

·方药研究·

本文引用:姜苏南,郭璇,徐寅,王小娟,郭建生,黄琳桂,谭华梁,肖麟,阳松威.舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃肠平滑肌 Bcl-2、Caspase-12 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(7):704-707.

舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃肠平滑肌 Bcl-2、Caspase-12 表达的影响

姜苏南¹,郭璇¹,徐寅²,王小娟^{2*},郭建生^{1*},黄琳桂¹,谭华梁²,肖麟²,阳松威¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 通过观察舒胃汤对功能性消化不良(functional dyspepsia,FD)肝郁脾虚证模型大鼠胃窦和幽门区 Bcl-2、Caspase-12 蛋白及 mRNA 表达的影响,探讨舒胃汤治疗 FD 的作用和机制。**方法** 将 Wistar 大鼠 60 只随机分成空白组,模型组,莫沙必利组,舒胃汤低、中、高剂量组。按改良复合病因造模法造成 FD 肝郁脾虚证模型,连续 21 d。分组干预,连续 14d。处死大鼠后,取胃窦平滑肌和十二指肠上段组织。Western-blot 法检测 Bcl-2、Caspase-12 蛋白表达;RT-PCR 法检测 Bcl-2、Caspase-12 的 mRNA 表达。**结果** Western-blot 检测发现,与空白组比,模型组 Caspase-12 表达升高而 Bcl-2 表达降低($P<0.05$);与模型组比,舒胃汤中、高组 Caspase-12 mRNA 表达显著降低($P<0.01$)。RT-PCR 检测发现,与空白组比,模型组 Caspase-12 表达显著升高而 Bcl-2 表达显著降低($P<0.01$);与模型组相比,舒胃汤低、中、高剂量组 Caspase-12 表达显著降低($P<0.01$),中、高剂量组 Bcl-2 表达显著升高($P<0.01$)。**结论** 舒胃汤可能通过调控胃窦和幽门区凋亡因子 Bcl-2、Caspase-12 的表达抑制平滑肌细胞的凋亡,从而有效地治疗功能性消化不良。

[关键词] 舒胃汤;功能性消化不良;Bcl-2;Caspase-12;细胞凋亡;柴胡;香附

[中图分类号]R285.5;R57

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.07.003

Effects of Shuwei Decoction on the Expression of Bcl-2, Caspase-12 in Gastrointestinal Smooth Muscle Rats with Functional Dyspepsia

JIANG Sunan¹, GUO Xuan¹, XU Yin², WANG Xiaojuan^{2*}, GUO Jiansheng^{1*}, HUANG Lingui¹,

TAN Hualiang², XIAO Lin², YANG Songwei¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Shuwei decoction on the expression of Bcl-2, Caspase-12 protein and mRNA in gastric antrum and pylorus of FD (functional dyspepsia) model rats with liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome, and to explore the effect and mechanism of Shuwei decoction on FD. **Methods** The 60 Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, mosapride group, Shuwei decoction low, medium and high dose groups. FD syndrome of liver stagnation and spleen deficiency was established by the method of improved complex etiology, 21 continuous days. Each group of rats were fed with the corresponding liquid 10 mL/kg, 14 continuous days. After the rats were sacrificed, the gastric antrum smooth muscle and the duodenum were selected. Western-blot method was used to detect the expression of Bcl-2 and Caspase-12 protein. The Bcl-2 and Caspase-12 mRNA expression were detected by RT-PCR assay. **Results** Western-blot detection showed that compared with the blank group, the expression of Caspase-12 in model group increased and the expression of Bcl-2 decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of Caspase-12 mRNA significantly decreased in the middle and high levels of the decoction ($P<0.01$). RT-PCR shows that compared with model group, Caspase-12 expression increased and Bcl-2 expression decreased significantly in the model group ($P<0.01$).

