文章编号:1000-5404(2006)13-1401-03

论著

氯化氨甲酰胆碱对糖尿病大鼠胃窦平滑肌细胞膜电位的作用

龙庆林,房殿春,史洪涛,罗元辉 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 通过研究糖尿病胃运动障碍大鼠胃窦平滑肌细胞膜电位变化及其对氯化氨甲酰胆碱(carbachol,CCH)反应,探讨糖尿病大鼠胃电节律失常及胃运动障碍原因。**方法** 健康2个月大小Wistar大鼠50只,分为糖尿病组和正常对照组,用链尿佐菌素建立大鼠糖尿病模型,3个月后记录胃电图,测定胃排空时间,然后用激光共聚焦方法测定胃窦平滑肌细胞膜电位,观察不同浓度的氯化氨甲酰胆碱对膜电位的影响。**结果** 与正常大鼠相比,糖尿病大鼠胃电节律失常明显增加,异常节律指数和慢波频率变异系数分别高达30.6%和23.5%,均显著高于正常组(分别为10%和17.5%),糖尿病大鼠胃排空明显延迟,但其胃窦平滑肌细胞膜电位无明显改变;应用CCH后,糖尿病大鼠胃窦平滑肌细胞对CCH敏感性增加。**结论** 糖尿病胃窦平滑肌细胞对胆碱能神经递质敏感性增加,可能是糖尿病胃电节律失常及胃排空障碍原因之一。

关键词:糖尿病;膜电位;平滑肌;氯化氨甲酰胆碱
中图法分类号:R337.5;R587.202;R971.91 **文献标识码**:A

Effect of carbachol on membrane potential of smooth muscle cells of gastric antrum of diabetic rats

LONG Qing-lin, FANG Dian-chun, SHI Hong-tao, LUO Yuan-hui (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of carbachol (CCH) on membrane potential of smooth muscle cells of gastric antrum of diabetic rats to verify the mechanism of gastric motility disturbance. Methods Fifty healthy Wistar rats of 2-month old, weighing 100 – 160 g, were divided into the control group (n = 20) and diabetes mellitus group (n = 30). Three months after the establishment of the rat model of diabetes by intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin, gastric emptying time and gastric electrical activity were measured, and the resting membrane potentials of smooth muscle cells in antrum were measured by confocal laser scanning microscopy, then treated with carbachol of 10^{-9} mmol/L, 10^{-8} mmol/L, 10^{-7} mmol/L, the membrane potentials were measured. Results As compared with the normal rats, gastric emptying time in diabetic rats was significantly longer and abnormal gastric electric rhythm was significantly increased, the abnormal rhythm index (ARI) and the coefficient of variation (CV) of slow wave frequency in diabetic rats were significantly higher, but the resting membrane potentials remained unchanged and the sensitivity of CCH-induced membrane depolarization was increased. Conclusion The increase of sensitivity of CCH-induced membrane depolarization may be involved in the diabetes-induced gastric motor disorders.

Key words: diabetes; membrane potential; smooth muscle; carbachol

糖尿病胃运动功能障碍是糖尿病常见的一种慢性并发症,其发病机制目前仍不十分清楚。许多实验及临床观察表明,糖尿病存在着明显的胃电节律失常。目前认为慢波是胃肌电活动的起步电位,慢波决定着胃收缩的频率、速度和方向,因而胃电活动与胃运动密切相关,胃电节律失常可导致胃运动异常。

胃肠道慢波电活动分为控制性电活动和反应性电活动,控制性电活动起源于胃肠道Cajal间质细胞,而反应性电活动由平滑肌细胞产生。已有研究表明,糖尿病大鼠存在有胃Cajal间质细胞数量及超微结构改变,且糖尿病大鼠胃Cajal间质细胞改变与糖尿病胃运动功能紊乱及胃电节律失常密切相关,但对糖尿病大鼠胃平滑肌细胞反应性电活动的改变仍不清楚。本实验通过观察糖尿病大鼠胃窦平滑肌细胞膜电位变化及其对胆碱能神经递质反应性改变,从平滑肌角度探讨

作者简介:龙庆林(1970-),男,湖南省茶陵县人,博士,主治医师,主要从事胃肠动力学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754124,E-mail:qinglinlong@yahoo.com.cn
通讯作者:房殿春,电话:(023)68754124
收稿日期:2005-03-05;修回日期:2005-11-18

糖尿病胃电节律紊乱以及胃排空延迟原因。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康2个月大小Wistar大鼠50只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量100~160 g,雌雄各半,完全随机化设计分为实验组和对照2组:实验组Wistar大鼠30只,用于建立鼠糖尿病模型;正常对照组20只。

