论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1388-04

糖尿病大鼠空回肠 PEPT1 水平与 SP 分布的变化

姚亚民[1],耿喜林[2],莫晓丹[1],王 芳[1],景玉宏[1],宋焱峰[1] (730000 兰州,兰州大学:基础医学院人体解剖与组织胚胎学研究所[1],第二附属医院创伤科[2])

[摘要] **目的** 研究糖尿病大鼠胃肠排空延迟和空回肠 P 物质分布的关系,及这一改变是否影响局部寡肽转运体 PEPT1 的水平。**方法** Wistar 大鼠 24 只,分为 3 组($n=8$)。1 型糖尿病模型加胰岛素治疗组,左脲链霉素(streptozocin,STZ)单次股静脉注射(60 mg/kg)诱导 1 型糖尿病模型,并每天给予 1 次长效胰岛素(20 U/d,皮下注射)控制血糖。1 型糖尿病模型组,左脲链霉素(STZ)单次股静脉注射(60 mg/kg)诱导 1 型糖尿病模型,并给予等量生理盐水。正常对照组大鼠经股静脉注射生理盐水。1 个月后检测胃肠排空功能,选取胃肠排空明显延迟的动物,通过免疫组化分析空肠起始段与回肠末端 SP 分布变化。刮取空肠起始段与回肠末端的黏膜细胞,通过免疫印迹技术检测 PEPT1 水平。**结果** 糖尿病大鼠胃肠推进率低于 60% 的,其空肠起始段和回肠末端 SP 分布明显减少($P<0.05$),其中 SP 在空肠起始段主要分布于黏膜下层,肌层未发现阳性染色,回肠末端除分布于黏膜下层外,黏膜上皮多见阳性染色。与同月龄正常大鼠及 STZ 加胰岛素注射非糖尿病组相比,糖尿病大鼠空肠起始段与回肠末端黏膜细胞 PEPT1 的表达水平显著下降($P<0.05$)。**结论** 糖尿病导致的胃排空延迟和空回肠 P 物质分布下调关系密切,同时也出现空肠起始端与回肠末端 PEPT1 的表达减少。上述变化可能和糖尿病胃肠营养不良有关。

[关键词] 糖尿病;P 物质;PEPT1;空回肠

[中图法分类号] R361.3;R574.52;R587.2 [文献标志码] A

Expression level of PEPT1 and distribution of substance P in jejunoileum of diabetic rats

Yao Yamin[1], Geng Xilin[2], Mo Xiaodan[1], Wang Fang[1], Jing Yuhong[1], Song Yanfeng[1] ([1]Institute of Human Anatomy and Embryology, School of Basic Medical Sciences, [2]Department of Trauma, Second Affiliated Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] Objective To study the correlation between delayed gastrointestinal emptying and distribution of substrate P (SP) and observe whether their change affects the expression level of local oligopeptide transporter PEPT1. Methods Twenty-four Wistar rats were randomly divided into type 1 diabetes mellitus (DM) model plus insulin therapy group, type 1 DM model group, and normal control group, 8 in each group. One month after rats in type 1 DM model plus insulin therapy group were injected with streptozocin (STZ, 60 mg/kg) through the femoral vein to induce type 1 DM model which was treated with long-acting insulin (20 U/day) by subcutaneous injection to control their blood glucose level, rats in type 1 DM model group were injected with STZ (60 mg/kg) through the femoral vein to induce type 1 DM model which was treated with an equal amount of physiological saline, and those in normal control group were injected with an equal amount of physiological saline through the femoral vein, their gastrointestinal emptying function was examined. Distribution of SP in rats with their gastrointestinal emptying significantly delayed from the starting segment of jejulum to the distal ileum was analyzed by immunohistochemistry. Expression level of PEPT1 in mucosal cells taken from the starting segment of jejulum and the distal ileum was measured by Western blotting. Results The gastrointestinal emptying rate was lower than 60% and the distribution of SP was significantly less in the starting segment of jejulum and the distal ileum in DM rats ($P<0.05$). The SP was mainly distributed in submucosal layer of the starting segment of jejulum with no positive staining of its muscular layer and in the distal ileum with positive staining of epithelium mucosae. The expression level of PEPT1 in the starting segment of jejulum and the distal ileum was significantly lower in type 1 DM model group than in control group and non-DM model

