维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0824-03

SCF 在糖尿病胃轻瘫大鼠胃壁中表达的研究

商文静[1],王继红[1],陈 辉[2],程大林[2]

(1.重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016)

【摘 要】目的:制备糖尿病胃轻瘫大鼠模型,通过检测其胃壁组织 SCF 的表达水平,探讨 SCF 与糖尿病胃轻瘫的关系。方法:用链脲佐菌素(Streptozocin,STZ)建立糖尿病胃轻瘫大鼠模型,应用 RT-PCR 和 Wester blotting 方法分别检测各实验组胃壁 SCF 基因(cDNA)及蛋白质的表达水平,分析 SCF 表达水平与糖尿病胃轻瘫的关系。结果:糖尿病胃轻瘫大鼠胃排空明显延迟;SCF 基因和蛋白的表达水平明显降低;用西沙必利处理后表达升高,且与病情轻重有相关性。结论:SCF 与糖尿病胃轻瘫发病有关,SCF 在糖尿病胃轻瘫中的表达水平可以反映其病情发展过程。

【关键词】胃轻瘫;SCF;Cajal 间质细胞

【中国图书分类法分类号】R587.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-05-08

The expression of SCF in gastric wall of diabetic gastroparesis rats

SHANG Wenjing, et al

(*Department of Biochemistry&MolecularBiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To model diabetic gastroparesis (DGP) in rats and evaluate the role of SCF in the diabetic gastroparesis rats by detecting the level of stem cell factor (SCF) in gastric tissue of diabetic gastroparesis rats in order to discuss the relationship between SCF and DGP. *Methods:* To model diabetic gastroparesis in rats with intraperitoneal injection of streptozocin (STZ). The models were treated with cisapride for two months, and then the function of gastric emptying of all rats and SCF levels, including mRNA and protein in gastric walls, were detected through reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and western-blotting(WB). *Results:* The function of gastric emptying was delayed and SCF levels of DGP rats were decreased obviousely . After treated with cisapride, SCF levels, however, were increased, dramatically under the levels of control rats. *Conclusion:* The stage of DGP seems closely associated with SCF levels in gastric walls of animal models. There may be positive correlation between SCF levels and function of gastric emptying.

【Key words】DGP;SCF;ICC

1958 年 Kassander 将以胃平滑肌收缩力减低、胃排空延迟为特点的糖尿病患者所并发的胃动力障碍命名为糖尿病性胃轻瘫(Diabetic Gastroparesis, DGP)。DGP 是糖尿病(Diabetes mellitus, DM)病人常见的并发症,国外流行病学研究发现有 50%～60% 的糖尿病患者合并有 DGP,主要表现为恶心、呕吐、腹泻、便秘、早饱或消化不良、腹部不适、腹胀等症状。糖尿病史较长、和血糖控制不良的糖尿病患者容易并发胃轻瘫。糖尿病性胃轻瘫不仅影响糖尿病患者的生活质量,而且影响糖尿病的有效控制。其发病机制尚未阐明,通常伴有胃电起搏功能异常及胃部平滑肌细胞的形态学异常[1,2];近年来的研究发现糖尿病胃轻瘫患者及其动物模型胃肠的 Cajal 间质细胞(Interstitial cells of Cajal, ICC)数量减少,或发生病理损害。ICC 是胃电活动的起搏细胞,其发育、表型及和功能均维持依赖于 SCF/KIT 信号传递系统。Kit 是 ICC 表达的一种跨膜蛋白,其配体为干细胞因子(stem cell factor, SCF)。目前国内外尚未见到有关 SCF 与糖尿病胃轻瘫关系的研究。本研究通过观察 SCF 在糖尿病胃轻瘫大鼠模型中表达水平的变化,旨在探讨 SCF 与 DGP 的关系、其在糖尿病胃轻瘫中的作用及相应的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:取 Wistar 雄性大鼠 55 只,体重 180±20g(重庆医科大学实验动物中心提供)。实验用药及主要试剂:阿托

