

# 半夏泻心汤对糖尿病大鼠胃窦 Cajal 间质细胞及干细胞因子的影响

蒋楠 余跃 陈凤琴 袁莉莉 王巧民

**摘要** **目的** 观察半夏泻心汤对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠胃窦 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)及干细胞因子(stem cell factor, SCF)表达的影响。**方法** 将 60 只健康雄性 DM 大鼠随机分成对照组、模型组、半夏泻心汤组(中药组)和多潘立酮组(西药组)。一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ, 55 mg/kg)制作糖尿病大鼠模型。中药组给予半夏泻心汤[5.4 g/(kg·d)]灌胃,西药组给予多潘立酮[5 mg/(kg·d)]灌胃,模型组及对照组每天给予等体积蒸馏水,持续灌胃 8 周后,检测各组大鼠体重及血糖,给予半固体营养糊灌胃测定胃残留率,利用免疫组化和图像分析观察胃窦 c-kit 阳性 ICCs 及 SCF 表达。**结果** 与对照组比较,模型组体重减轻,血糖及胃残留率升高,c-kit 阳性 ICCs 及 SCF 平均光密度值显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较,两个用药组多饮、多食及多尿症状减轻,精神状态好转,体重、c-kit 阳性 ICCs 及 SCF 平均光密度值明显增加( $P < 0.05$ ),胃残留率降低( $P < 0.05$ );中药组血糖降低( $P < 0.05$ ),且中药组 c-kit 阳性 ICCs 平均光密度高于西药组( $P < 0.05$ )。**结论** 半夏泻心汤可以促进糖尿病大鼠胃窦肌间神经丛 c-kit ICCs 及 SCF 的表达,对受损的 DM 大鼠胃窦 ICCs、SCF 有部分恢复作用,可改善糖尿病大鼠的胃动力障碍。

**关键词** 糖尿病;半夏泻心汤;Cajal 间质细胞;干细胞因子

Effect of Banxia Xiexin Decoction on Gastric Antral Interstitial Cells of Cajal and Stem Cell Factor in Diabetic Rats JIANG Nan, YU Yue, CHEN Feng-qin, YUAN Li-li, and WANG Qiao-min Department of Gastroenterology, Affiliated Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei (230001), China

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect of Banxia Xiexin Decoction (BXD) on expression of the interstitial cells of Cajal (ICCs) and stem cell factor (SCF) in the antrum of rats with diabetes mellitus (DM). **Methods** Totally sixty healthy male SD rats were randomly divided into the control group, the model group, the BXD group, and the Western medicine group (WM, treated by domperidone), 15 in each group. Diabetic rat models were established by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 55 mg/kg). Those in the BXD group were perfused with BXD at the daily dose of 5.4 g/kg. An equal volume of distilled water was given by gastrogavage to those in the WM group and the control group for 8 successive weeks. The body weight and blood glucose of all rats were detected, and the gastric residual rates were detected with semisolid nutrient paste by gastrogavage. The expression of positive ICCs and SCF were observed by immunohistochemical method and quantified image analyzer. **Results** Compared with the control group, the body weight reduced, blood glucose and gastric residual rates increased, and the mean optical density of positive ICCs and SCF significantly decreased in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, symptoms such as polydipsia, polyphagia, polyuria were relieved, spirits improved, the body weight and mean optical densities of positive ICCs and SCF significantly increased ( $P < 0.05$ ), and gastric residual rates significantly decreased in the BXD group and the WM group ( $P < 0.05$ ). The blood glucose significantly decreased ( $P < 0.05$ ) in the BXD group. The mean optical density of positive ICCs was higher in the BXD group than in the WM group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** BXD could

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(No. 1208085MH174);安徽省教育厅自然科学研究重点项目(No. KJ2010A192)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院消化内科(合肥 230001)

通讯作者:余跃, Tel: 0551-2283380, E-mail: yuyuemd163@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.12.1672

promote the expression of positive ICCs and SCF. It could improve the gastric motility in DM rats by partially inverting abnormal changes of gastric antral ICCs and SCF.

