

肠道硫化氢合成酶 CSE 与糖尿病大鼠结肠动力的相关研究*

王 芹¹, 刘 颖^{2△}, 林 中¹, 段泽辉¹

(1. 桂林医学院附属医院, 广西桂林 541001; 2. 桂林医学院第二附属医院, 广西桂林 541199)

[摘要] 目的 探讨肠道硫化氢(H₂S)合成酶胱硫醚-γ-裂解酶(CSE)与糖尿病(DM)大鼠近端结肠动力的关系。方法 一次性腹腔注射 1% 链脲佐菌素(STZ)65 mg/kg, 建立 1 型糖尿病模型, 观察大鼠的一般情况; 注药第 10 天制作结肠平滑肌纵行肌条, 使用生物机能实验系统记录每组纵行肌肌条自发性收缩活性; 分别采用免疫组化及双重免疫荧光的方法观察结肠全层标本及肌间神经丛(MP)中 CSE 分布; 采用 Western blot 方法观察肠道组织(去黏膜及黏膜下层)CSE 的表达。结果 DM 组近端结肠肌条收缩活性均低于对照组($P < 0.05$); CSE 在黏膜下层、黏膜下神经丛、MP、纵行肌和环形肌都有分布; CSE 在大鼠肌间神经细胞核中分布, 但 CSE 阳性神经元所占 MP 比例差异无统计学意义($P > 0.05$); DM 组大鼠结肠(去除黏膜及黏膜下层后)CSE 的表达上调($P < 0.05$)。结论 CSE 表达上调可能是 DM 大鼠近端结肠运动减退的原因之一。

[关键词] 硫化氢; 糖尿病; 胱硫醚-γ-裂解酶; 结肠动力

[中图分类号] R333

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)11-1463-04

Study on colonic H₂S-producing enzyme CSE and colonic motility in diabetes mellitus*Wang Qin¹, Liu Ying^{2△}, Lin Zhong¹, Duan Zehui¹

(1. the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541001, China;

2. the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541199, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between colonic H₂S-producing enzyme cystathionine-γ-lyase(CSE) and colonic motility in a rat model of diabetes mellitus(DM). **Methods** To obtain diabetic rat models, all rats were injected intraperitoneally (ip) 1% streptozotocin (STZ, 65 mg/kg), type 1 diabetes model was established, normol conditions were observed periodically. Ten days after treatment, production of colonic longitudinal smooth muscle strips, organ bath recordings were used to test the colonic motility; immunofluorescence and double immunofluorescence labeling method were performed to detect the distribution of CSE; Western blot were performed on rat colonic samples devoid of mucosa and submucosa to detect the expression of CSE. **Results** DM rats decreased the colonic motility($P < 0.05$); CSE was strongly expressed in the cytosols of the circular and longitudinal smooth muscle cells and the nucleus of the myenteric plexus neurons; CSE distributed in myenteric neurons in the nucleus of rat, but the proportion of MP had no difference ($P > 0.05$); DM rats increased the expression of CSE in the colon devoid of mucosa and submucosa($P < 0.05$). **Conclusion** The decrease of colonic motility in diabetic rat may be associated with the increased production of H₂S-producing enzyme CSE.

[Key words] hydrogen sulfide; diabetes mellitus; cystathionine-γ-lyase; colonic motility

近年来研究发现在哺乳动物多种器官组织有硫化氢(H₂S)产生, 其具有舒张血管平滑肌、心肌负性和肌力保护、清除氧自由基、抗炎等生物学效应^[1-2]。内源性 H₂S 主要通过胱硫醚-β-合成酶(cystathionine-β-synthase, CBS)和胱硫醚-γ-裂解酶(CSE)来合成^[3]。近年来发现 H₂S 对消化道动力亦起着重要的调节作用: 外源性和内源性 H₂S 均抑制胃的运动^[4]; 外源性硫化氢可抑制大鼠纵行肌和环形肌自发性收缩, 抑制效应呈浓度依赖性^[5]; 松弛人、小鼠离体空肠^[6]; 对 Wistar 大鼠离体单个结肠平滑肌细胞产生舒张作用^[7]; 主要通过保护肠神经元尤其是兴奋性神经元而部分地保护了离体肌条的收缩功能^[8]。

