

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.07.007

文章编号: 1005-8982(2016)07-0029-04

论著

胆宁片对胆汁骨桥蛋白的影响

郭满¹, 陈进宏², 张浩¹, 李伟汉¹

(1.河南省南阳市中心医院,河南 南阳 473000;2.复旦大学附属华山医院,上海 200040)

摘要:目的 探讨中药胆宁片对胆固醇结石形成的预防作用及机制。**方法** 建立骨桥蛋白(OPN)酶联免疫吸附(ELISA)快速检测法,分别检测正常人群、胆固醇以及胆色素结石患者血清及胆汁中的 OPN 浓度。另取 60 例术后诊断为胆固醇结石患者按随机序贯原则等分为胆宁片治疗组、熊去氧胆酸治疗组及对照组。观察胆宁片对患者胆汁 OPN 浓度的影响。**结果** 胆固醇结石患者血清及胆汁中 OPN 浓度低于正常人群以及胆色素结石患者($P < 0.05$);胆宁片治疗 2 周后,胆固醇结石患者血清及胆汁中 OPN 浓度明显升高($P < 0.05$)。**结论** 胆宁片能提高血清和胆汁中抑成核因子 OPN 的浓度,进而降低患者罹患胆固醇结石的风险。

关键词: 胆宁片;酶联免疫吸附;骨桥蛋白

中图分类号: R285;R575.62

文献标识码: A

Effect of Danning tablets on osteopontin in bile

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

(1. Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473000, China; 2. Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Danning tablets in the prevention of cholesterol lithogenesis. **Methods** A rapid method for detection of anti-nucleating factor osteopontin (OPN) was established. OPN concentrations were detected in serum and bile of the normal group, cholesterol-gallstone group and pigmental-gallstone group. Another group of cholesterol-gallstone patients ($n = 60$) were randomly divided into Danning group, sodium cholate group and control group; and the changes of OPN in serum and bile were observed using ELISA kits. **Results** The concentrations of OPN in serum and bile in the cholesterol-gallstone patients were significantly higher than those in the pigmental-gallstone and normal groups ($P < 0.05$). After treatment with Danning tablets for 2 weeks, the serum and bile OPN concentrations significantly increased in the cholesterol-gallstone patients ($P < 0.05$); but this increase was not found in the other two groups. **Conclusions** Danning tablets can raise the concentrations of anti-nucleating factor OPN in serum and bile, thereby reduce the risk of cholesterol gallstone formation.

Keyword: Danning tablet; enzyme-linked immunosorbent assay; osteopontin

胆汁中胆固醇成核是结石形成的始要环节,研究发现胆汁中存在促/抑成核因子的动态平衡,一旦平衡被打破将导致胆汁中胆固醇析出、结晶进而形成结石^[1]。本课题组从前期研究结果中发现,骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)具有抑制胆固醇成核的作用。作者进一步观察中药胆宁片对胆汁抑成核因

子 OPN 浓度的影响,探讨其预防胆固醇结石形成的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

胆宁片产自上海中药一厂,熊去氧胆酸片产自

上海信谊制药总厂,OPN 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测试剂盒购自美国 R&D 公司,辣根过氧化酶(horseradish peroxidase,HRP)购自美国 Sigma 公司,96 孔酶标板及酶标仪购自上海华美公司。

1.2 方法

1.2.1 建立 OPN ELISA 标准曲线

采用倍比稀释法将包被液纯化的 OPN 抗体依次加到酶标板中,每孔 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 包被 2 h 后,用 2% 牛血清白蛋白 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后拍净。将系列稀释度 OPN 标准品依次加入酶标板孔,每孔 100 μ l,45 $^{\circ}$ C 反应 1 h 后拍净。接着每孔加入 HRP 100 μ l(1:40 稀释),37 $^{\circ}$ C 反应 1 h 后每孔加入新鲜酶标底物液 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 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光密度值(optical density,OD),建立 OPN 浓度标准曲线,推导曲线方程。

