

· 论 著 ·

生长激素释放肽 ghrelin 对小鼠结肠动力的影响

邱文才 王维刚 闫钧 王志刚 郑起

【摘要】 目的 探讨生长激素促分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)内源性激动剂生长激素释放肽 ghrelin 对小鼠结肠动力的影响。**方法** 小鼠按随机数字法分组后,分别注射生理盐水和不同剂量 ghrelin(20, 50, 100, 200 ng/g),用炭末推进实验的方法观察 ghrelin 对小鼠结肠推进的影响,研究阿托品、NG-硝基精氨酸甲酯和 D-Lys³-GHRP-6(GHSR 阻断剂)对 ghrelin(100 ng/g)引起的小鼠结肠推进改变的影响。将小鼠近端结肠环形平滑肌条安置在恒温灌流肌槽中并用 SMUP-E 生物信号处理系统记录肌条的自发收缩活动,观察不同浓度的 ghrelin(0.01、0.1、1 和 10 μmol/L)对肌条自发收缩幅度的影响。**结果** ghrelin 能显著提高小鼠的结肠推进速度,有明显的量效关系。阿托品、NG-硝基精氨酸甲酯、D-lys³-GHRP-6 均能显著抑制 ghrelin 促进结肠推进的作用($t = 10.230, 12.560, 11.590, P < 0.05$)。ghrelin 能显著增加小鼠近端结肠环形平滑肌的自发收缩幅度,河豚毒素预处理肌条后 ghrelin 不能显著增加肌条的自发收缩幅度。**结论** ghrelin 可以显著增加小鼠结肠的推进,可能是通过结肠肌间神经丛的硝基能神经和胆碱能神经上的 GHSR 而起作用。

【关键词】 ghrelin; 生长激素促分泌素受体; 结肠动力

【中图分类号】 R333.2 **【文献标识码】** A

Effects of ghrelin on colonic motility in mice QIU Wen-cai, WANG Wei-gang, YAN Jun, WANG Zhi-gang, ZHENG Qi. Department of General Surgery, Sixth Affiliated Hospital, Medical School of Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Corresponding author: ZHENG Qi, E-mail: sh6_zhengqi@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ghrelin on colonic motility in mice. **Methods** The effects of ghrelin on colonic propulsive movement were detected by charcoal suspension pushing test after injection of normal saline and different doses of ghrelin (20, 50, 100, 200 ng/g). The effects of atropine, NG-nitro-L-arginine methylester hydrochloride (L-NAME) or D-Lys³-GHRP-6 on the changes of colonic propulsive movement caused by ghrelin(100 ng/g) were also investigated. *In vitro*, the effects of different doses of ghrelin (0.01, 0.1, 1, 10 μmol/L) on the spontaneous contraction amplitude of proximal colonic circular muscle strips were studied. **Results** Ghrelin significantly accelerated the colonic propulsive movement in dose-dependent manner, but the effect was significantly inhibited in the presence of atropine, L-NAME or D-Lys³-GHRP-6 ($t = 10.230, 12.560, 11.590, P < 0.05$). Administration of ghrelin significantly increased the contraction amplitude of colonic circular muscle strips, but this effect was inhibited when the colonic circular muscle strips were pretreated by tetrodotoxin. **Conclusions** Ghrelin can accelerate colonic propulsive movement by activating growth hormone secretagogue receptor of cholinergic excitatory pathways and nitrenergic nervous pathways in the enteric nervous system of colon.

