

通降合剂对犬胆囊切除后胆道 Oddi 括约肌功能的影响及其机制研究

刘万里¹ 颜延凤¹ 许立²

(1.南京中医药大学附属南京市中西医结合医院,江苏南京 210014; 2.南京中医药大学,江苏南京 210046)

摘要 目的:探讨通降合剂对犬胆囊切除后胆道 Oddi 括约肌(SO)功能的影响及其可能机制。方法:杂种犬随机分为假手术组和造模组,假手术组进行手术操作但不切除胆囊,造模组手术切除胆囊后随机分为通降合剂大、小剂量组和模型组。手术 1 个月后各组分别喂饲相应药物或生理盐水,每日 1 次,连续 2 周。末次给药结束后测定并比较各组犬胆总管内压、SO 肌电、SO 中肌球蛋白重链(MHC)及其 mRNA 表达。结果:通降合剂大剂量组犬 Oddi 括约肌收缩功能与胆总管内压明显低于模型组,SO 肌电振幅明显低于模型组;通降合剂大、小剂量组犬 SO 中 MHC 蛋白及其 mRNA 表达量均明显低于模型组。结论:通降合剂可能通过抑制 SO 中 MHC 的表达,降低 Oddi 括约肌收缩功能,从而降低胆总管内压力,减少胆汁反流。

关键词 通降合剂 Oddi 括约肌 肌球蛋白重链 杂种犬

中图分类号 R289.5 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2015)01-0074-04

胆囊切除后的胆汁反流可以造成胆汁反流性胃炎等食管、胃、十二指肠黏膜疾病,并且是胃黏膜癌前病变、食管癌发生的主要诱因^[1-3]。因此,研究胆囊切除后有效抑制胆汁反流的药物,对防止胆汁反流引起的诸多临床病变有积极的理论和临床意义。通降合剂为本院院内制剂,具有疏肝和胃、寒热并调的功效,为临床治疗胆囊切除后胆汁反流的有效经验方^[4]。研究显示,胆囊切除可致胆道功能失调,也是引起胆汁反流的因素之一^[3,5]。因此,本研究观察通降合剂对胆囊切除犬的 Oddi 括约肌(sphincter oddi,SO)收缩功能的影响,以及对 SO 中肌球蛋白重链(MHC)表达的影响,探讨该中药复方对胆囊切除后胆道功能的作用,为临床应用提供依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 杂种犬,体重 8~14kg,雌雄兼用,均为由南京中医药大学动物中心收购自市郊的杂种犬,试验前在该中心驯养,经检疫及驱虫后,用于该项实验。

1.2 实验仪器 ML870 PowerLab 830 型 Powlab 多道生理记录仪及其附件,澳大利亚 ADInstruments 公司;Western 电泳,美国 Bio-Rad 公司;UV-2450 紫外光度仪,日本 SHIMADZU 公司;MultiGene Gradient PCR 仪,美国 Labnet 公司;凝胶成像仪,美国 BIO-RAD 公司。

1.3 药品与试剂 通降合剂,药物组成:黄连 3g、吴茱萸 5g、枳实 10g、竹茹 10g、延胡索 10g、郁金 10g、半夏 10g、陈皮 6g,由南京市中西医结合医院制剂室提供,2g(生药)/mL,批号:20130802;全蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、抗体稀释液均为南京赛研生物技术有限公司产品;内参一抗,Abcam 公司产品;二抗(羊抗兔 IgG-HRP),Jackson 公司产品。

2 实验方法

2.1 分组与造模、给药 犬随机分为假手术组和造模组。手术前动物禁食 12h,不禁水,麻醉后固定于动物手术台上,取上腹部正中切口入腹,寻找胆囊所附肝叶并牵出腹腔,0# 线结扎胆囊管后分离胆囊床并完整切除胆囊(假手术组牵出胆囊所附肝叶后于腹腔外暴露 5min),依次缝合切口。术后正常饲养 1 个月。假手术组共 6 只,造模组 18 只。术后 1 个月将造模成功的犬随机分为通降合剂大、小剂量组和模型组,每组 6 只。同时开始喂饲给药,通降合剂大、小剂量组分别给以 12g/kg、3g/kg 的通降合剂,相当于人日用量的 12 倍和 4 倍,假手术组和模型组给予等体积饮用水,每日 1 次,连续 2 周。

