

ATP酶在细菌潜生体相关的IBS大鼠模型肠黏膜中的变化

裴轶劲, 黄梅, 郭林明, 吴小兰, 刘俊康

裴轶劲, 黄梅, 郭林明, 吴小兰, 刘俊康, 中国人民解放军第三军医大学医学检验系与药学院生物波研究室 重庆市400038

重庆市科委自然科学基金计划基金资助项目, No. CSTC 2006BB5068

作者贡献分布: 此课题由裴轶劲与刘俊康设计; 研究过程由裴轶劲, 黄梅, 郭林明及吴小兰操作完成; 研究获取研究经费, 所用新试剂及分析工具由刘俊康提供; 数据分析和论文写作由裴轶劲完成。

通讯作者: 刘俊康, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学医学检验系与药学院生物波研究室. liujunkang@163.com
电话: 023-68752190 传真: 023-68752191

收稿日期: 2009-01-05 修回日期: 2009-02-13

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-18

Changes of intestinal mucosa ATPase in the bacterial cryptic growth cell-related IBS rat model

Yi-Jin Pei, Mei Huang, Lin-Ming Guo, Xiao-Lan Wu, Jun-Kang Liu

Yi-Jin Pei, Mei Huang, Lin-Ming Guo, Xiao-Lan Wu, Jun-Kang Liu, Bio-Wave Research Center, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Supported by: the Natural Science Planning Foundation of Chongqing Science and Technology Committee, No. CST-C2006BB5068

Correspondence to: Jun-Kang Liu, Bio-Wave research center, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China. liujunkang@163.com

Received: 2009-01-05 Revised: 2009-02-13

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-18

Abstract

AIM: To study the ATPase changes of intestinal mucosa of the bacterial cryptic growth cell (CGC)-related irritable bowel syndrome (IBS) rat model.

METHODS: Wistar rats were divided into normal control group and the bacterial CGC-related IBS rat model group. The ATPase activity in rat ileocecal mucosa was tested by inorganic phosphorus detection method, the energy charge (Ec) of adenosine triphosphate and the ratio of ATP to the total amount of adenylate acid pool in ileocecal mucosa cells were detected by high performance liquid chromatography method, and the

respiratory enzyme activity was tested by MTT assay method.

RESULTS: Compared with normal control group, in IBS rat model group intestinal mucosa $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (22.44 ± 5.54 vs 14.20 ± 3.03 , $P < 0.01$), and $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ (16.46 ± 1.86 vs 10.63 ± 1.78 , $P < 0.01$) were significantly decreased, and ATP content was also significantly lower (0.96 ± 0.18 vs 0.48 ± 0.20 , $P < 0.01$), accompanied by the respiratory enzyme activity changes (0.50 ± 0.07 vs 0.21 ± 0.05 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: Lower ATPase activity in IBS rat ileocecal mucosa is relevant to lower energy metabolism, which may cause damage to mucosal barrier function. The results have significance on the IBS pathogenesis and treatment.

Key Words: $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$; $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$; Irritable bowel syndrome; Ileoceca; Mucosa

Pei YJ, Huang M, Guo LM, Wu XL, Liu JK. Changes of intestinal mucosa ATPase in the bacterial cryptic growth cell-related IBS rat model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 817-820

摘要

目的: 研究细菌潜生体相关的肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 大鼠模型肠黏膜ATP酶的变化。

方法: Wistar大鼠分为正常对照组和细菌潜生体相关的IBS大鼠模型组。采用无机磷法检测大鼠回盲部黏膜ATP酶活性, 高效液相色谱法检测回盲部黏膜细胞的腺苷酸能荷及ATP与总腺苷酸库比值, MTT法检测回盲部黏膜呼吸酶活性。

