

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.09.003

文章编号: 1005-8982(2016)09-0012-04

论著

伊托必利对肝衰竭大鼠胃肠道动力的影响*

朱金照,黎环,吕勇,王艳丽,熊伟,刘晓燕,吴旭玮
(福建医科大学孟超肝胆医院 肝病消化内科,福建 福州 350025)

摘要:目的 观察伊托必利对肝衰竭大鼠胃肠道动力的影响,探讨其可能的作用机制。**方法** 60 只 Wistar 大鼠随机分为肝衰竭模型组(以下简称模型组)、肝衰竭模型 + 伊托必利治疗组(以下简称治疗组)和对照组,采用葡聚糖蓝-2000 为胃肠内标记物,测定大鼠胃肠道传输的改变,通过放射免疫和免疫组织化学法观察大鼠胃窦、小肠组织中胃动素(MTL)的含量和分布变化。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠胃肠道动力明显减弱($P < 0.01$),胃窦、十二指肠组织中 MTL 的含量及分布无明显减少($P > 0.05$);但伊托必利治疗后,大鼠胃肠道传输明显改善($P < 0.05$),胃、十二指肠组织中 MTL 的含量和分布明显升高,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 伊托必利能明显改善肝衰竭大鼠的胃肠道功能,其机制可能与 MTL 有关。

关键词: 肝衰竭;胃肠动力;胃动素;伊托必利

中图分类号: R575.3

文献标识码: A

Itopride effect on gastrointestinal motility in rats with hepatic failure*

Jin-zhao Zhu, Huan Li, Yong Lyu, Yan-li Wang, Wei Xiong, Xiao-yan Liu, Xu-wei Wu
(Department of Liver and Digestive Diseases, Meng Chao Hepatobiliary Hospital,
Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Itopride on gastrointestinal motility in rats with hepatic failure, and to explore its possible mechanism. **Methods** Sixty Wistar rats were randomly divided into hepatic failure model group (model group), the hepatic failure model + Itopride therapy group (treatment group) and normal control group. Blue dextran-2000 was used as the gastrointestinal marker. Gastrointestinal transit in rats was determined. Radioimmunoassay and immunohistochemistry method were used to observe the changes of content and distribution of motilin (MTL) in gastric antrum and small intestine of the rats. **Results** Compared with the control group, the gastrointestinal motility of the rats in the model group significantly decreased ($P < 0.01$), the content and distribution of MTL in the gastric antrum and duodenum tissue did not significantly decrease ($P > 0.05$). However, after Itopride treatment, gastrointestinal transmission was significantly improved in the rats ($P < 0.05$), the content and distribution of MTL increased significantly in the tissues of stomach and duodenum, there were significant differences compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Itopride hydrochloride can significantly improve gastrointestinal function of the rats with hepatic failure, and its mechanism may be related to MTL.

Keywords: liver failure; gastrointestinal motility; motilin; Itopride

伊托必利是临床上常用的促胃肠动力药物,研究发现其主要通过对多巴胺 D2 受体和乙酰胆碱酯酶的拮抗作用增加乙酰胆碱的释放,通过胆碱能受

体增强胃肠动力^[1-3],临床常用于功能性消化不良的治疗^[4-5]。肝衰竭患者常伴有明显厌食、呕吐和腹胀等严重消化道症状,该症状严重影响肝衰竭患者的

收稿日期:2014-11-25

* 基金项目:福州市科技局科技计划项目(No:2011-S-69-3)

生活质量^⑥。目前,在治疗肝衰竭胃肠动力障碍方面,安全、有效的药物不多,伊托必利是一种安全有效的促胃肠动力药物,因此本实验通过建立肝衰竭大鼠模型,观察伊托必利对肝衰竭大鼠胃肠道动力的影响,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验分组

选用清洁级 Wistar 大鼠(上海实验动物中心提供)制作急性肝衰竭动物模型,雌雄各半,体重 200~250 g。将 60 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、肝衰竭模型组(以下简称模型组)和肝衰竭模型+托必利治疗组(以下简称治疗组)各 20 只。模型组采用 350 mg/kg 硫代乙酰胺(Thioacetamide, TAA)(天津科密欧化学试剂公司),腹腔注射,24 h 后重复 1 次,自由饮水。治疗组在给予大鼠 TAA 24 h 后,灌服 5%伊托必利混悬液 0.5 ml/100 g,2 次/d,持续 1 周。用生理盐水配成 40 g/L TAA 溶液备用,盐酸伊托必利片(哈尔滨哈药集团)制备成 5%伊托必利混悬液 4℃备用。

1.2 大鼠胃肠道动力测定

以 2%葡聚糖蓝-2000 为胃肠内标记物,各组动物在开腹前 20 min 灌入 0.5 ml 2%葡聚糖蓝-2000,腹腔注射 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,开腹留取标本。取全胃肠道,量取胃肠道色素最前端及全小肠的长度,以两者的比值为胃肠道推进百分率,测定胃肠道传输速率,代表胃肠道动力的改变。