基金项目:南京市科技发展资助项目(201104018)

2.2 胆道内压力测定 给药结束当天,动物麻醉后行剖腹手术,应用多通生理仪进行胆道内压力测定。将一带乳胶囊的塑料导管连接至压力换能器,导管及胶囊内充水,通过肌肉挤压水囊测定压力。水囊插入胆总管测压,连续描记压力图,记录各组动物基础压及压力峰值、频率。以十二指肠压力为基值,测定胆总管内压。

2.3 Oddi 括约肌(SO)肌电描记 应用多道生理仪测定 SO 肌电,用 Pull through 法将铂金黏膜接触电极置于 SO 并与多道生理生物电采集处理系统连接。先将电极头部置于胆总管内,然后缓慢向十二指肠方向拖出,调整电极位置,稳定 10min 以上后开始记录 SO 肌电变化,设定参数为:扫描速度 1s/div、灵敏度 200 μ V、时间参数 1s、滤波频率 10Hz 或 30Hz,肌电图形最后经高通 10Hz 数字滤波处理,肌电信号采集处理软件系统处理后储存。以 Oddi 括约肌肌电簇(myoelectronicactivity of SO, MASO)作为观察指标,分别记录其发生的频率(frequency, F)、振幅(amplitude, A),每只动物连续稳定记录 SO 肌电 30min。

2.4 SO 中肌球蛋白重链(MHC)表达量测定 实验结束后取 SO。Western Blot 检测 SO 中功能蛋白 MHC 的表达,RT-PCR 检测 MHC mRNA 的表达。

2.5 统计学方法 用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,数据采用($\bar{x}\pm s$)表示,多均数比较用单因素方差分析,两两比较组间方差齐($P>0.05$)用 SNK 法检验,组间方差不齐($P<0.05$)用 Tamhane's T2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组犬胆囊切除后胆管内压力比较 结果见表 1。与假手术组比较,模型组胆囊切除 6 周后胆管的运动明显增强,表现为胆管内基础压和峰压明显增高,收缩时间延长,可见相互叠加的强直收缩,但收缩频率减慢,胆总管内压升高($P<0.01$)。通降合剂大剂量能明显改善胆囊切除犬胆管的运动状态,其基础压和峰压均较模型组显著降低,收缩频率明显加快($P<0.05$);通降合剂小剂量组犬胆管基础压和峰

压也有下降,但与模型组比较差异不明显($P>0.05$),而收缩频率的加快与模型组比较差异显著($P<0.05$)。提示通降合剂对胆囊切除后胆管内压力的增加具有一定的改善作用。

3.2 各组犬胆囊切除后 Oddi 括约肌肌电比较 结果见表 2。与假手术组比较,胆囊切除后犬 SO 肌电频率和收缩振幅明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。通降合剂大剂量组犬 SO 肌电频率和收缩幅度均减少,其中振幅的降低与模型组比较差异显著($P<0.05$);通降合剂小剂量组犬 SO 肌电频率和振幅也有降低的趋势,但与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。提示通降合剂能一定程度改善因胆囊切除术所致 SO 肌电频率和振幅的变化。

3.3 各组犬 SO 中肌球蛋白重链(MHC)蛋白及其 mRNA 表达的比较 结果见表 3、图 1、图 2。与假手术组比较,模型组犬 SO 肌组织中 MHC 蛋白、mRNA 表达显著增加($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,通降合剂大、小剂量组 MHC 蛋白、mRNA 表达显著减少($P<0.05$)。

4 讨论

胆汁反流可归属于中医学“胃脘痛”“吐酸”“嘈杂”等范畴,因其病位在胆胃,治疗上通常采用疏胆和胃的治疗法则,并佐以健脾、温中、化湿、清热、理气、活血、化瘀等治法^[4]。对胆囊切除术后胆汁

