

# 加贝脂对ERCP患者十二指肠乳头局部组织中VIP和nNOS表达的影响

郭志国, 韩真, 袁鹤鸣

郭志国, 韩真, 袁鹤鸣, 皖南医学院弋矶山医院消化内科 安徽省芜湖市 241001

**作者贡献分布:** 郭志国与韩真对此文所作贡献均等; 此课题由郭志国与韩真设计; 研究过程由袁鹤鸣与韩真操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郭志国提供; 数据分析由郭志国完成; 本文写作由郭志国与韩真完成。

**通讯作者:** 韩真, 教授, 241001, 安徽省芜湖市, 皖南医学院弋矶山医院消化内科. hanzhen1028@hotmail.com  
电话: 0553-5739820

收稿日期: 2011-04-07 修回日期: 2011-05-16

接受日期: 2011-05-24 在线出版日期: 2011-06-08

## Pretreatment with gabexate mesilate alters expression of vasoactive intestinal peptide and neuronal nitric oxide synthase in the duodenal mucosa of patients undergoing ERCP

Zhi-Guo Guo, Zhen Han, He-Ming Yuan

Zhi-Guo Guo, Zhen Han, He-Ming Yuan, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China

**Correspondence to:** Professor Zhen Han, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China. hanzhen1028@hotmail.com

Received: 2011-04-07 Revised: 2011-05-16

Accepted: 2011-05-24 Published online: 2011-06-08

## Abstract

**AIM:** To explore the effect of pretreatment with gabexate mesilate on the expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the duodenal mucosa of patients undergoing endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP).

**METHODS:** A total of thirty patients with unexplained abdominal pain and jaundice were recruited to the study from September 2009 to July 2010 and divided into two groups: patients intravenously infused with gabexate mesilate and those with saline before ERCP. Three minutes after infusion, specimens were taken to detect the levels of VIP and nNOS by means of double-

antibody sandwich ELISA.

**RESULTS:** The level of VIP (ng/L) in the papillary mucosa of patients pretreated with gabexate mesilate was significantly higher than that of controls ( $0.032 \pm 0.004$  vs  $0.031 \pm 0.002$ ,  $P < 0.05$ ), while that of nNOS showed no statistical difference between the two groups of patients. The mean content of nNOS ( $\mu\text{mol/L}$ ) in the sphincter of Oddi of patients pretreated with gabexate mesilate was significantly higher than that of controls ( $9.55 \pm 1.10$  vs  $8.29 \pm 0.56$ ,  $P < 0.01$ ), while there was no marked difference in the level of nNOS in the sphincter of Oddi between the two groups of patients.

**CONCLUSION:** Pretreatment with gabexate mesilate up-regulates the expression of VIP in the papillary mucosa and nNOS in the sphincter of Oddi in patients undergoing ERCP.

**Key Words:** Gabexate mesilate; the sphincter of Oddi; Vasoactive intestinal peptide; Neuronal nitric oxide synthase

Guo ZG, Han Z, Yuan HM. Treatment with gabexate mesilate alters expression of vasoactive intestinal peptide and neuronal nitric oxide synthase in the duodenal mucosa of patients undergoing ERCP. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(16): 1731-1734

## 摘要

**目的:** 探讨加贝脂在内镜逆行胰胆管造影术(ERCP)患者十二指肠乳头黏膜、括约肌组织中血管活性肠肽(VIP)和神经型一氧化氮合酶(nNOS)含量的影响。

**方法:** 选择2009-09/2010-07因不明原因的上腹痛、黄疸到皖南医学院弋矶山医院就诊患者,在签署知情同意后接受逆行胰胆管造影术,共30例。按随机双盲法分成加贝酯组(GM组)与对照组。GM组静脉滴注加贝酯100 mg+0.9%生理盐水100 mL以2.5 mg/(kg·h)速度静脉滴入,输液结束后3 min取材;对照组给予0.9%生理盐水100 mL静滴,取材同前。标本常规置于

## ■背景资料

目前认为避免或减少ERCP术后胰腺炎(PEP)的方法有两种,一种是术前或术中预防性用药,另外是确定危险因素。加贝酯作为一种非肽类蛋白水解酶抑制剂,常用于PEP的预防,但其具体作用机制并不明确。

