文章编号:1000-5404(2012)09-0801-04

论著

莫沙必利对模拟急性高原暴露大鼠小肠动力的改善作用

薛世祥[1,2],彭贵勇[1],杨红勤[1],牟 东[1],代剑华[1],袁 月[1],康秀峰[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所[1];650224 昆明,77289 部队卫生队[2])

[摘要] **目的** 观察莫沙必利对高原缺氧大鼠小肠动力及黏膜屏障的保护作用,初步探讨其对肠道急性缺氧损害的预防作用。**方法** 将90只SD雄性大鼠按随机数字表法分为正常对照组、高原缺氧组、高原莫沙必利组;低压氧舱模拟海拔6 000 m,氧分压(9.31±0.05) kPa,氧含量(19.6±0.2)%,建立大鼠急性缺氧模型,高原莫沙必利组采用莫沙必利灌胃,3次/d,每天剂量0.27 mg/kg。分别于10、24、48、72、168 h取小肠组织。检测急性高原缺氧应激后小肠组织一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)的含量变化;墨汁灌胃实验计算推进距离,检测小肠动力;RT-PCR检测小肠黏膜闭锁连接蛋白1(ZO-1) mRNA的表达情况。**结果** 与同时间段正常对照组比,高原缺氧组NO、NOS含量增高,24、48、72、168 h NO含量差异明显($P<0.05$,$P<0.01$),48、72、168 h NOS含量差异明显($P<0.05$,$P<0.01$);ZO-1 mRNA表达量降低,48、72、168 h差异明显($P<0.05$,$P<0.01$);高原莫沙必利组NO、NOS含量较正常对照组增高,仅48 h NO含量增高明显($P<0.05$);高原缺氧组与高原莫沙必利组(168 h除外)各时间点小肠推进距离均较正常对照组明显降低($P<0.05$,$P<0.01$)。各时间点高原莫沙必利组NO、NOS含量较高原缺氧组降低,72 h NO,72、168 h NOS含量差异明显($P<0.05$);各时间点高原莫沙必利组小肠推进距离及ZO-1 mRNA的表达量较高原缺氧组增高,48、72、168 h的小肠推进距离及72、168 h ZO-1 mRNA的表达量差异明显($P<0.05$)。**结论** 莫沙必利可有效促进小肠动力,减轻高原缺氧应激引起的小肠动力障碍及肠道黏膜屏障的损伤,可用于高原缺氧肠道损害的预防。

[关键词] 莫沙必利;缺氧;小肠动力;ZO-1 mRNA
[中图法分类号] R333.3; R364.4; R975 [文献标志码] A

Mosapride promotes small intestine motility in acute high altitude-exposed rats

Xue Shixiang[1,2], Peng Guiyong[1], Yang Hongqin[1], Mou Dong[1], Dai Jianhua[1], Yuan Yue[1], Kang Xiufeng[1] ([1]Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Medical Team of 77289 Troop, Kunming, Yunnan Province, 650224, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the preventive effect of mosapride in the power of small intestine and mucosal barrier in rats in high altitude environment, and investigate its preventive role in intestinal injury induced by acute hypoxia. **Methods** A total of 90 SD male rats were randomly divided into 3 groups, that is, normal control group, hypoxia model group and hypoxia + mosapride treatment group ($n=30$). The rats from the 2 later groups were exposed to 6 000-meter high altitude in a hypobaric chamber under oxygen partial pressure (9.31±0.05) kPa and containing oxygen (19.6±0.2)% to establish rat model of acute hypoxia. At the same time, the animals of hypoxia + mosapride treatment group were gavaged with mosapride [0.27 mg/(kg·d), 3 times per day]. The rats were killed in 10, 24, 48, 72, and 168 h respectively, and their small intestine tissues were taken for content of nitric oxide (NO) and activity of nitric oxide synthase (NOS). The motility of small intestine was evaluated by calculating the promotion distance of the ink which was fed in 30 min before sacrifice. RT-PCR was employed to detect the expression of ZO-1 in small intestine. **Results** Compared with the normal control group, NO content and NOS activity in the model group were significantly increased, and the expression of ZO-1 mRNA was significantly decreased, especially the expression in 48 h ($P<0.05$). So did the promote distance of small intestine were significantly lower at all time points ($P<0.05$). Though the

[基金项目] 高原医学教育部重点实验室开放课题(2009GK08)
[通信作者] 彭贵勇,电话:(023)68765185,E-mail:pgy63@163.com

hypoxia + mosapride group had above mentioned changes, mosapride obviously attenuated them when compared with model group. NO content at 72 h, NOS activity and ZO-1 mRNA expression at 72 and 168 h, and promotion distance of small intestine at 48, 72 and 168 h in mosapride treatment group were significantly improved ($P<0.05$). **Conclusion** Mosapride promotes the power of small intestine effectively, reduces the disorders of small intestine power and the damage of intestinal mucosal barrier induced by high altitude stress, and it can be used to prevent intestinal damage in altitude.

