

· 基础研究 ·

探讨胃动素、神经降压素和一氧化氮合酶与 Oddi 括约肌运动功能障碍的关系

庞雪莹 任旭 夏添 梁金龙 王晨 唐秀芬 孙晓梅

【摘要】 目的 探讨胃动素(MTL)、神经降压素(NT)及一氧化氮合酶(NOS)对胆囊切除后 Oddi 括约肌(SO)运动功能的影响。**方法** 在动物实验中,豚鼠造模组(胆囊切除)和对照组(开术)术后 12 周行 SO 压力测定(SOM),计算受试者工作特征曲线(ROC)下面积值(AUC)及界限值,从造模组中筛选出符合条件的豚鼠,作为 SO 运动功能障碍(SOD)模型组。采用放射免疫法检测 SOD 模型组和对照组血浆 MTL、NT 的含量及采用积分光密度值方法检测 SO 组织中 MTL、NT 及 NOS 蛋白表达量。在临床研究中,比较 SOD 组(SO 压力 >40 mmHg)和对照组患者血浆 MTL、NT 含量。**结果** 根据 ROC 曲线计算 AUC 为 0.75,豚鼠($n=10$)SO 压力 ≥ 29.8 mmHg(界限值)为 SOD 模型组。SOD 模型组($n=10$)血浆 MTL [(193.16 ± 29.2) pg/mL] 和 NT 含量 [(104.57 ± 19.52) pg/mL] 均分别高于对照组($n=11$) 血浆 MTL [(154.24 ± 27.69) pg/mL] 和血浆 NT 含量 [(79.65 ± 11.24) pg/mL] ($P < 0.01$); SO 中 MTL ($3\,556.71 \pm 455.80$) 和 NT 蛋白表达量 ($6\,321.74 \pm 203.54$) 高于对照组 MTL ($3\,075.92 \pm 350.06$) 和 NT 蛋白表达量 ($5\,843.57 \pm 344.00$),而 NOS 蛋白表达量 ($2\,954.21 \pm 173.54$) 低于对照组 ($3\,314.91 \pm 246.67$) ($P < 0.05$)。临床研究 SOD 组($n=15$) 血浆 MTL [(350.98 ± 24.31) pg/mL] 和 NT 含量 [(102.39 ± 19.56) pg/mL] 分别高于对照组($n=15$) MTL [(319.56 ± 23.54) pg/mL] 和 NT 含量 [(80.45 ± 12.35) pg/mL] ($P < 0.05$)。**结论** 血浆 MTL 和 NT 水平以及 SO 中 MTL、NT 和 NOS 蛋白表达量与 SOD 发生有关。检测血浆 MTL 和 NT 可能对胆囊切除术后 SOD 有辅助诊断作用。

【关键词】 Oddi 括约肌运动功能障碍; 促胃动素; 神经降压肽; 一氧化氮合酶; 括约肌压力测定

Impact of motilin, neurotensin and nitric oxide synthase on sphincter of Oddi dysfunction Pang Xueying*, Ren Xu, Xia Tian, Liang Jinlong, Wang Chen, Tang Xiufen, Sun Xiaomei. * Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China
Corresponding author: Ren Xu, Email: hljxhy2001@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the impact of motilin (MTL), neurotensin (NT) and nitric oxide synthase (NOS) on Oddi sphincter (SO) motion after cholecystectomy. **Methods** Oddi sphincter pressure measurement (SOM) was performed on both Guinea pig model group (cholecystectomy) and control group (laparotomy) 12 weeks after operation. Sphincter of Oddi dysfunction (SOD) group was determined by receiver operating characteristic curve (ROC) analysis and area under curve (AUC). Protein expression of MTL, NT and NOS in SO was also detected through integral optical density method. Meanwhile, the contents of MTL and NT in patients' plasma of both SOD group (so pressure > 40 mmHg) and control group were compared. **Results** AUC of 0.75 and SO pressure of more than 29.8 mmHg was determined as the standard of SOD group. MTL and NT contents (193.16 ± 29.2 pg/mL and 104.57 ± 19.52 pg/mL, respectively) of the model group ($n=10$) in plasma were significant higher than those of control group ($n=11$) (154.24 ± 27.69 pg/mL and 79.65 ± 11.24 pg/mL, respectively), and same trend of MTL and NT protein expression in SO ($3\,556.71 \pm 455.80$ and $6\,321.74 \pm 203.54$ of the model group; $3\,075.92 \pm 350.06$ and $5\,843.57 \pm 344.00$ of

DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-5232.2017.12.000

作者单位:150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学附属第一医院肿瘤科(庞雪莹);黑龙江省医院消化病院(任旭、夏添、梁金龙、王晨、唐秀芬、孙晓梅)

通信作者:任旭,Email:hljxhy2001@126.com

the control group). While NOS protein expression in model group was lower than that of the control group (2954.21 ± 173.54 VS 3314.91 ± 246.67 , $P < 0.05$). In clinical research, the plasma contents of MTL (350.98 ± 24.31 pg/mL VS 319.56 ± 23.54 pg/mL) and NT (102.39 ± 19.56 pg/mL VS 80.45 ± 12.35 pg/mL) in SOD group ($n = 15$) were higher than those of the control group ($n = 15$) ($P < 0.05$). **Conclusion** MTL and NT contents in plasma and protein expression of MTL, NT and NOS may be related to SOD. MTL and NT examinations may assist diagnosing SOD after cholecystectomy.

【Key words】 Sphincter of Oddi dysfunction; Motilin; Neurotensin; Nitric oxide synthase; Oddi sphincter pressure measurement

Oddi 括约肌运动功能障碍(SOD)常见于胆囊切除术后患者,发病原因尚不清楚。Sonada 等^[1]曾提出胆囊切除后阻断了胆囊与 Oddi 括约肌(SO)之间的神经内分泌通路,破坏了胆汁排泄调节反应,而引起 SOD 的假说。然而并不是所有胆囊切除术后患者均发生 SOD,少数胆囊在位者也有 SOD 存在,不能完全支持此学说。近年报道切除犬的胆囊 4 周行括约肌压力测定(SOM),未发现基础 SO 压力(BSP)等有明显变化,但注射胆囊收缩素(CCK)后 SO 松弛反应减弱伴收缩紊乱^[2]。本研究通过对制作的豚鼠 SOD 模型及 SOD 患者检测胃动素(MTL)、神经降压素(NT)及一氧化氮合酶(NOS)的变化,探讨其对 SO 运动功能的影响。

材料与方法

一、研究对象

1.实验动物造模:选择 8 周龄豚鼠(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供),雌雄不限,体重(350 ± 20)g,分为造模组和对照组 2 组,造模组(19 只)行胆囊切除;对照组(15 只)仅行开腹手术。两组术后 12 周分别开腹行 SOM。实验过程中两组因手术或 SOM 不成功,或有并发症、死亡的 10 只豚鼠被剔除。实验成功造模组 13 只,对照组 11 只。

2.临床资料:选择 2014 年 3 月至 2015 年 3 月期间,ERCP 治疗胆道疾病患者中 15 例 SOD 作为研究对象(SOD 组),其中胆囊切除术后 SOD 11 例(I 型 4 例,II 型 7 例),胆总管结石伴 SOD 4 例。男 12 例,女 3 例,年龄 48~80 岁,平均(64.46 ± 16.6)岁。对照组(健康志愿者)15 例,其中男 10 例,女 5 例,年龄 50~72 岁,平均(61.66 ± 10.2)岁。两组年龄、性别相仿,具有可比性。

二、实验材料

1.造模用器械:造模用手术显微镜及手术相关器械。

2.放免药盒和抗体:药盒:碘^{125I}胃动素和碘^{125I}神经降压素药盒(北京华埠力特生物技术研究);Sn-69513 型免疫计数器。抗体(武汉博士德生物工程有限公司):一抗胃动素抗体,神经降压素抗体,一氧化氮合酶抗体。二抗山羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司)。

3. SOM 装置:丹麦 Polygram ID 型水灌注式测压仪;SOM-18-5-Lehman-NG 型三腔水灌注式测压导管,外径 3.5 Fr,每孔灌注速度为 0.2 mL/min。

三、方法

1.动物实验方法

(1)造模手术:豚鼠术前禁食禁水 10h,戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉。在操作台上豚鼠常规消毒,切开腹壁 2~3 cm,顺行性切除胆囊后关腹。

