

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.21.014

枳术丸汤剂含药血清对大鼠结肠 Cajal 间质细胞增殖及 PLC- γ 信号通路的影响

夏旭婷¹, 王婷², 刘富林¹✉, 涂琴蓉³, 滕广飞⁴

1. 湖南中医药大学, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教园学士路 300 号, 410208; 2. 湖北省襄阳市中医医院; 3. 湖南师范大学附属湘东医院; 4. 中国中医科学院望京医院

[摘要] **目的** 探讨枳术丸治疗慢传输型便秘的可能作用机制。**方法** 20 只 SD 雄性大鼠随机分为枳术丸汤剂组、空白组, 每组 10 只。枳术丸汤剂组大鼠每日给予浓度为 2 g/ml 枳术丸汤剂 5.8 g 灌胃, 连续 7 天, 空白组正常饲养。末次给药后 1 h 腹主动脉采血离心制备含药血清。采用 CCK8 法观察磷脂酶 C- γ (PLC- γ) 特异性抑制剂 U73122 对大鼠结肠原代 Cajal 间质细胞的细胞抑制率来筛选药物浓度, 观察 5%、10%、15%、20% 浓度的枳术丸汤剂含药血清对 Cajal 间质细胞的细胞增殖率筛选药物浓度, 并分别培养 12、24、48 h 来筛选用药时间。取二或三代 Cajal 间质细胞接种至 96 孔板中, 每孔 1×10^4 个细胞, 每组重复 3 孔。实验分为正常组、模型组(正常细胞+筛选浓度的 U73122)、空白血清组(模型组+10% 空白血清)、枳术丸汤剂血清组(模型组+筛选浓度枳术丸含药血清)。干预时间为实验筛选出的时间。免疫组化法检测磷脂酶 C- γ 1 (PLC- γ 1)、磷脂酶 C- γ 2 (PLC- γ 2) 阳性表达, Western blot 法检测 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白表达, RT-PCR 法检测 PLC- γ 1、PLC- γ 2 基因表达。**结果** 筛选出 U73122 最佳实验药物浓度为 30 μ mol/L, 枳术丸汤剂组最佳用药浓度为 5%, 实验最佳干预时间为 24 h。与正常组比较, 模型组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 平均光密度值、蛋白及基因表达均降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 枳术丸汤剂血清组、空白血清组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 平均光密度值、蛋白及基因表达均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与空白血清组比较, 枳术丸汤剂血清组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 阳性表达、蛋白及基因表达明显增多 ($P < 0.01$)。**结论** 枳术丸汤剂可能通过激活 Cajal 间质细胞 PLC- γ 信号通路, 调控细胞增殖, 从而促进胃肠运动。

[关键词] 慢传输型便秘; 枳术丸; Cajal 间质细胞; 肠道动力; 细胞增殖; 磷脂酶 C- γ 1/磷脂酶 C- γ 2 信号通路

随着人类生活方式的改变, 慢传输型便秘 (slow transit constipation, STC) 的发病率不断上升。Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 是一种以网状结构分布于消化道肠神经系统和平滑肌细胞之间的特殊类型的间质细胞, 与胃肠动力障碍性疾病特别是 STC 发病关系密切^[1]。磷脂酶 C- γ (PLC- γ) 是 ICC 的下游信号通路, 可促进细胞增殖和生长, 也是调控细胞凋亡的重要环节之一^[2]。枳术丸是《脾胃论》中调理脾胃的经典名方, 本课题组前期研究发现, 枳术丸能促进便秘小鼠 ICC 的增殖分化, 调整结肠慢波紊乱^[3-4]改善小鼠便秘症状, 其

机制可能与调控磷脂酶 C- γ 1 (PLC- γ 1)/磷脂酶 C- γ 2 (PLC- γ 2) 信号通路有关^[5]。为进一步明确枳术丸治疗 STC 的机制及与 PLC- γ 信号通路的相关性, 本研究从细胞学及分子生物学水平, 探讨 PLC- γ 信号通路在 ICC 表达中的作用及枳术丸调节 ICC 的可能作用机制, 以期枳术丸的临床应用提供依据。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准, 编号 20170704。

1 材料

1.1 细胞

大鼠结肠原代 Cajal 间质细胞株, 购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司, 编号: RAT/MIC/RAB-iCell-d024。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 12 ~ 13 周龄, 体质

基金项目: 国家自然科学基金 (81603597); 湖南省自然科学基金 (2020JJ5425); 湖南省教育厅优秀青年项目 (19B424); 湖南中医药大学中医学一流学科开放基金 (2018ZYX24)

✉ 通讯作者: 616217372@qq.com

量(220±20)g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(湘)2016-0002。所有大鼠均饲养于湖南中医药大学 SPF 级动物实验室, 饲养环境: 室温(20±2)℃, 湿度(50±10)%, 每日 7: 00-17: 00 光照, 17: 00 至次日 7: 00 无光照, 自由摄食饮水, 适应性喂养 3 天。

