in each group. Gallstones were induced in the guinea pigs of the latter 3 groups by the feed of diet inducing cholelithiasis with high cholesterol, while the corresponding medicines were used in NLCD group and UDCA group for prevention and treatment for 7 weeks. Then the state of the guinea pigs, the formation of gallstones, and the changes of $[Ca^{2+}]_i$ in gallbladder cells were observed.

Results: The $[Ca^{2+}]_i$ in gallbladder cells of guinea pigs in the untreated group was decreased significantly. NLCD improved the behavioral signs of the guinea pigs, significantly decreased the formative rate of gallstones and increased the $[Ca^{2+}]_i$ in gallbladder cells.

Conclusions: The $[Ca^{2+}]_i$ in gallbladder cells is the important factor for contractile function of gallbladder and the information of gallstones. Traditional Chinese herbs for nourishing the liver may significantly increase the $[Ca^{2+}]_i$ in gallbladder cells to facilitate contraction of the smooth muscle cells of gallbladder and relieve the cholestasis. It may be one of the mechanisms of traditional Chinese herbs for nourishing the liver in preventing and treating cholelithiasis.

Keywords: cholelithiasis; cholesterol; drugs, Chinese herbal; guinea pigs

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30672698);上海市重点学科建设资助项目(No. T0304);国家中医药管理局中医药科学技术研究专项中医(基础)研究资助项目(No. 04-05JP24);上海市卫生系统“百人计划”资助项目(No. 03HBR-29)

Correspondence: Ping SHEN, Associate Professor; E-mail: Shenping1963@sina.com

Shen P, Fang BJ, Zhu PT, Zhang JZ, Pei XJ. *J Chin Integr Med / Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2007; 5(2): 179-182. Received November 14, 2006; published online March 15, 2007. Free full text (PDF) is available at www.jcimjournal.com

我国胆石病呈较快的上升趋势,部分地区患病率已达 10%^[1],接近世界发达国家胆石病 10%~15% 的发病水平^[2]。胆石病仍是我国良性胆道疾患中致死、致残的重要原因。我们的前期研究工作表明,养肝柔肝中药对胆石病具有一定的临床疗效^[3,4]。本实验以高胆固醇饮食诱发豚鼠胆结石,采用流式细胞术(flow cytometry, FCM)测定实验豚鼠胆囊细胞钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$,以探讨养肝柔肝中药防治胆囊结石形成的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 选用白色、红目豚鼠,雌雄各半,清洁级,体质量(220±20)g,共 80 只,由上海中医药大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂、药物与仪器

1.2.1 实验试剂和药物 Fluo-3, AM 荧光染料,美国 Molecular Probes 公司产品;养肝柔肝中药采用养肝利胆颗粒(何首乌、枸杞子、白芍药、陈皮、甘草),8 g/包,每克相当于含原药材 4.5 g,由上海中医药大学龙华医院制剂室提供;熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA),上海三维长江生化制药厂产品,批号为 200304005,10 mg/片。

1.2.2 主要仪器 Mgna FTIR-750 型红外光谱仪,美国 Thermo Nicolet 公司产品;LG-10 低温高速离心机,北京医用离心机厂产品;Facsalibour 流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司产品。

1.3 动物分组、造模及药物处理 所有豚鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心动物室,室温(23±10)℃,适应性喂养 1 周,无怀孕及不良反应,饮食、饮水正常者,即纳入实验。实验豚鼠随机分为正常对照组、模型组、熊去氧胆酸组和养肝柔肝中药组,每组各 20 只。采用高胆固醇致石食饵诱发法建立豚鼠胆囊胆固醇结石动物模型^[5],正常对照组喂正常饲料及青菜适量,模型组喂以致石饲料及少量青菜,各治疗组在喂以相当于模型组的致石饲料及青菜的同时给以药物灌胃。药物以成人用药剂量(60 kg 体质量,养肝利胆颗粒 18 g/d、UDCA 300 mg/d)按体型系数换算^[6],养肝柔肝中药组给以养肝利胆颗粒 1.81 g/(kg·d),熊去氧胆酸组给以 UDCA 30.12 mg/(kg·d),模型组和正常对照组豚鼠灌胃等容量的生理盐水,连续 7 周。