[收稿日期]2017-04-28

[基金项目]国家自然科学基金项目(81373577);国家自然科学基金青年项目(81403384);湖南省教育厅优秀项目(15B151)。

[作者简介]姜苏南,女,在读硕士研究生,研究方向:中药新药研究与开发。

[通讯作者]*王小娟,女,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:1047610399@qq.com;*郭建生,博士研究生导师,硕士学位,E-mail:gjs7878@126.com。

Compared with the model group, the expression of Caspase-12 in Shuwei decoction low, medium and high dose groups significantly decreased ($P<0.01$), the expression of Bcl-2 in middle and high dose groups significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** Shuwei decoction could inhibit the apoptosis of smooth muscle cells by regulating the expression of Bcl-2 and Caspase-12 in gastric antrum and pylorus, so as to effectively treat functional dyspepsia.

[**Keywords**] Shuwei decoction; functional dyspepsia; Bcl-2; Caspase-12; cell apoptosis; radix bupleuri; rhizoma cyperi

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 为临床常见疾病^[1], 但就目前而言西方医学理论对于 FD 的发病机制和病因还未完全确定, 且有关 FD 的治疗仍滞留在对症处理阶段^[2], 虽也有一定的疗效, 但长期服用西药出现的副作用较多^[3]。通过运用中医药理论来进一步明确 FD 的发病机制并探寻安全有效的防治方法已成为临床消化治疗领域研究探索的热点内容。舒胃汤由王小娟教授根据其多年治疗功能性消化不良的临床经验将逍遥散化裁而来, 临床治疗取得了较好的疗效^[4-5]。本实验从胃肠平滑肌细胞中 Bcl-2、Caspase-12 蛋白和 mRNA 表达的变化, 初步探讨舒胃汤治疗 FD 的作用与机制。

1 材料与方

1.1 实验动物与分组

Wistar 大鼠 60 只, SPF 级, 雌雄各半, 体质量 180~200 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司购入, 许可证号: SYXK(湘)2013-0005。饲养于室温 20~25 ℃, 湿度 40%~45% 的环境, 自然光照时间 12 h。按体质量和分层随机法分组设计, 将其分为 6 组: 空白组, 模型组, 莫沙必利组, 舒胃汤低、中、高剂量组, 每组 10 只。

1.2 药物与试剂

舒胃汤由柴胡 10 g, 枳实 9 g, 香附 8 g, 白术 15 g, 白芍 10 g, 延胡索 8 g, 旋覆花 8 g, 川楝子 6 g, 焦神曲 10 g 组成, 饮片由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供; 枸橼酸莫沙必利片, 鲁南贝特制药有限公司提供, 批号: 25140608; Tween-20、APS、甘氨酸 (均由美国 Sigma 提供), Protein phosphatase 抑制剂 (瑞士罗氏公司), 逆转录试剂盒 (立陶宛 Fermentas 公司), 引物 (南京金斯瑞公司), HRP goat anti-mouse、anti-rabbit IgG (美国 Proteintech) 等。

1.3 仪器

TS-92 型摇床、QL-901 型旋涡混合器 (江苏海门其林贝尔公司); 164-5050 型电泳仪 (美国 Bio-rad 公司); DYCZ-24EN 型电泳槽、DYCZ-40A 型转

膜仪 (北京六一生物科技有限公司); PIKO REAL 96 型荧光定量 RCP 仪 (美国 Thermo 公司) 等。

2 方法

2.1 药物制备

参照文献[6]大鼠与人临床用药剂量体型系数公式换算得出, 用于灌胃的舒胃汤高、中、低剂量为 30.68、15.34、7.67 g/kg, 分别相当于人临床用量 4 倍、2 倍、1 倍。舒胃汤饮片水煎至 3.068 g/mL, 密封保存。莫沙必利的剂量为 1.37 mg/kg, 相当于人临床用量的 1 倍。实验时用蒸馏水稀释为 0.137 mg/mL 溶液。

2.2 动物造模

除空白组大鼠外, 其余 5 组按改良复合病因造模法^[7](慢性束缚应激+饮食失节+过度疲劳+夹尾激怒)造成 FD 肝郁脾虚证模型。先将大鼠束缚 3 h, 再于 (22±1) ℃ 的水中游泳 10 min, 隔日给食, 并于禁食日进行夹尾激怒 0.5 h, 连续 21 d。