## ■同行评议者

宋振顺, 教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

## ■相关报道

Di等在2002年即证实加贝酯能够松弛Oddi括约肌,但其机制并未研究;2010年Sarac等研究一氧化氮合酶/环鸟苷酸途径对山羊Oddi括约肌的影响,但未对人Oddi括约肌做相应研究。

-70℃冰箱保存,采用双抗体两步夹心ELISA测定组织内VIP及nNOS含量的变化。

**结果:** GM组十二指肠乳头黏膜中VIP(ng/L)显著高于对照组( $0.032 \pm 0.004$  vs  $0.031 \pm 0.002$ ,  $P < 0.05$ ), nNOS值较对照组无显著性差异; GM组Oddi括约肌中VIP较对照组无明显差异,而nNOS( $\mu\text{mol/L}$ )较对照组差异非常显著( $9.55 \pm 1.10$  vs  $8.29 \pm 0.56$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** 应用常规剂量的GM患者十二指肠乳头黏膜中VIP的含量增加, Oddi括约肌中nNOS的含量明显增加。

**关键词:** 加贝酯; Oddi括约肌; 血管活性肠肽; 神经型一氧化氮合酶

郭志国, 韩真, 袁鹤鸣. 加贝酯对ERCP患者十二指肠乳头局部组织中VIP和nNOS表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(16): 1731-1734

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1731.asp>

## 0 引言

由于近年来经内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)突飞猛进的发展, ERCP术后胰腺炎(post-ERCP pancreatitis, PEP)的发病率也在逐渐增加。而术中Oddi括约肌的刺激不可避免, Oddi括约肌痉挛水肿导致的插管困难是引起PEP的重要原因。加贝酯作为预防PEP的一线药物已被临床广泛应用,并证实能够松弛Oddi括约肌,但是其具体作用机制仍不详。目前多数学者倾向于非胆碱能非肾上腺素能途径,我们推测加贝酯可能与神经型一氧化氮合酶(the neuronal of nitric oxide synthase, nNOS)及血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)在括约肌组织中的表达有关。因此在该实验中我们采用ERCP和内镜下乳头括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST),应用加贝酯后获取乳头局部组织作为标本,采用双抗体两步夹心ELISA法研究VIP和一氧化氮(nitric oxide, NO)在乳头组织中的表达,探讨VIP和nNOS对PEP发病的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2009-09/2010-07到皖南医学院弋矶山医院就诊,因各种胰胆管疾病接受ERCP检查的患者,年龄18-70岁;性别不限。排除标准为:活动期急、慢性胰腺炎患者,胆总管十二指

肠痿的病例,有胆结石、嗜酒史、胰管异常、代谢性疾病及先天性胰腺囊性纤维化者。已证实为胰腺癌、十二指肠乳头癌、胆管癌者,孕妇或哺乳期妇女。总计30例,男14例,女16例。年龄32-65(平均年龄46)岁。所有患者按随机双盲法分为加贝酯[2.5 mg/(kg·h)]组及对照组,每组各15例。加贝酯组:15例,男6例,女9例,年龄32-59(平均年龄42)岁;对照组:15例,男7例,女8例,年龄35-65(平均年龄46.5)岁。检查前准备:向患者说明实验目的、实验过程、实验意义,在患者知情同意的基础上与其签署知情同意书并经过弋矶山医院伦理委员会批准。实验对象术前常规检查血常规、肝肾功能、血凝常规、血型及心电图、MRCP,禁食8-12 h,使用安定、654-2、度冷丁。PENTAX ED-3440T型电子十二指肠镜、C形臂(德国Ziehm imaging公司)、高频电刀ERBE-ICC200(德国爱尔博公司)、美国COOK针状剖开刀(HPC-2)、活检钳FG-22Q-1(日本奥林巴斯公司)等仪器。加贝酯:常州金远药业制造有限公司,产品批号,每安瓶100 mg、nNOS定量检测试剂盒、VIP定量检测试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品、37℃恒温箱、标准规格酶标仪、精密移液器及一次性吸头、蒸馏水等。