(2)豚鼠 SOM 方法:造模组和对照组豚鼠分别开腹,手术显微镜下横行切开十二指肠壁,经乳头开口向胆管内用导丝逆行引导插入测压导管。测压管的红色标记插入乳头内超过 1 cm 后,先测胆总管压力(CBDP),再将标记退出至乳头口,测 BSP,测压 2 次,每次至少 30 s。

(3)标本收集和處理:采血:SOM 成功后处死豚鼠,立即在左心尖处采血 2 mL 注入预冷 4℃ 的试管(内含 7.5%乙二胺四乙酸二钠 30 μ L 和抑肽酶 40 μ L)中,混匀后离心,收集上清液, -30℃ 冰冻保存,备用放射免疫法检测血浆 MTL 和 NT 含量。括约肌组织收集:切除胆总管、十二指肠乳头,用 10% 甲醛溶液固定。

(4)病理学检查:应用免疫组化 Power Vision (PV) 二步法及计算积分光密度值检测括约肌中 MTL、NT、NOS 蛋白表达量。

(5)确定豚鼠 SOD 模型方法:对照组和造模组 SOM 结果进行统计学分析,确定测定值的上下限、组距,分别计算出所有截断点的敏感度、特异度,并

作图绘成受试者工作特征曲线(ROC)。得出两组间 SO 压力检测数据重叠区内最佳界限值(Cut-off 值),造模组中 SO 压力升高 $\geq$ 界限值的豚鼠为 SOD 模型。

(6)积分光密度值检测方法:每例随机分析 3 个不同视野,取其平均值作为该例积分光密度。积分光密度=阳性面积 $\times$ 平均光密度。平均光密度表示在视野内所有选定对象(如:阳性细胞)的平均反应强度。染色结果细胞核呈蓝色,蛋白表达位于胞质中,阳性为淡黄色或黄棕色。

2. 临床研究方法

(1)SOM 方法及标本收集: SOM 前 24 h 停用可能影响括约肌运动功能的药物。空腹镇静状态下行 ERCP,十二指肠镜下选择性胆管插管,在治疗 ERCP 前行 SOM,方法见参考文献^[3]。SOD 组和对照组患者采静脉血 2 mL,放射免疫法检测血浆 MTL 和 NT 含量,进行对比。

(2)SOD 诊断标准:根据罗马 III 诊断标准^[4]。

(3)血浆 MTL 和 NT 正常值:参照试剂盒提供的正常参考值,血浆 MTL 正常值为(326 $\pm$ 58) pg/mL;血浆 NT 正常值为(74.3 $\pm$ 30.55) pg/mL。

四、统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件对各组数据做统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。对比应用 ROC 曲线,计算 ROC 曲线下面积值(AUC)及界限值。

结 果

一、动物实验

1.两组豚鼠 SOM 结果:测得对照组豚鼠 BSP 均值为(26.71 $\pm$ 6.23) mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),CBDP 均值为(2.35 $\pm$ 0.58) mmHg。根据对照组与造模组测定结果对比绘制 ROC 曲线,计算其 AUC 为 0.75,据此得出两组间的界限值为 29.8 mmHg(图 1),造模组 13 只豚鼠中 10 只超过此值豚鼠纳入 SOD 模型组, SOD 模型组 CBDP(3.6 $\pm$ 1.08 mmHg),与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.两组豚鼠血浆 MTL、NT 含量:SOD 模型组(n

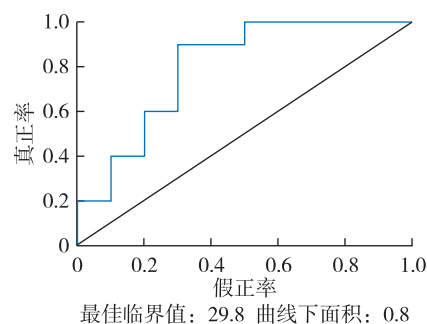


图 1 根据对照组和造模组括约肌压力测定结果对比绘制 ROC 曲线

=10) 血浆 MTL 含量为(193.16 $\pm$ 29.2) pg/mL、NT 含量为(104.57 $\pm$ 19.52) pg/mL。对照组($n=11$) 血浆 MTL 含量为(154.24 $\pm$ 27.69) pg/mL、血浆 NT 含量为(79.65 $\pm$ 11.24) pg/mL,两组相比,SOD 模型组血浆 MTL、NT 含量均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3.两组豚鼠 SO 中 MTL 及 NT、NOS 蛋白表达量(图 2):表 1 中 SOD 模型组 SO 中 NOS 蛋白表达量低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$); MTL 和 NT 蛋白表达量均高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

