

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.24.013

半夏泻心汤对糖尿病胃轻瘫模型小鼠胃排空、胃组织 AGEs 含量及 RAGE、nNOS 蛋白表达的影响

李霖芝, 丁宁, 岳仁宋✉

成都中医药大学附属医院, 四川省成都市金牛区十二桥路 39 号, 610075

[摘要] **目的** 探讨半夏泻心汤对糖尿病胃轻瘫 (DGP) 小鼠胃排空的影响及可能作用机制。**方法** 30 只雌性 db/db 小鼠为自发型 2 型糖尿病小鼠, 使用高脂高糖饲料适应性喂养 1 周后, 通过 ^{13}C 辛酸呼吸检测法区分 DGP 小鼠 [胃半排空时间 ($T_{1/2}$) 连续两次 $>129\text{ min}$] 和非 DGP 小鼠, 将非 DGP 小鼠 5 只设为 2 型糖尿病对照组, DGP 小鼠再随机分为糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组和半夏泻心汤低、中、高剂量组, 每组 5 只。各组小鼠均给予 $250\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 二甲双胍基础用药, 甲氧氯普胺组在基础用药上加 $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 甲氧氯普胺, 半夏泻心汤低、中、高剂量组分别加用 750、1500、3000 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 半夏泻心汤灌胃, 各组连续灌胃 8 周。8 周后各组小鼠检测空腹血糖并进行腹腔注射糖耐量试验, 使用糖耐量曲线下面积评价小鼠葡萄糖敏感性; 使用 ^{13}C 呼吸试验计算 $T_{1/2}$ 以评估小鼠胃动力; 检测胃组织 Cajal 间质细胞 (ICCs) 及其干细胞 (ICC-SC) 数量、胃组织晚期糖基化终末产物 (AGEs) 含量及晚期糖基化终产物受体 (RAGE)、神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 蛋白表达。**结果** 与 2 型糖尿病对照组相比, 糖尿病胃轻瘫模型组小鼠空腹血糖、糖耐量曲线下面积、 $T_{1/2}$ 均升高, 胃组织中 ICCs 及 ICC-SC 数量明显减少, AGEs 含量及 RAGE 蛋白表达升高, nNOS 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与糖尿病胃轻瘫模型组和甲氧氯普胺组相比, 半夏泻心汤中、高剂量组小鼠的空腹血糖和糖耐量曲线下面积均显著降低, 胃组织中 ICCs 以及 ICC-SC 数量显著增加, AGEs 含量和 RAGE 蛋白表达降低, nNOS 蛋白表达上升 ($P<0.01$)。半夏泻心汤高剂量组较甲氧氯普胺组 $T_{1/2}$ 缩短 ($P<0.01$)。与半夏泻心汤中、低剂量组比较, 半夏泻心汤高剂量组 ICCs、ICC-SC 数量及 nNOS 蛋白表达升高, AGEs 含量降低 ($P<0.01$)。**结论** 半夏泻心汤能改善 DGP 模型小鼠的血糖水平、加速胃排空, 以高剂量效果最佳, 其分子机制可能是抑制胃组织 AGEs 生成、RAGE 表达, 促进 nNOS 表达以调节 ICCs 及 ICC-SC 的增殖从而增强 DGP 小鼠胃动力。

[关键词] 糖尿病胃轻瘫; 半夏泻心汤; 胃动力; 晚期糖基化终末产物; Cajal 间质细胞

糖尿病胃轻瘫 (diabetic gastroparesis, DGP) 是糖尿病常见却极易被忽视的慢性消化道并发症之一, 主要表现为胃排空延迟、上腹胀满疼痛、少食易饱、腹胀、暖气、纳呆、恶心、呕吐等消化系统功能障碍相关临床症状。DGP 的发生不仅影响患者生活质量, 还影响营养物质和药物消化吸收, 导致糖尿病患者营养失衡、体质量下降、血糖紊乱, 严

重者还会出现低血糖、电解质紊乱等情况^[1]。DGP 发病机制可能与胃肠神经病变、胃肠激素异常、Cajal 间质细胞异常、胃肠微循环异常等相关, 但目前尚无明确定论^[2]。研究发现, 长期高糖环境下, 晚期糖基化终末产物 (AGEs) 不断的累积与糖尿病慢性并发症包括 DGP 的发生、发展有着密切的联系^[3-5]。半夏泻心汤出自《伤寒论》, 现代医家根据其“辛开苦降”的特点将其用于 DGP 的临床治疗, 疗效显著^[6-9]。本课题组前期研究发现, 半夏泻心汤对 2 型糖尿病 (T2DM) 模型大鼠的胃动力有明显改善, 可以促进胃动素 (MTL) 分泌、

