

消痞方对糖尿病胃轻瘫大鼠胃 c-kit 基因表达变化的影响

穆 标, 曲竹秋, 刘之武, 崔海沫, 秦怡男, 熊湘明, 阳泽彬

(天津市公安医院消化科, 天津 300040)

【摘要】 目的 探讨 Cajal 间质细胞 (ICC) 在糖尿病大鼠胃轻瘫发病机制中的作用以及中药消痞方的防治疗效。方法 50 只健康雄性 SD 大鼠被随机均分为正常对照组、糖尿病模型组及消痞方低、中、高剂量治疗组。静脉注射四氧嘧啶建立大鼠糖尿病模型; 正常对照组只注射等量生理盐水。低、中和高剂量组分别用中药消痞方 5、10 和 20 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 灌胃给药; 正常对照组、模型组仅给予等量生理盐水灌胃。用营养性半固体米糊法测定胃排空率; 免疫组化法、原位杂交法分别对 c-kit 阳性的 ICC 及 c-kit mRNA 表达进行定量分析。结果 ①胃排空率: 模型组较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$); 消痞方中、高剂量组与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但较模型组及消痞方低剂量组均明显增高 ($P < 0.05$); 消痞方低剂量组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); ②c-kit 免疫组化: c-kit 阳性细胞呈棕黄色, 膜着色, 主要分布于环形肌与纵行肌间的肌间神经丛周围, 并围绕神经节细胞形成类似“鞘样”结构。各组 c-kit 阳性细胞含量的定量分析结果是: 模型组较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$); 消痞方中、高剂量组与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但较模型组明显升高 ($P < 0.05$); 消痞方低剂量组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 均显著低于正常对照组和消痞方中、高剂量组 ($P < 0.05$); ③c-kit mRNA 表达量: c-kit mRNA 阳性物质呈棕黄色, 胞质着色, 主要分布于环形肌与纵行肌间的肌间神经丛周围, 并围绕神经节细胞形成类似“鞘样”结构。c-kit mRNA 的表达量为: 模型组较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$); 消痞方中、高剂量组与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但较模型组明显升高 ($P < 0.05$); 低剂量组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但显著低于正常对照组和消痞方中、高剂量组 ($P < 0.05$)。结论 ①糖尿病胃轻瘫大鼠胃 ICC 的 c-kit mRNA 表达量减少, 导致 c-kit 含量减少, 从而影响 ICC 正常生物学功能, 结构破坏、数量减少; 进一步引起胃节律性电活动异常, 从而导致胃动力下降, 胃排空率降低, 出现一系列胃轻瘫的临床表现; ②消痞方通过调节 c-kit mRNA 表达, 发挥对糖尿病胃轻瘫大鼠胃 ICC 的保护作用。

【关键词】 糖尿病; Cajal 间质细胞; 胃动力; 消痞方

中图分类号: R285.5; R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)04-0229-04

Effect of Xiaopi prescription (消痞方) on mRNA expression of c-kit in the rat with diabetic gastroparesis
 MU Biao, QU Zhu-qiu, LIU Zhi-wu, CUI Hai-mo, Qin Yi-nan, XIONG Xiang-ming, YANG Ze-bin.
 Department of Gastroenterology, Tianjin Gong' An Hospital, Tianjin 300040, China