1.3 药物

枳术丸汤剂的制备: 枳实 30 g, 白术 60 g, 按 5 倍比例加蒸馏水, 浸泡 30 min, 文火煎煮 40 min, 用纱布滤净, 再加 5 倍量自来水清水, 文火再煎煮 40 min, 纱布过滤, 合并两次煎液, 用旋转蒸发仪在 75℃ 水温中蒸发浓缩成 2 g/ml 的水煎液, 放入玻璃瓶中, 密封, 标记, 冷藏。药材购于湖南中医药大学第一附属医院中药房, 水煎剂均由制剂室提供。

1.4 主要试剂及仪器

原代细胞培养体系(赛百慷生物技术股份有限公司, 批号 PriMed-iCell-025); 0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司, 批号 25200056); CCK8 试剂(日本同仁化学研究所, 批号 KU746); Trizol(批号 V900483)、四甲基乙二胺(TEMED, 批号 T105497)、二甲基甲酰胺(DMF, 批号 PHR1553-3X1), 美国 Sigma 公司; 兔抗 IgG(批号 SA00001-1)、鼠抗 IgG(批号 SA00001-2)、大鼠 β -actin 抗体(批号 60008-1-Ig), 美国 Proteintech 公司; 蛋白酶抑制剂(德国 Merck 公司, 批号 583794); 蛋白磷酸酶抑制剂(瑞士 Roche 公司, 批号 P1260); Super ECL Plus 超敏发光试剂盒(美国 Thermo Pierce 公司, 批号 K-12045-D50); DAB 试剂盒(批号 ZLI-901)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 ZM-0301), 北京中杉金桥生物技术有限公司; 显影液(批号 BW-61)、定影液(批号 BW-62), 上海市佳信科技有限公司; PLC- γ 1 抗体(批号 ab76155)、PLC- γ 2 抗体(批号 ab227129), 英国 Abcam 公司; U73122(上海陶术生物科技有限公司, 批号 T6243); 胎牛血清(批号 C0232)、双抗(青霉素-链霉素溶液, 批号 C0222)、苏木素(批号 C0105S), 碧云天生物技术有限公司; 逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司, 批号 CW0742)。

台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司, 型号 TGL-18R); 荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo 公司, 型号 PIKO REAL 96); 荧光 PCR 板(美国 Thermo 公司, 型号 SPL0960); 恒温水浴箱(河南金博仪器制造有限公司, 型号 HH-S2); 旋涡混合器(其

林贝尔仪器制造有限公司, 型号 QL-901); 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司, 型号 164-5050); 水平琼脂糖电泳槽(北京六一生物科技有限公司, 型号 DYCZ-24EN); 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂, 型号 RE5298); 倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司, 型号 XDS-1B)。

2 方法

2.1 含药血清的制备

将 20 只大鼠采用随机数字表法分为枳术丸汤剂组、空白组, 每组 10 只。适应性喂养 3 天后, 以 60 kg 成人每日服药量 3 倍与 220 g 大鼠体表面积换算^[7], 枳术丸汤剂组大鼠每日给药约为 5.8 g, 连续 7 天, 空白组大鼠正常饲养。末次给药后 1 h 行腹主动脉采血, 静置 2 h 后, 3500 r/min, 离心 15 min(离心半径为 15 cm), 取上清存于 EP 管中, 密封, 标记, 56℃ 灭活 30 min, -80℃ 贮存备用, 用前 37℃ 水浴解冻, 过滤除菌。

2.2 PLC- γ 特异性抑制剂 U73122 的配制

用 DMF 溶解 U73122 5 mg 固体, 配成 50 mmol/L 的母液, 使用过程中用细胞培养液稀释至所需浓度, 再用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 4℃ 冰箱保存备用。实验时无菌操作配制 U73122 浓度为 10、20、25、30 μ mol/L 的含药培养基。

2.3 原代 ICC 的培养

将大鼠结肠原代 Cajal 间质细胞株用细胞培养基(胎牛血清: 双抗=100: 1)培养, 接种至培养瓶中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。1 或 2 天换液 1 次, 用 0.25% 胰酶 1 ml 消化分散细胞, 进行传代或接种。倒置显微镜观察细胞生长。