基金项目: 国家自然科学基金 (81774279); 四川省科技厅重点研发项目 (2018SZ0068); 四川省名中医岳仁宋工作室 (2100601); 四川省省级科研院所基本科研业务费项目 (A-2021N-9)

✉ 通讯作者: 1580229694@qq.com, (028)87780521

促进胃肠动力、抑制有害菌群、减少肠道菌群对肠黏膜屏障损伤、调控免疫因子并减轻糖尿病胃肠道炎症反应进而改善 DGP^[10-13]。结合课题组前期研究基础及网络药理学研究^[14]结果,本实验对 DGP 小鼠进行¹³C 呼吸检测,通过分析胃排空时间,检测胃组织 Cajal 间质细胞 (ICCs) 及其干细胞 (ICC-SC) 数量、AGEs 含量及晚期糖基化终产物受体 (RAGE)、神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 表达水平,进一步探讨半夏泻心汤治疗 DGP 的可能作用机制,为半夏泻心汤治疗 DGP 提供依据。本实验经成都中医药大学附属医院伦理委员会批准 (伦理证书号: 2018-14)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性 db/db 小鼠 30 只, 5~6 周龄, 体重 20~30 g, 实验动物由江苏集萃药康生物科技有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (苏) 2019-0009。动物饲养于成都中医药大学 SPF 级动物实验室, 笼养, 可自由摄食和饮水, 饲养温度 (22±2) °C, 相对湿度 60%±10%, 采光参考自然环境昼夜交替。

1.2 药物

半夏泻心汤由法半夏 12 g、干姜 9 g、人参 9 g、黄芩 9 g、黄连 9 g、大枣 36 g、炙甘草 9 g 组成, 免煎颗粒购自江阴天江药业有限公司。用沸腾的纯水冲泡免煎颗粒并充分搅拌, 闷泡 10 min, 待完全溶解后用药物旋转蒸发仪将其浓缩为含生药 150 mg/ml 的药液。盐酸二甲双胍粉 (爱必信生物科技有限公司, 批号: ABX-1016914), 用蒸馏水配制为 40 mg/ml 的药液; 阳性对照药物使用甲氧氯普胺片 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: YY-M1825000), 用蒸馏水配制为 1.6 mg/ml 的药液。

1.3 主要试剂及仪器

¹³C-辛酸试剂 (Sigma 公司, 批号: 382K2519); RIPA (批号: 20190717)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: 20191030), Beytime 公司; 化学发光试剂 (Thermo Fisher Scientific 公司, 批号: XB340789); 小鼠 AGEs ELISA 检测试剂盒 (批号: ml002154, 上海酶联生物科技有限公司); 抗 RAGE 抗体 (批号: ab30381)、抗 nNOS 抗体 (批号: ab76067)、抗 GAPDH 抗体 (批号: ab181602), Abcam 公司; APC-抗 KIT (clone: ACK2) 抗体 (批号: 17-1172-82)、APC-抗 KIT (clone 2B8) 抗体 (批号: 17-1171-

82)、抗 CD34 抗体 (批号: 11-0341-82)、抗 CD11b 抗体 (批号: 25-0112-82)、抗 CD45 抗体 (批号: 25-0451-82)、抗 F4/80 抗体 (批号: 25-4801-82)、抗 CD44 抗体 (批号: 47-0441-82)、抗 CD16/32 抗体 (批号: 16-0161-86), eBioscience 公司; PMSF (Amresco 公司, 批号: 700B098); 20% 葡萄糖溶液 (批号: GL1728, 北京百莱博科技有限公司)。

全自动血糖仪 (Roche 公司, ACCU-CHEK Performa 型); 超低温冰箱 (Thermo 公司, FORMA700 型); 超纯水仪 (Millipore 公司, Direct-Qwithpump 型); 电子天平 (北京塞多利斯仪器系统有限公司, BS224 型); 低温高速离心机 (Sigma 公司, 3K15 型); 电泳仪 (Bio-Rad 公司, 型号: POWERPAC HC POWER SUPPLY); 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司, Dx Flex 型); 发光成像工作站 (Tanon 公司, 6600 型); 微孔板式多功能酶标仪 (Berthold 公司, LB941 型); 红外线能谱分析仪 (德国瓦格纳分析技术有限公司, Irisdoc 型)。

