

半夏泻心汤调节胃电节律失常大鼠胃窦 Cajal间质细胞自噬的作用

张迪¹, 李雨静¹, 吉静¹, 张冬梅², 陈萌^{1*}

(1. 北京中医药大学 中医学院, 北京 100029;

2. 北京中医药大学 东直门医院, 北京 100700)

[摘要] 目的:通过观察半夏泻心汤对于胃电节律失常大鼠胃窦组织中Cajal间质细胞(ICCs)自噬的影响,探究其保护作用及调节机制。方法:32只SD大鼠随机分为正常组、模型组、半夏泻心汤组(24.68 g·kg⁻¹)及多潘立酮组(2.7 mg·kg⁻¹)。通过“隔日进食+饮稀盐酸”法建立胃电节律失常大鼠模型,给予半夏泻心汤及阳性药多潘立酮进行干预。每周记录大鼠体质量;生物机能实验系统记录大鼠胃电活动;透射电子显微镜观察大鼠胃窦组织超微结构变化;免疫荧光双标法检测大鼠胃窦组织中酪氨酸激酶受体(c-kit)/自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1)共表达情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃窦组织中微管相关蛋白1轻链3(LC3)B、p62蛋白表达,并计算LC3B II/I。结果:与正常组比较,模型组大鼠体质量减轻($P<0.01$);胃电主频率、主功率下降($P<0.01$);电镜下观察到胃窦ICCs超微结构损伤,细胞器变性坏死,可见少量自噬泡;免疫荧光双标结果显示,胃窦组织中c-kit阳性表达减低,Beclin1阳性表达增加;Western blot结果显示,胃窦组织中LC3B II/I增加($P<0.01$),p62蛋白表达减低($P<0.01$)。与模型组比较,半夏泻心汤及多潘立酮能够增加大鼠体质量($P<0.01$),升高胃电主频率、主功率($P<0.01$),修复胃窦ICCs超微结构损伤,上调胃窦组织中c-kit阳性表达并下调Beclin1阳性表达,上调胃窦组织中p62表达($P<0.05$);半夏泻心汤能够抑制胃窦组织中LC3B I转化为LC3B II($P<0.05$)。结论:半夏泻心汤能够通过调节自噬相关蛋白的表达,降低ICCs细胞自噬,调节ICCs的数量及结构,从而改善大鼠胃电节律失常,阐释了半夏泻心汤治疗“心下痞”的作用内涵。

[关键词] 半夏泻心汤;Cajal间质细胞;自噬;胃电节律失常;心下痞

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R573 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)06-0055-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230137

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20221228.1740.003.html>

[网络出版日期] 2022-12-29 17:00:44

Banxia Xiexintang Regulates Autophagy of Interstitial Cells of Cajal in Gastric Antrum of Rats with Gastric Electric Dysrhythmia

ZHANG Di¹, LI Yujing¹, JI Jing¹, ZHANG Dongmei², CHEN Meng^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Banxia Xiexintang on the autophagy of interstitial cells of Cajal (ICC) in the gastric antrum of rats with gastric electric dysrhythmia, and explore the protective effect and regulatory mechanism. **Method:** Thirty-two SD rats were randomly assigned into a normal group, a model group, a Banxia Xiexintang (24.68 g·kg⁻¹) group, and a positive drug (2.7 mg·kg⁻¹) group. The rat model of gastric electric dysrhythmia was established by the method of dieting every other day and drinking dilute

[收稿日期] 2022-10-28

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174270)