### 1.2 方法

**1.2.1 用药:** 加贝酯组:静脉滴注加贝酯100 mg+0.9%生理盐水100 mL以2.5 mg/(kg·h)速度静脉滴入,输液结束后3 min取材。选用加贝酯剂量是降低PEP事件的最低药物浓度<sup>[1]</sup>,对照组给予0.9%生理盐水100 mL静滴,以3 mL/min的速度静脉滴入,取材同前。

**1.2.2 取材:** 常规插管至十二指肠降段,发现主乳头后插入造影导管。若发现乳头狭窄插管困难者先行十二指肠乳头括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)或用针型切开刀预切开后再行插管,所用高频电切,功率45 W。切开方向为十二指肠乳头上十一点处向乳头开口方向。切开长度为0.6-1.0 cm。然后用活检钳取乳头黏膜组织1块、靠近胆管开口侧取Oddi括约肌组织1块。标本迅速置于-70℃冰箱保存。

**1.2.3 观察nNOS及VIP的表达:** 活检组织常规HE染色,采用双抗体两步夹心ELISA观察nNOS及VIP的表达情况。

**统计学处理** 采用计量研究,计量数据以mean±SD表示,采用SPSS18.0软件包进行统计,统计方法为t检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。  $P < 0.05$ 为差异显著,  $P < 0.01$ 为差异非常显著。

表 1 加贝脂组与对照组VIP及nNOS的比较 (n=15)

活检部位	VIP(ng/L)		nNOS(μmol/L)	
	加贝脂组	对照组	加贝脂组	对照组
乳头黏膜	0.032 ± 0.004	0.031 ± 0.002	39.04 ± 15.06	29.93 ± 9.28
Oddi括约肌	0.030 ± 0.001	0.029 ± 0.001	9.55 ± 1.10	8.29 ± 0.56

## 2 结果

两组患者在年龄、性别构成、体质量等方面差异无统计学意义。ERCP术后两组患者无继发性胰腺炎表现。患者十二指肠乳头黏膜中VIP和nNOS的表达: VIP在加贝脂组量高于对照组 ( $P<0.05$ , 表1)。nNOS在加贝脂组量高于对照组, 但两者差异不显著; Oddi括约肌中VIP和nNOS的表达: VIP在加贝脂组量高于对照组, 两者差异不显著; nNOS在加贝脂组量明显高于对照组, 两者差异非常显著 ( $P<0.01$ , 表1)。

## 3 讨论

加贝脂是一种蛋白酶抑制剂, 被广泛应用于急性胰腺炎的治疗, 特别是PEP预防<sup>[2-5]</sup>。孟凡冬等<sup>[6]</sup>证实国产加贝脂持续静脉滴注能够有效减少ERCP术后胰腺炎发生率, 减少高淀粉酶血症的发生。值得注意的是, 国外学者通过内镜下括约肌测压发现加贝脂还能够有效的抑制Oddi括约肌运动, 减少插管次数, 降低PEP的发病率, 但是其具体作用机制并不详<sup>[7, 8]</sup>。

VIP是机体调节胆道运动重要的抑制性胃肠肽, 是一种重要的肠道神经递质, 主要由中枢神经和外周神经系统产生, 由副交感神经节后纤维所释放, 并与乙酰胆碱共存, 可使胆囊和Oddi括约肌舒张; VIP的分泌细胞广泛存在于胃肠道黏膜的内分泌细胞和黏膜下的细微神经纤维、肠肌神经丛, 属胰高血糖素-胰泌素家族, 同时也是一种非胆碱能肾上腺素主要神经介质; 调节舒张的VIP受体主要存在于平滑肌细胞膜上; VIP对胃肠运动的调节途径有环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)依赖的蛋白激酶途径和NO相关性途径<sup>[9]</sup>: 前者为VIP激活腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AG)使cAMP含量增加, 活化cAMP依赖的蛋白激酶A(protein kinase A, PKA), 引起平滑肌细胞超极化,  $Ca^{2+}$ 内流减少, 从而导致胃肠平滑肌舒张<sup>[10]</sup>; 在NO相关性途径中, VIP与其特异性受体结合, 产生级联放大效应: 结合Gi蛋白刺激 $Ca^{2+}$ 内流, 从而激活 $Ca^{2+}$ /钙调蛋白依赖性内皮型NOS(eNOS), 导致

