

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.17.010

实验研究

利胆消石合剂对胆总管结石模型豚鼠血清胃肠激素及胆道组织中 Cajal 样间质细胞的影响

吕福琪¹, 卞昊宇², 魏骄阳¹, 张立平¹✉

1. 北京中医药大学东方医院, 北京市丰台区方庄芳星园一区6号, 100078; 2. 北京市丰台区中医医院

[摘要] 目的 探讨利胆消石合剂预防胆总管结石 (CBDS) 复发的可能机制。方法 85 只豚鼠采用随机数字表法分为对照组 10 只, 模型组、胆宁片组、利胆消石低剂量组、利胆消石中剂量组、利胆消石高剂量组各 15 只。除对照组进行假手术处理外, 其余各组采用胆总管插管、注射复发型胆总管结石患者胆道细菌培养液的方式制备 CBDS 豚鼠模型。造模后次日胆宁片组给予胆宁片混悬液 0.05 g/(100 g·d) 灌胃, 利胆消石低、中、高剂量组分别给予利胆消石合剂颗粒 0.16、0.32、0.64 g/(100 g·d) 灌胃, 对照组、模型组给予 1 ml/(100 g·d) 蒸馏水灌胃。各组均持续灌胃 7 天。最后一次灌胃后次日取材, 观察豚鼠胆总管及胆囊情况; ELISA 法检测各组豚鼠血清中胃动素 (MTL)、血管活性肠肽 (VIP)、生长抑素 (SS)、胆囊收缩素 (CCK) 含量; HE 染色法观察各组豚鼠 Oddi 括约肌、胆管组织病理情况; 免疫荧光染色法检测豚鼠 Oddi 括约肌、胆管组织中 Cajal 样间质细胞 (ICLC) 数量; Western Blot 法检测豚鼠 Oddi 括约肌组织中酪氨酸激酶受体 (c-kit)、干细胞因子 (SCF) 蛋白水平。结果 模型组豚鼠胆总管内可见黄色絮状固体, 胆囊中胆汁浑浊, 部分形成结石, HE 染色显示 Oddi 括约肌、胆管组织损伤及炎症反应增加; 胆宁片组及利胆消石各剂量组豚鼠胆总管及胆囊内胆汁澄清, 未见明显沉淀, 病理结果显示利胆消石高剂量组未见明显胆道组织损伤及炎症反应损伤。与对照组比较, 模型组血清 MTL、CCK 含量降低, VIP、SS 含量升高, Oddi 括约肌及胆管组织中 ICLC 数量减少, Oddi 括约肌组织中 c-kit、SCF 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 利胆消石各剂量组血清 MTL、CCK 含量升高, VIP、SS 含量降低, Oddi 括约肌及胆管组织中 ICLC 数量增加, Oddi 括约肌组织中 c-kit、SCF 蛋白水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与胆宁片组比较, 利胆消石中、高剂量组 MTL、CCK 含量升高, SS 含量降低; 利胆消石中剂量组 Oddi 括约肌和利胆消石各剂量组胆管组织中 ICLC 数量均增加, 利胆消石低、中剂量组 Oddi 括约肌组织中 c-kit、SCF 蛋白水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 利胆消石合剂可能通过减轻胆道组织炎症反应, 调节胃肠激素, 激活 c-kit/SCF 信号通路, 增加 ICLC 数量, 从而减少胆汁淤积和结石形成, 预防 CBDS 的复发。

[关键词] 胆总管结石; 胃肠激素; Cajal 样间质细胞; 利胆消石合剂; 酪氨酸激酶受体; 干细胞因子; Oddi 括约肌

胆总管结石 (common bile duct stones, CBDS) 的术后复发问题一直是临床关注的焦点, 其形成与复发是多种因素协同作用的病理结果。由于经内镜逆行性胰胆管造影术 (ERCP) 多不同程度地破坏 Oddi 括约肌的结构, 尤其在合并内镜下乳头括约

肌切开术时常见, 而 Oddi 括约肌功能紊乱作为胆道动力障碍的核心环节, 与 CBDS 复发密切相关^[1]。胆道的运动离不开胆道平滑肌的收缩和舒张, 而作用于胃肠道的胃肠激素, 同样对胆道的正常生理功能起着调节作用^[2]。在胆道中存在与胃肠 Cajal 间质细胞结构相似的细胞, 被命名为 Cajal 样间质细胞 (ICLC), 其主要调控胆道平滑肌的收缩运动, 且其结构、数量异常可导致胆道动力障碍^[3]。现代

基金项目: 北京中医药大学基本科研业务费项目 (2023-JYB-JBZD-004)

✉ 通讯作者: Zhanglp00363@126.com

研究发现,酪氨酸激酶受体(c-kit)是ICLC最重要的基因表达产物,其与天然配体干细胞因子(SCF)的结合,能够促进前体细胞增殖分化成ICLC,维持ICLC的表型^[4],c-kit/SCF信号通路是ICLC发挥功能的重要机制^[5]。