[基金项目] 国家自然科学基金(30872731);甘肃省自然科学基金(1107RJZA191)

[通信作者] 景玉宏,E-mail:jingyh@leu.edu.cn

group ($P<0.05$). **Conclusion** DM-induced delay of gastrointestinal emptying is closely correlated with the down-regulation of the distribution of SP and the expression level of PEPT1 in the starting segment of jejunum and the distal ileum, which may be related with the malnutrition in DM rats.

[**Key words**] diabetes mellitus; substrate P; PEPT1; jejunoileum

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872731) and the Natural Science Foundation of Gansu Province (1107RJZA191).
Corresponding author: Jing Yuhong, E-mail: jingyh@lzu.edu.cn

糖尿病患者胃肠功能障碍的发生率达到30%～70%[1],其中便秘和腹泻见于60%和22%的糖尿病患者。糖尿病胃肠功能障碍的病理生理特点是胃肠张力下降,胃肠蠕动度减弱,排空延迟。即使许多无明显胃肠道症状的糖尿病患者,也存在胃肠动力不足[2]。基于1型和2型糖尿病动物模型的研究则发现,糖尿病大鼠胃肠排空能力明显下降,伴随胃肠道平滑肌电生理异常[3]。糖尿病胃肠功能障碍的原因可能和自主神经功能障碍有关[4],自主神经病变对胃肠运动有较大的影响,糖尿病胃肠病变患者的内脏神经轴突发生节段性脱髓鞘病变,神经节超微结构显示非特异性树突肿胀[5]。伴有自主神经病变的糖尿病患者胃排空延迟的发生率高于不伴有自主神经病变的患者。除神经调节外,若干神经激素在糖尿病胃肠功能障碍中也发挥作用,由于血糖升高,炎症反应,胰岛素水平异常均可以影响神经激素的分泌,在众多的神经激素中,P物质(substance P)和胃肠道功能的关系极为密切[6-7]。SP广泛分布于肠道的黏膜下层与肌间神经丛中,可以促进胃肠道平滑肌收缩,促进肠管蠕动,同时可以促进胰岛素的分泌[8-9]。在生理状况下,SP对消化道平滑肌有强烈的刺激作用,可引起平滑肌收缩,加快食物通过时间,这种收缩可以是其直接作用于平滑肌或是间接通过释放乙酰胆碱而引起的。糖尿病大鼠结肠SP含量下降可能是胃肠蠕动减弱的重要原因。但对空回肠部位SP分布在糖尿病发病中的变化少有研究,因为空回肠是重要的营养吸收部位,糖尿病大多伴随营养障碍,在肠道营养吸收中,蛋白类的吸收除通过氨基酸转运体外,大多数二肽或三肽可以通过短肽转运体吸收,胃肠道内主要的短肽转运体是PEPT1,该转运体的功能和分布影响多种短肽的转运[10-11],影响全身及肠道自身营养的供应。糖尿病状态下PEPT和P物质之间的关系少见报道,因此本研究在1型糖尿病大鼠模型上,观察糖尿病对空回肠P物质分布的影响,同时检测空回肠黏膜层细胞PEPT1的水平变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar大鼠24只,体质量300 g左右,购自兰州大学医学实验动物中心,批号[SCXK(甘)2009-0004]。

1.1.2 药品及试剂 STZ,DAB购自Sigma公司;SP抗体及ECL发光剂购自Millipore公司;PEPT1抗体购自Santa Cruz公司;Biotin-IgG、HRP-IgG及Strep-aviding-HRP抗体购自Chemical公司。蛋白酶抑制剂购自Roche公司,其他药品均购自上海生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病动物模型制作 Wistar大鼠24只,自由摄食饮水。禁食24 h后,10%水合氯醛麻醉(360 mg/kg),无菌条件下暴露一侧股静脉,沿股静脉注射STZ(60 mg/kg,溶于生理盐水中)或是等量生理盐水,其中12只注射STZ,8只注射生理盐水,4只注射STZ加胰岛素治疗。1周后测量空腹血糖,血糖≥300 mg/dl视为模型成功。