1.2.2 胆石组与正常人群组血清及胆汁 OPN 含量检测

胆固醇结石、胆色素结石和正常人群组各 10 例,采集血清及术中胆管内胆汁各 2 ml。胆石症患者胆汁在肝胆系结石手术时抽取,正常人群组血清及胆汁标本来自于腹部外伤行剖腹探查术患者。本研究中所有标本采集均获得患者知情同意及医院伦理委员会授权。胆汁标本按照 Strasberg 所述的方法^[2],分装于无菌管中,4 $^{\circ}$ C、15 000 g 离心 15 min,去除杂质,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 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存备用。血清及胆汁中 OPN 浓度采用已建立的 ELISA 标准曲线计算。

1.2.3 实验分组

60 例胆固醇结石患者按照随机序贯原则分为 3 组。入选病例为本院 2012 年 6 月-2014 年 6 月行胆囊切除并胆管探查术患者,术后均带 T 管。胆固醇结石分类按肉眼观察及傅氏法。胆宁片治疗组口服胆宁片 5 片/次,3 次/d;熊去氧胆酸片治疗组口服熊去氧胆酸片 50 mg/次,2 次/d;对照组除采用前两组术后常规治疗外不附加任何其他治疗。前两组患者术后第 2 天起开始服用药物,共计 2 周时间,分别于术后 1、3、7 和 14 d 采取胆汁和血清,用以上方法测定 OPN 浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析用单因素方差分析(组间比较用 LSD 法)及重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPN 浓度标准曲线

ELISA 法得到标准蛋白系列稀释吸光度,建立曲线方程: $Y=0.037X$ (Y :吸光度; X :OPN 浓度 mg/mL,相关系数 $r=0.99$)。

2.2 ELISA 法检测胆石症及正常人群组血清和胆汁中 OPN 浓度

胆固醇结石组、胆色素结石组和正常人群组血清 OPN 浓度依次为(41.30 \pm 6.46)、(47.50 \pm 4.79)和(47.81 \pm 7.27)ng/ml,方差齐性检测表明方差齐($P=0.890$),单因素方差分析结果表明组间比较差异有统计学意义($P=0.011$)。其中胆固醇结石组患者血清 OPN 浓度低于胆色素结石组和正常人群组($P=0.003$);而胆色素结石组和正常人群组 OPN 浓度比较,差异无统计学意义($P=0.656$)。3 组患者胆汁检测结果与之相似。见表 1。

2.3 药物对胆固醇结石患者 OPN 浓度的影响

重复测量设计方差分析结果显示,3 组患者血清和胆汁中 OPN 浓度比较差异有统计学意义($P=0.013$ 和 0.010)。胆宁片组与对照组血清和胆汁中 OPN 浓度组间比较,差异有统计学意义($P=0.003$ 和 0.004);而熊去氧胆酸组与对照组血清和胆汁中 OPN 浓度比较,差异无统计学意义($P=0.570$ 和 0.659)。胆宁片组血清和胆汁中 OPN 浓度随着治疗时间的推移而逐渐升高,时间越长,上升越明显,自服药第 7 天开始,差异有统计学意义($P=0.009$ 和 0.007)。见表 2、3。

表 1 3 组 OPN 浓度比较 ($n=10$,ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	血清	胆汁
胆固醇结石组	41.30 \pm 6.46 ¹⁾	67.30 \pm 9.48 ²⁾
胆色素结石组	47.50 \pm 4.79	79.42 \pm 8.71
正常人群组	47.81 \pm 7.27	82.20 \pm 10.27

注:1)与正常人群组比较, $P=0.003$;2)与正常人群组比较, $P=0.656$

表 2 胆宁片对血清 OPN 浓度的影响 ($n=20$,ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
胆宁片组	42.50 \pm 7.12	43.18 \pm 8.03	46.35 \pm 7.53 ¹⁾	51.26 \pm 6.93 ²⁾
熊去氧胆酸组	41.81 \pm 6.65	42.17 \pm 6.35	41.57 \pm 8.72	42.03 \pm 8.52
对照组	40.95 \pm 7.83	42.05 \pm 8.43	41.87 \pm 5.85	41.87 \pm 7.75

注:1)与第 1 天比较, $P=0.009$;2)与第 1 天比较, $P=0.004$

表 3 胆宁片对胆汁 OPN 浓度的影响 ($n=20, \text{ng/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
胆宁片组	68.37 ± 8.32	72.13 ± 7.75	79.65 ± 9.13 ¹⁾	83.50 ± 8.43 ²⁾
熊去氧胆酸组	71.01 ± 7.85	72.67 ± 8.27	70.87 ± 7.82	73.15 ± 7.76
对照组	69.75 ± 9.21	71.93 ± 6.49	73.01 ± 6.75	71.80 ± 10.25