1.4 标本采集与处理

1.4.1 标本采集 各组动物均于第 7 周末取材。

以 15%乌拉坦腹腔注射麻醉,活体下肉眼观察胆汁中成石情况,然后完整切除胆囊后,再仔细观察胆囊内成石情况,收集胆石。完整切除胆囊后冷冻保存标本。

1.4.2 标本处理 取豚鼠胆囊修剪成米粒大小,用医用剪刀剪碎,同时不断用 PBS 冲洗,获得细胞悬液后用 40 μm 的尼龙网过滤,再用 PBS 冲洗两遍,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,调节细胞数至每管 10⁶ 个细胞,分别加入 A、B 管中,在 A 管中加入 PBS,B 管中加入 Fluo-3 荧光素,混匀后放在暗处,室温下静止 45 min,PBS 冲洗一遍上机待测。

1.5 胆石红外光谱定性 采用溴化钾压片法测定胆结石样品。

1.6 胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定 参考文献^[7],使用 Facsalibour 流式细胞仪检测,利用 CELL-Quest 功能软件进行参数的获取和数据分析。

1.7 统计学方法 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用方差分析。计数资料采用率或构成比表示,采用 χ^2 检验方法。所有运算程序均在计算机上运用 SPSS 11.0 统计软件包进行。

2 结 果

2.1 豚鼠大体情况 正常对照组豚鼠表现为体质量自然增加,反应灵活,活动敏捷,被毛密集而有光泽、紧贴皮肤,鼻、唇湿润清洁,眼睛明亮,大便正常,在饲养过程中无死亡。模型组动物表现饮食减少,生长缓慢,被毛干枯、蓬松且易脱落,活动迟缓,反应迟钝,眼睛、鼻、唇、耳、尾部色淡少泽。熊去氧胆酸组和养肝柔肝中药组豚鼠行为学表现、体质量和营养状况等方面与模型组比较有明显改善,但不能恢复到正常对照组水平。模型组豚鼠在造模 30 d 后有 3 只动物死亡,经解剖胆囊发现有 2 只豚鼠胆囊发生结石。养肝柔肝中药组、熊去氧胆酸组各有 2 只动物死亡,这两组死亡豚鼠经解剖胆囊均未发现明显结石生成。由于上述三组共计 7 只豚鼠死时未达造模的时间要求,所以没有计入成石率的结果,也未作为标本采集的来源。

2.2 胆石定性 肉眼所见胆囊结石呈胆石泥砂或絮状沉淀。经红外光谱检测分析为胆固醇结石。

2.3 豚鼠胆囊结石生成情况 以肉眼观察可见胆囊内有块状及絮状沉淀物并经红外光谱鉴定为胆固醇结石。正常对照组中 1 只动物无胆囊而没有计入成石率的统计,其余 19 只动物中有 1 只发生胆石,

成石率为 5.26%。模型组动物中除 3 只死亡外,其余 17 只动物中有 14 只出现胆石,成石率为 82.35%,明显高于正常对照组($P < 0.01$)。养肝柔肝中药组 18 只动物中有 5 只出现胆石,熊去氧胆酸组 18 只动物中有 7 只出现胆石,养肝柔肝中药组和熊去氧胆酸组成石率分别为 27.78%和 38.89%,均明显低于模型组胆石生成率($P < 0.05$)。

2.4 胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 测定结果 随机抽取保存的豚鼠胆囊组织,上述 4 组每组各 8 份,测定各组胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 。正常对照组胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 为 (82.77 ± 12.45) nmol/L,模型组为 (18.52 ± 11.97) nmol/L,熊去氧胆酸组为 (44.79 ± 8.94) nmol/L,养肝柔肝中药组为 (72.86 ± 10.68) nmol/L。结果显示,模型组胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 较正常对照组明显降低($P < 0.01$);养肝柔肝中药组和熊去氧胆酸组均可升高胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$,与模型组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$);但养肝柔肝中药组与正常对照组无明显差异($P > 0.05$),熊去氧胆酸组与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$);养肝柔肝中药组与熊去氧胆酸组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

随着人口的老齡化与饮食结构的改变,我国胆结石的患病种类发生了很大的变化,尤其是近 20 年来,胆囊结石约占胆石病发病的 80%^[8],以胆固醇为主要成分的胆囊结石已成为我国胆结石的主要类型^[1,9]。因此,我们在本研究中选择了高胆固醇致石食饵诱发法建立豚鼠胆固醇结石的动物模型。

