

补脾方药对脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体及细胞内钙离子浓度的影响

李燕舜* 王汝俊* 王建华* 杜群* 巫燕莉*

摘要 目的:观察补脾方药对脾虚模型大鼠壁细胞胃泌素受体及细胞内钙离子浓度的影响。方法:采用 EDTA-Pronase 酶法消化大鼠壁细胞,放射配基结合实验检测胃泌素受体,双波长荧光法测定壁细胞内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)变化。结果:模型组大鼠壁细胞胃泌素受体结合位点数显著降低($P < 0.05$),经补脾方药治疗后有所升高;同时模型组大鼠壁细胞内静息 $[Ca^{2+}]_i$ 明显低于正常对照组($P < 0.01$),经胃泌素刺激后壁细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 有所升高,且模型组与党参组升高幅度明显高于正常对照组($P < 0.05$),经治疗后此状态有所恢复,但差异无显著性。结论:脾虚证可能与胃泌素受体低表达相关,且壁细胞内钙离子处于低代谢状态,但对于胃泌素刺激的反应性增强,进而可能导致酸分泌敏感性相对增高,胃黏膜易损性增强,而补脾方药对其有一定的调节作用。

主题词 脾虚/中医药疗法 健脾 壁细胞,胃/药物作用

Effects of Recipe or Herbs of Invigorating the Spleen on Gastrin Receptor and Intracellular Calcium Ion Content in Parietal Cells in Spleen Deficiency Model Rats

Li Yanwu, Wang Rujun, Wang Jianhua, et al.

(Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405)

Objective: To observe effect of recipe or herbs of invigorating the spleen on gastrin receptor and intracellular calcium ion $[Ca^{2+}]_i$ level of parietal cells in spleen deficiency model rats. **Methods:** The parietal cells of the rats were isolated by EDTA-Pronase method. Gastrin receptor was detected with radioligand binding assay and intracellular calcium ion level was determined with double wave-length fluorescence method. **Results:** The gastrin receptor binding sites of parietal cells in the model group were significantly decreased ($P < 0.01$), and they were increased after treatment by the herbs or recipe of invigorating the spleen. The intracellular resting $[Ca^{2+}]_i$ of parietal cells in the model group was significantly lower than that in the normal group ($P < 0.01$), and it increased after stimulation of gastrin. The increasing amplitude in the model group and the Dangshen group was significantly higher than that in the normal group ($P < 0.05$), and after treatment the condition was not significantly changed. **Conclusion:** Spleen deficiency syndrome is possibly related with low expression of gastrin receptor, and calcium ion of parietal cells is at low level. But the reactivity to gastrin stimulation was strengthened, possibly further inducing relative increase of sensitivity of acid secretion and injury of gastric mucosa, on which the medical herbs or recipe of invigorating the spleen have regulative action.

Key Words Spleen deficiency/TCM therapy; Strengthening the spleen; Parietal cells, stomach/drug effect

胃泌素是一种多肽激素,主要可刺激胃酸分泌和营养胃肠道黏膜,包括调节上皮细胞增殖、壁细胞及肠嗜铬样细胞(ECL细胞)分化及刺激产生表皮生长因子家族的产物^[1]。脾虚证研究发现胃肠黏膜上皮等组织结构有显著的异常表现,胃肠激素包括前列腺素、胃泌素与生长抑素、表皮生长因子含量异常^[2]。壁细胞是胃底腺分泌细胞的一种,并被证实其表达胃泌素受体,因此,我们在已建立大鼠胃壁细胞分离纯化方法及胃泌素受体放射配基结合分析法^[3~5]的基础上,对脾虚大鼠胃泌素受体结合位点数及受体后细胞内钙离子浓度的变化进行观察,并在补脾法指导下运用健脾益气

方药党参、白术、补中益气汤治疗,探讨脾虚证病理机制及补脾方药的作用。

1 材料

1.1 试剂:¹²⁵I-胃泌素(中国原子能科学研究院同位素室提供,放射性比活度为1700Ci/mmol,放化纯度>95%);[Leu¹⁵]Gastrin-17(Sigma公司产品);链霉菌蛋白酶(Pronase, Sigma公司产品);Percoll(Pharmacia公司产品);Fura-2/AM(Biotium公司产品);玻璃纤维滤膜(上海红光造纸厂生产)。

