

家兔胆总管结扎与注射四氯化碳时血浆 c-AMP含量变化的实验性研究

简志瀚^{*} 刘天荣^{**} 邢益和^{*} 曾熙兰^{*} 刘秀琴^{*} 谭建芸^{***}
李 谛^{***} 陈炳生^{*} 袁海风^{*}

近年来, 已发现环磷酸腺苷(c-AMP)的测定对某些疾病的诊断和治疗有着重要的参考价值^[1,2]。某些肿瘤、内分泌疾病时c-AMP含量的改变已有报道^[3,4]。近年有人报道, 阻塞性黄疸与非阻塞性黄疸注射胰高血糖素(Glucagon)后, 血浆c-AMP含量的升高有区别^[5]。因胰高血糖素可活化细胞膜上的腺苷酸环化酶, 使c-AMP增加, 而引起血浆c-AMP含量明显升高^[6,7]。为了进一步证实这一结果的正确性及掌握其变化规律, 以便更好地应用于临床, 故在动物上进行了实验性研究。现将实验方法及初步结果报告如下:

材 料 与 方 法

一、实验材料

家兔12只, 体重1.6~2.8公斤, 雌雄不拘。随机分为两组。即胆总管结扎组与注射四氯化碳(CCl₄)组(以下简称结扎组和CCl₄组)。各组6只。

二、实验方法

(一)复制动物疾病模型:

1. 结扎组 5%硫贲妥钠静脉麻醉后, 行胆总管结扎断离术。术后肌注青霉素, 剂量为20万单位/次, 每日两次。

2. CCl₄组 实验前, 于小腿侧深部肌肉注射50%CCl₄一次, 剂量为2毫升/公斤体重。

(二)观察指标及其测定方法:

1. 血清胆红素 根据重氮反应原理, 自配0.15%盐酸液, 重氮试剂等。用721型分光光度计(上海第三仪器厂)按比色分析法(波长560nm)做一分钟胆红素、总胆红素定量测定。并自制标准曲线^[8]。所用胆红素系德国E. Merck Ag Darmstat出品。每支0.25克。

2. 血清凡登伯(VDB)定性实验 仍按重氮反应原理, 自配试剂, 观察其呈色反应^[8]。

^{*}中山医学院 ^{**}湖北省宜昌医专 ^{***}广东医药学院

3. 血糖 自配饱和硼酸溶液、葡萄糖标准应用液、30% 三氯乙酸和显色剂, 用721型分光光度计(波长635nm)按邻甲苯胺超微量法测定^[8]。

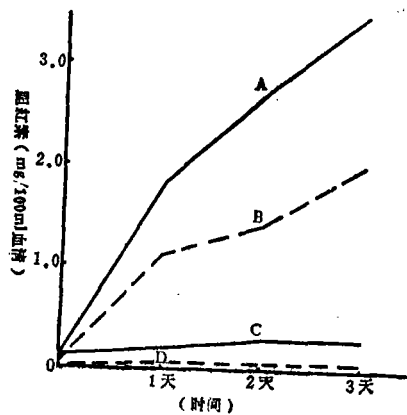
4. 血浆c-AMP 耳缘静脉或心脏采血4毫升, 用1%体积的0.5M乙二胺四乙酸(EDTA, pH7.5)抗凝, 离心后取血浆置冰箱冷藏。一周内作c-AMP测定。采用中国科学院原子能研究所提供的³H c-AMP标记物及c-AMP标准品, 自制蛋白激酶, 按蛋白竞争结合法测定。

上述四项观察指标分别在每只兔胆总管结扎术前及注射CCl₄前各测定一次正常含量。胆总管结扎和注射CCl₄后, 每天对每只兔测定上述各项指标一次, 至第4天。其中, 各免于胆总管结扎和注射CCl₄后第3天, 自耳缘静脉注射Glucagon, 剂量为50微克/公斤体重, 并于注射Glucagon前15分钟、后15和30分钟心脏采血, 分别测定上述四项指标。所用胰高血糖素系美国Eli Lilly and Company Limited·Basingstoke, England产品。