[第一作者] 张迪,在读博士,从事仲景学说的多维实证探析研究,E-mail:20180931015@bucm.edu.cn

[通信作者] *陈萌,博士,教授,博士生导师,从事仲景学说的多维实证探析研究,E-mail:chinmed@yeah.net

hydrochloric acid, and Banxia Xiexintang and the positive drug were administrated for intervention. The body weight of each rat was recorded weekly. The gastric electric activity was recorded by the biological function experimental system. The ultrastructural changes of the gastric antrum tissue were observed by a transmission electron microscope. The co-expression of receptor tyrosine kinase (c-kit)/mammalian homolog of yeast Atg6 (Beclin1) in the gastric antrum tissue was detected by double immunofluorescence labeling method. The expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) and p62 protein in the gastric antrum tissue was determined by Western blot, and the LC3B II / I ratio was calculated. **Result:** Compared with the normal group, the modeling reduced the body weight ($P<0.01$) and decreased the dominant frequency and dominant power of gastric electricity ($P<0.01$). In addition, the modeling caused ultrastructural damage of ICCs in gastric antrum, degeneration and necrosis of organelles, and appearance of a small number of autophagic vesicles. The results of double immunofluorescence labeling showed that the modeling inhibited the positive expression of c-kit and promoted the positive expression of Beclin1 in gastric antrum tissue. Western blot results showed that the modeling increased the ratio of LC3B II / I ($P<0.01$) and down-regulated the expression of p62 protein ($P<0.01$) in the gastric antrum tissue. Compared with the model group, Banxia Xiexintang and the positive drug increased the body weight ($P<0.01$) and the dominant frequency and dominant power of gastric electricity ($P<0.01$), repaired the ultrastructural damage of ICCs in gastric antrum tissue, promoted the positive expression of c-kit and inhibited the positive expression of Beclin1 in the gastric antrum tissue. Furthermore, Banxia Xiexintang up-regulated the expression of p62 ($P<0.05$) and inhibited the transformation of LC3B I into LC3B II in gastric antrum tissue ($P<0.05$). **Conclusion:** By regulating the expression of autophagy-related proteins, Banxia Xiexintang can reduce the autophagy and regulate the number and structure of ICCs and thus improve the gastric electric rhythm of rats, which preliminarily explains the mechanism of Banxia Xiexintang in the treatment of epigastric stuffiness.

[Keywords] Banxia Xiexintang; interstitial cells of Cajal; autophagy; gastric electric dysrhythmia; epigastric stuffiness

近年来,胃肠动力障碍性疾病(DGIM)在世界范围内广泛流行,尤其是在年轻人中发病率越来越高,是全球常见的公共健康问题,并导致相当大的医疗费用开支^[1-2]。目前,人们对胃肠动力调节机制方面的研究主要集中于胃肠激素、神经递质、肠道菌群、苦味受体、离子通道及平滑肌细胞等^[3]。胃肠道运动受平滑肌细胞电活动调控,平滑肌慢波被认为是消化道的动力基础,而Cajal间质细胞(ICC)则被认为是胃肠慢波活动的起搏细胞及维持基本电节律的主要传播细胞,具有引起胃肠平滑肌的慢波活动、促进电活动的传播、介导神经传递,产生一氧化氮(NO)并放大抑制性神经传递的作用^[4-6]。研究表明 ICCs 数量、形态和结构的异常变化与 DGIM 发病关系密切^[7],而 ICCs 网络结构及数量动态平衡遭到破坏的重要原因则是由于 ICCs 出现了过度自噬^[8]。因此,以 ICCs 为靶点进一步深入研究,探索通过调控上游信号分子等方式干预 ICCs 自噬的发生,有利于防治 DGIM。

中医学多以症状来命名 DGIM,包括痞证、

暖气、呕吐、呃逆、反胃等。从现代医学的角度来看,心下痞证的形成与胃肠运动功能紊乱,尤其是与胃肠动力减弱具有很强的相关性。半夏泻心汤是治疗“心下痞”的经典方剂,课题组前期在体内实验研究中观察到半夏泻心汤能够上调胃电节律失常大鼠中减少的 ICCs,同时在体外实验研究中证实,半夏泻心汤药物血清能够抑制 ICCs 数量减少,从而发挥调节胃肠动力的作用^[9-11]。因此本研究从细胞自噬角度切入,观察半夏泻心汤对于胃电节律失常大鼠中 ICCs 自噬调节的作用,进一步阐释半夏泻心汤治痞的科学内涵。

1 材料

1.1 动物 32只 SPF级 SD 雄性大鼠,体质量 160~180 g,购于北京斯贝福生物技术有限公司,实验动物合格证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于北京中医药大学 SPF 级动物房,室温 25~26 °C,湿度 50%~60%。本实验由北京中医药大学实验动物伦理委员会审批通过,审批编号 BUCM-4-2021091303-3082。

1.2 药物与试剂 半夏泻心汤所需中药免煎颗粒购自于北京康仁堂药业有限公司,根据2020年版《中华人民共和国药典》及北京康仁堂药业有限公司内控质量标准检验合格,所用中药及其批号为法半夏(21003871)、黄芩(19039941)、黄连(19023701)、干姜(21002701)、炙甘草(19037111)、党参(21000301)、大枣(20002431);多潘立酮片(西安杨森制药有限公司,批号LDJ0272);分析纯盐酸(北京化工厂有限责任公司,批号20210126);酪氨酸激酶受体(c-kit)抗体(美国Santa Cruz公司,批号sc-365504);自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1)抗体、微管相关蛋白1轻链3(LC3)B抗体、p62抗体、辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗兔H&L(FITC)抗体、HRP缀合的山羊抗小鼠H&L(Cy3)抗体、HRP标记的山羊抗兔二抗、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab55878、ab48394、ab56416、ab6717、ab97035、ab6721、ab181602);BCA蛋白测定试剂盒(凯基生物,批号KGP902);DAPI染液(碧云天生物技术有限公司,批号C1002)。

