

牛体外牛黄发生器内成黄机制的研究

李建基, 闫振贵, 刘翠艳, 刘俊栋, 李 强

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 利用 5 头健康黄牛同时施行了牛体外牛黄发生器内培植牛黄手术和肝脏内胆管插管手术, 以探讨牛黄的形成机理。研究表明: 在牛黄菌种的作用下, 胆汁的理化特性首先在肝内胆管发生改变, 转变为成黄胆汁; 胆汁进入胆囊后, 黏蛋白含量和细菌的数量迅速增加, 结果导致胆汁的黏度升高, 胆酸含量和 pH 值下降, 这加速了牛黄小颗粒的形成; 在牛黄发生器内, 胆汁的黏度和 pH 值下降, 这促进牛黄小颗粒的沉降、聚集和附着, 从而减少了牛黄的丢失, 提高了牛黄产量。牛的体重大, 分泌的胆汁多, 牛黄产量高。

关键词: 牛; 牛黄; 培植; 体外; 牛黄发生器(人工胆囊)

中图分类号: S857.12

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)01-0050-05

牛体外牛黄发生器内培植牛黄技术^[1]是在总结动物模拟胆囊内快速培植牛黄技术^[2,3]的基础上研究成功的又一培植牛黄新技术, 它具有手术操作简便、取黄不需要再做手术、一头牛可以长期植黄和牛黄产量高等优点。为了进一步完善和发展该植黄新技术, 我们开展了牛体外牛黄发生器内牛黄形成机制的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康黄牛 5 头, 均为母牛, 年龄 3~5 岁。饲喂干花生秧和玉米秸, 精料为 70% 玉米、20% 麸皮和 10% 黄豆饼, 每天 1 kg/头。

1.1.2 仪器与试剂 日立 180-80 型原子吸收分光光度计(日本), 乌贝路德黏度计(山东大学), 半自动生化分析仪(荷兰), 电解质分析仪(美国), F-820 血球计数仪(日本)。

胆红素标准品, 美国 Sigam Chem. Co. 产; 胆酸标准品, 中国药品生物制品检定所产; 对氨基苯磺酸、亚硝酸钠、糠醛等一般化学试剂均为国产、分析纯; 牛黄菌种为血清学 O₈、O₁₄₇ 大肠杆菌, 菌种液中含菌量为 2.5×10^8 个/mL。

1.1.3 体外牛黄发生器由本课题组自制。

1.2 方法

1.2.1 植黄方法 采用外科手术的方法, 对实验牛

施行胆总管结扎术、十二指肠插管术和胆囊插管术。将十二指肠插管和胆囊插管经原手术切口旁的小切口引至体外并分别与体外牛黄发生器的导管接头相连接, 使胆汁由胆囊流入牛黄发生器, 成黄后的胆汁经十二指肠插管流入肠腔, 参与消化活动。经胆总管施行肝内胆管插管术, 以采集肝内胆汁。术后第 7 d 牛黄发生器内接种牛黄菌种。

1.2.2 胆汁主要成分和物理性状的测定 在术中和术后 3、7、15、30、60、90、120 d 分别采集胆汁, 测定胆红素含量(重氮试剂法)、胆酸含量(糠醛显色法)、黏蛋白含量(以酪氨酸计, 酚试剂法)、镁离子含量(达旦黄比色法)、钙离子含量和 pH 值(电解质分析仪法)、胆汁黏度(黏度计法)。

1.2.3 胆汁细菌的计数、分离、鉴定 利用普通琼脂平皿培养基, 对术中和术后的胆汁分别进行细菌的计数、分离和生化鉴定。

1.2.4 肝脏组织学观察 术前和术后 60 d 分别用肝脏穿刺器无菌采集肝脏组织、手术采集胆囊组织, 置入 10% 福尔马林溶液和 2.5% 戊二醛溶液中进行固定, 然后制作成组织切片, 分别在光镜和电镜下进行观察。

1.2.5 胆汁分泌量的测定 在术后 3、4、5、6、7、8、13、14、30、60、90 d 分别测定牛 24 h 的胆汁分泌量, 观测其与体重、牛黄产量的关系。

1.2.6 血液理化指标的测定 在术前和术后 3、7、15、30、60、90、120 d 分别采集静脉血, 进行红、白细胞计数及血红蛋白含量、谷丙转氨酶活性、胆红素含量、黄疸指数、麝香草酚浊度、钙镁离子含量的测定。

