半夏泻心汤对食管炎大鼠食管平滑肌收缩调控蛋白基因和细胞内游离钙的影响

刘晓霓*, 金秀东, 李月珍, 刘桂莲, 孙　卫
(牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江　157011)

[摘要]　**目的**: 从食管运动角度探讨半夏泻心汤防治反流性食管炎的机制。**方法**: 60 只大鼠随机分为伪手术组、模型组、阳性对照组(西沙必利)和半夏泻心汤组(BX)。采用胃-十二指肠混合反流模型; 应用多导生理信号记录仪观察离体食管肌条收缩情况; 采用 RT-PCR 的方法观察食管平滑肌收缩调控蛋白基因表达情况; 激光共聚焦的方法观察细胞内游离钙的变化。**结果**: 与模型组相比, 半夏泻心汤组大鼠食管离体肌条收缩幅度增强; 调宁蛋白和钙调蛋白结合蛋白基因表达量降低; 细胞内游离钙的浓度增加。**结论**: 半夏泻心汤防治反流性食管炎的机制可能是通过下调调宁蛋白和钙调蛋白结合蛋白基因表达, 增加细胞内游离钙的浓度进而增加食管平滑肌收缩能力实现的。

[关键词]　半夏泻心汤; 反流性食管炎; 调宁蛋白; 钙调蛋白结合蛋白; 细胞内游离钙
[中图分类号]　R285.5　　[文献标识码]　B　　[文章编号]　1005-9903(2008)11-0060-04

Influence of BX Decoction on mRNA Expression for Calponin and Caldesmon and Intracellular Free Calcium

*LIU Xiao-ni**, *JIN Xiu-dong*, *LI Yue-zhen*, *LIU Gui-lian*, *SUN Wei*
(*Mudanjiang Medical College*, *Mudanjiang*　157011, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To explore the preventive and therapeutic mechanism of BX decoction on reflux esophagitis on the basis of esophageal movement. **Methods**: Sixty rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group,

[收稿日期]　2007-12-20
[基金项目]　黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1151G059)
[通讯作者]　* 刘晓霓, Tel: (0453) 6582156-3384; E-mail: liuxiaoni888@yahoo.com.cn

model group, cisapride group and BX group. Gastrointestinal reflux models in rats were made. Physiograph was used to observe the contraction of esophageal muscle strips. An RT-PCR based assay was used to detect mRNA expression for calponin and caldesmon in esophageal smooth muscle. Intracellular free calcium was measured by laser scanning confocal microscopy. **Results**: Compared with that in model group, contractive range of esophageal muscle strips in BX group increased greatly, mRNA expression level for calponin and caldesmon decreased obviously and intracellular free calcium increased significantly. **Conclusion**: The preventive and therapeutic mechanism of BX decoction on reflux esophagitis may be due to enhancement of contraction of esophageal smooth muscle by downregulating of mRNA expression for calponin and caldesmon and increasing the intracellular free calcium.

[**Key words**] Banxiaxiexin Decoction; reflux esophagitis; calponin; caldesmon; intracellular free calcium

反流性食管炎是由多种原因导致食管粘膜暴露在反流物(胃酸、胃蛋白酶、胆盐和胰酶)的作用下出现特异性症状或粘膜损伤的一种疾病[1]。大量研究表明,反流性食管炎是引起食管腺癌的重要诱因,因此对于该病的防治具有重要意义[2]。半夏泻心汤是《伤寒论》经典名方,临床和实验研究表明,半夏泻心汤对消化系统炎症、溃疡疗效显著。实验表明半夏泻心汤可以通过增强反流性食管炎大鼠食管抗氧化应激以及调节神经内分泌等方面机制保护食管粘膜[3,4],本研究旨在从食管运动的角度探讨半夏泻心汤对反流性食管炎防治机理。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雌雄兼用,12 周龄,(200~220) g,由北京维通利华实验动物中心提供,合格证号:SCXK-2002-0003。

1.2 实验用药 半夏泻心汤干膏(法半夏 9.0 g、干姜 7.6 g、黄芩 7.6 g、黄连 2.5 g、党参 7.6 g、大枣 6.8 g、甘草 7.6 g)由北京中医药大学中药教研室制备,方中各药味均购自同仁堂药店,精密称取 10 付,加 8 倍量水,1.5 h 煎煮两次,滤过,水浴继续浓缩至稠浸膏,真空干燥(80 ℃)得干浸膏,以方中小檗碱含量作为质控标准。西沙必利(cisapride,国药准字 H10960290 西安杨森制药有限公司)。

