

香砂六君子汤对脾气虚证大鼠胃 Cajal 间质细胞、 缝隙连接损伤的修复作用研究

李 冉 齐清会 谢明征 丁伯龙 张盛林

摘要 **目的** 探讨脾气虚证(Pi qi deficiency syndrome, PQDS)大鼠胃 Cajal 间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)、缝隙连接(gap junction, GJ)损伤和香砂六君子汤的修复作用。**方法** 选择 30 只健康 Wistar 大鼠,采用苦寒泻下法建立脾气虚证模型。造模成功后分为脾气虚组(模型组)和香砂六君子汤治疗组(治疗组),每组各 15 只。另选择 15 只健康 Wistar 大鼠作为健康组。治疗组灌胃香砂六君子汤(2 mL/100 g), 14 天;健康组和模型组按照治疗组方法予等量生理盐水灌胃 14 天。分别于造模前、干预前及干预后取各组胃肌层组织,采用透射电镜观察 ICC 和 GJ 的超微结构改变;免疫组织化学法检测连接蛋白 43(Cx43)的数量和分布。**结果** 透射电镜显示:与健康组比较,模型组大鼠 ICC 和 GJ 明显损伤;经治疗组干预后 ICC 和 GJ 有明显修复趋势。与本组造模前比较,模型组干预前后胃肌层 Cx43 IOD 值均降低($P < 0.05$)。与本组干预前比较,治疗组干预后 Cx43 IOD 值升高($P < 0.05$)。与健康组比较,模型组干预前后胃肌层 Cx43 IOD 值均降低($P < 0.05$)。与模型组比较,治疗组干预后 Cx43 IOD 值升高($P < 0.05$)。**结论** 脾气虚证大鼠胃肌层中 ICC 和 GJ 超微结构破坏,香砂六君子汤可修复脾气虚证状态下 ICC 和 Cx43 的损伤。

关键词 香砂六君子汤;Cajal 间质细胞;缝隙连接;连接蛋白 43

Repair of Xiangsha Liujunzi Decoction on Damage of Interstitial Cells of Cajal and Gap Junction in the Gastric Muscular Layer of Rats of Pi-Qi Deficiency Syndrome: an Experiment Study LI Ran, QI Qing-hui, XIE Ming-zheng, DING Bo-long, and ZHANG Sheng-lin *Department of General Surgery, Institute of Integrative Medicine, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Liaoning (116011), China*

ABSTRACT **Objective** To explore the repair of Xiangsha Liujunzi Decoction (XSLJZD) on interstitial cells of Cajal (ICC) and gap junction (GJ) in the gastric muscular layer of rats of Pi-qi deficiency syndrome (PQDS). **Methods** PQDS was established using purgative method with bitter and cold drugs in 30 healthy Wistar rats. After successful modeling they were randomly divided into the treatment group and the model group, 15 in each group. Another 15 healthy Wistar rats were recruited as the healthy control group. Rats in the treatment group were gastric administered with XSLJZD at 2 mL/100 g body weight, once daily for 14 successive days. Equal volume of normal saline was gastrically administered to those in the healthy control group and the model group. The gastric muscle tissues were taken out before modeling, before intervention, and after intervention, respectively. Ultrastructural changes of ICC and GJ were observed using transmission electron microscope (TEM). The number and distribution of Connexin43 (Cx43) were detected using immunohistochemistry. **Results** Results of TEM indicated that compared with the healthy control group, both ICC and GJ in the model group showed obvious injury. ICC and GJ were apparently repaired after intervention in the treatment group. Compared with the same group before modeling, the integrated optical density (IOD) of the Cx43 expression significantly decreased in the model group before and after intervention ($P < 0.05$). Compared with before intervention, the IOD of the Cx43

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173454)

作者单位:大连医科大学附属第一医院中西医结合研究院(大连 116011)

通讯作者:张盛林, Tel: 13074185755, E-mail: slzhang2991@outlook.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.10.1216

expression significantly increased in the treatment group ($P < 0.05$). Compared with the healthy control group, the IOD of the Cx43 expression significantly decreased in the model group before and after intervention ($P < 0.05$). Compared with the model group, the IOD of the Cx43 expression significantly increased in the treatment group ($P < 0.05$). Conclusions Ultrastructures of ICC and GJ in the gastric muscular layer of rats of PQDS were obviously damaged. XSLJZD could repair the structural damage of ICC and GJ in the gastric muscle tissues of rats of PQDS.