【Abstract】 Objective To investigate the possible role of interstitial cell of Cajal (ICC) in the pathogenesis of diabetic gastroparesis and the protective effect of "Xiaopi prescription (消痞方)". **Methods** Fifty healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 5 groups (each $n = 10$): normal, model, and 3 Xiaopi prescription groups: low, middle and high dosages. Diabetes was induced by intravenous injection of alloxan, and equal amount of normal saline was intravenously injected in the normal group. Gastric lavage method was used to administer the traditional Chinese medicine decoction of Xiaopi prescription in corresponding amount (5, 10 and 20 g · kg⁻¹ · d⁻¹) in respective low, middle and high dosage groups. In the normal control group and diabetic model group, only equal amount of normal saline was administered into the stomach. Gastric emptying rate was measured by method of nutritious semisolid paste; c-kit positive cells of ICC were quantitatively measured with immunohistochemistry assay and computer image analysis system; c-kit mRNA positive cells were quantitatively measured with in situ hybridization and computer image analysis system. **Results** ①Gastric emptying rate: The rate was significantly lower in the model group than that in the normal control group ($P < 0.05$); in the middle and high dosage groups of Xiaopi prescription, the rates were not significantly different from that in the normal control group (all $P > 0.05$), but higher than those in the model group and the low dosage group (all $P < 0.05$), respectively; and there was no marked difference between low dosage group and the model group ($P > 0.05$). ②c-kit immunohistochemistry: c-kit positive cell presented yellow in color, and its membrane was stained yellow, this kind of cells primarily were distributed around the neural plexus in the inter-space between the circular and longitudinal muscular fibers,

and around the ganglionic cells forming "sheath-like" structure. The results of numbers of c-kit positive cells in the various groups: the number of the cells in the model group was significantly lower than that in the normal group ($P < 0.05$); in the comparisons between the numbers of the cells in either the middle or high dosage groups and the number of the cells in the normal group, there were no marked differences, statistically (all $P > 0.05$), but the numbers in the former two dosage groups were obviously higher than those in the model group (all $P < 0.05$); the number in the low dosage group was not different markedly from that in the model group ($P > 0.05$), being significantly lower than that in the normal group, middle and high dosage groups (all $P < 0.05$). ③ The expression of c-kit mRNA: The positive c-kit mRNA material presented brown-yellow in color and the cytoplasm was stained, the material was distributed around the neural plexus in the inter-space between the circular and longitudinal muscular fibers, and around the ganglionic cells, forming "sheath-like" structure. The amount of the expression in the model group was significantly lower than that in the normal control group ($P < 0.05$); the amounts in the middle and high dosage groups were not markedly different from the amount in the normal group, the difference being of no significance, statistically (all $P > 0.05$), but obviously higher than those in the model group (all $P < 0.05$); the amount in the low dosage group was not different markedly from that in the model group ($P > 0.05$), being significantly lower than that in the normal, middle and high dosage groups (all $P < 0.05$). **Conclusion** ① In the stomach of rat with diabetic gastroparesis, ICC and c-kit mRNA expression are lowered, leading to the decrease of c-kit content, and the influence on the ICC normal biological function, structural destruction and decrease in number; further, the abnormality of the gastric rhythmic electric activity is induced, leading to the lowering of gastric motility and emptying rate, and eventually a series of clinical manifestations of gastroparesis; ② Xiaopi prescription can protect ICC in the stomach of rats with diabetic gastroparesis by regulating the expression of the c-kit mRNA.

【Key words】 diabetes mellitus; interstitial cell of Cajal; gastric motility; Xiaopi prescription

胃轻瘫是糖尿病的常见合并症,其不仅产生一系列消化道症状,如早饱、餐后腹胀、恶心及呕吐等,还会影响口服药物的正常吸收,因此严重影响了患者的生活质量和生命安全。关于其发病机制,目前尚不十分清楚。有关胃 Cajal 间质细胞(ICC)在其发病机制中的作用以及中药的影响目前国内外罕有报道,本研究中试图探讨 ICC 在其发病机制中的作用以及中药的防治效果。

1 材料与方

1.1 动物分组及模型制备: 清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 50 只,体重 250~270 g,购自中国军事医学科学院。实验动物按随机数字表法分为 5 组:正常对照组,糖尿病模型组,消痞方低、中、高剂量治疗组,每组 10 只。实验前大鼠先稳定 3 d、禁食 12 h,尾静脉注射四氧嘧啶 50 mg/kg 1 次,1 周后测定血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L,同时尿糖在 +++ 以上确定为糖尿病模型制备成功。正常对照组注射等量生理盐水,余处理同前。观察 12 周,每周监测大鼠体重、尿糖、24 h 进食量、饮水量、尿量,每个月测定 1 次血糖(采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法),若模型大鼠血糖 < 16.7 mmol/L 则予以剔除,整个实验过程中不使用任何降糖药。