1.4 糖尿病胃轻瘫小鼠模型的建立

雌性 db/db 小鼠为自发型 2 型糖尿病小鼠, 使用高脂高糖饲料 (苏州双狮实验动物饲料科技有限公司, 组成: 基础饲料 54.6%、猪油 16.9%、蔗糖 14%、蛋白 10.2%、混料糊精 4.3%, 批号: 20191123) 适应性喂养 1 周后, 测量小鼠空腹血糖浓度 >250 mg/dl (13.8 mmol/L) 且小鼠出现多饮、多食、多尿现象, 判定成 2 型糖尿病模型^[15]。随后使用¹³C 辛酸呼吸检测法测定各小鼠胃排空速率及半排空时间 ($T_{1/2}$), 当连续两次 $T_{1/2}$ >129 min 时^[16], 则认为该小鼠发生胃排空延迟, DGP 小鼠模型造模成功。

1.5 动物分组及给药

db/db 小鼠通过¹³C 辛酸呼吸检测法区分 DGP 和非 DGP 小鼠。将非 DGP 小鼠 5 只设为 2 型糖尿病对照组, DGP 小鼠采用随机数字表法分为糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组和半夏泻心汤低、中、高剂量组, 每组 5 只。各组均给予 250 mg/(kg·d) 二甲双胍作为基础用药, 甲氧氯普胺组在基础用药上加用甲氧氯普胺片 10 mg/(kg·d), 半夏泻心汤低、中、高剂量组分别加用 750、1500、3000 mg/(kg·d) 半夏泻心汤灌胃, 其中半夏泻心汤中剂量组为临床等效剂量, 按照人与小鼠体重折算系数^[17]计算得出, 半夏泻心汤低、高剂量组剂量分别是临床等效剂量的 1/2 和 2 倍。不同类药物间隔 30 min 给药。各组均连续 8 周灌胃给药。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 血糖情况 药物干预 8 周时，小鼠禁食 12 h 后进行腹腔注射糖耐量试验（IPGTT）。试验前先测空腹血糖，随后腹腔注射 0.01 mg/g 20% 葡萄糖溶液，在注射后 30、60、90、120 min 采用剪尾法取尾尖血并使用全自动血糖仪进行血糖测定。小鼠葡萄糖敏感性使用曲线下面积的计算值进行评估。

1.6.2 ¹³C 呼吸试验法检测胃排空 使用 ¹³C 呼吸试验法检测小鼠胃排空速率。呼吸试验前一天，小鼠禁食不禁水过夜。测试时将小鼠放置在清洁干燥的集气瓶中适应 5 min，随后收集 5 min 内小鼠呼出气体。随后向小鼠喂 200 mg 含有 2.5 μmol¹³C-辛酸试剂的蛋黄，随后每 5 min 收集气体一次，60 min 后则每隔 15 min 收集一次，整个气体采集时间为 4 h。最后将收集的气体用红外线能谱分析仪分析。根据测定结果，利用计算机拟合曲线计算小鼠胃半排空时间（T_{1/2}）以评估小鼠胃动力^[16]。

1.6.3 流式细胞术检测胃组织 ICCs 及 ICC-SC 细胞 将小鼠处死后仰卧固定，开腹，分离胃体和胃窦的完整肌层组织，并使用 APC-抗 KIT（clone: ACK2）抗体 4℃ 孵育肌层组织 3 h，随后用胶原酶消化、研磨并过滤制备单细胞悬液，单细胞悬液使用抗 CD16/32 抗体进行封闭。用抗 CD11b、抗 CD45b、抗 F4/80 标记巨噬细胞、肥大细胞及其他白细胞；同时用 APC-抗 Kit（clone 2B8）抗体、eFlour 450/FITC-a 抗 CD34 和 APC-Cy7-抗 CD44 标记 ICC 细胞和 ICC-SC 细胞。上机通过流式细胞仪进行分选后，其中 Kit_{low}CD44⁺CD34⁺ 细胞为 ICC-SC 细胞，Kit⁺CD44⁺CD34⁺ 为 ICCs 细胞。

1.6.4 ELISA 法检测胃组织 AGEs 含量 分离出胃体及胃窦组织用匀浆器将标本匀浆充分，4℃、3000 r/min 离心 20 min（离心半径为 13.5 cm），收集离心管上清置于 -20℃ 保存待测，根据 ELISA 试剂盒厂家说明书用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度，通过标准曲线计算样品 AGEs 含量。

1.6.5 Western Blot 法检测胃组织 RAGE、nNOS 蛋白表达 分别收集各组胃组织，用预冷的 PBS 洗涤胃体与胃窦组织样本后，使用添加了 PMSF 的 RIPA 充分裂解，4℃、转速 3000 r/min，离心 15 min（离心半径为 13.5 cm），吸取上清至一预冷的 EP 管中，即为抽提得到的细胞蛋白。BCA 法进行蛋白定量，最后加入 5×loading 缓冲液沸水浴 10 min，样品制备完成。根据待测蛋白分子量的不同，灌制 SDS-

