

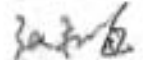
山东省自然科学基金 资助项目任务书

项目 基本 信息	项目名称		Odd 括约肌运动功能变化在豚鼠胆结石形成过程中所起作用的实验研究			
	项目编号		ZR2012HM079		项目类别	面上项目
	立项年度		2012		执行年限	2012.07-2015.07
	学科1		胆石成因、胆石症及胆道系统炎症		学科2	
项目 承担 人 信息	姓 名	张振海	性 别	男	出生年月	197303
	最高学位	博士	获得时间	2006年8月	职 称	副主任医师
	联系电话	13589084968	传 真			
	电子邮件	zhangzhenhai410@yahoo.com.cn		身份证号	372421197303080310	
	工作单位	山东省立医院		所在院所	省立医院肝胆外科	
	所在省级以上重点实验室					
项目 依 托 单 位 信息	上级主管部门		省卫生厅			
	依托单位		山东省立医院		联系人	周小明
	通讯地址		济南市经五路324号			
	邮政编码		250021		电 话	68776212
	电子邮件		sdslyy@yeah.net			
合 作 单 位 信息	单位名称					

项目组成员（前四位项目组成员应与申请书一致，最多10人，不含主持人）

姓 名	职 称	所在单位	在项目中 分担的任务	每年用于项目 工作时间(月)	签 名
蔡成坤	主任医师	山东省立医院	实验设计指导、血液指标检测	3	蔡成坤
戚国哲	主治医师	山东省立医院	胆汁指标检测	6	戚国哲
陈硕	主治医师	山东省医学影像研究所	括约肌电图及NO检测	6	陈硕
吴硕东	教授，主任医师	中国医科大学附属盛京医院	实验指导	2	吴硕东
崔现平	博士研究生	山东省立医院	动物模型建立、胃肠激素测定	6	崔现平
王志远	住院医师	山东省立医院	动物模型建立、胃肠反流测定	6	王志远
张东源	硕士研究生	山东省立医院	动物模型建立、括约肌激素测定	6	张东源
王鹏	硕士研究生	山东省立医院	动物模型建立、括约肌测压	6	王鹏

本人接受山东省自然科学基金的资助，并承诺严格遵守山东省自然科学基金委员会关于资助项目管理、财务等各项规定，切实保证研究工作时间，认真开展研究工作，按照项目申请书的内容完成各项目标。按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。

项目负责人（签章）：
2012年7月4日

我单位同意作为该基金项目的依托单位，严格遵守山东省自然科学基金委员会有关资助项目管理、财务等各项规定，提供项目实施所需的条件，并做好督促协调等工作。


依托单位（公章）
2012年7月24日

项目 资助 情况	拨款计划由省自然科学基金委员会办公室提供		
	拨款计划	总 额	当年拨款
	金额 (单位：万元)	8.0	8.0

山东省自然科学基金委办公室
(签章)
2012年7月31日

(此表请正反面打印，一式三份)

研究内容摘要（400 字以内）

Oddi括约肌是胆汁排出胆道的门户，其功能是否正常与胆结石形成关系密切。本研究拟建立豚鼠胆结石模型，研究豚鼠胆固醇结石及胆色素结石形成前后Oddi括约肌压力变化及肌电活动变化，电镜研究成石前后括约肌超微结构变化，从而明确是否存在Oddi括约肌功能障碍及结构异常。测定Oddi括约肌组织CCK(胆囊收缩素)、生长抑素等胃肠肽类激素水平及受体表达，并测定其血浆内水平，Oddi括约肌组织中一氧化氮（NO）表达，从而探讨导致Oddi括约肌功能障碍的可能原因。检测胆管汁中胰胆汁的胰淀粉酶-1、肠激酶含量及ELISA检测胃蛋白酶原法从而明确是否存在胆肠反流，探讨Oddi括约肌功能异常与成石豚鼠胆肠反流间的联系。检测胆囊及胆管胆汁中游离胆红素、总胆汁酸及钙离子等成分的变化。对胆汁进行细菌培养以明确胆道主要细菌谱变化，明确豚鼠胆结石形成过程中Oddi括约肌功能变化在其中所起的作用。从而为治疗Oddi括约肌功能异常以防治胆结石形成提供理论依据。

三、本研究的立项依据（3000 字以内）

请按以下提纲填写：

- 1、 研究意义（对基础研究，着重结合国际科学发展趋势，论述项目的科学意义；对应用基础研究，着重结合科学前沿、围绕国民经济和社会发展中的重要科技问题，论述其应用前景）；
- 2、 国内外研究现状；
- 3、 本项目的创新之处；
- 4、 主要参考文献及出处（格式：论文——作者，题目，刊名，年份，卷(期)，页码 / 专著——作者，书名，出版者，年份）。

胆石症是世界范围的常见病、多发病，其发病率呈上升趋势。胆结石的形成原因较为复杂。过去一个世纪东西方国家均曾出现过研究的高潮。以欧美为代表的西方发达国家主要侧重于发生于胆囊的胆固醇结石；而亚洲如中国、韩国、日本等国家和中国台湾地区则较为关注胆管色素结石的发病原因。⁽¹⁾

Oddi 括约肌 (the sphincter of oddi, so) 是胆汁排出胆道的门户，1887 年被匈牙利一位医学生 Oddi 发现并描述以来，长期并未受到广泛注意和深入研究。随着现代影像学技术的发展和消化道疾病认识的不断深入，逐渐发现 SO 异常与先天性胆管囊肿、胆源性胰腺炎、胆管炎、十二指肠乳头周围憩室，甚至胆囊切除术后腹痛等均有联系。SO 功能失调或障碍 (sphincter of oddi dysfunction, sod)，是胆结石发生的重要因素之一；同时，结石以及反复炎症发作亦可导致 SO 功能失调。但 SO 运动功能在胆结石形成过程中究竟发生了如何变化，通过哪些环节影响胆结石形成国内外尚缺乏此类研究。本课题组长期致力于 SO 运动功能与胆结石关系的研究。我们的既往研究发现，对于原发胆管色素结石，经十二指肠镜及钡餐检查均发现较高的乳头周围憩室发生率。² 经 T 管窦道测压提示 SO 功能下降，³ 通过口服 99mTC-DTPA 的方法及检测胰淀粉酶-1 和肠激酶含量证实了肠胆反流和胰胆反流的存在。⁴⁻⁶ 对于胆囊胆固醇结石，亦存在 SO 收缩亢进或者张力过高之现象。胆囊切除术后综合征中的 SO 异常及胆囊切除术后胆管结石的现象从一个侧面揭示某些病人的胆管结石原本是由于 SO 异常引起。