作者介绍: 商文静(1979-),女,硕士,
主要研究方向:糖尿病并发症分子机理。

基金项目: 重庆医科大学校办基金(XB200328)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

品、西沙必利(西安杨森);链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ,BBI 公司);京都血糖诊断试纸;RT-PCR 及 Western 相关试剂(上海生物工程科技服务有限公司);PCR 引物:5' 引物 CTACCCAATGCGTGGACTATCTG,3' 引物 GATTCGC-CACCAGTTTTGTAATG,(上海生物工程科技服务有限公司);SCF 多克隆兔抗鼠抗体及 Actin 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。主要仪器:凝胶扫描成像系统(Bio-Rad);日立 7170A 生化自动分析仪;京都血糖仪(日本京都公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 实验大鼠随机分为正常对照组(C 组,15 只)、糖尿病组(40 只)。C 组与糖尿病组分别用普通饲料喂养和高脂饲料喂养 2 个月,禁食 12h 后单剂量腹腔注射 STZ(30mg/kg 体重)。正常对照组腹腔注射相应剂量的生理盐水。血糖持续 1 周≥11.1mmol/L 者视为糖尿病(DM)模型建立成功。DM 鼠继续高脂饲养 3 个月[5],具备以下两种情况之一者为糖尿病胃轻瘫模型成功:①大鼠大便量和性状持续与对照组有明显差别;②胃肠推进指标检测与正常对照组有显著差异。将 DGP 模型大鼠随机分为糖尿病胃轻瘫组(D 组)、西沙必利治疗组(X 组),每组各 20 只,X 组以 0.5mg/kg 用西沙比利灌胃(药物剂量均按人与大鼠等效价剂量换算),每天 1 次,用药 2 个月,C 组和 D 组则给与相应量的生理盐水灌服。

1.2.2 血糖、血脂测定 断尾采血,京都血糖仪测血糖;毛细管内眦静脉丛采血,日立 7170A 生化自动分析仪测 TG、TC。

1.2.3 胃排空功能检测 实验结束时,将实验大鼠禁食 24h,按 1ml/100g 体重给与 10% 炭粉混悬液(活性炭和阿拉伯胶各 10%)灌胃。30min 后打开腹腔,用镊子轻轻将上端至幽门、下端至回盲肠的肠管置于托盘上,用直尺测量炭粉前端至幽门括约肌距离及幽门括约肌至小肠末段距离,计算胃肠推进指数。胃肠推进指数计算方法:炭粉前端至幽门括约肌距离(cm)/ 幽门括约肌至小肠末段距离(cm)× 100%。

1.2.4 SCF 基因和蛋白质表达水平测定 取胃窦部组织(约 100mg),提取总 RNA 及蛋白质,用常规逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)与 Western Blotting 方法测定 SCF 的 mRNA 和蛋白质表达水平,结果均用凝胶成像系统分析。

1.3 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS11.5 软件包进行各项统计分析,$P<0.05$ 有统计学差异。

2 结 果

2.1 一般检测指标测定结果

与正常对照组比较,DM 组大鼠的粪便量、血糖、甘油三酯水平均明显增加,胃肠推进指数明显降低,结果见表 1,P 值均 <0.05,差异有显著性。

同时粪便的性状与正常对照组比较也具有明显差异:DM 组粪便形状粗大、稀软、蓬松、互相粘连、不规则,部分不成形,颜色淡。C 组粪便呈棕黑色或深棕色,形状规则,质中或稍硬,互不粘连。

表 1 各组大鼠粪便量、血糖、TG 及胃肠推进指标测定结果

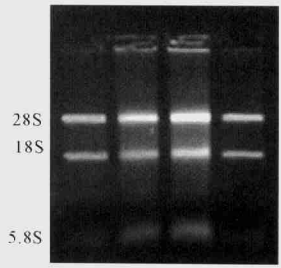
	粪便量 (g/ 天)	血糖 (mmol/L)	TG (mmol/L)	胃肠推进指数 (%)
C	10.84 ± 3.27	4.88 ± 0.92	0.1 ± 0.03	0.50 ± 0.02
DM	32.65 ± 12.03*	22.66 ± 5.47*	0.33 ± 0.06*	0.37 ± 0.02*

DMVSC*P <0.05

表 2 各组 SCF 的 RT-PCR 和 Western 结果分析

	C	D	X
RT-PCR	0.282 ± 0.018	0.229 ± 0.023*	0.258 ± 0.015*#
Western	0.224 ± 0.011	0.187 ± 0.010*	0.211 ± 0.012*#

VsC,*P <0.05;VsD,#P <0.05



总 RNA 电泳图

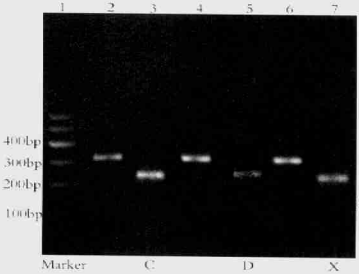


图 1 SCF mRNA 在各实验组中的表达

2.2 SCF 表达水平测定

各组 RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳(结果见图 1),均在 200bp 与 300bp 之间获得特异条带,即为 SCF(258bp)。各组胃窦部组织蛋白提取物

