

半夏泻心汤对胃电节律失常大鼠胃壁 SCF 基因表达水平的影响

李宇航 王庆国 陈萌 王丹 李丽娜 张冬梅
(北京中医药大学基础医学院,100029,北京//第一作者男,1960年生,教授,博士研究生导师)

摘要:胃电节律失常十分常见,与胃功能性疾病密切相关,它是胃运动功能障碍的一个重要原因。近年的研究表明,Cajal 间质细胞对胃肠动力有重要的调控作用。某些胃肠动力性疾病,如贲门失弛缓症、糖尿病性胃轻瘫等,胃肠局部 Cajal 间质细胞的数目和结构有变化。目的:观察半夏泻心汤及其拆方各组对胃电节律失常大鼠胃壁组织 SCF 基因表达水平的影响,探讨该方的作用机制。方法:制备胃电节律失常模型,用 RT-PCR 法检测半夏泻心汤及其拆方对胃壁 SCF 基因表达水平的影响。结果:各用药组均能下调 SCF 基因的表达,与模型组比较有显著差异($P < 0.05$)。结论:半夏泻心汤治疗心下痞证(调节胃肠运动)可能与其调节 SCF 基因表达有关。
关键词:半夏泻心汤; Cajal 间质细胞; SCF 基因

胃电节律失常十分常见,与胃功能性疾病密切相关,它是胃运动功能障碍的一个重要原因。近年的研究表明,Cajal 间质细胞对胃肠动力有重要的调控作用。某些胃肠动力性疾病,如贲门失弛缓症、糖尿病性胃轻瘫等,胃肠局部 Cajal 间质细胞的数目和结构有变化。Cajal 间质细胞表达 c-kit, 依靠基因产物 Kit 的信号发育和维持表型。Kit 是一种跨膜蛋白,带有一个细胞外的受体区和一个细胞内的酪氨酸激酶域。干细胞因子(stem cell factor, SCF)是其天然的配基。我们以前的研究发现,半夏泻心汤对胃电节律具有一定的调节作用,免疫组化染色显示 Kit 阳性 Cajal 间质细胞含量增加,提示半夏泻心汤可改变胃电节律失常大鼠胃壁 Cajal 间质细胞的数目,但其具体作用环节尚不清楚。本研究观察了半夏泻心汤及其拆方各组对胃电节律失常大鼠胃壁组织 SCF 基因表达水平的影响,旨在探讨该方的作用机制。

1 材料与方

拆方分组 根据中医组方原理,将半夏泻心汤拆方分为辛味组(半夏、干姜,简称 X 组)、苦味组(黄芩、黄连,简称 K 组)、甘味组(人参、大枣、炙甘草,简称 G 组);并交互组合为辛苦组(简称 XK 组)、辛甘组(简称 XG 组)、苦甘组(简称 KG 组)和全方组(简称 Q 组),共 7 组。

实验材料 健康成年 Wistar 雄性大鼠,体重(180 ± 20)g,由中国医学科学院动物研究所提供(许可证编号:SCXK11-00-0006),共 90 只。随机取出 10 只作为正常对照组(简称 Z 组),常规饲养。其余大鼠按文献^[2]方法制备大鼠胃电节律失常模型。4 周后,将造模大鼠随机分为模型对照组(简称 M 组)、X 组、K 组、G 组、XK 组、XG 组、KG 组、Q 组,共八个组,每组 10 只。各给药组从造模结束后开始每日 1 次给予相应药液灌胃(1ml/100g),Z 组与 M 组均以蒸馏水灌胃,连续 2 周。

主要仪器及试剂 Image Master VDS 图像摄录分析系统购自 Amersham Pharmacia 公司。细胞总 RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司,反向聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购于 Centus 公司。根据文献^[2]设计,由北京赛百盛基因技术有限公司提供引物。5'引物 CTACCCAATGCGTG GACTACTCTG,3'引物 GATTCGCCACCA GTTTTGTAATG。