奥狄括约肌测压是公认的研究 Oddi 括约肌功能的金标准，在胆道动力学及 Oddi 括约肌功能判断上有重要意义。胆总管探查术中、术后经 T 管窦道测压和行 ERCP 时经内镜测压较为常用。最近的测压研究多侧重于药物对 Oddi 括约肌运动功能的影响及 Oddi 括约肌运动功能与胰腺炎关系方面。⁷⁻⁹ 本课题组通过胆道探索术后留置 T 型管患者进行了胆道镜观察、取石及测压研究，对 Oddi 括约肌运动功能与胆肠反流及胆结石形成的关系进行了探索，本课题的设计旨深入探索其可能存在的因果关系。

最早关于 SO 电生理的研究是 1975 年关于胃肠激素对家兔肌电活动的影响，研究发现胆囊收缩素、蛙皮素和胃泌素能够促进 SO 肌电活动，使 SO 峰电位增加，促胰液素对 SO 肌电活动无影响，而胰高血糖素能使奥狄括约肌肌电活动减弱。近年来对 SO 肌电活动研究不多，多集中于药物对肌电活动的影响方面。¹⁰⁻¹² 新近研究显示兔慢性胆管炎模型中 SO 肌电活动明显减弱。¹³ 本研究将探讨豚鼠胆色素及胆固醇结石形成过程中奥狄括约肌压力及肌电活动的变化，并对比其灵敏性，比较其在研究奥狄括约肌运动功能的优缺点。国内外尚未见对其进行联合检测的报道。

目前，经内镜 Oddi 括约肌切开术 (EST) 已成为胆总管结石重要治疗手段。但此治疗亦有其缺点，如放射线检查显示 EST 术后约 50% 胆道内有气体影，提示存在十二指肠胆道返流¹⁴。亦有研究发现 EST 术后患者肠胆返流率达 100%¹⁵。EST 术后胆结石复发率约为 9.8%¹⁶，而胆囊结石患者单纯行胆囊切除术后的胆总管结石发生率仅为 2.5% 左右¹⁷，可见 Oddi 括约肌破坏与结石再发关系密切。胆总管探索取石及 T 型管引流术后患者胆总管结石再发率为 10.3% 左右，与 EST 术后无明显差别。胆色素结石患者是否存在 Oddi 括约肌运动功能障碍及十二指肠液返流很值得深

入探讨。为验证胆肠反流与 Oddi 括约肌运动功能及胆石症关系,我们设计了多种检查肠液是否反流入胆道的方法,即是否存在 SO 关闭功能异常或存在胆胰液流入十二指肠的 SO 单向阀门失常之现象。我们采用对胆管色素结石行胆道探查术后 2~3 个月的病人口服 99mTC- DTPA 后留取 T 管胆汁,测定其放射性核素含量以判定胆肠反流存在的方法。我们分析了胆管胆色素结石等患者胆汁的胰淀粉酶-1、肠激酶含量。发现色素结石病人两者都高;这说明原发性胆色素结石不但有肠胆反流而且有胰胆反流的存在。那么,胆色素结石发生的 SO 改变两者谁是因,谁是果呢?笔者观察认为 SO 的改变应是在先。当然在有说服力的研究成果未出现之前亦不能否认不同程度先有结石或细菌破坏 SO,反过来促进结石进一步形成之可能。

不可否认,关于胆固醇结石成因的研究目前已经比较透彻。其中肝脏代谢、胆汁中胆固醇过饱和及胆囊胆汁淤滞,包括胆囊运动功能下降、吸收和分泌障碍都不同程度地参与了胆石的形成。但我们也应看到某些胆囊结石病人胆囊收缩力正常或增高,但排胆功能反而降低。令人疑惑是否存在 SO 收缩亢进或者 SO 张力过高之现象。约有 10% 甚至以上的胆囊切除术后病人出现消化道症状及腹痛,被称为胆囊切除术后综合征。当除外其他器官病变后,发现 SO 异常 (SOD), 治疗后可有改善。这从一个侧面揭示某些胆囊结石病人是由于 SO 异常引起。胆囊结石的主因还应考虑为肝脏胆汁的异常代谢,在这里 SO 目前尚不能被认为起着主要作用。当然胆固醇胆囊结石时 SO 应当表现为张力增高,形态学尚呈现狭窄,恰与胆色素结石情形相反。

胃肠肽类激素对 Oddi 括约肌运动功能起到调控作用,一般认为,胆囊收缩素对人类 Oddi 括约肌具有松弛作用。CCK 可直接作用于 Oddi 括约肌或间接通过神经机制调节 Oddi 括约肌功能。其受体广泛分布于 Oddi 括约肌及其节后副交感神经纤维,通过胆碱能机制使 Oddi 括约肌松弛。但 CCK 并不能缓解 Oddi 括约肌痉挛,如 Krishnamurthy et al¹⁸ 研究发现 Oddi 括约肌痉挛患者在使用 CCK-8 后胆囊收缩,胆汁返流入肝内外胆管,而停止注射时胆汁返流入胆囊。目前,对生长抑素对 Oddi 括约肌的作用尚存在争议。一些学者认为生长抑素对 Oddi 括约肌的作用表现为双相性,即小剂量时有兴奋作用,大剂量时则表现为抑制作用。¹⁹⁻²⁰ 一般认为 VIP 对 Oddi 括约肌运动功能具有抑制作用。Bandyopadhyay 证实了负鼠 Oddi 括约肌存在 VIPmRNA 的表达。²¹ Zou 等发现单独注射 VIP 对豚鼠 Oddi 括约肌运动无明显影响,但同时使用 CCK 时 VIP 可拮抗 CCK 对 Oddi 括约肌的作用。²² Guelrud et al²³ 发现在使用经皮电刺激神经治疗 Oddi 括约肌功能障碍患者时,Oddi 括约肌的松弛伴随着血浆 VIP 水平升高。