2.3 干预及样本处理

第 22 天起每天进行舒胃汤低、中、高剂量和莫沙必利组的相应药液灌胃, 空白组和模型组则用蒸馏水灌胃 (10 mL/kg), 每天 1 次, 连续 14 d。末次给药 2 h 后, 麻醉处死大鼠, 开腹, 结扎胃贲门和胃幽门, 迅速取出距幽门 0.5 cm 胃窦壁全层以及距幽门 2 cm 的十二指肠上段组织, -80 ℃ 冰箱存放备用。

2.4 指标检测

2.4.1 Western-blot 法检测 FD 肝郁脾虚证大鼠胃窦和十二指肠 bcl-2、Caspase-12 蛋白表达 将所取胃肠组织磨碎吹匀, 冰上裂解, 冷冻离心取上清液; SDS-PAGE 电泳; Bcl-2 转膜 30 min, Caspase-12、actin 转膜 60 min; 配好 1×TBST 中室温密封 1 h; 一抗 (Bcl-2 1:100、Caspase-12 1:500、actin 1:4 000) 恒温孵育过夜; 二抗 (1:3 000) 恒温孵育 1 h; Triton 溶液漂洗, ECL 发光液显色, 以 X 胶片显影曝光处理。

2.4.2 RT-PCR 法检测 FD 肝郁脾虚证大鼠胃窦和十二指肠 bcl-2、Caspase-12 mRNA 表达 取一定量的细胞样品, 加入 Trizol 溶液提取总 RNA。将所

取胃肠组织总 mRNA 逆转录成 cDNA, 按说明书具体的步骤进行操作。30 μ L 反应体系配制: 5 \times RT Buffer 6 μ L, Primer Mix 3 μ L, RNase-Free Water 4.5 μ L, dNTP Mix, 2.5 mM Each 6 μ L, RNA Template 6 μ L, HiFiScript, 200 U/ μ L 1.5 μ L, DTT, 0.1 M 3 μ L。扩增条件: 42 $^{\circ}$ C, 60 min; 85 $^{\circ}$ C, 10 min; 所得 cDNA 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。取微量的 RNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶图像成像分析系统观察处理。

引物序列设计为: Bcl-2-F: 5'-ATTGTGGC-CTTCTTTGAGTTCG-3'; Bcl-2-R: 5'-CCTACCCAGCCTCCGTTATCC-3' (152 bp); Caspase-12-F: 5'-TCCTGTCTTTATGTCCC-3'; Caspase-12-R: 5'-CAGTATGTCTGCCTCTGC-3' (180 bp); β -actin-F: 5'-CATCTGCGTCTGGACCTGG-3'; β -actin-R: 5'-TAATGT-CACGCACGATTTCC-3' (107 bp)。

2.5 统计学处理

所有实验数据以 Excel 录入处理, 运用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 组间计量资料对比先作正态性和方差齐性的检验, 满足方差齐性, 采用 One-way ANOVA 法进行方差分析; 若不满足方差齐性, 则采用非参数法进行检验。数据用 " $\bar{x}\pm s$ " 表示, $P<0.05$ 即差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 结果

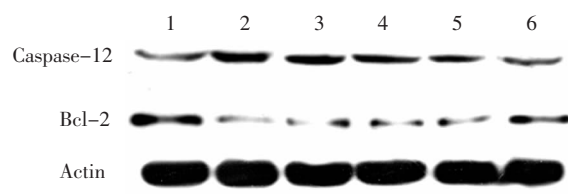
3.1 Western-blot 检测各组大鼠胃窦和幽门区 Caspase-12、Bcl-2 蛋白表达水平比较

与空白组相比, 模型组大鼠胃窦和幽门区平滑肌中 Caspase-12 表达量有较明显升高而 Bcl-2 表达量降低 ($P<0.05$)。与模型组相比, 舒胃汤中、高剂量组大鼠 Caspase-12 表达量显著降低 ($P<0.01$)。结果见表 1 和图 1。

