几种药物治疗对胆汁β-葡萄糖醛酸苷酶活性的影响——临床实验研究

第一附属医院肝胆外科

杨可桢　黄志强　孟宪钧　尹国清

胆红素钙结石（原发性胆管结石）约占我国胆石症病人总数的50%。当前对胆红素钙结石形成的机理，多认为在胆道感染情况下，大肠杆菌所产生的β-葡萄糖醛酸苷酶（以下简称为β-G）增加，使水溶性的胆红素葡萄糖醛酸酯水解为游离的胆红素，与胆汁中的固有成份钙离子结合沉淀所致。因此，胆汁中的β-G活性与原发性胆管结石的发生和发展有重要的意义。

葡糖二酸-1，4-内酯是对β-G活性特异性的有力抑制物质。在正常人的尿和胆汁中，含有能抑制β-G的物质。Marsh[1]阐明葡萄糖醛酸在肝内代谢时，生成葡糖二酸从尿中排出，在酸性的实验条件下，葡糖二酸部份地转化成为葡糖二酸-1，4-内酯，这是尿中抑制β-G的物质。同样，葡糖二酸亦可自肝脏排至胆汁，正常胆汁中含有葡糖二酸-1，4-内酯，能抑制β-G的活性[2]，因而在防止胆红素沉淀上可能起一定的作用。

祖国医学以疏肝利胆，清热去湿治疗胆道感染有一定的效果。所用药物，不少与肝和葡萄糖醛酸代谢有关。本文报告葡糖二酸-1，4-内酯、葡萄糖醛酸内酯（肝泰乐）、常用的中药方剂、甘草流浸膏4种药物对胆汁中β-G的影响。

材料及研究方法

胆汁β-G活性测定：根据Fishman法，以酚酞葡糖苷酸为底物，分别在pH4.6（组织性）及pH7.0（细菌性）下保温，被β-G水解释放的酚酞，在碱性溶液中显色，用Specord UV Vis双光束吸收光谱分光光度计，波数17670cm^{-1}相当于波长565.93nm测定酚酞的消光度。此法可除开胆色素的干扰。结果以Fishman单位表示，即每小时释放1微克酚酞为1单位。胆汁按100毫升保温24小时计算。

药物：

D-葡糖二酸-1，4-内酯，由我校化学教研室合成，纯度98.56%，熔点90～92℃，$[\alpha]_D^{25}$ +41.7。

葡萄糖醛酸内酯，片剂，无锡第四制药厂出品，注射剂，2毫升相当于0.1克。

甘草流浸膏，甘草（Glycyrrhiza uralensis Fischer）产地内蒙卓县，含甘草酸7%以上。

中药方剂由以下药物组成：金钱草30克，茵陈15克，山栀9克，制大黄6克，枳实15克，

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.

玉香 9 克，莪术12克，丹参12克，赤芍15克，川牛夕12克，香附 9 克，木香 9 克，木通 9 克。浓缩至80毫升，一次服。

胆汁收集：经胆道手术带有T形引流管的病人，最早是手术后12～15天，经测定胆汁β-G保持在较稳定水平者，每天上午同一时间收集。胆汁收集器为一深色广口瓶，内盛冰屑及一收集试管，每次收集15～30分钟，胆汁立即离心、去渣、低温保存、检测。单次服药者，于服药后 2 、24、48小时各收集胆汁一次。

实验分组、

一、体外实验：

1．从一胆道感染病人手术后T形管引流的胆汁中，分离出一大肠杆菌菌枝，使用前将其接种于40毫升牛肉膏培养液中，38℃孵育24小时，以供试验。另从 4 例病人采集胆汁，按下列分组试验：