此课题的目的即在于对 SO 运动功能与胆结石关系的研究在已有工作的基础上进行进一步研究。SO 运动功能与胆结石形成的先后及因果关系方面研究较少,缺乏证据。本研究通过建立豚鼠胆红素及胆固醇结石模型,在成石过程中观察 SO 运动功能的变化,通过不同时段胆汁分析及 SO 运动功能检测,探讨 SO 功能变化改变的可能原因及在哪些方面影响结石的生成,分析其与胆石形成的先后及可能的因果关系。从而为胆石症的防治提供理论基础。

1. 吴硕东.Oddi 括约肌异常与胆结石的关系.中国实用外科杂志,2010,30(5):353-355
2. 吴硕东,王昊霖,张振海,王敏飞,田雨,苏洋.原发性胆管胆色素结石与十二指肠憩室的关系[J].中华消化外科杂志,2008,7(5):380-381.
3. 田忠,吴硕东,孔静,张振海.胆管结石病人术后经 T 管窦道胆道镜 Oddi 括约肌测压的表现及意义[J].世界华人消化杂志,2006,14(11):1119-1123.
4. Xian GZ, Wu SD, Chen CC, et al. Western blotting in the diagnosis of duodenal- biliary and pancreaticobiliary refluxes in biliary diseases[J].Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2009,8(6):608-613.
5. Wu SD,Yu H,Sun JM. Bacteriological and electron microscopic examination of primary intrahepatic stones [J]. Hepatobiliary PancreatDisInt,2006,5(2):228-231.
6. Wu SD,Tian Y,Kong J,et al. Possible relationship between cholecystectomy and subsequent occurrence of primary common bile duct stones:a retrospective review of data[J].Hepatobiliary PancreatDisInt,2007,6(6):627-630.

7. Güitrón-Cantú A, Segura-López F, Limones-Ortiz G, Rascón C, Moreno-Ávalos S, Pérez-Solís L. Effect of different doses of fentanyl and butylhyoscine on the rabbit's sphincter of Oddi. *Rev Gastroenterol Mex.* 2011 Apr-Jun;76(2):89-96.
8. Koo HC, Moon JH, Choi HJ, Hwang KH, Maeng HJ, Kim HK, Park JK, Hong SJ, Cheon YK, Cho YD, Lee JS, Lee MS. Effect of transdermal fentanyl patches on the motility of the sphincter of oddi. *Gut Liver.* 2010 Sep;4(3):368-72. Epub 2010 Sep 24.
9. Fischer M, Hassan A, Sipe BW, Fogel EL, McHenry L, Sherman S, Watkins JL, Schmidt S, Lazzell-Pannell L, Lehman GA. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography and manometry findings in 1,241 idiopathic pancreatitis patients. *Pancreatology.* 2010;10(4):444-52. Epub 2010 Aug 19.
10. Li ST, Chen XW, Zhao HM, Li N, Yan J, Hu ZA. Effects of orexins on myoelectric activity of sphincter of Oddi in fasted rabbits. *Acta Pharmacol Sin.* 2006 Feb;27(2):212-6.
11. Xie YF, Liu JZ, Liu CY. Effect of nucleus raphe obscurus on myoelectric activity of sphincter of Oddi in rabbits. *Acta Pharmacol Sin.* 2006 Feb;27(2):212-6.
12. Zhang M, Ding CH, Zhang LW, Yang SY. [Role of nitric oxide in the reflex of raising biliary pressure]. *Sheng Li Xue Bao.* 2000 Feb;52(1):64-8.
13. Liu YK, Li ZH, Liu NZ, He Q, Lin H, Wang XJ, Li XW, Dong JH. Reduced myoelectric activity in the sphincter of Oddi in a new model of chronic cholangitis in rabbits: an in vivo and in vitro study. *Neurogastroenterol Motil.* 2010 Aug;22(8):927-34, e238-9.
14. Greenfield C, Cleland P, Dick R, Masters S, Summerfield JA, Sherlock S. Biliary sequelae of endoscopic sphincterotomy. *Postgrad Med J.* 1985 Mar;61(713):213-5.
15. 魏义, 张寅, 王凯, 吴硕东. 胆管空肠 Roux-en-Y 吻合与内镜下乳头肌切开术后肠胆返流与胆汁排泄的对比研究. *肝胆外科杂志.* 2003;11(4):119-120
16. Uchiyama K, Onishi H, Tani M, Kinoshita H, Kawai M, Ueno M, Yamaue H. Long-term prognosis after treatment of patients with choledocholithiasis. *Ann Surg.* 2003 Jul;238(1):97-102.
17. Anwar S, Rahim R, Agwunobi A, Bancewicz J. The role of ERCP in management of retained bile duct stones after laparoscopic cholecystectomy. *N Z Med J.* 2004 Oct 8;117(1203):U1102.
18. Krishnamurthy GT, Krishnamurthy S, Watson RD. Characterization of basal hepatic bile flow and the effects of intravenous cholecystokinin on the liver, sphincter, and gallbladder in patients with sphincter of Oddi spasm. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31(1):85-93. Epub 2003 Oct 22.
19. Woods CM, Mawe GM, Shaffer EA, et al. Effects of bioactive agents on biliary motor function. *Curr Gastroenterol Rep.* 2003;5(2):154-159.
20. 王纯巍, 陆星华, 陈元方, 等. 生长抑素及其类似物对犬奥迪括约肌运动的作用. *中华医学杂志.* 2000;80:621-623.
21. Bandyopadhyay A, Chakder S, Lynn RB, et al. Vasoactive intestinal polypeptide gene expression is characteristically higher in opossum gastrointestinal sphincters. *Gastroenterology.* 1994;106(6):1467-1476.
22. Zou S, Zhang J, Qiu F. Influence of octapeptide of cholecystokinin, vasoactive intestinal peptide and substance P on dynamics of biliary system and cardiovascular system. *Chin Med J (Engl).* 1998;111(12):1071-1074.
23. Guelrud M, Rossiter A, Souney PF, et al. The effect of transcutaneous nerve stimulation on sphincter of Oddi pressure in patients with biliary dyskinesia. *Am J Gastroenterol.* 1991;86(5):581-585.