实验结果

一、正常家兔血浆c-AMP、血糖和胆红素含量: 14只正常家兔血浆c-AMP, 平均值±标准差为 58.0 ± 22.4 微微摩尔/毫升 $\bar{X} \pm SD$ (下同此单位)。24只正常家兔血糖平均值±标准差为 109.6 ± 20.0 ($\bar{X} \pm SD$)毫克/100毫升血(下同此单位)。24只正常家兔一分钟胆红素平均值±标准差为 0.01 ± 0.02 毫克/100毫升血清(下同此单位); 总胆红素平均值±标准差为 0.09 ± 0.13 毫克/100毫升血清。

二、胆总管结扎、注射CCl₄前后(以下简称处理前后)血清胆红素含量见图1:



- A. 结扎组血清总胆红素;
- B. 结扎组一分钟胆红素;
- C. CCl₄组血清总胆红素;
- D. CCl₄组一分钟胆红素。

图1 结扎组和CCl₄组的胆红素曲线图

结扎组在结扎前与结扎后第一、二、三天的一分钟胆红素分别为 0.03 ± 0.03 、 1.1 ± 0.6 、 1.4 ± 0.5 、 2.0 ± 1.9 。CCl₄组在注射CCl₄前与注射CCl₄后第一、二、三天的一分钟胆红素分别为 0.004 ± 0.01 、 0.03 ± 0.03 、 0.03 ± 0.01 、 0.04 ± 0.01 。经统计学分析, 两组处理前后一分钟胆红素无显著性差异($P > 0.05$)。但处理后, 一分钟胆红素含量的数值是逐步上升的。结扎组在结扎前与结扎后第一、二、三天的血清总胆红素分别为 0.1 ± 0.09 、 1.8 ± 1.1 、 2.7 ± 1.1 、 3.3 ± 2.7 。CCl₄组在注射CCl₄前与注射CCl₄后

第一、二、三天的血清总胆红素分别为 0.1 ± 0.2 、 0.2 ± 0.1 、 0.3 ± 0.2 、 0.3 ± 0.3 。经统计学分析, 结扎组和 CCl_4 组处理后的血清总胆红素含量都有升高, 与处理前有显著性差异 ($P < 0.05$)。

血清凡登伯定性试验: 结扎组于胆总管结扎术后VDB试验为直接阳性反应。 CCl_4 组于注射 CCl_4 后VDB试验为直接双相反应(结扎和注射 CCl_4 前VDB试验均为直接阴性反应)。

三、胆总管结扎、注射 CCl_4 前后血浆c-AMP含量的变化见表1和图2:

经统计学分析, 两组处理后第一天与处理前之间血浆c-AMP含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。

四、两组于处理后第3天注射Glucagon前后血浆c-AMP含量的变化见表2和图3:

经统计学分析, 结扎组注射Glucagon前15分钟与后15分钟、后30分钟的血浆c-AMP含量均有高度显著性差异 ($P < 0.01$); CCl_4 组注射Glucagon前后15分钟中之间的血浆c-AMP含量有显著性差异 ($P < 0.05$), 前15分钟与后30分钟之间血浆c-AMP含量无