2.4 实验药物浓度及时间的筛选

2.4.1 U73122 药物浓度筛选 采用 CCK8 法, 取二或三代 Cajal 间质细胞配成细胞悬液接种至 96 孔板中, 取 100 μ l/孔, 每孔 1×10^4 个细胞, 每组重复 6 孔。留一列空白孔调零, 以只加培养液不加细胞作空白对照。继续培养 24 h 后, 向各组各孔加入 10、20、25、30 μ mol/L 浓度的 U73122 含药培养基, 并设不加 U73122 的对照组。继续培养 24 h, 将培养液吸除, 避光条件下每孔加入 100 μ l 反应液, 反应液的配置比例是 CCK8: 培养基=1: 9, 培养箱内孵育 4 h, 用酶标仪测 450 nm 处的吸光度(OD)值, 重复 3 次。细胞抑制率=[(对照组 OD-处理组 OD)/(对照组 OD-空白组 OD)] $\times$ 100%, 根据不同浓度干预后的细胞增值率确定 U73122 干预浓度进行下一步实验。

2.4.2 枳术丸汤剂含药血清浓度及干预时间筛选 采用 CCK8 法, 无菌操作配制空白血清及枳术丸汤含药血清浓度均为 5%、10%、15%、20% 的含药培养基。同样方法取二或三代 Cajal 间质细胞配成细胞悬液接种至 96 孔板中, 取 100 μ l/孔, 每孔 1×10^4 个细胞, 每组重复 6 孔。继续培养 24 h 后, 向各组各孔加入以上浓度的空白血清及枳术丸汤剂含药培养基, 并设不含血清的正常组为对照。分别继续培养 12、24、48 h, 将培养液吸除, 每孔加入 100 μ l 反应液, 培养箱内孵育 4 h, 用酶标仪测 OD。计算不同浓度及不同作用时间细胞增殖率, 细胞增殖率 (%) = $1 - (\text{该药物处理组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值} / \text{标准 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}) \times 100\%$, 实验平行重复 3 次取平均值。根据细胞增殖率确定含药血清的最佳干预浓度及干预时间进行下一步实验, 增值率高的浓度和时间为最佳。

2.5 分组及给药

取二或三代 Cajal 间质细胞配成细胞悬液接种至 96 孔板中, 取 100 μ l/孔, 每孔 1×10^4 个细胞, 每组重复 3 孔。将大鼠结肠 Cajal 间质细胞分为正常组、模型组 (正常细胞+筛选浓度的 U73122)、空白血清组 (模型组+10% 空白血清)、枳术丸汤剂组 (模型组+筛选浓度枳术丸汤剂含药血清)。干预时间为实验筛选出的时间。

2.6 观察指标及方法

2.6.1 免疫组化法检测 PLC- γ 1、PLC- γ 2 阳性表达 取出爬片, PBS 清洗; 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗; 加入 3% H_2O_2 , 室温 10 min, PBS 冲洗; 滴加一抗 (PLC- γ 2, 1:100; PLC- γ 1, 1:200), 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 冲洗; 滴加 50~100 μ l 鼠、兔 IgG 抗体-HRP 多聚体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 冲洗; DAB 显色; 苏木素染色; 显微镜观察, IPP 图像分析。

2.6.2 Western blot 法检测 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白表达 细胞冰上预冷, PBS 洗涤, 加入裂解液, 反复吹打混匀; 冰上蛋白裂解 10 min; 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 15 min (离心半径为 15 cm), 取上清; 按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行蛋白定量; 灌胶与上样后将浓缩胶 80 V 恒压进行电泳, 分离胶电泳电压为 120 V。待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳, 进行转膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h; 滴加一抗 (PLC- γ 2, 1:1000; PLC- γ 1, 1:5000; β -actin, 1:5000) 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗涤, 滴加二抗, 兔抗稀释比例 1:6000, 鼠抗稀释比例 1:5000, 孵育 90 min, TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min。ECL 显色曝光。

2.6.3 RT-PCR 法检测 PLC- γ 1、PLC- γ 2 基因表达 Trizol 提取细胞总 RNA, 检测 RNA 的完整性和 RNA 的纯度和浓度; RNA 的琼脂糖凝胶电泳; 以细胞总 mRNA 为模板, 逆转录 cDNA, 反应体系、操作步骤和逆转录条件按照试剂盒说明书操作, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用; 将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 引物 β -actin: 上游 ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC, 下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC, 长度 223 bp; PLC- γ 1: 上游 AGTACGACAGCACCAAGCAG, 下游 CTCATACACCACAAAGCGCAGA, 长度 131 bp; PLC- γ 2: 上游 TTCAACAGCATCTACGCCCTC, 下游 CCTGTCATAGTACCACGGCTT, 长度 132 bp。进行 PCR 反应, 完成后采用 PCR 仪自带软件 Qbase Plus 进行分析。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量数据均满足正态分布, 采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐性用多组计量资料单因素方差分析, 组间两两比较使用 LSD 法; 不满足方差齐性, 采用多个独立样本比较的秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 U73122 用药浓度的筛选结果

