

肠胆反流对胆管胆色素结石形成的影响

金俊哲, 吴硕东, 苏洋, 张振海, 张立魁, 孔静

金俊哲, 吴硕东, 苏洋, 张振海, 张立魁, 孔静, 中国医科大学
附属二院普外二科 辽宁省沈阳市 110004
通讯作者: 吴硕东, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号,
中国医科大学附属二院普外二科. jccccc@sina.com
电话: 024-83955062
收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-21

Influence of duodenal-biliary reflux on formation of bile duct pigment gallstone

Jun-Zhe Jin, Shuo-Dong Wu, Yang Su, Zhen-Hai Zhang,
Li-Kui Zhang, Jing Kong

Jun-Zhe Jin, Shuo-Dong Wu, Yang Su, Zhen-Hai Zhang,
Li-Kui Zhang, Jing Kong, the Second Department
of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of China
Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province,
China

Correspondence to: Shuo-Dong Wu, the Second Department
of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of
China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District,
Shenyang 110004, Liaoning Province,
China. jccccc@sina.com

Received: 2006-02-06 Accepted: 2006-02-21

Abstract

AIM: To investigate the possible action and mechanism of duodenal-biliary reflux in the pathogenesis of bile duct pigment gallstone.

METHODS: Forty-eight patients were divided into three groups: polyp of gallbladder (PG, $n = 10$), cholecystolithiasis (CH, $n = 27$) and calculus of bile duct (CBD, $n = 11$). Bile samples were collected during operation for bacterial culture and endotoxin examination. Forty-one patients received T tube drainage after cholecystectomy and choledochotomy were divided into reflux ($n = 16$) and non-reflux group ($n = 25$) according to radionuclide examination. The activity of biliary amylase, lipase and β -glucuronidase were detected in 26 of the 41 patients.

RESULTS: The positive rate of bacterial culture was 0% in PG group, 0% in CH group and 81.8% in CBD group, and the level of endotoxin in bile was $(0.003 \pm 0.004) \times 10^{-6}$, $(0.01 \pm 0.02) \times 10^{-6}$, and $(10.12 \pm 4.49) \times 10^{-6}$ EU/L the above corresponding group, respectively. Compared

with those in the former two groups, the positive rate and endotoxin level were higher in the latter CBD group ($P < 0.01$). Sixteen patients showed duodenal-biliary reflux (39.02%) among 41 patients. The activities of biliary amylase, lipase and exogenous β -glucuronidase in reflux group was significantly higher than those in non-reflux group (amylase: $79\ 891 \pm 91\ 152$ nkat/L vs 582 ± 928 nkat/L, $P < 0.01$; lipase: $86\ 110 \pm 58\ 255$ nkat/L vs $6\ 124 \pm 7\ 500$ nkat/L, $P < 0.01$; β -glucuronidase: $27\ 789 \pm 13\ 849$ nkat/L vs $15\ 369 \pm 7\ 533$ nkat/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Duodenal-biliary reflux can promote the formation of pigment gallstone through bacteria, endotoxin, amylase, lipase and exogenous β -glucuronidase.

Key Words: Duodenal-biliary reflux; Pigment gallstone; Bacteria; Endotoxin; Amylase; Lipase; β -glucuronidase

Jin JZ, Wu SD, Su Y, Zhang ZH, Zhang LK, Kong J. Influence of duodenal-biliary reflux on formation of bile duct pigment gallstone. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):727-730

摘要

目的: 探讨肠胆反流与胆色素结石形成间的相关性及其可能的作用机制。

方法: 胆囊息肉组($n = 10$), 胆囊结石组($n = 27$)和胆管结石组($n = 11$)患者48例, 术中穿刺获得胆汁标本, 行胆汁细菌培养及内毒素测定。另外, 胆囊切除、胆道探查、T管引流术后患者41例根据核素检查有无肠胆反流分为反流组($n = 16$)及无反流组($n = 25$), 随机选择其中26例, 比较两组患者胆汁淀粉酶、脂肪酶及 β -葡萄糖醛酸酶活性。