（1）大肠杆菌混悬液

（2）大肠杆菌液＋肝泰乐注射液（1：1）

（3）大肠杆菌液＋胆汁（1：1）

（4）胆汁

（5）大肠杆菌液＋肝泰乐注射液＋胆汁（1：1：1）

每组分 5 管，每管 4 毫升，38℃下孵育，每隔24小时每组取一管测定β-G活性。

2．药物对胆汁β-G的抑制作用：病人胆汁，加入不同浓度之药物，孵育后，观察其β-G活性改变。

二、服药试验：

1．一次服药，收集 2 、24、 48 小时胆汁，共有葡糖二酸－1， 4－内酯（3 克）21例，肝泰乐（0.6克）20例，中药（80毫升）18例，甘草流浸膏（15毫升）14例，共73例次。再根据服药前胆汁β-G活性分成二组，第一组为β-G 活性在 200单位以上；第二组为200单位以下。

2．长时间服药，共 4 例。

效果评定：计算试验治疗的效果，主要根据不同药物对抑制胆汁β-G的有效率和抑制率、

$$\text{有效率} = \frac{\text{有效例数}}{\text{治疗例数}} \times 100$$

$$\text{抑制率} = \frac{\text{服药前值} - \text{服药后值}}{\text{服药前值}} \times 100$$

各组治疗效果的比较，则根据其平均有效率和平均抑制率进行统计学处理。

结　　果

体外实验　我们在制备大肠杆菌β-G的实验过程中，发现在细菌培养基内加入肝泰乐，可刺激大肠杆菌产生多量的β-G，故进一步观察肝泰乐对大肠杆菌在胆汁中产生β-G的影响。4 例病人的胆汁培养均有大肠杆菌生长。所以原有的β-G活性水平不同。结果单纯大肠杆菌培养产生的β-G总量低，或随菌株的老化而β-G 有下降的趋向；但在加入肝泰乐的培养基，则β-G产量随培养时间延长而显著增加，平均升高15.1倍。加入大肠杆菌的胆汁比单纯胆汁

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.

培养，β-G总量只平均增加1.17倍；而在加入大肠杆菌的胆汁中再加入肝泰乐时，β-G总量比大肠杆菌加胆汁者，平均增加6.74倍，其中以在pH7.0时β-G活性的增加最为显著（表1）。此结果提示肝泰乐本身并无抑制β-G的作用，反而有刺激大肠杆菌产生β-G的效应。

表1　大肠杆菌经5天培养产生的β-G总量(pH7)

培养物	例1	例2	例3	例4	平均值
E.Coli	29.38	0	23.27	0	3.16
E.Coli+G-L	683.84	440.43	420.13	720.20	66.3
胆汁	7.58	496.43	25.93	1055.16	606.20
E.Coli+胆汁	62.68	868.44	65.83	591.19	396.64
E.Coli+G-L+胆汁	———	962.87	309.31	12015.06	4428.08

4例病人的胆汁培养物有大肠杆菌生长　G-L：葡萄糖醛酸内酯　E.Coli：大肠杆菌

药物对胆汁β-G活性的直接作用　葡糖二酸-1，4-内酯对胆汁的β-G活性有极明显的抑制作用，并且其抑制强度随药物浓度而增加；相反的，肝泰乐呈明显的增强作用（图1、2）。其他中药方剂及甘草流浸膏对胆汁β-G只有轻微的抑制作用。