1.2.2 胃肠排空功能测定及取材 3组大鼠饲养6周后检测血糖。禁食24 h后,给予10%印度墨水(10 ml/kg)灌胃,30 min后将大鼠颈椎脱臼处死,剖腹取出全部胃肠道,低温下测量并计算无张力下胃肠推进率(胃肠推进率=墨汁推进距离/肠道全长×100%)。测定胃肠排空速率之后的肠管,沿空肠起始部向后迅速截7 cm肠管,沿回肠末端向前截取7 cm肠管,两段肠管各取0.5 cm固定于4%多聚甲醛中备用,其余肠管沿纵轴剪开,于冰生理盐水中漂洗,置于冰台上,刮取黏膜层,-80 ℃低温保存备用。

1.2.3 血糖测定 3组动物分别于术前1周和处死前自尾静脉采血,分离血浆,利用葡萄糖还原酶-底物显色反应,在500 nm波长下测定D(500)值,并根据标准品计算血糖浓度。

1.2.4 P物质免疫组织化学方法检测 4%多聚甲醛固定的肠管,经常规石蜡包埋,组织切片,片厚5 μm切片脱蜡至水,0.01 mol/L PBS漂洗,0.03% H_2O_2室温下封闭15 min,漂洗后加10%山羊血清,37 ℃封闭40 min,抗小鼠的SP单克隆抗体(1∶5 000)孵育,4 ℃过夜。0.01 mol/L PBS漂洗,Biotin结合的山羊抗小鼠IgG(1∶200)室温孵育30 min,漂洗后加入Strep-aviding-HRP(1∶200)室温孵育1 h,DAB显色,光镜观察。

1.2.5 Western blot检测空回肠黏膜中PEPT1含量 低温保存的空回肠黏膜,称量,加入RIPA(100 mg/500 μl)及蛋白酶抑制剂,低温下于玻璃匀浆器内反复研磨,制成单细胞悬液,超声破碎,12 000×g,4 ℃离心30 min,利用Bradford法测定总蛋白浓度。50 μg上样量加入8% SDS-PAGE电泳分离,转至PVDF膜,Non-fat Milk封闭,PEPT1一抗(1∶500)4 ℃孵育过夜,TBST漂洗,HRP-IgG(1∶1 000)二抗室温下孵育1 h,ECL发光剂检测,以GAPDH为内参照控制上样量。

1.3 统计学处理

采用SPSS10.0软件,各组数据均以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用非配对t检验,多组之间采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组动物血糖及体质量测定

各组动物处死前体质量结果表明，正常对照组体质量为(340.54±6.25)g，胰岛素治疗组动物体质量为(336.25±6.29)g，糖尿病组动物体质量为(320.68±6.77)g，统计结果表明胰岛素补偿治疗后体质量恢复，和正常对照组无差别；未给予胰岛素治疗组动物体质量明显减轻($P<0.05$)，和正常对照组比较差异有显著性。各组动物处死前血糖结果表明，正常动物组为(89.42±6.15)mg/dl，胰岛素治疗组为(95.5±3.22)mg/dl，糖尿病组为(331.8±20.34)mg/dl，统计结果表明胰岛素补偿治疗后血糖下降($P<0.05$)，和正常对照组无差别；未给予胰岛素治疗组动物血糖明显升高($P<0.05$)，和正常对照组比较差异有显著性($P<0.05$)。