中医学将胆石症或CBDS引起的腹痛、发热、黄疸等症状纳入“胁痛”“黄疸”“胆胀”等范畴。胆石症的发生与肝气郁滞导致胆汁排泄不畅、郁久化热、煎熬胆汁成石的病理过程存在密切关联^[6],因此疏肝利胆应为治疗CBDS的基本治则。利胆消石合剂具有疏肝利胆、健脾益气、消石化坚的功效。团队前期研究^[7]已经初步证实利胆消石合剂防治CBDS复发的有效性,并从侧面反映出其对Oddi括约肌和胆道动力的调节作用。基于此,本研究观察利胆消石合剂对CBDS模型豚鼠胃肠激素及胆管组织ICLC的影响,探究其对胆道动力相关因素的影响及可能作用机制,为临床用药提供实验依据。本实验已通过中国中医科学院中药研究所动物伦理审查委员会批准(伦理审查号:2023C005)。

1 材料与方法

1.1 动物

普通级Dunkin Hartley雄性豚鼠85只,6~8周龄,体质量200~300 g,由北京市昌扬西山养殖场提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0008。豚鼠饲养于中国中医科学院中药研究所普通级动物实验室,4只1笼,温度23~25℃,相对湿度(55±10)%,40 W日光灯照射,维持12 h明暗交替,自由进食、饮水,标准豚鼠饲料喂养。

1.2 药物

利胆消石合剂组成:北柴胡10 g,枳壳10 g,白芍10 g,党参10 g,麸炒白术10 g,茯苓10 g,焦山楂10 g,茵陈15 g,金钱草30 g,海金沙10 g,郁金10 g,鸡内金10 g。剂型为颗粒剂(1 g颗粒剂相当于饮片3.03 g),由北京康仁堂药业有限公司提供,制备成浓度为0.3 g/ml的溶液。胆宁片(组成:大黄、虎杖、青皮、白茅根、陈皮、郁金、山楂,规格:0.36 g/片,批号:230712,上海和黄药业有限公司),制备成浓度为0.05 g/ml的混悬液。

1.3 主要试剂及仪器

胃动素(MTL)ELISA试剂盒(货号:YJ-9857)、血管活性肠肽(VIP)ELISA试剂盒(货号:YJ-4456)、生长抑素(SS)ELISA试剂盒(货号:YJ-2356)、胆囊收缩素(CCK)ELISA试剂盒(货

号:YJ-7989),上海酶联生物科技有限公司;膜蛋白提取试剂盒(货号:EX1110),北京索莱宝科技有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P1511),北京普利莱基因技术有限公司;山羊抗兔二抗(货号:SA00001-2)、c-kit一抗(货号:18696-1-AP)、SCF一抗(货号:26582-1-AP)、 β -actin抗体(货号:20536-1-AP),武汉三鹰生物技术有限公司;戊巴比妥钠(货号:57-33-0),美国Sigma公司;HE染液(货号:G1005)、CY3标记山羊抗兔IgG(货号:GB21303),武汉赛维尔生物科技有限公司。

霉菌培养箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司,型号MJ-01);低温离心机(德国Eppendorf公司,型号5424R);酶标分析仪(瑞士Tecan公司,型号Infinite F50);正置荧光显微镜(日本尼康株式会社,型号NIKON ECLIPSE C1);扫描仪(匈牙利3DHISTECH数字病理公司,型号Pannoramic MIDI);荧光发光成像系统(英国Syngene公司,型号G:BOX C Hemi XX9);电泳仪(北京六一生物技术有限公司,型号DYCZ-MINI 2);超薄切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号Leica UC7);透射电子显微镜[日立(中国)有限公司,型号HT7800]。

1.4 分组与模型制备

将豚鼠用随机数字表法分为对照组10只,模型组15只,胆宁片组15只,利胆消石低、中、高剂量组各15只。除对照组外,其余5组豚鼠按照本课题组前期研究的胆总管插管注射菌液法^[8]建立CBDS豚鼠模型:选取复发型CBDS患者胆道细菌培养液为造模用菌液,予胆总管插管注射菌液,注射浓度为 2.5×10^8 cfu/ml,菌液量为0.5 ml,注射后第4天胆道系统内可见结石形成,证明造模成功。对照组予胆总管插管注射0.5 ml生理盐水。

1.5 给药方法

造模第2天开始,参照《中药药理研究方法学》^[9]中人与动物剂量换算公式进行换算给药。胆宁片组豚鼠给予胆宁片混悬液0.05 g/(100 g·d)灌胃,利胆消石低、中、高剂量组分别给予利胆消石合剂颗粒0.16、0.32、0.64 g/(100 g·d)灌胃,其中中剂量为临床等效剂量,对照组、模型组给予1 ml/(100 g·d)蒸馏水灌胃。各组均每日1次,持续灌胃7天,此过程中均自由进食和饮水。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 豚鼠一般情况 研究期间观察并记录各组豚鼠的皮毛色泽、活动情况、进食、饮水等一般情

况的变化。

1.6.2 大体观察胆总管及胆囊情况 最后一次灌胃后次日取材,所有豚鼠不禁食水,称重后,腹腔注射3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,分离胆囊,观察胆组织形态及结石情况,并拍照。

1.6.3 ELISA 法检测豚鼠血清中 MTL、VIP、SS、CCK 含量 腹主动脉取血 3 ml, 4 °C、3000 r/min 离心 10 min (离心半径 8 cm), 小心分离上层血清, 将血清分装于冻存管中, -80 °C 冰箱冷冻保存。按照各 ELISA 检测试剂盒说明书进行检测, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔 OD 值, 绘制标准曲线, 并根据标准曲线计算豚鼠血清中 MTL、VIP、SS、CCK 的含量。