实验用药 实验用中药购自北京同仁堂药店,经北京中医药大学药用植物教研室鉴定,均为正品。生药剂量比例按原著,根据文献^[3]换算,依照人单位体重生药量求得大鼠单位体重生药量,并扩大 10 倍。各组药物分别以蒸馏水煎煮 30min,提取 2 次。再合并煎液,并将所得药液用双层纱布过滤,水浴加热蒸发浓缩为 1g/ml,贮于冰箱中备用。

实验方法 各给药组从造模后开始,每日 1 次灌胃给予相应药液;对照组以蒸馏水灌胃,连续 2 周。各组于末次给药禁食 12h 后断头处死,取胃体中 1/3 段的胃壁全层一块,约为 0.5cm × 0.5cm 大小,立即置于液氮罐中, - 70℃ 低温冰箱中保存待测。

按文献^[2]用反向聚合酶链反应(RT-PCR)测定 c-kit 的基因表达水平。取 RT-PCR 产物 10μl,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳及溴化乙锭染色后,用 Image Master VDS 图像摄录分析系统进行电泳条带光密度扫描,并对各组所有样品进行半定量分析。

统计学处理几个处理组与一个对照组的比较采用 Dunnett *t* 检验;各给药组均数之间的两两比较采用 *q* 检验。

2 结果

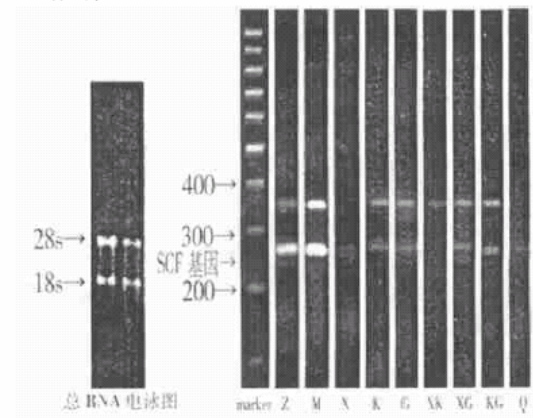


图1 各实验组 SCF 基因在胃壁中的表达(RT-PCR 法)

表 1 各实验组的 SCF 基因 mRNA 表达水平

	n	mRNA 光密度比值(±s)
Z	5	1.955 ±0.098
M	6	2.304 ±0.193
X	6	0.361 ±0.069 ***
K	5	0.920 ±0.649 ***
G	5	1.143 ±0.233 ***
XK	7	0.467 ±0.070 ***
XG	7	0.929 ±0.127 ***
KG	7	0.527 ±0.079 ***
Q	7	0.602 ±0.133 ***

注:与模型组比较 *** P < 0.001

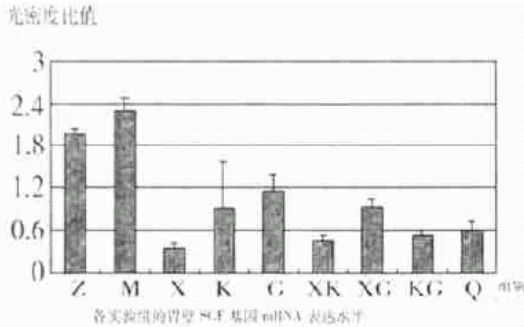


表 2 各给药组对 SCF 基因 mRNA 表达水平的影响的

	X	K	G	XK	XG	KG	Q
X	—	△	**	△	***	*	*
K	—	—	△	△	△	△	△
G	—	—	—	*	△	*	*
XK	—	—	—	—	***	△	△
XG	—	—	—	—	—	***	**
KG	—	—	—	—	—	—	△
Q	—	—	—	—	—	—	—

注:表中横竖交叉点处的符号为统计所得组间两两比较的显著性检验结果。
 * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001 △ P > 0.05 —不比较

SCF 基因表达 各组 SCF 基因经 RT-PCR 扩增后,均获得了设计大小的 DNA 片段 258bp(见图 1),其各组基因表

达水平的参数统计结果见表 1、表 2。

实验结果显示,正常组与模型组比较,无显著差异,模型组有高于正常组的趋势。各给药组均能降低 SCF 基因的表达,与模型组比较有显著差异。SCF 基因的表达水平依次为: X < XK < KG < Q < K < XG < G < Z < M(如表 1)。