收稿日期: 2003-02-12

基金项目: 山东省教委资助项目(531-32126)

作者简介: 李建基(1960-), 男, 山东省蓬莱人, 教授, 从事人工培植牛黄和临床兽医学方面的研究与教学。

2 结果

2.1 植黄牛胆汁主要成分的变化

在培植牛黄期间,随着时间的延长,胆汁中的胆红素含量逐渐下降,其中肝内胆汁下降的幅度最小,牛黄发生器内的下降最明显。胆汁胆酸和 pH 值也有

相似的变化,但胆汁黏蛋白含量的变化正相反,呈现逐渐升高的趋势。由肝脏至牛黄发生器,胆汁中胆红素、胆酸、钙离子、镁离子的含量和 pH 值逐渐下降,胆囊胆汁黏蛋白的含量明显高于肝内胆汁和发生器内的胆汁(表 1-3)。

表 1 植黄牛术后肝脏胆管内胆汁的主要成分含量($\bar{X} \pm SD, n=5$)

Table 1 Changes of the ingredients in the liver bile from the cattle with CB

成分 Ingredients	1 d	3 d	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
总胆红素 Bilirubin(mg/dl)	12.2 ± 1.3	18.7 ± 2.2**	18.4 ± 1.0**	16.3 ± 1.5*	14.8 ± 1.2	10.4 ± 1.5	9.8 ± 1.4*	9.6 ± 0.8*
胆酸 Cholic acid(%)	4.091 ± 0.28	3.62 ± 0.24	2.86 ± 0.31	2.35 ± 0.24*	2.24 ± 0.42*	2.28 ± 0.33*	2.15 ± 0.49*	2.25 ± 0.16*
黏蛋白 Mucin(mg/dl)	158 ± 51	179 ± 48	209 ± 38	237 ± 56*	252 ± 19*	282 ± 48*	278 ± 39*	268 ± 37*
[Ca ²⁺](mg/dl)	11.8 ± 0.5	10.3 ± 0.3	9.6 ± 0.2	9.8 ± 0.2	9.6 ± 0.3	8.2 ± 0.2*	8.3 ± 0.3*	8.5 ± 0.2*
[Mg ²⁺](mg/dl)	5.2 ± 0.3	5.0 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.1 ± 0.2*	3.8 ± 0.2*	4.3 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.2 ± 0.3
pH value	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	6.9 ± 0.1	6.9 ± 0.1	6.9 ± 0.1

同一行中标有*者,表示 $P < 0.05$; 标有**者,表示 $P < 0.01$; CB: 牛黄,下同。

With* in the same line were significantly different at 5% level, while with** at 1% level. CB: Calculus bovis. The same below.

表 2 植黄牛术后胆囊内胆汁的主要成分含量($\bar{X} \pm SD, n=5$)

Table 2 Changes of the ingredients in the gallbladder bile from the cattle with CB

成分 Ingredients	1 d	3 d	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
总胆红素 Bilirubin(mg/dl)	9.6 ± 1.6	16.4 ± 1.0**	12.2 ± 1.5**	9.8 ± 1.1	8.6 ± 1.6	6.9 ± 1.8*	6.8 ± 2.0*	6.0 ± 1.6*
胆酸 Cholic acid(%)	4.05 ± 0.26	4.01 ± 0.22	3.10 ± 0.19	2.61 ± 0.33*	2.40 ± 0.22*	2.38 ± 0.23*	2.35 ± 0.45*	2.25 ± 0.36*
黏蛋白 Mucin(mg/dl)	194 ± 51	228 ± 48	245 ± 38	286 ± 56*	315 ± 49*	354 ± 68*	356 ± 69*	335 ± 87*
[Ca ²⁺](mg/dl)	11.6 ± 0.6	9.8 ± 0.3	8.3 ± 0.4	9.6 ± 0.2	9.9 ± 0.4	9.6 ± 0.3	8.0 ± 0.4*	7.8 ± 0.5*
[Mg ²⁺](mg/dl)	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	3.8 ± 0.3*	4.0 ± 0.2	3.8 ± 0.3*
pH value	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1	6.9 ± 0.1	6.8 ± 0.1*	6.8 ± 0.1*	6.7 ± 0.1*	6.8 ± 0.1*

表 3 植黄牛术后牛黄发生器内胆汁的主要成分含量($\bar{X} \pm SD, n=5$)

Table 3 Changes of the ingredients in the artificial gallbladder bile from the cattle with CB

