

## · 基础研究 ·

# 六君子合旋覆代赭汤对反流性食管炎大鼠食管 Cajal 间质细胞及干细胞因子/c-kit 通道的影响

陈健海<sup>1,2</sup> 乔大伟<sup>1,2</sup> 李玉芳<sup>1,2</sup> 肖云<sup>1,2</sup> 姜礼双<sup>1,2</sup> 崔亚<sup>1,2</sup>  
仲婕<sup>1,2</sup> 张蕾<sup>1,2</sup> 孔桂美<sup>1,2</sup> 卜平<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 研究六君子合旋覆代赭汤对反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)大鼠食管 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)及干细胞因子(stem cell factor, SCF)/c-kit 通道的影响。方法 采用幽门半结扎+前胃结扎+大黄灌胃法建立 RE 脾虚证大鼠模型,造模成功 35 只 Wistar 大鼠随机分为模型组、西药组、中药高、中、低剂量组共 5 组,每组 7 只,另设正常组 10 只。西药组予以雷贝拉唑+莫沙比利混悬液灌胃;中药高、中、低剂量 3 组分别给予六君子合旋覆代赭汤高、中、低剂量灌胃;连续给药 14 天,1 mL/只,1 次/天;正常组以及模型组予以等量生理盐水灌胃。第 15 天取大鼠下段食管组织,利用透射电镜观察 ICC 超微结构、Western blot 法检测 c-kit 及 SCF 蛋白含量以及 RT-PCR 法检测 c-kit 和 SCF mRNA 相对表达量。**结果** 与模型组比较,各治疗组 ICC 细胞形态结构改善,与周围细胞之间缝隙连接较紧密。与正常组比较,模型组 c-kit、SCF 蛋白含量及 c-kit mRNA、SCF mRNA 相对表达水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,各治疗组 c-kit、SCF 蛋白含量均升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),中药低剂量组 c-kit mRNA、SCF mRNA 相对表达水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),其余各治疗组均较模型组显著升高( $P < 0.01$ );中药高、中剂量两组间 c-kit、SCF 蛋白含量及 c-kit mRNA、SCF mRNA 相对表达水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但中药高剂量组 c-kit、SCF 蛋白含量及 c-kit mRNA、SCF mRNA 相对表达水平明显高于低剂量组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 六君子合旋覆代赭汤通过促进 c-kit、SCF mRNA 及其蛋白的表达,能够使受损的 ICC 恢复正常。

**关键词** 反流性食管炎;六君子合旋覆代赭汤;Cajal 间质细胞;干细胞因子/c-kit 信号通道

Effect of Liujunzi Combined with Xuanfu Daizhe Decoction on ICC and SCF/c-kit Signal Pathway in Esophagus of RE Rats with Pi-deficiency Syndrome CHEN Jian-hai<sup>1,2</sup>, QIAO Da-wei<sup>1,2</sup>, LI Yu-fang<sup>1,2</sup>, XIAO Yun<sup>1,2</sup>, JIANG Li-shuang<sup>1,2</sup>, CUI Ya<sup>1,2</sup>, ZHONG Jie<sup>1,2</sup>, ZHANG Lei<sup>1,2</sup>, KONG Gui-mei<sup>1,2</sup>, and BO Ping<sup>1,2</sup> 1 Clinical Medical College of Yangzhou University, Jiangsu (225000); 2 Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Jiangsu (225000)

**ABSTRACT** Objective To observe the effect of Liujunzi (LJZ) combined with Xuanfu Daizhe Decoction (XDD) on interstitial cells of Cajal (ICC) and stem cell factor (SCF)/c-kit signal pathway in reflux esophagitis (RE) rats. Methods Using the ligation of half pylorus combined with anterior gastric ligation and rhubarb gavage to establish the RE Pi-deficiency syndrome (PDS) rat model. Thirty-five successfully modeled Wistar rats were randomly divided into five groups, i.e., the model group, the Western medicine (WM) group, high, medium, and low dose traditional Chinese medicine (TCM) groups, respectively, 7 rats in each group. In addition a normal group was set up ( $n = 10$ ). Rats in the WM group were administered with Rabeprazole and Moxapride suspension by gastrogavage. Rats in the three TCM groups were