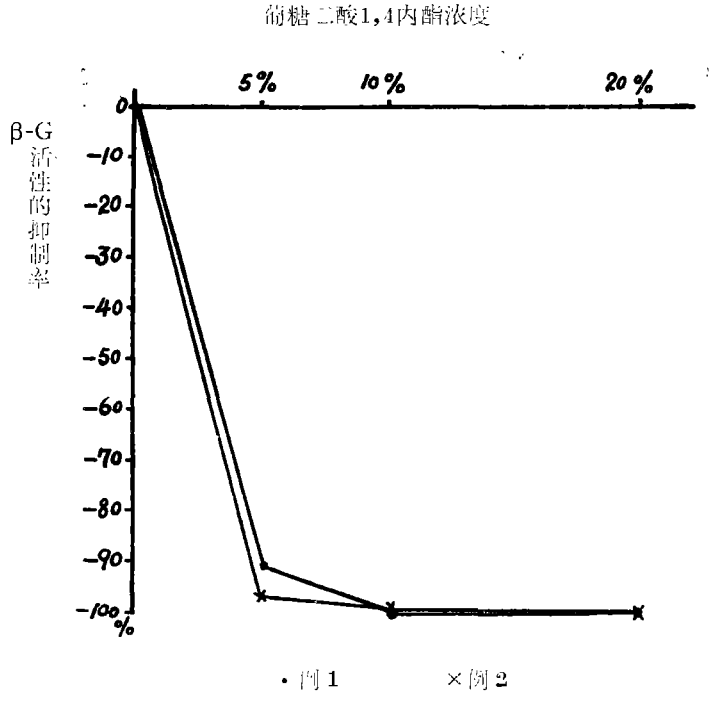


图1　试管内不同浓度葡糖二酸1,4内酯对胆汁β-G活性的抑制率

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.

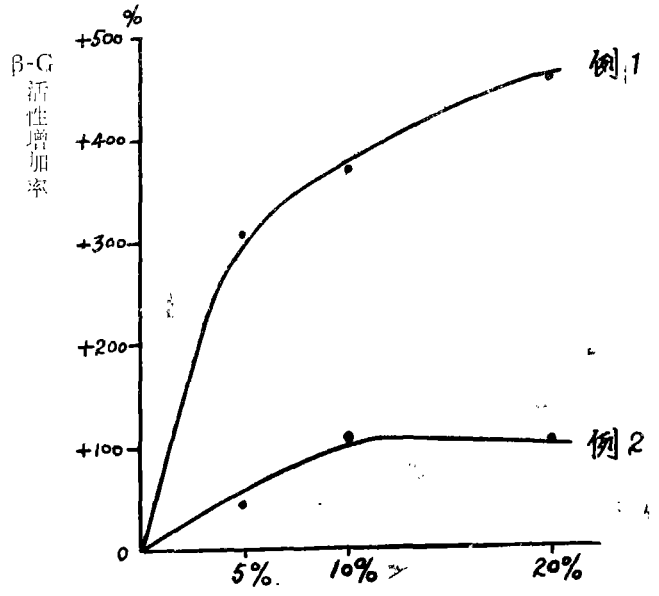


图2　试管内不同浓度肝泰乐（片剂）对胆汁β-G活性的增强作用

一次服药　根据服药前胆汁β-G的活性，大于200单位/小时者65例，其中有48例（73.85%）为原发性胆管结石病人，17例（26.15%）为原发性胆管结石以外的其他类型胆道疾患病人，口服药物后2小时，部份病人的胆汁β-G降低，有效率最高者为肝泰乐组（18/20），次为甘草流浸膏与二酸-1,4-内酯组（12/14），最低者为中药组（7/15）；4组间的比较，肝泰乐组的有效率有明显的差别（$P<0.05$），说明其抑制β-G的效果明显优于中药组，而与其他两组的比较，亦有显著差别（$P<0.05$）；但在服药后24和48小时胆汁β-G活性测定，各组间便无明显的差别（表2）；若单就pH7.0孵育所测定的结果，则在服药后24小时肝泰乐抑制胆汁β-G的效果比其他组有明显差别（$P<0.05$）（表3），但在pH4.6孵育所得的结果，各组间并无明显的差别。从以上的结果看来，肝泰乐、甘草流浸膏、葡糖二酸-1,4-内酯口服后，对胆汁的β-G活性均有一定的抑制作用，而本实验中所用的中药方剂的效果较低些。至于对酶的活性抑制的程度，亦即是抑制率方面，由于不同病例中所测得的数值的幅度范围很大，故各组间的总平均抑制率未见显著差别。服药后2小时平均抑制率54～71%（表4）。

表2　四种药物对胆汁β-G抑制的总有效率

服药时间	2小时	24小时	48小时
葡糖二酸-1,4-内酯	68.75（11/16）	50.0（8/16）	42.86（6/14）
中药	46.67（7/15）	46.67（7/15）	60.0（9/16）
甘草流浸膏	85.71（12/14）	71.43（10/14）	72.73（8/11）
肝泰乐	90.0（18/20）	65.0（13/20）	73.68（14/19）
P值	$P<0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$

（　）内为总例数和有效例数

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.