糖尿病(DM)胃肠动力减退是 DM 胃肠道的表现之一, 以往研究认为 DM 结肠动力障碍的机制与自主神经病变、肠神

经系统(enteric nervous system, ENS)病变、平滑肌形态学改变、Cajal 间质细胞病变、激素紊乱、血糖自身异常、Hp 感染等方面相关^[9-15]; 但不能完全解释 DM 动力异常的机制, 临床上缺乏有效治疗手段。

本研究运用 1 型 DM 模型, 通过测定结肠动力、结肠 H₂S 合成酶 CSE 分布及表达等实验, 探讨内源性 H₂S 与 DM 大鼠结肠动力减退的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠, SPF 级, 体质量 200~250 g, 购自广西医科大学动物实验中心, 动物生产许可证号: SCXK 桂 2014-0002, 实验前适应性饲养 1 周, 不控制食水摄入量。

1.1.2 主要试剂与仪器 罗氏血糖仪(德国 ACCU-CHEK-rPerforma 公司);解剖显微镜、荧光显微镜(Olympus);张力换能器、RM6240 多通道生理信号采集处理系统(成都仪器厂);STZ(美国 Sigma 公司);小鼠抗大鼠 Hu(HuC/HuD)单克隆抗体(美国 Invitrogen 公司);兔抗大鼠 CSE 单克隆抗体(Abcam);FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、TRITC 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及 1 型 DM 模型的制作 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 20 只,分为 DM 组($n=10$)和对照组($n=10$)。DM 模型按照文献报道方法进行^[16];DM 组大鼠禁食不禁水 12 h 后称重,一次性腹腔注射 STZ 65 mg/kg;对照组腹腔注射同等剂量柠檬酸母液(pH 4.2~4.5)。72 h 后尾静脉采血,连测 2 d 血糖大于或等于 16.7 mmol/L 者为造模成功,剔除血糖小于 16.7 mmol/L 者。此后于处死前 1 d 再次测量血糖,同时测量体质量,观察大鼠饮食、饮水、皮肤色泽、精神状况及二便情况。注药第 10 天进行下一步实验。

1.2.2 结肠平滑肌条制备及其自发性收缩的记录 大鼠用 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉后剖腹,迅速取约 2 cm 的结肠(约距回盲瓣 2 cm),平滑肌条制备及其自发性收缩方法同文献^[17]。收缩强度以曲线下面积(area under the curve, AUC)表示,统计分析两组 AUC 的差异。

1.2.3 免疫组化检测近端结肠 CSE 的分布 大鼠用 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉后,迅速取距回盲瓣 2 cm 结肠标本约 1 cm,在 Krebs 液中洗净肠内容物后,迅速予 10% 中性缓冲福尔马林固定约 24 h;按常规免疫组化步骤进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、抗体孵育及苏木素染色,石蜡包埋切片时切片平面与肠腔轴垂直,山羊抗大鼠 CSE 抗体浓度为 1:250。观察 CSE 在肠道壁中的分布。

1.2.4 双重免疫荧光染色观察近端结肠 MP 中 CSE 的分布 大鼠用 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉后,迅速剖腹取距回盲瓣 2 cm 的一段长约 1.5 cm 的结肠置于冰 Krebs 液中,参照 Liu 等^[17]双重免疫荧光方法进行肌间神经丛全层标本(whole-mount)制备及抗体孵育,小鼠抗大鼠 Hu 蛋白单克隆抗体浓度为 1:100,兔抗大鼠 CSE 多克隆抗体浓度为 1:200,山羊抗小鼠 FITC 抗体浓度为 1:100,山羊抗兔 TRITC 抗体浓度为 1:200。所有涉及荧光二抗的步骤都要避光。荧光显微镜下观察,以抗 Hu 抗体作为神经元标志物显示全部神经元,每只大鼠至少统计 1 000 个肠神经元,计算 CSE 阳性神经元占全部神经元的百分比。