成分 Ingredients	3 d	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
总胆红素 Bilirubin(mg/dl)	14.3 ± 2.2	8.1 ± 1.1*	3.7 ± 0.8**	3.2 ± 1.8**	2.4 ± 1.0**	2.1 ± 0.8**	2.6 ± 0.6**
胆酸 Cholic acid(%)	3.39 ± 0.17	2.51 ± 0.11	2.16 ± 0.25*	2.19 ± 0.16*	2.13 ± 0.1*	2.11 ± 0.24*	2.19 ± 0.21*
黏蛋白 Mucin(mg/dl)	126 ± 43	176 ± 50	216 ± 48	224 ± 63*	278 ± 37*	298 ± 49*	283 ± 44*
[Ca ²⁺](mg/dl)	9.6 ± 0.3	8.3 ± 0.2	7.9 ± 0.3*	8.5 ± 0.2	8.8 ± 0.4	8.0 ± 0.2*	8.2 ± 0.2*
[Mg ²⁺](mg/dl)	4.6 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2*	3.9 ± 0.2	3.2 ± 0.2*
pH value	7.0 ± 0.2	6.9 ± 0.1	6.8 ± 0.1	6.7 ± 0.2*	6.7 ± 0.1*	6.6 ± 0.2*	6.6 ± 0.1*

2.2 植黄牛术后胆汁黏度的变化

与术中采集的胆汁相比,植黄期间胆囊胆汁的黏度明显升高,且高于肝内胆汁和发生器内的胆汁;但肝内胆汁和发生器内胆汁的黏度在植黄期间变化不明显(表4)。

2.3 植黄牛术后胆汁中细菌计数的变化

细菌生化试验表明,术后3~7d,胆汁中的细菌

为大肠杆菌、肠杆菌、变形杆菌、葡萄球菌;自术后第7d接种牛黄菌种后,胆汁中的细菌主要为大肠杆菌。术后30d,当牛黄发生器内的温度在20℃、30℃和35℃时,其细菌计数分别为 3.38×10^9 、 4.34×10^9 、 8.51×10^9 个/mL($n=12$)。自肝脏至发生器,胆汁中的细菌数量逐渐增加,但每一部位胆汁中的细菌数量在植黄期间无明显改变(表5)。

表4 植黄牛术后的胆汁黏度($\bar{X} \pm SD, n=5$)

胆汁 Bile	1 d	3 d	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
肝内胆汁 Liver bile	1.21 ± 0.17	1.22 ± 0.18	1.22 ± 0.24	1.24 ± 0.26	1.23 ± 0.23	1.26 ± 0.33	1.22 ± 0.18	1.24 ± 0.20
胆囊内胆汁 Gallbladder bile	1.39 ± 0.12	1.30 ± 0.15	1.40 ± 0.12	1.50 ± 0.16*	1.70 ± 0.15*	1.58 ± 0.17*	1.60 ± 0.22*	1.68 ± 0.20*
AG 内胆汁 AG bile	1.38 ± 0.15	1.28 ± 0.20	1.38 ± 0.16	1.28 ± 0.21	1.44 ± 0.20	1.36 ± 0.16	1.38 ± 0.20	1.40 ± 0.16

表5 植黄牛胆汁中细菌计数的结果($n=5$)

胆汁 Bile	术前 Before operation	3 d	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
肝内胆汁 Liver bile	0	5.1×10^3	2.1×10^4	1.8×10^6	5.8×10^6	5.6×10^6	4.1×10^6	3.3×10^6
胆囊内胆汁 Gallbladder bile	0	1.2×10^5	3.1×10^6	1.6×10^8	2.4×10^8	9.1×10^7	1.6×10^8	1.8×10^8
EAG 胆汁 EAG bile	0	9.2×10^6	4.3×10^7	1.5×10^9	5.1×10^9	3.0×10^9	4.6×10^9	5.0×10^9

2.4 植黄牛血液理化指标的变化

在植黄期间,血液红细胞计数、血红蛋白含量、红细胞压积均呈下降的趋势,白细胞计数、血清胆红素含量和麝香草酚浊度无明显变化,谷草转氨酶的活性微升高,黄疸指数 $[Ca^{2+}]$ 、 $[Mg^{2+}]$ 均呈下降的趋势。