**KEYWORDS** diabetes mellitus; Banxia Xiexin Decoction; interstitial cells of Cajal; stem cell factor

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 患者中有 25% ~ 76% 存在胃肠动力障碍<sup>[1]</sup>。以往认为与高血糖、自主神经病变、胃肠平滑肌病变及激素紊乱等有关。近年研究显示 Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICCs) 是胃肠道起搏细胞, 其结构及数量的改变可能是导致胃肠动力障碍的重要原因<sup>[2,3]</sup>, 但对 ICCs 异常的调控因子研究尚不明确。干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 是 ICCs 特异性标志物 c-kit 受体的天然配体, 对 ICCs 的生长、发育及表型的维持具有至关重要的作用<sup>[4]</sup>。半夏泻心汤源于张仲景的《伤寒论》, 主治寒热错杂之痞证, 全方辛开苦降、寒温并用、攻补兼施, 为调节胃肠运动障碍之良方, 目前已广泛应用于临床<sup>[5,6]</sup>。本实验通过观察半夏泻心汤对 DM 大鼠胃排空和胃窦组织 c-kit 阳性 ICCs、SCF 表达的变化, 旨在探讨其调控 DM 胃动力障碍的作用机制, 为临床治疗提供理论依据。

## 材料与方

1 动物 健康成年雄性 SD 大鼠 60 只, 鼠龄 2 个月, 体重 (190 ± 20) g, 由安徽医科大学实验中心提供, 许可证号: SCXK (皖) 2005 - 001。实验前适应性饲养 1 周, 自由进食、进水, 保持光照周期 12 h/12 h。

2 药物 半夏泻心汤 (组成: 半夏 12 g 黄芩 9 g 干姜 9 g 人参 9 g 炙甘草 9 g 黄连 3 g 大枣 4 枚) 购自安徽中医学院第一附属医院药剂科。制作方法<sup>[7]</sup>: 加入蒸馏水 1 L, 将中药在蒸馏水中浸泡 2 h, 煎煮 30 min, 提取 2 次后合并煎液。4 层纱布过滤后取过滤液水浴加热蒸发浓缩至终浓度为含生药 1 g/mL, 分装于无菌小瓶, 4 °C 保存。多潘立酮片 (10 mg/片, 西安杨森制药有限公司, 批号: 111207013) 加蒸馏水配制成浓度为 0.5 mg/mL 的水溶液。链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司)。

3 试剂及仪器 SCF 多克隆一抗 (美国 Santa Cruz 公司), c-kit 多克隆一抗 (美国 Santa Cruz 公司), SP 法免疫组织化学试剂盒 SP-9001 (北京中杉金桥公司), JY3002 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), MotiCB 罗氏血糖仪 (ACCU-CHEK Performa, 德国), 血糖试纸 (ACCU-CHEK Performa, 德国)。

4 半固体糊制备 按文献 [8] 取羧甲基纤维素 5 g 溶于 125 mL 蒸馏水中, 加入奶粉 8 g, 白糖、淀粉

各 4 g, 活性炭末 2 g, 搅拌均匀后配制成约 150 mL (约 1 g/mL) 黑色半固体糊状物。

5 DM 大鼠模型造模及分组 60 只 SD 大鼠随机分为实验组 (50 只) 及正常对照组 (对照组, 10 只), 其中实验组腹腔注射 STZ (按 55 mg/kg 注射量称取 STZ, 加柠檬酸缓冲液配制至浓度为 10 mg/mL)。注射 STZ 72 h 及 1 周后尾静脉采血, 以血糖持续 1 周 ≥ 16.9 mmol/L<sup>[9]</sup> 者为 DM 大鼠模型成功标准, 共成模 45 只, 成功率为 90%。将成模大鼠随机分为模型组、半夏泻心汤组 (中药组)、多潘立酮组 (西药组), 每组 15 只。实验期间均随意饮水。每周测定体重、血糖 1 次, 并观察其大小便量、性状及活动情况。

6 干预方法 给药剂量按公式: 大鼠剂量 = 人剂量 × 35 (人转换因子) / 6 (大鼠转换因子) 计算出大鼠等效剂量: 中药组灌胃剂量为 5.4 g/(kg·d), 西药组为 5 mg/(kg·d)<sup>[10,11]</sup>, 模型组和对照组予等量生理盐水, 每天灌胃 1 次, 共 8 周<sup>[12]</sup>。