1.3 试剂 TRIZOL(Gibco 公司);Oligd(T);dNTP,Rnase 抑制剂,M-MLV 逆转录酶,PCR-MIX,TRIS,DNA marker(Promega 公司);Agrose(ServaG 公司);EB(Sigma 公司);Calponin 上下游引物,Caldesmon 上下游引物,GAPDH 上下游引物(北京奥科生物技术有限责任公司);Fluo-3/AM(分子探针公司);HEPES,胶原酶(Ⅱ),大豆胰蛋白酶抑制剂(Sigma 公司)。

1.4 仪器 EPS-301 电泳仪(Amersham pharmacia 公司);LNICAM 型紫外分光光度计(Helios Alpha 公司);3K30 型离心机(Sigma 公司);PTC-100™ PCR 仪(MJ Research 公司);Image Master VDS 凝胶成像分析系统(Ampharmacia 公司);ACAS 575 plus 型共聚焦显微镜(Meridian 公司);多导生理信号记录仪 RM-6000 型(日本光电公司)。

2 方法

2.1 分组及给药方法 60 只大鼠随机分为伪手术组、模型组、阳性对照组(西沙必利 2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1})和半夏泻心汤组(BX, 5.7 g·kg^{-1}·d^{-1}),各 15 只。各治疗组于造模后 1 周开始 ig 给药,伪手术组 1 周后给相同量的常水,连续给药 3 周,动物于实验第 4 周末断头处死。

2.2 反流性食管炎大鼠模型的制备 采用胃-十二指肠混合反流模型[4]。

2.3 食管平滑肌离体肌条收缩实验 参考代二庆[5]实验方法制备离体食管平滑肌条,观察离体食管肌条收缩情况。收缩幅度相对变化率(%) = 各样本收缩幅度值/对照组收缩幅度平均值。

2.4 calponin mRNA 和 caldesmon mRNA 测定 总 RNA 提取参照试剂盒。用紫外分光光度计对总 RNA 进行纯度和浓度的测定,要求 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~ 2.0 之间。

RT 过程:12 μL 样品(2 μg RNA),加 2 μL Oligd(T),混匀,95 ℃ 3 min,立即置于冰上。5 μL 10mmol·L^{-1} dNTP,5 μL 5 × buffer,Rnase 抑制剂 0.5 μL,M-MLV 逆转录酶 0.5 μL,混匀离心,42 ℃ 70 min,95 ℃ 3 min,立即置冰上。PCR 反应体系:上下游引物 2 μL、PCR-MIX 12.5 μL、RT 产物 3 μL、无 RNA 酶水 7.5 μL 共 25 μL。引物以及 PCR 反应条件见表 1。PCR 扩增产物定量分析:PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,用 ImageMaster VDS 凝胶成像分析系统进行 DNA 条带光密度扫描,以平均吸光度乘以条带面积

表示总 A 值,将样品的 A 值与 GAPDH A 值的比值作为 mRNA 相对表达水平,对各组所有样品的 calponin 和 caldesmon 的 mRNA 表达进行半定量分析。

表 1 引物和 PCR 反应条件

mRNA	引物 (5'→3')	引物大小 (bp)	PCR 反应条件
calponin	上游: CCT CAA GGA CGG GAT CAT TC 下游: CAG GCT CAA ATC TCC GCT CT	305	
Caldesmon	上游: GCA GAG AGG CTG AGG TTG GA 下游: CGC TGT CTG CAG TCT GTC GT	405	95 ℃/3min; (94 ℃/30s; 55 ℃/30s; 72 ℃/60s) × 24
GAPDH	上游: TTCCAGCCTTCCTTCCTGGG 下游: TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT	250	

2.5 食管游离平滑肌细胞的制备及细胞内游离钙测定 采用 Bitar 法[6] 制备食管游离平滑肌细胞方法。将分离好的平滑肌细胞 1 mL(1×10^5 个)移入已置入玻片(10% 多聚赖氨酸处理)的六孔培养板中,贴壁 1 h 后,每孔用 1 μg·mL^{-1} 的 Fluo-3/AM DMSO 液 5 μL 负载 50 min,用 HEPES-Ringer 缓冲液冲洗 3 遍,加入 1 mL HEPES-Ringer 缓冲液平衡 10 min,将 Fluo-3/AM 的负载好的标本在共聚焦显微镜下动态观察,激发波长 506 nm,发射波长 526 nm,连续扫描 10 min。由于细胞内游离钙浓度与细胞内荧光强度成正比,故细胞内游离钙浓度的大小用细胞内荧光值的大小来表示。