浓度为 0 μ mol/L 时, 细胞抑制率为 0; 浓度为 10 μ mol/L 时, 细胞抑制率为 17%; 浓度为 20 μ mol/L 时, 细胞抑制率为 28%; 浓度为 25 μ mol/L 时, 细胞抑制率为 41%; 浓度为 30 μ mol/L 时, 细胞抑制率为 52%。提示 PLC- γ 特异性抑制剂 U73122 能够抑制 ICC 的活性, 且随 U73122 浓度增加, 抑制作用增强。当浓度达到 30 μ mol/L 时, 能够达到半数抑制。根据 SPSS 20.0 软件计算半数抑制浓度 IC_{50} 值, 置信限度范围为 22.8%~38.3%, 考虑到 DMF 的细胞毒性及显微镜下观察细胞生长情况, 选择 30 μ mol/L 为最佳实验用抑制剂浓度。

3.2 枳术丸汤剂含药血清用药浓度和时间筛选结果

表 1 示, 与正常组比较, 空白血清组各浓度下细胞增殖率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 空白血清组不同浓度之间细胞增殖率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与空白血清组比较, 各浓度枳术丸汤剂含药血清组细胞增殖率明显升高 ($P < 0.01$), 且 5% 浓度的枳术丸汤剂含药血清组细胞增殖率高于 10%、15%、20% 浓度 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 故选择 5% 浓度的枳术丸汤剂含药血清进行后续实验。

取 10% 浓度空白血清及 5% 浓度枳术丸汤剂含

药血清分别作用于大鼠结肠 Cajal 间质细胞, 作用时间分别为 12、24、48 h, CCK8 法检测细胞增殖情况。表 2 示, 与正常组比较, 5% 枳术丸汤剂组各时间点细胞增殖率升高 ($P<0.01$), 10% 空白血清组各时间点 Cajal 间质细胞增殖率差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 10% 空白血清组比较, 5% 枳术丸汤剂含药血清组各时间点细胞增殖率升高 ($P<0.01$)。5% 枳术丸汤剂含药血清组 24、48 h 时细胞增殖率高于本组 12 h, 48 h 时细胞增殖率低于本组 24 h ($P<0.01$); 正常组 48 h 时细胞增殖率高于本组 12 h ($P<0.05$); 10% 空白血清组各时间点细胞增殖率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。以上结果提示随着枳术丸汤剂浓度的增加其细胞增殖率反而下降, 枳术丸汤剂对 Cajal 间质细胞的增殖作用可能存在峰值问题, 为了体现其最佳作用效果, 故此次实验选取 5% 枳术丸汤剂组最佳反应时间点为 24 h, 以此进行后续实验。

3.3 各组细胞 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白表达免疫组化检测结果比较

图 1-2 示, 正常组大鼠结肠 Cajal 间质细胞有大量 PLC- γ 1、PLC- γ 2 表达。模型组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 阳性表达明显减少, 枳术丸汤剂组、空白血清组

PLC- γ 1、PLC- γ 2 阳性表达较模型组增多。表 3 示, 与正常组比较, 模型组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 平均光密度值降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 枳术丸汤剂血清组、空白血清组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 平均光密度值均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与空白血清组比较, 枳术丸汤剂血清组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 平均光密度值升高 ($P<0.01$)。

3.4 各组细胞 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白表达 Western blot 检测结果比较

表 4 示, 与正常组比较, 模型组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白表达明显降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 空白血清组、枳术丸汤剂血清组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白表达均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与空白血清组比较, 枳术丸汤剂血清组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白表达均升高 ($P<0.01$)。各组细胞 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白表达电泳图见图 3。

3.5 各组细胞 PLC- γ 1、PLC- γ 2 基因表达比较

表 5 示, 与正常组比较, 模型组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 基因表达均明显下降 ($P<0.01$); 与模型组比较, 空白血清组、枳术丸汤剂血清组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 基因表达均明显升高 ($P<0.01$); 与空白血清组比较, 枳术丸汤剂组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 基因表达明显升高 ($P<0.01$)。

表 1 不同浓度枳术丸汤剂含药血清干预大鼠结肠 Cajal 间质细胞 24 h 后细胞增殖率比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	5%	10%	15%	20%
正常组	6	101.51 $\pm$ 7.99	101.51 $\pm$ 7.99	101.51 $\pm$ 7.99	101.51 $\pm$ 7.99
空白血清组	6	103.02 $\pm$ 0.91	103.83 $\pm$ 0.27	102.14 $\pm$ 0.24	100.16 $\pm$ 1.70
枳术丸汤剂含药血清组	6	142.14 $\pm$ 2.73 ^{a)}	129.64 $\pm$ 5.87 ^{a) b)}	123.33 $\pm$ 6.02 ^{a) c)}	116.13 $\pm$ 4.74 ^{a) c)}

注: a) 与空白血清组比较, $P<0.01$; b) 与 5% 浓度枳术丸汤剂含药血清组比较, $P<0.05$; c) 与 5% 浓度枳术丸汤剂含药血清组比较, $P<0.01$ 。