维普资讯 http://www.cqvip.com

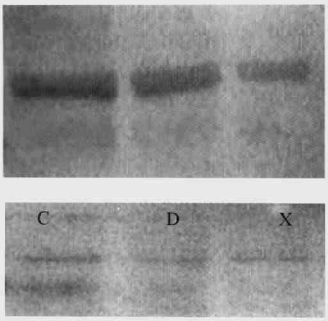


图 2 各实验组胃壁组织 SCF 含量

经 Western 免疫印迹法检测，均在 31ku 左右出现特异条带（见图 2）。对照、D 和 X 三组实验结果见表 2。分析显示，与正常对照组相比，D 组和 X 组 SCF 的 mRNA 及蛋白质相对表达量显著降低，且具有明显差异（$P<0.05$）；且 X 组 SCF 的 mRNA 及蛋白质相对表达量比 D 组高，亦具有显著性差异（$P<0.05$）。

3 讨 论

1893 年，西班牙神经解剖学家 Cajal 用甲基蓝及嗜银染色法在胃肠道观察到一类特殊的间质细胞，称为 Cajal 细胞，也称为 Cajal 间质细胞(Interstitial Cells of Cajal，ICCs)。这类细胞分布在自主神经末梢与平滑肌细胞之间。胃肠的解剖、功能和电生理学研究证实 ICC 是产生和传播胃电慢波的起搏细胞，同时 ICC 也介导肠神经系统信号传递[4]。原癌基因 c-kit 的产物 - Ⅲ型酪氨酸激酶受体 C-KIT 为 ICC 的标记性产物，SCF 是其天然配体，在胃肠道系统 SCF 主要由平滑肌细胞表达。文献报道 SCF/KIT 信号传递系统是胃 ICC 发育[5]、增生[6]、表型及功能维持[7]所必需的信号传递系统，SCF 或 C-KIT 基因的突变可导致小鼠胃肠 ICC 缺失，胃肠慢波动作电位消失。Nano M 等[8]对经胃代食管吻合术的病人进行研究，指出残留食道和胃管运动减弱与 SCF/c-kit 信号传递系统紊乱有密切关系。

本实验利用糖尿病胃轻瘫动物模型，模拟临床糖尿病胃轻瘫患者的发病过程，用 RT-PCR 和 Western 免疫印迹方法测定 SCF 基因和蛋白质的相对表达水平。结果显示 DGP 大鼠胃壁 SCF 基因和蛋白质表达水平和胃排空功能均明显低于正常对照组，西沙必利能提高糖尿病胃轻瘫大鼠胃壁的 SCF 表达水平，显著增强 DGP 大鼠的胃排空功能，提示 SCF 表达下调可能是导致 ICC 缺失或病理改变的原因之一，胃壁 SCF 表达水平与胃电活动存在相关性。

Horvath VJ 等[9]研究认为，在胃肠道系统 SCF 主要由平滑肌细胞表达，并指出肌源性病变在糖尿病胃轻瘫发生过程中具有重要作用。通过本实验，可发现 DGP 大鼠胃壁 SCF 基因和蛋白质表达水平下降，经西沙必利治疗后，其表达虽有上升，但仍明显低于正常对照组，其胃排空功能仍未恢复至正常水平。据此可推测，DGP 大鼠胃壁 SCF 表达下调可能与胃肌源性病变有关，表达下调的 SCF 可能导致胃 ICC 网络损害和功能紊乱，从而使胃动力失调。

西沙必利(cisapride)是一种本酰胺衍生物，可增强胃动力，增加胃窦收缩力，对纠正糖尿病胃轻瘫患者胃电异常、缓解临床症状有明显疗效[10]。但由于 DGP 大鼠胃壁肌病使病变的平滑肌不能对西沙必利引起的收缩冲动做出相应的应答，使 DGP 大鼠胃排空功能不能恢复至正常水平，其具体机制尚需进一步研究。至于西沙必利如何导致 SCF 表达升高的机制尚不清楚，可能是通过改变平滑肌收缩功能从而改变了平滑肌细胞的分泌功能所为。

{通讯作者：王继红，联系方式：重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室，邮编：400016；E-mail：wjhkyh@sina.com.cn}

参 考 文 献

[1] 簋 宇，何美云，侯 敏，等. 糖尿病大鼠的胃内神经系统及平滑肌的形态学改变及活血化瘀中药的影响[J]. 胃肠病学，2001；6(增刊)：A49.

[2] 张亚萍，高 革，张宽学，等. 糖尿病胃肠功能紊乱模型胃肠道超微结构变化的研究[J]. 临床消化病杂志，2002；14(4)：150-152.

[3] Ordog T, Takayama I, Cheung WKT, et al. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis[J]. Diabetes, 2000; 49: 1731-1739.

[4] Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside-I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001; 281: G602-611.