1.6.4 HE 染色法观察豚鼠 Oddi 括约肌、胆管组织病理情况 摘取全部肝胆组织, 4 °C 生理盐水冲洗后, 仔细剥离胆囊、胆管。抽取胆汁后, 将胆组织剪开并用生理盐水冲洗, 修剪出 Oddi 括约肌所在壶腹部、胆管组织, 各取 1 块 1 mm×1 mm×1 mm 大小壶腹部、胆管组织, 4% 多聚甲醛固定, 制作石蜡切片。将石蜡切片经脱蜡、水化后进行 HE 染色, 最后脱水封片在光镜下观察组织的病理变化。将 Oddi 括约肌剩余部分放入冻存管中, 置于液氮中骤冷后转移至 -80 °C 冰箱中保存, 用于 Western Blot 法检测。

1.6.5 免疫荧光染色法检测豚鼠 Oddi 括约肌、胆管组织中 ICLC 的数量 将制备好的石蜡切片脱蜡至水, EDTA 抗原修复液修复。将玻片置于磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后用 3% 牛血清白蛋白封闭 30 min, 滴加 c-kit 一抗 (稀释比例为 1 : 250), 4 °C 孵育过夜。PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入二抗 (稀释比例为 1 : 300), 避光室温孵育 50 min。PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加 DAPI 染液复染细胞核, 避光室温孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加自发荧光淬灭剂 B 液 5 min, 流水冲洗 10 min。使用抗荧光淬灭封片剂封片后采集图像, 其中 DAPI 激发波长 330~380 nm, 发射波长 420 nm; CY3 激发波长 510~560 nm, 发射波长 590 nm; DAPI 通道细胞核为蓝色, CY3 通道阳性为红色。采用 Image Pro Plus 6.0 软件定量分析 c-kit 阳性 ICLC 数量。

1.6.6 Western Blot 法检测豚鼠 Oddi 括约肌组织中 c-kit、SCF 蛋白水平 各组豚鼠 Oddi 括约肌组织 1 mm³ 大小并进行常规处理后, 使用膜蛋白提取试剂盒提取膜蛋白。用 BCA 法测定蛋白样品浓度后,

将所提样品按照 4 : 1 的比例加入 5×蛋白上样缓冲液, 混匀后于恒温器中变性, 冷却备用。电泳和转膜后将 PVDF 膜用 TBST 缓冲液漂洗, 随后在快速封闭液中室温摇床孵育 10 min。封闭后 TBST 洗膜。用 TBST 稀释一抗 (c-kit 按 1 : 2000 比例稀释, SCF 按 1 : 750 比例稀释, β -actin 按 1 : 7500 比例稀释), 将 PVDF 膜放入一抗, 4 °C 摇床孵育过夜。一抗孵育结束后 TBST 洗膜。用 TBST 将二抗按 1 : 10 000 比例稀释后, 将 PVDF 膜放入二抗孵育 1 h。二抗孵育结束后漂洗, 配置 ECL 发光工作液, 于多功能荧光凝胶成像系统内曝光成像。使用荧光发光成像系统采集图片, Image J 1.8.0 软件进行灰度值分析, 以 β -actin 为内参, 以目的蛋白与内参灰度值的比值表示目的蛋白水平。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析。计量资料均符合正态分布采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐性多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD 多重比较法, 采用 bonferroni 校正, 方差不齐采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠一般情况比较

在适应性饲养期间出现 8 只死亡, 造模开始前 1 日, 对照组余 9 只, 模型组余 13 只, 胆宁片组余 14 只, 利胆消石低、中剂量组各余 13 只, 利胆消石高剂量组余 15 只。对照组豚鼠正常进食、饮水, 行动敏捷, 皮毛光泽。模型组豚鼠出现精神萎靡不振, 行动迟缓, 活动减少, 皮毛少华凌乱, 进食、饮水减少。胆宁片组及利胆消石各剂量组豚鼠一般情况均有所改善, 各组之间无显著差异。干预期间有 21 只豚鼠因术后腹腔感染出现死亡, 对照组余 8 只, 模型组余 6 只, 胆宁片组余 10 只, 利胆消石低剂量组余 8 只, 利胆消石中、高剂量组各余 12 只。每组使用随机数字表法选取 6 只豚鼠用于检测血清胃肠激素, 选取 3 只胆道组织用于组织切片进行 HE 和免疫荧光染色, 剩余 3 只用于 Western Blot 法检测。

2.2 各组豚鼠胆总管及胆囊情况比较

图 1 示, 模型组豚鼠胆总管内可见黄色絮状固体, 胆囊中胆汁浑浊, 可见大量沉淀, 部分形成结石, 提示造模成功。胆宁片组、对照组及利胆消石各剂量组豚鼠胆总管及胆囊内胆汁澄清, 未见明显沉淀。

