

· 论 著 ·

## 胆囊结石形成时 Calponin、VIP 在胆囊平滑肌和 Oddi 括约肌中的表达及意义

沈 阳<sup>1</sup>, 丁佑铭<sup>2</sup>, 吕仁更<sup>1</sup>, 朱以祥<sup>1</sup>

(1. 湖北省新华医院普外科, 武汉 430015; 2. 湖北省人民医院肝胆外科 430000)

**摘要:**目的 探索血管活性肠肽(VIP)和调宁蛋白(Calponin)在胆囊平滑肌和 Oddi 括约肌中的表达, 并评估二者在胆囊胆固醇结石形成机制中的作用。方法 (1)动物模型: 新西兰兔 40 只, 随机分成对照组 20 只, 喂普通饮食; 结石组 20 只, 饲喂含 1.2 g/d 胆固醇的成石饮食 4 周。免疫组化法测定 Calponin、VIP 在胆囊平滑肌和 Oddi 括约肌中的表达。结果 结石组 16 只出现胆囊结石, 19 只出现胆固醇结晶, 对照组无结石及结晶出现; 结石组胆囊平滑肌 Calponin 和 VIP 阳性产物与对照组相比较明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), Oddi 括约肌 Calponin 和 VIP 阳性产物与对照组相比较明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Calponin 阳性表达与 VIP 呈正相关。结论 胆囊排空功能在胆囊结石形成中起重要作用, 胆囊结石家兔胆囊排空障碍与 Calponin、VIP 明显相关。

**关键词:** 胆囊结石; 调宁蛋白; 血管活性肠肽; 胆囊平滑肌; Oddi 括约肌

**中图分类号:** R657.42; R-332

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2010)05-0524-03

### Changes of vasoactive intestinal polypeptide and Calponin expression in gallbladder smooth muscle and Oddi sphincter in rabbits with cholesterol gallstone

SHEN Yang<sup>1</sup>, DING You-ming<sup>2</sup>, LV Ren-geng<sup>1</sup>, et al.

(1. Department of General Surgery, Hubei Xinhua Hospital, Wuhan 430015, China;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, Hubei Provincial People's Hospital, Wuhan, Hubei 430000, China)

**Abstract: Objective** To study the role of vasoactive intestinal polypeptide(VIP) and Calponin in the pathogenesis of cholecystolithiasis. **Methods** Two dietary groups of New Zealand rabbits with 20 in each were allocated 1, 2 g/d high cholesterol diet and common diet for 4 weeks. **Results** Comparing with the negative result in control group, cholesterol crystals and stones were found in 19 and 16 out of 20 gallbladders, respectively, under the polarizing microscope in lithogenic group. The positive expression of VIP and Calponin in gallbladder smooth muscle in lithogenic group was much higher than those in control group( $P < 0.05$ ). The positive expression of VIP and Calponin in Oddi sphincter in lithogenic group was much lower than those in control group( $P < 0.05$ ). The positive expression of VIP had a significant relation with Calponin( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The disorder of Calponin and VIP regulation, which induces gallbladder function disorder, plays an important role in gallstone formation.

**Key words:** gallstone; Calponin; vasoactive intestinal polypeptide; smooth muscle of gallbladder; Oddi sphincter

目前认为胆囊胆固醇结石形成机制是胆汁胆固醇过饱和、胆汁中成核因子的活性异常和胆道动力学改变三者作用的结果。胆道动力学改变是胆石形成不可缺少的条件。本研究采用免疫组化方法, 测定调宁蛋白(Calponin)以及血管活性肠肽(VIP)在胆囊平滑肌和 Oddi 括约肌中的表达, 分析二者在胆道动力学中所起的作用和相关性。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 成年健康雄性新西兰兔 40 只(武汉大学医学院实验动物中心提供), 体质量 1.80~2.50 kg, 随机分为两组, 即对照组, 实验组。每组 20 只, 对照组喂普通颗粒饲料(武汉大学医学院实验动物中心提供), 实验组饲喂 1.2% 高胆固醇饲料(武汉大学医学院实验动物中心提供)。置于隔离动物房喂养, 自由进水。两组饲喂普通颗粒饲料 1 周, 每只分别 100 g/d, 然后对照组继续进普通颗粒饲料(每只 100 g/d), 而实验组则饲喂 1.2% 高胆固醇饲料(每只 100 g/d, 其中胆固醇为每只 1.2 g/d)。饲养时间为 4 周。