二、临床研究结果

1.SOD 组 SOM 结果:15 例 SO 基础压力(70.72 $\pm$ 21.40) mmHg;收缩振幅为(56.08 $\pm$ 23.97) mmHg;收缩频率为(39.44 $\pm$ 26.52)次/min。

2.SOD 组和对照组患者血 MTL、NT 含量检测结果: SOD 组($n=15$) 血浆 MTL 含量为(350.98 $\pm$ 24.31) pg/mL,NT 含量为(102.39 $\pm$ 19.56) pg/mL;对照组($n=15$) 血浆 MTL 含量为(319.56 $\pm$ 23.54) pg/mL,NT 含量为(80.45 $\pm$ 12.35) pg/mL。两组相比较,SOD 组血浆 MTL、NT 含量均高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

讨 论

胆囊切除术后 SOD 的发生率约 13%,胆囊在位的患者为 0.9%^[5]。发生 SOD 时胆汁或胰液排出功

表 1 两组豚鼠 Oddi 括约肌中 MTL、NT 及 NOS 蛋白表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MTL	NT	NOS
SOD 模型组	10	3 556.71 $\pm$ 455.80	6 321.74 $\pm$ 203.54	2 954.21 $\pm$ 173.54
对照组	11	3 075.92 $\pm$ 350.06	5 843.57 $\pm$ 344.003	314.91 $\pm$ 246.67

注:MTL:胃动素;NT:神经降压素;NOS:一氧化氮合酶;SOD:Oddi 括约肌运动功能障碍

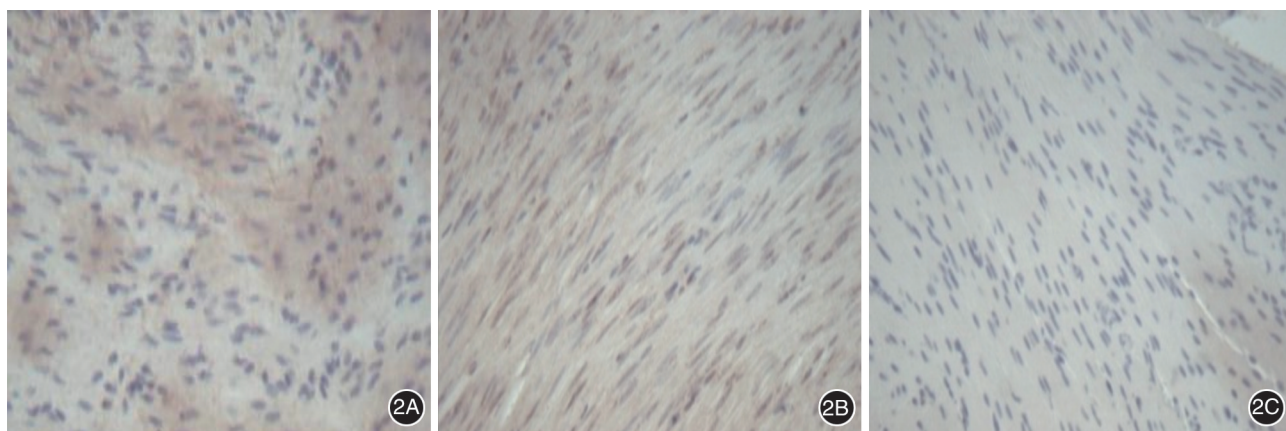


图2 胃动素(MTL)、神经降压素(NT)、一氧化氮合酶(NOS)在Oddi括约肌(SO)中表达 2A:MTL在SO中表达 PV二步法×400;2B:NT在SO中表达 PV二步法×400;2C:NOS在SO中表达 PV二步法×400

能不全, SOM显示BSP升高,同时有SO收缩频率异常等功能紊乱表现。BSP正常范围3~35 mmHg,如 ≥ 40 mmHg则提示SOD, BSP升高是诊断SOD的“金标准”^[6-7]。本研究临床病例中,胆囊切除术后SOD 11例(73.3%),胆囊在位4例(26.7%),BSP平均72.7 mmHg且伴收缩频率紊乱,主要是SOD II型和I型,未包括III型者。