PAGE 凝胶并进行电泳。定压电泳后开始恒压转膜。封闭后，加 RAGE、nNOS 一抗（1：1000）4℃ 孵育过夜，Western 洗涤缓冲液 TBST 洗膜 3 次，每次 10 min；加入适量二抗（1：1000）封闭袋口，室温孵育 1 h；TBST 洗膜 3 次，每次 10 min；加入化学发光试剂 5 min 后，用发光成像工作站进行检测。蛋白表达量使用 Image Pro Plus 6.0 软件对光密度值进行分析，蛋白相对表达量计算方法为目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 26.0 统计软件，计量资料符合正态分布用均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，方差齐者采用单因素方差分析进行组间总体比较，组间多重比较采用 Tukey 检验。若方差不齐选用 Welch 检验进行总体比较，用 Games-Howell 法进行两两比较分析。当 $P<0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠空腹血糖及血糖敏感性比较

表 1 示，与 2 型糖尿病对照组相比，糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组和半夏泻心汤低剂量组小鼠空腹血糖显著增高，糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组和半夏泻心汤低、中、高剂量组糖耐量曲线下面积均升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组相比，半夏泻心汤中、高剂量组小鼠的空腹血糖水平均降低，半夏泻心汤低、中、高剂量组糖耐量曲线下面积均显著降低（ $P<0.01$ ）。与半夏泻心汤低剂量组比较，半夏泻心汤高剂量组空腹血糖、糖耐量曲线下面积均明显降低（ $P<0.05$ ）。半夏泻心汤中、高剂量组空腹血糖、糖耐量曲线下面积比较差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表 1 各组小鼠空腹血糖及糖耐量曲线下面积比较（ $\bar{x}\pm s$ ）

组别	鼠数	空腹血糖/ mmol·L ⁻¹	糖耐量曲线下面积/ min·mmol·L ⁻¹
2 型糖尿病对照组	5	18.76±2.755	2619±108.9
糖尿病胃轻瘫模型组	5	30.14±4.435 ^{a)}	3699±96.1 ^{a)}
甲氧氯普胺组	5	29.15±1.561 ^{a)}	3637±122.7 ^{a)}
半夏泻心汤低剂量组	5	25.62±3.828 ^{b)}	3208±137.3 ^{a) c) d)}
半夏泻心汤中剂量组	5	21.47±2.297 ^{c) d)}	3026±116.3 ^{a) c) d)}
半夏泻心汤高剂量组	5	18.95±2.681 ^{c) d) e)}	2944±148.8 ^{a) c) d) e)}

注：a) 与 2 型糖尿病对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与 2 型糖尿病对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与糖尿病胃轻瘫模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与甲氧氯普胺组比较， $P<0.01$ ；e) 与半夏泻心汤低剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠 ^{13}C 呼吸试验 $T_{1/2}$ 比较

表 2 示, 与 2 型糖尿病对照组相比, 其余各组小鼠 $T_{1/2}$ 均显著延长 ($P<0.01$)。与糖尿病胃轻瘫模型组相比, 甲氧氯普胺组和半夏泻心汤低、中、高剂量组小鼠 $T_{1/2}$ 显著缩短 ($P<0.01$)。与甲氧氯普胺组相比, 半夏泻心汤高剂量组小鼠 $T_{1/2}$ 缩短, 而半夏泻心汤低剂量组小鼠 $T_{1/2}$ 延长 ($P<0.01$)。半夏泻心汤 3 个剂量组组间两两比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 随半夏泻心汤剂量增加 $T_{1/2}$ 缩短。

表 2 各组小鼠 ^{13}C 呼吸试验 $T_{1/2}$ 比较 (min, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	$T_{1/2}$
2 型糖尿病对照组	5	96.1 $\pm$ 3.83
糖尿病胃轻瘫模型组	5	141.4 $\pm$ 5.25 ^{a)}
甲氧氯普胺组	5	109.9 $\pm$ 2.87 ^{a) b)}
半夏泻心汤低剂量组	5	130.4 $\pm$ 4.13 ^{a) b) c)}
半夏泻心汤中剂量组	5	113.1 $\pm$ 5.38 ^{a) b) d)}
半夏泻心汤高剂量组	5	99.9 $\pm$ 3.54 ^{a) b) c) d) e)}

注: $T_{1/2}$, 胃半排空时间。

a) 与 2 型糖尿病对照组比较, $P<0.01$; b) 与糖尿病胃轻瘫模型组比较, $P<0.01$; c) 与甲氧氯普胺组比较, $P<0.01$; d) 与半夏泻心汤低剂量组比较, $P<0.01$; e) 与半夏泻心汤中剂量组比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组小鼠胃组织 ICCs 及 ICC-SC 数量比较