五、研究方案

1、研究内容、研究目标和拟解决的关键科学问题（3000 字以内）

一、研究目标

目标一：研究豚鼠胆色素结石及胆固醇结石形成过程中不同时段 Oddi 括约肌肌电活动、压力及超微结构变化，明确成石与 Oddi 括约肌运动功能的关系。

目标二：研究豚鼠胆色素结石及胆固醇结石形成过程中不同时段胃肠肽类激素变化及 NO 变化，明确 Oddi 括约肌运动功能变化的可能原因。

目标三：研究豚鼠胆色素结石及胆固醇结石形成过程中不同时段胆汁中的胰淀粉酶-1、肠激酶含量及胃蛋白酶含量从而明确是否存在胆肠反流，探讨 Oddi 括约肌运动功能与胆肠反流及结石形成的关系。

目标四：检测成石过程中胆囊及胆管胆汁中游离胆红素、总胆汁酸及钙离子等成分的变化。对胆汁进行细菌培养以明确胆道主要细菌谱变化，探讨其与 Oddi 括约肌运动功能改变的关系。

二、研究内容

本项目拟通过以下研究内容，实现以上目标：

实现目标一：研究豚鼠胆色素结石及胆固醇结石形成过程中不同时段 Oddi 括约肌肌电活动、压力及超微结构变化。

通过豚鼠摄入致石饲料分别建立胆色素结石及胆固醇结石模型，对 2w, 4w, 6w, 8w 及 10w 等几个时段组在满时段时进行下述指标测定：

- a. Oddi 括约肌压力测定各组 Oddi 括约肌基础压力、收缩幅度、收缩频率、收缩间期及胆总管压等指标变化，明确 Oddi 括约肌运动功能改变。
- b. 利用电生理方法记录各组 Oddi 括约肌的肌电活动，Oddi 括约肌肌电簇及 Oddi 括约肌锋电位变化作为指标，并明确肌电活动与压力变化的关系。
- c. 常规制片，透射电镜观察 Oddi 括约肌细胞骨架结构排列，密体、密斑分布，肌丝及细胞器变化，平滑肌细胞及肌成纤维细胞变化。明确 Oddi 括约肌功能变化是否存在超微器质变化，探讨功能变化原因。

实现目标二：研究豚鼠胆色素结石及胆固醇结石形成过程中不同时段胃肠肽类激素变化及 NO 变化。

- a. 放射免疫法测定各组不同时段血浆 CCK、生长抑素及 VIP 变化，明确其与 Oddi 括约肌运动功能改变间联系。

b. RT-PCR 等分子生物学方法检测中 Oddi 括约肌中 CCK、生长抑素及 VIP 受体 mRNA 的表达，明确受体变化，放射免疫法测定 Oddi 括约肌中 CCK，生长抑素及 VIP 变化，明确其与 Oddi 括约肌运动功能改变间联系。

c. 作为一种Oddi括约肌中重要抑制性神经递质，一氧化氮合酶（NOS）阳性神经元的分布与Oddi括约肌肌电关系密切。明确一氧化氮合酶阳性神经元分布与Oddi括约肌肌电活动及运动功能关系。

实现目标三：研究豚鼠成石过程中不同时段胆汁中的胰淀粉酶-1、肠激酶含量及胃蛋白酶含量从而明确是否存在胆肠反流，探讨 Oddi 括约肌运动功能与胆肠反流及结石形成的关系。

a. 测定成石过程中，生化分析仪测定胆囊及胆管胆汁中胰淀粉酶和胰脂肪酶含量，以胰淀粉酶 >100 U / L，胰脂肪酶 >60 U / L 为阳性标准观察和判定肠胆反流的存在。明确胆肠反流与Oddi括约肌运动功能间关系。

b. Western blotting 法检测胆囊及胆管胆汁中肠激酶含量变化以判定肠胆反流的存在，明确其与Oddi括约肌运动功能改变间联系。

实现目标四：检测成石过程中胆囊及胆管胆汁中游离胆红素、总胆汁酸及钙离子等成分的变化。对胆汁进行细菌培养以明确胆道主要细菌谱变化，探讨其与 Oddi 括约肌运动功能改变的关系。

a. 重氮试剂法测定胆管胆汁中游离胆红素、总胆红素、总胆汁酸，胆汁中钙离子用甲基麝香草酚蓝比色法测定，观察不同时段胆汁成分变化，并探讨其变化与胆肠反流及 Oddi 括约肌运动功能改变间可能联系。

b. 胆汁细菌培养测定大肠埃希氏菌、粪肠球菌、产酸克雷伯菌等细菌在各组胆囊及胆管胆汁中变化，探讨其与胆肠反流及 Oddi 括约肌运动功能改变间关系。

三、拟解决的关键科学问题

在理论上拟解决的关键问题是

1) 在胆管胆色素结石形成过程中，Oddi括约肌运动功能究竟在其中发挥多大作用，临床上一直处于探索循证阶段，尚无研究探索究竟Oddi括约肌功能变化在先还是结石形成在先缺乏研究。因此，本课题探讨胆色素结石形成过程中胆汁变化与Oddi括约肌功能变化及胆肠反流关系，为明确Oddi括约肌功能变化与胆色素结石形成的因果关系是非常有必要的，也为调控Oddi括约肌功能以预防胆管色素结石提供理论依据。

2) 在胆囊胆固醇结石形成过程中，Oddi括约肌运动功能可能所起的作用，临床上缺乏此类研究，多为理论上的推测。因此，本课题探讨胆囊胆固醇结石形成过程中胆汁变化与Oddi括约肌功能变化及胆肠反流关系，明确Oddi括约肌功能变化在胆囊胆固醇结石形成所起的作用非常有必要

的，也为调控Oddi括约肌功能以预防胆囊结石提供理论依据。

3) 虽然课题组此前研究发现，胆管结石患者SO 功能下降，通过核素及检测胰淀粉酶和肠激酶含量证实了肠胆反流和胰胆反流的存在。对于胆囊胆固醇结石，亦存在SO 收缩亢进或者张力过高之现象。 但Oddi括约肌运动功能与结石形成的先后及因果关系缺乏确切证据。因此，本课题将通过豚鼠结石模型深入探讨胆色素结石及胆固醇结石与Oddi括约肌功能变化间的深层关系，为胆结石防治提供理论依据。