各给药组之间两两比较的结果显示,苦味组与其它给药组均无显著差异;辛味组与甘味、辛甘、苦甘、全方组均有显著差异,说明它明显强于后四组;甘味组与辛味、辛苦、全方、苦甘组均有显著差异,说明它明显弱于后四组(如表 2)。

3 讨论

ICC 表达 c-Kit,依靠基因产物 Kit 的信号发育和维持表型。Kit 是一种跨膜蛋白,带有一个细胞外的受体区和一个细胞内的酪氨酸激酶域。干细胞因子(stem cell factor SCF)是其天然的配基。以胚胎小肠片段作器官培养,结果提示 Kit 信号所必须的物质是肠壁内部的^[4]。在 Sl/Sf^d突变体,只产生可溶性 SCF,使 ICC 不能正常发育^[5]。

各给药组均能下调 SCF 基因的表达,与模型组比较有显著差异。我们以往的研究发现,各组中药均能降低模型大鼠胃电慢波变异系数,提示胃壁 SCF 基因的表达与胃电慢波变异系数存在一定相关性,半夏泻心汤对胃电节律的影响可能与调节 SCF 基因的表达有关,但其中的具体作用机制有待于进一步的实验研究。

参考文献

- 张勇,王振华.大鼠胃电节律失常模型的建立[J].华人消化杂志,1998,6(7):612~613
- Latif Rachdi, Lynda El Ghazi, Florence Bernex, et al. Expression of the receptor tyrosine kinase kit in mature β-cell and in the pancreas in development [J]. DIABETES. 2001, 50(9):2022
- 柯雪帆,赵章忠,张玉萍,等.《伤寒论》和《金匮要略》中的药物剂量问题 [J]. 中国中药杂志,1983,8(12):36~38
- Ward SM, Harney SC, Bayguinov JR, et al. Development of electrical rhythmicity in the murine gastrointestinal tract is specifically encoded in the tunica muscularis [J]. Am J Physiol. 1997 Nov 15; 505 (Pt 1):241 - 58.
- Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, et al. Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants [J]. Am J Physiol. 1995 Dec;269(6 Pt 1):C1577~85

(上接第 1824 页)

2 讨论

PFP 存在于激活的 NK 和 CTL 等效应细胞胞浆颗粒中,当效应细胞接触靶细胞时,便通过脱颗粒方式将 PFP 释放,PFP 能插入靶细胞膜且聚合成直径 15~20nm 的跨膜孔道,使细胞膜的通透性增加,导致靶细胞发生渗透性溶解。同时,与 PFP 同存于胞浆颗粒中的颗粒酶等,也可通过 PFP 管道进入靶细胞,并激活细胞内切酶系统,使 DNA 降解而致细胞凋亡^[2]。

在本研究中,观察了 CVB₃ 感染的体外培养心肌细胞中 PFP 的表达。免疫组化检测发现病毒感染心肌细胞有 PFP 阳性信号,说明这些受 CVB₃ 攻击的心肌细胞能够表达 PFP 抗原。正常心肌细胞不应有 PFP 抗原阳性细胞,故未见 PFP 阳性信号。参白注射液组 PFP 阳性信号表达量少,

且细胞结构尚完整。

参白注射液是临床通过 2 万份病例筛选出的有效中药复方制剂,具有益气养阴、活血化瘀及清热解毒之功效,以往的研究已经证实,该方能明显提高机体免疫功能,有明显的抗心律失常、防治心肌损伤作用,可降低心肌缺血、缺氧时增强的脂质过氧化反应,纠正失衡的抗氧化酶的活性,防止心肌细胞过度凋亡,修复受损心肌。本实验结果证明,参白注射液能抑制 PFP 表达,减轻心肌损伤,对受 CVB₃ 攻击的心肌细胞有明显的保护作用。

参考文献

- 杨英珍.病毒性心脏病 [M]. 上海:上海科学技术出版社,2001,28
- 熊丁丁,杨英珍,宿燕岗,等.穿孔素和 Fas 配体在柯萨奇 B3 病毒性心肌炎小鼠心肌浸润细胞中表达 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志,1998,18(1):29~33