1.3 仪器 BL-420S型生物机能实验系统(成都泰盟软件有限公司);HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);TCS SP8型激光共聚焦显微镜(日本Sanyo公司);PP-1150型电泳仪、MP-3030型转移槽(北京Cavoy公司);5424R型高速离心机(德国Eppendorf公司);BSA224S型电子天平(北京赛多利斯有限公司);DS-U3型成像系统(日本Nikon公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及干预措施 将32只SPF级SD大鼠按照随机数字表法随机选取8只作为正常组,其余大鼠根据文献[12]及前期研究^[13],通过“隔日进食+饮稀盐酸”的方法建立胃电节律失常大鼠模型,即逢单日进食,双日禁食,自由饮水,每升饮水中加入 $10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸10 mL,打乱其正常饮食节律,破坏其胃内酸碱环境。造模4周后,通过BL-420S生物机能实验系统评价模型建立是否成功,并将大鼠随机分为模型组、半夏泻心汤组、多潘立酮组。

半夏泻心汤由法半夏42 g,黄芩、干姜、党参、炙甘草各46.875 g,黄连15.625 g,大枣30 g组成^[14]。参照《药理实验方法学》中人(70 kg)和大鼠(200 g)间按体表面积折算出的等效剂量,按单位体质量换算,大鼠的等效剂量约为人的6.3倍,分别换算求得

大鼠所用法半夏、黄芩、干姜、党参、炙甘草、黄连、大枣为 $3.78、4.2、4.2、4.2、4.2、1.4、2.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,以蒸馏水混匀相应药物,煮沸后,置于磁力搅拌器中不断搅拌至完全溶解,并浓缩为含生药质量浓度为 $24.68\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的半夏泻心汤溶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用;多潘立酮组所用多潘立酮片换算成大鼠等效剂量为 $2.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,以蒸馏水溶解混匀为含药物质量浓度为 $2.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多潘立酮混悬液。大鼠造模后24 h开始,药物干预组每日给予相应药液($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃1次;正常组和模型组以等体积蒸馏水灌胃,连续干预2周。

2.2 数据收集与标本采集 每周同一时间称取大鼠体质量并记录;各组大鼠于末次灌胃给药后,禁食不禁水24 h,1%戊巴比妥钠 $0.42\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,记录胃电活动30 min后,将新鲜胃窦全层组织分别剪成 $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ 、 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 小块,用预冷的生理盐水冲洗干净至无残存内容物,黏膜朝上,分别置于4%多聚甲醛固定液用于光镜观察及2.5%预冷的戊二醛固定液中用于电镜观察,剩余胃窦组织置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并保存,用于分子生物学检测。

2.3 胃电活动记录 BL-420S生物机能实验系统参数设定为扫描速度 $2.5\text{ s}/\text{div}$,时间常数3 s,高频滤波1 kHz,采集频率400 Hz。大鼠处于平稳麻醉状态后,背位固定于鼠板,剪去大鼠腹部正中线脐部区域的毛发,常规消毒。将Ag/AgCl针状电极垂直刺入自幽门向上0.5 cm胃窦处,测定胃电慢波主频率和主功率,描记时间30 min。

2.4 透射电子显微镜观察大鼠胃窦组织超微结构变化 将置于2.5%戊二醛固定液中胃窦组织取出,依次按照梯度乙醇脱水、渗透包埋、聚合、超薄切片、染色步骤进行,透射电镜下观察大鼠胃窦组织超微结构变化,每组随机选取3张切片于80 kV下采集图像($\times 8000$),并进行分析。

2.5 免疫荧光双标法检测大鼠胃窦组织中c-kit/Beclin1共表达情况 将置于4%多聚甲醛固定液中胃窦组织取出,依次按照梯度乙醇脱水、透明、石蜡包埋、切片步骤进行。石蜡切片脱蜡至水,EDTA抗原修复缓冲液修复。PBS清洗后,加入自发荧光淬灭剂。流水冲洗后,5% BSA封闭。加一抗c-kit(1:100)和Beclin1(1:100), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;依次加入HRP缀合的山羊抗小鼠H&L(Cy3)(1:500)、HRP缀合的山羊抗兔H&L(FITC)(1:500),避光室温孵育1 h。DAPI复染细胞核,避光室温孵育10 min。PBS洗涤,抗荧光淬灭封片剂封片,于激光