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173392);江苏省普通高校研究生实践创新计划(No. SJLX16-0604)

作者单位:1. 扬州大学医学院(江苏 225000); 2. 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室(江苏 225000)

通信作者:卜平, Tel: 0514-87978872, E-mail: boping@yzu.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20181029.316

administered with LJZ combined with XDD at high, medium, and low doses, respectively. All medication lasted for 14 successive days, 1 mL each time, once per day. Equal volume of normal saline was administered to rats in the normal and model groups. At day 15 rats' lower segment of esophagus were removed. The ultrastructure of ICC was observed by transmission electron microscope. The protein contents of c-kit and SCF were detected by Western blot. And the relative expressions of c-kit and SCF mRNA were detected by RT-PCR. Results Compared with the model group, the morphological structures of ICC cells in each treatment group were improved, and the gap between the cells and the surrounding cells was tight. Compared with the normal group, the contents of c-kit and SCF protein and the relative expression levels of c-kit mRNA and SCF mRNA in the model group were significantly lower ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the contents of c-kit and SCF protein in each treatment group were increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). There was no significant difference in the relative expression levels of c-kit mRNA or SCF mRNA between the low dose TCM group and the model group ( $P > 0.05$ ). And they were significantly higher in the other treatment groups than in the model group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in contents of c-kit and SCF protein/relative expression levels of c-kit mRNA and SCF mRNA between the high dose TCM group and the medium dose TCM group ( $P > 0.05$ ), but they were significantly higher in the high dose TCM group than in the low dose group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Conclusion LJZ combined with XDD could restore damaged ICC to normal by promoting the mRNA and protein expression levels of c-kit and SCF.

**KEYWORDS** reflux esophagitis; Liujunzi combined with Xuanfu Daizhe Decoction; interstitial cells of Cajal; stem cell factor/c-kit signal pathway

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是消化系统常见疾病,依据内镜下表现可分为反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)、非糜烂性胃食管反流病及 Barrett 食管三种类型。GERD 在全球范围内发病率逐渐上升,治疗仍以质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)为主的抗酸治疗为首选,但临床上约有 40%~50% 的 GERD 患者对 PPI 治疗无效,或停药后复发,其中 RE 复发率高达 90%,如何解决 RE 高复发难题是当前研究的重要任务<sup>[1,2]</sup>。RE 可归属于中医学的“噎膈”、“胸痛”、“吐酸”、“嘈杂”、“胃脘痛”等范畴。中医学认为,本病多因脾胃素虚,内外之邪乘虚袭入,使“清气”不升,“浊气”不降所致。笔者研究发现 RE 患者脾虚证占 53%,主张采用健脾和胃、泻火降逆,方用六君子、旋覆代赭汤等加减,均取得较好疗效<sup>[3]</sup>。

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)广泛存在于胃肠道,是胃肠慢波的起搏者以及胃肠神经递质的传递者,研究表明多种胃肠动力障碍性疾病如糖尿病胃轻瘫、肠易激综合征等都伴随着 ICC 结构、功能、数量及分布的改变<sup>[4]</sup>。ICC 可特异性表达 c-kit 基因,编码 kit 受体,即酪氨酸激酶受体,作为 ICC 特异性标记蛋白,可被干细胞因子(stem cell factor, SCF)激活。SCF/c-kit 信号通路在调节并维持 ICC 发育及细胞表型方面起到了重要作用。SCF/

c-kit 信号通路减退,可引起 ICC 数目、结构功能等改变,进而导致胃肠功能紊乱发生<sup>[5]</sup>。

有学者研究发现食管组织也存在 ICC<sup>[6]</sup>,因此,本实验旨在通过研究六君子合旋覆代赭汤对 RE 脾虚证大鼠食管 ICC 及 SCF/c-kit 通道的影响,揭示中药作用新靶点。

## 材料与方

1 动物 Wistar 大鼠 80 只,雄性,SPF 级,体质量(200 ± 20)g,由扬州大学提供[生产许可证号: SXCXK(苏)2012-0004;使用许可证号: SYXK(苏)2012-0029]。所有大鼠购回后,适应性饲养 7 天,每笼饲养 5 只。光照节律:12 h 昼夜交替照明(6:00~18:00),室温(22 ± 2)℃,相对湿度保持 50%~60%。保持动物房的安静,喂常规颗粒饲料和饮用水。本次动物实验通过扬州大学医学伦理委员会审查。具体过程:采用 SPF 级大鼠,动物饲养管理遵循中华人民共和国卫生部令第 55 号《医学实验动物管理实施细则》、国家科学技术委员会令第 2 号发布的《实验动物管理条例》;大鼠处死采用麻醉后颈椎脱臼法。