2.6 统计学方法 数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS10.0 软件,采用单因素方差分析的方法进行统计。

3 结果

3.1 半夏泻心汤对反流性食管炎大鼠食管平滑肌条收缩活动的影响 结果显示,与模型组相比,半夏泻心汤组收缩幅度相对变化率显著增高($P<0.05$),提示半夏泻心汤可以提高反流性食管炎食管平滑肌的收缩能力(见表 2)。

3.2 半夏泻心汤对反流性食管炎大鼠食管平滑肌收缩调控蛋白基因的影响 与模型组相比,半夏泻心汤组 calponin mRNA 和 caldesmon mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$)(见表 3,图 1,图 2)。

表 2 半夏泻心汤对反流性食管炎大鼠食管平滑肌条收缩活动的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量(g·kg^{-1})	收缩幅度相对变化率(%)
伪手术组	—	98.74±18.43
模型组	—	44.53±8.67
西沙必利组	2.5×10^{-3}	75.68±13.22[2)]
半夏泻心汤组	5.7	61.35±11.26[1)]

注:与模型组相比比较,[1)] $P<0.05$,[2)] $P<0.01$(下同)

表 3 半夏泻心汤对反流性食管炎大鼠食管平滑肌收缩调控蛋白基因的影响($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

组别	剂量(g·kg^{-1})	Calponin mRNA	caldesmon mRNA
伪手术组	—	1.73±0.15	0.82±0.11
模型组	—	2.76±0.39	1.93±0.38
西沙必利组	2.5×10^{-3}	1.92±0.30[2)]	1.31±0.36[1)]
半夏泻心汤组	5.7	2.01±0.46[1)]	1.57±0.23[1)]

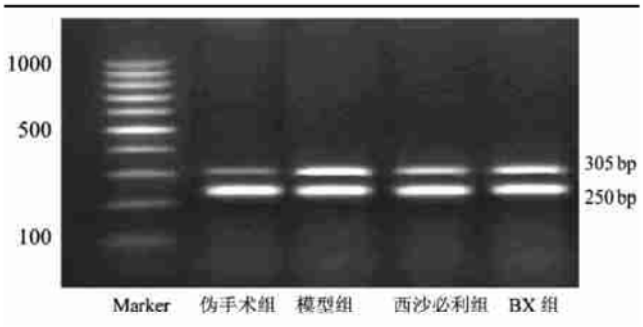

图 1 半夏泻心汤对反流性食管炎大鼠食管平滑肌 calponin mRNA 表达的影响

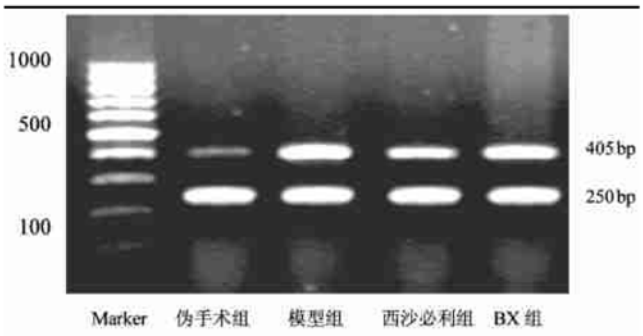

图 2 半夏泻心汤对反流性食管炎大鼠食管平滑肌 caldesmon mRNA 表达的影响

3.3 半夏泻心汤对反流性食管炎大鼠食管平滑肌细胞内游离钙的影响 与模型组相比,半夏泻心汤组食管平滑肌细胞内钙离子的荧光值显著增高($P<0.01$)(见表 4)。

4 讨论

反流性食管炎的发病机制主要是食管抗反流防御机制减弱和反流物对食管粘膜的攻击作用增

表 4 半夏泻心汤对反流性食管炎大鼠食管平滑肌细胞内游离钙的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	细胞内钙荧光值
伪手术组	—	402.40 ±66.98
模型组	—	279.60 ±39.38
西沙必利组	2.5×10^{-3}	371.00 ±45.08[2)]
半夏泻心汤组	5.7	346.80 ±33.34[2)]