KEYWORDS Xiangsha Liujunzi Decoction; interstitial cells of Cajal; gap junction; connexin43

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)广泛地分布于胃肠道,是介于肠神经系统(enteric nervous system, ENS)与平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)之间的一类特殊细胞。肠神经、ICC、平滑肌细胞,三者相互连接,共同构成网络结构,作为胃肠运动的基本功能单位(basic functional unit of GI motility, BFUGM),与胃肠运动功能密切相关^[1]。许多胃肠运动障碍性疾病如:贲门失弛缓症、糖尿病胃轻瘫、先天性巨结肠等均与 ICC 分布和表达异常有关^[2,3]。缝隙连接蛋白(connexin, Cx)是构成缝隙连接(gap junction, GJ)的基本结构蛋白,是相邻细胞间进行物质交换的桥梁。其中连接蛋白 43(Connexin43, Cx43)是连接蛋白家族中最重要的一种,在维持细胞间连接通讯、信号传导中起重要作用^[4],其表达或分布异常可导致胃肠运动障碍。从现代医学来看,脾气虚证主要表现为胃肠道的吸收和运动功能低下的一种慢性损害的疾病状态。补益方香砂六君子汤可纠正胃肠运动功能障碍,有效治疗脾气虚证^[5]。那么,脾气虚证大鼠 Cajal 是否损伤? ENS-ICC-SMC 网络信号转导通路如何变化? 香砂六君子汤治疗作用又如何? 本实验以 Wistar 大鼠为研究对象,探讨脾气虚证的本质和香砂六君子汤的作用机制。

材料与方法

1 动物 健康成年 Wistar 大鼠 45 只,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,购于大连医科大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(辽)2008-0002。饲养于大连医科大学实验动物中心,标准饲料和饮水 1 周。

2 药物 脾气虚造模方药组成如下,方 I:生大黄(后下)、厚朴、枳实,按照 2:1:1 比例,常规制成 200% 浓度煎剂;方 II:广豆根、旋覆花、槟榔,按照 3:1:1 比例,常规制成 250% 浓度煎剂,由北京同仁堂药店购买及煎制,批号:119013。香砂六君子汤(党参 10 g,白术 9 g,茯苓 9 g,陈皮 9 g,半夏 12 g,甘草 6 g,香附 6 g,砂仁 6 g。水煎剂,每毫升水煎剂含生药 1 g,由北京同仁堂药店购买及煎制,批号:131206)。

3 试剂及仪器 兔抗-connexin43 单克隆抗体(批号:844180A);SABC 免疫组化试剂盒(批号:090709396B);DAB 显色剂:A:DAB × 20 倍浓缩液,B:H₂O₂ × 20 倍浓缩液,C:TBS × 20 倍浓缩液(批号:A121022);JEM-2000EX 透射电镜(日本);Nikon 光学显微镜(日本)。

4 模型制备及分组 选择 30 只大鼠,参考陈小野等^[6]方法建立脾气虚证动物模型。予方 I、方 II 隔日交替灌服。造模前 18 天,3 次/天,后 12 天 4 次/天,每 2 次灌喂间隔 ≥ 5.5 h,共 30 天;对照组按上述方法予等量生理盐水灌胃,饲养 30 天。模型制备成功后,随机分为脾气虚自然恢复组(模型组)和治疗组,每组 15 只。另选择 15 只健康大鼠作为健康对照组(健康组)。脾气虚模型制造过程中因药物毒性或误入气管,致本次实验造模成功率为 83%。于造模成功日按上述方法继续制造脾气虚大鼠 10 只,做为替补。

5 干预方法 治疗组灌胃香砂六君子汤(2 mL/100 g),健康组和模型组按照治疗组方法予等量生理盐水灌胃,各组均连续干预 14 天。

6 检测指标及方法 分别于造模前、干预前和干预后取各组胃组织。麻醉后脱颈处死,无菌条件下剖腹,迅速取出胃远端 2/3。将组织切成 1 cm × 2 cm 的片段置于 4% 戊二醛固定 2 h,用于透射电镜检测,观察 ICC、GJ 形态。将组织切成 1 cm × 1 cm 片段置于甲醛中固定 48 h,用于 Cx43 定量检测。