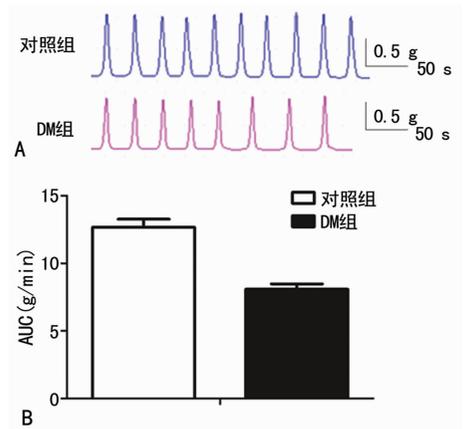
1.2.5 Western blot 检测近端结肠(去除黏膜及黏膜下层) CSE 的表达 大鼠用 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉后,迅速取距回盲瓣 2 cm 的一段长约 1.5 cm 的结肠组织(去除黏膜及黏膜下层)约 1 g 予 -80° 冰箱保存备用,常规 Western blot 方法进行提取蛋白、电泳、转膜、封闭、抗体孵育、曝光、显影,兔抗大鼠 CSE 多克隆抗体浓度 CSE 1:1 000。采用目的蛋白灰度值与内参灰度值的比值作为相对表达量来分析两组表达量差异。

1.3 统计学处理 用 SPSS 18.0 软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,两组之间的变化关系用 Spearman 相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 DM 模型建立成功后,大鼠血糖明显升高,出现明显三多一少症状;与对照组相比,DM 组大鼠明显懒动、毛色干枯、无进攻性、多便、稀便。DM 大鼠血糖明显高于对照组大鼠[(33.30 ± 2.23) nmol/L vs. (4.76 ± 0.28) nmol/L, $P < 0.05$];处死前 DM 组大鼠体质量明显低于对照组大鼠[(218.5 ± 8.6) g vs. (295.7 ± 18.3) g, $P < 0.05$],DM 组每只大鼠每天大便次数多于对照组[(8.00 ± 0.32)次 vs. (5.00 ± 0.65)次, $P < 0.05$],饮水量、饮水量、尿量未做统计,组内差异无统计学意义($P > 0.05$)。

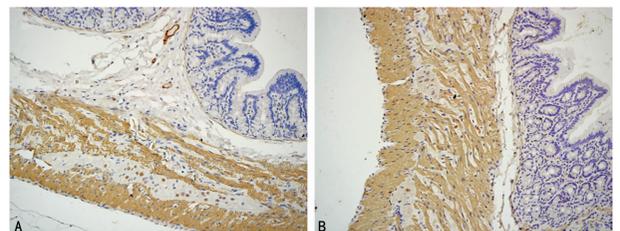
2.2 两组大鼠结肠平滑肌条自发性收缩活性 DM 组大鼠近端结肠纵行肌自发性收缩的 AUC 均低于对照组[(8.0 ± 0.72) g/min vs. (12.67 ± 0.32) g/min, $P < 0.05$],见图 1。