共聚焦显微镜下观察 c-kit/Beclin1 共表达, 每张切片分别选取 3 个视野采集图像 ($\times 400$), Image J 软件统计分析荧光表达面积。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠胃窦组织中 LC3B、p62 蛋白表达水平 各组称取大鼠胃窦组织 100 mg, 按照 1:9 的比例进行总蛋白提取液裂解, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min (离心半径为 10 cm), 取上清; BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白上样缓冲液均一化处理; 蛋白样品置于沸水中煮 10 min 使其变性; 配制 SDS-PAGE 凝胶 (13% 分离胶, 5% 浓缩胶); 每孔总量 $60\ \mu\text{g}$ 进行湿转膜, 封闭, 1:2 000 稀释一抗 LC3B, 1:1 000 稀释一抗 p62, 1:5 000 稀释内参 GAPDH; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜; 1:5 000 稀释以 HRP 标记的山羊抗兔二抗, 室温孵育 2 h, 洗膜; ECL 显色, 化学发光成像系统成像、拍照。采用 Image J 软件读取条带灰度值, 以目的蛋白与内参 GAPDH 灰度值之比表示蛋白的相对表达量。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。服从正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。若方差齐, 两两比较用最小显著性差异法 (LSD)-*t* 法; 若方差不齐, 两两比较用非参数检验 (Kruskal-Wallis 检验), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对胃电节律失常模型大鼠体质量的影响 与正常组比较, 大鼠造模成功后体质量显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 半夏泻心汤及多潘立酮干预后, 大鼠体质量均明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 半夏泻心汤对胃电节律失常模型大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of Banxia Xiexintang on body weight of rats with gastric electric dysrhythmia ($\bar{x} \pm s$, $n=8$) g

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	造模后	给药后
正常组		409.90 \pm 26.38	469.96 \pm 32.15
模型组		286.08 \pm 9.28 ²⁾	306.83 \pm 6.98 ²⁾
半夏泻心汤组	24.68	261.44 \pm 11.75 ^{2,4)}	438.06 \pm 11.71 ^{2,4)}
多潘立酮组	2.7×10^{-3}	251.28 \pm 9.65 ^{2,4)}	429.23 \pm 14.80 ^{1,3)}

注: 与正常组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2-表 4 同)

3.2 对胃电节律失常模型大鼠胃电活动的影响 与正常组比较, 模型组大鼠胃电主频率、主功率显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 半夏泻心汤及多潘立酮干预后, 大鼠胃电主频率、主功率显著升高

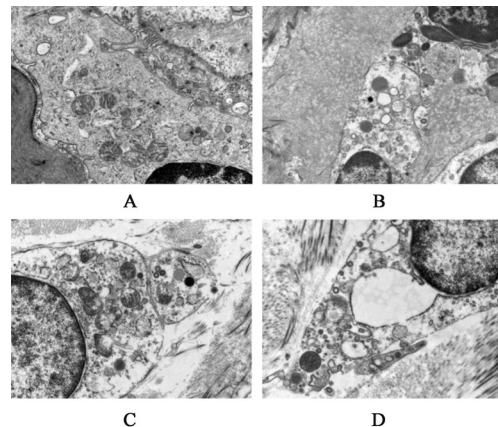
($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 半夏泻心汤对胃电节律失常模型大鼠胃电活动的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effect of Banxia Xiexintang on gastric electric activity in rats rats with gastric electric dysrhythmia ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	主频率/mHz	主功率/mV
正常组		2.23 \pm 0.95	1.71 \pm 0.27
模型组		0.97 \pm 0.33 ²⁾	0.75 \pm 0.24 ²⁾
半夏泻心汤组	24.68	2.52 \pm 0.92 ⁴⁾	1.65 \pm 0.38 ⁴⁾
多潘立酮组	2.7×10^{-3}	2.90 \pm 0.96 ⁴⁾	1.66 \pm 0.51 ⁴⁾