表 2 不同作用时间下枳术丸汤剂含药血清干预大鼠结肠 Cajal 间质细胞增殖率比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	48 h
正常组	6	99.23 $\pm$ 2.49	101.50 $\pm$ 7.99	105.66 $\pm$ 2.57 ^{c)}
10% 空白血清组	6	100.96 $\pm$ 3.80	103.83 $\pm$ 0.27	104.78 $\pm$ 1.22
5% 枳术丸汤剂含药血清组	6	115.64 $\pm$ 1.69 ^{a) b)}	142.14 $\pm$ 2.73 ^{a) b) d)}	128.80 $\pm$ 1.30 ^{a) b) d) e)}

注: a) 与正常组同时间比较, $P<0.01$; b) 与 10% 空白血清组同时间比较, $P<0.01$; c) 与本组 12 h 时比较, $P<0.05$; d) 与本组 12 h 时比较, $P<0.01$; e) 与本组 24 h 时比较, $P<0.01$ 。

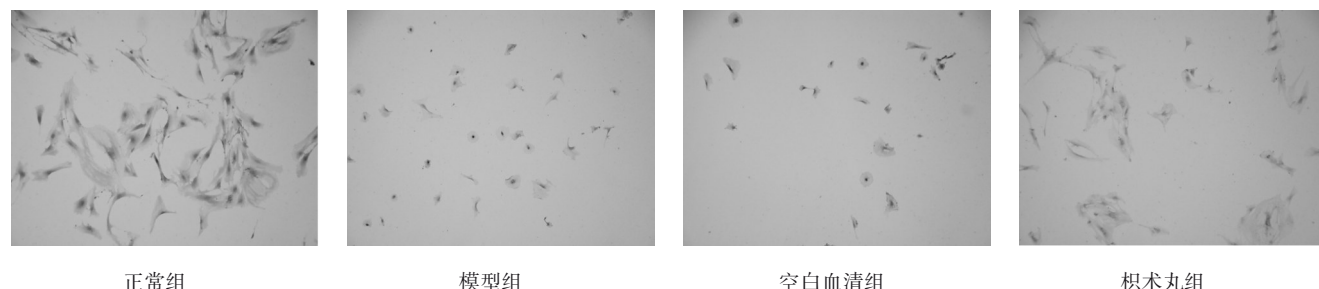


图 1 各组细胞 PLC- γ 1 免疫组化阳性表达 ($\times 100$)

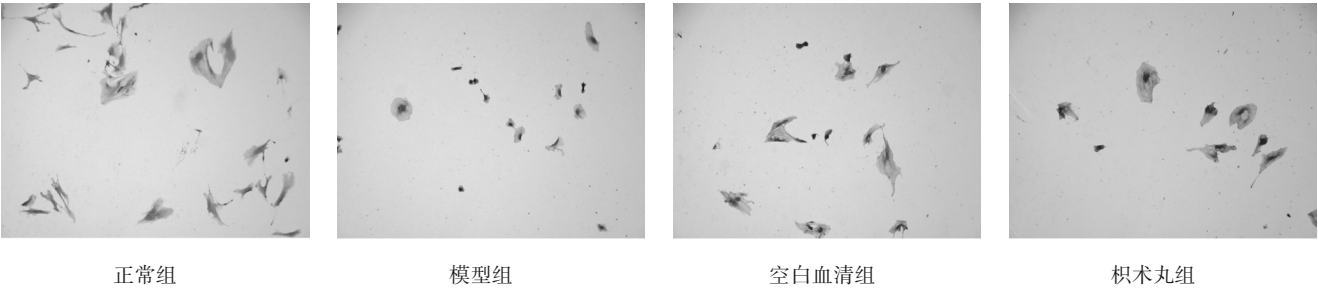


图2 各组细胞PLC-γ2免疫组化阳性表达(×100)

表3 各组细胞PLC-γ1、PLC-γ2平均光密度比较(̄x±s)

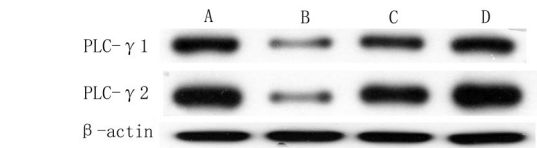
组别	样本数	PLC-γ1	PLC-γ2
正常组	3	0.25±0.03	0.16±0.01
模型组	3	0.10±0.01 ^{a)}	0.08±0.02 ^{a)}
空白血清组	3	0.14±0.01 ^{c)}	0.09±0.01 ^{b)}
枳术丸汤剂血清组	3	0.19±0.03 ^{c) d)}	0.12±0.01 ^{c) d)}

