文章编号:1000-5404(2011)03-0233-04

论著

匹维溴胺对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠组织AQP3表达影响

刘慧慧[1],王艳杰[2],刘旭东[1],关洪全[3],柴纪严[4],赵金茹[4],王德山[1] (110032 沈阳,辽宁中医药大学:基础医学院生理学教研室[1],基础医学院生物化学教研室[2],基础医学院免疫微生物学教研室[3],实验中心[4])

【摘要】 **目的** 观察匹维溴胺对腹泻型肠易激综合征(D-IBS)模型大鼠血清以及结肠组织血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide,VIP)含量、结肠组织水通道蛋白3(aquaporin 3,AQP3)表达的影响,探讨其治疗D-IBS的作用机制。**方法** 采用慢性应激与束缚相结合方法建立D-IBS大鼠模型。采用ELISA法检测VIP含量;采用Real time-PCR法和SABC免疫组化法检测AQP3的表达。**结果** 在血清和结肠组织中VIP的含量,与对照组[(3.092±0.613)ng/ml,(3.811±0.275)ng/ml]比较,模型组[(10.460±1.666)ng/ml,(4.495±0.341) ng/ml]与匹维溴胺组[(5.639±1.163)ng/ml,(4.063±0.534)ng/ml]均升高($P<0.05$),尤以模型组升高的更为明显($P<0.01$);两组AQP3的表达均下调($P<0.01$),尤以模型组AQP3蛋白表达下调显著。**结论** 匹维溴胺治疗D-IBS的作用机制之一,可能与抑制结肠组织中VIP分泌和上调AQP3表达有关。

【关键词】 腹泻型肠易激综合征;血管活性肠肽;水通道蛋白3;匹维溴胺
【中图法分类号】 R394.2;R574.4;R975.3 **【文献标志码】** A

Effect of pinaverium bromide on expression of aquaporin 3 in colon tissue of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

Liu Huihui[1], Wang Yanjie[2], Liu Xudong[1], Guan Hongquan[3], Chai Jiyan[4], Zhao Jinru[4], Wang Deshan[1] ([1]Department of Physiology, [2]Department of Biochemistry, [3]Department of Immune Microbiology, College of Basic Medicine, [4]Experimental Center, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning Province, 110032, China)

【Abstract】 **Objective** To study the serum vasoactive intestinal peptide (VIP) level and the effect of pinaverium bromide (PB) on expression of aquaporin 3 (AQP3) in colon tissue and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS) model of rats. **Methods** A D-IBS rat model was established with chronic stress plus binding limbs. Level of VIP was measured by ELISA and expression of AQP3 was detected by real-time PCR and SABC, respectively. **Results** The VIP level in serum and colon tissue was higher in model group (10.46±1.666 and 4.495±0.341 ng/ml) and PB group (5.639±1.163 and 4.063±0.534 ng/ml) than in control group (3.092±0.613 and 3.811±0.275 ng/ml) ($P<0.05$), which was particularly high in model group. The expression of AQP3 in colon tissue was remarkably decreased in model group and PB group, especially in model group ($P<0.01$). **Conclusion** PB improves D-IBS by inhibiting the secretion of VIP and up-regulating the AQP3 expression in colon tissue.

【Key words】 diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; vasoactive intestinal peptide; aquaporin 3; pinaverium bromide

Supported by the National Basic Research Program of China (973 program, 2007CB512702). Corresponding author: Wang Deshan, E-mail: wwddss5768@yahoo.com.cn

腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome,D-IBS)是一种临床最常见的慢性肠功能紊乱性疾病,目前虽然对D-IBS的病因及发病机制尚不清楚,但脑肠互动的发病模式和神经内分泌网络的发病机制正成为新的研究热点。组织水通道蛋白(aquaporins,AQPs)的发现为阐明肠道内水液转运机制研究拓展了视野,然而水通道蛋白在胃肠道内的分布及其功能调节机制目前尚未阐明[1]。AQP_S是一类糖蛋白家族,多种AQP_S都含有PKA和蛋白激酶C(PKC)的同源序列,所以能够直接接受磷酸化调节。由于血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide,VIP)属于含氮物质,其VIP1-R属于G蛋白耦联型受体。有报道提出VIP可以通过细胞蛋白激酶A系统来改变

