

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2014.10.05

胆宁片治疗豚鼠胆色素结石的实验研究

刘莹露, 赵航, 陈萍, 徐天舒

(南京大学医学院附属鼓楼医院 中医科, 南京 210008)

摘要:[目的]研究胆宁片治疗豚鼠胆色素结石的作用及机制。[方法]构建豚鼠胆色素结石模型,给予胆宁片小、中、大剂量治疗,治疗后观察豚鼠成石率,并用 ELISA 法测定血清中 IL-15、IL-1 β 及胆汁中 IL-15 含量。[结果]胆宁片中、大剂量治疗后的豚鼠成石率较模型组下降,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,胆宁片各剂量组血清中 IL-15、IL-1 β 及胆汁中 IL-15 含量减少,差异有统计学意义($P<0.01$),且胆宁片各剂量组间比较差异也有统计学意义($P<0.01$)。[结论]胆宁片能有效治疗豚鼠胆色素结石,其机制与减少 IL-15、IL-1 β 含量有关。

关键词:胆宁片;胆色素结石;白细胞介素-15;白细胞介素-1 β

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2014)10-0582-03

The experimental study of Danning Tablet on guinea pigs with bile pigment calculus

LIU Ying-lu, ZHAO Hang, CHEN Ping, XU Tian-shu

(Department of Traditional Chinese Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Corresponding author: XU Tian-shu, E-mail: tianshuxu2007@126.com

Abstract:[Objective]To explore the therapeutic effect and the mechanism of Danning Tablet on guinea pigs with bile pigment calculus. [Methods]We established the model of guinea pigs with bile pigment calculus and used Danning Tablets of low, medium and high doses to cure them. After treatment, the rate of gallstone and the content of IL-15 and IL-1 β in the serum as well as the content of IL-15 in the bile were measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. [Results]Compared with the model group, the rate of gallstone in medium and high dose Danning Tablet groups was lower than that of model group ($P<0.01$); Compared with the model group, the content of IL-15 in the serum and bile as well as the content of IL-1 β in the serum were significantly decreased, and there was significant difference ($P<0.01$). There was also significant difference among three-dose groups ($P<0.01$). [Conclusion]Danning Tablet has the effects of treating guinea pigs with bile pigment calculus. The mechanism is related to the decrease of the content of IL-15 and IL-1 β .

Key words:Danning Tablet; bile pigment calculus; IL-15; IL-1 β

胆结石是一种临床常见病、多发病,一般可以分为胆色素结石和胆固醇结石,胆色素结石与胆道感染和胆道蛔虫有密切关系。通常胆囊结石伴随着胆囊慢性炎症,若胆结石嵌于胆囊颈部,造成急性梗阻时,则出现胆绞痛,继而发展为急性胆囊炎。中医认为,胆结石属“胁痛、黄疸”范畴,其病因与饮食、情志

相关,病位在肝胆、脾胃,湿热是其主要病理变化。情志不遂,郁怒伤肝,肝胆气郁,使肝失疏泄、横逆犯胃,致脾胃升降失调,运化不健,湿热由生;饮食不节,嗜食膏粱厚味,或酗酒过度,或嗜食辛热之物,致脾胃损伤,湿热内生,从而影响肝胆疏泄功能。胆宁片由大黄、虎杖、青皮、陈皮、郁金、山楂、白茅根组成,具有疏肝利胆、清热通下的作用。临床上已有多项研究证实其对治疗胆囊炎、调节胆汁成分、抑制结石形成具有良好效果^[1-4]。本研究旨在通过动物实验进一步研究其治疗胆结石的作用效果及机制。

收稿日期:2014-06-29

基金项目:中国中西医结合学会—和黄科研基金项目(No:2012004)

作者简介:刘莹露,女,住院医师,硕士,研究方向中医内科内分泌代谢

通讯作者:徐天舒, E-mail: tianshuxu2007@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 英国短毛种一级豚鼠 25 只,雄性,体重 250~350 g,购自南京安立默科技有限公司[SCXK(苏)2010-0002,合格证号 0021140],南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心[SYXK(苏)2009-0017]进行饲养及相关实验。

1.1.2 药品、试剂与仪器 胆宁片,上海和黄药业有限公司(批准文号:国药准字 Z10910040)。盐酸林可霉素,江西博莱大药厂[批准文号:兽药学(2011)140062610];血清 IL-15、IL-1 β 及胆汁 IL-15 ELISA 试剂盒,购自上海韵涵生物科技有限公司。仪器:SUNRISE 酶标仪(No:0393000365)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将 25 只豚鼠随机分为 5 组:空白组,模型组,胆宁片小、中、大剂量组。

