

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.02.003

莫沙必利对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦 Cajal 间质细胞的影响*

张静瑜 谢燕东 崔曼莉 曹 瑛 张明鑫 吕丹丹 王景杰 秦 明[△]

(第四军医大学唐都医院消化内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究莫沙必利对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦 Cajal 间质细胞(ICC)的影响。**方法:**将 48 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、莫沙必利组,各组分 16 只。模型组、莫沙必利组大鼠给予一次性腹腔注射链脲佐菌素后建立糖尿病胃轻瘫模型,建模第 10 天起,莫沙必利组大鼠给予莫沙必利注灌胃治疗。建模 30 周后,检测各组大鼠的血糖水平、胃残留率,通过采用电生理学方法检测各组大鼠胃动力,并采用免疫组化染色方法检测各组胃窦 ICC 的相对数量。**结果:**模型组大鼠胃残留率明显高于正常组大鼠($P<0.05$),而给予莫沙必利后胃残留率显著降低($P<0.05$);模型组大鼠胃电图波幅和频率均明显低于正常组大鼠($P<0.05$),而给予莫沙必利后胃电图波幅和频率明显增加($P<0.05$);模型组大鼠胃窦 ICC 明显低于正常组大鼠($P<0.05$),而给予莫沙必利后胃窦 ICC 有所增加($P<0.05$)。**结论:**莫沙必利可显著改善糖尿病胃轻瘫大鼠的胃动力,可能与其增加胃窦 Cajal 间质细胞有关。

关键词:糖尿病;胃轻瘫;莫沙必利;Cajal 间质细胞

中图分类号:R-33;R587.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)02-210-04

Effect of Mosapride on the Interstitial Cells of Cajal in Gastric Antrum of Diabetic Gastroparesis Rats*

ZHANG Jing-yu, XIE Yan-dong, CUI Man-li, CAO Ying, ZHANG Ming-xin, LV Dan-dan, WANG Jing-jie, QIN Ming[△]

(Dept of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects of mosapride on the gastroparesis interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of diabetic rats. **Methods:** 48 male SD rats, were randomly divided into normal group, model group, mosapride group, 16 rats each group. Model group, mosapride rats given intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) after the establishment of diabetic gastroparesis model, Modeling the 10th day onwards, mosapride rats administered orally mosapride. Modeling after 30 weeks, blood glucose levels of the rats, gastric residual rate of detection of gastric motility of rats by using electrophysiological methods, and by immunohistochemical staining method to detect the relative amount of each group relative number of ICC. **Results:** Gastric residual rate of rats was significantly higher than normal group ($P<0.05$), but after giving mosapride gastric residual rate decreased significantly ($P<0.05$); EGG amplitude and frequency of model group were significantly lower than normal group ($P<0.05$), but after giving mosapride EGG amplitude and frequency was significantly increased ($P<0.05$); Antral ICC model group was significantly lower than normal group ($P<0.05$), but after giving mosapride antral ICC increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Mosapride significantly improved diabetic gastroparesis gastric motility in rats may be related to increased inter-related antral cells of Cajal.

Key words: Diabetes mellitus; Stomach light paralysis; Mosapride; ICC

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)02-210-04

胃轻瘫是一种慢性障碍定义为固体和液体胃排空延迟而并没有阻塞,早期症状包括饱腹感、恶心、呕吐、腹胀和痛苦^[1-3]。正常胃排空需要正确协调多种细胞类型,包括外在的神经支配胃、肠神经,神经胶细胞,平滑肌细胞,Cajal 间质细胞(interstitial cell of Cajal, ICC)和免疫细胞^[4,5]。在这些细胞中,ICC 扮演着非常重要的角色。糖尿病相关的胃轻瘫是最常见的,近期多项研究显示糖尿病胃轻瘫患者及相关的动物模型均存在 ICC 网络的异常、超微结构的损伤及其与神经末梢及平滑肌之间缝隙连接的减少^[6-9]。莫沙必利是一种促进胃肠动力的药物,已在临床上广泛应用^[8]。本实验旨在研究莫沙必利对糖尿病胃轻瘫大鼠

胃窦 cajal 间质细胞的影响以及 Cajal 间质细胞在糖尿病胃轻瘫发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性 SD 大鼠,2 月龄,体重 160 ± 10 g,第四军医大学实验动物中心提供,屏障环境饲养,普通饲料,自由饮水。莫沙必利(加斯清,日本),链脲佐菌素(sigma),抗 c-Kit 抗体免疫组化检测试剂盒(武汉博士德公司产品)。血糖仪(美国 ONETOUCH),电子天平(德国 Satorius 公司),3-18K 高速低温离心机(Sigma 公