## 7 检测指标及方法

7.1 一般状况 造模成功后观察饮食、饮水、粪便、毛色及精神状况, 每周称重 (药物干预后每周称重)。

7.2 血糖测定 造模成功后, 每周一早 7:00 测定各组大鼠血糖 (测血糖前一天晚 10:00 后禁食)。

7.3 胃残留率测定 参照文献 [8] 进行。干预结束后禁食 12 h, 予半固体营养糊 (1 mL/100 g) 灌胃。30 min 后用 10% 水合氯醛麻醉后开腹, 快速结扎幽门和贲门后取出胃, 清除胃表面的血渍, 第 1 次称重 (胃总重), 后剪开胃体, 洗去胃内容物, 用滤纸吸干水分第 2 次称重 (胃净重), 按公式计算: 胃残留率 (%) = (胃总重 - 胃净重) / 糊重 × 100%。

7.3 胃窦组织 c-kit 阳性 ICCs 及 SCF 表达检测 迅速测完胃残留率后, 取距离幽门 0.5 cm 处全层胃窦组织一块<sup>[13]</sup>, 4% 多聚甲醛固定、酒精脱水、石蜡包埋, 切片, 厚度约 3 μm, 60 °C 烤片 30 min, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液抗原修复 25 min 后自然冷却至室温, PBS 洗 3 次, 每次 3 min。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温 10 min 灭活内源性酶, PBS 洗同上。滴加正常山羊血清封闭液, 室温 15 min, 甩去多余液体, 加兔多克隆抗体抗 c-kit 多克隆抗体浓度为 1:300, SCF 多克隆抗体浓度为 1:

250)。次日 37 ℃ 温箱复温 30 min, PBS 冲洗同上;滴加二抗(山羊抗兔)37 ℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗同上;滴加辣根标记链霉卵白素工作液, 37 ℃ 孵育 15 min 后 PBS 冲洗 3 次, 滴加 DAB 显色至出现棕黄色阳性产物时终止, 自来水冲洗, 苏木素复染、脱水、透明、中性树脂封片。在每张切片随机选取 5 个肌间神经丛的高倍视野, 使用形态学图像分析系统(JE-OR80ID, Version 6.0)测定 c-kit 阳性 ICCs、SCF 免疫反应阳性产物的平均光密度(A)值。

8 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件, 计量数据均按  $\bar{x} \pm s$  进行分析, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 LSD 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组一般状态比较 对照组造模期间状况良好, 模型组大鼠多饮、多食、多尿, 粪次增多且便质稀软, 毛色无光泽, 精神萎靡, 瘦弱, 部分出现皮肤溃烂脓肿, 白内障, 部分出现死亡。模型组死亡率为 54.5% (12/22), 中药组为 33.3% (5/15), 西药组为 44.4% (8/18), 由于高血糖状态下大鼠死亡率高,