结果: 胆囊息肉组、胆囊结石组、胆管结石组细菌培养阳性率分别为0%, 0%, 81.8%; 胆汁内毒素水平分别为 $(0.003 \pm 0.004) \times 10^{-6}$ 、 $(0.01 \pm 0.02) \times 10^{-6}$ 、 $(10.12 \pm 4.49) \times 10^{-6}$ EU/L; 胆管结石组细菌培养阳性率和胆汁内毒素水平明显高于前两组($P < 0.01$)。16/41例患者检

■背景资料

目前多数研究者认为, 胆色素结石的形成与细菌感染有关, 而细菌来源于肠道。但具体途径尚不明确, 或者经过十二指肠乳头逆行入胆道, 或者穿透肠黏膜屏障进入胆道。由于缺乏有效的研究方法, 关于胆石症患者肠胆反流的发生率如何以及肠胆反流促使胆管胆色素结石形成机制的研究, 国内外鲜见报道。

■研发前沿

胆石的形成受机体内外环境和遗传等多因素影响,随着 β -葡萄糖醛酸酶基因的克隆和产物表达成功,胆色素结石形成机制进入了基因领域研究,在此方面我们也同样是刚刚起步,目前还没有突破性进展。

测到十二指肠胆道反流(39.02%),反流组淀粉酶、脂肪酶和外源性 β -葡萄糖醛酸酶显著高于无反流组($79\,891 \pm 91\,152$ nkat/L vs 582 ± 928 nkat/L, $P < 0.01$; $86\,110 \pm 58\,255$ nkat/L vs $6\,124 \pm 7\,500$ nkat/L, $P < 0.01$; $27\,789 \pm 13\,849$ nkat/L vs $15\,369 \pm 7\,533$ nkat/L, $P < 0.01$)。

结论:十二指肠胆道反流可能通过细菌、内毒素、淀粉酶、脂肪酶和外源性 β -葡萄糖醛酸酶活性改变,在胆色素结石的形成中发挥作用。

关键词: 肠胆反流; 胆色素结石; 细菌; 内毒素; 淀粉酶; 脂肪酶; β -葡萄糖醛酸酶

金俊哲, 吴硕东, 苏洋, 张振海, 张立魁, 孔静. 肠胆反流对胆管胆色素结石形成的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(7):727-730

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/727.asp>

0 引言

胆石病在我国常见,尤其欧美等国家少见的肝内外胆管色素类结石病,在我国还占有很高比例。有关胆管色素结石的成因研究在相当长的一段时间内没有取得重大进展,而十二指肠胆道反流在胆管色素结石形成中的作用愈来愈引起人们的重视。我们观察到胆管胆色素结石的形成可能与十二指肠胆道反流存在一定联系。为分析二者间的相关性及可能的内在机制,我们选择临床胆石症患者进一步研究。以十二指肠胆道反流-胆管胆汁中十二指肠内含物增加-胆汁细菌、内毒素及酶学改变-胆色素结石形成作为线索,对胆管色素结石患者胆管胆汁细菌和内毒素进行观察,并以核素判断反流为基础,对胆管色素结石术后T型管引流患者分组,观察胆汁中淀粉酶、脂肪酶、 β -葡萄糖醛酸酶等系列指标,分析肠胆反流与胆管结石成因之间的关系,探讨胆色素结石的形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-05/2006-01,住院治疗患者89例,全部患者无发热及胆系感染表现,血白细胞正常。其中胆囊息肉患者10例,胆囊结石患者27例,胆管色素结石患者11例,胆囊切除、胆道探查、T型管引流术后患者41例,各组间比较差异无显著性($P > 0.05$)。T型管引流患者因为需行胆道镜检查,术后常规保留T型管2 mo左右,平均术后时间62.3(59-66) d。细菌培养原料(法国生物梅里埃公司),鲎试剂及细菌内毒素检查用水(湛