A: 近端结肠纵行肌收缩曲线; B: AUC 柱形图。

图 1 大鼠近端结肠纵行肌肌条自发性收缩活性

2.3 两组大鼠结肠 CSE 分布 在两组大鼠的结肠组织中, CSE 在纵行肌和环形肌细胞的胞浆、肌间神经元细胞核中强表达,见图 2。



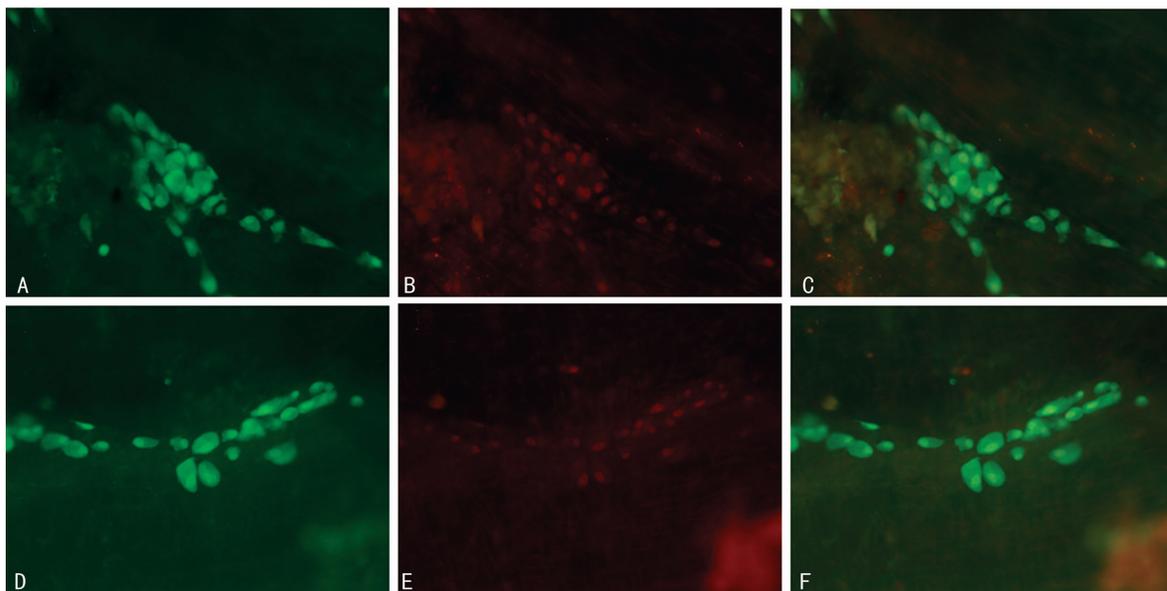
A: 对照组; B: DM 组。

图 2 两组大鼠近端结肠免疫组化染色($\times 200$)

2.4 两组大鼠近端结肠 MP 中 CSE 分布 在两组大鼠的结肠组织中, CSE 在肌间神经元细胞核中分布, 肌间神经丛神经元形态未见明显变化, DM 组 CSE 阳性神经元的比例较对照组差异无统计学意义[(99.00 ± 0.45)% vs. (99.00 ± 0.57)%, $P > 0.05$],见图 3。

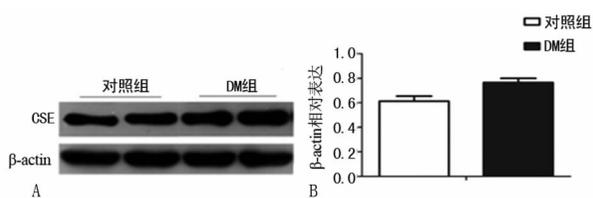
2.5 两组大鼠结肠中 CSE 的表达(去除黏膜及黏膜下层) Western blot 结果显示, DM 组大鼠结肠 CSE 的表达上调($P < 0.05$),见图 4。

2.6 两组大鼠胃肠动力改变与 CSE 表达的变化 Spearman 相关性分析 两组大鼠肠动力改变与 CSE 表达变化成负相关($r = -0.782$, $P < 0.05$),双侧显著相关,见图 5。



A: 对照组肌间神经节; B: 对照组 MP 中 CSE 分布; C: 对照组 CSE 阳性神经元占肌间神经节的比例; D: DM 组肌间神经节; E: DM 组 MP 中 CSE 分布; F: DM 组 CSE 阳性神经元占肌间神经元的比例。

图 3 两组大鼠近端结肠 MP 双重免疫荧光(×200)



A: Western blot 蛋白条带; B: 两组 CSE 灰度值与 β -actin 灰度值的比值柱形图。

图 4 两组 CSE 在结肠(去除黏膜及黏膜下层)的表达

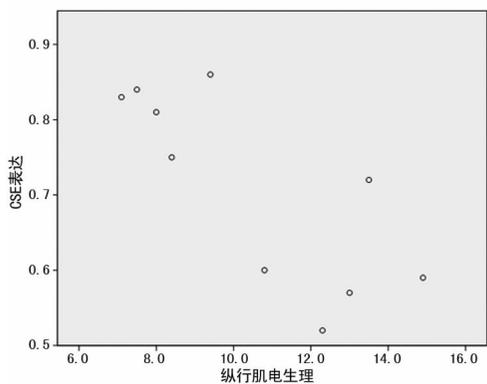


图 5 CSE 表达与纵行肌电生理 Spearman 相关性分析散点图

3 讨论

本研究首先建立 1 型 DM 大鼠模型,DM 组大鼠血糖明显升高,出现明显三多一少、懒惰、无攻击性、毛色干枯等表现。对其近端结肠动力进行评价,结果显示 DM 组大鼠结肠纵行肌的 AUC 明显低于对照组,以上结果表明 DM 组大鼠近端结肠动力减退。但 DM 组大鼠亦有稀便、多便情况,可能与高血糖引起的远端结肠胃肠动力增快有关^[10]。

