

中药胃肠舒对糖尿病大鼠胃窦 平滑肌细胞线粒体的影响

宋晓冬^{*}, 张瑾锦, 刘文波, 王秀文
(滨州医学院实验中心, 山东 烟台 264003)

[摘要] 目的: 研究中药胃肠舒对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠胃窦平滑肌细胞线粒体形态、结构、功能和蛋白的影响, 探讨胃肠舒促胃肠运动的线粒体动能调控机制。方法: 选择体重 150-170g 的标准 SD 大鼠随机分为 4 组: 正常对照组、DM 组、DM+胃肠舒 组、DM+胃肠舒 组。透射电子显微镜检测线粒体形态、结构的变化, 流式细胞术检测线粒体跨膜电位的变化, 荧光测定法检测线粒体呼吸链的变化, Western Blot 检测线粒体蛋白的变化。结果: 胃肠舒能改善 DM 大鼠胃窦平滑肌细胞线粒体的形态、结构, 增强呼吸链功能, 线粒体跨膜电位和 ATP 含量增高, 细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase, COX)活性增强, 活化物氧自由基(ROS)释放减少, 凋亡蛋白家族 Bcl-2 表达上调, Bax 表达下调。结论: 胃肠舒促胃肠运动可能与改善平滑肌的线粒体动能系统有关。

[关键词] 中药胃肠舒; 胃肠运动; 线粒体; 跨膜电位; 呼吸链

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0118-05

Effect of Chinese Medicine Weichangshu on Mitochondrial in Diabetic Mellitus Rats Stomach Smooth Mude Cells

SONG Xiao-dong^{*}, ZHANG Jin-jin, LIU Wen-bo, WANG Xiu-wen

(Experiment Center of Binzhou Medical College, Shangdong Yantai 264003, China)

[Abstract] Objective: To study the mechanism of the chinese medicine Weichangshu on mitochondrial kinetic energy in diabetic mellitus rats stomach by measuring the changes of morphology, structure, function and protein of mitochondria. **Method:** Standard Sprague Dawley rats with a mean weight of 150-170g were randomly divided into 4 groups, including a control group, DM model group, DM + Weichangshu group, DM + Weichangshu group. The mitochondrial morphology and structure were detected using transmission electron microscopy. The changes of mitochondrial transmembrane potential, respiratory chain and mitochondrial protein were detected using flow cytometry, fluorescence labeling and Western Blot respectively. **Result:** Weichangshu could ameliorate the mitochondrial morphology, structure and respiratory chain in diabetic mellitus rats stomach. Mitochondrial transmembrane potential, ATP level and activity of cytochrome C oxidase were increased. The release of ROS was decreased. The expression of Bcl-2 up-regulated and bax down-regulated. **Conclusion:** Weichangshu could promoted the gastrointestinal motility, which might be related with the regulation of mitochondrial kinetic energy.

[Key words] chinese medicine Weichangshu; gastrointestinal motility; mitochondrial; transmembrane potential; respiratory chain

[收稿日期] 2009-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672680, 30873263), 烟台市科技攻关项目(2008162), 大学生科技创新计划(BY2007DKCX10)

[通讯作者] * 宋晓冬, Tel: (0535) 6913074, 15552225077; E-mail: songxd71@yahoo.com.cn

糖尿病是一种代谢失调性内分泌疾病,能引起胃肠动力障碍、高血压、眼病、肾病等多种并发症,其中胃肠动力障碍的发生率高达 25%~76%^[1~2]。胃肠动力障碍主要表现为胃肠张力和收缩力低下、蠕动减慢、排空延迟。从中医学观点看,胃肠运动与脾胃气机的升降有着直接的相关性,气机升降协调,是胃肠协调运动的前提条件,气机升降失调,是胃肠动力障碍性疾病的主要病机。从现代医学观点看,胃肠运动障碍多由胃肠运动功能失调,能量供应不足导致胃排空时间延长所致^[3~7]。