强[7]。其中食管运动障碍在食管抗反流防御机制方面起着重要的作用,本研究结果显示模型组大鼠食管离体肌条的收缩能力显著下降,半夏泻心汤能显著提高食管炎大鼠食管离体肌条的收缩能力。由于食管运动的基础是食管平滑肌细胞的收缩,平滑肌细胞的收缩和舒张是由其内部的收缩蛋白质体系来实现的,因而研究不同食管运动状态下这些蛋白质的变化将有助于从分子水平阐明半夏泻心汤防治反流性食管炎的机制。calponin 和 caldesmon 是存在于平滑肌中的重要调节蛋白质。二者可抑制肌球蛋白 Mg-ATP 酶活性,抑制平滑肌磷酸化肌球蛋白所引发的肌动蛋白丝的移动。二者磷酸化后不再抑制 ATP 酶活性,有利于肌肉收缩。当平滑肌受外界刺激时,可通过 Ca^{2+} 和磷脂激活 PKC 导致 calponin 磷酸化,通过 PKC-ε 被特异性激活后,启动 MAPK 途径,通过一系列级联反应,引起 Caldesmon 间接磷酸化,进而调节平滑肌的收缩[8]。我们的研究结果显示,模型组大鼠 calponin mRNA 和 caldesmon mRNA 表达水平增高,半夏泻心汤组二者表达水平下降,有理由推测半夏泻心汤由于在基因水平通过某种直接或间接的途径抑制 calponin mRNA 和 caldesmon mRNA 的表达,进而抑制了二蛋白的表达。当平滑肌内收缩抑制蛋白 calponin 和 caldesmon 表达降低时,一方面 PKC 激活后能够充分地发挥其磷酸化 calponin 和 caldesmon 的效率,使 calponin 和 caldesmon 对肌球蛋白 Mg-ATP 酶活性和平滑肌磷酸化肌球蛋白所引发的肌动蛋白丝的移动的抑制减弱,从而食管平滑肌收缩力增强;另一方面 calponin 和 caldesmon 表达下降后,收缩蛋白与收缩抑制蛋白比例失调,导致抑制蛋白抑制平滑肌收缩作用减弱,更易促使食管平滑肌收缩。细胞内的钙离子浓度的增加是平滑肌收缩的一个主要因素,许多影响收缩的因素主要是通过影响细胞内的钙离子浓度而起作用的[9]。本研究结果表明,半夏泻心汤可以明显提高反流性食管炎大鼠食管平滑肌细胞内的钙离子浓度。导致胞浆内钙离子浓度上升的主要途径有两条:一是细胞外钙离子通过钙通道进入胞浆内;一是胞浆内钙库(内质网等)释放钙离子入胞浆。前者主要是主要通过神经冲动使电压依赖性钙通道开放或通过 cAMP 激活 APK 使钙通道磷酸化而变构开放,造成 Ca^{2+} 内流;后者主要通过 IP_3 引起细胞内质网、线粒体中 Ca^{2+} 释放入细胞浆[10]。半夏泻心汤可能通过影响神经体液的变化,一方面直接调节平滑肌细胞膜钙通道的开放或钙通道变构,胞外钙流入胞内,一方面通过某种间接机制使胞内 IP_3 和 cAMP 的含量增多,导致细胞内钙库释放钙离子,最终使得食管平滑肌细胞内的钙离子浓度增加,食管收缩能力增强。

[参考文献]

[1] Zamir D. Gastroesophageal reflux[J]. Eur J Intern Med, 2005, 16(6): 391-401.

[2] Holtmann G. Understanding GERD symptoms in the clinical setting[J]. Drugs Today (Barc), 2005, 41 Suppl B: 13-7.

[3] 刘晓霓, 高艳青, 司银楚, 等. 半夏泻心汤及类方治疗反流性食管炎作用机理的研究[J]. 中医药学刊, 2004, 22(3): 423, 432.

[4] 刘晓霓, 高艳青, 司银楚, 等. 半夏泻心汤及其类方对反流性食管炎大鼠神经降压素的影响[J]. 放射免疫学杂志, 2003, 16(4): 215-217.

[5] 代二庆, 李海英, 赵占考, 等. 和旋覆代赭汤及其拆方对大鼠离体食管肌条收缩活动的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(10): 1268-1270.

[6] Zhou L, Wang X. Effect of motilin on contrctile activity of isolated smooth muscle of stomach[J]. Acta Physic Sin, 1996, 48(2): 165-172.

[7] Kahrilas PJ, Lee TJ. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease[J]. Thorac Surg Clin, 2005, Aug, 15(3): 323-33.

[8] Rozenblum GT, Gimona M. Calponins: Adaptable modular regulators of the actin cytoskeleton[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, Jul 31.

[9] Missiaen L, De Smedt H, Droogmans G, *et al*. Calcium ion homeostasis in smooth muscle [J]. Pharmacol Ther, 1992, 56: 191-231.

[10] Hartmann H. Disturbances of the neuronal calcium homeostasis in the aging nervous system[J]. Life Sci, 1994, 55: 2011-2018.