结果: 与正常对照组相比较, IBS大鼠模型组回盲部肠黏膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP酶}$ (22.44 ± 5.54 vs 14.20 ± 3.03 , $P < 0.01$), $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP酶}$ 均显著下降 (16.46 ± 1.86 vs 10.63 ± 1.78 , $P < 0.01$), ATP显著降低 (0.96 ± 0.18 vs 0.48 ± 0.20 , $P < 0.01$), 同时呼吸酶活性显著变化 (0.50 ± 0.07 vs 0.21 ± 0.05 , $P < 0.01$)。

■背景资料

国际上对IBS的研究除继续关注5-HT受体相关的作用机制外, 出现了一部分肠黏膜屏障功能改变的研究。本文针对屏障中最为重要的细胞功能改变进行了探讨。

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理学室

■研发前沿

肠黏膜屏障研究多是探讨外来因素,如肠道细菌毒素或肥大细胞等释放的过敏介质作用下屏障改变;甚少直接研究IBS中构成肠黏膜屏障之间的上皮细胞的改变,成为该领域亟待解决的问题。

结论: IBS大鼠回盲部黏膜ATP酶活性显著降低,与能量代谢降低相关,这可能是引起肠黏膜屏障功能受损的重要原因,与IBS病因相关。

关键词: $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$; $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$; 肠易激综合征; 回盲部; 黏膜

裴轶劲, 黄梅, 郭林明, 吴小兰, 刘俊康. ATP酶在细菌潜生体相关的IBS大鼠模型肠黏膜中的变化. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 817-820

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/817.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种在人群中发生率较高^[1],严重影响人们生活质量的持续存在或间歇发作的肠道功能性疾病,但其病因复杂和发病机制尚不完全清楚,造成其防治治疗的困境^[2]. ATP酶存在于组织细胞及细胞器膜上,是生物膜上的重要蛋白酶,在物质运送、能量转换及信息传递等方面均有重要作用,已有研究证实在某些病理条件下^[3]及机体缺氧时^[4],ATP酶会发生一系列的改变,已成为早期生理功能衰退的敏感指标.但是,迄今为止,甚少IBS动物模型肠黏膜ATP酶活性的相关报道.细菌潜生体(cryptic growth cell, CGC)相关的IBS动物模型是最近新建立的一种较为理想的IBS动物模型,已初步证实代谢缓慢,菌体延长,侵袭能力强的CGC与IBS发病相关^[5].刘俊康 *et al*^[6]在前期工作中研究证实该模型的回盲部三个肠段的细胞线粒体能荷值以及ATP与总腺苷酸库比值均有明显变化.本文以该模型为研究对象,进一步研究了CGC易定植的整个回盲部肠黏膜ATP酶活性及能量代谢水平,以期阐明这些指标与IBS发病机制的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar大鼠,雌雄各半,体质量 200 ± 20 g,购自中国人民解放军第三军医大学动物研究所.全价颗粒饲料饲养,自由饮水,12 h 1次明暗周期交替,室温 24°C ,相对湿度45%-60%.ATP酶测试试剂盒:南京建成生物工程研究所产品;头孢呋辛钠,葛兰素史克集团生产;辣椒,市售;MTT试剂, Sigma公司产品; KM_2O_4 , K_2CO_3 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , HClO_4 等均为分析纯;其余试剂染液固定剂,市售,常规配制.光学显微镜, XS2-4G, 重庆光学仪器厂;高速离心机, TGL-16G, 上海医用分析仪器厂;高效液相色谱仪, 1100Agilent, 美国安捷伦公司;酶标

仪, BioRad550, 美国BioRad公司;紫外分光光度计, Du800, 美国Beckman Culter公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌CGC相关的IBS模型建立: 参照文献[5],略有修改. Wistar大鼠经适应性饲养后,随机取20只Wistar大鼠,常规饲养,作为正常对照组.另取60只Wistar大鼠, ip头孢呋辛钠2 g/L, 每2 d 1次0.2 mL, 连续3次, 然后再注射5 g/L头孢呋辛钠, 每次1 mL, 同时检测粪便细菌CGC情况^[7], 将粪便标本连续3次检测到细菌CGC的大鼠挑选出来进行辣椒液刺激实验. 7 d后给辣椒水(100 g干辣椒加水1000 mL煮至500 mL)刺激, 连续3 d灌胃总量为小鼠体质量的1/8, 此时粪便含水量经检测显著增高^[8]的大鼠即为实验需要的IBS模型大鼠. 从中随机选取20只进行下一步检测。

