

清热利胆理气活血方药对豚鼠胆囊收缩素受体的调节作用*

傅华群 吴伟顶 邹书兵 黄明文 黄长文 关晏星 徐艳萍

摘要 目的:探讨中医清热利胆、理气活血方药对豚鼠胆囊收缩素受体(CCK-R)表达的调节及作用机制。方法:采用放射免疫分析法和受体放射配基结合法检测对照组、高胆固醇组、自然恢复组及治疗组豚鼠门静脉血胆囊收缩素(CCK)水平、胆囊 CCK-R 的最大结合容量(B_{max})和亲和力(K_d)。同时观察空腹胆囊体积(FV)、空腹胆囊胆汁量(FB)和餐后胆囊体积(PV)、餐后胆囊胆汁量(PB)及胆囊收缩率(E)、胆汁胆固醇浓度的变化。结果:与对照组比较,高胆固醇组豚鼠 FV、FB 增大($P < 0.05$),PV、PB 也增大,胆囊收缩率下降($P < 0.01$),胆汁胆固醇浓度升高($P < 0.05$),门静脉血 CCK 水平及 CCK-R 的 K_d 无改变,而 CCK-R 的 B_{max} 下降($P < 0.01$)。治疗组上述各项指标治疗后恢复正常。结论:清热利胆、理气活血方药可能通过上调胆囊 CCK-R 表达促进胆囊动力功能恢复,其作用机制可能与降低胆汁中胆固醇浓度有关。

关键词 胆汁 胆固醇 胆囊收缩素受体 清热利胆 理气活血

Regulatory Effect of Clearing-Heat Secreting-Bile Regulating-Qi Flow and Activating Blood Circulation Principle on Cholecystokinin Receptor FU Hua-qun, WU Wei-ding, ZOU Shu-bing, et al *Institute of Liver-Biliary Surgery, The Second Affiliated Hospital, Jiangxi Medical College, Nanchang (330006)*

Objective: To explore the regulatory effect of clearing-Heat secreting-bile regulating-Qi flow and activating blood circulation (CSRA) principle on cholecystokinin receptor (CCK-R) and its mechanism. **Methods:** Cholecystokinin (CCK) in serum of portal venous blood, maximum binding capacity (B_{max}) and affinity (K_d) of CCK-R levels in gallbladder of guinea pigs allocated in four groups (control, high cholesterol, natural recovery and treated groups) were determined using radioimmunoassay and radioligand receptor assay (RRA). At the same time, changes of fasting volume (FV) and postprandial volume (PV) of gallbladder, fasting and postprandial bile (FB and PB) in gallbladder, gallbladder contraction rate (GCR) and cholesterol concentration (CC) in bile were observed. **Results:** Compared with the control group, after two weeks of high cholesterol feeding, increase of FV, FB, PV, PB and CC ($P < 0.05$), and decrease of GCR ($P < 0.01$) and B_{max} were found in cholesterol group, but with no significant change in K_d and CCK level. The above-mentioned criteria were restored to normal range in the treated group. **Conclusion:** CSRA principle could promote the recovery of gallbladder contraction by regulating CCK-R expression in it, its mechanism is possibly correlated with reduction of cholesterol concentration in bile.

Key words bile, cholesterol, cholecystokinin receptor, clearing-Heat secreting-bile, regulating Qi and activating blood circulation

临床实践证明,中医学清热利胆、理气活血法可以调节胆囊运动功能,缓解临床症状,但作用机制仍不完全清楚^[1]。近年来,胆囊收缩功能障碍时胆囊收缩素受体(cholecystokinin receptor, CCK-R)的调节变化已引起重视。本实验采用豚鼠制作胆囊收缩功能障碍的

动物模型,探讨清热利胆、理气活血法对胆囊 CCK-R 的调节及作用机制。

材料与方法

1 主要试剂 CCK 放射免疫药盒(英国皇家医学研究生院提供),¹²⁵I-CCK-OP(¹²⁵Iodine-Cholesystokinin-ostapeptide),比活度 2200Ci/mmol(Amersham 公司产品),CCK-OP、乙二醇丁二酸酯(EGTA)、大豆胰蛋白酶抑制剂、牛血清白蛋白、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)(Sigma 公司产品)。