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81070306)

作者简介:张静瑜(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:胃肠动力及机制方面的研究,E-mail:jingyu1104@163.com

△ 通讯作者:秦明,E-mail:447439722@qq.com

(收稿日期:2016-07-28 接受日期:2016-08-25)

司),隔水式电热恒温箱(上海跃进医疗器械厂),RM6280B 生物信号采集处理系统(成都仪器厂),Confocal 激光共聚焦显微镜(日本 Olympus, FV1000)。

1.2 方法

1.2.1 模型制作及分组 30 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组 16 只、模型组 16 只、莫沙必利组 16 只。禁食 12 小时后测空腹血糖。除正常组大鼠外,其它大鼠一次性腹腔注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的链脲佐菌素(STZ),注射时用柠檬酸缓冲液以 0.1 g/L 的浓度溶解 STZ,按空腹体重 65 mg/kg 注射相应的 STZ,在 30 分钟内注射完毕。正常组大鼠腹腔注射等容量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。造模后第 7 天,在非禁食情况下剪尾采血,用血糖仪测血糖值,以血糖 $> 16.7 \text{ mmol/L}$ 为实验纳入标准。

给药及取样造模后第 10 天起,莫沙必利注射液灌胃,模型组和正常组予等量蒸馏水灌胃,每周给药 6 次。所给药物剂量相当于成人临床常用剂量 2 倍(10 mg)。采用不同种属、不同体重动物剂量换算公式计算给药剂量。每 3 周称体重 1 次,按新体重重新计算给药剂量。实验期为 30 周。

1.2.2 观察指标及检测 1)血糖测定:用 8 号血糖试纸在美国 ONETOUCH 血糖仪测血糖值。2)胃液排空率测定:三组大鼠中各组随机取 8 只,末次给药前禁食 36 小时,不禁水。末次给药后 30 分钟后,每只灌胃半固体糊 2 mL/只。25 分钟后,脱颈椎处死。迅速打开腹腔,剖取全部胃肠,结扎胃贲门及幽门,自幽门切迹处取胃,拭干称胃全重。沿胃大弯剪开胃体,洗去胃内容物后拭干,称胃净重。计算为残留率。胃内容物残留率(%)=[(胃全重 - 胃净重)/半固体糊重量]*100%。3)多导电生理记录仪记录治疗前后大鼠胃肠道电活动的变化。

三组大鼠中各组取 8 只,末次给药后禁食 24 小时,用 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉。常规消毒皮肤,于剑突下沿腹白线处剪开约 1 cm 长的小口,轻轻拉出胃,暴露胃窦部,在胃大弯侧距幽门 0.5 cm 处,将双电极紧贴在胃浆膜表面。极间距 1.5-2.0 mm,电极与多导生理记录仪连接,稳定 30 分钟后,记录波形图,连续记录 2 小时,观察胃电频率(次/分钟)及振幅(μV)。

1.2.3 免疫组化法检测 ICC 在体胃电测定结束后,剖开左侧胸腔,拨开心包膜,暴露心脏。剪开右心耳放出血液,再剪开左心室将 16 号灌注针沿切口插入左心室至升主动脉根部用动脉夹固定,先输入 100 mL 生理盐水将血管内的血球冲干净,再注入多聚甲醛固定液灌流固定 400 mL,调整滴速,缓慢滴注流出清亮液体。待固定完全后,将所取胃组织放置 20% 的蔗糖溶液中过夜沉底。取胃体中上部上 1/3 处胃体组织,经冰冻切片机切片(10 μm)→分别入抗 c-kit,HCN1 等一抗→24 小时后分别入对应的二抗和三抗→显色反应→观察记录结果。各组组织标本的免疫组化切片,显微镜下胞浆呈棕黄色颗粒者视为 Kit (反应 ICC) 阳性。每张切片随机各取 6 个视野,应用 HPIAS-2000 彩色图文医学分析软件对所选视野内的免疫组化阳性信号进行计算机读片和测量分析(400 $\times$ 视野),计算环形纵形肌层中相对的阳性面积(即阳性面积/肌层总面积)光度,以均值计算每张切片的吸光度,最后以每组均值进行比较。

1.3 统计学方法

计量资料多组间均值的比较先采用单因素方差分析,方差齐时,以均值加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均值的两两比较用 SNK 法;方差不齐时,以平均秩次、下四分位数、中位数和上四分位数 R 表示,多组间平均秩次比较 Kruskal-Wallis 秩和检验,组间平均秩次的两两比较用 Mann-Whitney U 法;自身前后均值比较采用配对 t 检验。以上数据由 SPSS11.6 完成统计。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠胃残留率的比较