表 1 各组犬胆道管内压力的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g/kg)	基础压力 (mmHg)	峰值压力 (mmHg)	收缩频率 (次/min)	胆总管内压 (mmHg)
假手术组	5	-	10.80 $\pm$ 2.97**	12.15 $\pm$ 3.21**	8.43 $\pm$ 1.99*	7.37 $\pm$ 1.67**
模型组	5	-	29.15 $\pm$ 6.80	30.13 $\pm$ 5.99	5.40 $\pm$ 1.09	17.20 $\pm$ 4.21
通降合剂大剂量组	5	12	20.27 $\pm$ 5.32*	22.38 $\pm$ 4.55*	7.05 $\pm$ 0.97*	12.20 $\pm$ 2.78*
通降合剂小剂量组	5	3	23.92 $\pm$ 4.55	24.85 $\pm$ 5.40	6.90 $\pm$ 1.02*	12.70 $\pm$ 2.85

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 2 各组犬胆道 Oddi 括约肌肌电的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g/kg)	MWSO	
			频率(cqm)	振幅(μ v)
假手术组	5	-	12.98 $\pm$ 1.88*	24.18 $\pm$ 5.65**
模型组	5	-	16.68 $\pm$ 2.89	45.34 $\pm$ 7.16
通降合剂大剂量组	5	12	13.42 $\pm$ 2.40	33.20 $\pm$ 3.87*
通降合剂小剂量组	5	3	15.30 $\pm$ 2.72	37.94 $\pm$ 6.84

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 各组犬胆道 Oddi 括约肌中 MHC 蛋白、mRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	剂量(g/kg)	蛋白表达量	mRNA 表达量
假手术组	3	-	0.31 $\pm$ 0.07*	0.48 $\pm$ 0.08**
模型组	3	-	0.48 $\pm$ 0.06	0.84 $\pm$ 0.06
通降合剂大剂量组	3	12	0.29 $\pm$ 0.34*	0.60 $\pm$ 0.12*
通降合剂小剂量组	3	3	0.34 $\pm$ 0.06*	0.70 $\pm$ 0.06*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

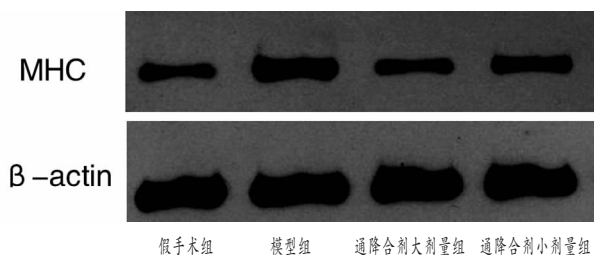


图1 各组犬 SO 中 MHC 蛋白表达的比较

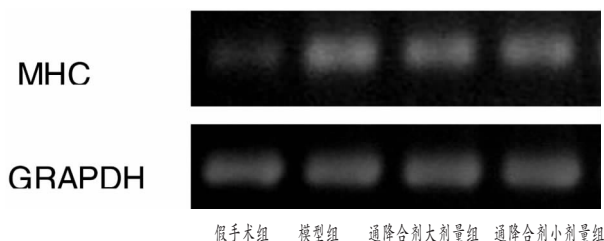


图2 各组犬 SO 中 MHC mRNA 表达的比较

反流的中医分型和治疗方药偶见报道,通常参照胆汁反流性胃炎的相关病证治疗。我们认为本病可归属于中医学“胃脘痛”等范畴,其病因为宿病胆疾,复加手术创伤,胆腑受损,其病机为肝胆疏泄失常,致胆汁反流入胃及食道。正如《灵枢·四时气》所谓“邪在胆,逆在胃”。寒热错杂是本病的主证及病理机制,根据这一病机特点我们应用疏肝清胆、和胃镇逆、寒热并调对本病进行临床治疗,取得了良好的疗效。方中黄连、吴茱萸为君药,黄连清泄肝胆郁火,吴茱萸温中理气、止痛燥湿、降逆止呕;竹茹、半夏为臣药,和胃镇逆浊;枳实、郁金、陈皮为使药,疏肝理气,以助胃气通降之力。寒热并用,正切病机而治。