1.2.2 大鼠腺苷酸能荷及ATP与总腺苷酸库比值的测定: 分别取正常对照和IBS模型大鼠各10只, 断颈处死, 立即剪取回盲部, 于冰冷的生理盐水中洗净, 取黏膜层, 立即加入9倍 0°C 的分离介质(0.25 mol/L蔗糖, 10 mol/L的Tris-HCl, 0.5 mol/L的EDTA)匀浆, 然后在1250 g离心8 min, 取上层液体, 5000 g离心10 min, 取沉淀; 再加入适量分离介质, 混匀后5000 g离心10 min, 弃上清液, 如此清洗数次后得到较纯的线粒体, 另取1 mL分离介质加入, 振匀, 得线粒体悬液. 从中取0.2 mL加入到0.4 mL 1.6 mol/L的 HClO_4 中, 0°C 静置5 min后, 12500 g离心15 min, 取上清液, 加入适量的2.5 mol/L的 K_2CO_3 溶液至液体呈中性(pH6.5). 然后 0°C 静置10 min, 再次12500 g离心15 min, 取上清液, 用于高效液相色谱仪检测, 色谱条件: 检测波长254 nm, 碳十八色谱柱, 流动相为pH6.0磷酸缓冲液, 流速1 mL/min, 柱温 37°C , 进样量10 μL ^[9]。

1.2.3 大鼠肠黏膜 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 活性测定: 取正常对照和IBS模型大鼠各10只, 断颈处死, 立即取回盲部, 生理盐水中洗净, 取黏膜层, 按重量体积比加9倍生理盐水匀浆, 离心后取上清液用于检测 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 活性。

按试剂盒说明书操作进行, 无机磷法测定 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 活性, 以每小时每毫克组织蛋白的组织中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 分解ATP产生1 $\mu\text{mol/L}$ 无机磷的量为一个ATP酶活力单位即 $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg prot}\cdot\text{h})$, 考马斯亮蓝法测定组织蛋白含量。

1.2.4 MTT法检测大鼠肠黏膜活性水平: 大鼠颈椎脱臼处死, 无菌解剖, 取各组大鼠回盲部, 生

■创新盘点

本文研究结果表明在IBS模型大鼠肠回盲部, 其黏膜上皮细胞的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$ 和 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 的活性均降低, 这有助于说明IBS中肠黏膜屏障功能改变的细胞学功能基础。

表 1 大鼠回盲部黏膜线粒体能量产生情况 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	ATP	ADP	AMP	能荷(EC%)	ATP与总腺苷酸库比值(%)
正常对照组	0.96 \pm 0.18	1.50 \pm 0.42	0.83 \pm 0.16	52.2 \pm 0.02	29.6 \pm 0.03
IBS模型鼠	0.48 \pm 0.20 ^b	1.41 \pm 0.60	0.74 \pm 0.30	43.8 \pm 0.04 ^b	17.5 \pm 0.02 ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常对照大鼠.

理盐水中洗净内容物和表层黏液后, 分别用金属钝器刮取黏膜层, 用含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640调整细胞浓度为 2×10^9 /L, 按100 μ L加入96孔培养板中, 于50 mL/L CO₂, 37℃培养箱中培养24 h. 用MTT法检测细胞活性, 用Bio-Rad550型酶标仪于570 nm处测吸光度A值, 结果以A₅₇₀值表示.

统计学处理 所有计量资料用mean \pm SD表示, 使用SPSS13.0统计软件进行 t 检验及方差分析结果.