注: PLC-γ1, 磷脂酶C-γ1; PLC-γ2, 磷脂酶C-γ2。
a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;
c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与空白血清组比较, $P<0.01$ 。

表4 各组细胞PLC-γ1、PLC-γ2蛋白表达结果(β-actin, ̄x±s)

组别	样本数	PLC-γ1	PLC-γ2
正常组	3	0.50±0.08	0.66±0.05
模型组	3	0.16±0.05 ^{a)}	0.18±0.06 ^{a)}
空白血清组	3	0.27±0.03 ^{b)}	0.51±0.07 ^{b)}
枳术丸汤剂血清组	3	0.38±0.03 ^{c) d)}	0.63±0.03 ^{c) d)}

注: PLC-γ1, 磷脂酶C-γ1; PLC-γ2, 磷脂酶C-γ2。
a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;
c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与空白血清组比较, $P<0.01$ 。



注: PLC-γ1, 磷脂酶C-γ1; PLC-γ2, 磷脂酶C-γ2。
A, 正常组; B, 模型组; C, 空白血清组; D, 枳术丸汤剂血清组。

表5 各组细胞PLC-γ1、PLC-γ2基因表达结果(̄x±s)

组别	样本数	PLC-γ1	PLC-γ2
正常组	9	0.98±0.10	0.99±0.13
模型组	9	0.39±0.04 ^{a)}	0.38±0.06 ^{a)}
空白血清组	9	0.55±0.08 ^{b)}	0.62±0.09 ^{b)}
枳术丸汤剂血清组	9	0.80±0.11 ^{b) c)}	0.85±0.12 ^{b) c)}

注: PLC-γ1, 磷脂酶C-γ1; PLC-γ2, 磷脂酶C-γ2。
a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$;
c) 与空白血清组比较, $P<0.01$ 。

4 讨论

枳术丸一方由《金匱要略》篇中的枳术汤变化而来, 张元素结合前人经验, 以白术两倍于枳实, 并佐以荷叶, 裹烧饭为丸, 得谷气之助, 升清降浊, 补脾去实, 攻补兼施, 是治疗便秘的经典名方。《内外伤辨惑论》言此方“治痞, 消食, 强胃”。徐大椿在《医略大书·杂病证治》中指出: “此健中消滞之剂, 为脾虚食滞痞结之专方。” 本实验将枳术丸易丸为汤, 主要取其速效之功, 且便于实验动物灌胃操作。白术与枳实2:1的比例, 一攻一补, 不用荷叶, 易于在前期研究的基础上探讨攻补兼施治法与单纯攻下法和补益法治疗效果微观层面的对比。临床发现, 枳术丸能改善脾胃虚弱症状和促进胃肠排空, 对许多胃肠动力性疾病有很好的疗效^[6]。前期实验^[7]证实, 枳术丸能改善脾虚便秘小鼠便秘症状, 调整结肠慢波紊乱。

ICC广泛分布于消化道的各个肌层, 在维持胃肠正常运动中起着重要的调控作用, ICC数量减少、分布异常、超微结构改变、免疫活性降低等均可能导致胃肠动力紊乱^[8]。张旭等^[9]研究发现, 慢传输性便秘大鼠结肠组织中Cajal间质细胞数量减少, 特别是肌间层数量明显减少, 网络结构被破坏。PLC-γ是ICC的下游信号通路之一, 广泛存在于各种细胞之中, 许多细胞外因子, 如内皮细胞生长因子、免疫球蛋白、细胞因子、细胞表面抗原等都可以通过磷脂酶(PLC)作用于细胞, 调控细胞代谢^[10]。PLC-γ包括PLC-γ1与PLC-γ2两个亚型, PLC-γ被激活后产生的一系列级联反应参与了细胞周期的调控、细胞转化、调动肌动蛋白细胞骨架等过程^[11]。PLC-γ被激活后水解磷酸肌醇(PIP2)产生甘油二酯(DAG)和肌醇三磷酸(IP3)双信使, 激活钙通路及蛋白激酶C(PKC)的活化, 从而调节细胞生长、分化、凋亡和细胞内多种功能^[12]。因此, PLC-γ1、PLC-γ2表达异常, 可能导致ICC增殖异常, 降低胃肠动力, 从而出现胃肠动力障碍性疾病。