2 药物 六君子汤(出自宋代陈自明的《校注妇人良方》)合旋覆代赭汤(出自汉·《伤寒论》)。药物:党参、茯苓、白术(麸炒)、半夏(制)、陈皮、旋覆花、代

赭石、生姜、大枣各 10 g,甘草(蜜炙)6 g,江阴天江免煎中药配方颗粒(批号:1704127);生大黄(江阴天江药业,批号:1609166);枸橼酸莫沙必利片(江苏豪森药业股份有限公司,批号:170107,规格 5 mg/片,24 片/盒);雷贝拉唑肠溶胶囊(济川药业集团有限公司,批号:1704073,规格 20 mg/粒,7 粒/盒)。所有药物根据成人用量,采用 DSA1.0 版软件,计算大鼠用量,所有药物均使用生理盐水配成相应浓度。

3 主要设备与试剂 透射电子显微镜(日本电子株式会社,型号:JEM-1400);超薄切片机(瑞典 LKB 公司,型号:LKB-III);电泳仪(美国 Bio-rad 公司,型号:mini protean3 cell);电转仪(大连竞迈生物科技有限公司,型号:PS-9);酶标仪(美国 Thermo 公司,型号:MK3);水浴锅(德国 Leica 公司,型号:HI1210);一体式化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:Chemiscope 5300 Pro);低温冷冻离心机(型号:5810R)、Real-time PCR 检测仪(型号:Mastercycler nexus)、PCR 仪(型号:Mastercycler X50)均为德国 Eppendorf 公司;动物术后保温箱(上海玉研科学仪器有限公司,型号:5104);大鼠固定板(自制);4 mm 金属棒(自制);动物手术器械一套(上海金钟手术器械厂,批号:201601);6-0、2-0 缝合针线(宁波成和显微器械厂,批号:17101);青霉素钠(石药集团中诺药业,批号:016170286);c-kit 抗体(美国 Santa 公司,批号:sc365504);SCF 抗体(美国 Snata 公司,批号:sc13126);BCA 蛋白定量试剂盒(安徽 Biosharp 公司,批号:BL521A);30% 丙烯酰胺(29:1)(上海国药集团,批号:79-06-1);1.0 mol/L Tris-HCl,pH 为 8.8 电泳缓冲液、1.0 mol/L Tris-HCl,pH 为 6.8 电泳缓冲液、PBS 磷酸盐缓冲液、5×蛋白上样缓冲液(无锡英纽瑞生物医药科技有限公司,批号:2018-01-20);10% SDS(上海国药集团,批号:L5750)、丽春红 S(上海国药集团,批号:6226-79-5);10% 过硫酸铵(美国 Sigma 公司,批号:7727-54-0);TEMED(美国 Sigma 公司,批号:2443-25-0);蛋白预染 Marker(美国 Thermo 公司,批号:26616);PVDF 膜(美国 Merck Millipore 公司,批号:ISEQ00010);5% BSA(安徽 Biosharp 公司,批号:BS043D);吐温-20(美国 Amresco 公司,批号:M147);ECL 发光液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号:PE0020);羊抗鼠 IgG(美国 Proteintech 公司,批号:SA00001-1);GAPDH(上海碧云天生物技术,批号:AF1186);Trizol(无锡展望化工试剂有限公司,批号:08132657);

氯仿( $\text{CHCl}_3$ )(无锡展望化工试剂有限公司,批号:08102202);异丙醇(永华化学科技有限公司,批号:20171022);DEPC 水、dNTP Mixture(10 mmol/L)、Rtase、M-MLV(RNase H-)、RNasin Inhibitor(40 units/ $\mu\text{L}$ )、Random Primer、SYBR Premix Ex Taq(2×)(上海碧云天生物技术,批号:PC3301)。