在技术上拟解决的关键问题是

保证各实验组间的平行性、每项实验的独立性和可重复性，以及资料间的可比性。

2、拟采取的研究方法、技术路线、实验方案及可行性分析（2000 字以内）。

一、研究方法

（1）动物模型构建及分组

实验豚鼠随机分为三大组，对照组 20 只，普通饲料饲养；胆色素结石组 50 只，分为 2w，4w，6w，8w 及 10w 等 5 个时段组，每组 10 只，给予致石食谱饲养；胆固醇结石组 50 只，分为 2w，4w，6w，8w 及 10w 等 5 个时段组，每组 10 只，给予致石食谱饲养。

胆色素结石组致石食谱（g/kg）：玉米粉 136.3，黄豆粉 90.9，鱼粉 63.6，麸皮 90.9，盐 10，酵母粉 10，苜蓿粉 416.5，猪油 20，蔗糖 30，纤维素 20，胆固醇 1，胆酸 0.4，维生素 C 0.05，酪蛋白 20。

胆固醇结石组致石食谱（g/kg）：胆固醇 2%，水分 9.4%，粗灰粉 8.4%，粗纤维 11.2%，粗脂肪 4.3%，粗蛋白 19.6%，钙 1.13%，磷 0.8%。

（2）豚鼠胆色素结石及胆固醇结石形成过程中不同时段 Oddi 括约肌肌电活动、压力及超微结构变化，血液及组织标本获取。

a. 实验动物麻醉后采血，细针胆囊穿刺及胆管穿刺取胆囊胆汁及胆管胆汁，胆汁置于 Eppendorf 管内，-70℃深低温冰箱保存待测。血液置于试管中（每管 2ml），采血前放置 30 μl 10% EDTA 二钠和 30 μl 抑肽酶，混匀，4℃ 1500 转/min 离心 15 分钟，分离出的血浆装于 Eppendorf 管内，-70℃深低温冰箱保存待测。

b. 压力及肌电活动测定

豚鼠麻醉后切开十二指肠，测压管置入 Oddi 括约肌内，并植入双极金属钩状电极以采集肌电信号，缝合肠壁。首先测定压力及肌电活动，然后胃造瘘管饲以流食观察进食后压力及肌电活动变化。

1. 测压系统、原理及方法 测压器械为 PC polygram HR 高分辨、多通道胃肠功能测定仪及相应测压软件、三通道测压导管、低顺应性水灌注系统、氮气泵及 PENTEX LX-750p 纤维胆道镜。三通道测压导管长 2 米，直径 1.7mm，末端有三个侧孔，相隔 2mm，每孔开口于不同方向。

2. 观察参数 观察参数包括 Oddi 括约肌基础压、收缩频率、收缩幅度、收缩间期、十二指肠压及胆总管压，十二指肠压作为零点。

双极金属钩状电极采集到的肌电信号，放大器放大后，传入多通道生理仪，利用胃肠肌电信号采集处理软件系统处理后储存。

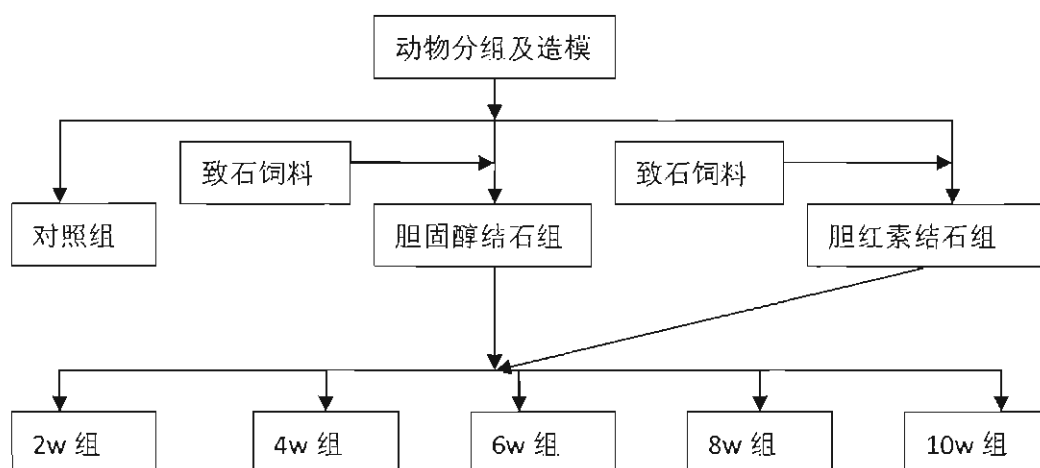
（3）一氧化氮合酶（NOS）阳性神经元，胃肠肽类激素及受体检测

测压及肌电结束后处死豚鼠，取部分 Oddi 括约肌组织，立即放入 30g/L 戊二醛溶液中固定 15min，然后切取 1mm1mm1mm 大小组织，按常规电镜标本制作方法，依次为 10g/L 四氧化锇酸后固定、脱水、染色，电镜下观察超微结构改变（细胞间紧密连接，微绒毛排列，胞质内细胞器等）。另取部分 Oddi 括约肌组织，立即于 1ml 100℃ 的生理盐水中煮沸 3min，加 0.1N 盐酸 0.5ml 于匀浆器中制成匀浆，4℃ 放置 1.5h，再用 0.1N 的 NaOH 0.5ml 中和，4℃ 3000 转/min 离心 30 分钟，取上清分装于 Eppendorf 管内，-70℃ 深低温冰箱保存待测激素及受体。采用放射免疫分析法，血浆、血清及组织标本在测定前混匀，4℃ 1500 转/min 离心 15 分钟，取上清液测定。RT-PCR 检测 Oddi 括约肌组织中胃肠肽类激素受体 mRNA 的表达。