注:1)与第 1 天比较, $P=0.007$;2)与第 1 天比较, $P=0.002$

3 讨论

胆石症是造成胆道系统急危重症的重要原因。近年来,由于生活方式的改变,我国胆石症的发病率呈逐渐上升趋势,且多为胆固醇性结石^[3],因此研究胆固醇结石成石机制,有效预防和治疗胆固醇结石具有十分重要的理论和现实意义。已有研究表明,胆固醇结石的形成与胆汁促/抑成核平衡体系失调、胆道动力学功能紊乱等因素有关。其中胆汁促/抑成核平衡体系失调造成胆固醇异常成核是结石形成的关键步骤^[4]。关于胆汁中促/抑成核因子的研究,现已取得大量的成果。其中促成核因子黏蛋白、 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白、抑成核因子载脂蛋白 A1 等都已得到学界公认^[5-8]。本课题组前期研究中作者观察到,OPN 能抑制胆固醇结晶形成,延缓胆固醇结晶出现,并且抑制由钙离子诱导的胆固醇促成核效应,使胆固醇/磷脂泡更加稳定,抑制磷脂泡的动态变化及胆固醇析出,从而降低胆固醇结石的发生^[9]。此外,动物实验也证实 OPN 参与胆囊胆固醇结石形成的整个过程,与其他促成核因子具有拮抗作用^[10]。本研究中作者发现,胆固醇结石患者血清及胆汁中 OPN 浓度明显低于正常人群,且经抗胆结石药物胆宁片治疗后胆固醇结石患者血清及胆汁中 OPN 浓度明显升高,该结果与笔者前期研究结果发现 OPN 的抑成核作用相吻合。

胆宁片是由大黄、虎杖、青陈皮等制成的纯中药制剂,具有消炎、利胆、防石、溶石、抗肝脏脂肪变性、改善结石患者胆囊切除术后不适症状等功能^[11-12]。研究表明,胆宁片不仅可以提高胆汁中胆盐、磷脂的浓度,促进胆固醇溶解,降低胆汁游离胆红素浓度,改善胆汁成石热力学平衡紊乱^[13];同时动物实验还发现胆宁片还可以上调钠离子-牛磺胆酸协同转运蛋白、多药耐药相关蛋白 3、多药耐药蛋白 2、谷胱甘肽-S-转移酶 A1 和葡萄糖醛酸转移酶 1A1 的表达,有效改善胆汁淤积,减轻肝胆系病理损害^[14]。此外还有研究表明胆宁片可以降低和改变胆汁中 33.5

kD 泡蛋白等促成核因子含量和结构,从而降低胆汁成核趋势^[15]。本研究中作者发现胆宁片可以提高胆石症患者血清及胆汁中抑成核因子 OPN 的浓度,从而起到溶石和防石的作用。由此认为,胆宁片是一种针对胆结石形成过程的多靶点、多作用机制的有效纯中药制剂。

胆汁中 OPN 来源目前仍不十分明确。Imano 等^[16]研究发现,OPN 在肝内结石患者的肝内胆管、腺体及结石中都有较强表达。Ichikawa 等^[17]研究发现,结石患者的胆囊壁有较强的 OPN 表达,也有较多高表达 OPN 的巨噬细胞浸润。本课题组前期研究中作者发现^[18],胆囊结石患者的胆囊上皮细胞发生变性,而纤维化或萎缩的上皮细胞表达更多的 OPN 和整合素,且胆囊结石患者血清 OPN 浓度较正常人低,胆汁中 OPN 和钙离子浓度降低。由此笔者认为,胆固醇结石患者体内 OPN 可能来源于肝脏、胆囊上皮细胞的分泌等途径。胆宁片提高患者体内 OPN 浓度,初步推测可能与其促进胆系上皮细胞 OPN 合成相关基因转录及酶类活性等相关,其确切的机制仍有待更深入的研究。