【Key words】 Ghrelin; Growth hormone secretagogue receptor; Colonic propulsive movement

生长激素释放肽 ghrelin 是 1999 年 Kojima 等发现的第一个生长激素促分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的内源性配体。ghrelin 与 GHSR 结合后除了可以促进生长激素的释放外,还具有调节胃肠运动、心血管功能、能量代谢平衡、肿瘤细胞的增生和免疫系统功能等多种作用。我们

研究给予小鼠不同剂量 ghrelin 后结肠推进的变化,并观察不同浓度 ghrelin 对小鼠近端结肠离体环形平滑肌条自发收缩活动的影响,从而探讨 ghrelin 对小鼠结肠动力的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

实验用 C57 小鼠,雌雄不限,体质量(25 ± 5)g,购自上海中国科学院实验动物中心。ghrelin、硝基能神经阻断剂 NG-硝基精氨酸甲酯(Ng-nitro-L-argi-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400429)

作者单位:200233 上海交通大学医学院附属第六人民医院普外科

通讯作者:郑起, E-mail: sh6_zhengqi@126.com

nine methylester, L-NAME) 和 GHSR 阻断剂 D-Lys³-GHRP-6 购自美国 Tocris 公司;胆碱能神经阻断剂阿托品、钠离子通道阻断剂河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)购自美国 Sigma 公司。小鼠结肠推进试验及离体肌条试验均在上海交通大学医学院生理学教研室完成。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和药物注射:48 只小鼠禁食、自由饮水 24 h 后,按随机数字法分为 8 组,每组 6 只。向各组小鼠腹腔内注射生理盐水,ghrelin 20、50、100、200 ng/g,ghrelin 100 ng/g + 阿托品 1 μg/g、ghrelin 100 ng/g + L-NAME 50 μg/g、ghrelin 100 ng/g + D-Lys³-GHRP-6 5 nmol/g。后 3 组的阿托品、L-NAME 和 D-Lys³-GHRP-6 均在注射 ghrelin 100 ng/g 前 20 min 注射。

1.2.2 小鼠结肠推进:结肠推进实验根据文献[1]进行制备,在紧靠回盲部的近端结肠内注入 100 g/L 活性炭悬液 0.2 ml。1 h 后小鼠颈椎脱臼法处死,立刻取出全部结肠,测量结肠中炭末推进距离及结肠全长,结肠推进率 = (炭末推进距离/结肠全长) × 100%。

1.2.3 小鼠近端结肠环形平滑肌条自发收缩活动:将小鼠断颈处死,平铺于实验台上,沿腹中线开腹取出近端结肠,放入台氏缓冲液中清洗后,移入氧饱和的台氏缓冲液中,在显微解剖镜下仔细去除黏膜层,显露肌层,沿环行肌走向剪取 2.0 mm × 8.0 mm 的肌条,置于含有 95% O₂ 和 5% CO₂ 饱和台氏液的垂直灌流槽内,灌流槽内的液体通过恒温装置使温度保持在(37.0 ± 0.5)℃。肌条一端固定于玻璃小钩上,另一端与 SMUP-E 生物信号处理系统连接的张力换能器相连,记录肌条自发收缩活动。肌条自发收缩活动平稳后灌流槽内分别通入不同浓度的 ghrelin(0.01, 0.1, 1 和 10 μmol/L)。TTX 阻断神经效应实验是灌流肌槽内预先通入 TTX 孵育后再同时通入 TTX 和 ghrelin,观察神经效应被阻断时 ghrelin 对肌条自发收缩活动影响有无变化。更换药物浓度或药物种类时,用台氏液充分冲洗,待肌条自发收缩活动平稳后,再加入下一组浓度或下一种药物。

1.3 统计学分析

结肠推进率以炭末推进距离占结肠全长的百分比计算,近端结肠环行肌条加药后收缩幅度变化以不加药物情况下肌条自发收缩活动稳定后的收缩幅度为对照表示。所有统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验结果采用同体对照的 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ghrelin 对小鼠结肠推进的影响

与生理盐水组小鼠结肠推进率(39.70 ± 1.78)% 相比较,ghrelin 注射剂量为 50、100、200 ng/g 时小鼠结肠推进率均显著提高,分别为(45.10 ± 1.21)%、(52.30 ± 2.51)%、(60.3 ± 1.92)% (*t* = 6.470, 11.230, 19.230, *P* < 0.05)。ghrelin 注射剂量在 20 ng/g 时小鼠结肠推进率为(40.30 ± 2.11)%,与生理盐水组比较差异无统计学意义。