江博康海洋生物制品公司),细菌内毒素标准品(中国药品生物制品检定所),内毒素检测处理剂(天津一瑞化学试剂有限公司),酚酞葡萄糖醛酸(Sigma公司)。

1.2 方法 术中穿刺获得胆囊及胆管胆汁标本,分别行胆汁细菌培养、胆汁内毒素测定。随机选择T型管引流患者26例,根据核素检查肠胆反流,将患者分为反流组及无反流组,分别测定胆汁淀粉酶、脂肪酶及 β -葡萄糖醛酸酶活性。细菌培养采用脱纤维羊血琼脂和中国蓝培养基,细菌鉴定采用全自动细菌鉴定系统。以去热源管收集胆汁标本,每份标本平行做2管,于BET-32B型细菌内毒素测定仪上,采用动态浊度法检测胆汁内毒素。T型管引流患者于检查前禁食1夜,口服1 mL含有185 MBq的 ^{99m}Tc -DTPA(diethylene triamine pentaacetic acid)溶液,以240 mL水漱服,患者立即平卧。经T型引流管收集接下来的2 h胆汁,取20 mL,采用RM905型放射活性检测仪计数放射性活度。如胆汁中可检测到放射性活度,则判定该患者存在十二指肠胆道反流^[1]。以改良Fishman方法,分别在pH 4.6和6.8比色波长550 nm检测内、外源性 β -葡萄糖醛酸酶活性。使用日立7170A全自动生化分析仪测定胆汁淀粉酶和脂肪酶。

统计学处理 使用SPSS 11.5统计软件进行统计,用mean \pm SD表示,分别进行 χ^2 检验、 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

胆管色素结石组11例胆汁培养细菌种类分别为大肠埃希菌5例,产酸克雷伯菌2例,产气肠杆菌1例,阴沟肠杆菌1例,细菌培养阳性率达81.8%,并且都是肠道细菌。而胆囊息肉组和胆囊胆固醇结石组细菌培养全部阴性,二者间有明显差异($P < 0.01$)。胆汁内毒素水平与细菌培养结果一致,胆管色素结石组(10.12 ± 4.49) $\times 10^{-6}$ EU/L明显高于胆囊息肉组(0.003 ± 0.004) $\times 10^{-6}$ EU/L和胆囊胆固醇结石组(0.01 ± 0.02) $\times 10^{-6}$ EU/L($P < 0.01$),说明胆管色素结石与细菌及内毒素有关。口服 ^{99m}Tc -DTPA证实,41例行胆道取石T型管引流术后的患者中有16例检测到十二指肠胆道反流(占39.02%),此16例反流阳性患者的2 h胆汁中得计数为 $0.099\,6 \pm 0.162\,4$ MBq,2 h胆汁引流量 38.5 ± 17.2 mL,其余25例胆汁样品中未检测到放射性活度,2 h胆汁引流量 35.9 ± 20.6 mL。由此将T型管引流患者分为反流组16

■创新盘点

我们使用了核素判定肠胆反流的新方法,以胆道探查、T型管引流术后患者为依托进行分组,并比较胆汁中各有效促成石成分,系统地进行了肠胆反流的发生及其与胆管胆色素结石形成的关系研究。

表 1 胆汁淀粉酶、脂肪酶和 β -葡萄糖醛酸酶活性 (mean \pm SD, nkat/L)

分组	n	淀粉酶	脂肪酶	β -葡萄糖醛酸酶	
				外源性	内源性
反流组	10	79 891 \pm 91 152 ^b	86 110 \pm 58 255 ^b	27 789 \pm 13 849 ^b	1 377 \pm 669
无反流组	16	582 \pm 928	6 124 \pm 7 500	15 369 \pm 7 533	1 217 \pm 584

^b $P < 0.01$ vs 无反流组.