糖尿病胃轻瘫模型组大鼠的胃残留率比正常组大鼠明显升高($P < 0.05$),而给予莫沙比利灌胃糖尿病胃轻瘫模型组大鼠的胃残留率与糖尿病胃轻瘫模型组明显降低($P < 0.05$),如表 1 示。

表 1 各组大鼠胃残留率的比较

Table 1 Comparison of the gastric residual rate between different groups

Groups	Residual rate %
A normal group	43.50 $\pm$ 18.60
B model group	70.50 $\pm$ 16.82
C mosapride group **	48.14 $\pm$ 17.90

注:C 与 B 组比较, $P < 0.05$;B 与 A 比较, $P < 0.05$ 。

Note: Compared with group B, C $P < 0.05$; Compared with A, B, $P < 0.05$.

2.2 各组大鼠胃电图的比较

正常状态下,大鼠胃电图的波幅和频率比较稳定。糖尿病胃轻瘫模型组大鼠与正常组比较有显著性差异($P < 0.05$),而给予莫沙比利灌胃糖尿病胃轻瘫组大鼠与糖尿病胃轻瘫模型组胃电图相比,存在显著性差异($P < 0.05$,如图 1、表 2 示)。各组大鼠胃电图变化见表 1。

2.3 各组大鼠胃窦 Cajal 间质细胞数量的比较

糖尿病胃轻瘫模型组大鼠胃窦 Cajal 间质细胞与正常组比较减少,并且有显著性差异($P < 0.05$),而给予莫沙比利灌胃糖尿病胃轻瘫模型组大鼠与糖尿病胃轻瘫模型组大鼠胃窦 Cajal 间质细胞相比增多,存在显著性差异($P < 0.05$,如图 3 示)。各组大鼠胃窦 Cajal 间质细胞表达的影响见图 4。

3 讨论

糖尿病胃轻瘫 (DGP) 是糖尿病患者临床上常见的并发症,患者可表现为恶心呕吐、餐后不适、饱胀、早饱、腹胀、上腹痛等症状,严重影响着患者的生活质量^[6]。胃排空延缓刺激胃窦部 G 细胞分泌胃泌素,增加胃酸分泌,胃窦、十二指肠运动失调和幽门括约肌功能障碍可导致十二指肠—胃反流。1958 年首次提出糖尿病胃轻瘫的概念,目前认为其发病机制主要与胃肠激素异常、自主神经病变、糖尿病微血管病变及高血糖使胃排空延迟等密切关系^[7-10]。近几年研究发现,糖尿病胃轻瘫患者及动物模型存在 Cajal 间质细胞网络异常,在超微结构损伤以及在神经末梢与平滑肌之间的缝隙连接变少。越来越多的研究