2.5 植黄牛肝胆组织学的变化

在光镜下见肝内胆管扩张、壁变厚,其周围有多量的炎性细胞浸润和结缔组织增生(主要为淋巴细胞和成纤维组织);管腔内有均质红染的物质(胆红素钙沉淀);肝窦扩张。肝细胞糖原含量减少,胆囊壁黏膜固有层黏液腺增生,粘蛋白分泌旺盛;间质中有结缔组织增生和炎性细胞浸润。电镜下见微胆管扩张,其微绒毛变粗大;肝细胞的间隙增大,有的肝细胞中出现脂肪滴;滑面内质网增多,池变宽,有的滑面内质网呈泡状;线粒体肿大、降解或即将降解,外膜不完整。

2.6 植黄牛的胆汁分泌量及其与牛黄产量的关系

胆汁分泌量与植黄牛的体重成正比。自术后第15d开始,昼夜胆汁分泌量(V)与体重(W)的关系为 $V = 0.28W + 7.04$; V —L/24 h; W —kg。术后1~14d胆汁分泌量是逐渐增加的趋势,但15d以后,其分泌量呈相对稳定的状态。牛黄产量与胆汁分泌量也成正比,二者的关系为 $Q = 1.7V - 1.71$, Q —牛黄产量(g), V —每头牛24h的胆汁分泌量(mL)。

3 讨论与小结

在植黄期间胆汁胆红素的含量下降与牛黄的形成有关。胆汁中的 O_8 和 O_{147} 大肠杆菌能产生 β -葡萄糖苷酶(β -G酶),该酶降解胆汁中的结合胆红素并生成游离胆红素,后者与钙、镁离子结合生成胆红素钙盐沉淀。牛黄的胆红素含量被国家定为评价牛黄质量的主要标准,优质牛黄的胆红素含量为

35%以上。本实验中胆汁的胆红素含量为肝内胆汁>胆囊内胆汁>牛黄发生器内胆汁;钙、镁离子也有相似的变化。胆汁中细菌含量的变化却相反,牛黄发生器内胆汁的细菌含量明显高于胆囊胆汁和肝内胆汁。这表明胆汁中的结合胆红素在 β -G酶的作用下,在流运过程中逐渐被降解并与胆汁中的钙、镁离子结合,生成胆红素钙盐,即牛黄的主要成分。肝脏组织切片显示在微胆管内有牛黄样物质存在,胆囊内仅有少量牛黄生成。因此,牛黄发生器是牛黄形成、成型的主要场所,随着牛黄的形成,胆汁胆红素逐渐下降。

胆酸含量减少有利于牛黄的形成。在生理情况下机体存在胆酸的肠肝循环,机体对胆酸进行重复利用。如果回到肝脏的胆酸量减少到20%以上,机体合成胆酸的能力不能维持胆酸池的恒定。在培植牛黄期间,一部分胆酸参与牛黄的形成,成为牛黄的重要成分,一部分胆酸被细菌降解;结果导致胆汁胆酸的含量下降。胆汁中的胆酸对游离胆红素(UCB)有助溶作用,抑制UCB与钙、镁离子结合;胆酸本身尚可与钙离子结合,抑制胆红素钙盐的形成。在植黄期间胆汁胆酸的含量减少,有利于UCB与钙、镁离子结合,促进牛黄的形成。但胆囊胆汁的胆酸含量高于胆管内的胆汁,与胆囊对胆汁的浓缩有关;发生器内的胆汁胆酸含量下降,与胆酸参与牛黄的形成和被细菌降解有关。

牛黄发生器内牛黄成型是牛黄小颗粒被黏附、吸附的结果。牛黄小颗粒是胆红素钙盐与黏蛋白络合形成的胆红素钙盐黏蛋白高分子多聚物复合体^[4]。植黄期间胆汁的黏蛋白含量升高,这与胆管和胆囊的感染有关。胆管和胆囊感染后,其黏液腺增生、分泌能力增强,以胆囊的增生为最明显、分泌量最多,致胆汁的黏度升高。粘蛋白分子能进行疏水结合的位点中含有酸性基团,在酸性环境和溶液的离子强度增强时,其疏水结合的能力增强。黏蛋白进入牛黄发生器后,它作为一种重要的凝集赋形因子,首先形成丝网框架,然后借助其无机离子的静电效应和高分子有机物间的桥联作用,与胆红素钙盐、胆酸、胆固醇等物质络合,形成牛黄小颗粒。胆汁呈酸性,一方面使细菌性 β -G酶的活性升高,UCB的溶解度降低;另一方面使黏蛋白的静电效应和疏水结合能力增强,从而促进了牛黄小颗粒的形成和牛黄在牛黄床上的附着。另外,细菌表面有一