NO合成增加, 再进一步激活GC, 使细胞内cGMP含量增加, 活化cGMP依赖的蛋白激酶G(protein kinase G, PKG), PKG和PKA共同作用于平滑肌, 使之舒张。Guelrud等<sup>[11]</sup>发现在使用经皮电刺激神经疗法(transcutaneous electric nerve stimulation, TENS)治疗Oddi括约肌功能障碍(sphincter of Oddi dysfunction, SOD)患者时, Oddi括约肌的松弛常伴随着血浆VIP水平的升高。

Oddi括约肌上NO的释放, 会产生有益的临床作用。包括松弛Oddi括约肌, 利于胆道结石的排出; 减少ERCP术中插管困难; 减少ERCP术后胰腺炎的发生率; 减轻SOD或吗啡所致的Oddi括约肌痉挛引起的疼痛等。但是NO对Oddi括约肌作用机制并不完全清楚<sup>[12]</sup>, 主要与一氧化氮敏感鸟苷酸环化酶(NO-sensitive guanylyl cyclase, NO-GC)的激活有关<sup>[13]</sup>。内源性NO是以左旋精氨酸(L-Arginine, L-NAA)为底物, 由NOS催化合成的。NOS为NO合成过程中的限速酶, 与NO的生成及其生物学效应密切相关。正常情况下是以Oddi括约肌黏膜下和肌层内分布为主。Sarac等<sup>[14]</sup>研究一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)/环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)途径对山羊Oddi括约肌的影响, 实验表明Oddi括约肌的松弛是由于cGMP水平的增加、5-氨基-3-(4-吗啉基)-1, 2, 3-恶二唑盐酸盐(3-morpholinolinosydnonimine hydrochloride, SIN-1)和NO增加共同激活鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC)引起。Palvolgyi等<sup>[15]</sup>在动物实验中证实NOS抑制能够增加Oddi括约肌的收缩频率和振幅, 轻度增加Oddi括约肌的活动张力; 单独应用VIP可能增加Oddi括约肌收缩, 联合应用NOS和VIP则Oddi括约肌舒张。目前认为加贝脂抑制Oddi括约肌运动机制可能是通过直接刺激非胆碱能非肾上腺素抑制性神经元, 而不是通过促进胆囊收缩素分泌间接刺激<sup>[16-18]</sup>。Takahashi等<sup>[19]</sup>通过免疫组织化学方法证实, nNOS神经纤维主要分布在人的Oddi括约肌肌层, 肌层nNOS的激活能够引起NO释放, 明显抑制Oddi括约肌收缩及电活动。

## ■应用要点

本文对加贝脂松弛Oddi括约肌的机制进行了初步探讨, 明确了加贝脂与十二指肠局部组织中VIP及nNOS的关系, 可以在ERCP操作中使用加贝脂预防胰腺炎。



# 同行评价

本文在前人以往研究的基础上,进一步探讨加贝酯对减少和减轻ERCP造成的高淀粉酶血症和急性胰腺炎发病率的机制,有较好的创新性和临床指导意义。

本实验采用双抗体夹心ELISA法检测应用加贝酯后患者十二指肠乳头局部组织中nNOS及VIP含量的变化情况,与常玉英等<sup>[20]</sup>应用免疫组织化学SABC法不同。实验结果表明加贝酯组Oddi括约肌中nNOS的含量明显高于对照组,十二指肠乳头黏膜中VIP的含量高于对照组,与上述文献结果一致。考虑与下列因素有关:(1)加贝酯组Oddi括约肌中nNOS显著增加使括约肌中NO的含量上升,后者作为第二信号因子激活非胆碱能非肾上腺素神经介导了Oddi括约肌的舒张。而十二指肠乳头黏膜变化不显著可能与nNOS的肌层分布有关;(2)十二指肠乳头黏膜中加贝酯组VIP含量明显增加,协调了Oddi括约肌舒张。但Oddi括约肌中两组VIP值无明显差异性,与VIP的选择性表达有关。我们实验不足是没有增加其他神经递质的观察如胆囊收缩素,儿茶酚胺等。本次试验结果表明nNOS和VIP作为调节胆道运动的抑制性神经介质共同参与了Oddi括约肌和胆囊运动的调节。提示Oddi括约肌中nNOS表达增加及乳头黏膜中VIP表达增多是加贝酯松弛Oddi括约肌的机制之一。关于加贝酯与胆囊收缩素,儿茶酚胺类神经递质及胃肠道间质细胞的关系仍有待我们进一步的实验研究。

