论著

文章编号:1000-5404(2012)01-0062-04

早期2型糖尿病大鼠胃动力变化与胃血管病变的关系

王 琼[1],严 祥[1],李维辛[1],高承霞[1],孙晓玮[2] (730030 兰州,兰州大学:第一医院老年病科[1],基础医学院病理教研室[2])

[摘要] **目的** 研究胃组织一氧化氮(nitric oxide, NO)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)与可溶性内皮细胞蛋白C受体(soluble endothelial cell protein C receptor, sEPCR)的变化情况,探讨早期糖尿病胃动力异常与胃血管病变的关系。**方法** 25只SPF级雄性SD大鼠分为正常对照组(NC组,$n=10$)、糖尿病组(DM组,$n=15$)。高糖高脂饲料喂养并腹腔注射链脲佐菌素(STZ)制备2型糖尿病大鼠模型。12周后应用单光子发射断层显像仪(SPECT)技术测定胃半排时间与胃排空速率,采用酶联免疫法测血清sEPCR,硝酸还原酶法测定胃组织NO含量,免疫组织化学方法测定胃组织eNOS免疫阳性染色密度。**结果** DM组大鼠胃半排时间(30.82±12.56)min、NO(30.82±12.56)μmol/L、eNOS平均光密度(0.36±0.15)均明显低于NC组($P<0.05$),血清sEPCR(129.45±4.83)μg/L明显高于NC组($P<0.01$)。**结论** 2型糖尿病大鼠早期胃动力加快,血管内皮功能受损,血管病变可能是胃动力障碍的始动因素。

[关键词] 胃动力;2型糖尿病;血管病变
[中图法分类号] R587.202; R333.2; R573 [文献标志码] A

Relationship of gastric motility with vasculopathy in rats at early stage of type 2 diabetes mellitus

Wang Qiong[1], Yan Xiang[1], Li Weixin[1], Gao Chengxia[1], Sun Xiaowei[2] ([1]Department of Gerontology, First Affiliated Hospital, [2]Department of Pathology, College of Preclinical Medicine, LanZhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730030, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the changes of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in gastric antrum tissue and soluble endothelial cell protein C receptor (sEPCR) in the serum in the diabetic rats, and to investigate the relationship of the gastric motility change and gastric vasculopathy in the early stages of type 2 diabetes mellitus. **Methods** A total of 25 male SPF SD rats were first divided random in two groups: control group (NC, $n=10$) and diabetic mellitus group (DM, $n=15$). The rats in the DM group were fed with fat- and caloric-rich diet and induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). After the induction, 13 rats were finally identified as DM rats. At 12 weeks, gastric emptying ($GET_{1/2}$) and gastric emptying rate were measured in NC groups and DM groups by single photo emission computed tomography (SPECT). Enzyme-linked immunosorbent assay was employed to examine the serum level of sEPCR. NO in gastric antrum tissue was detected by nitrate reductase, and eNOS observation in the gastric tissue was measured by immunohistochemical assay. **Results** The gastric emptying, gastric NO content, and mean density of eNOS were significantly lower in DM group (30.82±12.56 min, 30.82±12.56 μmol/L and 0.36±0.15, respectively) than in NC group ($P<0.05$). While the serum level of sEPCR was significantly higher in DM group (129.45±4.83 μg/L) than in NC group ($P<0.01$). **Conclusion** Our results indicate that gastric emptying is accelerated in the early stages of DM. In this stage, vascular endothelium is impaired, and thus results in gastric motility disorders.