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划,2007CB512702)
【通信作者】 王德山,E-mail:wwddss5768@yahoo.com.cn

膜上 AQP 的含量以调节跨膜水流动,从而调节膜对水的通透性[2]。由此推测 VIP 可能通过调控胃肠组织 AQPs 表达而参与结肠内的水液分泌与转运过程。本研究通过观测匹维溴胺(pinaverium bromidel)对 D-IBS 模型大鼠结肠组织中 VIP 含量以及对 AQP3 表达的影响,旨在探讨匹维溴胺治疗 D-IBS 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要药物和试剂

大鼠 VIP ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司,Catalogue No:QRCT-3013322200021EIA/UTL);RNAiso™ Plus(TaKaRa Code. D9108);SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit (Perfect Real Time)(TaKaRa Code. DRR063A),TaKaRa DNase I (RNase Free)(TaKaRa Code. D2215);Easy Dilution (for Real Time PCR)(TaKaRa Code. D9160);DL2000 DNA Marker (TaKaRa Code. D501);PrimerScriptTMRT-PCR Kit (TaKaRa Code. DRR014);*in vitro* Transcription T7 Kit (TaKaRa Code. D6140);AQP3 抗体(美国 ADL 公司,兔抗大鼠);匹维溴胺片(法国苏威制药,生产批号 610994)。

1.2 动物分组及 D-IBS 模型复制

SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体质量(220 ± 20) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SCXK(京)2007-0001。分笼适应性饲养 1 周,常规摄食饮水,室温控制在 18 ~ 23 ℃,相对湿度 45% ~55%。参照文献[3 - 4]采用应激刺激与束缚相结合方法建立 D-IBS 模型,依据文献[5]对模型进行评价。在实验过程中无动物死亡现象发生,参与 D-IBS 模型复制大鼠总计 24 只,依据成模评价标准选用 20 只作为实验对象。将成模动物采用随机数字法分为 D-IBS 模型组(下称模型组)、匹维溴胺组,并设立正常对照组(下称对照组),每组 10 只。模型复制成功后进行 1 周的治疗,按照“等效剂量”原则,以 15 mg/kg 的匹维溴胺灌胃给药 7 d;对照组和模型组予以等容量的生理盐水灌胃 7 d。

1.3 血清和结肠组织 VIP 含量检测

治疗结束后将大鼠处死,取距肛门 10 cm 处结肠 1 cm,用眼科剪刀沿结肠长轴将结肠展开,生理盐水冲洗干净,用灭菌锡纸包好结肠组织并且明确标号后,放在 - 70℃保存,备用。依据文献[5]测定各组大鼠血清和结肠组织中 VIP 含量。

1.4 SABC 免疫组化法检测结肠组织 AQP3 蛋白的表达

按上述方法取距肛门 11 cm 处结肠 1 cm,用生理盐水冲洗干净后放入 4% 的多聚甲醛中固定。石蜡包埋,4 μm 切片、脱蜡、3% H_2O_2 室温孵育 30 min、滴加正常山羊血清、37 ℃孵育 30 min、滴加适当稀释的 AQP3 抗体(兔抗大鼠,稀释浓度为 1∶100),4 ℃过夜;滴加羊抗兔生物素化二抗,20 ~ 37 ℃,20 min;滴加试剂 SABC,20 ~ 37 ℃,20 min;使用 DAB 显色试剂盒,室温显色,蒸馏水洗涤。苏木精轻度复染。梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片。结果分析方法:应用 BI2000 医学图像分析系统对 AQP3 的蛋白表达进行定量分析,每张切片选取 3 ~ 5 个不重叠视野(×400 倍),测定每个视野下的平均光密度(mean optical density,MOD)值,MOD 值代表阳性表达参数,MOD 值越大,阳性表达越强。检测波长的下限为 0 ~ 15,上限为 70 ~ 150。