* 国家自然科学基金资助课题(No. 39960084)

江西医学院第二附属医院肝胆外科研究所(南昌 330006)

通讯作者:傅华群, Tel: 0791-6259631

万方数据

2 药品 根据天津市南开医院处方“利胆汤”加减,由金钱草、虎杖、十大功劳、茵陈、赤芍、丹参、枳壳、大黄等 15 味中药组成。由本院制剂室制成中药口服液,生药含量 6.75g/ml。

3 动物分组及处理 实验用短毛雄性豚鼠 100 只(江西省医学实验动物中心提供),体重 350~400g,随机分为 4 组,每组 25 只。对照组:标准颗粒饲料饲养 2 周;高胆固醇组:标准颗粒饲料加入 2% 胆固醇;自然恢复组:高胆固醇饲料喂养 2 周后,标准颗粒饲料饲养 2 周;治疗组:高胆固醇饲料喂养 2 周后,标准颗粒饲料喂养加中药灌胃 2 周(每天 30g/kg 灌胃,每天 1 次)。除对照组外,后 3 组于实验开始时,按文献^[2]制作胆囊收缩功能障碍动物模型。

4 标本采集 各组豚鼠实验到期后,又随机分为空腹(12 只)、餐后(13 只)两亚组。空腹组禁食 12h,餐后组禁食 12h 后,予液体脂餐 15ml/kg 体重灌胃,30min 后剖腹取材。

4.1 胆囊收缩功能测定 包括观察空腹胆囊体积(FV)、空腹胆囊胆汁量(FB)和餐后胆囊体积(PV)、餐后胆囊胆汁量(PB)及胆囊收缩率(E)。剖腹后自然状态下测量胆囊最大长径(L)及相互垂直两横径(W、H),以公式 $V=0.52 \times L \times W \times H$ (cm³) 计算胆囊体积。

4.2 胆汁性状及成分分析 用血管钳阻断胆总管,一次性注射器吸取胆囊内全部胆汁置试管中,记录胆汁量,取少许于偏光显微镜下观察胆汁性状,其余即送实验室测量胆汁中胆固醇浓度。

4.3 门静脉血浆 用预冷的一次性注射器抽取门静脉血 2ml,置预冷含 10% EDTA-Na 40 μl 和抑肽酶 15μl 的试管中,4℃ 条件下 2 000r/min 离心 30min,取血清置 -20℃ 保存待测。

4.4 胆囊组织 完整取下胆囊,纵行剪开,收集胆汁沉积物,滤纸吸净,迅速置液氮管中保存待测。

5 胆囊平滑肌细胞膜受体制备 按改良 UPP 法^[3],胆囊置于 10ml 预冷的匀浆缓冲液(含蔗糖 250mmol/L, HEPES 10mmol/L,大豆胰蛋白酶抑制剂 0.01%)充分剪碎,于电动中速匀浆器中匀浆(冰浴),每次 3min,共 3 次。充分匀浆后,转移至干净离心管,

2 500r/min(4℃)离心 5min。收集上清液于干净离心管,收集沉淀于匀浆缓冲液,重新匀浆,离心,收集上清液。合并两上清液,20 000r/min(4℃)离心 45min,收集沉淀,加入 HEPES 缓冲液(含 HEPES 25mmol/L, MgCl₂ 2.5mmol/L, NaCl 137mmol/L, NaH₂PO₄ 0.7mmol/L, Glucose 10mmol/L, 明胶 1%)摇匀,即为粗制膜受体。部分粗制膜受体以牛血清白蛋白为标准,用 Lowery 法测定蛋白含量,其余用于下一步配体结合反应。

6 CCK-R 的检测 CCK-R 检测采用放射配基结合分析法(RBA)。含膜蛋白 50μg 的 HEPES 缓冲液 300μl 分别和不同浓度的¹²⁵I-BH-CCK-OP 硫酸酯($1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-9}$)反应,非特异性结合管另加入 1 000 倍过量的未标记 CCK-OP 硫酸酯。反应温度为 25℃,pH 为 6.5,时间为 30min,冰冷 HEPES 缓冲液 900μl 终止反应。离心法(4℃, 4 500g, 20min)收集沉淀,测定放射性计数,利用计算机获得 CCK-R 的最大结合容量(B_{max})和平衡解离常数(K_d)。