表 3 示, 与 2 型糖尿病对照组比较, 糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组和半夏泻心汤低、中剂量组小鼠胃组织中 ICCs 及 ICC-SC 数量明显减少 ($P<0.01$)。与糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组比较, 半夏泻心汤中、高剂量组小鼠胃组织中 ICCs 以及 ICC-SC 数量显著增加 ($P<0.01$)。半夏泻心汤 3 个剂量组 ICCs 数量组间两两比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$), ICCs 数量随半夏泻心汤剂量增加而增加; 半夏泻心汤高剂量组 ICC-SC 数量显著高于半夏泻心汤中、低剂量组 ($P<0.01$), 而半夏泻心汤中、低剂量组 ICC-SC 数量差异无统

计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组小鼠胃组织 ICCs 及 ICC-SC 数量比较 (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ICCs 数量	ICC-SC 数量
2 型糖尿病对照组	5	6618 $\pm$ 851.5	646.4 $\pm$ 124.10
糖尿病胃轻瘫模型组	5	1324 $\pm$ 171.1 ^{a)}	146.6 $\pm$ 46.63 ^{a)}
甲氧氯普胺组	5	1367 $\pm$ 251.7 ^{a)}	167.6 $\pm$ 51.35 ^{a)}
半夏泻心汤低剂量组	5	2088 $\pm$ 250.3 ^{a)}	245.0 $\pm$ 45.85 ^{a)}
半夏泻心汤中剂量组	5	3235 $\pm$ 475.0 ^{a) b) c) d)}	361.0 $\pm$ 69.47 ^{a) b) c)}
半夏泻心汤高剂量组	5	5758 $\pm$ 442.0 ^{b) c) d) e)}	559.4 $\pm$ 99.33 ^{b) c) d) e)}

注: ICCs, Cajal 间质细胞; ICC-SC, Cajal 间质细胞干细胞。

a) 与 2 型糖尿病对照组比较, $P<0.01$; b) 与糖尿病胃轻瘫模型组比较, $P<0.01$; c) 与甲氧氯普胺组比较, $P<0.01$; d) 与半夏泻心汤低剂量组比较, $P<0.01$; e) 与半夏泻心汤中剂量组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组小鼠胃组织 AGEs 含量及 RAGE、nNOS 蛋白表达比较

表 4 示, 与 2 型糖尿病对照组相比, 糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组和半夏泻心汤低、中剂量组 AGEs 含量显著增加, 糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组和半夏泻心汤低剂量组 RAGE 蛋白表达升高, 糖尿病胃轻瘫模型组、甲氧氯普胺组和半夏泻心汤低、中、高剂量组 nNOS 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与糖尿病胃轻瘫模型组和甲氧氯普胺组比较, 半夏泻心汤中、高剂量组 AGEs 含量和 RAGE 蛋白表达显著降低, nNOS 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$)。与甲氧氯普胺组比较, 半夏泻心汤低剂量组 nNOS 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$)。与半夏泻心汤高剂量组比较, 半夏泻心汤低、中剂量组 AGEs 含量升高, nNOS 蛋白表达降低 ($P<0.01$), 半夏泻心汤低剂量组 RAGE 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。半夏泻心汤低、中剂量组 AGEs 含量及 RAGE、nNOS 蛋白表达比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠胃组织 RAGE、nNOS 蛋白电泳图见图 1。