本课题组人员研制的中药胃肠舒,主要药味是大黄、枳壳、甘草。前期体外细胞培养实验证明胃肠舒能显著增高胃肠平滑肌细胞 ATP 的含量,明显加大胃肠平滑肌细胞的线粒体跨膜电位^[8~10]。本文选取 SD 大鼠构建 DM 大鼠模型,ig 不同浓度胃肠舒后检测对 DM 大鼠胃窦平滑肌细胞线粒体动能系统的影响,探讨胃肠舒促胃肠运动的机制,为开发中药新药提供科学的实验数据。

1 材料与方 法

1.1 材料 胃肠舒由滨州医学院附属医院制剂室提供(鲁药制字 Z 1620030009),每粒含生药 1.5 g。SD 大鼠(体重 150~170 g)由烟台绿叶实验动物中心提供。

1.2 DM 大鼠模型的建立、分组及干预 SD 大鼠 ip 链尿佐菌素 150 mg·kg⁻¹ 造模^[11~12],2 周后尾静脉采血测血糖,血糖 16.9 mmol/L 者为 DM 大鼠模型建立,不符合条件者予以剔除。所有实验大鼠分为正常对照组,DM 组,DM + 胃肠舒 组(75 mg·mL⁻¹,10 mL·kg⁻¹)、DM + 胃肠舒 组(150 mg·mL⁻¹,10 mL·kg⁻¹),每组 10 只,胃肠舒 ig 1 周后,禁食 24 h,处死各组大鼠,取距幽门近端约 2~3 cm 的胃窦组织。

1.3 透射电子显微镜观察线粒体形态结构 取胃窦肌层组织清洗后,3% 戊二醛固定 5 h, PBS 缓冲液清洗,1% 锇酸固定 1.5 h 后,酒精、丙酮梯度脱水, Epon812 包埋聚合,半薄切片定位,超薄切片 70 nm,双氧铀、柠檬酸铅双重染色,透射电镜(JEM1400, JAPAN)下观察线粒体形态结构并拍照。

1.4 线粒体跨膜电位的检测 取胃窦肌层组织 PBS 洗涤后剪碎,按照组织线粒体分离试剂盒(碧云天生物科技有限公司)要求分离线粒体后,加入适量线粒体储存液,重悬线粒体,加入终浓度为 1 μg·

mL⁻¹ 的 JC-1 荧光探针,放入 37 °C 孵箱里静置培养 45 min。PBS 清洗 2 次并重悬,流式细胞仪(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm, Beckman Coulter, Inc, America)检测。

1.5 ATP 定量 取胃窦肌层组织置于冰上, PBS 洗涤后剪碎,按照 ATP 试剂盒(碧云天生物科技有限公司)要求,加入 1 mL ATP 检测裂解液后用玻璃匀浆器裂解匀浆后,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,取适量上清放于 96 孔板后,按照 Celltiter-GloTM 试剂盒操作,酶标仪检测(波长 562 nm)。

1.6 细胞色素 C 氧化酶活性的测定 取胃窦肌层组织 PBS 洗涤后剪碎,按照组织线粒体分离试剂盒要求分离线粒体后,加入含有蛋白抑制剂的线粒体裂液裂解线粒体,用 BCA 法测定蛋白浓度。制作标准曲线,计算每个线粒体样品的蛋白浓度。线粒体细胞色素 C 氧化酶能将还原型的细胞色素 C 转化为氧化型细胞色素 C。根据这个原理,向含有还原型细胞色素 C 的反应体系中加入线粒体样品,加入样品后 0 s 与 60 s 分别用分光光度计比色测 OD 值,0 s 与 60 s 差值反应细胞色素 C 氧化酶的活性。根据前述测得的线粒体蛋白浓度将细胞色素 C 氧化酶活性的单位转化为 μmol·min⁻¹,mg·kg⁻¹ pro。