1.3 胃肠道组织匀浆胃动素放射免疫测定

胃动素(small intestine, MTL)放射免疫测试药盒由解放军总医院东亚免疫研究所提供。大鼠麻醉后,分别取 2.5 g 胃窦、十二指肠组织,加入生理盐水 3 ml 用粉碎机制成匀浆,4℃、3 500 r/min 离心 20 min,取上清液置入 -30℃冰箱冷冻保存待测。MTL 按放射免疫分析药盒说明书进行操作。

1.4 胃窦、十二指肠组织 MTL 免疫组织化学法染色

免疫组织化学试剂由江西生物技术公司提供,按链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP)进行。分别将胃窦、十二指肠组织标本加入 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PB)中固定 24 h,常规梯度酒精脱水,石蜡包埋备用。将石蜡切片,60℃烤片 4~6 h;组织于二甲苯及酒精中脱蜡,自来水冲洗;3%双氧水 H₂O₂ 室温下孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性;蒸馏

水冲洗,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)浸泡 5 min;5%正常山羊血清封闭,室温孵育 10 min;倾去多余血清,分别滴加兔抗鼠 1:50 MTL 4℃过夜;PBS 漂洗 5 min×3 次;滴加 1:100 生物素标记二抗 50 μl,37℃孵育 30 min;PBS 漂洗 5 min×3 次;滴加 1:100 辣根酶标记链霉卵白素 50 μl,37℃孵育 30 min;PBS 漂洗 5 min×3 次;加入新配制的二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色,3~5 min 后光镜下观察结果。自来水冲洗、复染、脱水、封片。

1.5 图像分析

采用 Backmen 全自动图像分析系统。取胃窦、十二指肠组织免疫组织化学法切片,每张切片于 200 倍光镜下选取 5 个视野,观察 MTL 的染色及分布,将图像扫描入计算机,通过计算机自动分析得到相应的数据。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝衰竭模型的制作

采用硫代乙酰胺制作急性肝衰竭模型,成功率高,重复性好,20 只模型组大鼠,第 2 次注射后 24 h 内死亡 3 只,20 只治疗组大鼠第 2 次注射后 24 h 内死亡 2 只,其余观察至 72 h。肝衰竭模型出现明显症状,包括嗜睡、反应迟钝、食量少、腹胀等,肝脏病理检查显示,肉眼肝充血肿大,肝脏包膜表面可见点状出血,光镜下肝组织结构破坏,小叶紊乱,肝细胞明显水肿,呈气球样变,汇管区炎症细胞浸润,可见肝细胞点片状、灶状坏死。

2.2 胃肠道动力的测定

与对照组比较,模型组大鼠胃肠推进比下降,胃肠道动力受损,差异有统计学意义(*t* = 5.970, *P* = 0.000)。治疗组经伊托必利治疗后,与模型组比较,肝衰竭大鼠胃肠推进比好转,差异有统计学意义(*t* = 4.870, *P* = 0.000),而与正常组比较差异无统计学意义(*t* = 0.968, *P* = 0.339),说明伊托必利治疗后肝衰竭大鼠胃肠道动力明显恢复。见表 1。

2.3 胃、十二指肠组织 MTL 含量的变化

模型组胃、十二指肠组织中 MTL 的含量与对照组比较,差异无统计学意义(*t* = 0.220 和 0.089, *P* =

0.828 和 0.929);伊托必利治疗 1 周后,肝衰竭大鼠胃、十二指肠组织中 MTL 含量增加,差异有统计学意义($t=1.696$ 和 1.657 , $P=0.028$ 和 0.037)。见表 2。

表 1 大鼠胃肠道动力的变化

组别	例数	胃肠道推进比 $I(\%, \bar{x} \pm s)$
对照组	20	57.45 ± 5.72
模型组	17	$48.02 \pm 3.36^{1)}$
治疗组	18	$55.67 \pm 5.59^{2)}$

注:1)与对照组比较, $P<0.01$;2)与模型组比较, $P<0.01$

表 2 大鼠胃、十二指肠组织 MTL 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	胃组织	十二指肠组织
对照组($n=20$)	107.53 ± 62.32	214.42 ± 80.12
模型组($n=17$)	103.25 ± 55.01	211.89 ± 92.34
治疗组($n=18$)	$138.51 \pm 72.35^{\dagger}$	$265.52 \pm 98.71^{\dagger}$

注:† 与模型组比较, $P<0.05$

2.4 胃、十二指肠组织 MTL 分布的变化

对照组与模型组大鼠胃、十二指肠组织中 MTL 着色浅,分布较稀少,两者比较差异无统计学意义($t=0.366$ 和 0.981 , $P=0.718$ 和 0.334);经伊托必利治疗 1 周后,肝衰竭大鼠胃、十二指肠组织中 MTL 着色变深,分布增多,与治疗前模型组比较,MTL 明显增加,差异有统计学意义($t=2.701$ 和 5.070 , $P=0.017$ 和 0.000)(见表 3)。对照组大鼠胃窦 MTL 免疫阳性物质表达较低,分布少,染色较浅(见图 1);模型组大鼠胃窦 MTL 免疫阳性物质表达较低,染色浅,分布