例和无反流组25例. 随机选取反流组10例及无反流组16例测定胆汁淀粉酶、脂肪酶和 β -葡萄糖醛酸酶活性, 两组间性别、年龄分布和引流量比较, 差异无显著性($P > 0.05$). 胆汁淀粉酶、脂肪酶和外源性 β -葡萄糖醛酸酶活性均较无反流组明显增高($P < 0.01$, 表1), 两组间数值相差达几倍至上百倍; 而内源性 β -葡萄糖醛酸酶活性两组间无统计学差异($P > 0.05$).

3 讨论

胆色素结石的形成是一种与细菌感染、胆汁成分代谢异常、胆汁淤滞等多种因素相关的多机制参与的病理过程^[2-4]. 我们再次证实, 胆管色素结石组胆汁中细菌及内毒素远高于胆囊息肉组和胆囊胆固醇结石组, 细菌及内毒素与胆管色素结石具有密切关系. 那么细菌及内毒素的来源就成为问题的焦点, 十二指肠内容物胆道反流和细菌移位^[5]及内毒素吸收入血^[6]是已知的两种原因, 我们倾向于十二指肠胆道反流起更重要作用, 不仅仅是细菌和内毒素, 十二指肠内的其他成分也可能是胆色素结石形成的原因. 有人发现体外成石胆汁中加入十二指肠液, 可以促进结石的形成, 但没有人体实验结果支持. 为了观察二者之间的相关性, 分析其可能的作用机制和地位, 我们选用了临床实验, 对相关指标进行了检测. 肠胆反流是一种非正常现象, 只有在一些病理情况下, 如胆肠吻合术后或Oddi括约肌切开等, 才存在肠胆反流. 而对于正常人及未处理Oddi括约肌的胆石症患者是否存在肠胆反流研究尚少, 且无统一的检查手段, 临床上能确定十二指肠胆道反流的有效方法较少. 我们对胆道取石T管引流术后的患者采用^{99m}Tc-DTPA检测十二指肠胆道反流, 其原理是高分子量的^{99m}Tc-DTPA不能穿透肠道黏膜, 并且不经肝脏排泄. 因此如果在胆汁中测到放射性活度, 则判断存在肠胆反流. 我们发现41例T管引流术后患者中16例存在明显的肠胆反流, 发生率为39.02%. 可见在此类患者中肠胆反流这种异常现象发生

率非常高, 其他研究表明胆总管探查取石及T型管引流术后患者胆总管结石再发率达10.3%左右, 这可能也与十二指肠胆道反流高发生率有关^[7]. 为评价十二指肠胆道反流在胆色素结石形成中的作用, 以此检查为依托将胆汁标本分为反流组和无反流组, 进一步检测其成分区别来判定十二指肠胆道反流在胆色素结石形成中的意义. 结果可见, 反流组胆汁中淀粉酶、脂肪酶含量和外源性 β -葡萄糖醛酸酶明显高于非反流组, 这些现象证实了胆色素结石与十二指肠胆道反流之间具有一定的相关性. 发生肠胆反流时, 十二指肠内容物主要包含有食物、细菌、各种消化酶及激素等进入胆道可能与胆管色素结石形成有关.