目前已经证实 H_2S 可以抑制肠道动力,有研究^[4]发现 NaHS 浓度依赖性抑制兔离体回肠肌自发性收缩,NaHS 还抑

制肠壁内神经受电刺激后诱发的豚鼠和大鼠回肠收缩;Gallego 等^[6]的研究显示 NaHS 浓度依赖性抑制小鼠结肠和空肠、人和大鼠的结肠运动;Gil 等^[18]发现 H_2S 抑制大鼠结肠推进运动,使平滑肌细胞超极化,但对慢波频率没有影响; H_2S 还可浓度依赖性抑制大鼠空肠环肌和纵肌的收缩^[19-20]。蒋楠^[21]发现 DM 大鼠回肠动力减弱同时 CBS 表达增多,提示内源性 H_2S 可能对 DM 大鼠回肠动力具有抑制作用,而 H_2S 对 DM 大鼠结肠动力研究少见相关报道。CSE 是 CBS 外另外一种体内 H_2S 主要合成酶^[3]。近年来发现不同种属动物肠道组织中均有内源性 H_2S 合成酶 CSE 或 CBS 分布^[22-23]。也有研究发现结肠活体肌组织可产生 H_2S ,同时使用 CSE 和 CBS 抑制剂后, H_2S 的产生受到明显抑制^[17,22]。为探讨二者关系,本研究首先观察 CSE 在大鼠结肠的分布及表达,发现 CSE 在两组大鼠纵行肌和环形肌细胞质中强表达,并且还在肌间神经元细胞核中分布,从而证实大鼠结肠有 CSE 分布;进而 Western blot 结果显示,DM 组结肠(去除黏膜及黏膜下层)CSE 表达均高于对照组,从而提示 CSE 增多可能是 DM 结肠动力减弱的原因之一,但由于本实验的局限性,此时的 CSE 升高来自源于平滑肌细胞还是肌间神经丛尚未可知。ENS 包括黏膜下神经丛及肌间神经丛,调节胃肠道的运动、分泌、免疫等,被称为消化道壁内的“微型脑”,其中位于纵行肌和环形肌间的肌间神经丛对胃肠动力起着重要的调节作用^[24]。本研究结果显示,大鼠结肠 MP 有 CSE 的分布,且 CSE 阳性率达 99%,这与文献相似^[3,17,25-27],从这方面来讲,内源性 H_2S 可能作为一种神经递质调节胃肠道动力,实际上两组大鼠 MP 中 CSE 阳性率无差异,但不排除 MP 中 CSE 蛋白表达上调引起的结肠动力降低;免疫组化结果显示出了肌间神经丛,结肠固有肌层亦 CSE 分布。既往有研究发现,大鼠结肠平滑肌细胞可产生 H_2S ^[17],从这种意义上来讲, H_2S 可能作为一种胞内信号分子参加胃肠道动力的调节。就本实验结果来讲,无论是肌源性还是神经源性 H_2S 合成的增多均会导致结肠动力的紊乱。CSE 表达与纵