3.3 对胃电节律失常模型大鼠胃窦组织超微结构的影响 正常组大鼠胃窦 ICCs 超微结构清晰, ICCs 数量较多, 体积较大, 形态较好, 呈椭圆形或梭形, 含有丰富的细胞器, 线粒体轻度肿胀, 可见少量溶酶体; 模型组大鼠胃窦 ICCs 超微结构损伤, 细胞器变性坏死, 线粒体肿胀, 甚至空泡化, 溶酶体数量较多, 可见少量自噬泡; 与模型组比较, 半夏泻心汤及多潘立酮干预后, 胃窦 ICCs 超微结构较为完整, 细胞器数量增加, 可见少量溶酶体, 未见明显自噬结构。见图 1。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 半夏泻心汤组; D. 多潘立酮组 (图 2 和图 3 同)

图 1 半夏泻心汤对胃电节律失常模型大鼠胃窦组织超微结构影响 (电镜, $\times 8\ 000$)

Fig. 1 Effect of Banxia Xiexintang on ultrastructure of gastric antrum tissue of rats with gastric electric dysrhythmia (TEM, $\times 8\ 000$)

3.4 对胃电节律失常模型大鼠胃窦组织中 c-kit/Beclin1 共表达的影响 免疫荧光双标结果显示, 细胞核呈蓝色; c-kit 标记的 ICCs 阳性表达呈荧光红色, 位于肌层之间, 形状为椭圆形或梭形; Beclin1 阳性表达呈荧光绿色。半定量分析结果显示, 与正常组比较, 模型组 c-kit 蛋白表达减低, Beclin1 蛋白表

达增加,但差异无统计学意义;与模型组比较,半夏泻心汤及多潘立酮干预后,c-kit蛋白表达增加,

Beclin1蛋白表达减低,但差异无统计学意义。见图2、表3。

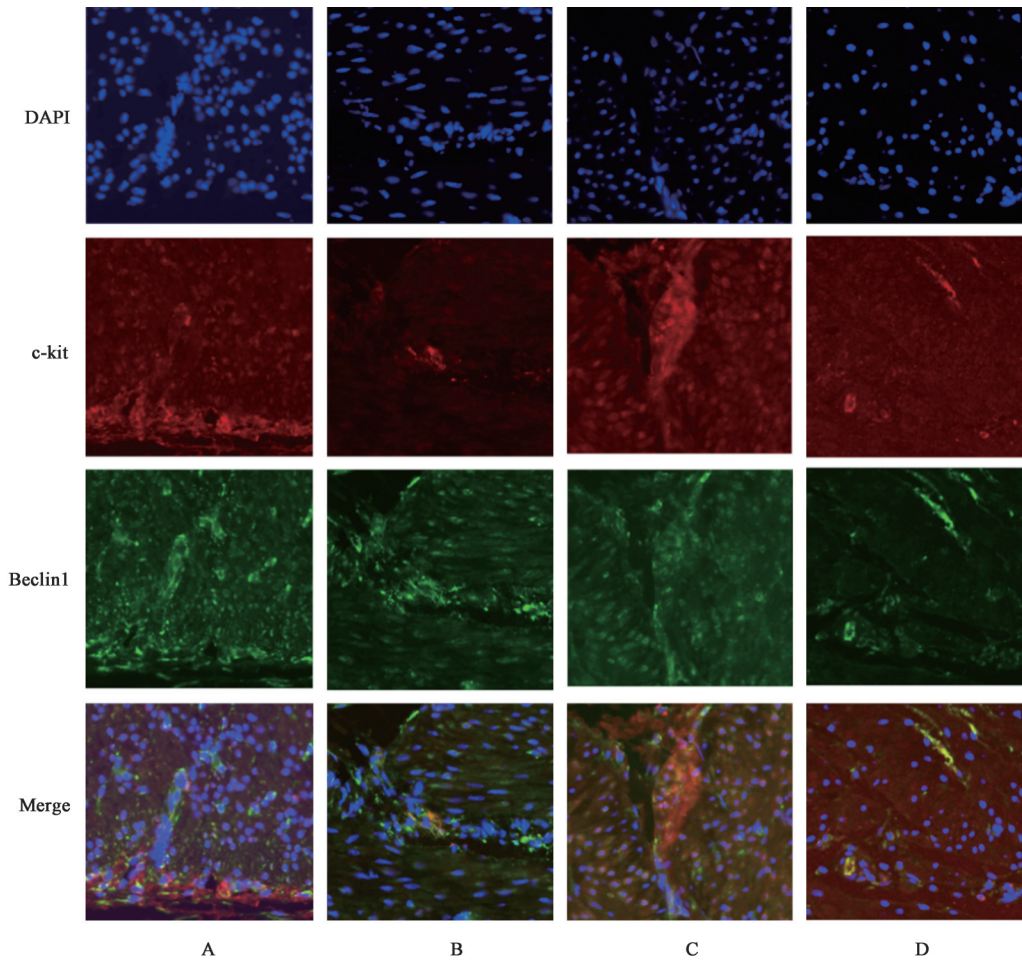


图2 半夏泻心汤对胃电节律失常模型大鼠胃窦组织中c-kit/Beclin1共表达的影响(免疫荧光双染,×400)