阿托品 1 μg/g、L-NAME 50 μg/g 和 D-Lys³-GHRP-6 5 nmol/g 预先处理小鼠均能显著抑制 ghrelin 100 ng/g 促结肠推进的作用,小鼠结肠推进率分别减少为(42.10 ± 1.35)%、(43.70 ± 1.92)% 和(42.30 ± 1.63)% (*t* = 10.230, 12.560, 11.590, *P* < 0.05)。

2.2 ghrelin 对离体平滑肌肌条的影响

在肌条出现稳定的自发性收缩后,分别给予 0.1、1 和 10 μmol/L 的 ghrelin 均可显著增加小鼠近端结肠环行肌条的自发收缩幅度,分别为(112.00 ± 2.31)%、(121.00 ± 1.72)% 和(130.00 ± 1.29)% (*t* = 5.320, 8.450, 11.340, *P* < 0.05)。ghrelin 在浓度为 0.01 μmol/L 引起的肌条自发收缩幅度为(102.00 ± 3.12)%,与自发收缩幅度比较差异不大。在预先用 0.2 μmol/L TTX 预处理肌条后,各浓度 ghrelin 均不能显著增加肌条的自发收缩幅度。

3 讨论

ghrelin 分布于人体多种组织器官,以胃组织中含量最高,说明 ghrelin 在胃肠功能的调节上具有重要意义^[2]。

我们发现 ghrelin 能促进小鼠结肠的推进,且有明显的量效关系;阿托品、L-NAME 及 D-Lys³-GHRP-6 均能显著抑制 ghrelin 促进小鼠结肠推进的作用;离体肌条实验中 ghrelin 可以显著提高近端结肠环行平滑肌条的自发收缩幅度,而在 TTX 阻断神经效应时 ghrelin 不能显著提高肌条的自发收缩幅度。ghrelin 对 GHSR 具有较强的亲和力,能通过结肠上的 GHSR 发挥促进结肠推进的作用,3 种阻断剂均能阻断 ghrelin 促进结肠推进的作用。通过体内、外实验说明 ghrelin 可能是通过结肠肌间神经丛的硝基能神经和胆碱能神经上 GHSR 起作用。

控制胃肠运动的肌间神经丛属于消化道的内在神经系统。其神经元分布在纵行肌和环形肌之间,其中有以乙酰胆碱和 P 物质为递质的兴奋性神经

元,也有以血管活性肠肽和 NO 为递质的抑制性神经元,主要支配平滑肌细胞。Dass 等^[3]发现 GHSR 在大鼠胃和结肠的神经细胞上表达,在平滑肌细胞和上皮细胞无表达。这提示 ghrelin 可能通过肠神经系统发挥作用。Xu 等^[4]发现将豚鼠的肠神经元分离出来,并证实有胃动素、ghrelin 及其受体的存在。Fukuda 等^[5]发现辣椒辣素能阻断 ghrelin 的促大鼠胃肠运动作用。这提示 ghrelin 通过肠神经通路及对辣椒辣素敏感的感觉传入神经元调节胃肠运动。

ghrelin 也在中枢神经系统影响结肠动力。Tebbe 等^[6]的研究说明 ghrelin 在下丘脑室旁核通过神经肽 Y1 受体和非选择性的促肾上腺激素释放因子 1 受体发挥胃肠动力的中枢调节作用。