1.2 实验用药及给药方法: 消痞方由白术、枳实、党参、炒莱菔子等组成,按比例称取,水煎、过滤,浓缩为 3 kg/L。大鼠给药量按临床成人的剂量,通过体重系数折算成低、中、高剂量,分别为 5、10 和 20 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,按 1 ml/kg 灌胃给药;正常对照组和糖尿病模型组给予相应剂量的生理盐水。自制模成功后 1 d 起开始至实验结束,每日 1 次。

1.3 实验方法

1.3.1 胃排空率测定: 胃排空率以 1-胃内容物残留率表示^[1]。实验大鼠禁食不禁水 12 h 后,给予营养性半固体米糊灌胃,用量为 10 ml/kg,灌胃 30 min 后脱颈处死大鼠,剖取全部胃肠,自幽门切迹处取胃,拭干称量,沿胃大弯剪开胃体,洗去胃内容物后拭干称重,计算胃内容物残留率。

$$\text{胃内容物残留率} = \frac{\text{全胃重} - \text{胃净重}}{\text{半固体米糊重}} \times 100\%$$

1.3.2 ICC 的 c-kit 免疫组化染色: 将大鼠脱颈处死后,剖腹迅速沿胃大弯剪开胃腔,在装有 Krebs 液的烧杯内仔细去除胃内容物。剪取胃窦全层 1 块约 1 cm \times 1 cm 组织平铺于滤纸上,置于体积分数为 10% 的甲醛水溶液中固定。兔多克隆抗体 c-kit (美国 Labvision 公司),PV6001 (北京中杉生物制品有限公司),3,3'-二氨基联苯胺 (DAB,天津灏洋生物技术有限公司)。采用 PV 两步法测定。光学显微镜下观察 c-kit 阳性产物为棕黄色,主要为细胞膜着色。

作者简介: 穆 标 (1971-),男(回族),天津市人,博士,副主任医师。

以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,以人胃间质瘤为阳性对照。采用计算机图像分析系统采集图像,每张切片在高倍镜下观察 5 个视野,测定 c-kit 阳性细胞胞体和突起所占面积的百分比,取其平均值进行统计。

1.3.3 ICC 的 c-kit mRNA 原位杂交:原位杂交试剂盒购自天津灏洋生物技术有限责任公司。试剂盒内包括:探针、封闭液、复合消化液(T/P/E)pH 6.4、预杂交液[50%去离子甲酰胺、5×氧化钠-柠檬酸钠缓冲液(SSC)、5×Dehard、0.5%的十二烷基硫酸钠(SDS)、100 mg/L 变性鲑精 DNA]、生物素化小鼠抗 Digoxin、高敏 TSP ABC 过氧化物酶复合物、焦碳酸二乙酯(DEPC)、DAB。探针序列:c-kit 5'-ATCCA TTCAT TCTGC TTATT CTCAT TCGT-3'。标本经石蜡包埋,行 5 μm 厚的连续切片,置于 Poly-L-Lysine 处理过的专用载玻片上。石蜡切片常规脱蜡至水化;用体积分数为 3%的过氧化氢(H₂O₂)室温孵育 10 min 去除内源性过氧化物酶,滴加消化液室温孵育 15 min 以暴露 mRNA 片段,滴加预杂交液 37 °C 湿盒孵育 2 h,0.2×SSC 洗 3 次、每次 5 min,滴加杂交液 37 °C 湿盒孵育 4 h,梯度 SSC 洗涤,滴加封闭液室温孵育,滴加高敏链霉亲和素过氧化物酶复合物(SABC)37 °C 湿盒孵育 40 min,PBS 冲洗 3 次、每次 3 min,DAB 避光显色 5 min,水洗中止反应。实验设 β-肌动蛋白(β-actin)为阳性对照,正义链探针为探针对照,无探针杂交液为阴性对照。在显微镜下观察胞质中出现棕黄色颗粒为 c-kit mRNA 阳性标志,进一步采用计算机图像分析系统采集图像并进行半定量分析,每张切片在高倍镜下观察 5 个视野,测定 c-kit mRNA 阳性细胞胞体和突起所占面积的百分比,取其平均值进行统计。