1.2 糖尿病模型建立

实验组大鼠禁食12 h后,腹腔内注射链尿佐菌素(streptozotocin, STZ) 60 mg/kg;正常对照组腹腔内只注射等量的生理盐水。两组大鼠每2周采用快速血糖测定仪测定测血糖1次,同时测体质量,并观察大鼠的食量、尿量、饮水情况等。

1.3 胃肌电活动的记录

建模3个月后记录正常大鼠及糖尿病大鼠胃电图。

1.3.1 手术埋植电极 大鼠禁食12 h,3%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射麻醉后,沿剑突下正中线切开腹腔,在距幽门大约0.5 cm处,将电极的银丝部分沿胃的纵轴方向与纵形肌平行刺入胃窦部肌层,然后弯曲缝合固定,两电极间距约0.3 cm。

1.3.2 记录胃肌电 1周后记录胃电信号,由计算机采集并分析输出信号,待胃电记录平稳后开始记录,每次记录60 min。

1.3.3 胃肌电参数处理 由计算机自行分析采集的胃电图信号。胃肌电记录以每2 min为一时间段,计算每个时间段胃电慢波频率,再计算出每组动物慢波的频率、频率变异系数和异常节律指数。根据本实验记录正常对照组大鼠胃电慢波频率(4.41±0.91/min),将慢波频率正常范围定为2.63~6.19次/min。根据胃电节律失常定义,参考胃电频谱分析方法,将大鼠胃电节律失常分为3型:胃动过速:慢波频率≥6.19次/min,节律整齐,波形规则,持续时间≥1 min;胃动过缓:慢波频率≤2.63次/min,节律整齐,波形规则,持续时间≥1 min;节律不齐:慢波频率过缓或过速,不规则,振幅高低不一,持续时间≥1 min。

1.4 胃排空时间测定

大鼠禁食12 h后,将2%的美蓝溶液0.4 ml胃内灌注,30 min后脱臼处死大鼠,迅速开腹取出全胃放置于冰上,沿胃大弯侧剪开胃,将胃内残留物用4 ml去离子水冲洗并收集,3 500 r/min离心15 min,取上清液用Beckman Du640分光光度计以640 nm波长比色测吸光度,即为胃内色素残留率,求出与对照均值的百分比即为各样本的胃内色素相对残留率。

1.5 平滑肌细胞膜电位测定

实验前大鼠禁食18~20 h,自由饮水。大鼠脱臼处死后,剖腹立即取出胃,沿胃小弯剪开胃,置于冰冷的HEPES-Ringer缓冲液中,除掉大网膜,剥去浆膜,用眼科剪剪去黏膜,取胃窦(距幽门0.3~0.5 cm)组织,并剪成2 mm×2 mm小块,将肌肉组织孵育于30 ℃,10 ml体积含0.1%胶原酶和0.01%胰蛋白酶抑制剂的HEPES-Ringer缓冲液中,通入100%的氧气,消化胃肌肉组织30 min,共消化2次。当2次消化完成后,用无酶的pH 7.4的HEPES-Ringer液洗3次,每次10 ml,肌肉组织被重新悬浮于10 ml的HEPES-Ringer液中,通入100%的氧气,轻轻震荡20 min使细胞分散。滴1滴细胞悬液于载玻片上,待细胞贴片后,吸弃培养皿内的培养液,用不含白蛋白的HEPES-Ringer缓冲液洗3遍,滴加5 μmol/L $DiBAC_4(3)$染液100 μl,37 ℃避光孵育,使染料达到细胞膜内外平衡。保留染液使用德国BP2型激光扫描共聚焦显微镜,将培养皿置于倒置显微镜受488 nm激光束激发,确定测定的细胞后进入预扫描程序,调节并确定扫描参数开始动态扫描。首先测定静息状态下平滑肌细胞荧光强度,之后测定加入不同浓度的氯化氨甲酰胆碱(Carbachol, CCH)(10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mmol/L)平滑肌细胞荧光强度变化[1,2]。

1.6 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS软件进行t检验及Fisher检验。

2 结果

2.1 一般情况

糖尿病模型建立后,糖尿病组大鼠血糖明显升高,出现了明显的多饮、多尿、多食。注射STZ 3个月后,糖尿病组大鼠平均血糖浓度为(22.3±2.4) mmol/L,显著高于正常对照组大鼠的(4.2±0.9) mmol/L($P<0.01$);糖尿病组大鼠的平均体质量为(197.9±45.26) g,明显低于正常对照组大鼠的平均体质量[(264.7±55.80) g, $P<0.01$]。