表 1 各组大鼠胃窦和幽门区 Caspase-12、Bcl-2 蛋白表达

水平比较		$(\bar{x}\pm s, n=10)$	
组别	剂量/(g/kg)	Caspase-12/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
空白组	-	0.441 \pm 0.096	0.559 \pm 0.138
模型组	-	0.549 \pm 0.053*	0.386 \pm 0.166*
莫沙必利组	0.00137	0.493 \pm 0.080	0.416 \pm 0.132
舒胃汤低剂量组	7.67	0.460 \pm 0.100	0.411 \pm 0.127
舒胃汤中剂量组	15.34	0.411 \pm 0.113 ^{##}	0.431 \pm 0.141
舒胃汤高剂量组	30.68	0.383 \pm 0.084 ^{##}	0.500 \pm 0.146
F	-	4.828	2.221
P	-	0.001	0.065

注: 与空白组相比, * $P<0.05$; 与模型组相比, ^{##} $P<0.01$ 。



注: 1. 空白组; 2. 模型组; 3. 莫沙必利组; 4. 舒胃汤低剂量组; 5. 舒胃汤中剂量组; 6. 舒胃汤高剂量组

图 1 各组大鼠胃窦和幽门区 Caspase-12、Bcl-2 蛋白表达电泳图

3.2 RT-PCR 检测各组大鼠胃窦和幽门区 Caspase-12、Bcl-2 mRNA 表达水平比较

与空白组相比, 模型组大鼠胃窦和幽门区平滑肌中 Caspase-12 表达量显著升高而 Bcl-2 表达量显著降低 ($P<0.01$)。与模型组相比, 舒胃汤低、中、高剂量组大鼠 Caspase-12 表达量显著降低 ($P<0.01$), 中、高剂量组 Bcl-2 表达量显著升高 ($P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠胃窦和幽门区 Caspase-12、Bcl-2 mRNA

相对表达量比较		$(\bar{x}\pm s, n=10)$	
组别	剂量/(g/kg)	Caspase-12 mRNA	Bcl-2 mRNA
空白组	-	0.844 \pm 0.345	8.319 \pm 0.814
模型组	-	4.719 \pm 1.319**	1.140 \pm 0.410**
莫沙必利组	0.00137	2.270 \pm 0.551 ^{##}	5.413 \pm 1.103 ^{##}
舒胃汤低剂量组	7.67	3.675 \pm 0.567 ^{##}	1.697 \pm 0.611
舒胃汤中剂量组	15.34	1.653 \pm 0.168 ^{##}	5.133 \pm 1.293 ^{##}
舒胃汤高剂量组	30.68	1.139 \pm 0.425 ^{##}	6.173 \pm 1.777 ^{##}
F	-	48.04	58.49
P	-	0.000	0.000

注: 与空白组相比, ** $P<0.01$; 与模型组相比, ^{##} $P<0.01$ 。

4 讨论

目前中医学理论对 FD 的辨证分型虽尚未统一, 但究其病机病因, 古今医家均各有论述, 形成了脾胃气机升降失调是 FD 基本病机且为病理关键的共识。因此疏肝健脾法为治疗 FD 的根本, 舒胃汤方中, 柴胡辛行苦泄, 香附疏肝理气, 二者疏肝解郁、条达肝气共为君药, 以疏木郁之不达补土虚之不运。延胡索理气解郁, 行气止痛; 白术甘温健脾, 益气补虚; 白芍养血柔肝, 令肝气条达无犯土虚; 枳实苦降辛散, 破气消痞; 诸药合用共为臣药。旋覆花行气降气, 有较好的降逆止呕作用, 善治噎气、呕吐诸症; 川楝子舒肝, 行气止痛; 焦神曲消积化滞共为佐使药。全方运用扶土抑木之法, 使肝郁得解, 脾弱得健, 则 FD 肝郁脾虚诸症可愈。