2 结果

2.1 大鼠回盲部黏膜线粒体能量产生情况 根据公式: 能荷EC = (1/2ADP+ATP)/(AMP+ADP+ATP), ATP与总腺苷酸库比值 = ATP/(AMP+ADP+ATP), 计算大鼠回盲部黏膜线粒体能荷和ATP与总腺苷酸库比值. 与对照相比, IBS模型大鼠能荷值, ATP与总腺苷酸库比值, ATP均显著下降($P < 0.01$, 表1).

2.2 大鼠回盲部黏膜ATP酶的变化 与对照相比, IBS模型大鼠回盲部黏膜Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase均显著下降($P < 0.01$, 表2).

2.3 大鼠回盲部黏膜细胞的呼吸酶活性 MTT检测结果显示, 正常对照组A₅₇₀值与IBS模型组相比较有显著差异(0.50 \pm 0.07 vs 0.21 \pm 0.05, $P < 0.01$).

3 讨论

本研究首次发现, 细菌CGC相关的IBS模型回盲部黏膜的Na⁺-K⁺-ATPase和Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase均有显著降低, 意味着IBS大鼠回盲部黏膜ATP酶活性受到影响, 同时肠黏膜上皮细胞呼吸酶活性低下和作为机体能量的ATP也有显著下降, 这些现象是相关的. ATP酶进行逆化学梯度离子转运, 是一种主动耗能过程, 需要水解ATP释放能量, 而IBS模型大鼠ATP下降, 能量供给匮乏, 会影响到ATP酶功能, ATP酶活性下降, 导致过多离子如Ca²⁺积聚在线粒体, 干扰线粒体氧化磷酸化, 线

表 2 大鼠回盲部黏膜ATP酶变化 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATPase
正常对照组	22.44 \pm 5.54	16.46 \pm 1.86
IBS模型鼠	14.20 \pm 3.03 ^b	10.63 \pm 1.78 ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常对照大鼠.

粒体不能正常发挥功能, 影响ATP生成, 使能量生成更趋减少, 会导致ATP酶活性进一步下降. 在IBS模型大鼠中发现ATP酶活性下降具有重要的生理意义, 对阐明IBS发生及防治有积极意义的, 我们认为早期使用对ATP酶活性有上调作用的药物, 对于及时早期治疗有帮助.

自IBS被发现以来, 对他的认识经历了许多变迁. IBS作为一种功能性疾病, 所有的症状与特定的结构, 内视镜或组织学上的异常没有相关性^[2]. 然而, 近来陆续有报道证实如PD-IBS肠通透性改变, 肠黏膜屏障功能缺损^[10]. IBS模型大鼠肠黏膜上皮细胞呼吸酶活性低下和ATP含量降低, 提示肠黏膜上皮细胞受到影响正是肠黏膜屏障功能缺损的决定因素. 我们分析原因在于, 细胞ATP酶活性显著下降, 细胞内外离子浓度梯度受到影响, 会造成离子流紊乱, 胞质内如Ca²⁺离子积累, 能量代谢水平降低, 进一步引起亚细胞结构的改变, ATP酶改变可能是肠黏膜屏障功能受损的重要原因, 提示为引发IBS症状的原因.

愈来愈多的证据显示微生物与IBS密切相关, 如IBS患者小肠细菌过度生长^[11-12], 肠道菌群失调^[13-14]等, 细菌感染后部分患者易形成IBS症状^[15-16]等. 在我们所用的IBS模型大鼠粪便中可持续检出有CGC, 而且回盲部有CGC的定植^[5]等, 也进一步的证实微生物与IBS密切相关. ATP酶是镶嵌在脂质双分子层的特殊蛋白, 亚基暴露在细胞膜表面, 易受种种影响, 在我们所用的IBS模型大鼠CGC的定植和自溶导致内毒素产生^[5], 推测细菌内毒素的产生与该部位的ATP酶

■应用要点

本研究有助于围绕这两个酶作为靶位的药物开发及其治疗作用机制阐明, 也有助于阐明IBS发病的机制.