对照组大鼠慢波多数呈正弦波形,少数有切迹,呈双峰型,振幅较整齐,频率范围为2.63~6.19次/min,平均频率为(4.41±0.91)次/min,平均频率最大相差1次/min以上。慢波频率变异系数为17.5%,异常节律指数为10%,节律失常持续时间短暂,约1~2 min,呈一过性。

糖尿病大鼠慢波频率范围为1.62~6.44次/min,平均为(4.03±1.23)次/min,波形不规则,振幅低且不齐,出现了明显的胃电节律失常,异常节律指数及慢波频率变异系数分别高达30.6%和23.5%,均显著高于正常对照组($P<0.01$及$P<0.05$)。

我们用美蓝测定胃液体排空时间,根据胃内美蓝残留率的多少判断胃排空的快慢。给大鼠胃内灌注美蓝,30 min后用分光光度计测定大鼠胃内美蓝残留率:糖尿病大鼠胃内美蓝残留率为(134.38±21.25)%,而正常对照大鼠胃内美蓝残留率仅为(100.00±16.46)%,明显低于糖尿病组($P<0.01$),说明糖尿病大鼠胃排空明显延迟。

2.2 大鼠胃窦平滑肌细胞膜静息电位测定

本实验用激光共聚焦方法测定大鼠胃窦平滑肌细胞膜电位:用带负电荷的细胞膜电位特异荧光染料$DiBAC_4(3)$作为测定膜电位的亲脂性阴离子荧光探针。它在细胞外无荧光,进入细胞后与细胞内蛋白结合后发出荧光。去极化时进入细胞,细胞内荧光强度增强,超极化时探针排出胞外,荧光强度降低,根据其在细胞内外的重新分布,可以判断出膜电位的变化。与正常大鼠胃窦平滑肌细胞内荧光强度相比,STZ诱发的糖尿病大鼠胃窦平滑肌荧光强度虽然有所改变,但改变并不明显,正常对照大鼠胃窦平滑肌细胞荧光强度为(499.5±54.6),糖尿病大鼠胃窦平滑肌细胞荧光强度为(489.6±56.5),经统计学处理无显著差别($P>0.05$)。

2.3 CCH对胃窦平滑肌细胞的作用

CCH能使胃窦平滑肌细胞发生超极化,细胞内荧光强度增

强，在一浓度范围内，超极化的作用与 CCH 浓度呈正比。在正常大鼠胃窦平滑肌细胞细胞，给予 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mmol/L CCH 分别使细胞内荧光强度上升 19.6%、45.4% 和 85.1%；而在糖尿病大鼠胃窦平滑肌细胞细胞，给予相同剂量 CCH 可分别使细胞内荧光强度上升到 28.7%、64.7% 和 108.6%，均明显高于正常大鼠，说明糖尿病大鼠胃窦平滑肌对 CCH 敏感性高于 0 mol/L CCH 组（$P<0.05$，$P<0.01$）。

3　讨论

胃运动功能障碍是糖尿病常见的一种慢性并发症，Ⅰ型、Ⅱ型糖尿病均可以发生，10 年以上患者胃神经肌肉功能异常发生率高达 30% ~50%，但其发病机制目前仍不十分清楚。许多临床观察及实验研究表明[3,4]，糖尿病存在着明显的胃电节律失常如胃动过缓等，机制尚不完全清楚。

胃肠道慢波电活动分为控制性电活动和反应性电活动，控制性电活动起源于位于肠肌丛和环行肌黏膜下边缘的 Cajal 间质细胞，它决定了胃肠蠕动的速度、频率以及慢波波形等，我们以前的研究发现糖尿病时 Cajal 间质细胞超微结构发生了明显的改变，同时胃排空延迟以及胃电节律失常明显增加，认为糖尿病胃窦 Cajal 间质细胞改变与胃电节律失常及胃运动障碍关系密切[4]；反应性电活动由平滑肌细胞产生，它主要同胃电图的能量变化有关。平滑肌细胞不仅对 Cajal 间质细胞引起的周期性去极化/复极化发生反应，产生反应性电活动，而且还是胃肠运动最基本条件。在慢波作用下，平滑肌细胞膜去极化，从而发生收缩反应，平滑肌变性必然导致其收缩功能的变化。但目前对糖尿病时平滑肌细胞反应性电活动的改变仍不清楚。为此，我们采用激光共聚焦方法测定平滑肌细胞膜电位的变化，结果显示与正常大鼠相比，糖尿病大鼠胃窦平滑肌细胞静息膜电位无明显改变。但记录的胃电慢波显示正常对照大鼠胃窦慢波节律整齐，频率为 2.63 ~6.19 次/min，平均为（4.41 ±0.91）次/min，在糖尿病大鼠却出现了明显的胃电节律失常：慢波频率减慢，振幅较低，节律明显不齐，异常节律指数和慢波频率变异系数分别高达 30.6% 和 23.5%，均显著高于正常对照组。提示糖尿病胃电节律紊乱主要归因于 Cajal 间质细胞的病变以及 Cajal 间质细胞与平滑肌细胞间连接的改变。