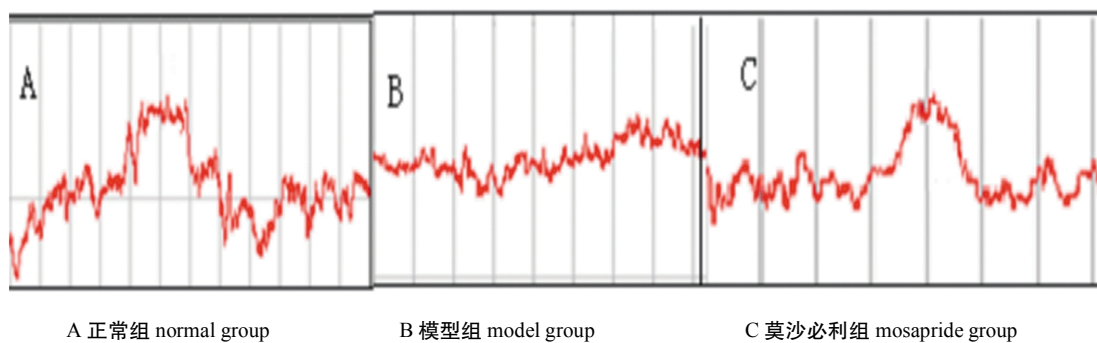


图 1 各组大鼠胃电图

Fig.1 Electrogastrogram of rats in different groups

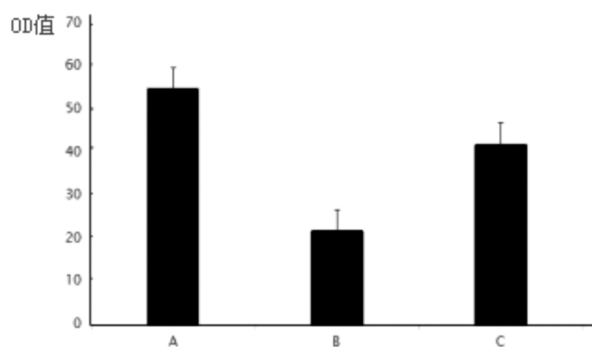
表 2 各组大鼠胃电图的比较

Table2 Comparison of the electrogastrogram between different groups

Groups	Frequency/(次/min)	Wave amplitude(μ v)
A normal group	2.6 ± 0.6	186.52 ± 20.56
B model group	1.8 ± 0.2	210.72 ± 16.90
C mosapride group *	2.4 ± 0.5	153.06 ± 18.96

* 注: C 与 B 组比较, $P < 0.05$; B 与 A 比较, $P < 0.05$ 。

Note: Compared with group B, $P < 0.05$; Compared with A, B, $P < 0.05$.



C 与 B 组比较, $P < 0.05$; B 与 A 比较, $P < 0.05$

图 2 大鼠胃窦 Cajal 间质细胞表达的影响

Fig.2 The rat gastric antrum Cajal interstitial cells express

表明糖尿病胃轻瘫可能与 Cajal 间质细胞的缺失或缺陷等因素有关, ICC 的缺失或受损可能是糖尿病胃轻瘫发病的关键原因 [12-15]。

多中心临床观察提示, 莫沙必利治疗糖尿病引起的胃轻瘫有着明显好转, 目前认为主要通过兴奋了胃肠道的胆碱能神经元, 与肌间丛 5-HT₄ 受体结合, 促进释放 Ach、直接作用于肠壁平滑肌, 协调平滑肌的功能, 最终刺激患者胃肠道, 而改善了糖尿病胃轻瘫 [16-20]。Cajal 间质细胞在糖尿病胃轻瘫的发生是否起了关键性的作用, 本实验通过电生理学方法证明了糖尿病胃轻瘫大鼠的胃动力明显比正常大鼠降低, 而经莫沙必利治疗后糖尿病胃轻瘫大鼠胃动力明显有所好转, 这说明了莫沙必利对治疗糖尿病胃轻瘫大鼠有效, 而从免疫组化方法也同样说明了糖尿病胃轻瘫大鼠的 ICC 明显比正常大鼠胃的 ICC 数量表达降低, 而经莫沙必利治疗后糖尿病胃轻瘫大鼠的 ICC 表达明显有