1.2 药物:唐古特大黄(纱布包裹,加适量蒸馏水,置60℃恒温箱内24小时,倒出滤液,水浴蒸发浓缩至100%备用);党参、白术水煎液(66%);补中益气汤(组成:党参10g,黄芪20g,白术10g,当归10g,陈皮6g,柴胡3g,升麻3g,炙甘草5g,水煎液100%)。

1.3 仪器:HYS-4型多头细胞收集器;SN-695B型智

基金项目:国家自然科学基金项目(30271650)

* 广州中医药大学脾胃研究所中药药理研究室,广东省广州市机场路12号(510405)

收稿日期:2005-06-15;修回日期:2005-08-27

能放免 γ 测量仪(计数效率 70%);LS-55 荧光分光光度计(Perkinelmer 公司产品);XDS-1 倒置显微镜;HZS-H 恒温水浴振荡器;TDZ5-WS 低速离心机;HJ-6 多头磁力搅拌器等。

2 方法

2.1 动物分组与造模:雄性 SD 大鼠,体重 180~200g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号:2004-A 021,大鼠按体重随机分成 5 组,即正常对照组、模型组、党参组、白术组、补中益气汤组。模型组用 100%大黄酒浸液 1ml/100g 灌胃大鼠,每天 2 次(间隔 8 小时),连续 14 天。党参组、白术组、补中益气汤组于造模第 11 天开始分别给予相应的中药煎剂 1ml/100g,连续 4 天,正常对照组给予等量蒸馏水。第 15 天处死动物,分离壁细胞,由于细胞分离过程操作烦琐,故各组造模隔日进行。

2.2 大鼠胃壁细胞分离及纯化:参照本实验室的方法^[3,4]。大鼠脱颈椎处死(不禁食),分别结扎贲门和幽门取胃,在胃底剪开小口,将胃翻转结扎形成翻转胃袋。冰冷生理盐水冲洗后注入消化液(A 液+Pronase)。将胃袋放入 A 液(NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaHCO_3 , NaCl , KCl , HEPES, Glucose, BSA, EDTA)中消化 90 分钟,同时 37℃ 水浴振荡(100 次/分),通入 95% O_2 和 5% CO_2 ,然后将胃袋放入 B 液(NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaHCO_3 , NaCl , KCl , HEPES, Glucose, BSA, CaCl_2 , MgCl_2)中在磁力搅拌作用下分散胃黏膜细胞,10 分钟后尼龙滤膜(200 目)过滤 B 液,离心(900~1000 转/分)收集细胞。此过程重复 5 次,将所有收集的胃黏膜细胞用 C 液(B 液+DTT)混悬,利用 40%、60% Percoll 进行非连续密度梯度离心,收集 60% 层面的细胞。

2.3 胃泌素受体放射配基结合实验:参考文献[5]、[6]。将壁细胞悬液调整为浓度($1\sim 2$) $\times 10^6$ /ml,根据预示多点结合实验确定¹²⁵I-胃泌素饱和终浓度为 300pM,并以此为基础做单点结合实验,计算各组大鼠胃壁细胞上胃泌素受体结合位点数。非特异结合管分别加入¹²⁵I-胃泌素 15 μ l、[Leu¹⁵]Gastrin-17 15 μ l、壁细胞混悬液 170 μ l,总结合管则用冰冷的 C 液 15 μ l 代替 [Leu¹⁵]Gastrin-17,其余加样同非特异结合管。样品加样后 37℃ 孵育 30 分钟(轻微振荡),加冰冷 C 液 800 μ l 终止反应,迅速用多头细胞收集器抽滤至玻璃纤维滤膜(用含 0.1%BSA 的 PBS 浸泡过夜),再用 C 液 2ml 淋洗滤膜 3 次,50℃ 烘干滤膜,打孔,放入一次性塑料管中计数每分钟结合位点数。每管均设复管。计算方法:特异结合(SB) = 总结合(TB) - 非特异性结合

(NSB)。

位点/细胞 =

$$\frac{\text{每分钟特异结合位点数} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{计数效率} \times 2.2 \times 10^6 \times \text{放射比度} \times \text{放化纯度} \times 10^9 \times \text{细胞数}}$$