行肌电生理呈负相关,进一步提示 CSE 表达上调引起肠道动力的降低。

综上所述,结肠局部内源性 H₂S 合成酶表达上调,提示 H₂S 产生增多可能是 DM 结肠动力减弱的原因之一。

参考文献

- [1] Huang Q, Sparatore A, Del Soldato P, et al. Hydrogen sulfide releasing aspirin, ACS14, attenuates high glucose-induced increased methylglyoxal and oxidative stress in cultured vascular smooth muscle cells[J]. PLoS One, 2014,9(6):e97315.
- [2] Olas B. Hydrogen sulfide in hemostasis: Friend or foe? [J]. Chem Biol Interact, 2014,217(1):49-56.
- [3] Gil V, Gallego D, Jimenez M. Effects of inhibitors of Hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility[J]. Br J Pharmacol, 2011,164(2b):485-498.
- [4] 叶艳芳. 硫化氢对健康雄性大鼠胃运动的影响及其机制研究[D]. 济南:山东大学,2009.
- [5] 刘颖,全晓静,夏虹,等. 外源性硫化氢及 K(ATP)通道对大鼠慢性应激结肠高动力的调节[J]. 中国病理生理杂志, 2015,31(4):725-731.
- [6] Gallego D, Clavé P, Donovan J, et al. The gaseous mediator, Hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum[J]. Neurogastroenterol Motil, 2008,20(12):1306-1316.
- [7] 程英. 硫化氢对大鼠结肠平滑肌细胞的舒张作用及机制的研究[D]. 天津:天津医科大学,2008.
- [8] 张观坡. 硫化氢对大鼠肠缺血再灌注后回肠收缩活性和肠神经的保护作用[D]. 上海:第二军医大学,2011.
- [9] 孙洁. 不同血糖浓度糖尿病大鼠结肠动力研究[D]. 兰州:兰州大学,2013.
- [10] 蓝宇,吴改玲,闫冰,等. 糖尿病消化不良患者的自主神经功能及其对近端胃功能的影响[J]. 胃肠病学, 2006,11(8):484-487.
- [11] Schicho R, Krueger D, Zeller F, et al. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the guinea-pig and human colon[J]. Gastroenterology, 2006, 131(5):1542-1552.
- [12] 史洪涛,房殿春,龙庆林. 糖尿病大鼠胃平滑肌细胞凋亡及相关基因蛋白表达的意义[J]. 中国临床康复, 2005,9(3):114-115,117.
- [13] 林琳,徐丽明,罗云,等. 糖尿病结肠动力障碍时 Cajal 间质细胞和干细胞因子的变化以及胰岛素的干预效应[J]. 胃肠病学, 2008,13(4):200-204.
- [14] 林琳,计敏,赵志泉,等. 糖尿病结肠动力障碍与几种胃肠激素变化的意义[J]. 江苏医药, 2003,29(9):641-644.
- [15] 吴波,郑长青. 幽门螺杆菌、胃肠激素与糖尿病胃轻瘫的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2010,18(15):1616-1619.
- [16] 张巨彪,苏秀兰,欧阳晓晖. 1 型糖尿病大鼠模型的建立及观察[J]. 医学综述, 2013,19(2):335-337.
- [17] Liu Y, Luo H, Liang C, et al. Actions of Hydrogen sulfide and ATP-sensitive Potassium channels on colonic hypermotility in a rat model of chronic stress[J]. PLoS One, 2013,8(2):e55853.
- [18] Gil V, Parsons S, Gallego D, et al. Effects of Hydrogen sulphide on motility patterns in the rat colon[J]. Br J Pharmacol, 2013,169(1):34-50.
- [19] Kasperek MS, Linden DR, Farrugia GA. Hydrogen sulfide modulates contractile function in rat jejunum[J]. J Surg Res, 2012,175(2):234-242.
- [20] Nagao M, Duenes JA, Sarr MG. Role of Hydrogen sulfide as a gasotransmitter in modulating contractile activity of circular muscle of rat jejunum[J]. J Gastrointest Surg, 2012,16(2):334-343.
- [21] 蒋楠. 半夏泻心汤对糖尿病大鼠 Cajal 间质细胞、肠神经系统及 CBS 的影响[D]. 合肥:安徽医科大学,2014.
- [22] Linden DR, Sha L, Mazzone A, et al. Production of the gaseous signal molecule Hydrogen sulfide in mouse tissues[J]. J Neurochem, 2008,106(4):1577-1585.
- [23] Martin GR, Mcknight GW, Dickey MS, et al. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract[J]. Digestive Liver Dis, 2010,42(2):103-109.
- [24] Hansen MB. The enteric nervous system II: Gastrointestinal functions[J]. Pharmacol Toxicol, 2003, 92(6):249-257.
- [25] Hennig B, Diener M. Actions of Hydrogen sulphide on ion transport across rat distal colon[J]. Br J Pharmacol, 2009,158(5):1263-1275.
- [26] Schicho R, Krueger D, Zeller F, et al. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the guinea-pig and human colon[J]. Gastroenterology, 2006, 131(5):1542-1552.
- [27] Lu W, Li J, Gong LP, et al. H₂S modulates duodenal motility in male rats via activating TRPV1 and KATP channels[J]. Br J Pharmacol, 2014,171(6):1534-1550.

(收稿日期:2015-12-10 修回日期:2016-02-09)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数,通常是未知的,一般用希腊字母表示,如 μ 、 σ 、 π 等。描述样本特征的数值为统计量,是已知的或可计算获得的,用英文字母表述,如 S 、 P 等。从总体中随机抽样可获得样本,以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。