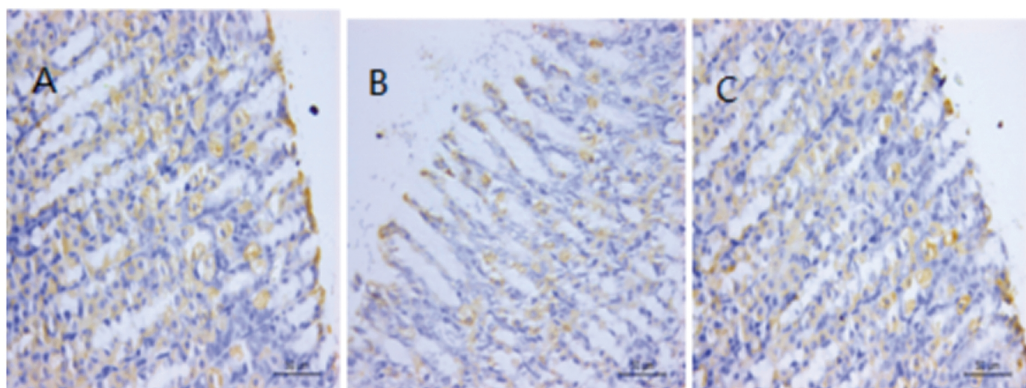


图 3 大鼠胃窦 Cajal 间质细胞表达的影响

Fig.3 The rat gastric antrum Cajal interstitial cells express

所增加,因此,可以认为 Cajal 间质细胞在糖尿病胃轻瘫的发生起着关键作用,而且可以探讨莫沙必利促进糖尿病胃轻瘫大鼠的胃动力的作用机制与 Cajal 间质细胞有着密切的联系。我们考虑未来针对糖尿病胃轻瘫的治疗,可通过影响 Cajal 间质细胞来发挥作用,然而具体的通路机制以及具体作用机制还可能需要进行进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Wellington J, Scott B, et al. Effect of endoscopic pyloric therapies for patients with nausea and vomiting and functional obstructive gastroparesis [J]. *Auton Neurosci*, 2016, Jul 16.pii:S1566-0702(16)30102-3
- [2] Parkman HP. Granisetron Transdermal System for Treatment of Symptoms of Gastroparesis: A Prescription Registry Study [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2016,8. 10.5056
- [3] Khashab MA, Ngamruengphong S, et al. Gastric peroral endoscopic myotomy for refractory gastroparesis: results from the first multicenter study on endoscopic pyloromyotomy [J]. *Gastrointest Endosc*, 2016, Jun 25. pii:S0016-5107(16)30332-7
- [4] Nusrat S, Bielefeldt K. Gastroparesis on the rise: incidence vs awareness?[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2013, 25: 16-22
- [5] Grover M, Bernard CE, et al. NIDDK Gastroparesis Clinical Research Consortium (GpCRC). Clinical histological associations in gastroparesis: results from the Gastroparesis Clinical Research Consortium[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(6): 531-539
- [6] Othman A. Al-Shboul, The Importance of Interstitial Cells of Cajal in the Gastrointestinal Tract[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2013, 19(1): 3-15
- [7] Horvath VJ, Vittal H, Lorincz A, et al. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130: 759-770
- [8] Yin J. Roles of interstitial cells of Cajal in regulating gastrointestinal motility: in vitro versus in vivo studies[J]. *Cell Mol Med*, 2008, 12(4): 1118-1129
- [9] Hasler WL, Wilson LA, Parkman HP, et al. Factors related to abdominal pain in gastroparesis: contrast to patients with predominant nausea and vomiting[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2013, 25: 427-438
- [10] Yamamoto T, Watabe K, et al. Disturbed gastrointestinal motility and decreased interstitial cells of Cajal in diabetic db/db mice [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(4): 660-667
- [11] Yimin Li, Hideto Kojima, et al. Homing of the Bone Marrow-Derived Interstitial Cells of Cajal is Decreased in Diabetic Mouse Intestine[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(6): 1072-1078
- [12] Chen Yan, Xu Juan-juan, Liu S, et al. Electroacupuncture at ST36 Ameliorates Gastric Emptying and Rescues Networks of Interstitial Cells of Cajal in the Stomach of Diabetic Rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e83904
- [13] Quigley EM, Camilleri M, Chang L, et al. Systematic review: cardiovascular safety profile of 5-HT₄ agonists developed for gastrointestinal disorders [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 35(7): 745-767
- [14] Zhang CM, Huang X, Lu HL, et al. Up-regulation of the Ang II/AT₁ receptor may compensate for the loss of gastric antrum ICC via the PI3k/Akt signaling pathway in STZ-induced diabetic mice [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 423: 77-86
- [15] Huizinga JD, Chen JH. Interstitial cells of Cajal: update on basic and clinical science[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2014, 16: 363
- [16] Zhang H, Miao FR, Luo YY, et al. Effect of moxibustion with ignited Zhuang-medicine medicated-thread on interstitial cells of Cajal in gastric antrum in diabetic gastroparesis rats [J]. *Zhen Ci Yan Jiu*. 2015, 40(2): 104-107, 118
- [17] Asakawa A, Ueno N, Katagi M, et al. Mosapride improves food intake, while not worsening glycemic control and obesity, in ob/ob mice with decreased gastric emptying [J]. *J Diabetes Complications*, 2006, 20(1): 56-58
- [18] 龙庆林, 房殿春, 史洪涛, 等. 胃 Cajal 间质细胞在糖尿病胃轻瘫中的作用[J]. *重庆医学*, 2005, 34(8): 1159
- Long Qing-lin, Fang Dian-chun, Shi Hong-tao, et al. Stomach Cajal interstitial cells in the role of diabetic gastroparesis [J]. *Chongqing Medical Journal*, 2005, 34(8): 1159
- [19] Bernard CE, Gibbons SJ, et al. NIDDK Gastroparesis Clinical Research Consortium (GpCRC). Association of low numbers of CD206-positive cells with loss of ICC in the gastric body of patients with diabetic gastroparesis[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2014, 26(9): 1275-1284
- [20] 何继东, 王平, 欧阳晓波. 莫沙必利治疗糖尿病胃轻瘫的荟萃分析[J]. *胃肠病学*, 2011, 16(2): 94-98
- He Ji-dong, Wang Ping, Ouyang Xiao-bo. Mosapride for the treatment of diabetic gastroparesis meta-analysis[J]. *Gastroenterology*, 2011, 16(2): 94-98