4 动物分组与造模 采用完全随机法将所有大鼠分为 2 组:正常组 10 只和模型组 70 只。

RE 模型参照 Masuda T 等<sup>[7]</sup>以前胃结扎+幽门半结扎法建立,具体为:术前禁食 48 h,以 5% 葡萄糖注射液代替,术前 24 h 禁水,以 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,模型组取上腹正中切口约 2 cm,暴露幽门,在幽门上 1 cm 胃大弯侧切开小孔,置入直径 4 mm 内支架,以 6-0 丝线结扎幽门环,并将结扎线缝合固定于浆肌层,抽出内支架后缝合胃壁切开处。将前胃排空,以 2-0 线结扎前胃。关腹前用青霉素(8 万 IU/只)腹腔注射预防感染,逐层关腹,将大鼠置于 30℃ 保温箱中过夜,术后禁食 48 h,24 h 后可喂食 5% 葡萄糖注射液,48 h 后恢复正常饮食饮水。两周后获得 RE 大鼠模型;正常组取上腹正中切口约 2 cm,将胃提出暴露 15 min,重新关腹,关腹前用青霉素(8 万 IU/只)腹腔注射预防感染。术后第 15 天,对所有 RE 大鼠进行脾虚证造模,方法采用目前国内通用大黄灌胃法<sup>[8]</sup>进行:模型组大鼠灌以 100% 大黄水煎液 1 mL/只(含药量 1 g/mL),每天 2 次,连续 7 天,最终 GERD 脾虚大鼠造模成功 35 只,正常组灌以等量生理盐水。

5 再分组及用药 RE 脾虚证大鼠共 35 只,采用完全随机法分为 5 组:模型组、西药组、中药高、中、低剂量组,每组 7 只;其中西药组予以雷贝拉唑+莫沙比利混悬液灌胃(含药量 0.63 mg/mL);中药高、中、低剂量 3 组分别给予六君子汤合旋复代赭汤高(含药量 3.456 g/mL)、中(含药量 1.728 g/mL)、低剂量(含药量 0.864 g/mL)灌胃(分别相当于临床用药量的 2、1、1/2 倍);连续给药 14 天,1 mL/只,1 次/天;模型组及正常组大鼠给予等量生理盐水灌胃。

## 6 观察指标

6.1 透射电镜下观察大鼠食管下段组织 ICC 超微结构 (1)取材:于大鼠食管下段(距贲门约 0.5 cm)取大小约 0.5 cm×0.5 cm 组织 1 块,PBS 漂洗 1 次,置于 EP 管中;(2)前固定:将组织置于磷酸缓冲盐配置的浓度为 2.5% 戊二醛中固定 2 h,用 0.1 mol/L 磷酸漂洗液漂洗 3 次,以 1% 饿酸固定液固定 2~3 h,0.1 mol/L 磷酸漂洗液漂洗 3 次;(3)脱

水:在 4℃ 下先后经 50%、70%、90% 的丙酮脱水,每次 15~20 min,室温下以 100% 丙酮脱水 3 次,每次 15~20 min;(4)包埋:将组织先后置于纯丙酮+包埋液(2:1)室温 3~4 h,纯丙酮+包埋液(1:2)室温过夜,纯包埋液 37℃ 2~3 h;(5)固化:37℃ 烘箱内过夜,45℃ 烘箱内 12 h,60℃ 烘箱内 24 h;(6)切片:LKB-1 型超薄切片机切片 50~60 nm;(7)染色:3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色;(8)透射电镜观察,拍片。实验重复两次。