2.4 壁细胞内钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)测定:(1) Fura-2/AM 的负载:纯化后的壁细胞活率达 90% 以上,每 2ml $[(1\sim 2) \times 10^6/\text{ml}]$ 细胞悬液加入终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ Fura-2/AM, 37℃ 避光孵育 30 分钟,离心(10000 转/分, 5 分钟),加入 C 液再离心,重复 2 次洗去残存细胞外液的 Fura-2/AM,重新加入 2ml PBS 调整细胞数至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,用 LS-55 荧光分光光度计测定细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。整个测试过程中细胞悬液处于搅拌状态,且外环境保持在 37℃。(2) 壁细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定:采用双波长荧光分光光度法,将负载 Fura-2 的细胞悬液 2ml 加入分光光度计的石英小槽内,分别测定给药前后的荧光强度变化。测定参数为:激发波长 340nm 和 380nm,发射波长 510nm,狭缝 5nm。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的计算公式: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (S_{340}/S_{380}) \times [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)]$ 。Kd 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数,为 224nmol/L;R 为每次所测得的荧光比值; S_{340} 为在无 Ca^{2+} 状态下 380nm 激发的荧光强度; S_{380} 为在饱和 Ca^{2+} 状态下 380nm 激发的荧光强度; $R_{\max}$ 为 Fura-2 的所有结合部位均为 Ca^{2+} 所饱和,即缓冲液中加入 TritonX-100(终浓度 0.1%) 所测得的 340nm/380nm; $R_{\min}$ 为所有 Fura-2 均为游离形式时所测得的荧光比值,即过量的 EGTA 存在下(终浓度为 5mmol/L, pH 值 > 8.5) 所测得的 340nm/380nm。

2.5 统计学方法:所有数据均采用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠壁细胞胃泌素受体结合位点数比较:表 1 示,模型组大鼠壁细胞胃泌素受体结合位点数显著下降($P < 0.05$),经党参、白术、补中益气汤治疗后有所升高,以白术组和补中益气汤组较为明显($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠壁细胞胃泌素受体结合位点数比较(位点/细胞, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	胃泌素受体结合位点数
正常对照组	5	465.46 $\pm$ 108.55
模型组	6	192.28 $\pm$ 80.04 *
党参组	5	306.22 $\pm$ 149.28
白术组	5	335.80 $\pm$ 83.32 Δ
补中益气汤组	5	317.33 $\pm$ 66.67 * Δ

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3.2 各组大鼠壁细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化比较:表 2 示,静息

状态下,模型组大鼠壁细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显低于正常组($P<0.01$),经治疗后3组壁细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均有所升高,但差异无显著性。各组均加入 $[Leu^{15}]-Gastrin$ (终浓度 $0.1\mu mol/L$)刺激后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均有所升高,且模型组与党参组升高幅度与正常对照组比较差异有显著性($P<0.05$)。

表2 各组大鼠壁细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	静息状态 (nmol/L)	刺激后 (nmol/L)	升高幅度 (%)
正常对照组	6	83.08 ± 14.13	88.15 ± 14.01	6.28 ± 3.61
模型组	6	$35.29 \pm 24.63^{**}$	$43.65 \pm 28.38^{**}$	$28.95 \pm 20.17^{*}$
党参组	7	$36.99 \pm 16.43^{**}$	$43.06 \pm 19.34^{**}$	$16.67 \pm 7.75^{*}$
白术组	7	66.58 ± 28.43	74.49 ± 32.46	12.59 ± 8.93
补中益气汤组	6	$46.08 \pm 23.06^{*}$	58.50 ± 37.65	23.08 ± 17.82

与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

4 讨论

脾虚证是中医临床常见的一类证候,是以消化道病理改变和功能障碍为主,累及神经内分泌免疫网络的全身性病理状态。20世纪80年代以来,脾虚证与胃肠激素关系的研究逐渐增多,其中血清及胃黏膜中胃泌素水平与脾虚证关系的报道很多,但结果不甚一致。胃泌素的生物效应是通过胃泌素受体介导的,因此本实验从离体壁细胞上的胃泌素受体入手,利用受体放射配基结合实验研究脾虚模型大鼠胃泌素受体表达及受体后信号传递。结果发现,脾虚模型大鼠壁细胞胃泌素受体结合位点数较正常大鼠明显降低,与我们前期实验利血平脾虚模型表现一致^[7],而经党参、白术、补中益气汤治疗后有所升高,以白术和补中益气汤尤为显著,与以往报道经黄芪注射液治疗效果一致^[7,8],提示胃泌素受体低表达可能与脾虚证相关,而健脾益气方药对其有显著上调作用。