2.2 胃肠排空速率检测

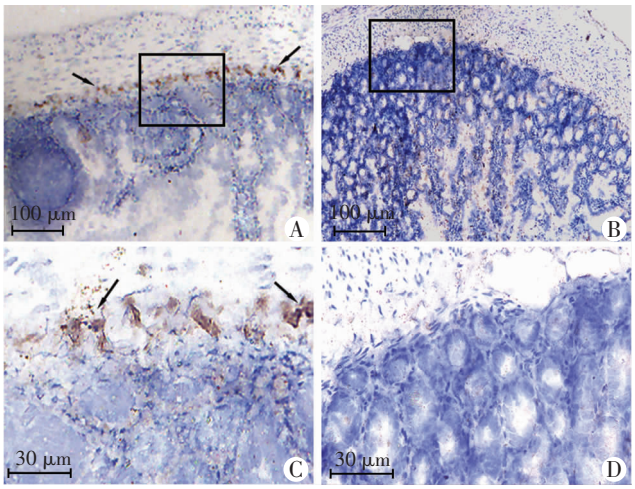
通过对处死前糖尿病组及对照组动物胃肠推进率检查，发现对照组动物胃肠推进率达到91.27%左右，而糖尿病动物中胃肠推进率达到75%的有3只动物，低于60%的有6只动物，介于60%~75%之间的有3只。STZ诱导的糖尿病动物，给予胰岛素治疗后，胃肠排空率维持在89.22%左右，与对照组无明显差异($P>0.05$)，说明胃肠排空率异常是胰岛素低下，血糖升高等糖尿病相关病理变化导致的结果。糖尿病模型加胰岛素治疗组及正常对照组动物胃肠排空功能正常，无明显差异($P>0.05$)，故本实验不再做形态学研究。

2.3 空肠起始端与回肠末端SP分布变化

SP的表达位置主要在空回肠的黏膜下层，肌层很少表达。在分布上，无论对照组、糖尿病组回肠表达均明显比空肠高。SP在回肠的表达位置除了黏膜下层外，黏膜隆起之间也可以看见SP的表达。2组之间比较可见，糖尿病组SP的表达大大减少，见图1、2。

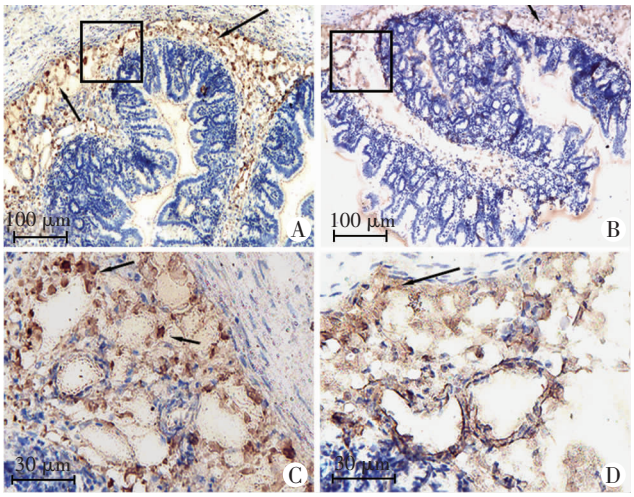
2.4 空回肠PEPT1表达水平

糖尿病动物PEPT1的表达水平明显下降($P<0.05$)，在空肠大约只有对照组的30%，在回肠只有对照组的50%，见图3。



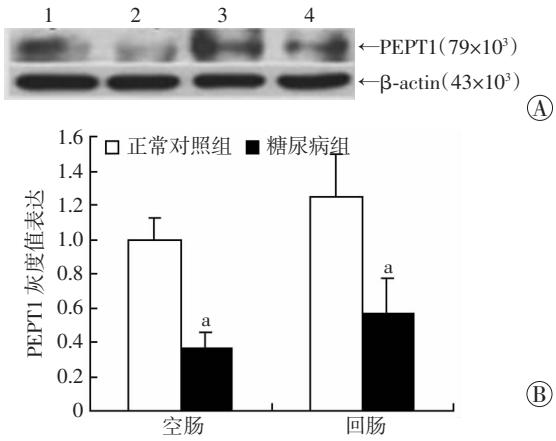
A、C：正常对照组；B、D：糖尿病组；箭头示空肠起始部黏膜下层SP的分布；C、D：A、B图中方框选取区域在高倍镜下所示

图1 正常对照组和糖尿病组大鼠空肠起始部SP分布变化 (S-P)



A、C：正常对照组；B、D：糖尿病组；箭头示回肠末端黏膜下层SP的分布；C、D：A、B图中方框选取区域在高倍镜下所示

图2 正常对照组和糖尿病组大鼠回肠末端SP分布变化 (S-P)