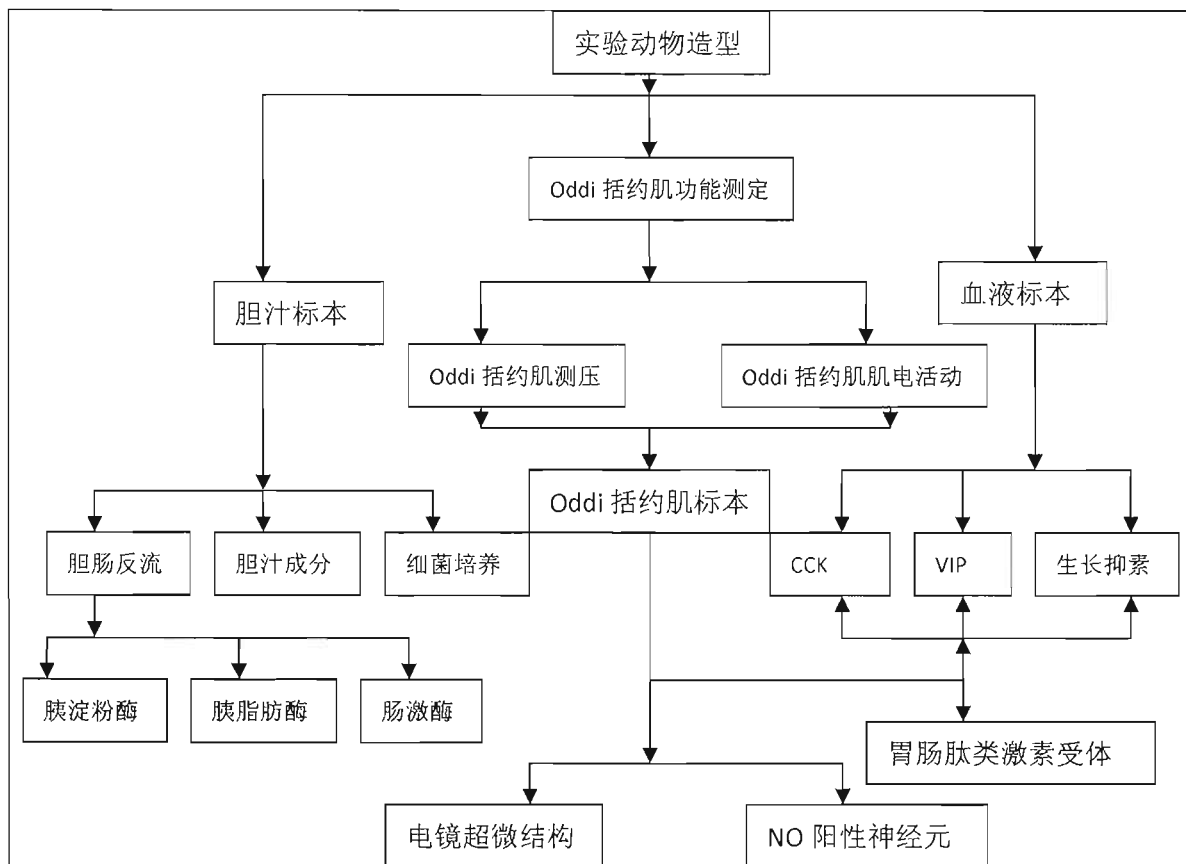
（4）检测成石过程中胆囊及胆管胆汁中游离胆红素、总胆汁酸及钙离子等成分的变化，对胆汁进行细菌培养以明确胆道主要细菌谱变化。测定大肠埃希氏菌、粪肠球菌、产酸克雷伯菌等细菌在各组胆囊及胆管胆汁中变化。重氮试剂法测定胆管胆汁中游离胆红素、总胆红素、总胆汁酸，胆汁中钙离子用甲基麝香草酚蓝比色法测定。

二、技术路线

1. 动物模型建立及分组



2、主要指标检测流程



三、可行性分析

课题组近些年来主要从事胆结石疾病成因的课题研究，在 Oddi 括约肌功能方面，胆肠反流与胆结石形成关系方面中具备深厚的研究基础，取得了阶段性的研究成果。课题组承担并出色地申请并完成了多项与胆结石疾病相关的国家自然科学基金及省级基金项目，获得 4 项国家自然科学基金资助，近年来发表 SCI 收录及中华系列杂志论文 20 余篇，并取得了多项省级科学技术奖励。

申请者在前期工作中研究了药物对 Oddi 括约肌运动功能的经胆道镜测压研究，胆结石形成过程中胃肠肽类激素发生的变化及可能发生的作用，胆肠反流与 Oddi 括约肌运动功能及胃肠肽类激素的关系。在此基础上推论 Oddi 括约肌功能改变造成胆肠反流，胆肠反流导致细菌谱及胆汁成分的变化，从而导致结石的形成。Oddi 括约肌功能失调在胆结石尤其是胆管色素结石形成过程中起到关键的作用。为此设计此课题，动态观察胆结石形成过程中 Oddi 括约肌功能变化及相应胆肠反流情况，胆汁成分及细菌谱变化，从而为 Oddi 括约肌与胆结石关系方面提供第一手的实验依据。

在前期工作中掌握了动物模型的建立方法，并掌握了胆肠反流检测、Oddi 括约肌测压、胃肠肽类激素及受体检测等核心技术，为本课题的研究提供了技术上的保证。课题组具备由良好的科研梯队，研究人员具有综合科研素质及熟练的分子生物学和病理生理学技术。课题组已与国外同行展开了长期良好的国际合作关系，在信息、生物材料、论文撰写和国际交流方面具有一定的优势

4、本研究的特色及主要创新点（1000 字以内）

本研究特色为通过建立豚鼠胆固醇结石及胆色素结石模型，深入探讨 Oddi 括约肌运动功能改变与结石形成的先后及因果关系。

主要创新点：1. 豚鼠胆结石形成过程中 Oddi 括约肌压力，肌电活动及超微结构变化，探讨 Oddi 括约肌功能在成石过程中变化。2. 成石前后胃肠肽类激素水平及受体表达变化，Oddi 括约肌组织中一氧化氮（NO）表达，从而探讨导致 Oddi 括约肌功能障碍的可能因素。3. 检测胆管汁中胰胆汁的胰淀粉酶-1、肠激酶含量及 ELISA 检测胃蛋白酶原法从而明确是否存在胆肠反流。4 尚无研究探索胆色素结石形成过程中究竟 Oddi 括约肌功能变化在先还是结石形成在先。本课题探讨胆色素结石形成过程中胆汁变化与 Oddi 括约肌功能变化及胆肠反流关系，以明确 Oddi 括约肌功能变化与胆色素结石形成的因果关系。5 成石前后胆道主要细菌谱变化及胆汁中游离胆红素、总胆汁酸及钙离子等成分的变化与 Oddi 括约肌功能关联。6. 探讨胆囊胆固醇结石形成过程中胆汁变化与 Oddi 括约肌功能变化及胆肠反流关系，明确 Oddi 括约肌功能变化在胆囊胆固醇结石形成所起的作用