我们认为, 十二指肠胆道反流造成胆管结石的一个重要因素是细菌. 本胆管色素结石组细菌培养的阳性率为81.8%, 并证实胆汁中细菌以肠道细菌为主. 细菌进入胆道后引起胆管结石的原因有许多学说, 1966年Maki首先提出 β -葡萄糖醛酸酶水解胆汁中的结合胆红素, 生成非结合胆红素和葡萄糖醛酸, 非结合胆红素又与胆汁中的钙离子结合, 生成不溶性的胆红素钙^[8]. 而大多数细菌都能产生 β -葡萄糖醛酸酶, 促使胆石形成^[4]. 本反流组外源性 β -葡萄糖醛酸酶远高于非反流组, 而外源性 β -葡萄糖醛酸酶主要是细菌产生的. 多数细菌还能产生磷脂酶, 降解卵磷脂成为软脂酸, 形成软脂酸钙沉淀, 同时由于胆汁中卵磷脂减少, 胆红素溶解度降低, 也可促进游离胆红素与钙结合发生沉淀, 细菌磷脂酶对磷脂的降解, 也会降低胆汁中胆固醇的溶解度促进成核^[9]. 细菌还可以产生多糖蛋白质复合物, 这种阴离子糖蛋白使细菌易于黏附到异物表面形成微小菌落, 促使胆色素沉淀和凝聚^[10]. 细菌产生的自由基是胆红素钙形成的触发因子, 使胆红素与钙形成沉淀的条件溶解度常数变小, 促使胆色素沉淀, 自由基还通过糖蛋白的作用促进成石^[11]. 除了上述原因引起结石形成以外, 细菌还可以产生内毒素, 肠道内毒素也可反流

■应用要点

由于胆管胆色素结石的形成与肠胆反流有密切关系, 因此Oddi括约肌作为防止肠胆反流发生的阀门, 他的功能状态值得注意, 临床上也可以给予相应的处理来治疗和预防胆管胆色素结石, 如调控Oddi括约肌的药物等, 并需重新评价Oddi括约肌切开、成型以及胆肠吻合的效果和作用.

■名词解释

肠胆反流就是十二指肠液的胆道反流,也有人称之为肠胆逆流或胆肠返流。肠胆反流是一种非正常现象,只有在一些病理情况下,如胆肠吻合术后或Oddi括约肌切开等,才存在肠胆反流。

进入胆道,内毒素除了本身的疏水核心与胆汁微胶粒相互作用成核,作为结石的成核因子以外,还可能通过细胞毒效应或其他机制激活肝脏细胞、胆道上皮细胞或胆汁中的白细胞,释放内源性 β -葡萄糖醛酸酶,参与结石形成^[12]。本反流组胆汁淀粉酶和脂肪酶升高,主要有2种可能:一是富含胰酶的十二指肠液反流入胆道,二是存在胰胆管合流异常,胰液反流入胆汁^[13-14]。因此胆道反流可被认为是此结果的主要原因。胰脂肪酶是消化脂肪的主要消化酶,在胆汁中适宜的pH环境下胆盐激活胰脂肪酶,可分解甘油三酯为脂肪酸、甘油一酯和甘油^[15]。胰酶中还有胆固醇酯水解酶及磷脂酶A₂,分别水解胆固醇酯和卵磷脂,前者生成胆固醇和脂肪酸,后者生成溶血卵磷脂和脂肪酸。而脂肪酸与钙离子结合成脂肪酸钙盐,可行成结石核心^[16]。脂肪酸还与胆固醇竞争胆盐及卵磷脂的结合位点,促使胆固醇溶解度降低形成结晶。这些可能都与胆管色素结石形成有关。除了细菌、内毒素及各种酶,十二指肠内食物也可能通过反流进入胆道。反流入胆道的食物,作为胆道异物起到结石的成核作用,胆汁中的黏蛋白、胆红素钙、细菌及其他物质会围绕此核心聚集,形成结石。

基于以上结果,我们推测十二指肠胆道反流可能通过细菌、内毒素、各种酶导致胆汁内、外源性的 β -葡萄糖醛酸酶活性改变,从而在胆色素结石的形成环节中发挥作用。作为防止十二指肠液反流的Oddi括约肌,其功能状态与肠胆反流的发生存在密切的关系。人类Oddi括约肌解剖结构上与猫类相似,其特点是收缩时不能排泄胆汁,胆汁仅在收缩间期排至十二指肠。研究显示猫类及负鼠的Oddi括约肌即使在十二指肠压高达45 cm H₂O时仍能排泄胆汁而无肠胆反流发生^[17],可见功能正常的Oddi括约肌是防止肠胆反流发生的重要条件。而当Oddi括约肌功能运动不良时,便失去了对胆汁排泄所起的单向阀门作用,不能阻止十二指肠内容物逆流至胆管内,成为结石形成的重要原因。这些证据提示十二指肠胆道反流在胆管色素结石的形成中起着重要作用,而Oddi括约肌异常则可能是根源所在,这有待于进一步研究证实。