7 统计学处理 数据用 SAS 软件包处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料比较用方差分析,两组资料比较用 t 检验。

结 果

1 各组豚鼠胆汁性状 对照组胆汁清亮,偏光显微镜下未见胆固醇结晶;高胆固醇组胆汁粘稠,混浊,偶见胆泥沉积,镜下均可见大量胆固醇结晶(25/25 只);自然恢复组胆汁粘稠,混浊,与高胆固醇组比较无明显改变,镜下胆固醇结晶稍有减少,阳性率 88%(22/25 只);治疗组胆汁外观明显改善,基本清亮,镜下胆固醇结晶阳性率 8%(2/25 只)。各组均无肉眼可见结石形成。

2 各组豚鼠胆囊收缩功能变化 见表 1。与对照组比较,高胆固醇组胆囊收缩功能下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与自然恢复组比较,治疗组胆囊收缩功能升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),恢复近似正常。

3 各组豚鼠胆汁胆固醇浓度和门静脉血 CCK 水平变化 见表 2。不论空腹或餐后与对照组比较,高

表 1 各组豚鼠胆囊收缩功能变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FV (cm ³)	PV (cm ³)	FB (cm ³)	PB (cm ³)	E (%)
对照	25	0.89 ± 0.26	0.28 ± 0.08	0.68 ± 0.20	0.23 ± 0.06	65.83 ± 7.32
高胆固醇	25	1.27 ± 0.60*	0.85 ± 0.45*	0.92 ± 0.35*	0.76 ± 0.34**	43.06 ± 4.27*
自然恢复	25	1.34 ± 0.61*	0.90 ± 0.53**	1.01 ± 0.43*	0.83 ± 0.32**	47.22 ± 5.24*
治疗	25	0.90 ± 0.27 [△]	0.32 ± 0.12 ^{△△}	0.73 ± 0.21 [△]	0.29 ± 0.08 ^{△△}	67.01 ± 6.82 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与自然恢复组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 2 各组豚鼠胆汁胆固醇浓度和门静脉血

CCK 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胆固醇浓度 (mmol/L)		CCK 水平 ($\mu\text{g/L}$)	
		空腹	餐后	空腹	餐后
对照	25	0.44 ± 0.11	0.46 ± 0.14	2.34 ± 0.62	3.96 ± 0.98▲
高胆固醇	25	0.60 ± 0.13*	0.61 ± 0.17*	2.85 ± 0.79	4.15 ± 0.91▲
自然恢复	25	0.59 ± 0.14*	0.65 ± 0.18*	2.28 ± 0.82	3.68 ± 0.63▲
治疗	25	0.43 ± 0.10△	0.48 ± 0.07△	2.57 ± 0.60	4.08 ± 0.50▲

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与自然恢复组比较,△ $P < 0.05$;与本组空腹比较,▲ $P < 0.05$

胆固醇组胆固醇浓度升高 ($P < 0.05$),与自然恢复组比较,治疗组胆汁胆固醇浓度下降 ($P < 0.05$)。各组豚鼠门静脉血 CCK 水平差异无显著性,但餐后 CCK 水平均较空腹明显升高 ($P < 0.05$)。

4 豚鼠胆囊平滑肌细胞膜 CCK-R 结合特征 见表 3。高胆固醇组和自然恢复组豚鼠胆囊 CCK-R 的 B_{max} 下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),治疗组恢复正常。各组 CCK-R 的 K_d 无改变。

表 3 各组豚鼠胆囊平滑肌 CCK-R 的 B_{max} 和 K_d 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	B_{max} (fmol/mg pro)	K_d (nmol/L)
对照	25	60 ± 27	0.19 ± 0.13
高胆固醇	25	32 ± 13**△	0.16 ± 0.09
自然恢复	25	39 ± 19*△	0.19 ± 0.06
治疗	25	59 ± 11	0.18 ± 0.08