1.2.2 豚鼠胆色素结石模型的制备^[5] 空白组以正常饲料喂养,同时每只豚鼠皮下注射生理盐水 0.2 ml/d,连续 10 d。其余 4 组皮下注射林可霉素 60 mg/(kg·d),连续 10 d,同时给予致石饲料(基础料 90.86%、酪蛋白 2%、蔗糖 3%、猪油 2%、微晶纤维素 2%、胆酸钠 0.04%、胆固醇 0.1%,购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司)。造模期间不限饮食、饮水。

1.2.3 给药方法 造模结束后给药。空白组和模型组每只豚鼠给予生理盐水 1 ml/d 灌胃;胆宁片小、中、大剂量分别为 0.5 g/(kg·d)、1.5 g/(kg·d)、3.0 g/(kg·d),连续 10 d。末次给药第 2 天,豚鼠禁食,给予氯胺酮、地西洋腹腔麻醉(氯胺酮与地西洋 1:1 混合,剂量为 0.2 ml/100 g),剖腹、抽取胆汁、观察成石情况,腹主动脉取血。

1.2.4 观察指标 血清 IL-15、IL-1 β 的测定:腹主

动脉取血,4℃ 静置 2 h 后 3 500 r/min 离心 10 min,分离出血清,-80℃ 保存。胆汁 IL-15 的测定:豚鼠麻醉后,剖腹、抽取胆汁,-80℃ 保存。采用双抗夹心 ELISA 法测定 IL-15、IL-1 β 含量,严格按照说明书操作,最后用酶标仪测 450 nm 的 OD 值,由标准曲线求出 IL-15、IL-1 β 的值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分类变量采用 χ^2 检验,计量资料采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

胆宁片中、大剂量组成石率较模型组减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明胆宁片中、大剂量可以抑制胆结石形成,见表 1。

胆宁片小、中、大剂量组血清、胆汁 IL-15 含量均较模型组降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),且胆宁片各剂量组之间比较差异也有统计学意义($P < 0.01$);胆宁片小、中、大剂量组血清 IL-1 β 含量均较模型组降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),且胆宁片各剂量组之间比较差异也有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表 1 各组豚鼠成石率比较

分组	例数	成石数	成石率/%
空白组	5	0	0 ¹⁾
模型组	5	5	100
胆宁片小剂量组	5	5	100
胆宁片中剂量组	5	4	80 ¹⁾
胆宁片大剂量组	5	2	40 ¹⁾

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 各组豚鼠血清、胆汁 IL-15 及血清 IL-1 β 含量比较

$\bar{x} \pm s$, pg/ml

分组	例数	血清 IL-15	胆汁 IL-15	血清 IL-1 β
空白组	5	71.12 $\pm$ 1.86 ¹⁾	68.05 $\pm$ 1.85 ¹⁾	18.05 $\pm$ 0.83 ¹⁾
模型组	5	98.45 $\pm$ 1.99 ²⁾	92.12 $\pm$ 2.01 ²⁾	30.47 $\pm$ 0.70 ²⁾
胆宁片小剂量组	5	92.21 $\pm$ 1.15 ¹⁾²⁾	85.62 $\pm$ 1.19 ¹⁾²⁾	26.26 $\pm$ 0.48 ¹⁾²⁾
胆宁片中剂量组	5	84.12 $\pm$ 1.43 ¹⁾²⁾	78.59 $\pm$ 1.48 ¹⁾²⁾	22.32 $\pm$ 0.42 ¹⁾²⁾
胆宁片大剂量组	5	74.99 $\pm$ 1.56 ¹⁾	71.39 $\pm$ 2.26 ¹⁾	18.77 $\pm$ 0.50 ¹⁾

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与胆宁片大剂量组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