**6.2 Western Blot 法检测食管下段组织 c-Kit 及 SCF 蛋白含量** (1)组织剪碎用适量预冷的已加 PMSF 的 RIPA 裂解液混匀,充分裂解后 12 000 ×g 离心 10 min,取上清,上清液经 BSA 蛋白试剂盒测定总蛋白浓度后进行 Western blot 分析。(2)取 40 μg 蛋白与 5 × SDS 上样缓冲液混合,煮沸 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,所得蛋白样品分别置于 12% (SCF)、10% (c-kit) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后半干电转移法转移至 PVDF 膜。(3)将膜用 TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,然后用 5% 的脱脂奶粉 37℃ 缓慢震荡 2 h。(4)孵育一抗:TBST 洗 3 次,每次 5 min。一抗(c-kit 稀释度 1:500;SCF 稀释度:1:1 000)4℃ 孵育过夜。(5)二抗孵育:待一抗孵育结束后,TBST 冲洗 3 次,每次 1 min。将 PVDF 膜放入以 1:5 000 稀释的二抗溶液中,37℃ 缓慢振荡孵育 1 h。TBST 冲洗 3 次,每次 5 min。(6)显色:在膜上加入适量的 ECL 发光液,利用一体式化学发光仪拍摄照片,以 GAPDH 作为内参照,实验重复 3 次。(7)半定量分析:凝胶图像扫描分析系统对所得目的蛋白与内参蛋白的 X 光片分析,用灰度分析软件对每个条带的灰度值进行测定,获得每条目的蛋白及内参蛋白的灰度值,目的蛋白的相对表达量 = 目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

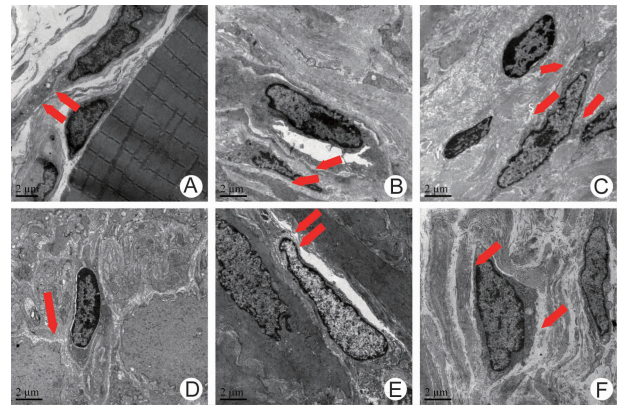
**6.3 RT-PCR 法检测大鼠食管下段组织 c-kit 和 SCF mRNA 表达量** 引物由生工合成,c-kit 上游引物:5'-GCCAACCAAGACAGACAAGAGG-3',下游引物:5'-AAATCATCCAGGTCCAGAGCC-3'(22 bp);SCF 上游引物:5'-CAAGGACTTCATGTGGCA-3',下游引物:5'-GCGGCTTTCCTATTACTGCTA-3'(19 bp);GAPDH 内参上游引物:5'-TGGTATCGTGAAGGACTCA-3',下游引物:5'-CCAGTAGAGGCAGGGATGAT-3'(20 bp)。取食管下段组织(约 100 mg),用 Trizol 提取总 RNA,行常规反转录聚合酶链反应(RT-PCR)。PCR 反应条件:95℃ 预处理 5 min;95℃ 变性 20 s;55℃ 退火

20 s;72℃ 延伸 20 s,以上反应循环 40 次。反应结束后核对扩增曲线和熔解曲线,以 GAPDH 为内参,通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算食管下段组织 c-kit 及 SCF mRNA 的相对表达量。

**7 统计学分析** 所得数据输入 SPSS 19.0 统计软件包及 Excel 软件进行处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,统计数据采用单因素方差分析、LSD 检验和 Gmmes-Howell 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

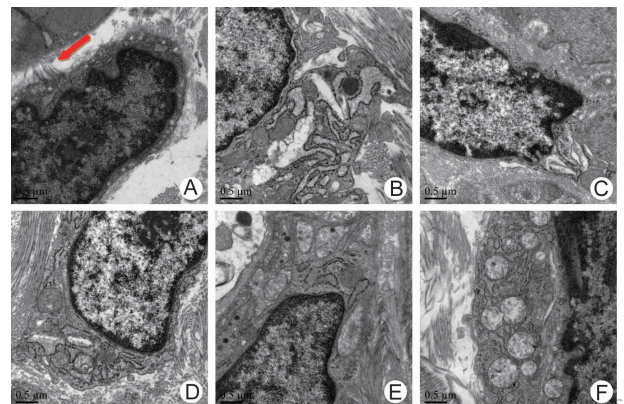
## 结 果

**1 各组大鼠食管下段组织电镜下 ICC 超微结构** (图 1、2) 正常组中 ICC 细胞结构完整,形态清晰,呈纺锤形,核体较大,胞质较少,胞质中含有大量线粒体以及丰富的内质网,有较多胞体突起,与周围细胞之间连接紧密;模型组中 ICC 细胞数目明显减少,且细