1.5 Real time-PCR 法检测结肠组织 AQP3 mRNA 表达

按上述方法取距肛门 12 cm 处结肠 1 cm,将标本放入液氮预冷的研钵中研磨后按照常规方法提取总 RNA。采用 Real time-PCR 方法测定各组大鼠结肠组织 AQP3 基因的 mRNA,进行相对表达量分析。利用 RNAiso™ Plus 进行总 RNA 的提取,用 DNase Ⅰ处理、精制后,利用 SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit 采用 SYBR Green Ⅰ荧光染料嵌合法,以总 RNA 反转录获得的 cDNA 作为标准品,分别对管家基因 Actb 和目的基因 AQP3 制作标准曲线,目的基因 AQP3 的 Ct 值范围是 20 ~ 30。利用标准曲线分别对各样品管家基因和目的基因进行定量,通过管家基因的校正,对各样品目的基因相对表达量进行分析。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 RCR 引物序列

引物	序列(5′ - 3′)	产物大小
Actb 正义链	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	171 bp
反义链	ATGGAGCCACCGATCCACA	
Aqp3 正义链	GCCATTGTTGACCCTTATAACAAC	150 bp
反义链	AGTGAAAAGGCGAGGTCCAA	

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 匹维溴胺对 D-IBS 模型大鼠血清和结肠组织 VIP 含量的影响

血清和结肠组织 VIP 含量的检测结果如表 2 显示,与对照组比较,模型组大鼠的结肠和血清中 VIP 含量均有明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,经过匹维溴胺治疗以后,血清与结肠组织中 VIP 含量已经明显降低($P < 0.01$)。

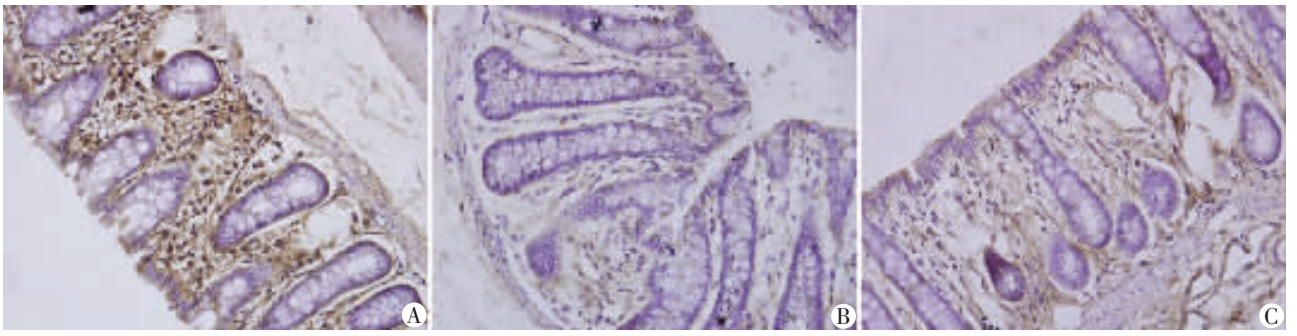
表 2 各组大鼠血清和结肠组织中 VIP 含量的变化($n = 8$,ng/ml,$\bar{x} \pm s$)