[**Key words**] gastric motility; type 2 diabetes; vasculopathy

Supported by the Project of Health Industry Scientific Research of Gansu Province (GSWST09-04) and the Special Funds for Fundamental Research for the Central Universities of Lanzhou University (lzujbky-2009-148). Corresponding author: Yan Xiang, Tel: 86-931-8625200-6573, E-mail: yanxiang528@sohu.com

糖尿病患者合并胃动力异常并不少见,随着诊断技术的进步,约90%的糖尿病患者存在胃肠动力紊乱[1]。由于胃肠的适应与代偿调节能力较强,糖尿病胃肠并发症早期虽已存在病理结构改变[2],但临床症状却不明显;而至糖尿病中晚期,消化道症状明显出现(胃轻瘫)时,胃肠道功能很难改善。因此研究糖尿病胃动力障碍的发病机制,探讨早期可防治的方法是糖

[基金项目] 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWST09-04);兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2009-148)
[通信作者] 严 祥,电话:(0931)8625200-6573,E-mail:yanxiang528@sohu.com

尿病治疗中的重点。但糖尿病胃动力异常的发生机制尚不明确,目前认为可能与自主神经病变、高血糖、胃肠激素异常及微血管病变等有关[3]。我们认为,保持正常的胃微循环对胃动力正常作用的发挥是至关重要的。因此,本实验通过观察早期 2 型糖尿病大鼠胃排空功能及胃血管病变情况,从胃血管病变的角度来了解胃动力异常发生的机制,为糖尿病胃动力障碍的治疗找到一条新途径。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型建立

SPF 级雄性 2 月龄 SD 大鼠 25 只,体质量 170 ~ 200 g,购自甘肃省中医学院实验动物中心 SPF 级实验室,动物质量合格证号:SCXK(甘)2004-0006-0000891。大鼠适应性饲养 1 周后,称质量,分为 2 组,正常对照组(NC 组)10 只,糖尿病组(DM 组)15 只。DM 组饲喂以高糖高脂饲料,NC 组饲喂基础颗粒饲料。6 周后,全部大鼠禁食 12 h,DM 组按 35 mg/kg 一次性腹腔注射由柠檬酸缓冲液配置的浓度为 1% 的链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司),NC 组大鼠注射相等容量的柠檬酸缓冲液。注射后 72 h 尾静脉取血,虹吸式血糖仪测定随机血糖≥16.7 mmol/L 确立为糖尿病模型。造模过程中死亡 1 只,3 只不达标大鼠 3 d 后按 15 mg/kg 腹腔补注射 STZ,2 只达标,1 只剔除,总共成模 13 只。实验过程中大鼠自由摄食、饮水,不使用降糖药物。

1.2 实验方法

1.2.1 胃排空功能测定 采用核素标记半固体餐单电子发射计算机断层扫描照相仪(SPECT)显像技术测定胃半排时间(GET1/2)及胃排空速率。所有大鼠禁食 12 h 后应用含有同位素^{99}锝-亚锡喷替酸($^{99}Tc^{m}$-DTPA)标记的蒙牛纯牛奶与面粉混合的糊剂 1 ml 灌胃,之后将大鼠仰卧绑缚于特制的固定板上,将探头置于大鼠腹部(窗宽 20,矩阵 128 × 128,放大倍数 3.0),即刻采集其放射性计数并显像。前 30 min 间隔 5 min 采集 1 次,然后每 10 min 采集 1 次,共采集 9 次,连续测定 60 min。

1.2.2 血清生化指标测定 完成核素显像胃排空测定后,乙醚麻醉大鼠,心脏取血 4 ml,离心取血清待测。可溶性内皮细胞蛋白 C 受体(sEPCR)采用 ELISA 法检测,试剂盒购自美国 R&D 公司,严格按试剂盒说明书操作。

1.2.3 硝酸盐还原酶法测定胃窦组织一氧化氮(NO)含量

大鼠麻醉后打开腹腔,取胃窦组织(约 200 mg),在冰生理盐水中漂洗,滤干水分。加入组织重量 9 倍体积的水煮沸 10 min,加入乙酸和盐酸使其终浓度分别为 1 mol/L 和 0.02 mol/L,冰浴电动匀浆 10 min,以低温低速离心机 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定 NO 含量。试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2.4 免疫组织化学方法测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的表达 取胃窦部组织(0.5 cm × 0.5 cm)块置于 10% 中性缓冲甲醛中固定,常规脱水、石蜡包埋,做免疫组织化学染色。包埋后切片、脱蜡,微波修复抗原,滴加兔抗鼠多克隆抗体(美国 Bioworld 公司)及二抗(美国 ZYMED 公司 S-P 试剂盒),DAB 显色;充分水洗、苏木精复染;用 PBS 缓冲液分别代替一抗作为阴性对照。高倍镜下观察胃黏膜 eNOS 表达情况,应用 ImagePro Plus 多媒体图像分析仪测定平均光密度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料满足正态分布和方差齐性后,全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间用独立样本 t 检验。相关性分析用 Sperman 相关系数及多元逐步回归分析。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