**1.2 标本收集** 饲养时间充足后, 剖杀前 12 h 禁食, 4 h 禁水。耳缘静脉 20% 乌拉坦麻醉。常规消毒, 剖腹取胆囊平滑肌以及 Oddi 括约肌。4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续

切片 4  $\mu\text{m}$ 。收集胆汁并观察成石情况。

### 1.3 观测指标及检测方法

**1.3.1 胆囊胆汁胆固醇结晶及结石鉴定** 结石判断标准: 肉眼观察胆汁内有成形粗大颗粒, 光镜下观察为致密大团块结晶胆固醇即定为结石<sup>[1]</sup>, 正常兔胆囊胆汁均未见有形成分。胆固醇结晶定量: 取部分胆囊胆汁离心, 沉淀物涂片, 光镜下观察有无胆固醇结晶。胆固醇结晶定量参照文献<sup>[2]</sup>标准分为+, ++, +++ 及++++ 4 个等级。

### 1.3.2 VIP、Calponin 在胆囊平滑肌以及 Oddi 括约肌的表达

S-P 法染色测定 Calponin 和 VIP 在胆囊平滑肌和 Oddi 括约肌的表达(以 Calponin 为例, 免疫组化相关试剂购自 Sigma 公司), 石蜡切片脱蜡、水化; 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.4)洗 2~3 次, 每次 5 min; 滴加 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (80% 甲醇), 室温静置 10 min; PB 缓冲液洗 2~3 次, 每次 5 min; 抗原修复(柠檬酸高温修复); PBS 洗 2~3 次, 每次 5 min; 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min。甩去多余液体。滴加 Calponin I 抗 50  $\mu\text{L}$ , 室温静置 1 h 或者 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜或者 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h。PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加生物素 II 抗 40~50  $\mu\text{L}$ , 室温静置 1 h 或 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h; II 抗中可加入 0.05% 的 tween-20。PBS 洗 3 次, 每次 5 min; DAB 显

色 5~10 min,在显微镜下掌握染色程度;PBS 或自来水冲洗 10 min;苏木精复染 2 min,盐酸酒精分化;自来水冲洗 10~15 min;脱水、透明、封片、镜检。

**1.3.3 VIP、Calponin 免疫组化染色结果的判断**(阳性表达位置均在胞浆,为棕黄色颗粒) 在高倍视野下( $\times 400$ ) 随机取 5 个视野(每个视野不少于 50 个细胞),按阳性细胞所占的百分比进行半定量分析(CIAS-1000 细胞图像分析仪半定量分析)。一:无阳性细胞;+:低度表达(阳性细胞小于 10%);++:中度表达(阳性细胞 10%~50%);+++ :高度表达(阳性细胞大于 50%)。无阳性细胞与低度表达视为阴性,中度表达与高度表达视为阳性。

**1.4 统计学方法** 所有结果经 SPSS11.5 统计软件处理。采用  $\chi^2$  检验及直线相关分析,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 实验动物一般情况及体质量变化** 对照组动物生长良好,每周体质量增加 0.05~0.10 kg,试验组饲高胆固醇膳食生长较快,体质量增长明显,每周平均增长 0.15~0.20 kg,各组动物饲养期间均无死亡。