1.7 ROS 测定 取胃窦肌层组织制备单细胞悬液,按照 ROS 检测试剂盒(碧云天生物科技有限公司)要求,悬浮于稀释好的 DCFH-DA(10 μmol/L) 荧光探针中,流式细胞仪检测。

1.8 Western Blot 定量 BCL-2 和 BAX 蛋白表达 提取胃窦肌层组织 ACTIN、BCL-2、BAX 蛋白,波长 595nm 酶标仪上 Bradford 法检测蛋白浓度。8% 分离胶 8 mL,5% 积层胶 4 mL 灌注 SDS-PAGE 凝胶,用微量进样器每孔分别加 Marker、蛋白样品 ACTIN 和 BCL-2、BAX 各 30 μL(约 50 μg),积层胶电压 80 V,分离胶电压 160 V,待溴酚蓝到达底部,关闭电源,把胶移入缓冲液中平衡 10 min。转膜后放入 5% 脱脂奶粉、0.03% 叠氮钠的 TBS 中平衡 1 h。分别加羊抗鼠 actin 单克隆抗体(1 500, Santa Cruz 公司)和兔抗鼠 bcl-2、bax 多克隆抗体(1 50, 购自 Santa Cruz 公司),摇床上作用 8 h。TBST 漂洗 3 次,每次 5 min。分别加二抗 HRP 标记的兔抗羊 IgG(1 1000, 博士德公司)和 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1 1000, 博士德公司),摇床上作用 2 h。ECL 荧光显影液加膜上 1 min,终止反应,暗室内显影,定影。

1.9 统计方法 实验数据均采用均数 ± 标准差表示,应用 SPSS 11.5 for windows 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 线粒体形态结构的变化 透射电子显微镜下观察到正常对照组胃窦平滑肌细胞膜结构完整,胞核呈不规则梭形,线粒体数目繁多,线粒体膜完整,线粒体脊曲折清晰可见,细胞质中尚可见到排列整齐的肌丝、密体等超微结构。DM 组胃窦平滑肌细胞膜模糊,肌丝排列紊乱,密体减少,线粒体空泡样变严重,线粒体膜断裂,线粒体脊分辨不清。DM + 胃肠舒 组胃窦平滑肌细胞线粒体空泡样变减少,

能够清晰分辨线粒体脊。DM + 胃肠舒 组胃窦平滑肌细胞线粒体数目明显增多,线粒体膜较完整。

2.2 线粒体跨膜电位的变化 线粒体跨膜电位的存在是线粒体生成 ATP 的基础条件,跨膜电位的崩溃会导致能量生成障碍,细胞内还原性物质耗尽,线粒体肿胀破裂。流式细胞仪荧光分析图结果显示正常对照组阳性细胞率为 98.46%,DM 组阳性细胞率为 10.10%,胃肠舒干预 组和 组分别为 31.71% 和 54.66%。阳性细胞的减少预示着线粒体跨膜电位的降低,从结果分析 DM 组线粒体跨膜电位明显降低,胃肠舒干预组与 DM 对照组相比跨膜电位明显增加 ($P < 0.05$)。