[**Key words**] mosapride; hypoxia; the power of small intestine; ZO-1 mRNA

Supported by the Open Project of Key Laboratory of High Altitude Medicine of Ministry of Education(2009GK08). Corresponding author: Peng Guiyong, Tel: 86-23-68765185, E-mail: pgy63@163.com

高原环境是一个特殊的生态环境系统,可对机体各个系统产生重要影响[1],可减慢肠蠕动功能,进而损伤肠黏膜屏障。小肠为缺氧的敏感组织,血液中氧含量水平及其弥散入组织中的氧浓度,对维持肠黏膜上皮细胞的各种正常代谢起着非常重要的作用[2]。改善肠动力,可能对保护肠黏膜屏障有积极作用[3]。本研究通过在低压氧舱中建立高原缺氧动物模型,探索胃肠动力药莫沙必利对高原缺氧状态下小肠动力及黏膜屏障的保护作用,为高原缺氧状态下促动力治疗提供部分依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验样品 枸橼酸莫沙必利分散片由成都康弘药业集团股份有限公司生产(批准文号:国药准字H20031110),生理盐水由山东鲁抗辰欣药业有限公司生产(批准文号:国药准字:H20013310)。实验用具均经严格消毒灭菌处理,所用药物剂量均按文献[4]报道,用精密电子天平称取,灭菌用生理盐水稀释。

1.1.2 实验动物及分组 健康雄性Sprague-Dwley(SD)大鼠90只,11~13周龄,体质量(195±20)g,清洁级,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。实验组饲养并实验于第三军医大学军事高原医学系低压氧舱中,正常对照组常温饲养于西南医院全军烧伤研究所动物实验室。随机数字表法分为3组:高原莫沙必利组、高原缺氧组、正常对照组,每组30只,分别于10、24、48、72、168 h用2%戊巴比妥钠腹腔麻醉取小肠组织进行实验,每个时间点取6只。实验过程中自由进食、饮水,采集标本前30 min,分别给予墨汁0.5 ml灌胃,取标本后计算墨汁在小肠中的推进距离。

1.1.3 实验器材 低压动物实验舱群(贵州风雷航空军械有限责任公司,型号:DYC-2842),大鼠代谢笼(上海中胜科教设备有限公司,型号:DXL-10)、电子天平、一次性无菌注射器及动物实验器材等。

1.2 方法

1.2.1 高原缺氧模型的建立 SD大鼠灌胃给药剂量按文献[3]报道,莫沙必利0.27 mg/(kg·d)。将高原莫沙必利组、高原缺氧组同时放入低压氧舱,持续模拟高原缺氧环境,高原莫沙必利组每隔8 h灌胃给药1次,3次/d,持续应激至各时间段采集标本前30 min取出行墨汁灌胃;正常对照组存放于室温。低压氧舱模拟的海拔为6 000 m,氧分压(9.31±0.05)kPa,氧含量(19.6±0.2)%。

1.2.2 小肠组织一氧化氮(NO)含量的测定 SD大鼠从低压氧舱中取出后,先行墨汁灌胃,0.5 ml/只,30 min后用2%的戊巴比妥钠腹腔麻醉取小肠组织,立即存放于液氮罐中。NO(试剂盒购买于南京建成生物工程研究所)含量测定采用硝酸还原酶法,严格按照试剂盒使用说明书进行操作,分别对10、24、48、72、168 h的小肠组织进行测定。

1.2.3 小肠组织一氧化氮合酶(NOS)活力的检测 取材方法同上。NOS(试剂盒购买于南京建成生物工程研究所)采用比色法测定,严格按试剂盒使用说明书进行操作,分别对10、24、48、72、168 h的小肠组织进行检测。

1.2.4 小肠推进比的测定 各组于各时间段用灌胃法将墨汁0.5 ml注入大鼠胃内,30 min后取小肠组织,方法同前。开腹取出从幽门括约肌至盲肠全部小肠,立即置于冰上,测量小肠全长及墨汁在小肠中的推进距离,计算墨汁推进距离占小肠全长的百分比即小肠推进比。