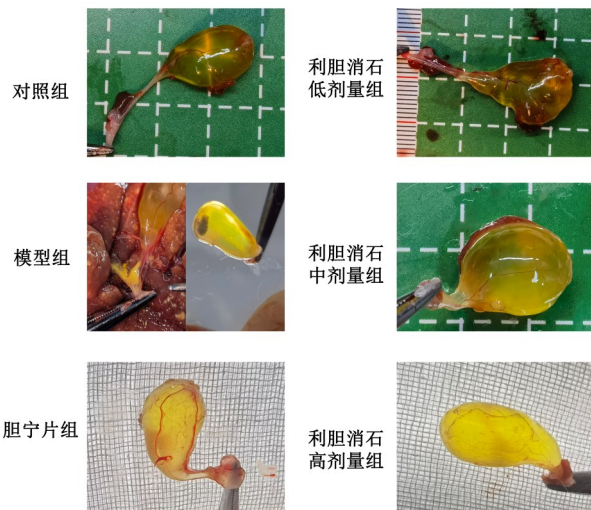


图1 各组豚鼠胆总管及胆囊大体观察结果

Figure 1 Pathology results of common bile duct and gallbladders of guinea pigs in each group

2.3 各组豚鼠血清中 MTL、VIP、SS、CCK 含量比较

表 1 示, 与对照组比较, 模型组 MTL、CCK 含量降低, VIP、SS 含量升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 除胆宁片组 SS 含量差异无统计学意义外 ($P>0.05$), 各药物干预组 MTL、CCK 含量均升高, VIP、SS 含量均降低 ($P<0.05$)。与胆宁片组比较, 利胆消石低剂量组 SS 含量降低, CCK 含量升高 ($P<0.05$); 利胆消石中、高剂量组 MTL、CCK 含量升高, SS 含量降低 ($P<0.05$)。与利胆消石低剂量组比较, 利胆消石中剂量组 MTL 含量升高, VIP 含量降低 ($P<0.05$); 利胆消石高剂量组 VIP 含量降低, CCK 含量升高 ($P<0.05$)。利胆消石中、高剂量组各指标含量比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组豚鼠 Oddi 括约肌、胆管组织中 ICLC 数量比较

表 2 示, 与对照组比较, 模型组豚鼠 Oddi 括约

肌、胆管组织中 ICLC 数量均减少 ($P<0.05$)。与模型组比较, 除胆宁片组胆管组织中 ICLC 数量差异无统计学意义 ($P>0.05$) 外, 各药物干预组 Oddi 括约肌、胆管组织中 ICLC 数量均增加 ($P<0.05$)。与胆宁片组比较, 利胆消石中剂量组 Oddi 括约肌、利胆消石各剂量组胆管组织中 ICLC 数量均增加 ($P<0.05$); 与利胆消石低剂量组比较, 利胆消石中剂量组胆管组织中 ICLC 数量增加 ($P<0.05$)。利胆消石中、高剂量组组间比较, Oddi 括约肌、胆总管组织中 ICLC 数量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组豚鼠 Oddi 括约肌、胆管组织中 ICLC 免疫荧光染色图分别见附图 1、附图 2 (请扫描本文二维码获取)。

表 2 各组豚鼠 Oddi 括约肌、胆管组织中 c-kit 阳性 ICLC 数量比较

Table 2 Comparison of c-kit-positive ICLC numbers in Oddi sphincter and bile duct tissues of guinea pigs in each group (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Oddi 括约肌	胆管组织
对照组	3	156.67±9.50	51.00±7.21
模型组	3	40.33±14.74 ^{a)}	10.33±2.08 ^{a)}
胆宁片组	3	200.67±20.23 ^{b)}	17.67±5.69
利胆消石低剂量组	3	236.00±38.94 ^{b)}	47.00±16.64 ^{b)c)}
利胆消石中剂量组	3	278.33±10.02 ^{b)c)}	71.33±8.74 ^{b)c)d)}
利胆消石高剂量组	3	226.00±39.95 ^{b)}	55.00±4.58 ^{b)c)}

注: c-kit, 酪氨酸激酶受体; ICLC, Cajal 样间质细胞。

a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与胆宁片组比较, $P<0.05$; d) 与利胆消石低剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.5 各组豚鼠 Oddi 括约肌、胆管组织 HE 染色结果

图 2 示, 对照组、胆宁片组、利胆消石中剂量组和利胆消石高剂量组豚鼠 Oddi 括约肌组织肌层的肌纤维结构清晰, 着色均匀, 未见明显的坏死及炎性细胞浸润; 模型组豚鼠 Oddi 括约肌组织局部