表 3 大鼠胃、十二指肠组织 MTL 分布的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	胃窦	十二指肠
对照组($n=20$)	18.32 ± 6.14	25.23 ± 6.24
模型组($n=17$)	19.01 ± 5.17	27.18 ± 5.76
治疗组($n=18$)	$26.23 \pm 6.28^{1)}$	$41.83 \pm 10.51^{2)}$

注:1)与模型组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.01$



图 1 对照组大鼠胃窦 MTL 免疫组织化学法染色 ($\times 200$)

稀少(见图 2);治疗组大鼠胃窦 MTL 免疫阳性物质分布更丰富,着色明显(见图 3);对照组大鼠十二指肠 MTL 免疫阳性物质染色较浅,分布少(见图 4);模型组大鼠十二指肠 MTL 免疫阳性物质表达低,染色浅,分布少(见图 5);治疗组大鼠十二指肠 MTL 免疫



图 2 模型组大鼠胃窦 MTL 免疫组织化学法染色 ($\times 200$)



图 3 治疗组大鼠胃窦 MTL 免疫组织化学法染色 ($\times 200$)



图 4 对照组大鼠十二指肠 MTL 免疫组织化学法染色 ($\times 200$)



图 5 模型组大鼠十二指肠 MTL 免疫组织化学法染色 ($\times 200$)

阳性物质分布较丰富,染色明显加深(见图 6)。



图 6 治疗组大鼠十二指肠 MTL 免疫组织化学染色
($\times 200$)

3 讨论

肝衰竭患者死亡率较高,与其常伴有胃肠功能障碍甚至胃肠功能衰竭密切相关。因此,研究肝衰竭胃肠动力障碍的药物干预并探讨其机制,对提高肝衰竭的治疗成功率有较大的临床意义。

伊托必利是目前临床上应用较多且副作用较小、安全度较高的新一代胃肠促动力药^[7-8]。胃动素是 1966 年被发现的,由 22 个氨基酸组成的直链多肽,由内分泌 Mo 细胞分泌,可在消化间期呈周期性释放,促进胃肠运动并刺激胃蛋白酶的分泌,并证实 MTL 对胃肠道移行复合运动起非常重要的调节作用^[9-11]。

本实验发现,肝衰竭大鼠胃肠动力明显减退,与对照组比较,胃、十二指肠组织中 MTL 的含量无明显变化,胃肠组织中 MTL 的分布也无明显改变。但应用伊托必利后,大鼠胃肠动力障碍明显改善,同时胃、十二指肠组织中 MTL 的含量明显升高,胃肠组

织中 MTL 的分布也显著增加,说明伊托必利能显著改善肝衰竭大鼠的胃肠动力,其机制可能与促进胃肠道胃动素的释放有关,但是否还涉及其他方面的机制还需深入研究。

参 考 文 献:

- [1] JARVIE E M, CELLEK S, SANGER G J. Potentiation by cholinesterase inhibitors of cholinergic activity in rat isolated stomach and colon[J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58(5/6): 297-301.
- [2] SCARPELLINI E, VOS R, BLONDEAU K, et al. The effects of itopride on oesophageal motility and lower oesophageal sphincter function in man[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 33(1): 99-105.
- [3] 李富军, 邹益友, 黄田辉. 促胃肠动力药对大鼠胃及十二指肠电活动的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2009, 34(7): 599-602.
- [4] 范红云, 段志英, 朱秀芳, 等. 盐酸伊托必利治疗功能性消化不良的临床疗效观察[J]. *临床荟萃*, 2013, 28(5): 565-566.
- [5] 马晓光, 高保华, 吴方雄, 等. 质子泵抑制剂联合伊托必利对胃食管反流病的疗效评价[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2013, 22(11): 1110-1113.
- [6] 王宇明, 李兰娟. 肝衰竭诊治指南(2012年版)治疗进展解读与探讨[J]. *中华临床感染病杂志*, 2013, 6(2): 77-80.
- [7] 杜爱民, 杨霞, 毛勇, 等. 胃肠道动力药联用黛力新治疗功能性消化不良的对比研究[J]. *临床消化病杂志*, 2013, 3: 138-140.
- [8] 王忠波, 李丹. 伊托必利在功能性消化不良治疗中的应用[J]. *中国药师*, 2010, 4(10): 559.
- [9] SANGER G J, WANG Y, HOBSON A, et al. Motilin: towards a new understanding of the gastrointestinal neuropharmacology and therapeutic use of motilin receptor agonists[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 170(7): 1323-1332.
- [10] 谭康联, 陈志强. 胃动素用于胃肠功能评价的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(2): 156-160.
- [11] SUZUKI A, ISHIDA Y, AIZAWA S, et al. Molecular identification of GHS-R and GPR38 in *Suncus murinus* [J]. *Peptides*, 2012, 36(1): 29-38.

(童颖丹 编辑)