1.2.5 RT-PCR检测小肠黏膜闭锁连接蛋白1(ZO-1) mRNA表达 小肠组织取材方法同前,立即存放于液氮罐中。按Trizol试剂盒说明书的操作步骤依次加入Trizol、氯仿、异丙醇,提取小肠组织总RNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,RT-PCR试剂盒检测ZO-1 mRNA的表达。二步法RT-PCR:即在25 μl逆转录体系中PCR扩增为cDNA,25 μl PCR反应体系进行扩增。ZO-1引物设计:上游5′-ATTCAGTTCGCTCCCATGAC-3′,下游5′-GCTGTGGAGACTGTGTGGAA-3′[5],预计扩增长度为99 bp,PCR反应条件为,94 ℃预变性3 min,94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min,30个循环,72 ℃ 5 min。内参GAPDH引物序列,上游5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,预计扩增长度为452 bp。引物设计由生工生物工程(上海)有限公司合成。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,凝胶成像系统照相,Quantity one软件分析测定灰度值。将目的条带与GAPDH RT-PCR产物的灰度比

值作为 ZO-1 mRNA 的相对表达量(%)。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件,组间比较行单因素方差分析,2 两样本间比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 小肠组织 NO 含量的变化

与同时间段的正常对照组比,高原缺氧组 NO 含量升高,24 h 后差异显著($P<0.05$,$P<0.01$),高原莫沙必利组 NO 含量逐步升高,48 h 差异显著($P<0.05$),但均低于高原缺氧组,其中 72 h 差异显著($P<0.05$,表 1)。

表 1 小肠组织 NO 含量的变化(μmol/g,$n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	10 h	24 h	48 h	72 h	168 h
正常对照组	22.83 ±6.84	22.93 ±6.35	23.16 ±6.76	22.96 ±6.13	23.84 ±5.15
高原缺氧组	27.29 ±4.86	29.83 ±5.30[b]	31.00 ±4.05[b]	35.75 ±5.79[a]	33.01 ±5.26[a]
高原莫沙必利组	25.01 ±5.43	26.54 ±5.23	29.37 ±4.63[b]	28.92 ±5.61[c]	28.88 ±4.36

a:$P<0.01$,b: $P<0.05$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,与高原缺氧组比较

2.2 小肠组织 NOS 含量的变化

与同时间段的正常对照组比,高原缺氧组及高原莫沙必利组 NOS 含量升高,48 h 后高原缺氧组 NOS 含量差异明显($P<0.05$,$P<0.01$),余各时间段及高原莫沙必利组 NOS 含量无统计学差异($P>0.05$),高原莫沙必利组 NOS 含量均低于高原缺氧组,其中 72、168 h 差异显著($P<0.05$,表 2)。

表 2 小肠组织 NOS 含量的变化(U/mg,$n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	10 h	24 h	48 h	72 h	168 h
正常对照组	12.52 ±6.14	13.07 ±5.79	13.21 ±6.38	12.80 ±5.72	12.75 ±5.95
高原缺氧组	16.43 ±5.97	18.82 ±6.86	20.73 ±6.52[b]	24.54 ±6.11[a]	23.94 ±6.05[a]
高原莫沙必利组	14.73 ±5.39	16.24 ±5.06	17.21 ±4.73	17.12 ±5.77[c]	17.00 ±4.55[c]

a:$P<0.01$,b: $P<0.05$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,与高原缺氧组比较

2.3 小肠推进距离的测定

与同时间段的正常对照组比,高原缺氧组及高原莫沙必利组小肠推进距离均明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),高原莫沙必利组小肠推进距离均高于高原缺氧组,其中 48、72、168 h 差异显著($P<0.05$,表 3)。

表 3 小肠推进距离的变化(cm,$n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	10 h	24 h	48 h	72 h	168 h
正常对照组	61.98 ±2.90	60.91 ±2.81	61.85 ±3.41	61.46 ±3.43	60.73 ±3.90
高原缺氧组	53.75 ±5.23[a]	49.93 ±3.50[a]	45.48 ±3.06[a]	49.95 ±4.60[a]	53.38 ±3.96[a]
高原莫沙必利组	54.15 ±3.36[a]	52.18 ±4.01[a]	49.25 ±2.95[ac]	55.80 ±4.65[bc]	58.65 ±4.69[c]

a:$P<0.01$,b: $P<0.05$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,与高原缺氧组比较