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药高剂量组;E 为中药中剂量组;F 为中药低剂量组;↑ 示缝隙结构

图 1 各组大鼠食管下段组织电镜下 ICC 超微结构 (3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色, ×5 000)



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药高剂量组;E 为中药中剂量组;F 为中药低剂量组;↑ 示缝隙连接

图 2 各组大鼠食管下段组织电镜下 ICC 超微结构 (3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色, ×20 000)

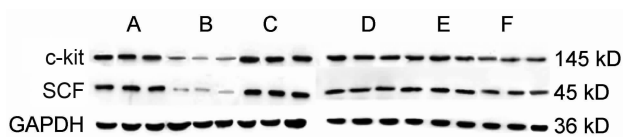
胞形态结构模糊,核仁较小,胞质内内质网扩张明显,线粒体空泡化现象严重,胞体未见明显突起,与周围细胞之间空隙较大,连接不紧密;中药低剂量组 ICC 细胞数目少,结构欠清晰,核体较小,胞质内线粒体嵴溶解,内质网有扩张,胞体突触少,与周围细胞连接不紧密,中药高、中剂量组 ICC 细胞数目较正常组有减少,细胞结构基本完整,胞质可见内质网以及线粒体损伤,胞体可见突起,与周围细胞之间缝隙连接较紧密;西药组镜下表现基本同正常组。

2 各组大鼠食管下段组织 c-kit、SCF 蛋白含量比较(表 1,图 3) 与正常组比较,模型组 c-kit、SCF 蛋白含量显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,各治疗组 c-kit、SCF 蛋白含量均升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );中药高、中剂量两组间 c-kit、SCF 蛋白含量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但中药高剂量组 c-kit、SCF 蛋白含量明显高于低剂量组( $P < 0.01$ )。

表 1 各组大鼠食管下段组织 c-kit、SCF 蛋白(内参)相对灰度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	c-kit	SCF
正常	10	0.776 ± 0.078	0.783 ± 0.063
模型	7	0.238 ± 0.035*	0.186 ± 0.045*
西药	7	0.824 ± 0.111 $\Delta\Delta\Delta$	0.762 ± 0.058 $\Delta\Delta\Delta$
中药高剂量	7	0.632 ± 0.082 $\Delta\Delta$	0.620 ± 0.038 $\Delta\Delta$
中药中剂量	7	0.601 ± 0.127 $\Delta\Delta$	0.632 ± 0.114 $\Delta\Delta$
中药低剂量	7	0.409 ± 0.049 $\Delta\Delta\Delta$	0.329 ± 0.107 $\Delta\Delta\Delta$

注:与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与中药高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药高剂量组;E 为中药中剂量组;F 为中药低剂量组

图 3 各组大鼠食管下段组织 c-kit、SCF 蛋白电泳图

3 各组大鼠食管下段组织 c-kit、SCF mRNA 相对表达量比较(表 2) 与正常组比较,模型组 c-kit、SCF mRNA 相对表达水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,中药低剂量组 c-kit、SCF mRNA 相对表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),其余各治疗组均较模型组显著升高( $P < 0.01$ );中药高、中剂量两组间 c-kit、SCF mRNA 相对表达水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),中药高剂量组 c-kit、SCF mRNA 相对表达水平明显高于低剂量组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 2 各组大鼠食管下段组织 c-kit、SCF mRNA

组别	n	相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )	
		c-kit mRNA	SCF mRNA
正常	10	0.724 ± 0.128	0.981 ± 0.152
模型	7	0.140 ± 0.038 $\Delta\Delta$	0.358 ± 0.073 $\Delta\Delta$
西药	7	0.754 ± 0.136*	1.002 ± 0.191*
中药高剂量	7	0.637 ± 0.134*	0.813 ± 0.176*
中药中剂量	7	0.510 ± 0.085* $\Delta$	0.773 ± 0.062*
中药低剂量	7	0.240 ± 0.062 $\Delta\Delta\Delta$	0.468 ± 0.159 $\Delta\Delta\Delta$

注:与模型组比较,\* $P < 0.01$ ;与正常组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与中药高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$