Fig. 2 Effect of Banxia Xiexintang on co-expression of c-kit/Beclin1 in gastric antrum tissue of rats with gastric electric dysrhythmia (double IF, ×400)

表3 半夏泻心汤对大鼠胃窦组织中c-kit/Beclin1共表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Banxia Xiexintang on co-expression of c-kit/Beclin1 in gastric antrum tissue of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	c-kit /平均荧光强度	Beclin1 /平均荧光强度
正常组		23.29±0.88	21.83±3.25
模型组		17.11±4.16	30.49±0.67
半夏泻心汤组	24.68	22.68±5.85	16.15±5.30
多潘立酮组	2.7×10 ⁻³	21.27±2.75	13.61±0.35

3.5 对大鼠胃窦组织中LC3B、p62蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠胃窦组织中LC3B I、LC3B II蛋白表达、LC3B II/I显著增加($P<0.01$),p62蛋白表达显著减低($P<0.01$);与模型组比较,多潘立酮干预可以显著下调LC3B I蛋白表达($P<0.01$)。半夏泻心汤干预可以下调LC3B I

和LC3B II蛋白表达,多潘立酮组可以下调LC3B II蛋白表达,但差异无统计学意义。半夏泻心汤组可以下调LC3B II/I($P<0.05$),多潘立酮可以下调LC3B II/I,但差异无统计学意义。半夏泻心汤和多潘立酮干预可以上调p62表达($P<0.05$)。见图3、表4。

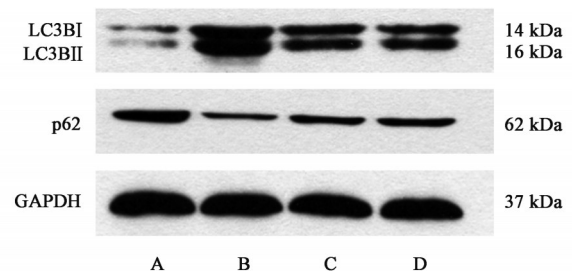


图3 胃电节律失常模型大鼠胃窦组织LC3B、p62蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of LC3B, p62 protein expression in gastric antrum tissue of rats with gastric electric dysrhythmia

表4 半夏泻心汤对胃电节律失常模型大鼠胃窦组织中LC3B、p62蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Banxia Xiexintang on expression of LC3B and p62 in gastric antrum tissue of rats with gastric electric dysrhythmia ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LC3B I /GAPDH	LC3B II /GAPDH	LC3B II / I	p62/GAPDH
正常组		0.17±0.06	0.11±0.05	0.66±0.26	0.55±0.07
模型组		0.49±0.08 ²⁾	0.60±0.16 ²⁾	1.23±0.30 ²⁾	0.31±0.07 ²⁾
半夏泻心汤组	24.68	0.45±0.05	0.40±0.11	0.88±0.23 ³⁾	0.40±0.07 ³⁾
多潘立酮组	2.7×10 ⁻³	0.38±0.04 ⁴⁾	0.37±0.10	0.95±0.22	0.40±0.07 ³⁾

4 讨论

DGIM是胃电节律紊乱、胃排空下降、胃窦动力指数降低及消化间期移行性运动复合波Ⅲ期(强力收缩期)持续时间缩短或缺失等一系列表现的总称^[15]。近年来,中医药在DGIM的治疗上越来越受到临床医生青睐,半夏泻心汤由辛温的法半夏、干姜,苦寒的黄连、黄芩,甘补的党参、大枣、甘草组成,全方和阴阳、顺升降、调虚实,实为“消痞散结”(调节胃肠动力)之良方。随着近年来胃肠动力障碍性疾病发生率的不断上升,针对胃运动功能方面的机制研究也逐渐深入,但半夏泻心汤通过调节ICCs自噬进而调节胃运动的研究鲜有报道。