**2.2 胆汁胆固醇结晶与成石情况** 对照组胆囊胆汁几乎无胆固醇结晶,实验组 16 只可见明显结石颗粒,19 只可见胆固醇结晶。

**2.3 胆囊平滑肌中 Calponin 和 VIP 的阳性产物的变化** 结石组 Calponin 和 VIP 的阳性产物在显微镜下与对照组比较显著增多,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 两组胆囊平滑肌中 Calponin 和 VIP 的表达结果

组别	n	Calponin		VIP	
		阳性	阳性率(%)	阳性	阳性率(%)
对照组	20	6	30.0	5	25.0
结石组	20	17	85.0 $\Delta$	16	80.0 $\Delta$

$\Delta$ :与对照组比较, $P < 0.01$ 。

**2.4 Oddi 括约肌中 Calponin 和 VIP 的阳性产物的变化** 结石组 Calponin 和 VIP 的阳性产物在显微镜下与对照组比较显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 2。

表 2 两组 Oddi 括约肌中 Calponin 和 VIP 的表达结果

组别	n	Calponin		VIP	
		阳性	阳性率(%)	阳性	阳性率(%)
对照组	20	15	75.0	17	85.0
结石组	20	8	40.0 $\Delta$	7	35.0 $\Delta$

$\Delta$ :与对照组比较, $P < 0.01$ 。

**2.5 胆囊平滑肌及 Oddi 括约肌中 Calponin 和 VIP 的相关性** 胆囊平滑肌中 Calponin 表达的阳性率与 VIP 表达的阳性率呈正相关  $Y(\text{Calponin}) = 22.813 + 0.646X(\text{VIP})$ ,  $r = 0.785$ ,  $P < 0.05$ 。Oddi 括约肌中 Calponin 表达的阳性率与 VIP 表达的阳性率呈正相关  $Y(\text{Calponin}) = 9.652 + 0.473X(\text{VIP})$ ,  $r = 0.624$ ,  $P < 0.05$ 。

**3 讨 论**

胆囊胆固醇结石的形成不是单一病理因素所致,而是胆道系统在多种因素的影响下发生的一系列病理变化的结果。胆囊胆固醇的成因目前尚存在一定的争议。近年来,对胆汁成分

的改变,胆固醇磷脂泡、促成核因子和抗成核因子的失衡病理因素作了较多研究,而对胆囊运动在胆石形成中的作用研究相对较少。

胆囊是贮存和浓缩胆汁的器官,具有节律性和紧张性收缩运动的功能,胆囊收缩力下降是引起胆囊排空障碍的主要动力学因素,促进胆囊收缩力能有效增加胆囊排空<sup>[3]</sup>。胆囊是一个弹性的囊体,和胆道系统相连。在非消化期间,肝细胞不断分泌胆汁流入胆囊内贮存。胆囊可吸收胆汁中的水分和无机盐,使肝胆汁浓缩 4~10 倍,增加了贮存的效能。空腹时,胆囊多呈松弛状态,进食后则呈张力性收缩。正常情况下,胆囊和 Oddi 括约肌的活动表现出协调的相互关系:Oddi 括约肌收缩时胆囊舒张,从而使肝胆汁贮入胆囊;反之,胆囊收缩,Oddi 括约肌舒张,肝胆汁和胆囊胆汁便流入十二指肠。所以胆囊平滑肌和 Oddi 括约肌的功能紊乱会导致胆汁排放受阻,从而促进胆囊胆固醇结石的形成。

平滑肌细胞有粗肌丝组成,粗肌丝主要由肌球蛋白组成。而细肌丝主要由肌动蛋白组成,但不含有骨骼肌所有的肌钙蛋白。平滑肌没有骨骼肌那样发达的肌管系统,而是肌膜。平滑肌细胞受刺激时,细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  进入胞内,但细胞中靠近肌膜的肌浆网也构成了细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  贮存库。一些兴奋性递质、激素或者药物同肌膜受体结合,通过 G 蛋白在胞浆内产生第二信使,引起  $\text{Ca}^{2+}$  库中的  $\text{Ca}^{2+}$  释出。 $\text{Ca}^{2+}$  先结合于胞浆中钙调蛋白,后者结合了 4 个  $\text{Ca}^{2+}$  后使肌球蛋白激酶活化,使 ATP 分解,从而使横桥磷酸化,既而激活横桥,导致平滑肌收缩。