本课题使用PLC-γ特异性阻断剂U73122阻断

了 PLC- γ 信号通路后发现 ICC 生长受到抑制, 说明 PLC- γ 信号通路在 ICC 生长发育方面起着一定的作用。本研究结果显示, 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 PLC- γ 特异性抑制剂 U73122、5% 枳术丸汤剂含药血清对大鼠结肠 ICC 干预 24 h 为最佳干预措施。正常组大鼠结肠 ICC 有大量 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白和基因表达。与正常组比较, 模型组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白和基因表达皆减少, 说明大鼠结肠 ICC 生长受到抑制, 且与 PLC- γ 1、PLC- γ 2 表达减少有关。而与模型组比较, 空白血清组和枳术丸汤剂组 PLC- γ 1、PLC- γ 2 蛋白和基因表达皆升高, 且枳术丸汤剂血清组升高较空白血清组更明显。因此, 枳术丸汤剂可能通过上调 PLC- γ 1、PLC- γ 2 表达, 激活 PLC- γ 信号通路, 触发一系列级联反应, 刺激细胞生长因子, 调控 ICC 的生长发育及增殖, 从而促进胃肠运动。本实验结果还显示, 枳术丸汤剂对 ICC 增殖作用可能存在峰值问题, 考虑可能与细胞生长空间、细胞周期、营养物质饱和、药物毒副作用等因素有关, 课题组应进一步细化枳术丸浓度, 缩小浓度差距, 增加浓度分组, 探讨枳术丸汤剂的最佳作用浓度及作用规律。另外, ICC 的下游信号转导通路比较复杂, 下游信号通路在胃肠动力障碍性疾病中的作用机制及枳术丸汤剂对影响 ICC 的其他下游信号通路的调控作用等问题还需进一步研究。

参考文献

- [1] GARCIA-LOPEZ P, GARCIA-MARIN V, MARTINEZ-MURILLO R, et al. Updating old ideas and recent advances regarding the interstitial cells of Cajal [J]. Brain Res Rev, 2009, 61(2): 154-169.
- [2] REBECCHI MJ, PENTYALA SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C [J]. Physiol Rev, 2000, 80(4): 1291-1335.
- [3] 刘富林, 易健, 刘柏炎, 等. 超微枳术丸对功能性消化不良小鼠胃肠运动及 MTL、GAS 的影响 [J]. 中国中医急诊, 2011, 20(4): 594-595, 604.
- [4] 滕广飞, 刘富林, 夏旭婷, 等. 枳术丸水煎液及其拆方含药血清对大鼠结肠 Cajal 间质细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(19): 120-126.
- [5] 王伟松, 夏旭婷, 刘富林, 等. 枳术丸对脾虚证慢传输型便秘小鼠肠道运动及 PLC- γ 1/PLC- γ 2 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10): 8-14.
- [6] 王浩. 枳术丸加减治疗老年慢传输型便秘的临床研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [7] 夏旭婷, 刘富林, 王文凤, 等. 枳术丸对慢传输型便秘脾虚证模型小鼠肠道传导功能的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(19): 1725-1730.
- [8] 夏旭婷, 樊俊阳, 易健, 等. Cajal 间质细胞在慢传输型便秘发病机制中的作用 [J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(10): 172-174.
- [9] 张旭, 徐华, 毕淑英, 等. 大鼠胃肠道不同部位 Cajal 间质细胞与慢传输型便秘的关系 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(6): 536-540.
- [10] JI QS, WINNIER GE, NISWENDER KD, et al. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in mammalian growth and development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(7): 2999-3003.
- [11] 孟凡华, 葛彦明, 王素霞, 等. 系统性红斑狼疮的磷脂酶 C- γ 的致病机制及靶向治疗研究进展 [J]. 实用医药杂志, 2017, 34(3): 269-271.
- [12] DIENI CA, STOREY KB. Protein kinase C in the wood frog, *Rana sylvatica*: reassessing the tissue-specific regulation of PKC isozymes during freezing [J]. Peer J, 2014, 2: e558. doi: 10.7717/peerj.558. eCollection 2014.

Effect of Serum Containing Zhizhuwan Decoction (枳术丸汤剂) on Proliferation and Colonic Interstitial Cells Cajal and PLC- γ Signaling Pathway in Rats

XIA Xuting¹, WANG Ting², LIU Fulin¹, TU Qinrong³, TENG Guangfei⁴

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. Xiangyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hubei Province; 3. Xiangdong Hospital, Hunan Normal University; 4. Wangjing Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Zhizhuwan Decoction (枳术丸汤剂, ZD) for treatment of slow transit constipation (STC). **Methods** Twenty SD male rats were randomized into ZD group and blank group, with 10 rats in each group. The rats in the ZD group were given 5.8 g ZD by gavage at a concentration of 2 g/ml per day for seven consecutive days, while those in the blank group were fed normally. One hour after the last administration, blood was collected from the abdominal aorta and centrifuged to prepare the medicated serum. CCK8 method was used to assess the cell inhibition rate of U73122, a specific inhibitor of phospholipase C- γ (PLC- γ), on primary interstitial cells of Cajal (ICC); the concentration of medicated serum was selected from 5%, 10%, 15% and 20% by observing the effect on cell proliferation of ICC; the medication time was selected from 12 h, 24 h and 48 h based on the results. Second or third generation of ICC were seeded into a 96-well plate, with 1×10^4 cells per well and three repeated wells for each of the three groups, which were normal group, model group (normal cells plus U73122 at the selected concentration), blank serum group (model group plus 10% blank serum) and ZD-containing serum