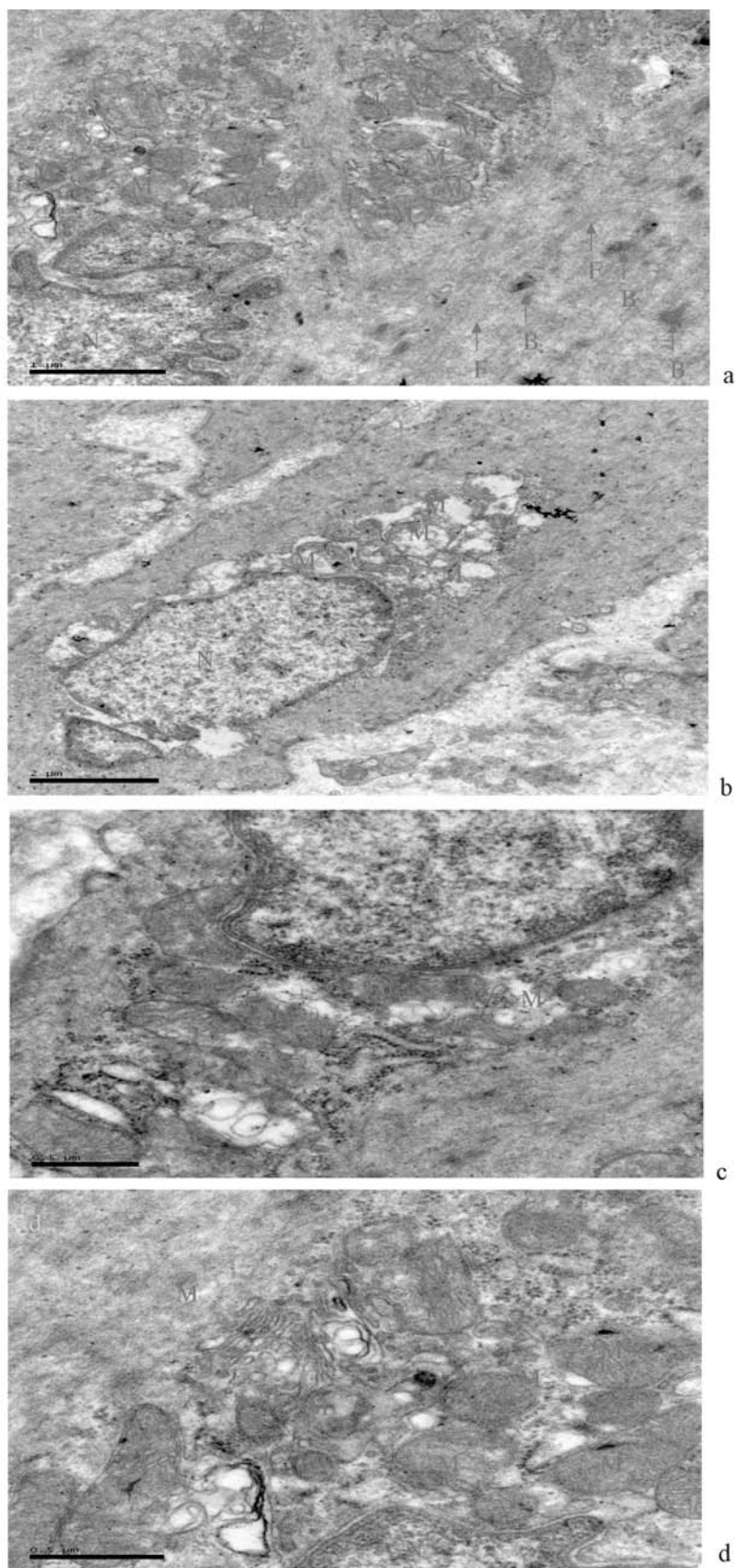


图 1 透射电子显微镜下观察线粒体形态结构

a. 正常对照组; b. DM 组; c. DM + 胃肠舒 组; d. DM + 胃肠舒 组

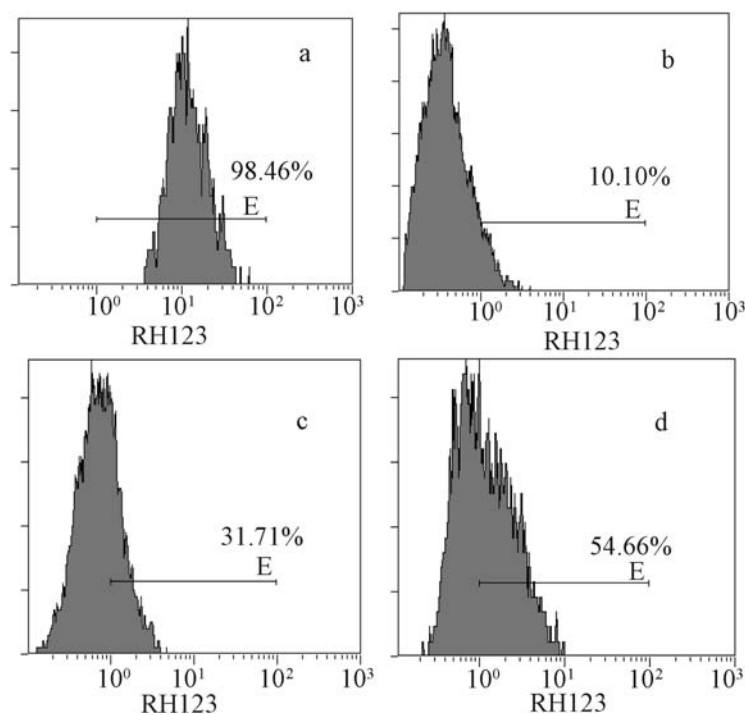


图 2 线粒体跨膜电位的变化

a. 正常对照组; b. DM 组; c. DM + 胃肠舒 组; d. DM + 胃肠舒 组

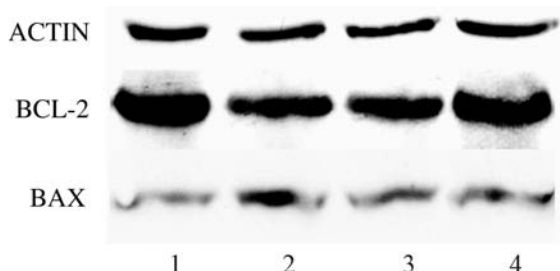
2.3 线粒体呼吸链的变化 线粒体呼吸链是将底物的电子经过一系列酶系的传递最后生成 ATP 供给细胞生命活动能量的过程。COX 是线粒体内呼吸链电子传递的终末复合物,是线粒体氧化能力的关键调节物质,在电子传递过程中一旦有电子漏出会产生 ROS。本文检测结果显示 DM 组大鼠线粒体呼吸链中 ATP 含量和 COX 活性降低,ROS 释放增多,表明该组大鼠呼吸链功能明显减弱。胃肠舒干预组 ATP 含量和 COX 活性有所上升,ROS 释放减少,表明胃肠舒改善了 DM 大鼠线粒体呼吸链功能。

2.4 线粒体蛋白的变化 Western Blot 结果显示 DM 组大鼠与正常对照组相比 Bcl-2 蛋白表达下调, Bax 蛋白上调。胃肠舒干预组与 DM 组相比 Bcl-2 蛋白表达上调, Bax 蛋白表达下调。Image 软件测量各条带的灰度,结果具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 线粒体呼吸链的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$	ATP 含量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	COX 活性 / $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ng}^{-1}$	DCFHDA 荧光 强度(ROS)
正常对照	—	10.87 \pm 0.16	3.98 \pm 0.11	5.64 \pm 0.21
DM 模型	—	3.71 \pm 0.12	1.07 \pm 0.31	21.19 \pm 0.30
DM+胃肠舒	750	6.81 \pm 0.17 ¹⁾	2.57 \pm 0.23 ¹⁾	12.69 \pm 0.38 ¹⁾
DM+胃肠舒	1500	9.78 \pm 0.14 ¹⁾	2.97 \pm 0.14 ¹⁾	7.61 \pm 0.22 ¹⁾

注与DM模型组比¹⁾ $P < 0.05$ (下同)



1. 正常对照组, 2. DM 组, 3. DM + 胃肠舒 组, 4. DM + 胃肠舒 组

图 3 BCL-2 和 BAX 蛋白的变化

表 2 BCL-2, BAX 蛋白和 ACTIN 蛋白条带的灰度比值
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