A：Western blot结果 1：正常对照组空肠；2：糖尿病组空肠；3：正常对照组回肠；4：糖尿病组回肠；B：PEPT1灰度值分析 a：$P<0.05$，与正常对照组比较

图3 糖尿病大鼠空肠及回肠黏膜细胞PEPT1表达水平变化

3 讨论

生理状况下，SP可引起平滑肌收缩，加快食物通过时间，该作用是SP直接作用于平滑肌或是间接通过释放乙酰胆碱而引起。SP还可加强结肠的集团推进运动，导致排便次数增加。有研究发现糖尿病大鼠血浆SP含量明显低于正常对照组，而十二指肠、远端结肠中含量明显高于正常对照组。研究[12-13]表明在与便秘有关的胃肠道功能障碍中，SP含量下降；与腹泻有关的疾病中，SP含量增加。这说明SP的变化和胃肠状态相关。Zhang等[14]对糖尿病腹泻型和便秘型胃肠功能障碍患者的研究发现，直肠黏膜SP水平明显低于正常对照组。应用放射免疫法发现，糖尿病患者血浆中的SP浓度低于正常人，而糖尿病胃肠病患者其血浆SP浓度比正常人和单纯糖尿病患者都要低。这表明糖尿病胃肠病的患者体内缺乏SP，对胃肠道活动的

免疫调节受到抑制,因此出现了一系列胃肠道症状。对胰岛素依赖性糖尿病患者研究发现其空肠的 Cajal 间质细胞显著减少,且肠道含兴奋性神经递质(如 SP)的神经元增加,而含抑制性神经递质的神经元减少。但我们的研究发现糖尿病大鼠无论在空肠起始部,还是回肠末端都存在 SP 含量的下降,这可能因为我们选择的动物主要是胃肠排空受阻的动物,糖尿病引发的腹泻伴随胃肠节律增加,可能会出现相反的结果[15]。Cajal 间质细胞是胃肠基本节律的起搏细胞,已有研究发现 SP 能够通过 NK1R 使非选择性阳离子通道开放引发细胞内 Ca^{2+} 的释放,从而激活 Cajal 间质细胞调节胃肠活动。本实验中,我们通过观察空回肠 SP 变化,发现正常情况下回肠 SP 分布明显高于空肠,这可能和空肠的吸收功能有关,由于吸收的需要,空肠需要较慢的蠕动节律[16]。糖尿病导致 SP 显著减少,可能是胃肠蠕动减慢的关键原因,该原因可能和胃肠道自身营养不足有关,由于葡萄糖利用障碍,肠管自身,包括粘膜上皮细胞及平滑肌细胞均可能出现代谢障碍,这可能会影响 SP 受体在细胞膜上的分布,受体对配体的调节作用丧失,从而影响 SP 的表达。作为营养吸收的关键部位,在蠕动迟滞的情况下,也影响局部代谢微环境,诸如肠道内毒性产物聚集影响上皮细胞功能状态、局部血流。

生理学及分子水平研究表明,肠道上的寡肽转运体,通常指的是 PEPT1,主要位于小肠上皮细胞刷状缘膜上。与其他转运体不同的是,寡肽转运体具有广泛的底物,包括 400 多种二肽及 8 000 多种三肽,日常饮食、肉类及食物消化的多种肽类均可经 PEPT1 转运。不同于其他以钠离子浓度梯度为驱动力的转运体,PEPT1 的独特性在于其是以氢离子作为驱动力的转运体,属于寡肽转运体家族,在大多数动物种属均存在,具有进化上的保守性。PEPT1 的转运功能受到许多因素的影响,诸如发育、胰岛素水平等。当胰岛素水平低下时,PEPT1 不能组装到细胞膜上,导致肽类利用障碍,除了导致全身营养不良外,也影响到肠道细胞,尤其吸收细胞的功能状态,最终导致 PEPT1 翻译后水平下调。我们的研究结果发现 PEPT1 的分布在正常状态下回肠水平高于空肠,但糖尿病状态下,这两部分肠管中 PEPT 的水平都出现了不同程度的下调,这一下调和 SP 的分布变化是一致的,但依然无法确认二者之间的关系,早期可能是胃肠道自主神经系统及胃肠激素的反应异常,后期也波及肠道本身的结构及功能,如本实验中,可能影响到小肠黏膜上皮细胞的吸收功能。