除对照组外, 各组都进行了后期再造模补充样本量。两个用药组干预后多饮多食多尿症状减轻, 精神状态好转。

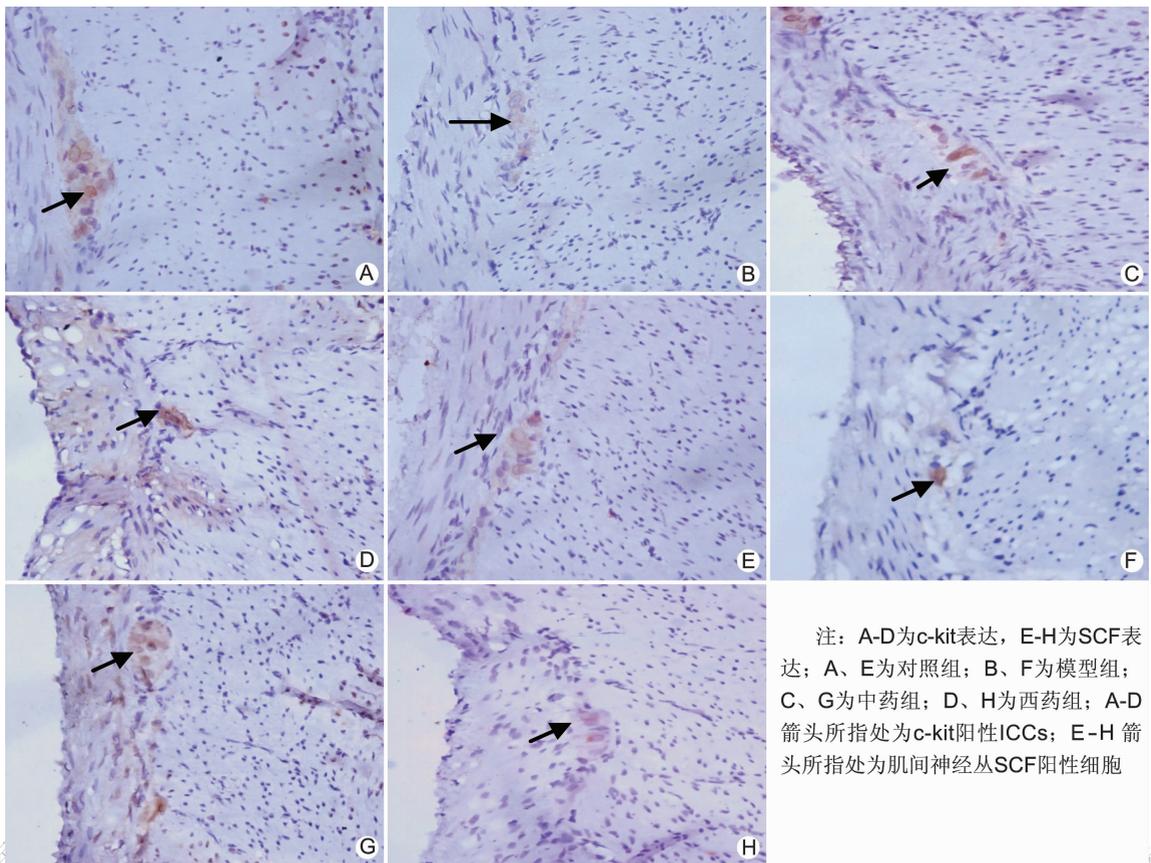
2 各组干预后大鼠体重、血糖及胃残留率比较(表 1) 造模后模型组较对照组体重下降( $P < 0.05$ ), 血糖明显升高( $P < 0.05$ ), 与对照组同期比较, 模型组干预后体重减轻, 血糖及胃残留率升高( $P < 0.05$ )。与模型组同期比较, 两个用药组体重明显增加( $P < 0.05$ ), 胃残留率降低( $P < 0.05$ ), 中药组血糖降低( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠体重、血糖值及胃残留率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	体重(g)	血糖(mmol/L)	胃残留率(%)
对照	10	干预前	198.9 ± 4.3 *	5.6 ± 1.2 *	—
		干预后	274.2 ± 16.0 *	5.6 ± 0.7 *	43.5 ± 3.6 *
模型	10	干预前	189.3 ± 2.8	23.7 ± 2.3	—
		干预后	165.0 ± 17.0	28.7 ± 3.1	72.1 ± 5.6
西药	10	干预前	200.0 ± 2.7	24.4 ± 2.0	—
		干预后	183.6 ± 14.6 *	26.5 ± 2.2	55.1 ± 4.8 *
中药	10	干预前	197.5 ± 5.8	23.2 ± 2.9	—
		干预后	191.3 ± 15.6 *	24.9 ± 2.6 *	54.5 ± 4.8

注: 与模型组同期比较, \* $P < 0.05$

3 各组大鼠胃窦 c-kit 阳性 ICCs 及 SCF 表达比较(图 1, 表 2) c-kit 阳性 ICCs 定位于细胞膜(质),



注: A-D为c-kit表达, E-H为SCF表达; A、E为对照组; B、F为模型组; C、G为中药组; D、H为西药组; A-D箭头所指处为c-kit阳性ICCs; E-H箭头所指处为肌间神经丛SCF阳性细胞

图 1 各组 c-kit 阳性 ICCs 及 SCF 表达 (SP, ×400)

表 2 各组大鼠胃窦 c-kit 阳性 ICCs、SCF 平均光密度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ICCs	SCF
对照	10	0.199 ± 0.019 *	0.245 ± 0.078 *
模型	10	0.125 ± 0.020	0.102 ± 0.012
西药	10	0.141 ± 0.016 *	0.139 ± 0.024 *
中药	10	0.164 ± 0.012 * <sup>△</sup>	0.163 ± 0.027 *

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与西药组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