ghrelin 可以通过中枢和外周神经促进结肠动力,是极具潜力的推进结肠动力的药物,给胃肠道动力相关性疾病的治疗开拓了新的研究方向,提供了极具潜力的应用前景。

参考文献

- [1] 李海燕,李得香,严祥,等. 孤啡肽对大鼠体内外结肠动力的影响. 世界华人消化杂志,2006,14(14):1377-1381.
- [2] Locatelli V, Bresciani E, Bulgarelli I, et al. Ghrelin in gastroenteric pathophysiology. J Endocrinol Invest,2005,28(9):843-848.
- [3] Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, et al. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of Ghrelin. Neuroscience,2003,120(2):443-453.
- [4] Xu L, Depoortere I, Tomasetto C, et al. Evidence for the presence of motilin, Ghrelin, and the motilin and Ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus. Regul Pept,2005,124(1-3):119-125.
- [5] Fukuda H, Mizuta Y, Isomoto H, et al. Ghrelin enhances gastric motility through direct stimulation of intrinsic neural pathways and capsaicin-sensitive afferent neurones in rats. Scand J Gastroenterol,2004,39(12):1209-1214.
- [6] Tebbe JJ, Mronga S, Tebbe CG, et al. Ghrelin-induced stimulation of colonic propulsion is dependent on hypothalamic neuropeptide Y1- and corticotrophin-releasing factor 1 receptor activation. J Neuroendocrinol,2005,17(9):570-576.

(收稿日期:2007-07-30)

(本文编辑:张玉琳)

· 经验交流 ·

经腹经后下纵隔根治切除贲门部癌 43 例

王遵义 朱丽华 刘伟 张维 王鹏

贲门部癌位于胃与食管连接部,故其手术路径有经胸、胸腹联合及经腹等多种术式。我科 2003 年 2 月至 2007 年 1 月行经腹经后下纵隔贲门部癌根治切除术 43 例,效果满意。

1 资料和方法

1.1 一般资料

本组 43 例,男 27 例,女 16 例;平均年龄 56.5 岁(42~76 岁)。术前胃镜多点活检及胸腹部螺旋 CT 检查,癌肿浸润食管 1 cm 以内,纵隔无明显淋巴结转移。其中 Siewert II 型 27 例,III 型 16 例。Borrmann I 型 7 例,II 型 26 例,III 型 10 例。高、中分化腺癌 32 例,低分化腺癌 6 例,黏液腺癌 4 例,印戒细胞癌 1 例。

1.2 手术方法

常规行 D₂ 胃周淋巴结清扫。将胃周韧带及血管充分切开游离后,显露胃与食管接合部及其病灶。于腹主动脉前方贴近腹主动脉鞘,将围绕形成食管裂孔的右膈脚左、右翼肌纤维均予以钳夹、切断并缝扎。切解膈食管韧带,暴露食管

裂孔并予以扩大,向剑突方向切开膈肌中心腱 7~8 cm。切除食管腹段周围组织的同时,切除食管裂孔周围筋膜纤维组织。切断迷走神经前后干,向下牵拉暴露食管下段 8~10 cm。牵开膈肌,显露后下纵隔,清扫后下纵隔食管周围淋巴结。于肿瘤上方 4~5 cm 处切断食管。对食管壁硬韧者,选择术中病理检查。用吻合器行食管胃或食管空肠吻合。将膈肌切开处与远侧胃或空肠妥善固定。

2 结果

本组围手术期无患者死亡。食管切缘均未见癌细胞浸润。有 36 例淋巴结转移,其中贲门周围淋巴结转移 61%(22/36),胃左动脉淋巴结转移 44%(16/36),腹腔动脉干淋巴结转移 28%(10/36),幽门上、下淋巴结转移 17%(6/36),食管胸下段周围淋巴结转移 6%(2/36)。术后合并吻合口瘘 2 例,均经引流后治愈。本组无残胃排空障碍及心、肺功能不全发生。

随访 37 例,失访 6 例,中位随访时间 18 个月(6~54 个月)。术后合并反流性食管炎 4 例,出现吻合口狭窄 3 例行胃镜下扩张治愈。随访时间满 1 年者 31 例,术后 1 年内无一例局部复发、转移或死亡。

作者单位:061001 河北省沧州市中心医院肿瘤一科(王遵义、刘伟、张维、王鹏);061000 河北省沧县医院外科(朱丽华)

(下转 158 页)