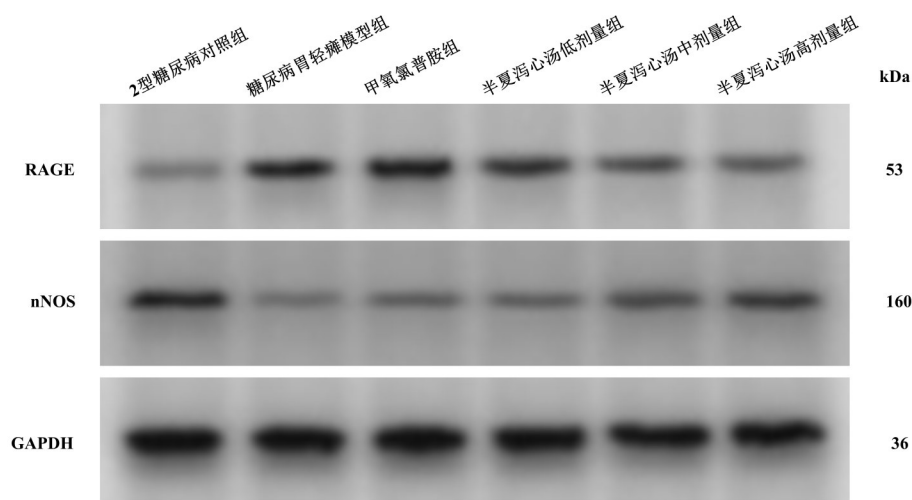
表 4 各组小鼠胃组织 AGEs 含量及 RAGE、nNOS 蛋白表达比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	AGEs / $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	RAGE/GAPDH	nNOS/GAPDH
2 型糖尿病对照组	5	21.50 $\pm$ 3.291	1.000 $\pm$ 0.130	1.000 $\pm$ 0.130
糖尿病胃轻瘫模型组	5	48.75 $\pm$ 3.348 ^{a)}	2.224 $\pm$ 0.309 ^{a)}	0.296 $\pm$ 0.311 ^{a)}
甲氧氯普胺组	5	46.93 $\pm$ 0.564 ^{a)}	2.124 $\pm$ 0.267 ^{a)}	0.259 $\pm$ 0.152 ^{a)}
半夏泻心汤低剂量组	5	43.15 $\pm$ 5.576 ^{a) d)}	1.788 $\pm$ 0.255 ^{a) d)}	0.435 $\pm$ 0.492 ^{a) c) d)}
半夏泻心汤中剂量组	5	36.15 $\pm$ 5.183 ^{a) b) c) d)}	1.458 $\pm$ 0.301 ^{b) c)}	0.573 $\pm$ 0.069 ^{a) b) c) d)}
半夏泻心汤高剂量组	5	24.37 $\pm$ 2.925 ^{b) c)}	1.265 $\pm$ 0.122 ^{b) c)}	0.775 $\pm$ 0.109 ^{a) b) c)}

注: AGEs, 晚期糖基化终末产物; RAGE, 晚期糖基化终末产物受体; nNOS, 神经元型一氧化氮合酶。

a) 与 2 型糖尿病对照组比较, $P<0.01$; b) 与糖尿病胃轻瘫模型组比较, $P<0.01$; c) 与甲氧氯普胺组比较, $P<0.01$; d) 与半夏泻心汤高剂量组比较, $P<0.01$ 。



注：RAGE，晚期糖基化终产物受体；nNOS，神经元型一氧化氮合酶。

图1 各组小鼠胃组织 RAGE、nNOS 蛋白电泳图

3 讨论

DGP是现代病名，根据DGP的临床表现特征，可将其归于中医“消渴”兼“痞满”“呕吐”的范畴。亦有医家称其为“消渴痞病”^[18]。我们认为，“脾弱胃强”是2型糖尿病的核心病机。“脾弱”则失于运化，精微物质不得正常转输利用，“胃强”则火盛于中，虽消谷引食，但“脾弱”不能为其行精气，日久郁精化浊，酿浊为毒，浊毒再伤及胃肠，则在“脾弱胃强”基础上进一步引发精微不得布散，脾胃功能进一步下降，终成“脾虚胃滞”，导致中焦满闷，甚至胃气上逆，出现胃动力障碍、胃排空延迟为特征的DGP临床症状，属虚实兼杂之证^[18]。半夏泻心汤是调理脾胃功能失调、气机升降不利的经典名方，该方中人参、甘草、大枣味甘能补益脾脏、温中益气，半夏、干姜味辛能行气燥湿、健脾开痞，黄连、黄芩味苦性寒能降胃、泄痞、燥湿、清胃郁热，诸药同用以达助脾散精、清热和胃、顺气降逆之效。其补泻兼施、寒热平调、升降同调，切合DGP“脾虚胃滞”之病机，可复脾胃之升降，使中焦痞结得开，临床运用中也显示出良好的疗效^[19]。本研究利用¹³C辛酸呼吸试验法亦证实半夏泻心汤能有效改善胃轻瘫小鼠的胃排空，缩短T_{1/2}时间，且高剂量半夏泻心汤的治疗效果优于甲氧氯普胺。

有研究表明，在糖尿病小鼠中高血糖可引起胃肠肌间神经丛神经元凋亡，胃底和胃窦收缩力减弱，从而导致胃排空延迟，其中ICCs作为胃肠慢波起搏细胞作用关键，ICCs结构破坏或数量减少