钙离子是细胞生理功能的重要物质基础,细胞内自由 Ca^{2+} 的分布和转移是形成 Ca^{2+} 信号的基础。一般认为,细胞对许多外界环境和激素等刺激作出的反应是通过胞质中自由 Ca^{2+} 浓度变化来传递的, Ca^{2+} 在细胞内起到信使的作用。当受到刺激时,细胞外 Ca^{2+} 通过 Ca^{2+} 通道的开启进入细胞内或细胞内钙库(如内质网)向细胞质中释放出 Ca^{2+} 。荧光测定法是研究细胞内钙变化的一种重要方法,其中Fura-2是20世纪80年代出现的第二代钙荧光指示剂,是典型的双激发荧光指示剂,与钙结合后导致荧光光谱移动,当被 Ca^{2+} 饱和后,340nm处激发荧光强度上升3倍,而380nm处激发荧光强度下降10倍,故二者荧光强度比值能够较准确地反映 Ca^{2+} 浓度。已有研究表明,壁细胞表面有多种受体存在,包括胃泌素受体、 H_2 受体、胆碱受体

等,它们的激动剂可分别作用于各自的受体导致壁细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 增高而引发促酸分泌功能^[9]。研究发现,组胺、卡巴可、胃泌素、胆囊收缩素-8(CCK-8)可引起细胞内钙浓度升高,其机制是细胞内钙的释放^[10]。本实验利用大鼠即时分离的壁细胞,经非连续密度梯度离心纯化后壁细胞纯度可达到75%,观察脾虚模型大鼠壁细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化及经胃泌素刺激后的变化,结果表明,模型组大鼠胃壁细胞内静息状态 $[Ca^{2+}]_i$ 明显低于正常对照组,经胃泌素刺激后, $[Ca^{2+}]_i$ 增高且模型组增高幅度明显高于正常对照组,提示脾虚模型大鼠壁细胞虽然处于低代谢状态,但对胃泌素刺激的反应性增强,进而可能导致壁细胞酸分泌功能的异常。各治疗组大鼠壁细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 较模型组均有恢复趋势,但差异无显著性。在利用双波长荧光分光光度计检测细胞内钙浓度时,混悬壁细胞的细胞外液采用无钙的PBS,在胃泌素刺激后可观察到细胞内游离钙离子浓度的缓慢升高,而换用含钙的C液混悬细胞时,经刺激后钙的升高并未见明显改变,可见胃泌素刺激壁细胞内钙升高的机制主要是细胞内钙库的释放。

参考文献

- 1 Dockray GJ. Gastrin and gastric epithelial physiology. J Physiol, 1999, 518(Pt 2):315~324.
- 2 王文波,谢湘峰,程艳荣.脾虚证胃肠黏膜屏障保护功能的研究集要.中医药学刊,2002,20(4):504.
- 3 聂克,王汝俊,王建华.大鼠胃壁细胞的分离方法.世界华人消化杂志,1999,7(11):994~995.
- 4 李燕舞,王汝俊,王建华.大鼠胃壁细胞的分离和纯化.世界华人消化杂志,2004,12(7):1733~1735.
- 5 聂克,王汝俊,王建华.大鼠胃壁细胞胃泌素受体的放射配基结合法.中国药理学通报,2001,17(6):645~647.
- 6 黄广建,邓守真,乐竹琴,等.胃泌素受体放射配基结合分析法的建立.核技术,1996,19(12):653~656.
- 7 张根水,王汝俊.脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体研究及黄芪作用观察.中国中医基础医学杂志,2002,8(6):44~45.
- 8 聂克,王汝俊,王建华,等.脾虚大鼠胃壁细胞胃泌素受体结合容量及黄芪对其调控作用.中药药理与临床,2000,16(增刊):39.
- 9 Delvalle J, Tsunoda Y, Williams JA, et al. Regulation of $[Ca^{2+}]_i$ by secretagogue stimulation of canine gastric parietal cells. Am J Physiol, 1992, 262(3 Pt 1):G420~G426.
- 10 Chew CS, Brown MR. Release of intracellular Ca^{2+} and elevation of inositol trisphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa. Biochim Biophys Acta, 1986, 888(1):116~125.

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951~1986年(4张光盘)480元,1995~2004年(1张光盘)280元,汇款地址:北京东直门内南小街16号中医杂志医海林音像书店,邮编:100700。电话:010-64013164,64035632。