现代医学认为,胆囊切除术后,胆汁的分泌、排泄不受胃肠激素及神经因素调节,胆汁直接持续排入十二指肠,刺激肠黏膜,引起肠道功能紊乱,括约肌功能失调,使胆汁反流,加上胃肠运动不协调,胆汁淤积在胃内,浓度相对增高,胆汁内脂类的主要成分可在磷脂酶 A2 作用下分解为溶血卵磷脂,它可作为一种细胞毒素,溶解脂蛋白,从而破坏胃黏膜屏障和胃上皮细胞膜^[1-2,5]。因此胆囊切除术后,胆汁反流引起的损伤不仅涉及胃肠动力障碍,同时与胆道系统功能相关。临床研究还提示,胆囊切除后胆管压力相对增高,导致胆管向肠腔排放胆汁的冲击力增大,更易引起胃肠蠕动紊乱。因此,胆囊切除术致胆管压力增大,胆汁异常排放引起十二指肠逆蠕动是加重反流的主要因素。

胆管的压力变化与 Oddi 括约肌功能密切相关,尤其在胆囊切除后^[6]。胆囊与 Oddi 括约肌均受迷走神经肝支的控制,同时它们之间也存在局部神经的

反射。因此,胆囊的存在对于 Oddi 括约肌的运动有调节作用,这种复杂的神经网络调控是协调胆汁正常排出的生理基础。在胆汁排泄的生理过程中,胆囊起着存贮和缓冲的作用,胆囊的张力升高可抑制 SO 的收缩,从而完成胆汁排泄。胆囊切除后,一方面肝脏分泌的胆汁不能被储存和浓缩,另一方面由于内环境改变,受神经、体液调节的 SO 功能也会发生相应的变化。有文献表明胆囊切除术后 6 个月患者的 Oddi 括约肌基础压和波幅有所升高,且对生理剂量的 CCK 引起的舒张效应消失^[7-8]。Oddi 括约肌收缩功能的这种改变,必然导致胆管压力的增大。本研究显示,犬胆囊切除后胆管基础压和峰压明显增高,收缩时间延长,但收缩频率减慢,胆总管内压升高,同时 Oddi 括约肌肌电频率和振幅明显增加,提示胆管总压力的增加可能与 Oddi 括约肌肌电改变有关。而决定肌肉组织收缩功能的 MHC 分子表达量增多,则表明胆囊切除术后 SO 细胞发生了适应性改变。给予通降合剂后,胆管的运动状态明显改善,其基础压和峰压均较模型组显著降低,收缩频率明显加快,而与此相应的 Oddi 括约肌肌电活动减弱,MHC 表达下降。

胆总管内含有收缩结构的平滑肌,其收缩由粗细肌丝相对滑动所引起。两条肌球蛋白重链(myosin heavy chain,MHC)相互缠绕构成了粗肌丝的杆状体部和球形头部。其球形头部具有 ATP 酶活性,在与肌动蛋白构成的细肌丝结合后水解 ATP 提供肌肉收缩的能量。因此,MHC 的表达变化也可以反映 SO 肌细胞的收缩功能的变化^[9-10]。本研究显示,胆囊切除后,SO 中 MHC 蛋白及其 mRNA 的表达均有明显升高,这至少可为犬 SO 在胆囊切除术后收缩能力增大提供部分分子水平上的解释,说明功能的改变必然伴有组织细胞结构和成分的变化,而这种改变可能与疾病的发生发展有关。

根据本实验结果,我们认为胆囊切除后 Oddi 括约肌功能的增强有可能引发不同的情形,当这种增强过大,可能导致胆汁排出受阻,从而表现为 Oddi 括约肌功能障碍综合征,当这种增强在一定范围时,可能使胆管内压力增加,并超过 Oddi 括约肌的收缩压,反而导致胆汁异常排出,引起胆汁反流的发生。而 Oddi 括约肌功能增强的程度,可能与患者的生理病理状况、手术损伤程度等有关。

综上,通降合剂可能通过抑制胆囊切除后 MHC 的高表达,改善 SO 运动功能,降低胆管总压力,从而抑制胆汁反流,这为临床应用通降合剂防治胆囊切除后的胆汁反流提供了实验依据。

醋灸法对商陆毒性和药效影响的实验研究

钦建伟 陈琳

(苏州大学附属第一医院,江苏苏州 215006)