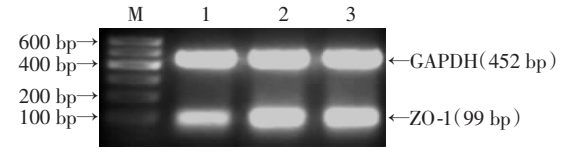
2.4 小肠黏膜 ZO-1 mRNA 表达变化

与同时间段的正常对照组比,高原缺氧组及高原莫沙必利组 ZO-1 mRNA 表达量均逐步降低, 仅高原缺氧组 48 h 后差异明显($P<0.05$,$P<0.01$,图 4)。高原莫沙必利组 ZO-1 mRNA 表达量在 72、168 h 明显高于高原缺氧组($P<0.05$,表 4、图 1)。

表 4 小肠组织 ZO-1 mRNA 表达的变化($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	10 h	24 h	48 h	72 h	168 h
正常对照组	0.92 ±0.087	0.93 ±0.076	0.91 ±0.066	0.91 ±0.069	0.92 ±0.063
高原缺氧组	0.87 ±0.076	0.86 ±0.058	0.83 ±0.071[b]	0.77 ±0.071[a]	0.79 ±0.054[a]
高原莫沙必利组	0.91 ±0.052	0.89 ±0.039	0.86 ±0.051	0.85 ±0.070[c]	0.87 ±0.066[c]

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,与高原缺氧组比较



M:标准;1:高原缺氧组;2:高原莫沙必利组;3:正常对照组

图 1 RT-PCR 检测第 168 小时组小肠黏膜 ZO-1 mRNA 表达的变化

3 讨论

在高原缺氧条件下,肠道的节律性收缩和对固有神经跨壁刺激的应答性降低,引起肠蠕动减慢。小肠自身的运动功能是构成肠黏膜机械膜屏障之一,肠黏膜上皮细胞纤毛的灵活摆动也可减少病原与黏膜细胞间吸附的机会;肠蠕动将肠腔内食物残渣向远端推进,防止细菌在邻近肠黏膜上长时间的滞留,减少细菌穿透黏液层到达上皮的机会,起到肠道"自洁"作用[6-8],杨春敏等[9]研究表明,在海拔 7 000 m 的高度,食物通过十二指肠瘘管由 300 m/h 减至为 63 m/h,说明在高原低压低氧的状态下,小肠的收缩振幅、收缩频率降低,小肠的蠕动能力减弱而导致上述小肠组织中的氧浓度降低及代谢异常,进而引起肠道微生态紊乱,既可引起肠道毒素入血,也可造成优势繁殖的细菌突破受损的黏膜屏障而发生移位,导致多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome MODS),形成恶性循环[10]。因此,保持高原低压低氧的状态下正常的小肠运动功能也是保护小肠黏膜屏障的重要基础。

有报道显示 NO 可在分子和蛋白水平影响 occludin 的表达[11],缺氧可抑制内皮细胞 NOS 的活性及其 mRNA 的转录[12],从而调控 occludin 蛋白的表达,损伤肠黏膜紧密连接。ZO-1 是第一个被证实的紧密连接胞质蛋白,是膜结合鸟苷酸激酶同系物家族中唯一

可形成高度稳定二聚体的蛋白[13],作为肠黏膜连接蛋白家族的重要组成部分之一,在连接跨膜蛋白与细胞骨架、结构蛋白之间起着重要的中心作用[14],故有效地保持ZO-1在肠黏膜内的水平及活性对稳定细胞间紧密连接胞质蛋白结构和细胞功能的完整性具有积极的意义[15]。