灰度比值	Control	DM	DM+胃肠舒 组	DM+胃肠舒 组
BCL-2/ACTIN	3.25 \pm 0.01	1.27 \pm 0.02	2.11 \pm 0.02 ¹⁾	3.02 \pm 0.01 ¹⁾
BAX/ACTIN	0.04 \pm 0.02	0.90 \pm 0.01	0.49 \pm 0.02 ¹⁾	0.27 \pm 0.01 ¹⁾

3 讨论

诸多研究表明细胞水平能量代谢障碍早于机体器官系统的病理生理改变,是多器官多系统紊乱的根本原因。线粒体作为细胞内氧化磷酸化和形成能量 ATP 的主要场所,是细胞内的能量转换器,因此改善线粒体能量代谢是促进机体器官系统运动的关键。本文电子透射显微镜观察到正常对照组胃窦平滑肌细胞膜结构完整,胞核梭形,线粒体膜清晰可见,数量丰富,线粒体脊曲折完整、数目较多。DM 组胃窦平滑肌细胞排列紊乱,细胞内有很多大的空泡,线粒体肿胀破裂,内有空泡样变,线粒体膜不完整,线粒体脊模糊。而不同剂量胃肠舒的干预都能改善线粒体的形态结构,使得线粒体数目增加,结构完整。线粒体的这种变化提示 DM 组大鼠平滑肌细胞线粒体形态结构的变化,可能最终导致了细胞能量代谢紊乱,从而造成胃肠运动障碍,改善线粒体形态结构能够提升细胞能量代谢的能力,促进胃肠运动。

线粒体内外膜完整性的破坏,必然引起跨膜电位的降低,跨膜电位的降低会进一步引起线粒体膜内外一系列的生化改变,如细胞色素氧化酶活性减弱、呼吸链与氧化磷酸化失耦联、ROS 渗漏、凋亡因

子释放、ATP 合成停止等^[13-15]。细胞色素氧化酶是电子传递链的重要环节,传递电子复合物,是线粒体的标志酶,也是线粒体氧化呼吸的限速酶,在细胞的有氧代谢和氧化磷酸化耦联中起关键作用,其结构和活性的改变可影响电子传递链的功能,导致 ATP 能量生成障碍。当线粒体损伤、细胞色素氧化酶活性降低时 ATP 能量代谢发生障碍;而当线粒体修复,细胞色素氧化酶活性恢复后,ATP 能量代谢恢复正常。ATP 是机体生命活动的源泉,细胞的物质代谢、信号转导、电活动、肌肉收缩等生理过程均需要 ATP 提供直接的能量来源,ATP 产生不足势必影响细胞的机能与代谢障碍和结构损伤,从而影响器官功能和整个机体的生命活动能力。本文流式细胞仪检测到 DM 组线粒体跨膜电位显著降低,细胞色素氧化酶活性减弱,ATP 含量减少;胃肠舒干预组能提高线粒体跨膜电位,防止 ROS 的渗漏,细胞色素氧化酶活性增强,促进 ATP 的合成。

线粒体形态、结构和功能的变化最终会导致蛋白表达的改变,诸多学者研究表明^[16-18],糖尿病患者血液中葡萄糖浓度很高,会伴随着凋亡基因蛋白的变化。Bcl-2 是一类在线粒体水平上决定细胞存活或死亡的蛋白质家族,包括抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 等,在正常细胞中,这些成员呈现功能适应性的细胞内分布,抗凋亡成员主要定位于线粒体膜内外侧,另外在核膜、内质网上也有存在,Bax 主要位于细胞浆中,但当凋亡发生时,它从胞浆移到线粒体并与线粒体膜相结合,这两类蛋白的比例决定了细胞在受到凋亡信号刺激时是否发生凋亡。本研究结果显示 DM 组大鼠与正常对照组相比 Bcl-2 蛋白表达下调,Bax 蛋白上调。胃肠舒干预组与 DM 组相比 Bcl-2 蛋白表达上调,Bax 蛋白表达下调。

本实验初步阐释了胃肠舒促胃肠运动可能与其改善线粒体的动能系统有关,本实验对于用现代医学观点阐释中药促进胃肠运动的作用机制提供了科学的实验数据,为开发胃肠动力中药新药开辟了思路。