DM 大鼠腹腔注射 STZ 3 d 后明显出现多食,多饮,多尿症状,1 周后出现精神萎靡。2 周后 DM 组大鼠与 NC 组相比,体质量明显减轻,活动迟缓、皮毛干枯,发黄,无光泽。

2.2 大鼠体质量、空腹血糖

NC 组高脂饲料喂养 6 周,体质量迅速增长($P < 0.01$),经 STZ 诱导为糖尿病模型后,体质量较成模前显著下降($P < 0.01$)。成模 6 周后,较 NC 组明显减轻($P < 0.01$,表 1)。NC 组血糖在正常范围内[(5.43 ± 0.98) mmol/L],DM 组造模 72 h 后血糖显著升高($P < 0.01$),初期无明显变化,DM 组 GSP 水平显著升高($P < 0.01$,表 2)。

表 1 2 组体质量变化 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 1 周	第 6 周	第 12 周
NC 组	10	185 ± 13	238 ± 29	316 ± 17
DM 组	13	190 ± 3	312 ± 21[a]	229 ± 24[a]

a: $P < 0.01$,与 NC 组比较

表 2 2 组造模前后血糖变化 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 1 周	造模后 72 h	第 12 周
NC	10	5.07 ± 1.31	5.69 ± 0.98	5.43 ± 0.98
DM	13	5.31 ± 0.87	24.83 ± 6.02[a]	20.97 ± 2.48[a]

a: $P < 0.01$,与 NC 组比较

2.3 大鼠胃半排时间、排空速率及 60 min 胃内核素残留率

实验至第 12 周(即造模成功 6 周后),DM 组大鼠较 NC 组胃半排时间($GET_{1/2}$)缩短($P < 0.05$),胃排空速率加快($P < 0.05$),60 min 胃内核素残留率低于 NC 组($P < 0.05$,表 3)。

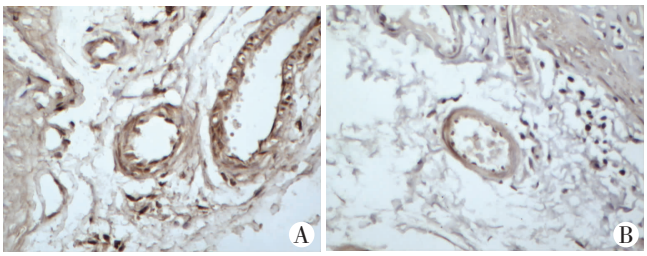
表 3 2 组胃半排空时间、排空速率及 60 min 胃内核素残留率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胃半排时间(min)	排空速率(%)	60 min 胃内核素残留率(%)
NC 组	10	47.86 ± 19.65	1.17 ± 0.43	44.30 ± 7.02
DM 组	13	30.82 ± 12.56[a]	1.92 ± 0.49[a]	37.81 ± 5.63[a]

a: $P < 0.01$,与 NC 组比较

2.4 胃窦组织 eNOS 免疫阳性细胞表达的变化、NO 含量及血清 sEPCR

eNOS 在正常胃组织阳性表达率是 100%,阳性染色主要位于血管内皮细胞,固有层腺体及肌间神经丛也有表达,为棕黄色颗粒沉积。NC 组血管内皮细胞被染成棕黄色,可见较多的颗粒状沉积,DM 组血管内皮细胞可见散在的棕色颗粒状染色物质(图 1)。表 4 显示与 NC 组相比,DM 组 eNOS 平均光密度较显著下降($P < 0.05$),大鼠胃窦组织 NO 含量减少($P < 0.01$),血清 sEPCR 水平升高($P < 0.01$)。