我们的研究结果表明糖尿病持续高血糖状态导致胃肠蠕动功能下降,这一变化可能是自主神经及胃肠激素综合作用的结果,尤其空回肠 SP 表达减少,导致空回肠蠕动减慢,增加了肠道内毒性产物聚集,并进而影响肠黏膜上皮细胞功能,尤其影响短肽转运体的表达,短肽转运体水平降低,导致肽类吸收障碍,加重了全身营养不良,也导致肠道自身营养障碍,形成恶性循环,最终可能影响平滑肌的功能,加剧了胃肠道功能障碍的发生和发展。

参考文献:

[1] Feldman M, Schiller L R. Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus [J]. Ann Intern Med, 1983, 98(3): 378-384.
[2] Talley N J, Young L, Bytzer P, *et al*. Impact of chronic gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus on health-related quality of life[J]. Am J Gastroenterol, 2001, 96(1): 71-76.
[3] Grover M, Farrugia G, Lurken M S, *et al*. Cellular changes in diabetic and idiopathic gastroparesis[J]. Gastroenterology, 2011, 140(5): 1575-1585.
[4] Kondo T, Oshima T, Obata K, *et al*. Role of transient receptor potential A1 in gastric nociception[J]. Digestion, 2010, 82(3): 150-155.
[5] Karagiannides I, Torres D, Tseng Y H, *et al*. Substance P as a novel anti-obesity target [J]. Gastroenterology, 2008, 134(3): 747-755.
[6] Foley D W, Rajamanickam J, Bailey P D, *et al*. Bioavailability through PepT1: the role of computer modelling in intelligent drug design [J]. Curr Comput Aided Drug Des, 2010, 6(1): 68-78.
[7] Brandsch M, Knutter I, Bosse-Doenecke E. Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters [J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(5): 543-585.
[8] Der-Boghossian A H, Saad S R, Perreault C, *et al*. Role of insulin on jejunal PepT1 expression and function regulation in diabetic male and female rats [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(7): 753-759.
[9] 计敏, 林琳, 赵志泉. 糖尿病动物模型P物质含量的变化及其意义[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2002, 22(4): 291-292, 298.
[10] Menzies J R, McKee R, Corbett A D. Differential alterations in tachykinin NK2 receptors in isolated colonic circular smooth muscle in inflammatory bowel disease and idiopathic chronic constipation [J]. Regul Pept, 2001, 99(2/3): 151-156.
[11] Lysy J, Karmeli F, Sestieri M, *et al*. Decreased substance P content in the rectal mucosa of diabeties with diarrhea and constipation [J]. Metabolism, 1997, 46(7): 730-734.
[12] Jun J Y, Choi S, Yeum C H, *et al*. Substance P induces inward current and regulates pacemaker currents through tachykinin NK1 receptor in cultured interstitial cells of Cajal of murine small intestine [J]. Eur J Pharmacol, 2004, 495(1): 35-42.
[13] Adibi S A. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function [J]. Gastroenterology, 1997, 113(1): 332-340.
[14] Zhang Q, Liu Q, Wu J, *et al*. PEPT1 involved in the uptake and transepithelial transport of cefditoren *in vivo* and *in vitro* [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 612(1/3): 9-14.
[15] Motohashi H, Masuda S, Katsura T, *et al*. Expression of peptide transporter following intestinal transplantation in the rat [J]. J Surg Res, 2001, 99(2): 294-300.
[16] 刘颖, 林中, 胡琼花, 等. 伴有胃肠动力障碍的重症急性胰腺炎大鼠结肠肠肌间神经丛一氧化氮合成酶神经元的变化[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(3): 274-277.

(**收稿**:2011-12-23;**修回**:2012-03-16)
(编辑 栾 嘉)