1.4 统计学处理:实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学处理采用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析,样本间的两两比较采用 *q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃排空率(表 1):糖尿病模型组及消痞方低剂量组胃排空率均较正常对照组显著降低(P 均 < 0.05)。消痞方中、高剂量组大鼠胃排空率均显著高于模型组及消痞方低剂量组(P 均 < 0.05),且与正常对照组比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05);低剂量组与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 c-kit 免疫组化形态学特点和定量分析

2.2.1 形态学特点:c-kit 阳性细胞呈棕黄色,膜着色,主要分布于环形肌与纵行肌之间的肌间神经丛周围,并且围绕神经节细胞形成类似“鞘样”结构。

2.2.2 定量分析(表 1):模型组及消痞方低剂量组大鼠胃 c-kit 阳性细胞率均显著低于正常对照组(P 均 < 0.05)。消痞方中、高剂量组大鼠胃 c-kit 阳性细胞率均较模型组及消痞方低剂量组显著升高,差异有统计学意义(P 均 < 0.05),且与正常对照组比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.3 c-kit mRNA 的定位表达及定量分析

2.3.1 形态学特点:c-kit mRNA 阳性物质呈棕黄色,胞质着色,主要分布于环形肌与纵行肌之间的肌间神经丛周围,并且围绕神经节细胞形成类似“鞘样”结构。

2.3.2 定量分析(表 1):模型组及消痞方低剂量组大鼠胃 c-kit mRNA 阳性细胞率均显著低于正常对照组(P 均 < 0.05);消痞方中、高剂量组较模型组及消痞方低剂量组显著升高,差异有统计学意义(P 均 < 0.05),且与正常对照组比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

3 讨论

1893 年,西班牙神经解剖学家 Cajal 采用甲基兰及嗜银染色法在胃肠道观察到一类特殊的间质细胞,后被称为 ICC^[2-3]。新近研究表明,胃肠道 ICC 主要有两大功能:一是作为节律性电活动的起搏点并参与电活动的传播;二是作为神经输出与平滑肌之间的中介,其和胃肠动力性疾病密切相关^[4]。

有关 ICC 在糖尿病胃轻瘫发病机制中的作用

表 1 各组大鼠血糖、胃排空率及 c-kit 和 c-kit mRNA 阳性细胞率的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血糖(mmol/L)	胃排空率(%)	c-kit 阳性细胞率(%)	c-kit mRNA 阳性细胞率(%)
正常对照组	10	4.97±0.45	39.95±9.49	2.72±0.74	2.61±0.64
糖尿病模型组	10	21.52±1.94	19.38±7.20*	0.91±0.38*	0.85±0.34*
消痞方低剂量组	10	21.92±1.84	24.02±6.09*	1.10±0.24*	1.02±0.27*
消痞方中剂量组	10	21.58±1.91	37.20±9.64 ^{bc}	2.61±0.50 ^{bc}	2.49±0.50 ^{bc}
消痞方高剂量组	10	21.79±1.66	36.61±9.50 ^{bc}	2.52±0.50 ^{bc}	2.52±0.44 ^{bc}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与糖尿病模型组比较,^b $P < 0.05$;与消痞方低剂量组比较,^c $P < 0.05$

已见一些文献报道,但仅限于形态学的观察,未进行基因调控的进一步探讨。

c-kit 基因的正常表达对于 ICC 的生长、增殖、分化和表型维持起着至关重要的作用^[5]。本实验通过免疫组化和核酸的原位杂交技术,分别从组织水平和基因分子生物学水平观察了实验各组 c-kit 的表达变化,发现 c-kit 阳性细胞主要分布于环形肌与纵行肌之间的肌间神经丛周围,并且围绕神经节细胞形成类似“鞘样”结构,细胞呈圆形或星形,胞核大圆形,胞体有多突起,相互连接形成网络,与文献结果^[6]一致。通过测定 c-kit 和 c-kit mRNA 阳性细胞面积百分比发现,模型组明显低于正常对照组,以上结果说明:糖尿病模型大鼠胃 ICC 的 c-kit mRNA 表达减少,进一步导致 c-kit 减少,从而引起 ICC 数量减少、结构破坏,最终发生胃肠电活动紊乱和胃肠运动障碍。