表3 口服药物对pH 7 时β-G抑制的有效率

服药时间	2 小时	24 小时	48 小时
葡糖二酸-1,4-内酯(6)*	83.33	66.67	66.67
中药(7)	42.86	28.57	42.86
甘草流浸膏 (6)	83.33	66.67	80.0
肝泰乐 (10)	90.0	90.0	88.89
	P>0.05	P<0.05	P>0.05

*( )病例数

表4 服药后2小时胆汁β-G的平均抑制率

药物	病例数	pH4.6	pH7.0
葡糖二酸-1,4-内酯	21	53.94	65.16
肝泰乐	20	49.98	64.81
中药	18	57.55	57.56
甘草流浸膏	14	54.73	71.72

在第二组病人，服药前胆汁β-G为200单位以下，此种病人多为胆道感染较轻，服药后，以甘草流浸膏组显效较好，在24小时，对抑制胆汁β-G的总有效率较其他组为高（P<0.05），而主要是作用于pH7.0孵育时的结果，对在pH4.6者各组间无明显别差。

从以上两组病人服药后的结果，主要表现为对pH7.0孵育时β-G活性的抑制，而对pH4.6者的作用不够显著。pH7.0是细菌β-G的最合适的pH范围，代表大肠杆菌β-G；而pH4.6的数值则表示来自肝组织的β-G。

另4例病人连续服药5天，服药前、服药过程中及停药后，每天测定胆汁的β-G活性。由于例数少，不宜作比较，但在个别病例中，显示明显的效果。例如一先天性胆管囊肿患者，经胆管空肠吻合及胆管引流，在服用中药过程中，pH7.0下测得的β-G活性有明显降低。但在其余的病例，均为原发性胆管结石患者，在用葡糖二酸-1,4-内酯或肝泰乐的治疗下，未见胆汁β-G活性呈有规律性改变。

讨论

本实验显示葡糖二酸-1，4-内酯对β-G活性在试管内有强烈的抑制作用，而肝泰乐则有使大肠杆菌增加产生β-G的作用。单次服药试验，中药方剂、葡糖二酸-1，4-内酯、甘草流浸膏、肝泰乐对服药后2、24小时胆汁β-G活性有一定的抑制作用，但以后二者较为明显，本试验所用的中药方剂较差。

肝泰乐即葡糖醛酸-γ-内酯，在水溶液中，一部分又加水成为葡糖醛酸，两者成平衡状态；在正常尿液中含有在酸性条件下抑制β-G活性的物质，它是D-葡糖醛酸内酯在体内代谢产物D-葡糖二酸，后者在酸性条件下转化成D-葡糖二酸-1，4-内酯。D-葡糖醛酸内酯的C_1位还原基因氧化后，便可直接生成D-葡糖二酸。口服D-葡糖醛酸内酯可使24小时内尿中抑制β-G的作用极显著增加，48小时后回复至服药前水平；口服D-葡糖醛酸内酯后1小

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.

时，血清中β-G活性也呈明显降低。正常人每天从尿中约排出10毫克的D-葡糖二酸。在正常胆汁内亦存在D-葡糖二酸及D-葡糖二酸-1，4-内酯[2][3]。在肝内，D-葡糖醛酸内酯经D-葡糖醛酸内酯-NAD氧化还原酶作用，氧化成D-葡糖二酸-(1→4)，(6→3)-二内酯，然后再水解成D-葡糖二酸-1,4-内酯及D-葡糖二酸-6，3-内酯[4]。口服肝泰乐后，可能是通过这个途径对胆汁β-G活性起作用。在试管内，肝泰乐可水解成葡萄糖醛酸，而葡萄糖醛酸可以类似薄荷醇葡糖醛铵的作用，能促使大肠杆菌产生β-G。