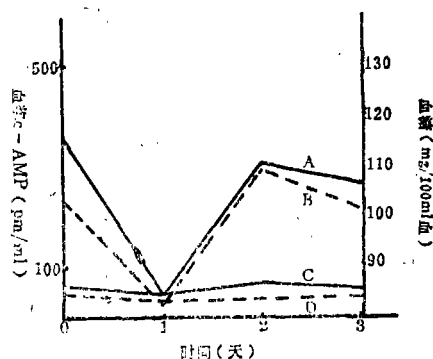


图2. 两组注射 CCl_4 前后血浆c-AMP和血糖曲线图

- A. 结扎组血糖含量变化曲线;
B. CCl_4 组血糖含量变化曲线;
C. 结扎组血浆c-AMP含量曲线;
D. CCl_4 组血浆c-AMP含量曲线。

表1 家兔结扎胆总管、注射四氯化碳前后血浆c-AMP含量

组别	例数	血浆c-AMP含量(微微摩尔/毫升)			
		处理前 1天	处理后		
			1天	2天	8天
结扎组	6	63.2 ± 28.3	47.4 ± 9.9	67.3 ± 19.2	56.6 ± 13.7
CCl_4 组	6	48.6 ± 6.8	33.6 ± 15.4	36.0 ± 20.4	39.1 ± 21.6

表2 两组处理后第三天注射Glucagon前后血浆c-AMP含量

组 别	例 数	血浆 c-AMP 含量 (微微摩尔/毫升)		
		注射 Glucagon 前	注射 Glucagon 后	
		15分钟	15分钟	30分钟
结扎组	6	56.6 ± 13.7	703.5 ± 266.8	142.8 ± 26.6
CCl ₄ 组	6	39.1 ± 21.6	332.1 ± 280.1	255.8 ± 275.2

显著性差异 ($P>0.05$)。注射Glucagon后15分钟两组之间血浆c-AMP的含量有显著性差异 ($P<0.05$)，后30分钟两组之间血浆c-AMP的含量已无显著性差异 ($P>0.05$)。

五、结扎胆总管、注射CCl₄前后的血糖含量见表3和图2：

表3 胆总管结扎及注射四氯化碳前后血糖含量

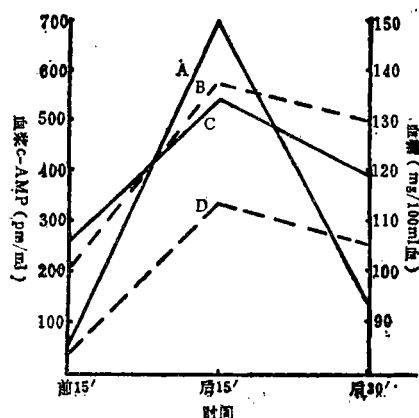
组别	例数	血糖含量 (毫克/100毫升血)			
		处理前	处理后		
		1天	1天	2天	3天
结扎组	6	115.7±22.1	84.0±1.4	110.0±13.2	106.2±12.1
CCl ₄ 组	6	103.2±22.9	83.3±9.9	109.0±18.7	101.2±16.1

经统计学分析，两组处理前后一天之间血糖含量无显著性差异 ($P>0.05$)。

六、两组于处理后第3天注射Glucagon前后的血糖含量变化见表4和图3：

表4 两组处理后第三天注射Glucagon前后血糖含量

组别	例数	血糖含量毫克/100毫升血		
		注射Glucagon前	注射Glucagon后	
		15分钟	15分钟	30分钟
结扎组	6	106.2±12.1	134.0±26.5	119.3±2.9
CCl ₄ 组	6	101.1±16.1	137.3±22.5	130.0±16.9



- A. 结扎组血浆c-AMP曲线；
- B. CCl₄组血糖曲线；
- C. 结扎组血糖曲线；
- D. CCl₄组血浆c-AMP曲线。

图3 结扎组和CCl₄组处理后第三天注射Glucagon前后血浆c-AMP和血糖的变化曲线图。

经统计学分析，结扎组注射Glucagon前后15分钟之间血糖含量有显著性差异 ($P<0.05$)，前15分钟与后30分钟之间已无显著性差异 ($P>0.05$)；CCl₄组注射Glucagon

前后15分钟之间有高度显著性差异 ($P < 0.01$), 后30分钟与前15分钟之间血糖含量有显著差异 ($P < 0.05$)。注射 Glucagon 后 15 分钟, 两组之间的血糖含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。