中医将糖尿病胃轻瘫归为“痞满”或“胃痞”范畴。其病机与糖尿病的基本病机脾虚有着密切的联系^[7-8],认为其病机为脾虚气滞,据此我们提出了健脾理气的治则。消痞方由白术、党参、枳实、炒莱菔子组成,白术为君,健脾祛湿,助脾运化;枳实下气化滞,消痞除满,为臣;党参助白术补脾养胃之功效;增加炒莱菔子消食除胀,助枳实以消痞除满。

本实验结果显示,消痞方中、高剂量治疗组大鼠一般情况较好,毛发光泽,活动力正常,食量和胃排空率接近正常对照组,且明显高于模型组,说明消痞

方对糖尿病模型大鼠的胃肠运动具有保护作用。进一步从组织水平和基因分子生物学水平探讨了其可能的作用机制,观察到:消痞方中、高剂量组 ICC 的 c-kit 和 c-kit mRNA 的表达量均接近正常,说明消痞方可能是通过调节 ICC c-kit mRNA 的表达,从而保证 ICC 发挥正常的生物学功能,维持胃肠的正常运动功能,对糖尿病胃轻瘫有一定的防治作用。

参考文献

- [1] 段长农,程宜福.小鼠半固体糊法加活性炭测定胃排空[J].皖南医学院学报,2002,21(3):184-185.
- [2] Ward S M, Sanders K M. Interstitial cells of cajal; primary targets of enteric motor innervation[J]. Anat Rec, 2001, 262(1):125-135.
- [3] Reynhout J K, Duke G E. Identification of interstitial cells of cajal in the digestive tract of turkeys (meleagris gallopavo) [J]. J Exp Zool, 1999, 283(4-5):426-440.
- [4] Hanani M, Freund H R. Interstitial cells of cajal-their role in pacing and signal transmission in the digestive system [J]. Acta Physiol Scand, 2000, 170(3):177-190.
- [5] Ward S M, Ordög T, Bayguinov J R, et al. Development of interstitial cells of cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves[J]. Gastroenterology, 1999, 117(3):584-594.
- [6] 董卫东,刘宝华,张连阳,等.慢传输性便秘患者乙状结肠组织中 Cajal 间质细胞的分布[J].中华外科杂志,2004,42(14):853-856.
- [7] 孙维峰.糖尿病从脾论治的体会[J].云南中医学院学报,2001,24(3):34-41.
- [8] 石志乔.中西医结合治疗糖尿病肠病 20 例[J].中国中西医结合急救杂志,1998,5(10):470.

(收稿日期:2007-12-20)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅《中国中西医结合急救杂志》

《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办、天津市天和医院承办的全国性科技期刊(为中国中西医结合学会系列杂志之一,由《中西医结合实用临床急救》杂志更名),是我国中西医结合急救医学界权威性学术期刊,已进入国内外多家权威性检索系统。本刊为双月刊,64页,国际通用16开大版本,80克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理2008年的订阅手续,邮发代号:6-93,定价:每期7.6元,全年45.6元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误,请将刊物寄回编辑部调换,我们将负责免费邮寄新刊。

《中国中西医结合急救杂志》已经进入美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”、“em120.com 危重病急救在线”以及国家中医药管理局“中国传统医药信息网”(http://www.Medicine China.com)。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。

《中国中西医结合急救杂志》开设有述评、专题讨论、博士论坛、论著、研究报告、经验交流、病例报告、治则·方剂·针灸、基层园地、临床病理(病例)讨论、消息、读者·作者·编者等栏目,欢迎广大作者踊跃投稿。同时,本刊倡导学术争鸣,对所投稿件将予以重视,优先考虑。

2008年以前的合订本和单行本请在杂志社发行部电话订阅:022-23042150。

地址:天津市和平区睦南道122号天和医院内;邮编:300050。

(本刊编辑部)