组别	结肠	血清
对照组	3.811 ± 0.276	3.092 ± 0.614
模型组	4.495 ± 0.341[b]	10.460 ± 1.666[b]
匹维溴胺组	4.063 ± 0.534[bc]	5.639 ± 1.163[ac]

a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与对照组比较;c:$P < 0.01$,与模型组比较

2.2 匹维溴胺对 D-IBS 模型大鼠结肠组织 AQP3 蛋白表达影响

如图 1 所示,在光学显微镜下(×400)观察,AQP3 阳性细胞在结肠黏膜层表达较多,但在固有层的细胞核周围也有较高表达。其中对照组 AQP3 阳性细胞着色最深,匹维溴胺组着色居中,D-IBS 模型组着色最浅。图像分析 MOD 值的结果显示:与对照组相比(0.601 ± 0.027),模型组(0.284 ± 0.025)和匹维溴胺组(0.374 ± 0.031) AQP3 的蛋白表达均明显减少($P < 0.01$),且模型组和匹维溴胺组间比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。表明匹维溴胺可以增加 D-IBS 模型组大鼠结肠组织 AQP3 的蛋白表达。



A:对照组;B:模型组;C:匹维溴胺组

图1 各组大鼠结肠组织中AQP3阳性细胞的表达 (SABC ×400)

2.3 匹维溴胺对D-IBS模型大鼠结肠组织AQP3 mRNA表达影响

Real time-PCR结果显示:与对照组(7.016±1.250)比较,模型组(1.092±0.085)和匹维溴胺组(2.145±0.563)结肠组织中AQP3的mRNA表达量均降低($P<0.01$);与模型组相比,匹维溴胺组结肠组织中AQP3表达有所升高,但经统计学分析未显示出差异性。

3 讨论

AQP3主要分布于从口腔到胃以及从结肠到肛门段的消化道黏膜上皮上,Northern blot显示AQP3在结肠表达明显多于小肠和胃[6]。迄今为止,AQP3在结肠的表达部位、表达数量以及与D-IBS所发生的腹痛、腹泻是否有关等均不明确。Silberstein等研究发现AQP3高表达可引起结肠黏膜对水的吸收增加而导致便秘,AQP3的低表达可引起结肠黏膜对水吸收减少而导致腹泻或便溏[6-7]。Julian等[8]通过对小鼠腹泻模型研究发现,在病情活动期时结肠AQP2、AQP3表达降低,病情好转后这些蛋白表达恢复到正常水平。以上均表明,AQP3在结肠水的转运中起重要作用,其代谢异常可以引起腹泻或便秘。本研究发现AQP3阳性细胞在结肠黏膜层表达较多,但在固有层的细胞核周围也有较高表达,与Guttman等[8]的报道比较吻合。其中模型组大鼠结肠组织AQP3的mRNA和蛋白表达与对照组相比均有下降。由此推测D-IBS模型大鼠出现腹泻的症状可能与AQP3表达降低后影响了结肠内水转运所致。根据AQP3的分布部位可以认为,AQP3不仅参与了结肠黏膜处水的转运,而且对其黏膜下层等处的水转运过程依旧有作用。

VIP属于脑-肠肽物质,在胃肠道主要作为神经递质起到舒张胃肠、血管平滑肌以及刺激腺体分泌等作用。近年在对D-IBS发生机制的研究发现,D-IBS患者在腹痛、腹泻等症状出现同时往往伴有血与结肠组织中VIP含量升高[9-10],但有学者认为,D-IBS患者结肠黏膜VIP表达升高可能是肠动力增强后的一种负反馈机制[11]。本实验结果显示,D-IBS模型大鼠血清和结肠组织VIP含量改变与既往的研究结果一致,提示VIP与D-IBS的腹痛、腹泻发生有着密切关系。如果根据以往报道,消化道的VIP对胃肠组织活动呈现抑制效应,那么VIP水平升高由于减缓了结肠运动则应出现便秘,而不是腹痛或腹泻症状。因此认为VIP表达升高可能是肠动力增强后的一种负反馈机制的解释似乎有些牵强。