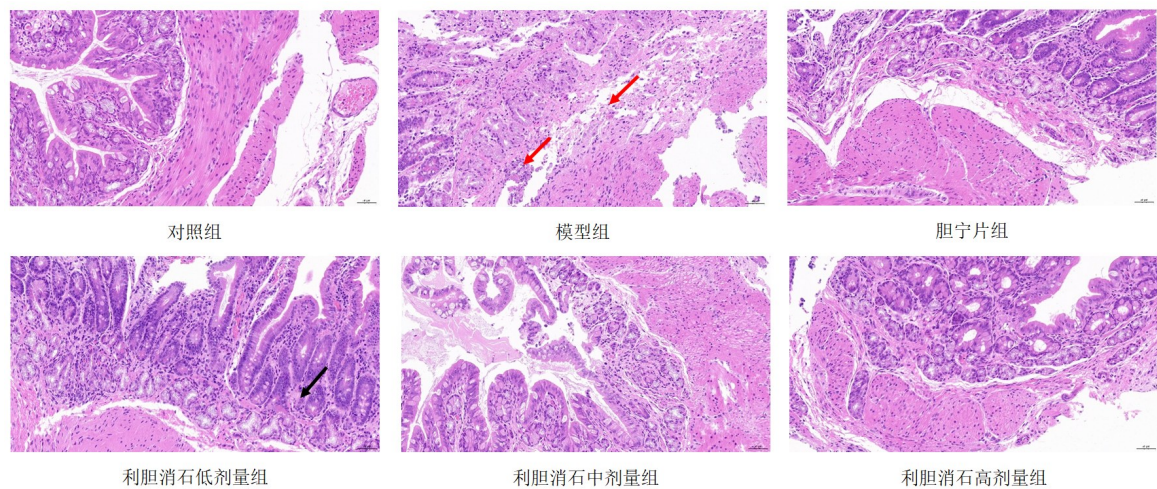
表 1 各组豚鼠血清中 MTL、VIP、SS、CCK 含量比较

Table 1 Comparison of MTL, VIP, SS, and CCK levels in serum of guinea pigs in each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MTL	VIP	SS	CCK
对照组	6	350.28±30.86	128.03±14.25	23.29±2.33	237.44±25.49
模型组	6	244.79±25.56 ^{a)}	324.42±16.99 ^{a)}	67.26±4.06 ^{a)}	143.37±14.54 ^{a)}
胆宁片组	6	374.13±29.33 ^{b)}	262.12±21.54 ^{b)}	57.06±4.34	242.07±15.29 ^{b)}
利胆消石低剂量组	6	448.29±31.77 ^{b)}	273.52±9.26 ^{b)}	46.75±2.80 ^{b)c)}	295.36±18.33 ^{b)c)}
利胆消石中剂量组	6	585.63±31.20 ^{b)c)d)}	225.99±10.36 ^{b)d)}	39.54±4.89 ^{b)c)}	321.43±21.72 ^{b)c)}
利胆消石高剂量组	6	515.87±26.03 ^{b)c)}	203.82±20.95 ^{b)d)}	38.01±2.95 ^{b)c)}	368.46±15.78 ^{b)c)d)}

注: MTL, 胃动素; VIP, 血管活性肠肽; SS, 生长抑素; CCK, 胆囊收缩素。

a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与胆宁片组比较, $P<0.05$; d) 与利胆消石低剂量组比较, $P<0.05$ 。



注：图中红色箭头指示肌层肌纤维坏死溶解，黑色箭头指示粒细胞浸润。

图2 各组豚鼠Oddi括约肌组织病理情况（HE染色，×200）

Figure 2 Histopathological changes in Oddi's sphincter tissues from guinea pigs in each group (HE staining, ×200)

肌层肌纤维坏死溶解，可见少量的坏死细胞碎片；利胆消石低剂量组豚鼠Oddi括约肌组织固有层的结缔组织内可见少量粒细胞浸润。

图3示，对照组豚鼠胆管组织的黏膜上皮细胞完整，黏膜有许多较小的皱襞，固有层为薄层结缔组织，肌层较薄，浆膜无明显异常，未见明显的炎性细胞浸润；模型组豚鼠胆管组织固有层可见少量的粒细胞及淋巴细胞浸润；胆宁片组和利胆消石低、中剂量组豚鼠胆管组织固有层偶见淋巴细胞浸润；利胆消石高剂量组豚鼠胆管组织固有层为疏松结缔组织，未见明显的炎性细胞浸润。

2.6 各组豚鼠Oddi括约肌组织中c-kit、SCF蛋白水平比较

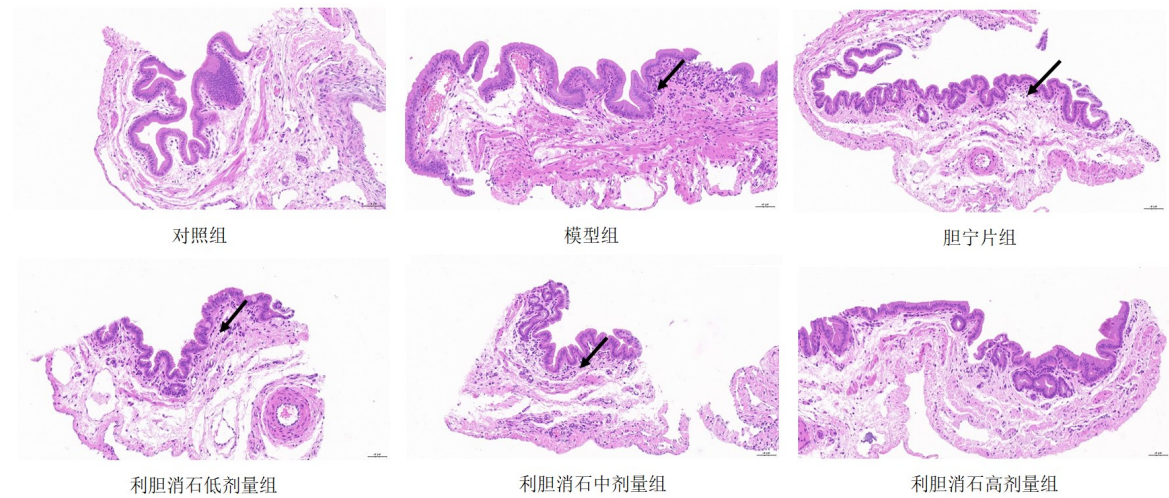
表4示，与对照组比较，模型组豚鼠Oddi括约

表4 各组豚鼠Oddi括约肌组织中c-kit、SCF蛋白水平比较

Table 4 Comparison of c-kit and SCF protein levels in Oddi sphincter tissues of guinea pigs in each group (/β-actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	c-kit	SCF
对照组	3	0.746±0.028	0.680±0.006
模型组	3	0.072±0.005 ^{a)}	0.375±0.016 ^{a)}
胆宁片组	3	0.912±0.031 ^{b)}	0.780±0.002 ^{b)}
利胆消石低剂量组	3	1.149±0.016 ^{b) c)}	1.051±0.027 ^{b) c)}
利胆消石中剂量组	3	1.393±0.048 ^{b) c) e)}	0.853±0.018 ^{b) d) e)}
利胆消石高剂量组	3	1.038±0.044 ^{b)}	1.004±0.006 ^{b) c)}