呈棕黄色,主要分布于胃窦肌间神经丛之间。对照组 c-kit 表达强烈,颜色明显,着色较深,模型组 c-kit 表达较弱且阳性细胞数分布减少,着色较淡。中药组与西药组都可见着色较深的 c-kit 阳性细胞。与模型组比较,用药组 c-kit 平均光密度值增加且中药组高于西药组( $P < 0.05$ )。SCF 阳性定位于胞浆,主要分布于胃窦的肌间神经丛周围,多呈团状或梭状分布。对照组大鼠肌间神经丛 SCF 免疫阳性物质丰富,呈棕黄色成片分布。对照组大鼠肌间神经丛 SCF 免疫阳性物质较对照组少,仅见极少量颗粒状分布。中药组与西药组可见成团的免疫阳性物质分布,且中药组 SCF 的光密度值高于西药组( $P < 0.05$ )。

## 讨 论

胃肠动力障碍是 DM 的常见并发症之一,对血糖的控制和生活质量产生了严重影响。DM 胃肠功能障碍的病理生理特点主要表现为胃肠道张力及舒缩能力下降,节律失常,消化道移动性复合波减少,胃排空延迟<sup>[14,15]</sup>。

ICCs 是一类分布于胃肠道的间质细胞,已有大量证据表明,ICCs 为胃肠道电慢波的发生器,并且为胃肠道慢波活动的传导者,对胃肠道神经肌肉信号传导起到了重要的调节作用<sup>[16,17]</sup>。Iwasaki H 等<sup>[18]</sup>发现,在严重的 2 型 DM 患者中,环形肌层处的 c-kit 表达减少较病情控制者更为明显,并表明胃窦 c-kit 受体减少可能是 DM 胃动力障碍的发生机制,ICCs 的缺失或损伤将导致 DM 胃肠动力障碍的发生、发展。本实验中模型组大鼠的胃残留率明显增加,胃窦 c-kit 平均光密度值较用药组显著下降,其对胃残留量的影响可能是由于 c-kit 表达的下降导致 ICCs 的网状结构受损,导致胃肠起搏功能减弱、作为信号传导中介的作用减弱,产生异常的不规则慢波,胃蠕动减弱,从而出现胃排空延迟等症状。

SCF 与 c-kit 结合组成 SCF/c-kit 信号系统,激活酪氨酸激酶,导致一系列磷酸化过程<sup>[16]</sup>。目前认为 SCF/c-kit 信号途径与 ICCs 关系密切。当微环境中

SCF 表达下降时,将导致 ICCs 数量的减少及功能的损伤。本课题组前期研究发现外源性 SCF 可以改善或逆转 DM 小鼠小肠 ICCs 病变,进一步提示 SCF 对维持 ICCs 正常功能的重要作用<sup>[19]</sup>。本实验发现在 DM 模型大鼠中,SCF 的表达较用药组明显减弱,表明 DM 胃窦 SCF 表达的改变与胃肠动力障碍存在一定的相关性,与国外文献<sup>[4]</sup>结果一致。

从中医学观点看,气机升降失调是胃肠动力障碍性疾病的主要病机<sup>[20]</sup>。半夏泻心汤源于张仲景的《伤寒论》,其中半夏、干姜辛开而温,以散脾气之寒;黄芩、黄连苦温而寒以降脾气之热;人参、甘草、大枣甘润调补,和脾胃,补中气以复中焦升降功能。现已广泛用于临床治疗 DM 胃轻瘫、功能性消化不良等胃肠动力障碍疾病<sup>[5,6]</sup>。陈立江等<sup>[21]</sup>采用正交设计法拆方研究,报道半夏泻心汤对大鼠胃肠运动有双向调节作用;王秀杰等<sup>[22]</sup>在对半夏泻心汤的拆方研究中发现半夏、黄连及小剂量的人参有很强的促胃排空作用。本实验结果显示:与对照组比较,模型组大鼠胃残留率显著增加;中药持续灌胃干预 8 周后,中药组比模型组的大鼠多饮、多食、多尿的症状减轻,精神状态好转,体重增加且死亡率降低,胃残留率明显减少,与西药组无明显差异,但仍比对照组低,这表明半夏泻心汤能改善 DM 大鼠的胃动力,促进胃排空。此外,光镜下可见模型组 c-kit、SCF 阳性产物表达的平均光密度值减少,说明 ICCs 和 SCF 对于维持胃肠道的正常运动有重要作用。中药组及西药组均比模型组显著增加但仍低于正常对照组,这表明半夏泻心汤可以部分恢复 DM 大鼠受损的 ICCs,促进胃排空,改善胃动力。

综上,半夏泻心汤有显著促进胃排空的作用,推测其可能通过调节 DM 大鼠胃窦 c-kit 及 SCF 的表达,作用于 kit-SCF 信号途径,使得 ICCs 的功能及表型得以逆转,从而维持正常的生物学功能,DM 胃运动障碍得以改善。其具体机制有待于进一步研究。

(致谢:感谢安徽中医学院中西医结合临床学院许冠荪教授在本实验中给予的指导和大力帮助。)

## 参 考 文 献

- [1] Ordög T, Hayashi Y, Gibbons SJ. Cellular pathogenesis of diabetic gastroenteropathy [J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2009, 55(3): 315-343.
- [2] Huizinga JD, Zarate N, Farruga G. Physiology, injury and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(5): 1548-1556.