甘草流浸膏含7%以上的甘草酸，甘草酸的盐即甘草甜素，水解后可产生二分子的葡萄糖醛酸及一分子的甘草次酸。口服葡糖醛酸并不增强对尿中β-G活性的抑制作用，可能与在胃肠道的吸收的关系。但在甘草流浸膏的制作过程中，由于水解、加热、浓缩等过程，可能使葡萄糖醛酸脱水生成葡糖醛酸内酯。同时，甘草甜素经胃肠道吸收后，可在体内代谢分解出葡糖醛酸。灌流实验证明甘草甜素经肝脏灌流，可分解出葡糖醛酸；甘草甜素加甲醇加β-G在37℃下水解，可出现结合型葡糖醛酸；在β-G的作用下，可水解成为2分子葡糖醛酸和1分子甘草次酸；并且当甘草甜素浓度增高（$10^{-5}\times4.5$M）时，则能强烈地抑制β-G对酚酞葡糖醛酸结合物的分解，此种作用是非竞争性的[5]。甘草同时有促进肝脏恢复的作用。因此，在中西医结合治疗和预防胆石症中，如何更好地应用甘草及其制剂以及对其作用机理的探讨，有一定的实际意义。

D—葡糖二酸-1，4-内酯在体外实验中是对β-G的最强烈的抑制剂，但在口服试验中，服药后2小时胆汁的平均抑制率为53.94%及65.10%，并不比其他几种药物的抑制作用更为强烈。Matsushiro[2]的报告平均抑制率为72.6%。在个别病人一次口服药量为2～3克时，感有上腹部不适、恶心。因为此药在胃肠道内的吸收，在体内的代谢和排泄途径，尚很少了解，故在中西医结合治疗胆道疾病方面的作用，缺乏足够的论据，有待于研究。

对胆道疾病的药物治疗效果是与胆道疾病本身的病变有密切关系，所以必需彻底处理肝脏及胆道的病灶，才能得到较好的效果。胆汁中β-G活性升高往往是胆道内细菌感染和肝内炎症、组织破坏、化脓病灶的表现，应该根据病情，采中西结合药物及外科手术的综合处理。

摘　要

中西医结合治疗胆道感染，一般以疏肝利胆、清热去湿为主，在临床上收到一定效果。本文是根据临床实验研究的结果，比较常用的中药方剂、葡糖二酸-1，4-内酯、葡糖醛酸内酯、甘草流浸膏对手术后胆汁中β-葡糖醛酸苷酶活性的影响。结果发现，在体外试验，葡糖二酸-1，4-内酯对β-葡糖醛酸苷酶活性抑制最显著，而葡糖醛酸内酯（肝泰乐）则有促进作用，其他二者作用不明显。口服后2小时，胆汁中β-葡糖醛酸苷酶均有一定程度的抑制，其中以肝泰乐和甘草流浸膏的作用较明显，葡糖二酸-1，4-内酯次之，本实验中所用之中药方剂较弱。但在长时间服用中药的病例，亦见对胆汁中β-葡糖醛酸苷酶活性的明显抑制。文中讨论肝泰乐和甘草流浸膏的作用，及其在中西医结合治疗胆道感染的意义。

参 考 文 献

1. Marsh CA: Metabolism of D-glucurolactone in Mammalian system. Identification of D-glucaric acid as a normal constituent of urine. Biochem J 86:77,1963

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.

2. Takaski Matsushiro: Identification of Glucaro-1, 4-lactone in Bile as a Factor Responsible for Inhibitory Effect of Bile on Bacterial β-glucuronidase. Tohoku J Exp Med 85:330, 1965

3. Iwao Yamaguchi, et al:Quantitative Determination of D-Glucaric Acid in Bile in Relation to Inhibitory Effect of Bile on Bacterial β-glucuronidase. Tohoku J Exp Med 87:123,1965

4. Marsh CA: Metabolism of D-glucuronolactone in Mammalian System:2.Conversion of D-glucuronolactone into D-glucaric acid by tissue preparatson. Biochem J 87:82.1962

5. 张宝恒：甘草药理作用研究的进展。药学学报 10(11):688, 1963

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.