注：c-kit，酪氨酸激酶受体；SCF，干细胞因子。
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与胆宁片组比较， $P<0.01$ ；d) 与胆宁片组比较， $P<0.05$ ；
e) 与利胆消石低剂量组比较， $P<0.01$ 。

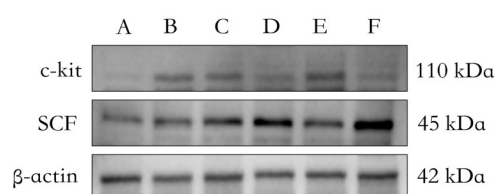


注：图中黑色箭头指示粒细胞及淋巴细胞浸润。

图3 各组豚鼠胆管组织病理情况（HE染色，×200）

Figure 3 Histopathological changes in bile duct tissues of guinea pigs in each group (HE staining, ×200)

肌组织中 c-kit、SCF 蛋白水平均降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组 c-kit、SCF 蛋白水平均升高 ($P < 0.01$)。与胆宁片组比较, 利胆消石低、中剂量组 c-kit 蛋白水平升高, 利胆消石各剂量组 SCF 蛋白水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与利胆消石低剂量组比较, 利胆消石中剂量组 c-kit 蛋白水平升高, SCF 蛋白水平降低 ($P < 0.01$)。各组豚鼠 Oddi 括约肌组织中 c-kit、SCF 蛋白电泳图见图 4。



注: c-kit, 酪氨酸激酶受体; SCF, 干细胞因子。A, 模型组; B, 对照组; C, 胆宁片组; D, 利胆消石低剂量组; E, 利胆消石中剂量组; F, 利胆消石高剂量组。

图 4 各组豚鼠 Oddi 括约肌组织中 c-kit、SCF 蛋白电泳图

Figure 4 Electrophoretograms of c-kit and SCF protein expression in Oddi sphincter tissues of guinea pigs in each group

3 讨论

CBDS 是胆道系统常见病, 目前 ERCP 术为主要治疗方法, 鉴于 ERCP 取石术的有创性和胆总管结石及其并发症的危害性, 患者在术后常呈正气不足的虚弱状态。团队前期研究^[7]发现, 患者术后 6 个月随访期内除肝郁外亦常见脾虚证型, 因此, 脾虚在患者 ERCP 术后的病理状态中亦占据重要地位。本研究所用的利胆消石合剂化裁于疏肝代表方四逆散和健脾代表方四君子汤, 除疏肝利胆外兼具健脾益气之效。方中柴胡、枳壳、白芍为君, 疏肝理气, 体用兼顾; 党参、茯苓、麸炒白术为臣, 益气健脾, 培补中土; 佐以郁金、茵陈、金钱草、海金沙、鸡内金和焦山楂, 清热利湿, 利胆消石。全方寒热并调、补泻兼施, 共奏疏肝利胆、健脾益气、消消化坚之效。胆宁片作为常见疏肝利胆类中成药, 既往研究显示其可预防胆总管结石复发^[10-11], 亦可降低 ERCP 碎石术后肠胆反流的发生^[12]。因此, 本研究选用胆宁片作为对照药物。

Oddi 括约肌受到各种神经和胃肠激素的调节, 是维持胆肠压差的重要部分^[13]。在正常状态下, 由于 Oddi 括约肌的屏障作用, 十二指肠液难以逆流进入胆道。在胆总管结石患者 ERCP 取石术后,

Oddi 括约肌的功能失调易诱发肠胆反流, 反流的肠液可造成胆道内细菌定植, 引发胆道感染, 不仅能够改变胆汁成分比例加速胆红素钙沉淀, 还可以影响胆汁酸的合成和代谢, 从而促进结石的复发^[14]。因此, 恢复 Oddi 括约肌的正常生理功能, 改善胆道动力, 减少肠胆反流事件的发生, 应是降低胆总管结石术后复发的重要手段。本研究通过胆道细菌感染建立 CBDS 豚鼠模型, 结果显示, 模型组豚鼠胆总管内可见黄色絮状固体, 胆囊中胆汁浑浊, 部分形成结石, 病理显示出现不同程度的胆管组织损伤和炎症表现。而利胆消石合剂各剂量组及胆宁片组均能减少胆道淤积及结石生成。在 Oddi 括约肌组织中, 胆宁片组和利胆消石合剂中、高剂量组相较于利胆消石低剂量组, 表现出更好的减轻组织损伤及抗炎作用。在胆管组织中, 仅利胆消石高剂量组表现出较好的抗炎作用。总之, 胆宁片和利胆消石合剂均能一定程度上减轻胆道的炎症反应及组织损伤, 保护胆道组织。