七、两组与处理后第3天注射 Glucagon 前后的一分钟胆红素、总胆红素含量的变化: 结扎组在注射 Glucagon 前15分钟、后15分钟和后30分钟的一分钟胆红素含量分别为 1.9 ± 1.9 、 2.4 ± 1.9 、 2.5 ± 2.0 。CCl₄组在注射 Glucagon 前15分钟、后15分钟和后30分钟的一分钟胆红素含量分别为 0.04 ± 0.01 、 0.02 ± 0.01 、 0.03 ± 0.03 。结扎组注射 Glucagon 前15分钟、后15分钟和后30分钟的总胆红素含量分别为 3.3 ± 2.7 、 4.4 ± 2.8 、 4.5 ± 2.9 , CCl₄组注射 Glucagon 前15分钟、后15分钟和后30分钟的总胆红素含量分别为 0.3 ± 0.3 、 0.7 ± 0.5 、 0.4 ± 0.3 。经统计学分析, 两组在注射 Glucagon 前后不同时间之间一分钟胆红素、总胆红素含量均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

讨 论

一、正常家兔血浆中c-AMP含量:

14只正常家兔血浆中c-AMP含量的平均值 $\pm$ 标准差为 55.0 ± 22.4 。由于实验条件不同, 所以各作者报道的结果亦不完全相同。本实验测定的数值介于邵亚男^[9]与万宝松^[10]报道的正常家兔血浆c-AMP含量之间(分别为 $72.89 \pm 20.35 \text{ pm/ml}$ 、 $21.88 \pm 3.72 \text{ pm/ml}$)。

二、复制动物疾病模型

用结扎胆总管方法复制阻塞性高胆红素血症的模型是成功的。结扎组行胆总管结扎术后, 血清胆红素逐日递增。结扎后第3天的一分钟胆红素平均值由结扎前的0.03上升到1.98, 增加了66倍; 血清总胆红素由结扎前的0.1上升到3.27, 增加了32.7倍。经统计学分析, 结扎后第3天与结扎前一天的总胆红素含量均有显著性差异 ($P < 0.05$)。这与菊川政男报道大鼠胆总管结扎术后的血清总胆红素含量的变化规律一致^[11]。凡登伯定性试验的直接阳性反应结果也支持此模型的复制成功。

CCl₄组于注射CCl₄后, 血清胆红素的增高虽不及结扎组明显, 但仍每日递增。注射CCl₄后第3天的一分钟胆红素含量由注射CCl₄前的0.004上升到0.04, 增加了10倍; 血清总胆红素由注射前的0.1上升到0.3, 增加了3倍。经统计学分析, 注射CCl₄后第3天与注射CCl₄前一天的血清总胆红素含量差别有显著性意义 ($P < 0.05$)。凡登伯定性试验为直接双相反应。病理切片可见肝细胞坏死, 但不严重, 故血清胆红素的升高不显著是可以理解的。有人用氨基半乳糖(galactosamine)致肝细胞损害, 伴有明显的高胆红素血症^[12]。唯该药价格昂贵, 未能采用。

三、Glucagon可使c-AMP明显增加。结扎组血浆c-AMP增加比CCl₄组显著。

第3天注射 Glucagon, 发现注射 Glucagon 后15分钟, 两组血浆c-AMP含量都明显升高: 结扎组注射 Glucagon 后15分钟血浆c-AMP的平均值由注射前15分钟的56.6上升到703.5, 增加12.4倍, 净增值为646.9。CCl₄组注射 Glucagon 后15分钟血浆c-AMP的平均值由注射前15分钟的39.1上升到332.1, 增加3.5倍, 净增值为293。又结扎组在注