Grivell^[8]等观察到仓鼠具有独立的SO运动性反映区,可分别测得胆管压力及十二指肠压力,仓鼠SO的基本结构、平滑肌分布以及其胆道系统与人类相似,且CBDP < 3 mmHg。FAN^[2]等报道通过切除犬的胆囊制作动物模型,测BSP均值为17.75 mmHg,CBDP均值为6.38 mmHg。本实验测得的BSP均值(26.71 mmHg)超过报道的犬BSP值(17.75 mmHg),是否为豚鼠SO内腔狭小,测压管外径相对粗(3.5 Fr),使测得压力偏高尚不清楚。

MTL是多肽激素,主要由存在于胃窦、十二指肠、近端小肠黏膜的内分泌细胞分泌,具有协调胃肠运动和分泌的功能。可通过作用于肠道神经系统中的神经元触发消化间期移行性复合运动(MMC) III相的发生。III相期间的MTL血浆浓度达高峰。III相运动传导进入十二指肠时,可以观察到SO与十二指肠平滑肌同步强烈收缩,此时SO依赖于十二指肠平滑肌,而在I相SO持续独立性收缩。MTL可促进SO运动,刺激胆囊平滑肌收缩,增加胆汁分泌,大剂量可使动物SO强烈收缩甚至痉挛。既往研究表明,胃肠道平滑肌细胞膜上存在 Ca^{2+} 通道,可影响胃肠平滑肌收缩,平滑肌收缩时的 Ca^{2+} 来源于细胞外液 Ca^{2+} 内流和细胞内钙库 Ca^{2+} 释放^[9],

而MTL可作用于肌细胞膜,活化钙通道,刺激细胞内肌浆网释放 Ca^{2+} ,使其浓度升高,导致平滑肌细胞收缩^[10]。在本动物实验切除豚鼠胆囊的SOD模型中,SO组织中MTL通过抗体显色,测量染色阳性区的光密度参数,得出其在细胞胞浆中的蛋白表达量及血浆含量均明显高于对照组($P<0.05$),其结果与MTL活化钙通道,释放 Ca^{2+} ,增加平滑肌收缩机制一致。本动物实验豚鼠SOD模型MTL在其SO组织中的蛋白表达量及血浆含量均明显高于对照组($P<0.05$);本临床研究SOD患者血浆中MTL含量亦高于对照组($P<0.05$),与报道SO运动功能不足的患者血浆中MTL含量低于对照组的结论^[11]相符,说明胃动素具有收缩SO的作用,可能与SOD的发生有关。

NT是一种脑与胃肠肽,分布于胃肠黏膜开放型N细胞中,回肠分布最多,空肠亦可见,部分存在于肠神经纤维内,可通过其特异性受体作用于神经中枢和外周消化系统。NT可降低人类食管下括约肌压力、抑制胃肠蠕动及胃排空动力作用明显,尚可刺激胰腺分泌^[12]。NT对SO的影响研究较少。报道犬的胆囊和SO中存在NT特异性受体,大量NT可使犬与豚鼠的胆囊收缩运动增加42%~48%,亦可导致SO收缩^[13]。本实验中,豚鼠SOD模型SO组织NT的蛋白表达量及血浆含量与对照组比较均相应增高($P<0.05$),且在我们临床研究中,SOD患者血浆中NT含量较对照组升高($P<0.05$),提示NT可影响SO的运动功能。

NOS是非肾上腺素能非胆碱能神经调控的抑制性神经递质,具有神经传导、胃肠保护、调节内分泌

泌等功能^[14]。硝基脂是一氧化氮前体,临床上应用硝基脂类药物,如给予硝酸甘油可促进一氧化氮释放,可使 SO 松弛^[15],以前曾有助于促进胆管结石排出和提高 ERCP 插管成功率。已有研究表明,NOS 广泛分布于 SO 平滑肌中,且通过 NOS 抑制神经元对 SO 的运动起到抑制的作用^[16]。在本实验中通过组织病理学检测可见 SO 肌层中存在大量 NOS 细胞,豚鼠 SOD 模型 SO 组织 NOS 的蛋白表达量明显减少($P<0.05$),证实了 NOS 具有抑制 SO 运动,降低 SO 压力的作用。