VIP 在胆囊的功能调节上起重要作用,Strah 等<sup>[4]</sup>利用狗胆瘘模型进行体内研究发现,胆囊受着 3 种迷走神经纤维共同支配,即胆碱能、胆囊收缩素(CCK)和 VIP 能。胆碱能和 CCK 能神经可使胆囊张力增强,收缩性加强,而 VIP 能神经则抑制胆囊收缩。生理情况下,胆囊的张力和排空是受兴奋性的胆碱能、CCK 能和具抑制性的 VIP 能神经共同调节的。用免疫组化和放射免疫测定技术对胆囊组织 VIP 产生及分泌进行定位和定量研究,发现胆囊上皮细胞膜上有结合 VIP 的特异性受体,而胆囊组织内没有产生 VIP 的内分泌细胞;胆囊产生的 VIP 主要是由胆囊壁内的 VIP 能神经纤维所释放。胆囊排空受复杂的神经内分泌调控,新近证实主要促排空激素是 CCK,主要抑制排空激素是 VIP<sup>[5]</sup>。VIP 能降低胆囊的张力和抑制胆囊收缩,在离体情况下呈剂量相关性抑制 CCK 的收缩胆囊作用对 VIP 引起平滑肌松弛的机制,目前认为与迷走神经受到刺激后,胆囊壁的 VIP 能神经纤维释放 VIP 增加有关,它与上皮细胞膜上高亲和力受体结合,激活了腺苷酸环化酶,使细胞内环磷酸腺苷(cAMP)浓度增加,增加  $\text{Ca}^{2+}$  从胞内排出和抑制  $\text{Ca}^{2+}$  从钙池释放,同时抑制肌球蛋白的磷酸化,使平滑肌处于松弛状态。

CaP 是一种平滑肌特有的收缩调控蛋白<sup>[6-8]</sup>,几乎存在于所有哺乳动物和人的各种平滑肌组织中。调宁蛋白根据其等电点不同可分为 3 种异构体,碱性调宁蛋白 h1,中性调宁蛋白 h2 和酸性调宁蛋白,平滑肌组织中主要为 h1 型<sup>[8-10]</sup>,其氨基酸及核苷酸序列已完整测出<sup>[8,10]</sup>。Strasser 等<sup>[10]</sup>对调宁蛋白的功能进行了详细研究,发现调宁蛋白能与其他蛋白结合,但与肌动蛋白的结合直接影响调宁蛋白的功能。调宁蛋白能抑制肌动球蛋白三磷酸腺苷(ATP)酶的活性,具有对肌动蛋白单体的聚合作用,肌动蛋白肌丝的集束作用,可与肌动蛋白(actin)、

肌球蛋白(myosin)及原肌球蛋白(tropomyosin)结合,并能与钙结合蛋白如钙调素、钙调蛋白及 S100 蛋白结合,调宁蛋白能被蛋白激酶 C 及钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II 磷酸化,被磷酸酶脱磷酸化。当调宁蛋白磷酸化时,与肌动蛋白丝分离,失去对肌动球蛋白 ATP 酶的抑制作用,使肌肉收缩;调宁蛋白脱磷酸化时表现出抑制肌动球蛋白 ATP 酶活性,使肌肉舒张。调宁蛋白还能抑制肌动蛋白丝相对于肌球蛋白丝的滑行。