射Glucagon后15分钟的净增值为CCl₄组的2.2倍。注射Glucagon后30分钟两组血浆c-AMP含量又明显回降,但仍高于注射Glucagon前15分钟水平。经统计学分析,结扎组在注射Glucagon前后血浆cAMP差别有高度显著性(注前15分钟与注后15分钟、30分钟 $P<0.01$);CCl₄组注射Glucagon前后15分钟血浆c-AMP差别有显著性($P<0.05$)。注射Glucagon前后15分钟,两组之间的血浆c-AMP差别有显著性意义($P<0.05$)。由此可以看出,注射Glucagon后15分钟,两组血浆c-AMP含量都明显上升,且结扎组血浆c-AMP的升高比CCl₄组显著(结扎组净增值为CCl₄组净增值的2.2倍, $P<0.05$)。这与Arther E^[7]和Carstensen^[5](1979)的报道相符。

至于在结扎和注射CCl₄后第一天,血浆c-AMP和血糖的含量,经统计学分析,无显著差异($P>0.05$)。但结扎和注射CCl₄后的数值都比注射CCl₄和结扎前一天有所降低。这可能一方面与注射CCl₄和结扎术后,动物食欲减退,进食减少有关;另一方面还可能与手术创伤后,细胞增殖过程中细胞内c-AMP含量下降有关^[13]。具体机制有待进一步研讨。

四、Glucagon使血浆c-AMP升高的机制:

血浆中c-AMP来源于组织细胞的释放。肝脏能向血浆中提供c-AMP已被实验所证实^[14]。腺苷酸环化酶可被许多激素所激活。Glucagon是激活细胞膜上腺苷酸环化酶的激素之一。

本实验注射Glucagon后15分钟血糖含量增加的事实表明,Glucagon已确实作用于肝脏,肝脏磷酸化酶被激活而促进肝糖原分解,同时Glucagon诱导与糖异生有关酸类的合成而促进糖异生。肝糖元的分解和糖异生的作用而使血糖升高。

既然Glucagon是影响c-AMP的一种激素,因而当注射Glucagon后,Glucagon作用于细胞膜上腺苷酸环化酶,使ATP生成c-AMP加速,从而使c-AMP含量上升。由于c-AMP对糖元分解的酶有一系列连续激活的反应,因而产生上述血糖升高的激素效应。这可说明c-AMP含量的增加是由于Glucagon作用于肝脏的结果。Arther及其同事^[7]有实验证实Glucagon引起血浆c-AMP的增加系由肝脏对Glucagon的反应。后来Jurums G^[15](1977)的家兔实验也观察到Glucagon引起血浆中c-AMP的含量上升主要来自肝脏。

本实验注射Glucagon后血浆中c-AMP含量增加的机理,除与上述Glucagon的作用机制有关外,还与下列因素有关:结扎组血浆c-AMP含量的明显增加与胆总管结扎所造成的胆道阻塞有关。胆道阻塞时,c-AMP随胆汁排泄障碍而返流入血,因而血浆中c-AMP含量显著上升。CCl₄组血浆c-AMP含量的增加与CCl₄的肝脏毒性有关。CCl₄经肝脏微粒体混合功能氧化酶的作用,在体内,转化产生自由基(-CCl₃),自由基作用与线粒体膜而破坏正常代谢,使肝功能降低,对c-AMP的灭活作用(c-AMP由磷酸二酯酶催化而水解成无活性的5'-AMP)减弱,致使血中c-AMP含量增加。有资料表明^[16],长期接触CCl₄的工人,血浆c-AMP含量增加,其增加水平与肝损害有一定关系。

五、注射Glucagon后15分钟,CCl₄组血浆c-AMP含量不如结扎组上升显著的机理:结扎组由于胆总管结扎而闭塞,c-AMP随胆汁道流入血的机理可解释结扎组血浆

c-AMP含量的显著升高;而CCl₄组则由于胆道通畅,而部分c-AMP可随胆汁的排泄而排出,故血浆中c-AMP不如结扎组上升显著。这是解释两组血浆中c-AMP含量为何出现差异的主要机制。由此说明,血浆中c-AMP的含量增加不仅反映了肝脏功能的好坏,而且也反映了胆道是否畅通。