ICCs被称为胃肠道平滑肌电活动的“起搏器”,在维持正常胃运动中起着重要作用。临床研究发现,胃食管反流病患者食管体中ICCs数量明显减少伴有结构异常^[16],而肝硬化患者胃肠道中ICCs数量减少及结构破坏,不仅会导致胃肠动力异常出现恶心、呕吐、腹胀等消化不良症状,也是腹水迁延不愈的重要发病原因^[17]。ICCs是胃肠动力障碍性疾病的关键治疗靶点,维持其数量及结构的稳定有助于恢复正常的胃肠生理运动。酪氨酸激酶受体c-kit是ICCs特异性表达的蛋白,调控ICCs的增殖、表型与功能维持。c-kit蛋白表达减少可使ICCs数量减少,引起胃肠运动功能障碍^[18]。在本研究中,胃电节律失常大鼠体质量减轻,胃电主频率及功率降低,胃窦中c-kit蛋白表达减低,经过半夏泻心汤药物干预后,大鼠体质量逐渐恢复,胃电主频率及功率升高,胃窦中c-kit蛋白表达增加,提示半夏泻心汤能够改善胃电节律失常大鼠胃电活动,上调c-kit蛋白表达,从而增加胃窦中ICCs数量,调节胃运动,进而增加模型大鼠的体质量,与课题组前期研究结果一致^[11]。

自噬是通过胞内溶酶体途径消化自身受损的细胞器或错误折叠蛋白,以维持细胞内环境稳态的自我保护过程。当细胞处于各种应激条件下,可能发生过度自噬,最终诱导细胞发生程序性死亡,而

致细胞数量减少、结构破坏、功能障碍或缺失^[19]。体内实验研究观察到,在糖尿病胃轻瘫大鼠胃组织中存在ICCs过度自噬及超微结构改变^[20],恢复ICCs数量及结构稳定后,也能够改善功能性消化不良大鼠的胃动力^[21]。ICCs是胃肠动力障碍性疾病的关键治疗靶点,而自噬调节是多种疾病潜在的治疗措施^[22],因此预防ICCs自噬的发生,有利于防治胃肠动力障碍性疾病。

自噬包括自噬体膜包裹待降解物质形成自噬小体、自噬小体-溶酶体融合产生自溶酶体和自噬底物降解3个过程^[23]。Beclin1构成自噬启动蛋白^[24],并在不同阶段干预自噬小体的形成^[25]。LC3负责调控自噬体膜的伸长延伸,其表达主要有I型和II型2种存在形式,自噬发生过程中,胞浆型LC3 I会酶解掉一小段多肽转变为膜型LC3 II,其转化率增加与自噬小体数量增加相关,因此通过LC3 II / I大小能够反应自噬发生程度。p62蛋白主要负责自噬底物的降解,自噬功能减弱时,p62会在细胞质中不断累积,与LC3相互作用,负性调节自噬活性^[26]。在本研究中,电镜下观察到胃电节律失常大鼠胃窦组织中ICCs超微结构破坏,同时c-kit蛋白表达减低,伴有自噬相关蛋白Beclin1、LC3B II / I上调及p62下调,经过半夏泻心汤药物干预后,LC3B II / I及Beclin1蛋白表达下调、p62蛋白表达上调,ICCs损伤的超微结构部分得到改善,c-kit蛋白表达增加,说明半夏泻心汤可能通过干预ICCs自噬来调控ICCs数量及功能,从而起到改善大鼠胃电节律失常的作用。

课题组前期通过体外实验研究观察到,半夏泻心汤药物血清能够通过调控细胞凋亡相关蛋白胱天蛋白酶-9(Caspase-9)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)等抑制ICCs凋亡^[10,27]。细胞凋亡是一个主动的、顺序的和程序性的细胞死亡过程,自噬是一种生存过程,其中真核细胞解受损或衰老的细胞器和蛋白质以进行细胞更新^[28]。在某些情况下,自噬既可能通过诱导细胞凋亡来促进

细胞死亡,又可能抑制凋亡促进细胞生长,这种双向调节作用根据细胞内情形而相互转化,二者均参与细胞存活的调节^[29]。然而在胃电节律失常大鼠中是否也存在 ICCs 自噬与凋亡的相互作用,有待进一步研究。

综上,本研究从 ICCs 自噬角度探讨了半夏泻心汤调节胃运动的可能机制。通过对胃电节律失常大鼠治疗前后一般状态的对比观察及胃窦中 c-kit、自噬相关蛋白表达的测定,进一步阐明了半夏泻心汤治疗“心下痞”的科学内涵。本研究也对于临床治疗 DGIM、改善患者生活质量具有积极意义,为中医诊疗提供新思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] DEANE A M, CHAPMAN M J, REINTAM B A, et al. Pathophysiology and treatment of gastrointestinal motility disorders in the acutely ill[J]. *Nutr Clin Pract*, 2019, 34(1):23-36.