及ICC-SC减少可造成胃慢波消失、胃节律失常导致胃排空延迟^[20]。AGEs是蛋白质、脂类和核酸等大分子物质在非酶条件下与葡萄糖等还原糖反应而形成的不易降解的终末化合物，其可在组织细胞中积累，并在葡萄糖升高时加速形成^[21]，在糖尿病组织损伤的调节中发挥了关键作用。长期高糖环境下，AGEs不断地累积与糖尿病慢性并发症包括DGP的发生、发展有着密切的联系^[22]。Cellek等^[4]研究表明，神经元的nNOS和/或邻近内皮型一氧化氮合酶（eNOS）产生的内源性一氧化氮（NO）参与了神经元的凋亡，且AGEs和NO在糖尿病自主神经病变的发病机制中起着关键作用。本研究结果显示，半夏泻心汤可在一定程度上改善DGP小鼠血糖水平。同时，中高剂量半夏泻心汤能减少胃组织中AGEs含量，抑制RAGE表达，促进nNOS表达，增加ICCs及ICC-SC的数量，而甲氧氯普胺对上述指标无明显作用，说明半夏泻心汤可能通过抑制AGEs生成、RAGE表达，促进nNOS表达以调节ICCs及ICC-SC的增殖来改善DGP胃肠功能障碍，而甲氧氯普胺与半夏泻心汤改善DGP的机制不同。

综上所述，半夏泻心汤能有效改善DGP小鼠的血糖水平、提高胃排空速率，其分子作用机制可能与抑制AGEs生成、RAGE表达，促进nNOS表达以调节ICCs及ICC-SC的增殖从而增强DGP小鼠胃动力有关。但半夏泻心汤通过AGEs-RAGE通路影响ICCs及ICC-SC增殖所涉及的机制过程复杂，后续研究需要增加下游靶标的检测进行进一步研究。

此外, 该研究未进行体外验证及元代永生细胞验证, 还需进一步体外实验验证。

参考文献

- [1] INTAGLIATA N, KOCH KI. Gastroparesis in type 2 diabetes mellitus: prevalence, etiology, diagnosis, and treatment[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2007, 9(4): 270-279.
- [2] 孔艳华, 祝捷, 郜同心. 糖尿病胃轻瘫发病机制的研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(33): 25-26.
- [3] RENARD C, CHAPPEY O, WAUTIER MP, et al. The human and rat recombinant receptors for advanced glycation end products have a high degree of homology but different pharmacokinetic properties in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 290(3): 1458-1466.
- [4] CELLEK S, QU W, SCHMIDT AM, et al. Synergistic action of advanced glycation end products and endogenous nitric oxide leads to neuronal apoptosis in vitro: a new insight into selective nitrenergic neuropathy in diabetes [J]. Diabetologia, 2004, 47(2): 331-339.
- [5] KISHORE L, KAUR N, SINGH R. Effect of Kaempferol isolated from seeds of *Erucasativao* on changes of pain sensitivity in Streptozotocin-induced diabetic neuropathy [J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(4): 993-1003.
- [6] 夏婷婷, 刘清源, 何赛萍. 半夏泻心汤治疗糖尿病胃轻瘫的研究现状[J]. 江西中医药大学学报, 2015, 27(2): 114-116.
- [7] 向芬. 半夏泻心汤加减治疗糖尿病胃轻瘫的 Meta 分析 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
- [8] 余蓉. 莫沙必利联合半夏泻心汤对糖尿病胃轻瘫患者血清胃肠激素水平的影响及疗效观察[J]. 中国社区医师, 2020, 36(13): 95-97.
- [9] 李娜, 段春梅, 胡马尔. 半夏泻心汤治疗糖尿病胃轻瘫 31 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(2): 1-3.
- [10] 杨旭, 岳仁宋, 徐萌, 等. 探讨糖尿病胃轻瘫大鼠肠道菌群失衡致免疫功能失调的机制研究及半夏泻心汤的干预作用[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 17-21.
- [11] 徐萌. 基于“肠道菌群-宿主”交互的助脾散精法对 DGP 大鼠胰岛损伤修复影响的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [12] 徐萌, 岳仁宋, 杨茂艺, 等. 半夏泻心汤对糖尿病胃轻瘫大鼠肠道菌群及炎症因子的影响[J]. 中草药, 2018, 49(13): 3056-3061.
- [13] 杨旭, 岳仁宋, 徐萌, 等. 从“脾主谏议”角度探讨半夏泻心汤对 DGP 模型大鼠肠道免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2078-2081.
- [14] WU T, YUE R, LI L, et al. Study on the mechanisms of Banxia Xiexin decoction in treating diabetic gastroparesis based on network pharmacology [J]. Interdiscipl Sci Comput Life, 2020, 12(4): 487-498.
- [15] ABARI E, KOCIOK N, HARTMANN U, et al. Alterations in basement membrane immunoreactivity of the diabetic retina in three diabetic mouse models [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2013, 251(3): 763-775.
- [16] CHOI KM, KASHYAP PC, DUTTA N, et al. CD206-positive M2 macrophages that express hemeoxygenase-1 protect against diabetic gastroparesis in mice [J]. Gastroenterology, 2010, 138(7): 2399-2409.
- [17] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [18] 王晶, 岳仁宋, 汪晓敏, 等. 从助脾散精法论治消渴痞病[J]. 四川中医, 2018, 36(8): 20-21.
- [19] 杨茂艺, 胡志鹏, 岳仁宋. 岳仁宋基于玄府理论探讨糖尿病胃轻瘫经验[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(5): 698-700.
- [20] VITAL H, FARRUGIA G, GUILLERMO G, et al. Mechanisms of disease: the pathological basis of gastroparesis: a review of experimental and clinical studies [J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2007, 4(6): 336-346.
- [21] BUCALA R, TRACEY KJ, CERAMI A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes [J]. J Clin Invest, 1991, 87(2): 432-438.
- [22] 丁珊珊, 刘星玥, 马浩. 晚期糖基化终末产物介导糖尿病慢性并发症的分子机制研究进展[J]. 江苏医药, 2020, 46(2): 202-206.