细胞的凋亡是真核细胞在凋亡刺激信号的作用下,启动细胞死亡机制,经过信号的转导,从而致使细胞程序性变异和死亡的过程。又被称为 I 型程序性细胞死亡,受多种相关基因的调控,如 Caspase-12、Bcl-2 等。Caspase-12 是内质网应激(过度)介导细胞凋亡的途径之一。目前仅在大鼠、小鼠体内取得,人体内因基因突变而失去了调控凋亡的活性,但其异构体 Caspase4 被认为与之有相类似的作用而受到了广泛的关注。Caspase-12 被激活后进入细胞液,通过激活其他 Caspase 家族的因子来完成凋亡,提示可将 Caspase-12 作为靶点来为 Caspase-4 的研究提供实验基础。Bcl-2 是在细胞凋亡的研究中最受重视的癌基因之一,是一种抗凋亡因子,其确切的作用机制尚未阐明,一般认为其通过线粒体、细胞内 Ca^{2+} 等多种途径的共同调节,可起到抑制细胞凋亡的作用。

通过前期的相关基础与临床研究^[8-11]发现,FD 发病机制复杂多变,而又尚未十分明确,但其主要病理生理基础是胃肠动力学障碍^[12],胃肠动力障碍的形成牵涉到不同器官间功能的失调,多种细胞的信号传导受阻碍,胃肠平滑肌收缩功能失调以及相关基因、蛋白表达的不足等,而这些也可能会诱发细胞的凋亡。本实验通过检测对比发现,舒胃汤对于造成 FD 肝郁脾虚证模型大鼠的胃窦和十二指肠肌条细胞中的 Caspase-12、Bcl-2 的蛋白和 mRNA 表达有明显影响,尤其对于其 mRNA 表达进行对比分析可发现,通过舒胃汤对模型大鼠的干预,能显著降低 Caspase-12 和升高 Bcl-2 表达($P<0.01$)。即提示功能性消化不良可能与抑制胃窦和十二指肠组织平滑肌细胞凋亡有关,会受到相关凋亡因子表达的影响。因此,可认为舒胃汤可能通过抑制胃肠道起搏细胞

的凋亡,促进胃肠动力的恢复,而有效治疗 FD,但其具体的改善和调节机制还需进一步的研究与讨论。

参考文献:

- [1] Kim SE, Park HK, Kim N, et al. Prevalence and risk factors of functional dyspepsia: a nationwide multicenter prospective study in Korea[J]. J Clin Gastroenterol, 2014, 48: e12-18.
- [2] Okumura T, Tanno S, Ohhira M. Prevalence of functional dyspepsia in an outpatient clinic with primary care physicians in Japan[J]. J Gastroenterol, 2010, 45: 187-194.
- [3] 张声声,杨静.中医药治疗功能性胃肠病大有可为[J].世界华人消化杂志,2007,15(33):3457-3461.
- [4] 谭华梁,王小娟.舒胃汤治疗肝胃不和型功能性消化不良 30 例临床观察[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(9):93-94.
- [5] 李永静,郭璇,王小娟,等.舒胃汤治疗功能性消化不良肝胃不和型临床研究[J].湖南中医药大学学报.2013,33(7):65-68.
- [6] 徐叔云.药理实验方法学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2002: 202-203.
- [7] 郭海军.功能性消化不良的动物模型研究[J].中国中西医结合消化杂志,2001,9(3):141-142.
- [8] 弭艳红,郭璇,王小娟,等.舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃排空、血清干细胞因子、一氧化氮的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):159-162.
- [9] 徐寅,郭璇,弭艳红,等.舒胃汤对 FD 大鼠 P 物质与胃窦 Cajal 间质细胞的影响[J].中国实验方剂学杂志.2012,18(6):163-166.
- [10] 徐寅,王小娟,张丽明,等.舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃动素及电镜观察胃窦 Cajal 间质细胞的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2012,20(3):65-68.
- [11] 王小娟,周恒,郭璇,等.舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃肠动力及 ENS-ICC-SMC 网络超微结构的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(24):134-139.
- [12] Vanheel H, Farre R. Changes in gastrointestinal tract function and structure in functional dyspepsia[J]. Nat Rev Gastroenterol. 2013, Jan15, 10(3): 142-144.

(本文编辑 杨瑛)