朱培庭教授^[3]在总结我院著名中医外科专家顾伯华教授和中西医结合专家徐长生教授治疗胆石病经验的基础上,对 274 例慢性胆道感染、胆石病病人进行辨证分析发现,肝阴不足证型占 66.66%,并且 50 岁以上年龄者高达 72.37%,这与《内经》“年四十而阴气自半也,起居衰矣”(《素问·阴阳应象大论》)的理论及朱丹溪“阳常有余,阴常不足”之论相吻合。对肝阴不足证型胆石病患者予验方养肝利胆方药治疗显示了良好的效果,有效率达 84.13%^[3,4]。养肝利胆颗粒剂由何首乌、枸杞子、白芍、陈皮、甘草等组成。方以何首乌、枸杞子、白芍滋养肝阴。其中何首乌补肝肾、益精血;枸杞子味甘平而润,性滋而补,能生精益气;白芍酸微寒,能养血敛阴,柔肝止痛;陈皮苦辛温,能理气健脾,且能防滋阴药过于滋腻之弊。纵览全方切合疏肝利胆的治疗大法,体现了“胆病从肝论治”之学术思想。

在平滑肌收缩与舒张的信号转导机制中,细胞

内游离钙作为一种重要的第二信使广泛地参与细胞的运动、分泌、代谢和分化等多种细胞功能活动的调节。 $[Ca^{2+}]_i$ 的降低是平滑肌细胞舒张的关键因素之一,调节平滑肌收缩的主要蛋白有肌球蛋白轻链、原肌球蛋白和调钙蛋白的结合蛋白等。平滑肌细胞中收缩相关蛋白参与平滑肌细胞收缩、收缩的调节及细胞骨架的构成,这些蛋白的活性在一定程度上均受到 $[Ca^{2+}]_i$ 的调节^[10,11]。已有研究表明,胆囊平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的降低,是导致平滑肌收缩功能障碍的重要原因。本研究表明,模型组豚鼠胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 明显降低,养肝柔肝中药不仅能有效降低胆结石的生成,而且可明显提高胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 。胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 通过与相关钙结合蛋白结合,间接调节蛋白的磷酸化,对细胞外信号作出应答,以增强胆囊平滑肌细胞的收缩,减轻胆汁淤滞,这可能是养肝柔肝中药治疗胆石病作用的重要机制之一。

REFERENCES

- 1 Chen XG, Liu JQ, Peng MH, *et al.* Intrahepatic cholelithiasis in Guangxi area, an analysis of 8 585 cases. *Zhonghua Pu Tong Wai Ke Za Zhi.* 2002; 17(2): 99-101. Chinese with abstract in English.
陈希纲, 刘家奇, 彭民浩, 等. 胆石病临床流行病学调查——附 8 585 例分析. *中华普通外科杂志.* 2002; 17(2): 99-101.
- 2 Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell.* 2001; 104(4): 503-516.
- 3 Zhu PT, Zhang JZ, Cao ZP, *et al.* Summary of the treatment of 274 patients with cholelithiasis and chronic biliary tract infection. *Shanghai Zhong Yi Yao Za Zhi.* 1986; (9): 15-17. Chinese.
朱培庭, 张静喆, 曹中平, 等. 治疗慢性胆道感染、胆石病 274 例的总结. *上海中医药杂志.* 1986; (9): 15-17.
- 4 Fang BJ, Zhou S, Gu HG, *et al.* Pei-ting Zhu's experience of treating cholelithiasis with the theory of liver. *Zhong Yi Za Zhi.* 2004; 45(5): 334. Chinese.
方邦江, 周爽, 顾宏刚, 等. 朱培庭从肝论治胆石病经验. *中医杂志.* 2004; 45(5): 334.
- 5 Zhu PT, Zhu SM. Practical book of cholic diseases in traditional Chinese medicine. Beijing: People's Medical Publishing House. 1999; 272. Chinese.
朱培庭, 朱世敏. 实用中医胆病学. 北京: 人民卫生出版社. 1999; 272.
- 6 Chen Q. The experimental methods of traditional Chinese medicinal pharmacology. Beijing: People's Medical Publishing House. 1993; 206. Chinese.
陈奇. 中药药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社. 1993; 206.