Effect of *Banxia Xiexin Decoction* (半夏泻心汤) on Gastric Emptying, AGEs Content in Gastric Tissue and Expression of RAGE and nNOS Proteins in Diabetic Gastroparesis Model Mice

LI Linzhi, DING Ning, YUE Rensong

Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075

ABSTRACT Objective To explore the effects of *Banxia Xiexin Decoction* (半夏泻心汤) on gastric emptying in diabetic gastroparesis (DGP) mice and the possible mechanism. **Methods** Thirty female db/db spontaneous type 2

diabetic mice were fed with high-fat and high-sugar diet for one week as adaption, and then DGP mice, when the gastric half emptying time ($T_{1/2}$) >129 min for two consecutive times, were distinguished with non-DGP mice by ^{13}C caprylic acid breath test. Five non-DGP mice were set as the type 2 diabetes control group, and the DGP mice were randomly divided into the DGP model group, the metoclopramide group, and low-, medium- and high-dose *Banxia Xiexin Decoction* groups, with five mice in each group. All mice were given 250 mg/(kg·d) of metformin. Additionally, 10 mg/(kg·d) of metoclopramide and 750, 1500, and 3000 mg/(kg·d) of *Banxia Xiexin Decoction* were given by gavage to the mice in the metoclopramide group, low-, medium- and high-dose *Banxia Xiexin Decoction* groups, respectively, all for eight consecutive weeks. After eight weeks, fasting blood glucose was tested, and intraperitoneal glucose tolerance test was performed. The area under the glucose tolerance curve was used to evaluate glucose sensitivity in mice. $T_{1/2}$ was calculated using the ^{13}C breath test to assess gastric motility. The number of interstitial cells of Cajal (ICCs) and their stem cells (ICC-SC), the content of advanced glycation end products (AGEs), and the expression levels of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in gastric tissue were measured. **Results** Compared to those in the type 2 diabetes control group, the fasting blood glucose, the glucose area under the curve, and $T_{1/2}$ of the mice in the DGP model group all increased, while the number of ICCs and ICC-SC in gastric tissue significantly decreased; the content of AGEs and RAGE protein expression increased, while the expression of nNOS protein decreased ($P<0.01$). Compared to those in the GDP model group and the metoclopramide group, the fasting blood glucose level and the glucose area under the curve of mice in the medium- and high-dose *Banxia Xiexin Decoction* groups were significantly lower, while the number of ICCs and ICC-SC in gastric tissue significantly increased; the content of AGEs and the expression level of RAGE were significantly lower, while the expression level of nNOS was higher ($P<0.01$). $T_{1/2}$ was shortened in the high-dose *Banxia Xiexin Decoction* group than in the metoclopramide group ($P<0.01$). The number of ICCs, ICC-SCs and the expression of nNOS protein in the high-dose *Banxia Xiexin Decoction* group increased, while the content of AGEs decreased compared to those in the medium- and low-dose groups ($P<0.01$). **Conclusion** *Banxia Xiexin Decoction* can improve the level of blood glucose and accelerate gastric emptying in DGP model mice, and the effect is best at high dose. Its molecular mechanism may be related to the inhibition of the production of AGEs and the expression of RAGE, and the up-regulation of the expression of nNOS to regulate the proliferation of ICCs and ICC-SC, thereby enhancing the gastric motility. **Keywords** diabetic gastroparesis; *Banxia Xiexin Decoction* (半夏泻心汤); gastric motility; advanced glycation end products; Cajal interstitial cells

(收稿日期: 2022-04-21; 修回日期: 2022-07-15)

[编辑: 邓媛]