在此次实验中,结石组 16 只(16/20)出现胆囊结石,19 只(19/20)出现胆固醇结晶,对照组无结石及结晶出现;结石组胆囊平滑肌 Calponin 和 VIP 阳性产物与对照组相比较明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),从而抑制胆囊平滑肌收缩。Oddi 括约肌 Calponin 和 VIP 阳性物与对照组相比较明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。从而使两者抑制 Oddi 括约肌收缩的功能减弱,导致 Oddi 括约肌痉挛。所以可以导致胆汁排放受阻,促进胆囊胆固醇结晶的形成。本实验结果认为,胆囊排空功能在胆囊结石形成中起重要作用,而胆囊结石家兔胆囊排空障碍与 Calponin、VIP 明显相关。本实验研究,从胆囊平滑肌及 Oddi 括约肌协调运动入路,旨在进一步明了胆囊结石形成病因,实验证实 Calponin 阳性表达与调宁蛋白呈正相关,表明二者协同参与平滑肌的收缩,但具体信号传导机制尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 别平,孟宪均,杨可祯,等. 前列腺素环磷酸腺苷在胆囊结石形成中的作用[J]. 中华外科杂志,1987,25(6):339.
  - [2] Juniper K. Biliary tract studies 2: the significance of biliary crystals[J]. Gastroenterol,1957,32(6):175.
  - [3] 厉红民,李前伟,刘广元,等. 胆囊动力学变化对胆囊结石形成影响的实验观察[J]. 重庆医学,2003,32(9):1222.
  - [4] Strah KM, Melendez RL, Pappas TN, et al. Interaction of vasoactive intestinal polypeptide and cholecystokinin octapeptide on the control of gallbladder contraction[J]. Surgery,1986,99(4):469.
  - [5] Chen Q, Amaral J, Oh S, et al. Gallbladder relaxation in patients with pigment and cholesterolstones[J]. Gastroenterology,1997,113(3):930.
  - [6] Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle Biochem[J]. Biochem Biophys Res Commun,1986,141(1):20.
  - [7] Takahashi K, Nadal-Ginard B. Molecular Cloning and sequence analysis of smooth muscle calponin[J]. J Biol Chem,1991,266(20):13284.
  - [8] Jin JP, Wu D, Gao J, et al. Expression and purification of the h1 and h2 isoforms of calponin[J]. Protein Exp Purif,2003,31(2):231.
  - [9] Matthew JD, Khromov AS, McDuffie MJ, et al. Contractile properties and proteins of smooth muscles of a calponin knockout mouse[J]. J Physiol,2000,529(Pt3):811.
  - [10] Strasser P, Gimona M, Moessler H, et al. Mammalian calponin. Identification and expression of genic variants[J]. FEBS Lett,1993,330(1):13.
- (收稿日期:2009-08-15 修回日期:2009-09-10)
- 
- (上接第 523 页)
- MV, et al. Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs[J]. Basic Res Cardiol,2006,101(6):502.
  - [2] Schwartz LM, Lagranha CJ. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2006,290(3):H1011.
  - [3] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion; comparison with ischemic preconditioning[J]. Am J Physiol(Heart Circ Physiol),2003,285:579.
  - [4] Philipp S, Yang XM, Cui L, et al. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein receptor cascade C-adenosine A2b receptor cascade[J]. Cardiovasc Res,2006,70:308.
  - [5] 洪李萍,陈玉培. 镁对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 重庆医学,2007,36(2):176.
  - [6] Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist[J]. Circulation,2002,105(20):2332.
  - [7] Girm HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AL, et al. Reperfusion Syndrome: Cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies[J]. Vasc Endovascular Surg,2007,4(4):277.
  - [8] Mykytenko J, Kerendi F, Reeves JG, et al. Long-term inhibition of myocardial infarction by postconditioning during reperfusion[J]. Basic Res Cardiol,2007,102(1):90.
  - [9] Krombach GA, Kinzel S, Mahnken AH, et al. Minimally invasive close-chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine[J]. Invest Radiol,2005,40(1):14.
  - [10] Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury[J]. Cardiovasc Res,2006,70(2):200.
  - [11] Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, et al. preconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials[J]. J Am Coll Surg,2006,202(5):797.
- (收稿日期:2009-07-23 修回日期:2009-09-10)