- 7 Fang BJ, Zhu PT, Zhang JZ, *et al.* Change of $[Ca^{2+}]_i$ in gallbladder cells of guinea pigs with gallstone and its releasing by Chinese drugs and recipe for dispersing stagnated liver qi and promoting bile secretion. *Zhongguo Zhong Yi Ji Chu Yi Xue Za Zhi.* 2006; 12(7): 519-521.
方邦江, 朱培庭, 张静喆, 等. 胆结石豚鼠胆囊细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化与疏肝利胆方药对其的促释放作用. *中国中医基础医学杂志.* 2006; 12(7): 519-521.
- 8 Huang ZQ. Status quo and future prospects of biliary tract surgery. *Zhongguo Shi Yong Wai Ke Za Zhi.* 1999; 19(1): 17-18. Chinese.
黄志强. 胆道外科的现状与未来. *中国实用外科杂志.* 1999; 19(1): 17-18.
- 9 Shi JS, Ren R. Progress of experimental study on biliary tract surgery in China. *Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi.* 2004; 21(12): 1418-1419. Chinese.
石景森, 任予. 我国胆道外科实验研究的进展. *中华实验外科杂志.* 2004; 21(12): 1418-1419.
- 10 Zeng J, Miao ZH, Qiu F, *et al.* Constriction effect of daidzein on guinea pig's gall bladder. *Zhong Cao Yao.* 2004; 27(5): 369-370. Chinese with abstract in English.
曾靖, 缪作华, 邱峰, 等. 大豆苷元对豚鼠胆囊收缩功能的影响. *中草药.* 2004; 27(5): 369-370.
- 11 Yu P, Chen Q, Xiao Z, *et al.* Signal transduction pathways mediating CCK-induced gallbladder muscle contraction. *Am J Physiol.* 1998; 275(2 Pt 1): G203-G211.

第五届国际心脏血管疾病手术及介入治疗研讨会通知

为促进心脏大血管疾病的手术及介入治疗的发展,加强国际间的交流与合作,由国际心脏血管介入外科学会和同济大学主办,《中华心血管病杂志》、中华医学会海南省医学分会、海口市人民医院、同济大学附属同济医院、同济大学中法心血管病治疗中心、法国马赛圣约瑟夫医院、《中国医学文摘外科学分册》编辑部联合举办第五届国际心脏血管外科手术及介入治疗研讨会,大会将邀请法国、美国、德国、澳大利亚等国的心脏血管内外科、麻醉科的著名专家及国内心脏血管内、外科,麻醉科和重症监护等领域的著名专家教授与会,并作精彩报告及手术演示,共同探讨心脏血管疾病的手术、介入治疗及围手术期处理的最新进展。欢迎全国各大医院心胸血管外科、麻醉科、心内科、放射介入科、重症监护、体外循环等专科医师及护理人员参加。

1 征稿内容 (1)主动脉夹层和夹层动脉瘤的手术及介入治疗进展(围术期重要脏器保护);(2)冠心病治疗进展(药物涂层支架的进展,干细胞治疗进展);(3)复杂先天性心脏病的外科治疗进展;(4)先天性心脏病重度肺动脉高压的治疗研究进展;(5)心脏疾病治疗中的 Hybrid 技术;(6)先心病及颈动脉等疾病介入治疗(疑难先心病的介入治疗);(7)心律失常的药物治疗及非药物治疗(房颤的射频消融术);(8)腔镜技术在心胸血管领域中的应用。

2 征稿要求 (1)未在国内外公开发表过、涉及会议内容的论文,全文 4 000 字以内,附加 500 字摘要及英文摘要。文章被录用将编入《中国医学文摘外科学分册》增刊上发表,并收取论文发表费 200 元/篇;(2)《中国医学文摘外科学分册》是一本以英文为主的面向国际的专业性学术刊物,国内外公开发行,如已在中文期刊上发表过,还可以以英文稿形式发表,不为一稿二投。欢迎广大读者投稿,投稿者可参阅杂志的稿约。

增刊截稿日期:2007 年 8 月 30 日

会议时间:2007 年 11 月 4 日~11 月 6 日

会务费:900 元(代表食宿由会议统一安排,经费自理)

会议地点:海南省海口市

注意事项:会议指定语言为英语和法语,也可用中文发言,但幻灯必须用英语书写,发言时间为 10 分钟。

来稿请寄:上海市新村路 389 号同济大学附属同济医院《中国医学文摘外科学分册》编辑部洪炯和胡雨华收。邮政编码:200065。电话:021-66111279;传真:021-66103027;E-mail:emasurgery199201@sina.com。

第五届国际心脏血管介入外科学术研讨会会务组