本研究中作者发现 3 组受试者血清与胆汁中 OPN 浓度结果一致:即胆固醇结石患者血清及胆汁中 OPN 浓度明显低于正常人群和胆色素结石患者。由此笔者设想通过 ELISA 法检测血清中 OPN 浓度,以帮助筛选易罹患胆固醇结石的高危人群,或为溶石利胆类药物的临床疗效评判提供参考依据,但该设想的可靠性和有效性以及 OPN 浓度界定位点等仍有待于进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] Castro-Torres IG, Cardenas-Vazquez RJ, Velazquez-Gonzalez C, et al. Future therapeutic targets for the treatment and prevention of cholesterol gallstones[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015,765: 366-374.
- [2] Strasberg SM, Harvey PR, Hofmann AF. Bile sampling, processing and analysis in clinical studies[J]. *Hepatology*, 1990, 12(32): 176-180.
- [3] 刘江伟,吕复君,吕辉琴,等.新疆地区维吾尔族、汉族和哈萨克族三个民族胆囊结石的流行病学分析[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013(21): 9542-9548.
- [4] Zhang D, Xiang J, Wang L, et al. Comparative proteomic analysis of gallbladder bile proteins related to cholesterol gallstones[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54489.DOI: 10.1371/journal.pone.0054489.
- [5] Kim HJ, Kim SH, Chae GB, et al. Increased expression of mucin 5AC mRNA and decreased expression of epidermal growth-factor receptor mRNA in gallstone patients[J]. *Tohoku J*

- Exp Med, 2008, 214(2): 139-144.
- [6] Abei M, Nuutinen H, Kawczak P, et al. Identification of human biliary alpha 1-acid glycoprotein as a cholesterol crystallization promoter[J]. Gastroenterology, 1994, 106(1): 231-238.
- [7] Secknus R, Yamashita G, Ginanni CS, et al. Purification and characterization of a novel human 15 kd cholesterol crystallization inhibitor protein in bile[J]. J Lab Clin Med, 1996, 127(2): 169-178.
- [8] 殷和平, 曾骥孟, 胡鹏, 等. 利用基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱分析胆囊结石中非黏性蛋白的组成[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(23): 46-51.
- [9] Yang L, Chen JH, Cai D, et al. Osteopontin plays an anti-nucleation role in cholesterol gallstone formation[J]. Hepatol Res, 2011, 41(5): 437-445.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 马恩伟, 顾宏刚, 阎良, 等. 胆宁片在胆囊切除术后应用的大样本、多中心临床研究[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2606-2609.
- [13] 赵滨, 杨培民, 杨静, 等. 中药胆宁片对胆汁热力学平衡体系的影响[J]. 肝胆胰外科杂志, 2010, 22(3): 203-204.
- [14] 王莉, 丁丽丽, 杨帆, 等. 胆宁片对胆汁淤积小鼠肝脏转运体及代谢酶基因表达的影响[J]. 中成药, 2013, 35(7): 1385-1389.
- [15] 赵滨, 杨培民, 项建斌, 等. 胆宁片对胆汁 33.5 kDa 泡蛋白含量和结构的影响[J]. 中国临床医学, 2011, 1: 74-75.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Yang L, Chen JH, Cai D, et al. Osteopontin and integrin are involved in cholesterol gallstone formation[J]. Med Sci Monit, 2012, 18(1): 16-23.

(申海菊 编辑)

致作者信

尊敬的作者、读者：

最近有不法分子利用《中国现代医学杂志》假网站假邮箱诱使作者投稿、约稿，诈取版面费或者加快费，同时通过不正当手段将假网站置顶百度搜索结果前几名，请大家不要向假网站及邮箱投稿。本刊从不向作者发电子版的录用通知，除审稿费和版面费外不收加快费，凡是大家收到电子版的盖有《中国现代医学杂志》假公章的《录用通知》都是假的，更不要寄版面费和加快费。《中国现代医学杂志》投稿路径一：《中国现代医学杂志》官网 www.zgxdyx.com；投稿路径二：进入中南大学湘雅医院官网→首页左下角点击“医学杂志”→点击《中国现代医学杂志》→点击《中国现代医学杂志》官网 <http://www.zgxdyx.com>。请大家提高警惕，不要上当受骗，造成不必要的损失。任何事情请来电咨询。编辑部咨询电话：0731-84327993（咨询时间上午 8:00 ~ 12:00，下午 2:30 ~ 5:30）。

《中国现代医学杂志》编辑部