莫沙必利是具有苯甲酰胺结构的新型胃肠动力促进药,为强效选择性5-羟色胺4(5-HT_4)受体激动剂,5-羟色胺(5-HT)为单胺类神经递质。受体广泛分布于胃肠道,除平滑肌细胞外,还存在于壁细胞、肠黏膜上皮细胞、肠肌间神经丛和嗜铬细胞上,可用于增强胃及十二指肠动力,对小肠和结肠动力均有促进作用[2,16]。本研究采用低压氧舱建立高原缺氧动物模型,分析莫沙必利干预对高原缺氧小肠功能损伤的预防作用。结果显示高原缺氧组NO、NOS含量增高,ZO-1 mRNA的表达降低,小肠推进距离明显降低;高原莫沙必利组NO、NOS含量增高,ZO-1 mRNA的表达降低,小肠推进距离降低;但高原莫沙必利组变化程度低于高原缺氧组,其中72 h NO,72 h及168 h NOS含量和ZO-1 mRNA的表达量,48、72、168 h的小肠推进距离差异明显($P<0.05$)。说明高原缺氧可明显损害小肠黏膜屏障及小肠运动功能,采用莫沙必利干预可有效改善高原缺氧状态下的小肠动力和小肠黏膜屏障。从本实验过程观察,在造模前48 h内,尤其是24 h内大鼠基本没有进食,只少许饮水,而高原莫沙必利组48~72 h大鼠逐步开始少量进食,较高原缺氧组进食早、恢复快。说明莫沙必利可有效促进小肠动力,减轻高原缺氧对小肠功能的损伤,提高小肠对高原缺氧的适应性及耐受性。

综上所述,莫沙必利可预防高原缺氧应激引起的小肠动力障碍,有效地促进小肠动力及减轻对肠道黏膜屏障的损伤,对高原缺氧的预防具有积极作用。

参考文献:

[1] Leon-velarde F, Maggiorini M, Reeves J T, *et al*. Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases[J]. High Alt Med Biol, 2005, 6(2): 147-157.

[2] 吴文明,张方信. 高原缺氧与肠黏膜屏障损伤[J]. 国际内科学杂志, 2009, 8(36): 449-452.

[3] Ji S W, Park H J, Cho J S, *et al*. Investigation into the effects of mosapride on motility of Guinea pig stomach, ileum, and colon[J]. Yonsei Med J, 2003, 44(4): 653-664.

[4] 张培, 罗炳德, 谭庆, 等. 青蒿琥酯对中暑内毒素血症小鼠腹腔巨噬细胞内游离钙浓度的影响[J]. 中国工业医学杂志, 2005, 18(2): 96-98.

[5] Fan H, Li L, Zhang X, *et al*. Oxymatrine downregulates TLR4, TLR2, MyD88, and NF-kappaB and protects rat brains against focal Ischemia[J]. Mediators Inflamm, 2009, 2009: 704706.

[6] Dogi C A, Galdeano C M, Perdigon G. Gut immune stimulation by non pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria. Comparison with a probiotic strain[J]. Cytokine, 2008, 41(3): 223-231.

[7] Wang Y B, Liu J, Yang Z X. Effects of intestinal mucosal blood flow and motility on intestinal mucosa[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(5): 657-661.

[8] 杨定周, 周其全, 李素芝, 等. 高原缺氧致大鼠肠黏膜屏障功能损伤及谷氨酰胺的保护作用观察[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(3): 301-306.

[9] 杨春敏, 张秀荣, 张映辉, 等. 急性低压低氧对狗餐后和红霉素所致胃肠收缩的影响[J]. 中华航空航天医学杂志, 2001, 12(4): 224-227.

[10] Bellot P, Frances R, Such J. Bacterial translocation in cirrhosis[J]. Gastroenrol Hepatol, 2008, 31(8): 508-514.

[11] 刘冬妍, 崔巍. NO体外对肠上皮细胞表达紧密连接蛋白Occludin的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(21): 2295-2299.

[12] 高文祥, 高钰琪, 李素芝, 等. 缺氧对世居高原藏族人脐静脉内皮细胞ET和NO水平的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2005, 21(1): 1-4.

[13] Abbott N J, Patabendige A A, Dolman D E, *et al*. Structure and function of the blood-brain barrier[J]. Neurobiol Dis, 2010, 37(1): 13-25.

[14] 陈传莉, 刘依凌, 王裴, 等. 严重烧伤后肠黏膜肌球蛋白轻链磷酸化表达改变及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(15): 1434-1437.

[15] Shiou S R, Yu Y, Chen S, *et al*. Erythropoietin protects intestinal epithelial barrier function and lowers the incidence of experimental neonatal necrotizing enterocolitis[J]. J Biol Chem, 2011, 286(14): 12123-12132.

[16] Sasaki N, Okamura K, Yamada H. Effects of mosapride, a 5-hydroxytryptarnine 4 receptor agonist, on electrical activity of the small intestine and cecum in horses[J]. Am J Vet Res, 2005, 66(8): 1321-1323.

(**收稿**:2012-01-04;**修回**:2012-02-27)

(编辑 王 红)