[2] MILLER J, KHLEVNER J, RODRIGUEZ L. Upper gastrointestinal functional and motility disorders in children[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2021, 68(6):1237-1253.

[3] 于红珍,付明海,吉小平,等. 简述胃肠动力调节机制的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2020, 28(23):1183-1191.

[4] WARD S M, SANDERS K M, HIRST G D. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2004, 16(Suppl1):112-117.

[5] KLEIN S, SEIDLER B, KETTENBERGER A, et al. Interstitial cells of Cajal integrate excitatory and inhibitory neurotransmission with intestinal slow-wave activity[J]. *Nat Commun*, 2013, 4(5):1630.

[6] FOONG D, ZHOU J, ZARROUK A, et al. Understanding the biology of human interstitial cells of Cajal in gastrointestinal motility [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12):4540.

[7] 常宗宏,邓尚新,杨娟,等. Cajal间质细胞在胃肠动力障碍性疾病中的研究[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2019, 28(4):387-390.

[8] ANGELI T R, CHENG L K, DU P, et al. Loss of interstitial cells of Cajal and patterns of gastric dysrhythmia in patients with chronic unexplained nausea and vomiting[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(1):56-66.

[9] 王飞,陆瑞敏,王淑艳,等. 半夏泻心汤对小鼠 Cajal

间质细胞表型维持及相关钙离子通道蛋白的影响[J]. *环球中医药*, 2021, 14(1):8-13.

[10] 赵冉冉,王梦薇,王启航,等. 半夏泻心汤含药血清对大鼠胃 Cajal 间质细胞凋亡相关蛋白表达及 eNOS、NO 分泌的影响[J]. *中医杂志*, 2021, 62(10):893-897.

[11] 陈萌. 半夏泻心汤调节胃电节律的拆方研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2003.

[12] 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, doi: 10.3969/j. issn. 1009-3079. 1998. 07. 021.

[13] 李亚欢. 半夏泻心汤对胃电节律失常模型大鼠胃组织 microRNA 的影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.

[14] 柯雪帆. 现代中医药应用与研究大系·第四卷·伤寒及金匱[M]. 上海:上海中医药大学出版社, 1995:140-144.

[15] MIWA H, WATARI J, FUKUI H, et al. Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(Suppl 3):53-60.

[16] SHAFIK A, AHMED I, SIBAI O E, et al. Interstitial cells of cajal in reflux esophagitis: Role in the pathogenesis of the disease[J]. *Med Sci Monit*, 2005, 11(12):452.

[17] 邢枫,陶艳艳,李爽,等. 基于胃肠动力调节与透皮吸收探讨中药外用制剂消胀贴膏治疗肝硬化腹水的作用机制[J]. *世界中医药*, 2016, 11(7):1357-1361.

[18] SINGH R, HA S E, WEI L, et al. miR-10b-5p rescues diabetes and gastrointestinal dysmotility [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(5):1662-1678.

[19] KROEMER B L. Autophagy in aging, disease, and death: The true identity of a cell death impostor [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1):1-2.

[20] WEI X, LIN Y, ZHAO D, et al. Electroacupuncture relieves suppression of autophagy in interstitial cells of Cajal of diabetic gastroparesis rats [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2020, doi: 10.1155/2020/7920715.

[21] 潘小丽,周丽,王丹,等. 电针“足三里”对功能性消化不良大鼠胃排空及自噬信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(7):486-491.

[22] RUBINSZTEIN D C, CODOGNO P, LEVINE B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(9):709-730.

[23] KLIONSKY D J, PETRONI G, AMARAVADI R K, et al. Autophagy in major human diseases[J]. *EMBO J*,

- 2021,40(19):e108863.
- [24] XU H D, QIN Z H. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 109-126.
- [25] WEI F, JIANG X, GAO H Y, et al. Liquiritin induces apoptosis and autophagy in cisplatin (DDP)-resistant gastric cancer cells *in vitro* and xenograft nude mice *in vivo*[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(5): 1383-1394.
- [26] DIKIC I, ELAZAR Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6): 349-364.
- [27] 陆瑞敏. 基于 miRNA-451-5p 靶向 SCF/c-kit 探讨半夏泻心汤干预 ICC 凋亡的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2021.
- [28] WANG G, ZHANG T, SUN W, et al. Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106: 24-37.
- [29] MAIURI M C, ZALCKVAR E, KIMCHI A, et al. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(9): 741-752.

[责任编辑 孙丛丛]