本文报道了在复制动物疾病模型的基础上,注射Glucagon后15分钟时,血浆c-AMP含量明显升高。且胆道阻塞时血浆c-AMP比肝细胞损害(非阻塞性)时增加显著,故本实验有其理论上的意义;从而提示在临床工作中,可借助Glucagon的作用,利用血浆c-AMP的这一变化,把测定血浆c-AMP的含量(以观察注射Glucagon后15分钟为宜),作为鉴别阻塞性与非阻塞性高胆红素血症的一项指标,是其实验之实际意义所在。

参 考 文 献

- [1] 李振甲等:放射免疫分析手册, p379, 科学技术文献出版社, 1980
- [2] 中国科学院上海生物化学研究所酶结构功能组等:生物化学与生物物理学报 8(2):169, 1976
- [3] 简志瀚等:肿瘤, 2(6):1, 1982
- [4] 上海第一医学院, 医用生物化学(上册), p668, 654, 人民卫生出版社, 1979
- [5] Carstensen et al: Surg Gynecol Obstet, 149:503, 1979
- [6] Broadus A E et al: J Clin Invest, 49:2237, 1970
- [7] Arther E et al: Ann N Y Acad Sci, 185:50, 1971
- [8] 崔福生:医学生化检验手册. p503, 505, 天津科学技术出版社, 1982
- [9] 邵亚男等:南京医学院学报, 2(1):40, 1982
- [10] 万宝松等:山西医药杂志, 12(1):8, 1983
- [11] 菊川孜男:医学あゆみ, 125(13):1128, 1983
- [12] 郭鹑:病理生理丛书第一辑, 人类疾病动物模型. p279, 人民卫生出版社, 1982
- [13] 詹文华等:中山医学院1983年校庆论文摘要, P226, 1983
- [14] Wethman R E et al: J Clin Invest, 53:173, 1974
- [15] Jerums G et al: Diabets, 26:81, 1977
- [16] 曾熙兰等:内部资料, 待发表。

Effect of Glucagon Infusion on Plasma Cyclic AMP in Rabbits with Obstructive Jaundice and Tetrachloromethane Injection

Jian Zhihan Liu Tianrong Xing Yihe Zeng Xilan Liu Xiuqin
Tan Jianyu Li Di Chen Bingsheng Yun Hanfeng

(Zhongshan Medical College)

Abstract

Plasma cyclic AMP concentration during glucagon infusion at certain time intervals was determined in 6 rabbits with obstructive jaundice and 6 rabbits with tetrachloromethane(CCl_4) injection. A significant difference in plasma cyclic AMP concentration was found, both rabbits with obstructive jaundice and tetrachloromethane injection at the 15th minuts before and after glucagon infusion.

In the obstructive jaundic group, plasma cyclic AMP concentration at 15th minuts before glucagon infusion was $56.6 \pm 13.7 \text{ pM/ml}$, but at 15th minuts after was $703.5 \pm 266.8 \text{ pM/ml}$. The difference is highly significant ($P < 0.01$). In the tetrachloromethane group, plasma cyclic AMP concentration at the 15th minuts before glucagon infusion was $39.1 \pm 21.6 \text{ pM/ml}$, but at the 15th minuts after was $322.1 \pm 280.1 \text{ pM/ml}$. The difference was significant too ($P < 0.05$). In addition, plasma cyclic AMP concentration with obstructive jaundice group at 15th minuts after glucagon infusion were found to be greater than those in tetrachloromethane injection group ($P < 0.05$).

These results indicate that plasma cyclic AMP levels at the 15th minuts after glucagon infusion may represent a reliable differential diagnosis index between the obstructive jaundice and hepatogenous jaundice.