[5] Isozaki K, Hirota S, Nakama A, et al. Distributed intestinal movement, bile reflux to the stomach, and deficiency of c-kit-expressing cells

（下转第 891 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

外,其余患儿均自动复跳。

脑保护 随着心脏麻醉学的发展,术后生存质量日益受到重视,减少脑部并发症变得越来越重要。体外循环婴幼儿脑损伤的机制在于快速降温导致脑区域性血管舒缩不均匀和局部脑血流不足。有研究显示[5],快速降温期是脑损害的重要阶段,而血气管理是降温期脑保护的重要措施。Belling[6]的研究结果发现在新生儿和小婴儿组,PH-STAT 管理的神经系统并发症较少。我院采用浅低温 α-STAT 稳态管理血气,体温低于 28℃时用 PH-STAT 管理;同时监测肛温和鼻咽温,匀速降温、复温;开放主动脉前头低脚高、鼓肺,以减少气栓发生;降温期实施脑局部降温;需深低温停循环或深低温低流量的患儿,给予丙泊酚以加强脑保护。本组 43 例患儿中无 1 例有严重神经系统并发症出现,是否有认知障碍和癫痫等发生还有待进一步随访观察。

综上所述,低体重小儿先天性心脏病矫治术的麻醉处理较困难,死亡率高,有作者报道其死亡率高达 8.3%[7],本组病例死亡率 6.98%,可能与病例的组成有关。

参 考 文 献

[1] 李 欣,高尚志,徐仲凡,等.不同温度下含血停跳液对未成熟心肌保护作用的实验研究[J].中华心胸血管外科杂志,2000;16:38-39.

[2] Allen BS,Barth MJ,Ilbawi MN.Pediatric myocardial protection:an overview [J].Semin Thorac Cardiovasc Surg,2001;13(1):56-72.

[3] Yamamoto F.Do we need hypothermia in myocardial protection [J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg,2000;6(4):216-223.

[4] Gaillard D,Bical O,Paumier D,et al.A review of myocardial normothermia:its theoretical basis and the potential clinical benefits in cardiac surgery [J].Cardiovasc Surg,2000;8(3):198-203.

[5] Jonas RA,Lang P.Open repair of cardiac defects in neonates and young infants [J] .Clin perinatol,1988;15:665-677.

[6] Bellinger DC,Wypij D,du Plessis Aj,et al,Developmental and neurologic effects of alpha-stat strategies for deep hypothermic Cardiopulmonary bypass in infants[J]J Thorac Cardiovasc surg,2001;121: 374-383.

[7] 陈 虹,朱德明,王 伟,等.低体重危重先心病婴儿的体外循环方法[J].中国体外循环杂志,2003;1(2):95-97.

(上接第 820 页)

ing in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats[J]. Circ Res,1994;75(1):105-113.

[4] Okafor CC,Saunders L,Li X,et al.Myofibrillar responsiveness to cAMP, PKA,and caffeine in an animal model of heart failure[J].Biochem Biophys Res Commun,2003;300(2):592-299.

[5] Dorr RT.Cytoprotective agents for anthracyclines [J].Semin Oncol, 1996;23(4Suppl8):23-34.

[6] Singal PK,Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. N Engl J Med,1998;339(13):900-905.

[7] Christiansen S,Redmann K,Scheld HH,et al. Adriamycin-induced cardiomyopathy in the dog-an appropriate model for research on partial left ventriculectomy[J]. Heart Lung Transplant,2002;21(7):783-790.

[8] Toyoda Y,Okada M,Kashem MA.A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration[J].J Thorac Cardiovasc Surg,1998;115(6):1367-1373.

[9] Arnolda L,McGrath B,Cocks M,et al. Adriamycin cardiomyopathy in the rabbit:an animal model of low output cardiac failure with activation of vasoconstrictor mechanisms[J].Cardiovasc Res,1985;19(6):378-382.

(上接第 826 页)

in Ws/Ws mutant rats[J]. Gastroenterology, 1995;109(2):456-464.

[6] Young HM. Embryological origin of interstitial cells of Cajal[J]. Micro Res Tech, 1999;47(5):303-308.

[7] Sean MW,Mary FB,Vivienne MJ,et al. Role of PI3-kinase in the development of interstitial cells and pacemaker in murine gastrointestinal smooth muscle[J].Physiol,1999; 516(3):835-846.

[8] Nano M, Battaglia E. Decreased expression of stem cell factor in esophageal and gastric mucosa after esophagogastric anastomosis for cancer: potential relevance to motility [J].Ann Surg Oncol,2003 ;10(7): 801-809.

[9] Horvath VJ, Vittal H, Lorincz A, et al. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis[J].Gastroenterology,2006; 130(3):759-770.

[10] Soulie ML,Cros G,Serrano JJ,et al. Impairment of contractile response to carbachol and muscarinic receptor coupling in gastric antral smooth muscle cells isolated from diabetic streptozotocin-treated rats and db/db mice[J].Mol Cell Biochem,1992;109(2):185-188.