[参考文献]

[1] Feldman M, Schiller LR. Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus[J]. Ann Intern Med, 1983, 98: 378.
[2] Icks A, Haastert B, Rathmann W, et al. Prevalence of gastrointestinal symptoms in patients with type 2

- diabetes: a population-based study [J]. Arch Intern Med, 2002, 162: 1067.
- [3] Choi S, Park CG, Kim MY, *et al.* Action of imipramine on activated ATP-sensitive K(+) channels in interstitial cells of Cajal from murine small intestine[J]. Life Sci, 2006, 78(20) : 2322.
- [4] Nakayama S, Ohya S, Liu HN, *et al.* Sulphonylurea receptors differently modulate ICC pacemaker Ca²⁺ activity and smooth muscle contractility[J]. J Cell Sci, 2005, 118(18) : 4163.
- [5] Jin X, Malykhina AP, *et al.* Altered gene expression and increased bursting activity of colonic smooth muscle ATP-sensitive K + channels in experimental colitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 287(1) : C274.
- [6] Monro RL, Bertrand PP, Bomstein JC. ATP and 5-HT are the principal neurotransmitters in the descending excitatory reflex pathway of the guinea-pig ileum[J]. Neurogastroenterol Motil, 2002, 14(3) : 255.
- [7] Heinemann A, Shahbazian A, BarthóL, *et al.* Different receptors mediating the inhibitory action of exogenous ATP and endogenously released purines on guinea-pig intestinal peristalsis[J]. Br J Pharmacol, 1999, 128(2) : 313.
- [8] 宋晓冬, 刘孟安, 孙丰润, 等. 中药胃肠舒对胃肠平滑肌细胞 ATP 生成的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(30) : 3159.
- [9] 刘孟安, 赵岩, 张树平. 胃肠舒的药理与毒理实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10) : 2460.
- [10] 刘孟安, 姜学连, 孙丰润, 等. 胃肠舒治疗痞满证的临床研究[J]. 中国中医急症, 2006, 15(8) : 843.
- [11] Kitayama J, Faraci FM, Gunnnett CA, *et al.* Impairment of dilator responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus: role of inducible NO synthase [J]. Stroke, 2006, 37: 2129.
- [12] Yu X, Tesiram YA, Towner RA, *et al.* Early myocardial dysfunction in streptozotocin induced diabetic mice: a study using in vivo magnetic resonance imaging [J]. Cardiovasc Diabetol, 2007, 6: 6.
- [13] Chiche J, Rouleau M, Gounon P, *et al.* Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli[J]. J Cell Physiol, 2010, 222(3) : 648.
- [14] Hirst J. Towards the molecular mechanism of respiratory complex I[R]. Biochem J, 2009, 425(2) : 327.
- [15] Vaidya B, Mishra N, Dube D, *et al.* Targeted nucleic acid delivery to mitochondria [R]. Curr Gene Ther, 2009, 9(6) : 475.
- [16] Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, *et al.* Myocardial cell death on human diabetes[J]. Circ Res, 2000, 87: 1123.
- [17] Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG. Expression of apoptosis is regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys[J]. J Invest Med, 1997, 45: 50.
- [18] Moore P, EI-sherbeny A, Roon P, *et al.* Apoptosis cell death in the mouse retinal ganglion cell layer is induced in vivo by the excitatory amino acid homocysteine[J]. Exp Eye Res, 2001, 73: 45.

《中国实验方剂学杂志》入编中文核心期刊信息

依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《中国实验方剂学杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版(即第五版) 之中国医学类的核心期刊。该核心期刊按《中国图书馆分类法》的学科体系, 列出了 73 个学科的核心期刊表, 并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括: 题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN 号、CN 号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。该研究成果只是一种参考工具书, 主要是为图书情报部门对中文期刊的评估与订购、为读者导读提供参考。