志谢:感谢病理室的卢林明主任与刘银华医师在本试验中给予的大力帮助。

## 参考文献

- Masci E, Cavallini G, Mariani A, Frulloni L, Testoni PA, Curioni S, Tittobello A, Uomo G, Costamagna G, Zambelli S, Macarri G, Innocenti P, Dragonetti C. Comparison of two dosing regimens of gabexate in the prophylaxis of post-ERCP pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2182-2186
- 王丹珠. 加贝酯预防ERCP术后胰腺炎临床研究. *山东医药* 2009; 49: 78-79
- 郑明华, 陈永平, 杨新军, 李骥, 张友才, 施红旗, 曾其强. 加贝酯预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的随机对照试验的荟萃分析. *中华内科杂志* 2007; 46: 404-406
- 纪磷, 郭继中, 占强, 严洁, 王辉, 杜虎. 加贝酯预防逆行性胰胆管造影术后急性胰腺炎的临床观察. *胰腺病*

- 学 2007; 7: 43-44
- 熊光苏, 张唏文, 吴叔明, 戈之铮, 莫剑忠. 加贝酯预防ERCP术后胰腺炎的临床研究. *胰腺病学* 2005; 5: 200-202
- 孟凡冬, 吴咏冬, 冀明, 张澍田, 李文燕, 王青红, 赵海英, 杨迅. 国产加贝酯预防ERCP术后胰腺炎的临床研究. *中华消化内镜杂志* 2007; 24: 100-102
- Di FV, Mariani A, Angelini G, Masci E, Frulloni L, Talamini G, Passaretti S, Testoni P, Cavallini G. Effects of gabexate mesilate, a protease inhibitor, on human sphincter of Oddi motility. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 741-745
- Sato Y, Okamura S, Nakasono M, Aoki R, Nakamoto J, Muguruma N, Ito S. Evaluation of serum amylase and gabexate mesilate with endoscopic papillary balloon dilatation. *J Med Invest* 2007; 54: 65-71
- Holden RJ, Pakula IS. Tumor necrosis factor-alpha: is there a continuum of liability between stress, anxiety states and anorexia nervosa. *Med Hypotheses* 1999; 52: 155-162
- 陆志凯, 陈卫昌. 血管活性肠肽在调节肠黏膜屏障功能中的作用. *国际消化病杂志* 2008; 28: 226-229
- Guelrud M, Rossiter A, Souney PF, Mendoza S, Mujica V. The effect of transcutaneous nerve stimulation on sphincter of Oddi pressure in patients with biliary dyskinesia. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 581-585
- Woods CM, Saccone GT. Neurohormonal regulation of the sphincter of Oddi. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 165-170
- Friebe A, Koesling D. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. *Nitric Oxide* 2009; 21: 149-156
- Sarac B, Durmus N, Bagcivan I, Altun A, Turan M, Sencan M. Investigation of relaxant effects of new agents affecting nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway on sheep oddi sphincter. *Pancreas* 2010; 39: 875-878
- Palvolgyi A, Sari R, Nemeth J, Szabolcs A, Nagy I, Hegyi P, Lonovics J, Szilvassy Z. Interplay between nitric oxide and VIP in CCK-8-induced phasic contractile activity in the rabbit sphincter of Oddi. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3264-3266
- 彭国林, 李兆申. 加贝酯防治急性胰腺炎应用现状. *胰腺病学* 2005; 5: 177-179
- 张旻, 李平. 血管活性肠肽的研究进展. *医学综述* 2009; 15: 3235-3238
- 黎永军, 马洪升. 血管活性肠肽与消化道疾病研究新进展. *华西医学* 2005; 20: 616-617
- Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol* 2003; 38: 421-430
- 常玉英, 黄永辉, 欧阳钦, 孙诚宜. Oddi括约肌功能障碍患者乳头局部组织中血管活性肠肽和一氧化氮的改变及其意义. *临床内科杂志* 2004; 21: 668-670

编辑 李军亮 电编 何基才