■同行评价

本文工作基础好,方法较先进,有较好的科学意义。

活性下降有关联,相关的实验正在进行中。

4 参考文献

- 1 Thompson WG, Heaton KW, Smyth GT, Smyth C. Irritable bowel syndrome in general practice: prevalence, characteristics, and referral. *Gut* 2000; 46: 78-82
- 2 Camilleri M. Treating irritable bowel syndrome: overview, perspective and future therapies. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 1237-1248
- 3 张顺斌. 原发性高血压肾病患者红细胞ATP酶活性检测的临床意义. *淮海医药* 2008; 26: 477-478
- 4 李王平, 楚东岭, 金发光. 山莨菪碱对兔海水淹溺型肺水肿组织钠-钾-ATP酶活性的影响. *中国急救医学* 2008; 28: 718-721
- 5 刘俊康, 陈杰, 吴小兰, 徐启旺. 细菌潜生体相关的IBS动物模型建立实验研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2007; 16: 243-246
- 6 刘俊康, 廖玉芳, 胡峻晨, 吴小兰, 徐启旺. 肠道细菌CGC定植及其对局部细胞活性的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1198-1201
- 7 丛延广, 刘俊康, 袁泽涛, 徐启旺. 潜生体定植的原位观察技术研究. *中国微生态杂志* 2000; 12: 70-72
- 8 Barone FC, Deegan JF, Price WJ, Fowler PJ, Fondacaro JD, Ormsbee HS 3rd. Cold-restraint stress increases rat fecal pellet output and colonic transit. *Am J Physiol* 1990; 258: G329-G337
- 9 Shofer SL, Tjeerdema RS. Effects of hypoxia and toxicant exposure on adenylate energy charge and cytosolic ADP concentrations in abalone. *Comp*

Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 1998; 119: 51-57

- 10 Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000; 47: 804-811
- 11 Lin HC. Small intestinal bacterial overgrowth: a framework for understanding irritable bowel syndrome. *JAMA* 2004; 292: 852-858
- 12 Schiller LR. Evaluation of small bowel bacterial overgrowth. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 373-377
- 13 Madden JA, Hunter JO. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 1: S67-S72
- 14 Gasbarrini A, Lauritano EC, Garcovich M, Sparano L, Gasbarrini G. New insights into the pathophysiology of IBS: intestinal microflora, gas production and gut motility. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12 Suppl 1: 111-117
- 15 Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ* 1997; 314: 779-782
- 16 Smith JL, Bayles D. Postinfectious irritable bowel syndrome: a long-term consequence of bacterial gastroenteritis. *J Food Prot* 2007; 70: 1762-1769

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

全国消化疾病诊治进展学习班在京举办

本刊讯 由《中华内科杂志》主办的“全国消化疾病诊治进展学习班”拟定于2009-08-08/10在北京举办. 主要内容涉及: 肠易激综合征、功能性消化不良、缺血性肠病、炎症性肠病、胃食管反流病、不明原因消化道出血、慢性胰腺炎、食管胃底静脉曲张、经鼻胃镜的临床应用、食管源性胸痛及胃食管反流病与内脏高敏感、肝脏疾病的肠屏障功能改变. 授课教师: 林三仁、刘新光、柯美云、钱家鸣、张澍田、周丽雅、杨云生、谢鹏雁、刘玉兰、丁士刚、吕愈敏等国内消化领域著名专家. 学习期满授予学员国家级 I 类继续教育学分6分[项目编号: 2009-03-03-085(国)]. 可来电、来函或电子邮件索取正式通知(请注明消化学习班). 注册费900元, 资料费100元, 食宿统一办理, 费用自理.

欢迎全国广大消化科及内科医师参加.

联系方式: 沈志伟, 100710, 北京东四西大街42号中华医学会《中华内科杂志》编辑部, shenzhw@163.com. 电话: 010-85158275, 85158280; 传真: 010-85158275.