6.1 免疫组织化学检测 常规制备石蜡超薄切片(4 μm),ABC 法进行石蜡切片染色,置于显微镜下观察,每一标本随机选取 5 个 400 倍视野,采集图像、观察棕黄色免疫反应沉淀物。

6.2 透射电镜检测 常规制备超薄切片,厚度为 50 ~ 70 nm,载于 200 目铜栅网上,于透射电镜下观察,每个样本随机选取相同倍数 5 个视野,采集图像、观察 ICC、GJ 形态。

7 统计学方法 实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,ANOVA 法进行比较,方差齐性用 LSD 检验,方差不齐用 Tamhane's T2

检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 干预期间各组大鼠一般状态比较 健康组毛色白、光滑，食欲良好，反应灵敏，好动，体重增加，生长良好。模型组毛色枯黄，皮毛松弛，反应迟钝，精神倦怠，食欲差，便溏与便秘交替存在，体重减轻。治疗组干预 14 天后毛色光滑，精神良好，食欲增加，体重增加，便溏与便秘次数明显减少，接近健康组。

2 各组胃肠大体形态观察结果比较 健康组胃肠形态正常，蠕动规律，肠管呈粉红色，无粘连、水肿及扩张。模型组肠浆膜充血、水肿，组织脆弱，大部分肠管呈鲜红色，回盲部极度扩张，粪便潴留，可见腹水。治疗组胃肠浆膜水肿明显减轻，形态基本正常，肠管呈红色，回盲部不扩张，未见腹水。

3 各组干预前后胃肌层组织 Cx43 表达比较(图 1, 表 1) Cx43 免疫反映沉淀物为棕黄色，呈颗粒状，主要位于黏膜层、肌层中。健康组 Cx43 免疫反映沉淀物分布密集、均匀。模型组干预前后肌层见少量 Cx43 免疫反应沉淀物，部分区域未见。治疗组干预后 Cx43 免疫反应沉淀物分布均匀、密集，较对照组无明显差别。各组干预前大鼠胃肌层 Cx43 IOD 值比较，

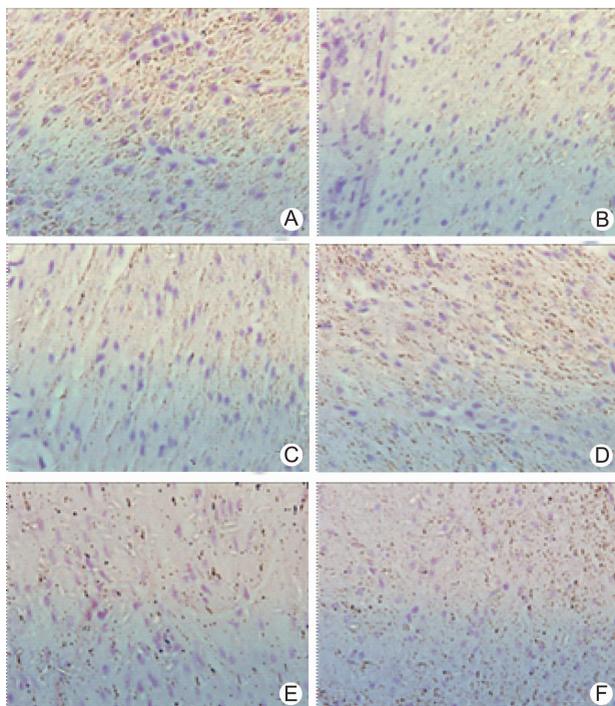
表 1 各组胃肌层组织 Cx43 表达比较 (IOD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	造模前	干预前	干预后
健康	5	17 376 ± 1 546	17 909 ± 1 337 [▲]	17 345 ± 1 398 [▲]
模型	5	16 993 ± 1 506	10 111 ± 545 [*]	13 874 ± 760 [*]
治疗	5	17 011 ± 1 489	11 697 ± 996	16 262 ± 1 012 ^{▲▲}