A:NC 组;B:DM 组

图1 胃窦组织黏膜下层血管免疫组化观察 (S-P ×400)

表4 2组血管内皮功能测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NO (μmol/L)	eNOS 平均光密度值	sEPCR (μg/L)
NC 组	10	30.30 ± 2.04	0.61 ± 0.15	116.44 ± 8.05
DM 组	13	30.82 ± 12.56[a]	0.36 ± 0.15[b]	129.45 ± 4.83[a]

a: $P<0.01$,与 NC 组比较;b: $P<0.05$,与 NC 组比较

2.5 胃半排时间与血糖、胃黏膜 NO、eNOS、sEPCR 的相关性分析

Spearman 相关分析显示胃半排时间与胃黏膜 NO 含量、胃组织 eNOS 表达水平呈正相关(r 分别是 0.512、0.589,$P<0.05$)与 FBG、血清 sEPCR 呈负相关(r 分别是 −0.441、−0.526,$P<0.05$)。以胃半排时间为应变量,以 FBG、sEPCR、胃黏膜 NO、eNOS(D 值)为自变量进行多元逐步回归分析,结果胃黏膜 NO 含量(Beta = 0.358,$P=0.02$)与胃组织 eNOS 平均光密度(Beta = 0.589,$P=0.001$)与胃排空显著相关。

3 讨论

糖尿病微血管病变常发生于眼、肾脏、神经等,消化道亦可发生,其主要病理特征就是内皮功能受损[4]。血管内皮细胞中的 eNOS 催化 L-精氨酸代谢产生 NO,是血管内皮合成 NO 的限速酶,胃组织血管系统亦可合成并释放 NO。内皮源性 NO 维持血管平滑肌舒张,使胃血流量保持在一定水平上,对胃肠黏膜有保护作用[5]。释放至血管腔内的 NO 还是一种强大的血小板聚集和黏附抑制因子,可以抑制血管平滑肌细胞增殖[6]。本实验发现 DM 组胃黏膜 NO 含量与胃组织 eNOS 表达均减少,说明糖尿病大鼠存在内皮介导的血管舒张功能减弱。有实验证明糖尿病或持续高血糖使 eNOS mRNA 及蛋白表达水平均受到抑制,出现功能障碍[7],这与本研究结果相似。高糖的直接毒性作用、晚期糖基化终末产物(AGEs)的蓄积、氧自由基的产生等均可致血管内皮功能障碍,内皮功能受损抑制 eNOS 的激活,从而减少 NO 的产生、生物利用度及活性的降低[8]。NO 活力降低可引起胃血管不规则收缩,血小板聚集于血管内皮,血管平滑肌增生,这一系列病理变化致胃微循环受损。

EPCR 是近年发现的由血管内皮产生的一种新型蛋白受体,也是反映血管内皮功能的一种特异性指标。EPCR 主要表达于大动脉和大静脉内皮细胞表面,微血管内皮表达相对较少。EPCR 与蛋白 C(PC)结合于血管内皮细胞表面,通过凝血酶-血栓调节蛋白复合物活化 PC,活化 PC 在辅助因子蛋白 S、膜磷脂、V 因子及钙离子参与下,抑制凝血功能。可溶性内皮细胞蛋白 C 受体(sEPCR)抑制 PC 的活化,减弱膜联 EPCR 的抗凝作用[9]。本实验中 DM 组 sEPCR 水平显著升高,国外研究表明糖尿病患者 sEPCR 水平升高与血管内皮损伤程度相关,并参与体内高凝状态的形成[10],这种变化可能导致胃组织局部缺血。有实验证明[11] APC 通过抑制应激性胃黏膜损伤中的中性粒细胞活化而减少血管内皮细胞损伤,保持胃血流量,减轻胃黏膜损伤,说明 APC 对胃血管内皮有保护作用,这种作用是 APC 与 EPCR 结合后激活蛋白酶激活受体(PAR-1)来实现的。EPCR 在多种疾病的保护效应也可能是通过 sEPCR 发挥的,sEPCR 水平的改变破坏了这种保护机制。血管内皮损伤是多种器官损害的病理基础,包括消化系统,内皮受损不仅能够造成胃黏膜缺血,血流量减少,进一步使胃壁平滑肌细胞变性,胃壁平滑肌舒缩功能紊乱,还可能通过影响胃肠自主神经、胃肠激素水平来促进胃动力障碍的发展。