IL-15 是一种相对分子量为 14 000~15 000 kD、由 162 个氨基酸组成的多功能细胞因子,具有

广泛的生物学活性,尤其在参与机体免疫反应方面具有重要作用^[6]。IL-15 对单核巨噬细胞和中性粒细胞的活化具有调节作用,能刺激肿瘤坏死因子

TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)和IL-17等细胞因子的产生,增加或促进血管内皮细胞与白细胞之间的粘附,有助于白细胞聚集于炎症局部,从而扩大炎症反应^[7]。临床上已发现多种疾病(如溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、支气管哮喘等)与IL-15的表达失调有关,但有关IL-15与胆囊炎症、胆结石的关系研究报道较少。王玉春等^[8]在研究IL-15与豚鼠胆囊炎的实验中发现,胆囊炎豚鼠胆汁及血清IL-15含量明显升高,与空白对照组比较差异有统计学意义,并且在胆囊炎组中,血清和胆汁中的IL-15含量呈显著正相关。这与我们的实验结果一致,本实验结果显示,形成胆结石豚鼠的血清及胆汁IL-15含量与空白组相比升高,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。胆结石豚鼠胆汁IL-15含量的升高说明存在胆囊局部炎症,而血清IL-15含量的升高则说明存在全身炎症反应。IL-1 β 主要是由单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、淋巴细胞、星状细胞以及肿瘤细胞等产生和释放的,是炎症反应的内生介质^[9]。它可引起与其有关的炎性递质IL-6、PGE2等的释放,然后经一系列信号转导,最后产生炎症效应^[10]。IL-1 β 升高也说明存在炎症效应,本实验结果显示胆结石豚鼠血清IL-1 β 含量较空白组升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。同时,我们除了比较胆结石模型组与空白组IL-15、IL-1 β 含量的水平,还比较了给予胆宁片治疗后,其小、中、大3个剂量组间血清、胆汁IL-15及血清IL-1 β 的含量与模型组、空白组间的差异。我们发现胆宁片可以减少血清、胆汁中的IL-15以及血清中的IL-1 β 含量,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。另外,我们比较了空白组、模型组及胆宁片各剂量组间成石率的不同,发现给予中、大剂量的胆宁片后,豚鼠的成石率明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$),说明胆宁片可以有效抑制胆结石形成。

中医认为,胆结石是由于饮食、情志等多种原因导致肝胆疏泄所致,其临床表现有发热、腹痛、黄疸等。胆宁片具有疏利肝胆、清热通下的作用,可针对发热、腹痛、黄疸进行治疗。我们推测,胆宁片抗炎、

治疗胆结石的作用机理在于抑制结石生成,减少IL-15、IL-1 β 的含量,抑制炎症反应。而且,根据实验结果,胆宁片大剂量组与中小剂量组相比,其成石率降低,IL-15、IL-1 β 的含量下降($P<0.01$),说明胆宁片治疗胆结石效果与剂量相关。综合上述实验结果,我们认为,胆宁片为治疗胆色素型胆结石提供了新的方法与思路,其治疗机理需要进一步研究和探讨。

参考文献

- [1] 朱培庭,张静哲,王以实,等.胆宁片、胆通、熊去氧胆酸治疗慢性胆道感染、胆石病的临床疗效对照研究[J].中国中西医结合外科杂志,1995,1(4):205—209.
- [2] 向阳,项建斌,马保金,等.胆宁片对胆石症患者胆汁成分和成石趋势的影响[J].上海医学,2008,31(2):104—106.
- [3] 程相超,赵建红,袁启东,等.胆宁片在胆道结石治疗中的疗效观察[J].中国社区医师,2013,15(7):215—216.
- [4] 李坤,邓兆斌,侯宪琴,等.胆宁片治疗慢性胆囊炎及胆石症的体会[J].现代中西医结合杂志,2011,20(10):1228—1228.
- [5] 张静喆,梁晓强,章学林,等.清胆胶囊与养肝利胆颗粒对豚鼠胆色素结石炎症反应环节的影响[J].上海中医药大学学报,2009,23(5):51—54.
- [6] FEHNIGER T A, CALIGIURI M A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease[J]. Blood, 2001, 97(1):14—32.
- [7] BADOLATO R, PONZI A N, MILLESIMO M, et al. Interleukin-15(IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes[J]. Blood, 1997, 90(7):2804—2809.
- [8] 王玉春,李涛,冯丽. IL-15在豚鼠胆囊炎形成中的作用[J].医学研究杂志,2009,28(3):46—47.
- [9] 吴晓岚,赵书芬. IL-1 β 致热机制的研究进展[J].解剖科学进展,2004,10(3):267—270.
- [10] 王玉春,苏富琴,苗术,等.金茵颗粒剂抗豚鼠胆囊炎的实验研究[J].医学研究杂志,2008,37(9):90—91.