group (model group plus ZD-containing serum at the selected concentration); the administrations lasted for the selected time duration. The positive expression of PLC- γ 1 and PLC- γ 2 were detected by immunohistochemistry, and the protein and gene expression of PLC- γ 1 and PLC- γ 2 were detected through Western blotting and RT-PCR, respectively. **Results** The selected best concentration was 30 $\mu\text{mol/L}$ of U73122, and was 5% of ZD; and the selected administration time was 24 h. Compared to the normal group, the model group had decreased PLC- γ 1, PLC- γ 2 average optical density, protein and gene expression ($P<0.01$); compared to the model group, the ZD-containing serum group and blank serum group had higher PLC- γ 1 and PLC- γ 2 average optical density, protein and gene expression ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared to the blank serum group, the ZD-containing serum group had significantly increased positive expression of PLC- γ 1, PLC- γ 2, as well as protein and gene expression ($P<0.01$). **Conclusion** ZD may regulate cell proliferation through activation of the PLC- γ signaling pathway of ICC, so as to promote the gastrointestinal motility.

Keywords slow transit constipation; Zhizhuwan Decoction (枳术丸汤剂); interstitial cells of Cajal; gastrointestinal motility; cell proliferation; PLC- γ 1/PLC- γ 2 signaling pathway

(收稿日期: 2021-05-23; 修回日期: 2021-08-07)

[编辑: 邓媛]

(上接第 1922 页)

Effect of Jianwei Shoutai Pill (减味寿胎丸) on Lipid Peroxidation and Ferroptosis Protein Expression in Decidua of Abortion Rats

LAI Yuling¹, ZHANG Yingxuan¹, ZENG Lihua¹, DENG Gaopi², LUO Songping², GAO Jie²

1. The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510545; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the underlying mechanism of Jianwei Shoutai Pill (减味寿胎丸, JSP) in treating abortion. **Methods** Forty-eight male rats were bred in cages with 48 female rats at the ratio of 1 : 1 for two weeks; and day 0 of pregnancy was when the vaginal suppository was found. Forty rats with successful pregnancy were randomized into normal group, model group, dydrogesterone group and JSP group with ten rats in each group. From day 0 of pregnancy, rats in the normal group and model group were given 10 ml/(kg·d) pure water by gavage; the JSP group was administered with 1.8 g/(kg·d) JSP by gavage, and the dydrogesterone group was given 5.4 mg/(kg·d) didroxyprogesterone by gavage; all the administrations were given once daily for 13 days. The abortion rat model was established in the model group, dydrogesterone group and JSP group by gavage with 10 ml/kg mifepristone solution at a concentration of 1.2 mg/ml on day 13 of pregnancy, and decidual tissues were collected on day 14 of pregnancy. HE staining was used to observe the pathological changes of decidual tissue, and to detect the levels of lipid peroxidation-related indexes including reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPX), malondialdehyde (MDA), as well as the content of total iron ($\text{Fe}^{(II+III)}$). Prussian blue (Perls) staining was used to detect the distribution of iron ion in the decidua tissue, and the immunohistochemistry and Western Blot method were used to detect the protein distribution and relative expressions of glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and transferrin receptor 1 (TFR1) which could reflect ferroptosis. **Results** The HE staining results indicated that the decidual tissue of the rats in the normal group was rich in blood vessels, and the decidual cells were tightly arranged; the decidual tissue in the model group had less blood vessels, with cytoplasmic edema and partially missing nucleus; the dydrogesterone group and the JSP group had improved pathological results of decidual tissue than the model group. Compared to the normal group, the model group had significantly lower GSH and GPX levels, and GPX4 and SLC7A11 protein expression, as well as higher $\text{Fe}^{(II+III)}$ content, MDA level and TFR1 protein expression in decidual tissue ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to the model group, the JSP group significantly increased the GSH, GPX levels, GPX4 and SLC7A11 protein expression, and reduced the MDA level, $\text{Fe}^{(II+III)}$ content and TFR1 protein expression ($P<0.05$ or $P<0.01$); the dydrogesterone group had higher GPX level and lower $\text{Fe}^{(II+III)}$ content ($P<0.01$). There were no significant differences between dydrogesterone group and JSP group in all indexes. **Conclusion** JSP may reduce lipid peroxidation and excessive iron accumulation to inhibit ferroptosis in the decidual tissue, thereby preventing abortion ultimately.

Keywords abortion; Jianwei Shoutai Pill (减味寿胎丸); uterus; decidual tissue; ferroptosis; lipid peroxidation

(收稿日期: 2021-04-22; 修回日期: 2021-07-21)

[编辑: 邓媛]