■同行评价

文章有较好的科学性、创新性和可读性,有一定的学术意义。

4 参考文献

- 1 Sun SL, Wu SD, Zhang XB. Oral (99m)Tc-DTPA simultaneous determination of duodenobiliary reflux and intestinal permeability in patients

- after choledocholithotomy plus T-tube drainage. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 593-596
- 2 Swidsinski A, Lee SP. The role of bacteria in gallstone pathogenesis. *Front Biosci* 2001; 6: E93-E103
- 3 Jayanthi V, Anand L, Ashok L, Srinivasan V. Dietary factors in pathogenesis of gallstone disease in southern India-a hospital-based case-control study. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 97-99
- 4 Stewart L, Oesterle AL, Erdan I, Griffiss JM, Way LW. Pathogenesis of pigment gallstones in Western societies: the central role of bacteria. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 891-903
- 5 Choudhry MA, Rana SN, Kavanaugh MJ, Kovacs EJ, Gamelli RL, Sayeed MM. Impaired intestinal immunity and barrier function: a cause for enhanced bacterial translocation in alcohol intoxication and burn injury. *Alcohol* 2004; 33: 199-208
- 6 Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Patsoukis N, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopu CD. Evidence for intestinal oxidative stress in obstructive jaundice-induced gut barrier dysfunction in rats. *Acta Physiol Scand* 2004; 180: 177-185
- 7 Hwang JH, Yoon YB, Kim YT, Cheon JH, Jeong JB. Risk factors for recurrent cholangitis after initial hepatolithiasis treatment. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 364-367
- 8 Rege RV. The role of biliary calcium in gallstone pathogenesis. *Front Biosci* 2002; 7: e315-e325
- 9 Sunami Y, Tazuma S, Chayama K. Is a role of phospholipase A(2) in cholesterol gallstone formation phospholipid species-dependent? *Biochim Biophys Acta* 2001; 1532: 51-59
- 10 Stewart L, Ponce R, Oesterle AL, Griffiss JM, Way LW. Pigment gallstone pathogenesis: slime production by biliary bacteria is more important than beta-glucuronidase production. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 547-553
- 11 Liu XT, Hu J. Relationship between bilirubin free radical and formation of pigment gallstone. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 413-417
- 12 Vitetta L, Best SP, Sali A. Single and multiple cholesterol gallstones and the influence of bacteria. *Med Hypotheses* 2000; 55: 502-506
- 13 Tashiro S, Imaizumi T, Ohkawa H, Okada A, Katoh T, Kawaharada Y, Shimada H, Takamatsu H, Miyake H, Todani T. Pancreaticobiliary maljunction: retrospective and nationwide survey in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 345-351
- 14 Kamisawa T, Amemiya K, Tu Y, Egawa N, Sakaki N, Tsuruta K, Okamoto A, Munakata A. Clinical significance of a long common channel. *Pancreatology* 2002; 2: 122-128
- 15 Wang DQ, Zhang L, Wang HH. High cholesterol absorption efficiency and rapid biliary secretion of chylomicron remnant cholesterol enhance cholelithogenesis in gallstone-susceptible mice. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1733: 90-99
- 16 Konikoff FM, Gilat T. Effects of fatty acid bile acid conjugates (FABACs) on biliary lithogenesis: Ppotential consequences for non-surgical treatment of gallstones. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5: 171-175
- 17 Calabuig R, Weems WA, Moody FG. Choledochoduodenal flow: effect of the sphincter of Oddi in opossums and cats. *Gastroenterology* 1990; 99: 1641-1646