胆总管结石术后患者常出现的胆道动力学障碍现象, 不仅涉及 Oddi 括约肌结构功能障碍, 还与胃肠激素的异常分泌密切相关^[15]。胃肠激素作为调节消化道运动的核心介质, 其动态变化在术后胆道动力紊乱中起重要介导作用。胃肠激素能够调节胆道平滑肌的收缩舒张, 其中 MTL、CCK 对胆道运动和胆汁排泄主要起促进作用; VIP、SS 对胆道运动主要起抑制作用, 能使 Oddi 括约肌舒张, 并可拮抗兴奋型胃肠激素的调节作用^[16-17]。研究结果显示, 模型组豚鼠的血清胃肠激素出现分泌紊乱状态, 而利胆消石合剂各剂量组均能够升高 CBDS 模型豚鼠血清 MTL、CCK 含量, 降低 VIP、SS 含量。其中利胆消石中、高剂量组在降低 VIP 含量方面优于利胆消石低剂量组, 在升高 MTL、CCK 含量及降低 SS 含量方面优于胆宁片组。因此, 利胆消石合剂或可通过调节胃肠激素水平, 改善胆道动力, 促进胆汁排泄, 减少胆汁淤积和肠胆反流, 从而减少 CBDS 复发。

胆道动力学离不开与 Oddi 括约肌功能相关机制, 其收缩和舒张运动主要受到 ICLC 的起搏调控^[3]。c-kit 免疫荧光技术可用来鉴定 Cajal 间质细胞^[18]。ICLC 作为胆道系统中与 Cajal 间质细胞相似的细胞, 同样可以通过免疫荧光染色的方法鉴定其数量。研究结果显示, 模型组 Oddi 括约肌、胆管组织中 ICLC 数量均显著低于对照组, 说明胆道感染可减少胆道组织中 ICLC 的数量。而利胆消石合

剂各剂量组均能够提高 CBDS 模型豚鼠 Oddi 括约肌、胆管组织中 ICLC 的数量,且利胆消石中剂量在促进 ICLC 数量增加方面优于胆宁片和利胆消石低剂量。ICLC 数量的维持离不开 c-kit/SCF 信号通路的调控^[4]。本研究结果发现,模型组 Oddi 括约肌组织中 c-kit、SCF 水平均降低,说明造模后 c-kit、SCF 蛋白表达受抑制。而各药物干预组 c-kit、SCF 蛋白水平均升高,利胆消石中剂量对 c-kit 蛋白水平的促进作用优于低剂量,但在升高 SCF 蛋白方面不如低剂量,利胆消石高剂量与低剂量组相比未表现出明显的差异。利胆消石低、中剂量组在升高 c-kit、SCF 蛋白水平方面优于胆宁片组,说明利胆消石合剂可以促进 c-kit、SCF 蛋白的表达,效果优于胆宁片,与利胆消石各剂量组 ICLC 数量增加的研究结果相符。

综上所述,利胆消石合剂对 CBDS 模型豚鼠的胃肠激素、ICLC 数量及 c-kit/SCF 信号通路具有一定的调节作用,从而改善胆道动力以降低胆总管结石复发。但本实验未能直接检测 Oddi 括约肌的收缩功能,且造模方法仅能模拟肠胆反流导致胆道菌群定植感染的状态,无法完全模拟内镜下乳头括约肌切开术导致 Oddi 括约肌切开而结构功能受损的情况,对临床实际情况模拟仍有不足,且动物实验中仅对模型进行了短期干预,未检测长期效果,下一步将继续完善造模及实验方法,进一步探讨利胆消石合剂降低 CBDS 复发的可能作用机制。

参考文献

- [1]李思萱,田雪丽,黄永辉.胆总管结石内镜治疗的远期并发症与 Oddi 括约肌功能保护的研究进展[J].中国微创外科杂志,2022,22(7):575-579.
- [2]李杨,石承先.胃肠激素对胆道运动的调节[J].贵州医药,2007,31(11):1036-1038.
- [3]邓天麟. Cajal 样间质细胞调控 Oddi 括约肌运动及在 Oddi 括约肌功能障碍发病中的作用[D]. 沈阳:中国医科大学,2019.
- [4]GORAN R, DINA R, ALEKSANDRA V. Development of interstitial cells of Cajal in the human digestive tract as the result of reciprocal induction of mesenchymal and neural crest cells[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(2): 778-785.
- [5]肖丽君,甘苡榕,刘春丽,等. 大黄灵仙方对胆固醇结石豚鼠模型胆囊 Cajal 间质细胞中 scf/c-kit 信号通路的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(2): 376-382.
- [6]中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 胆石症中西医结合诊疗专家共识(2025 年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2025, 33(3): 242-251.
- [7]王惠临. ERCP 术后胆总管结石复发患者特征及利胆消石合剂预防复发的临床研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2022.
- [8]卞昊宇,韩冉,段学光,等. 运用复发型胆总管结石患者胆道细菌建立豚鼠胆石症模型[J]. 河北医学, 2024, 30(1): 40-45.
- [9]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [10]王琦,闫婷婷,贾佳,等. 胆宁片对 ERCP 术后预防胆总管结石复发的临床疗效研究[J]. 湖北医药学院学报, 2019, 38(2): 158-159.
- [11]金雷,戴萌,李蜀豫,等. 药物预防经内镜逆行胰胆管造影术后结石复发的疗效观察[J]. 中国内镜杂志, 2018, 24(5): 78-84.
- [12]达选博,张诚,胡海,等. 胆宁片在 ERCP 碎石术后留置胆管支架患者中的应用效果观察[J]. 肝胆胰外科杂志, 2024, 36(7): 407-411.
- [13]王越琦,刘厚宝. 重视 Oddi 括约肌功能[J]. 肝胆胰外科杂志, 2017, 29(3): 181-183, 187.
- [14]卞昊宇,吕福琪,魏骄阳,等. 探究利胆消石合剂预防 ERCP 术后 CBDS 复发的作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27(5): 9-16.
- [15]劳万升,曹立瀛,刘四清,等. 金黄益胆颗粒对原发性胆管结石病人术后血浆胃肠激素水平的影响[J]. 肝胆外科杂志, 2011, 19(5): 357-360.
- [16]陈晓文,智发朝,曹东林. 胃动素及生长抑素在胆总管结石形成中作用探讨[J]. 中国民康医学, 2008, 20(1): 23, 25.
- [17]王纯巍,陆星华,陈元方. 胃肠激素对胆道和括约肌运动功能的调节[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 1996, 5(4): 242-244, 260.
- [18]HUANG Y, MEI F, YU B, et al. Distribution of the interstitial Cajal-like cells in the gallbladder and extrahepatic biliary duct of the guineapig[J]. Acta Histochem, 2009, 111(2): 157-165.