糖尿病胃排空障碍不仅影响食物的吸收与消化,还干扰口服药物的吸收,给糖尿病治疗带来极大的困扰。本研究中,糖尿病组大鼠出现胃排空加速现象,Arige 等[12]发现未出现自主神经病变的 2 型糖尿病大鼠早期胃排空也是加速的。相关分析显示,胃动力与 NO、eNOS 及 sEPCR 均有相关性,多元逐步回归分析发现,胃动力异常与胃黏膜 NO 含量、胃组织 eNOS 表达水平显著相关,提示血管病变可能是胃动力障碍的始动因素。

因此,在临床上如果从保护血管内皮功能的角度来防治糖尿病胃动力异常,可能对防治糖尿病并发症有益,这将是我们下一步的工作。

参考文献:

[1] 张万方, 黄伟文, 熊玉冰. 糖尿病胃动力障碍的症状流行病学调查分析[J]. 国际医药卫生导报, 2009, 15(3): 97 – 101.

[2] Grover M, Farrugia G, Lurken M S, *et al*. Cellular changes in diabetic and idiopathic gastroparesis[J]. Gastroenterology, 2011, 140(5): 1575 – 1585.

[3] Samsom M, Bharucha A, Gerich J E, *et al*. Diabetes mellitus and gastric emptying: questions and issues in clinical practice[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2009, 25(6): 502 – 514.

[4] Rizzoni D, Rosei E A. Small artery remodeling in diabetes mellitus[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009, 19(8): 587 – 592.

[5] S-Kwiecien S, Pawlik M W, Brzozowski T, *et al*. Nitric oxide (NO)-re-

leasing aspirin and (NO) donors in protection of gastric mucosa against stress[J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59(Suppl 2): 103 - 115.
[6] Umar S, van-der-Laarse A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 333(1/2): 191 - 201.
[7] Bojunga J, Dresar-Mayert B, Usadel K H, *et al*. Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(3): 771 - 780.
[8] Hamed S, Brenner B, Roguin A. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2[J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(1): 9 - 15.
[9] Navarro S, Bonet E, Estelles A, *et al*. The endothelia cell protein C receptor: Its role in thrombosis[J]. Thromb Res, 2011, 128(5): 410 - 416.
[10] Ireland H, Konstantoulas C J, Cooper J A, *et al*. EPCR Ser219Gly: elevated sEPCR, prothrombin F1 + 2, risk for coronary heart disease, and increased sEPCR shedding *in vitro*[J]. Atherosclerosis, 2005, 183(2): 283 - 292.
[11] Isobe H, Okajima K, Harada N, *et al*. Activated protein C reduces stress-induced gastric mucosal injury in rats by inhibiting the endothelial cell injury[J]. J Thromb Haemost, 2004, 2(2): 313 - 320.
[12] Arige H, Imai K, Chen C, *et al*. Does ghrelin explain accelerated gastric emptying in the early stages of diabetes mellitus? [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 294(6): R1807 - R1812.