综上所述,我们观察到 SOD 模型豚鼠血浆中 MLT 和 NT 的含量增加以及其 SO 中 MLT 和 NT 的蛋白表达量高于对照组,NOS 表达低于对照组,差异具有统计学意义。此外,在临床研究的 SOD 患者中也观察到血浆中 MTL 和 NT 含量高于对照组。结果提示胆囊切除后血浆中 MTL 和 NT 水平以及其 SO 中 MTL、NT 和 NOS 蛋白表达量影响 SO 运动功能,可能与 SOD 发生有关。检测血浆中 MTL 和 NT 可能对胆囊切除后 SOD 有辅助诊断作用。但本研究例数较少,检测激素和神经递质的种类有限,而且 SOD 发生机制复杂,尚有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Sonoda Y, Takahata S, Jabar F, et al. Electrical activation of common bile duct nerves modulates sphincter of Oddi motility in the Australian possum [J]. HPB (Oxford), 2005, 7(4): 303-312. DOI: 10.1080/13651820510037639.
- [2] Fan MM, Li F, Zhang XW. Changes of the sphincter of Oddi motility in dog after cholecystectomy [J]. J Dig Dis, 2012, 13(1): 40-46. DOI: 10.1111/j.1751-2980.2011.00545.x.
- [3] 李兆申,张澍田. ERCP 高级培训教程 [M]. 北京:人民卫生出版社,2015:84-92.
- [4] Kakuyama S, Nobutani K, Masuda A, et al. Sphincter of Oddi manometry using guide-wire-type manometer is feasible for examination of sphincter of Oddi motility [J]. J Gastroenterol, 2013, 48(10): 1144-1150. DOI: 10.1007/s00535-012-0710-0.
- [5] Hall TC, Dennison AR, Garcea G. The diagnosis and management of Sphincter of Oddi dysfunction: a systematic review [J]. Langenbecks Arch Surg, 2012, 397(6): 889-898. DOI: 10.1007/s00423-012-0971-3.
- [6] Cicala M, Habib FI, Fiocca F, et al. Increased sphincter of Oddi basal pressure in patients affected by gall stone disease: a role for biliary stasis and colicky pain? [J]. Gut, 2001, 48(3): 414-417.
- [7] Tanaka M. Function and dysfunction of the sphincter of Oddi [J]. Dig Surg, 2010, 27(2): 94-99. DOI: 10.1159/000286464.
- [8] Grivell MB, Woods CM, Grivell AR, et al. The possum sphincter of Oddi pumps or resists flow depending on common bile duct pressure: a multilumen manometry study [J]. J Physiol, 2004, 558(Pt 2): 611-622. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.061663.
- [9] Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles [J]. J Appl Physiol (1985), 2001, 91(3): 1438-1449.
- [10] 旋覆代赭汤对胃窦平滑肌细胞收缩和钙离子浓度的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(28): 2936-2939.
- [11] Zhang ZH, Wu SD, Wang B, et al. Sphincter of Oddi hypomotility and its relationship with duodenal-biliary reflux, plasma motilin and serum gastrin [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(25): 4077-4081.
- [12] Dekel R, Carraway RE, Green C, et al. The relationship between the esophageal tissue content of neurotensin and the presence or absence of esophageal inflammation [J]. Dig Dis Sci, 2004, 49(1): 42-47.
- [13] Guo YS, Singh P, Upp JR, et al. Species-specific effects of neurotensin on gallbladder contraction in vitro [J]. Dig Dis Sci, 1989, 34(1): 21-26.
- [14] Sarac B, Durmus N, Bagcivan I, et al. Investigation of relaxant effects of new agents affecting nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway on sheep oddi sphincter [J]. Pancreas, 2010, 39(6): 875-878. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181d3645b.
- [15] Woods CM, Saccone GT. Neurohormonal regulation of the sphincter of Oddi [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2007, 9(2): 165-170.
- [16] Kovsca JA, Valpotic H, Kezic D, et al. Secretion of immunomodulating neuropeptides (VIP, SP) and nitric oxide synthase in porcine small intestine during postnatal development [J]. Eur J Histochem, 2012, 56(3): e30. DOI: 10.4081/ejh.2012.e30.

(收稿日期:2017-10-26)

(本文编辑:钱程)