5、研究工作的成果形式及知识产权、技术水平、市场前景及产业化后经济、社会效益预期结果（1000 字以内）

（1）通过建立豚鼠胆固醇结石模型，验证胆囊胆固醇结石形成过程中是否存在 Oddi 括约肌痉挛及张力增高型改变，并探讨胃肠肽类激素与受体与 Oddi 括约肌功能改变间的关联关系。

（2）通过建立豚鼠胆色素结石模型，验证胆色素结石形成过程中是否存在 Oddi 括约肌松弛，张力减低等改变，探讨 Oddi 括约肌功能与胆肠反流的关系，并探讨胃肠肽类激素与受体与 Oddi 括约肌功能改变间改变间的关联关系。

（3）研究结石形成与 Oddi 括约肌功能变化的先后关系，推论其可能存在的因果关系，论证调节 Oddi 括约肌功能对防止胆结石形成具有重要作用。

（4）总结研究成果，参加国际学术会议报告交流，拟发表 SCI 论文 2-3 篇。通过课题实施，培养研究生 1~3 名。

附件:

前期工作

1、RT-PCR 检测胆囊疾病患者胆囊组织中血管活性肠肽受体 1 及受体 2 mRNA 的表达

图 1: 胆囊结石患者及胆囊息肉患者胆囊组织中 VPAC₁-R mRNA 的表达

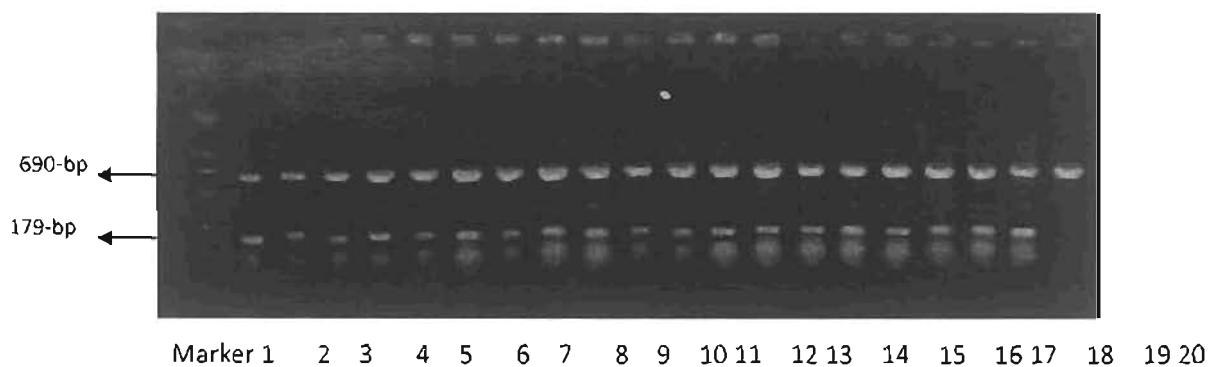
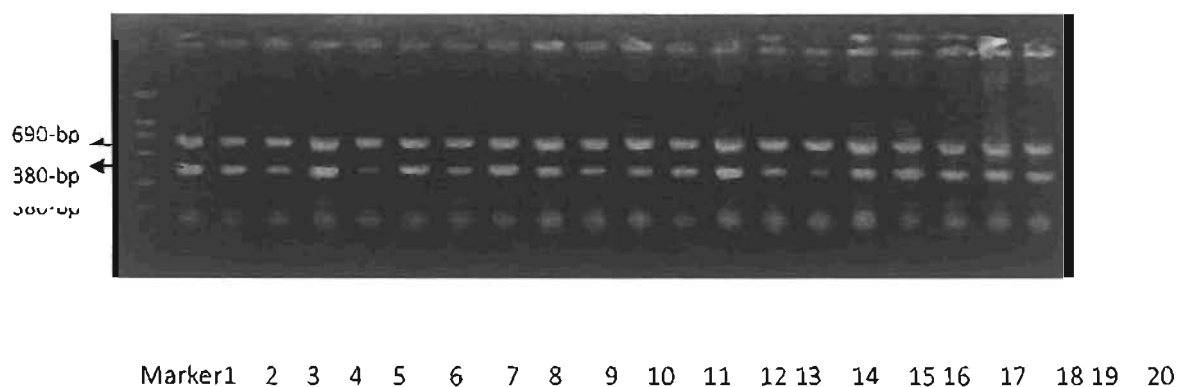
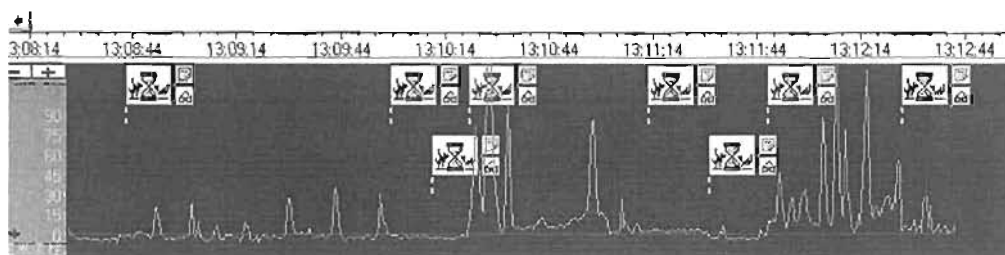


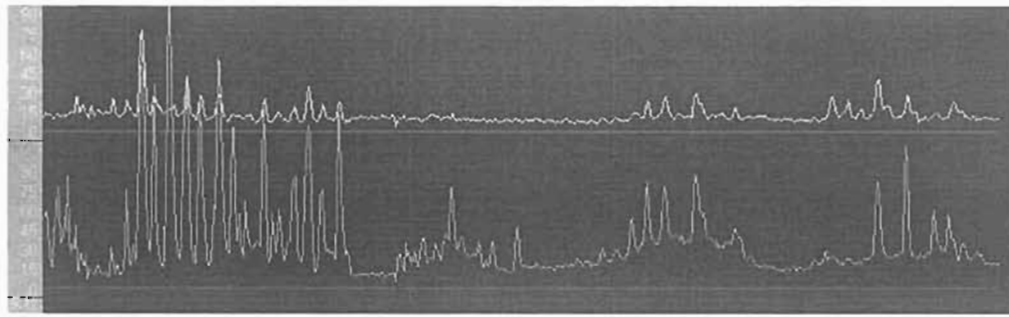
图 2: 胆囊结石患者及胆囊息肉患者胆囊组织中 VPAC₂-R mRNA 的表达