(**收稿**:2011-09-15;**修回**:2011-10-08)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2012)01-0065-01

个案与短篇

Cantrell 综合征 1 例

冉 倩,邹利光,谷 涛 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院放射科)

[**关键词**] Cantrell 综合征;心脏畸形;小儿
[**中图法分类号**] R726.204 [**文献标志码**] B

Cantrell 综合征是一种涉及心脏、腹壁发育异常的复杂性先天性畸形[1]。因病例罕见、病情复杂,诊断困难,容易导致误诊及漏诊。我院儿科近期收治 1 例,现报告如下。

1 临床资料

患儿,男性,12 d。系第 5 胎第 2 产,体质量 4.04 kg。因发现上腹部异常搏动区 12 d 于 2011 年 1 月 25 日收入新桥医院儿科。体检:腹部畸形,上腹部见异常搏动区,表面无皮肤覆盖,左上至右下斜行走形,面积约 1.5 cm × 3.5 cm,搏动与心音同步,中腹部见菱形皮损面,约 1.0 cm × 1.5 cm,外周见菱形深棕色皮肤,约 1.0 cm × 3.0 cm,其下端与脐窝相连,皮损面及腋窝见黄色分泌物附着(图 1)。CT 检查:胸部及上腹部 64 排 CT 血管造影(CTA)检查。心脏增大,心尖朝向左前下方。室间隔缺损,大小约 11.8 mm,房间隔缺损,大小约 5.1 mm。左心室憩室向前下方延伸,远端距胸骨剑突下方 38.4 mm。心包前部、膈肌前部、上腹壁中部部分缺如(图 2)。肺动脉增宽,主肺动脉干横径为 12.3 mm。动脉导管未闭,长 9.5 mm,宽 1.2 mm(图 3)。胸骨下端见 2 个未融合的并行排列的小骨骺,考虑胸骨体下端裂(图 4)。心脏超声检查:心脏异位,位于上腹腔,右旋心;右房、右室比例增大,肺动脉稍增宽;室间隔缺损;卵圆孔未闭;动脉导管未闭,左向右分流速度降低,继发性肺动脉高压。近心底部膈肌回声中断。初步诊断为 Cantrell 综合征。经专家会诊后,待患儿 5 个月时(6 月 14 日)在我院心外科体外循环下行手术治疗,术后确诊为 Cantrell 综合征(胸腹型异位心、心包部分缺如、胸骨下段缺损、膈肌前部缺损、腹壁部分缺损、先天性心脏病)。行室间隔修补、卵圆孔未闭修补、异位心矫正术后,7 月 12 日痊愈出院。

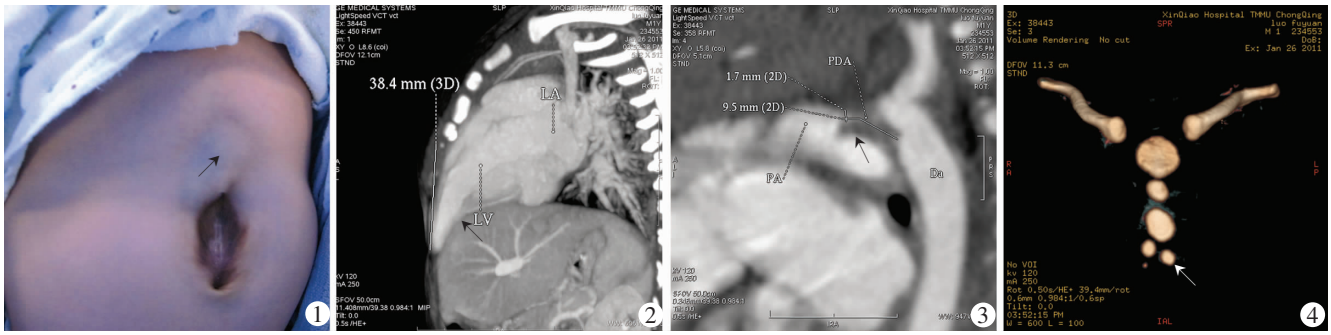


图 1 患儿体表观察 ↑:上腹部异常搏动区
图 2 患儿 CT 矢状位示左心室憩室及心包前壁、膈肌前壁、上腹部前腹壁部分缺如 ↑:缺损部位
图 3 患儿 CT 示动脉导管未闭(↑)
图 4 患儿 VR 图像显示胸骨体下端缺陷(↑)

[**通信作者**] 邹利光,E-mail:zoulg@mail.tmmu.com.cn

(下转 69 页)