注:与本组造模前比较,*P < 0.05;与本组干预前比较,▲P < 0.05;与模型组同期比较,▲▲P < 0.053

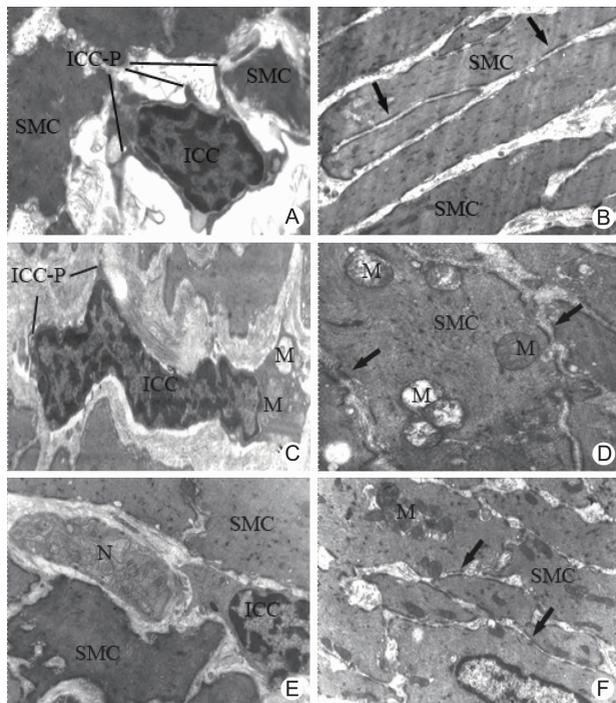
差异无统计学意义。与本组造模前比较,模型组干预前后胃肌层 Cx43 IOD 值均降低(P < 0.05)。与本组干预前比较,治疗组干预后 Cx43 IOD 值升高(P < 0.05)。与健康组比较,模型组干预前后胃肌层 Cx43 IOD 值均降低(P < 0.05)。与模型组比较,治疗组干预后 Cx43 IOD 值升高(P < 0.05)。

4 各组干预后大鼠胃肌层组织 ICC、SMC、GJ 超微结构比较(图 2) 健康组 ICC 发出 3~5 个突触与周围细胞相连,细胞核大而不规则,染色质电子密度均匀,胞质中可见丰富的线粒体、粗面内质网和滑面内质网。相邻细胞间可见典型 GJ,间隔 20~50 nm。模型组 ICC 和 SMC 明显损伤,异染色质边集,可见肿胀的线粒体和空泡形成,GJ 增宽。治疗组 ICC 和 SMC 中线粒体肿胀明显减轻,ICC、神经末梢、SMC 之间通过典型 GJ 相连,相邻细胞间隔 20~50 nm。



注:A、D为对照组;B、E为脾气虚自然恢复组;C、F为治疗组;A-C为干预前;D-F为干预后;棕黄色颗粒为Cx43表达

图 1 各组干预前后胃肌层组织 Cx43 表达 (ABC, ×400)



注:A、B为健康组;C、D为模型组;E、F为治疗组;A-C、E: ×12 000;图D: ×20 000;图F: ×15 000;ICC-P为ICC突触;N为肠神经;箭头所指为GJ;M为线粒体

图 2 各组干预后大鼠胃肌层组织 ICC、SMC、GJ 超微结构

讨 论

脾气虚证是指因脾气不足,运化失职所导致的临床以食少、腹胀、大便溏泻、神疲肢倦、舌淡苔白、脉缓弱等为常见证候。现代医学研究表明,脾气虚主要表现为胃肠道运动功能障碍、消化吸收功能降低下的一种虚损性疾病状态^[7]。促进胃肠动力的疗法能够改善消化吸收、神经体液调节紊乱以及营养物质代谢紊乱,有效防治脾气虚证^[8]。研究表明,香砂六君子汤具有抑制胃黏膜损伤,促进水肿吸收,调节内分泌及免疫功能等功效^[9]。本研究在脾气虚造模期间可明显观察到大鼠精神倦怠、毛色枯黄、食欲减退、便秘与便溏交替存在等症状,这与临床上脾气虚证的表现相吻合。经香砂六君子汤治疗 14 天后,症状明显减轻。本实验还观察到脾气虚大鼠胃肠浆膜充血、水肿,胃肠蠕动减弱,回盲部极度扩张,粪便滞留等现象,可见脾气虚大鼠存在明显胃肠运动障碍。