## 讨论

目前认为下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)基础压下降及瞬时食管下括约肌松弛导致食管抗反流屏障功能减退是反流发生的基础<sup>[9,12]</sup>,因此,基于恢复 LES 功能的抗反流治疗是当前研究的热点,对临床应用具有重要的指导意义。LES 是胃食管交界处一段长 3~4 cm 左右的环形平滑肌,主要受肌间神经丛中兴奋性神经介质(乙酰胆碱和 P 物质为主)和抑制性神经介质(一氧化氮和血管活性肠肽为主)的相互作用与共同调节。这种神经递质由分布于黏膜下层和环肌纵肌之间肠神经系统释放,调控着食管平滑肌的活动。有研究显示胃食管结合部或其周围的迷走神经可能通过某种机制诱发瞬时下食管括约肌松弛,进而导致 LES 舒缩功能异常,引起返流。由此可见,肠神经系统支配下的 LES 舒缩功能障碍是返流发生的根本原因<sup>[13]</sup>。

ICC 是胃肠道广泛存在的一类特殊类型的细胞,位于肠神经系统与平滑肌之间,相互之间连接成网。近年来,一系列的研究发现 ICC 在胃肠动力调节方面扮演着至关重要的角色。ICC 可通过膜电位自发性节律性的去极化与复极化活动产生慢波电流并沿着缝隙连接传递到邻近的平滑肌细胞,引起平滑肌细胞上 L 型钙通道开放,兴奋收缩偶联,从而维持着正常的胃肠蠕动<sup>[14,15]</sup>。另一方面,脑肠轴所释放的各类神经递质(包括氮能神经递质及胆碱能神经递质),并不是直接作用于平滑肌细胞,而是首先与 ICC 细胞膜上的各类神经递质受体结合,通过 ICC 的放大作用,传递到平滑肌细胞,最终兴奋或抑制平滑肌细胞的收缩活动<sup>[6]</sup>。动物实验及临床研究均显示 ICC 形态结构及分布密度的异常改变可导致结肠慢传导性便秘、糖尿病胃轻瘫、肠易激综合征等多种消化道动力障碍性疾病<sup>[17,19]</sup>。近年来,Groneber D 等<sup>[6]</sup>分别利用免疫组化及基因敲除技术证明 ICC 不仅存在于食管组织,其细胞分化异常更是导致 LES 松弛及 GERD 形成的重

要原因<sup>[6]</sup>。利用蛋白组学及基因组学的研究发现 SCF/c-kit 信号通道的减退是 ICC 增殖、分化及细胞表型异常的最直接原因<sup>[20,21]</sup>。

c-kit 受体是由 ICC 内原癌基因 c-kit 编码并表达的 III 型酪氨酸激酶受体,是 ICC 特异性的标志蛋白,可被 SCF 激活。SCF 是由胃肠神经细胞及平滑肌细胞合成并分泌,作为 c-kit 的天然配体,可促进 c-kit 受体表达。c-kit 一旦与 SCF 特异性结合,相邻的 c-kit 单体发生同源二聚化,导致酪氨酸残基自身磷酸化,激活并招募一系列下游信号分子,如 PLC-r、Scr 家族激酶、PI3K/AKT、RAS-ERK、JAK/STAT 等,进而发挥调控 ICC 增殖、分化、凋亡、维持 ICC 细胞表型及功能的重要作用。此外,SCF/c-kit 信号通道一旦被激活,还可促进缝隙连接蛋白 Connexin 43 蛋白表达,从而改善网状结构,使 ICC 与平滑肌细胞之间联系更加紧密,促进细胞间的电信号的相互传导;另一方面,SCF/c-kit 信号通道的激活还能磷酸化 ICC 细胞膜表面的多种递质受体如 SP、NK-1、TRPV1 等,导致这些受体更易激活,从而增加 ICC 内在起搏节律,调节平滑肌细胞的收缩<sup>[22,23]</sup>。

c-kit、SCF 表达对 ICC 的生长发育及细胞表型具有重要调节作用,由于 ICC 以及平滑肌细胞来源于同一种前体细胞,c-kit 受体的表达与否决定该前体细胞的分化方向,当编码 c-kit 或 SCF 的基因位点发生突变,SCF/c-kit 信号系统受损后,该前体细胞由于缺少 c-kit 受体的刺激作用,分化发育为平滑肌细胞;另一方面,应用 c-kit 抗体阻断 c-kit 的作用,可导致 ICC 细胞转分化为平滑肌细胞,这些均可导致 ICC 的数目的缺失,从而使得网络结构发生改变,影响慢波的形成及信号的传导功能,导致胃肠动力障碍<sup>[20,24]</sup>。