根据本实验结果,D-IBS模型大鼠血清及结肠组织VIP水平升高同时AQP3表达降低,可以认为,D-IBS模型大鼠结肠组织VIP水平增高可能下调了结肠组织AQP3的表达而影响了结肠内水的转运,导致水吸收减少。由于结肠腔内存水量的增加,不但能够引起腹痛及腹泻发生,同时由于结肠内水分增多则提高了结肠的敏感性,通过"脑-肠轴"途径反射性地调控了肠道神经-体液-免疫网络系统活动,进而加剧了结肠组织的运动和分泌功能的异常,导致D-IBS状态下腹痛、腹泻等症状的发生。至于D-IBS状态下的VIP水平升高与腹痛、腹泻等病理生理学改变过程中,是VIP升高下调了AQP3影响结肠内水的转运而直接导致腹痛、腹泻,还是由于残留在结肠内水液增多造成了结肠高敏感性后,通过"脑-肠轴"途径反射性影响了肠道系统功能,间接地导致结肠功能异常而引起腹痛、腹泻,还有待于进一步研究证实。

以往的研究已经明确,匹维溴胺的重要药理作用在于通过阻断肠壁平滑肌细胞的Ca^{2+}通道抑制Ca^{2+}的内流,从而缓解肌肉过度收缩,降低肠平滑肌的高反应性,达到或改善腹痛、腹泻等症状。本实验结果显示,匹维溴胺还可能通过降低D-IBS模型大鼠的血清和结肠组织VIP分泌与释放,增加结肠组织AQP3的表达,由此不但促进了结肠内水的转运,同时由于结肠残存的水液减少还可能降低了结肠组织的高敏感性,从而达到减轻或缓解了D-IBS的腹痛、腹泻等症状。至于匹维溴胺抑制VIP分泌与释放,以及VIP调控AQP3表达的具体机制有待于进一步研究明确。

参考文献:

[1] Itoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, *et al*. Enhancement of aquaporin-3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell

line [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(2): 203-210.
[2] HarmarA J, Sheward W J, Morrison C F, *et al*. Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse [J]. Endocrinology, 2004, 145(3): 1203-1210.
[3] Katz R J, Roth K A, Carroll B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5(2): 247-251.
[4] Williams C L, Villar G R, Peterson J M, *et al*. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome [J]. Gastroenterology, 1988, 94(3): 611-621.
[5] 王艳杰, 王德山, 关洪全, 等. 眼针对肠易激综合征大鼠血清和结肠组织中P物质及血管活性肠肽含量的影响[J]. 针刺研究, 2010, 35(1): 8-11, 26.
[6] Ramirez-Lorca R, Vizuete M L, Venero J L, *et al*. Localization of aquaporin-3 mRNA and protein along the gastrointestinal tract of Wistar rats [J]. Pflugers Arch, 1999, 438(1): 94-100.
[7] Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, *et al*. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon [J]. Braz J Med Biol Res, 1999, 32(10): 1303-1313.
[8] Guttman J A, Samji F N, Li Y, , *et al*. Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens [J]. Cell Microbiol, 2007, 9(1): 131- 141.
[9] Van DerVeek P P, Biemond I, Masclee A A. Proximal and distal gut hormone secretion in irritable bowel syndrome [J]. Scand J Gastroenterol, 2006, 41(2): 170-177.
[10] Morise K, Furusawa A, Yamamoto H, *et al*. Role of gut hormones in irritable bowel syndrome [J]. Nippon Rinsho, 1992, 50 (11): 2697-2702.
[11] 李兆申, 董文珠, 邹多武, 等. 肠易激综合征肠黏膜SP、VIP、CGRP变化的研究[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(2): 147-151.