层自身分泌的阴离子糖蛋白,也具有与胆红素钙盐、胆酸、胆固醇等物质络合的能力^[5]。全棉材料的牛黄床,棉纤维分子中的羟基基团与UCB的羧基和黏蛋白的酸性基团有较强的静电引力,有利于牛黄颗粒的附着。

胆汁黏度降低,有利于牛黄颗粒沉降、聚集和附着。牛黄发生器内胆汁的黏度明显低于胆囊胆汁,这可能与细菌含量较高有关。大肠杆菌在活动过程中一方面产酸,使胆汁pH值下降,酸性环境引起胆汁中蛋白质的沉降;另一方面,它利用胆汁中的蛋白质、碳水化合物等大分子物质,结果导致胆汁的黏度下降。若胆汁黏度高,新形成的牛黄小颗粒在胆汁中悬浮,不易沉降和黏附。低黏度的胆汁,牛黄小颗粒易发生沉淀、附着和聚集,并形成大的牛黄团块。牛黄小颗粒快速形成大团块后,不易因胆汁流动而被丢失。这正是该培植牛黄技术牛黄产量高的主要原因。

胆汁分泌量与植黄牛的体重成正比。在正常情况下肝细胞分泌胆汁的活动是连续的,而胆汁向肠道的排入是间断的。本实验观察到胆汁由胆囊排入牛黄发生器的活动是连续的。这与胆囊经插管始终与发生器相通有关。生理状态下胆汁排放受十二指肠奥迪氏括约肌的控制,而本实验胆汁由胆囊排入牛黄发生器的活动受胆囊内压的影响,肝细胞连续性分泌胆汁的活动使胆囊内压始终高于发生器内压,从而产生连续性胆汁流动。牛的体重大,肝脏分泌的胆汁多,生成牛黄的原料丰富,则牛黄的产量高,但牛黄的产量尚受胆汁质量、牛黄菌种活性、牛黄床材料与结构等许多因素的影响^[1-3]。

参考文献:

- [1] 马卫明,李建基,王春敖,等.牛体外牛黄发生器内培植牛黄技术研究[J].畜牧兽医学报,2001,32(3):224~230.
- [2] 王春敖,李建基,阎青,等.模拟动物胆囊研制与利用技术研究[J].畜牧兽医学报,1994,25(5):385~389.
- [3] 李建基,王春敖,马卫明,等.牛双胆囊内培植牛黄技术的研究[J].中国兽医杂志,1996,22(4):26~27.
- [4] 王春敖,李建基,马卫明,等.培植牛黄成因研究[J].畜牧兽医学报,1995,26(4):369~374.
- [5] Stewart L, Smith A L, Pellegrini C A, et al. Pigment gallstones form as a composite of bacteria microclonies and pigment solids[J]. Ann Surg, 1987, 206: 242~250.

Formation Mechanism of the Calculus Bovis in the External Artificial Gallbladder

LI Jiarji, YAN Zhenhui, LIU Cuiyan, LIU Jun-dong, LI Qiang

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Five healthy cattle were used to cultivate the Calculus Bovis in the external artificial gallbladder (EAG) and were simultaneously performed catheterization of the hepatobiliary ducts for draining the liver bile. During the period of cultivating the Calculus Bovis, the physical and chemical characters of the bile (including the intrahepatic bile and the gallbladder bile and the EAG bile) were analyzed in order to investigate the mechanism of formation of the Calculus Bovis in the EAG. The results showed that as inoculating the *E. coli* in the bile, the physical and chemical characters changed originally in the intrahepatic bile, the normal bile were changed into the Calculus Bovis-forming bile. While the bile moved from the intrahepatic duct into gallbladder, the quantity of the mucin and *E. coli* increased, which made the viscosity of bile increasing and the pH value and the content of cholic acid in the bile decreasing. The formation of the Calculus Bovis microgranules were thus accelerated. The viscosity and pH value of the bile in the EAG were decreased, resulting in the Calculus Bovis microgranules to sink and assemble and adhere to the Calculus Bovis' carrier easily, which prevented the Calculus Bovis granules from moving into the duodenum and improved the output of the Calculus Bovis. The more the body weight of cattle, the more the quantity of bile, and then the higher the output of Calculus Bovis.

Key words: Cattle; External; Cultivate; Calculus Bovis; Artificial gallbladder