Effects of Lidan Xiaoshi Mixture (利胆消石合剂) on Serum Gastrointestinal Hormones and Cajal-Like Interstitial Cells in Bile Duct Tissue in Common Bile Duct Stones Model Guinea Pigs

LYU Fuqi¹, BIAN Haoyu², WEI Jiaoyang¹, ZHANG Liping¹

1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078; 2. Beijing Fengtai District Traditional Chinese Medicine Hospital

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism by which the Lidan Xiaoshi Mixture (利胆消石合剂, LXM) can prevent the recurrence of common bile duct stones (CBDS). **Methods** Eighty-five guinea pigs were randomly divided using a random number table, 10 in the control group, and 15 each in the model group, Danning Tablet (胆宁片, DT) group, LXM low-, middle-, and high-dose group. Except for the guinea pigs in the control group which underwent sham surgery, the CBDS models were established by common bile duct intubation and injection of biliary bacterial culture solution from patients with recurrent CBCS. On the day after modeling, the DT group was given DT suspension by gavage at a dose of 0.05 g/(100 g·d); the LXM low-, middle-, and high-dose groups were administered LXM granules by gavage at doses of 0.16, 0.32, and 0.64 g/(100 g·d) respectively; while the control group and the model group were given 1 ml/(100 g·d) of distilled water by gavage. All groups administrated via gavage for continuous 7 days. Samples were collected on the day after the last gavage to observe the conditions of the common bile duct and gallbladder in guinea pigs. The levels of motilin (MTL), vasoactive intestinal peptide (VIP), somatostatin (SS), and cholecystokinin (CCK) in serums of each group were detected by ELISA; the histopathology changes of the Oddi sphincter and bile duct tissues in each group were observed by HE staining; the number of Cajal-like interstitial cells (ICLC) in the Oddi sphincter and bile duct tissues was detected by immunofluorescence staining; the protein levels of tyrosine kinase receptor (c-kit) and stem cell factor (SCF) in the Oddi sphincter tissues were detected by Western Blot. **Results** In the model group, yellow flocculent solids were observed in the common bile duct of guinea pigs, and the bile in the gallbladder was turbid with partial stone formation. The increased damage and inflammatory reactions in the Oddi sphincter and bile duct tissues were observed in HE staining. In contrast, in the DT group and all LXM dose groups, the bile in the common bile duct and gallbladder was clear with no obvious precipitation; histopathology results showed no significant biliary tissue damage or inflammatory reaction in the LXM high-dose group. Compared with the control group, the model group exhibited decreased levels of MTL and CCK, increased levels of VIP and SS in serum, reduced number of ICLC in the Oddi sphincter and bile duct tissues, and decreased protein levels of c-kit and SCF in the Oddi sphincter tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, all LXM dose groups showed increased levels of MTL and CCK, decreased levels of VIP and SS in serum, an increased number of ICLC in the Oddi sphincter and bile duct tissues, and elevated protein levels of c-kit and SCF in the Oddi sphincter tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the DT group, the LXM middle-dose and high-dose groups had increased levels of MTL and CCK and lower levels of SS. The number of ICLC in the Oddi sphincter of the LXM middle-dose group and in the bile duct tissues of all LXM dose groups was increased; the protein levels of c-kit and SCF in the Oddi sphincter tissue of the LXM low-dose and middle-dose groups were elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** LXM may reduce cholestasis and stone formation by alleviating inflammatory reactions in biliary tissues, regulating gastrointestinal hormones, activating the c-kit/SCF signaling pathway, and increasing the number of ICLC, thereby reducing cholestasis and calculus formation, and preventing the recurrence of CBDS.

Keywords common bile duct stones; gastrointestinal hormones; Cajal-like interstitial cells; Lidan Xiaoshi Mixture (利胆消石合剂); tyrosine kinase receptor; stem cell factor; Oddi sphincter

(收稿日期: 2025-04-20; 修回日期: 2025-05-29)

[编辑: 邓媛]