- [3] Mostafa RM, Moustafa YM, Hamdy H. Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16 (26): 3239-3248.
- [4] Horváth VJ, Vittal H, Lőrincz A, et al. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of Cajal in murine diabetic gastroparesis [J]. Gastroenterology, 2006, 130(3): 759-770.
- [5] 赵旭,田小平,林垦.张发荣治疗糖尿病胃肠动力紊乱经验[J].中医杂志,2006,47(8):581-582.
- [6] 李禾花,赵立新.半夏泻心汤加减治疗老年 2 型糖尿病胃轻瘫 38 例 [J].河北中医,2009,31(10):1498-1498.
- [7] 方正清,申国明,徐颖,等.电针和半夏泻心汤对功能性消化不良大鼠胃肠电图的影响[J].安徽中医学院学报,2005,24(1):14-16.
- [8] 韩棉梅,梁嘉恺,陶双友,等.四磨汤口服液对胃肠运动功能障碍模型大鼠胃残留、小肠推进率及结肠 P 物质的影响[J].新中医,2011,43(12):114-115.
- [9] 陈凤琴,余跃,薛丹,等.沉香化气胶囊对糖尿病大鼠小肠 ICC 和肌间神经丛的影响[J].世界华人消化杂志,2012,20(20):1858-1862.
- [10] 陈珺明,王磊,邢练军,等.清肝活血方对酒精性肝纤维化大鼠基质金属蛋白酶的调控作用[J].中国中西医结合杂志,2011,31(11):1538-1544.
- [11] 吴涛,柳涛,郑培永,等.清肝活血方及其拆方对酒精性肝病大鼠 CD14、TLR<sub>4</sub> 表达的影响[J].世界华人消化杂志,2008,16(30):3372-3380.
- [12] 金明柱,李敬林.益气解毒活络法对糖尿病早期肾病大鼠的药效学实验研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(10):1971-1973.
- [13] 陈军,余跃,杨琰,等.突触在胃起搏调控胃慢波活动中的作用[J].胃肠病学和肝病学杂志,2011,20(7):633-636.
- [14] De Block CE, De Leeuw IH, Pelckmans PA, et al. Current concepts in gastric motility in diabetes mellitus [J]. Curt Diabetes Rev, 2006, 2(1): 113-130.
- [15] Jung HK, Kim DY, Moon IH, et al. Colonic transit time in diabetic patients - comparison with healthy subjects and the effect of autonomic neuropathy [J]. Yonsei Med J, 2003, 44(2): 265-272.
- [16] 高显奎,余跃,李京培,等.胃 Cajal 间质细胞的分离和培养 [J].安徽医科大学学报,2009,44(4):522-524.
- [17] Iino S, Horiuchi K. Interstitial cells of Cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract [J]. Acta Histochem Cytochem, 2006, 39(6): 145-153.
- [18] Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, et al. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Gastroenterology, 2006, 41(11): 1076-1087.
- [19] 杨琰,余跃,高显奎,等.干细胞因子对糖尿病小鼠小肠 Cajal 间质细胞的影响 [J].胃肠病学和肝病学杂志,2011,20(3):230-232.
- [20] 柴可夫,黄晓玲.2 型糖尿病中医气阴两虚证与湿热困脾证差异表达基因的研究 [J].中华中医药杂志,2009,24(9):1340-1343.
- [21] 陈立江,张胜,吴春福,等.采用正交设计法拆方研究半夏泻心汤对大鼠胃底条运动的双向调节作用 [J].中药药理与临床,2006,22:107(3):1-3.
- [22] 王秀杰,王学清,李岩,等.半夏泻心汤及拆方对小鼠胃排空影响的实验研究 [J].中华医药学刊,2008,26(5):1072-1073.

(收稿:2012-12-02 修回:2013-07-08)