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与治疗组比较,△ $P < 0.05$

讨 论

1 清热利胆、理气活血方药对 CCK-R 的调节作用 CCK 是餐后胆囊收缩的主要调节肽,餐后胆囊正常收缩需要 CCK 与胆囊壁的 CCK-R 结合。体内 CCK 浓度、CCK-R 结合容量及亲和力水平任何一个环节的变化均可能影响胆囊的餐后收缩功能。

豚鼠经 2% 胆固醇饲料饲养 2 周,其 FV、PV、FB 及 PB 均升高,胆囊收缩率下降,胆囊胆汁淤滞,提示胆囊收缩功能障碍动物模型的建立。此时,分析动物体内的 CCK 生理效应可以发现,各组动物门静脉血 CCK 水平无明显改善,餐后体内的 CCK 释放升高,显示了良好的餐后分泌反应。胆囊 CCK-R 的亲合力亦没有变化,而 CCK-R 最大结合容量下调,上述实验结果说明胆囊 CCK-R 表达下调是高胆固醇饲料饲养豚鼠早期胆囊收缩功能障碍的主要原因。经清热利胆、理气活血方药治疗 2 周后,反映胆囊收缩功能的各项

指标均恢复正常,胆囊 CCK-R 最大结合容量亦从 (32 ± 13) fmol/mg pro 上升到 (59 ± 11) fmol/mg pro,基本恢复到对照组水平,提示中医上述疗法具有上调胆囊 CCK-R 的作用,这可能是其促进胆囊收缩功能恢复的重要原因。

2 中医中药调节 CCK-R 表达的作用机制 利胆汤具有清热利胆、理气活血、通里攻下等多种作用,对胆囊有较广泛的药理作用,如消炎、利胆、促进胆囊组织结构及动力功能的恢复等。本动物实验表明,随着胆汁内胆固醇浓度升高和下降,胆囊 CCK-R 表达表现为下调和上调,提示胆汁中的胆固醇可能影响胆囊 CCK-R 表达。胆汁是体内胆固醇排泄的重要途径,高胆固醇饲养的豚鼠胆汁中的胆固醇浓度升高。胆汁中高胆固醇可以通过扩散及胞吞作用与胆囊平滑肌细胞膜结合产生细胞膜毒性效应,改变肌细胞膜的流动性,限制肌细胞膜 CCK-R 的构象改变,从而下调 CCK-R 的表达^[4]。清热利胆、理气活血方药通过降低胆汁内胆固醇浓度而上调胆囊 CCK-R,从而提示,胆汁中的胆固醇在胆囊壁上的扩散呈浓度依赖性和双向性,它对 CCK-R 表达的影响也具有可逆性。中医的上述疗法降低胆汁中胆固醇浓度可能通过以下两条途径(1)影响肝细胞内胆固醇、胆汁酸代谢及分泌,改变胆汁中胆固醇的浓度及状态(2)促进胆汁的肠肝循环^[5]。上述机制及中医清热利胆、理气活血方药对胆囊平滑肌细胞的直接作用尚需更多的研究。

参 考 文 献

- 傅华群,蒋筱强,熊本京,等.豚鼠体内生长抑素和血管活性肠肽在胆囊结石形成中的作用.中华实验外科杂志 2000;17(1):10—11.
- Poston GJ, Singh P, Draviam E, et al. Early stages of gallstone formation in guinea pig are associated with decreased biliary sensitivity to cholecystokinin. Dig Dis Sci 1992;37:1236—1244.
- Upp JR, Nealon WH, Singh P, et al. Correlation of cholecystokinin receptors with gallbladder contractility in patients with gallstones. Ann Surg 1987;205:641—648.
- Xiao ZL, Chen Q, Amaral J, et al. CCK receptor dysfunction in muscle membranes from human gallbladders with cholesterol stones. Am J Physiol 1999;276:1401—1407.
- 蔡竣,高炬,高滨,等.疏肝利胆和清热通下法治疗急性胆道感染的临床观察.中国中西医结合外科杂志 1999;5(4):199—202.

(收稿 2001-12-10 二次修回 2002-12-08)