胃肠道神经系统中主要的兴奋性神经是胆碱能神经，其递质乙酰胆碱（Ach）对多种离子通道均有作用，从而抑制细胞超极化，使细胞去极化，并激发动作电位，致使平滑肌细胞收缩[5,6]。

许多研究表明，糖尿病时平滑肌对神经递质反应性发生了改变，如 STZ 糖尿病大鼠胃平滑肌细胞对肾上腺素反应减弱；但在盲肠，对肾上腺素反应却增加。不同部位的平滑肌组织对乙酰胆碱的反应也不一样：在 BB/W 糖尿病大鼠胃体平滑肌经 CCH 作用后，细胞内蛋白激酶 C 以及三磷酸肌醇的改变不如正常大鼠那么明显，CCH 以及电刺激引起胃体平滑肌肌条收缩反应也较正常大鼠下降；在 STZ 诱发糖尿病的 Wistar 大鼠，回肠平滑肌对 CCH 及电刺激的反应性也减弱[7]；但在 STZ 糖尿病大鼠主动脉，平滑肌收缩能力增加[8]；在 STZ 糖尿病大鼠气管，CCH 和乙酰胆碱引起收缩的最大幅度明显大于正常大鼠。这些研究结果提示糖尿病平滑肌改变存在器官特异性。

在本实验中，我们利用激光共聚焦显微镜观察 CCH 对糖尿病大鼠胃窦平滑肌细胞对细胞膜电位的影响，发现 CCH 能引起细胞膜明显的去极化，其作用与其浓度密切相关。但在糖尿病大鼠胃窦平滑肌细胞，CCH 致细胞去极化作用明显强于正常大鼠。而平滑肌的收缩是在细胞去极化基础上发生的，因而说明在糖尿病大鼠胃窦，CCH 致平滑肌收缩增强。同时糖尿病大鼠胃体、胃底平滑肌细胞对 CCH 致收缩的反应性减弱，从而有可能导致胃底、胃体和胃窦运动失耦联，使胃移行性复合运动不协调，从而使胃排空延缓。

参考文献：

[1] SCOTT V E, DAVIS-TABER R A, SILVIA C, *et al*. Characterization of human urinary bladder $K_{(ATP)}$ channels containing SUR2B splice variants expressed in L-cells[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 483(2-3): 195-205.

[2] WOLFF C, FUKS B, CHATELAIN P. Comparative study of membrane potential-sensitive fluorescent probes and their use in ion channel screening assays[J]. J Biomol Screen, 2003, 8(5): 533-543.

[3] WARD S M, SANDERS K M. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation[J]. Anat Rec, 2001, 262(1): 125-135.

[4] LONG Q L, FANG D C, SHI H T, *et al*. Gastro-electric dysrhythm and lack of gastric interstitial cells of cajal[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(8): 1227-1230.

[5] EMERSON G G, NEILD T O, SEGAL S S. Conduction of hyperpolarization along hamster feed arteries: augmentation by acetylcholine[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(1): H102-H109.

[6] SO I, YANG D K, KIM H J, *et al*. Five subtypes of muscarinic receptors are expressed in gastric smooth muscles of guinea pig[J]. Exp Mol Med, 2003, 35(1): 46-52.

[7] NOBE K, MOMOSE K, SAKAI Y. Effects of Kampo medicine, keishi-ka shakuyaku-to (TJ-60) on alteration of diacylglycerol metabolism in gastrointestinal smooth muscle of diabetic rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(12): 1173-1180.

[8] NOBE K, SAKAI Y, MARUYAMA Y, *et al*. Hyper-reactivity of diacylglycerol kinase is involved in the dysfunction of aortic smooth muscle contractility in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Br J Pharmacol, 2002, 136(3): 441-451.

（编辑　汪勤俭）