(收稿: 2010-09-14 修回: 2010-11-02)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2011)03-0236-01

MELAS型线粒体脑肌病1例

陈晓燕[1], 李 啸[2], 戢福云[3] (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院神经内科[1]; 402316 重庆, 重庆市九龙坡区中西医结合医院内科[2]; 400037 重庆, 第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所[3])

【关键词】 MELAS; 磁共振成像; 基因检测
【中图法分类号】 R741.04 【文献标志码】 B

线粒体脑肌病(mitochondrial encephalomyopathy, ME)是mtDNA发生突变导致线粒体结构和功能障碍、ATP合成不足所致的多系统疾病, 多数为母系遗传[1]。其临床表现取决于正常mtDNA和突变mtDNA的比例, mtDNA突变的数目越多, 临床症状越重。可分为不同的临床综合征, 部分类型表现可以重叠。常见有: ①线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作综合征(mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidemia and stroke-like episodes, MELAS), ②慢性进行性眼外肌瘫痪(chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO), ③Kearns-Sayre综合征(Kss), ④肌阵挛性癫痫伴肌肉破碎红纤维综合征(myoclonus epilepsy with ragged-red fiber, MERRF)。新桥医院收治1例MELAS型线粒体脑肌病, 报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

患者, 男性, 28岁, 因"耳聋, 反复发作性肢体抽搐、意识丧失, 偏瘫10年"于2009年10月入我院。患者10年前无明显诱因突发双耳失聪, 当地医院诊断神经性耳聋, 经高压氧、营养神经等治疗略有恢复。9年半前出现发热, 反复双上肢屈曲、双下肢伸直样抽搐, 伴意识丧失, 当地医院头颅MRI检查发现双侧额、颞、顶叶长T_1长T_2异常信号, 诊断"单纯疱疹病毒性脑炎"。经抗病毒、抗癫痫治疗, 患者意识清醒, 未再出现肢体抽搐出院。6年前患者因腹泻、发热再次出现发作性意识丧失、四肢抽搐, 在当地医院复查MRI发现左侧枕叶病变, 与9年半前相比右侧颞叶病变明显缩小, 左侧颞叶病变消失。诊断"症状性癫痫"。口服丙戊酸钠片0.25 g, 3次/d, 治疗, 四肢抽搐、意识丧失仍反复发作, 智能进行性下降。3年前改服"藏药"治疗, 意识丧失、肢体抽搐发作频率明显减少。1年前突发左侧上下肢瘫痪(上肢持物不稳、下肢行走拖行), 经静滴胞二磷胆碱、针灸治疗, 5 d后肢体瘫痪完全缓解。入院前1个月再次出现左侧肢体瘫痪, 伴精神症状(易激惹、言语增多、幻视), 当地医院再次复查MRI发现双侧额叶、颞叶长T1长T2异常信号。转入我院。出生情况好, 自幼发育无明显异常。无头部外伤史。其外祖母、母亲均在40余岁出现耳聋或听力下降, 其小姨有"反复肢体抽搐"病史。入院查体: 生命体征正常, 意识清楚, 主被动接触可, 反应力、记忆力、理解力减退, 双耳听力下降, 左侧中枢性面瘫, 左侧上、下肢肌力Ⅳ$^+$级, 左上下肢腱反射较右侧活跃, 双下肢Babinski's阳性。脑电图: 中度异常。TCD未见明显异常。腰穿脑脊液压力正常, 蛋白0.78 g/L, 余正常。血乳酸: 静息3.59 mmol/L, 活动10 min后5.71 mmol/L(正常值0.7~2.1 mmol/L)。血常规、肝肾功、血脂、心肌酶谱均正常。

1.2 影像学表现

1999年10月头颅MRI文字报告(片子丢失)左侧颞、顶、枕叶, 右侧颞顶叶长T1长T2异常信号。2003年2月头颅CT(文字报告)见左侧顶叶低密度灶; 4月头颅MRI见左侧枕叶长T_1长T_2异常信号(图1A), 与1999年MRI相比右侧颞叶病变明显缩小, 左侧颞叶病变消失。2008年6月头颅MRI见双侧颞叶皮质病灶, 与2003年4月头颅MRI相比左侧枕叶病灶消失。2009年10月头颅MRI见双侧颞、顶叶皮质及皮质下白质长T_1

(下转240页)

【通信作者】 陈晓燕, E-mail: cq1997@163.com