摘要 目的:研究商陆醋灸前后毒性和药效的变化情况。方法:按照 2010 版《中国药典》商陆项下炮制方法——醋灸法对商陆进行炮制,得炮制品醋商陆。给予小鼠单次不同剂量生、醋商陆煎液灌胃,3h 后检测小鼠消化系统脏器变化情况。给予家兔不同浓度生商陆混悬液和 15.0%醋商陆混悬液滴眼,检测药物对家兔眼结膜的刺激性强度。大鼠制作盐水负荷模型,分别给予同体积生理盐水、氢氯噻嗪和生商陆、醋商陆煎液灌胃后,比较各组 5h 总尿量。小鼠随机分组后分别灌胃同体积加入墨汁的生理盐水、10%芒硝溶液和生商陆、醋商陆煎液,15min 后检测墨汁推进率。结果:单次 30 倍日用量(35.1g/kg)灌胃生商陆后,小鼠消化系统脏器病变率为 66.7%,而醋商陆各剂量组未见明显病变。各剂量生商陆混悬液滴眼后,家兔均表现出充血、水肿、分泌物等眼结膜刺激性,有确切量效关系;等剂量生、醋商陆混悬液滴眼后,生商陆组眼结膜刺激性强于醋商陆组。大鼠灌胃生、醋商陆后,尿量均增加,高剂量醋商陆组尿量显著高于高剂量生商陆组。小鼠灌胃生、醋商陆后小肠墨汁推进率均明显高于生理盐水组,生商陆组明显高于醋商陆组。结论:醋灸法能够降低商陆对黏膜的刺激性,增强利尿功效,缓和泻下作用。

关键词 商陆 醋灸 药理学 毒性

中图分类号 R282.71

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2015)01-0077-03

商陆系商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb. 或垂序商陆 *Phytolacca americana* L. 的干燥根,为历版《中国药典》收载品种,具有逐水消肿、通利二便的功效。但由于其药性峻猛、毒副作用较大,故须经严格炮制后方可入药。商陆的炮制工艺以醋灸为主^[1],本研究对商陆醋灸前后的黏膜刺激性以及利尿、泻下作用的变化情况进行了对比研究,以期验证该炮制方法的科学性。

1 实验材料

1.1 药材 生商陆购自安徽省亳州市永刚饮片有限公司(山西产,批号 20100122),经南京中医药大学王春根教授鉴定为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb. 的干燥块根。取生商陆饮片适量,按 2010 年版《中国药典》“醋灸法”项下炮制:加入 30%醋拌匀,闷润至醋被吸尽,置炒制容器内,120℃炒制 30min,取出放凉,得醋商陆^[2]。

参考文献

- [1] 张文鸿,王晓梅,黄朝荣.56 例胆结石行胆囊切除术患者胆汁反流指数(BRI)分析.中国实用医药,2014,9(7):14
- [2] 沙鑫.胆囊切除术后综合征的病因分析及对策.中外医学研究,2013,11(9):103
- [3] Chen H, Li X, Ge Z, et al. Rabepazole combined with hydrotalcite is effective for patients with bile reflux? gastritis after cholecystectomy. Can J Gastroenterol, 2010, 24(3):197
- [4] 颜延凤,陈显倩,刘万里.中西医结合治疗胆囊切除术后胆汁反流性胃炎 42 例临床观察.吉林中医药,2012,32(1):53
- [5] Baillie J. Sphincter of Oddi dysfunction. Curr Gastroenterol Rep, 2010, 12(2):130
- [6] Fan MM, Li F, Zhang XW. Changes of the sphincter of Oddi motility in dog after cholecystectomy. J Dig Dis, 2012, 13(1):40

- [7] 毕冬松,高海东,宋科英,等.胆囊切除对大白兔奥狄氏括约肌运动影响的实验研究.中国普外基础与临床杂志,2001(4):封二
- [8] 禹建峰,李智华,李晓武,等.犬双侧迷走神经干切断术对 Oddi 括约肌肌电的影响.消化外科,2006,5(3):211
- [9] 何谦,李智华,王铁虎,等.兔胆囊切除术后 Oddi 括约肌离体收缩及肌球蛋白重链表达变化.第四军医大学学报,2009,30(9):778
- [10] 王铁虎,李智华,何谦,等.钙调神经磷酸酶在兔胆囊切除术后早期 Oddi 括约肌改变中的作用.华南国防医学杂志,2008,22(5):17

第一作者:刘万里(1972-),男,医学博士,主任中医师,研究方向:中医脾胃病。

通讯作者:许立, njxyjhy@126.com

收稿日期:2014-07-23

编辑:吴宁