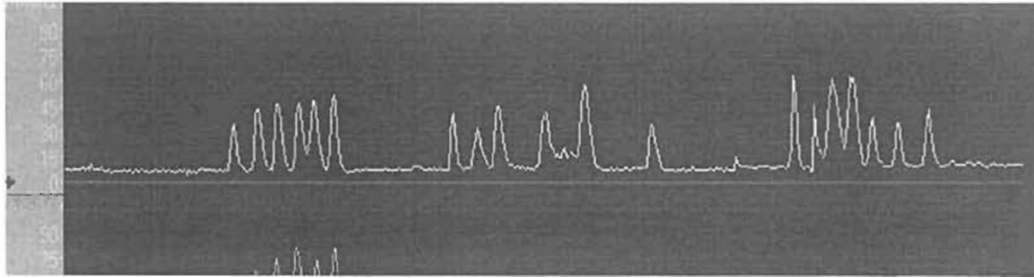
2、麻醉镇痛药品度冷丁、强痛定及曲吗多对 Oddi 括约肌动力学的影响
强痛定对 Oddi 括约肌动力学的影响



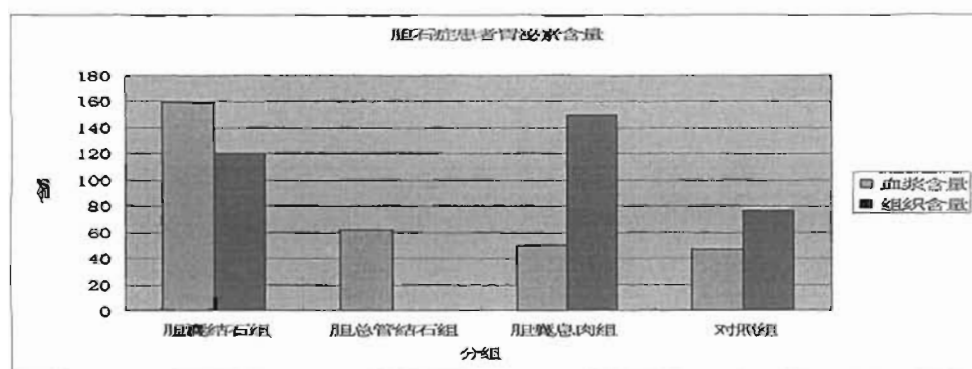
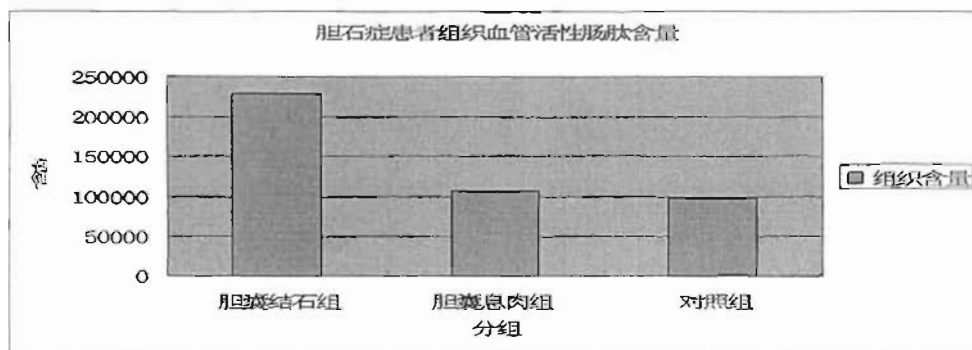
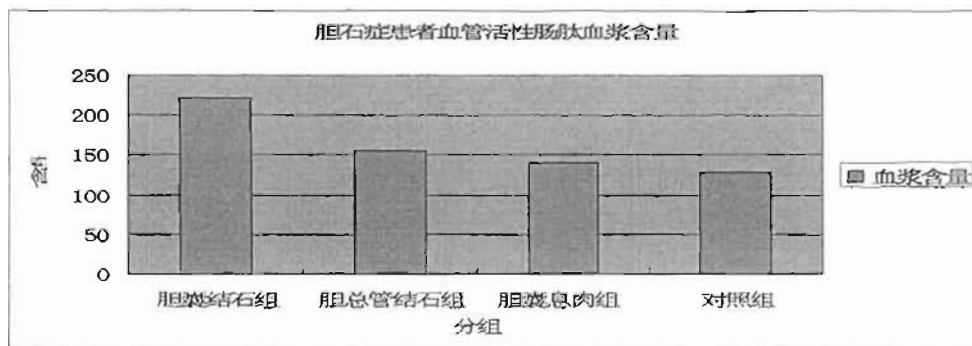
曲马多对 Oddi 括约肌动力学的影响



度冷丁对 Oddi 括约肌动力学的影响

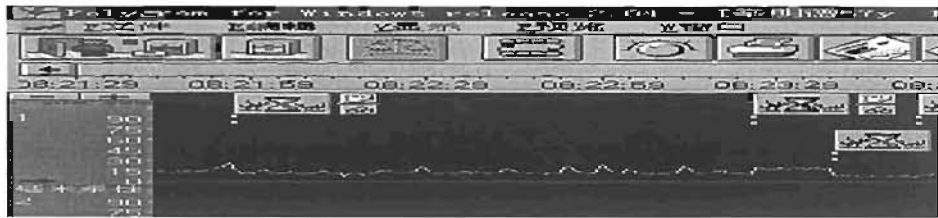


3、胃动素、胃泌素及血管活性肠肽在胆石症患者血液和组织内的含量及意义



Oddi 括约肌运动功能不良与肠胆逆流及胃动素、胃泌素关系的研究

反流组测压图



无反流组测压图