研究表明 ICC 是胃肠道运动的起搏点,与胃肠运动密切相关^[10]。GJ 是细胞连接形式之一,以 Cx43 最常见。Cx43 以及其构成的 GJ 和胃肠运动密切相关。如先天性巨结肠 Cx43 分布异常导致病变肠管慢波节律和兴奋传导异常,引起或加重发病^[11]。先天性巨结肠环形肌层与纵形肌之间 Cx43 表达缺失,在移行肠段表达减少^[12]。因此,观测 ICC、Cx43、GJ 的形态有助于揭示脾气虚证的本质。本研究结果提示脾气虚证致胃肠运动障碍机制可能包括 ICC 结构破坏,影响正常的起搏活动和慢波的产生,导致胃肠平滑肌的收缩节律紊乱。ICC 对神经递质的反应性降低,对肠神经发出的电学信号不能有效作出反应,这些因素都可造成运动功能的损害。本研究结果提示,香砂六君子汤能够修复或保护 ICC 的结构,使 ICC 发挥正常功能,从而保证胃肠运动的正常进行。正常的胃肠运动功能前提是 ENS-ICC-SMC 之间物质交换和信号转导功能的完整,脾气虚证大鼠胃 Cx43 的分布不均匀,抑或由 Cx43 介导的信号转导机制异常,造成 ENS-ICC-SMC 网络信号转导功能障碍。本研究中,香砂六君子汤能够保护胃肌层中 Cx43 的结构不受破坏,维持 Cx43 的数量,保证了 ENS-ICC-SMC 网络信号转导功能有序进行。本实验造模期间观察到大鼠便秘与便溏交替出现,这可能是通过上述机制,造成胃肠运动功能紊乱,食物不能完全消化或吸收所致。

本研究结果提示脾气虚证时胃 ICC、平滑肌和 GJ

结构的损伤,但损伤机制还不是十分清楚。脾气虚证影响 ICC、平滑肌细胞间信号转导,ICC-平滑肌网络损伤机制以及香砂六君子汤对脾气虚证致胃肠运动障碍的防治机制仍需继续深入研究。

(致谢:本研究得到大连医科大学中西医结合研究院成立彬、隋华和孙杰等友情帮助,在此深表谢意)

参 考 文 献

- [1] Daniel EE. Communication between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal muscle[J]. Neurogastroenterol Motil, 2004, 16(1): 118-122.
- [2] Anatol T, Mohammed W, Rao C. Interstitial cells of Cajal and intestinal function in Trinidadian children[J]. West Ind Med J, 2008, 57(4): 393-397.
- [3] Zhang H, Xu X, Wang Z, et al. Correlation between gastric myoelectrical activity recorded by multi-channel electrogastrography and gastric emptying in patients with functional dyspepsia[J]. Scand J Gastroenterol, 2006, 41(7): 797-804.
- [4] Lee HT, Hennig GW, Fleming NW, et al. The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of Cajal in human small intestine[J]. Gastroenterology, 2007, 132(5): 1852-1865.
- [5] 李冀,李浦媛,刘波. 香砂六君子汤的实验研究进展[J]. 中医药信息, 2008, 25(2): 33-34.
- [6] 陈小野,周永生,樊雅莉,等. 脾气虚证动物模型规范化的初步研究[J]. 中国医药学报, 2001, 16(4): 52-58.
- [7] 危北海,金敬善,赵子厚,等. “脾虚综合征”一种新的病证诊断学概念[J]. 中国中医基础医学杂志, 1997, 3(1): 6-9.
- [8] 彭芬,易受乡,严洁,等. 脾虚证与物质代谢改变相关性的研究概况[J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(6): 540-543.
- [9] 李向荣,于广华. 香砂六君子汤的药理研究与临床应用[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(1): 68-69.
- [10] Lammers WJ, Stephen B. Origin and propagation of individual slow waves along the intact feline small intestine[J]. Exp Physiol, 2008, 93(3): 334-346.
- [11] 张娟,王维林,张志波,等. Cajal 间质细胞和缝隙连接蛋白 43 在先天性巨结肠中的表达[J]. 中国医科大学学报, 2008, 37(2): 227-229.
- [12] Nemeth L, Maddur S, Puri P. Immunolocalization of the Gap junction protein connexin43 in the interstitial cells of Cajal in the normal and Hirschsprung's disease bowel[J]. J Pediatr Surg, 2000, 35(6): 823-828.

(收稿:2013-07-27 修回:2014-07-04)