本研究围绕 SCF/c-kit 信号轴对 ICC 增殖分化及其细胞表型改变的影响,从透射电镜、Western blot、RT-PCR 3 个层面观察食管下段组织 ICC 数目结构的改变以及 c-kit、SCF 蛋白、基因的表达情况,探讨中药六君子合旋覆代赭汤治疗 RE 脾虚证的潜在作用机制。本次研究发现:与正常组比较,模型组大鼠食管组织 ICC 数目显著减少,细胞结构明显破坏,c-kit、SCF 蛋白、mRNA 表达量明显减少,而中药高中剂量组及西药治疗组 ICC 数目及结构均明显恢复,蛋白及 mRNA 表达水平明显升高,其中西药组治疗效果优于中药各组。其可能的机制为某些原因导致大鼠 c-kit、SCF mRNA 及蛋白的表达量下降,抑制了 c-kit 单体的同源二聚化以及酪氨酸残基自身磷酸化,进而下游信号通路受阻,最终抑制前体细胞分化为 ICC 及促使

ICC 细胞表型向平滑肌细胞方向转化,导致 ICC 细胞数目的减少;另一方面,由于 SCF/c-kit 信号通道的抑制,ICC 细胞膜上的递质受体的磷酸化过程被抑制、细胞间的缝隙连接蛋白 Connexin 43 表达下降,从而影响了起搏信号的形成及传导,引起 LES 收缩功能障碍,导致反流形成以及 RE 的发生。而中药六君子合旋覆代赭汤可通过上调 SCF/c-kit 信号通道,促进 c-kit、SCF mRNA 及蛋白的表达,使得受损的 ICC 得到恢复正常的细胞表型,使 LES 功能恢复正常,从而达到治疗 RE 的作用。

本次实验尚存在一些缺陷:(1)本次实验未对 SCF/c-kit 上游信号分子进行研究,无法解释引起 c-kit、SCF 蛋白及 mRNA 表达减少的原因及确切机制,近年来有研究发现,Ca<sup>2+</sup>-ERK-AP-1-miR-34c-SCF/NPs/NPRs 等信号通路可能与 SCF 表达下调相关<sup>[18,25]</sup>。(2)本研究 ICC 胞质内质网肿胀、线粒体空泡化现象等细胞结构改变严重,但无法用 SCF/c-kit 信号通道下调进行解释,近年来研究发现与细胞自噬相关基因 Beclin1、LC3B 可能参与了 ICC 细胞结构的破坏,与 SCF/c-kit 通道下调共同促进了 ICC 结构、表型的改变,成为导致胃肠动力障碍的重要原因<sup>[26]</sup>。下一步我们将基于 Ca<sup>2+</sup>-ERK-AP-1-miR-34c-SCF 信号通道研究 SCF/c-kit 上游信号分子,阐述引起 SCF/c-kit 信号通道下调的具体机制;另一方面我们将通过透射电镜、Western blot 以及 PCR 扩增技术研究细胞自噬与 ICC 结构破坏的关系,从而补充 ICC 结构表型受损的病理机制,为后期研究提供新靶点。

利益冲突:作者承诺无任何个人、商业、学术或财务方面利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] Heading RC. Proton pump inhibitor failure in gastroesophageal reflux disease: a perspective aided by the Gartner hype cycle [J]. Clin Med, 2017, 17(2): 132-136
- [2] 赵威,王瑞峰,孙晓红,等.反流性食管炎患者胃肠道自主神经功能研究[J].中华消化杂志,2011,31(7): 438-441.
- [3] 徐海荣,卜平,袁洋,等.胃食管反流病中西医结合治疗及疗效标准研究——附 116 例临床观察[J].中国中西医结合杂志,2007,27(3): 204-207.
- [4] Gim H, Nam JH, Lee S, et al. Quercetin inhibits pacemaker potentials via nitric oxide/cGMP-dependent activation and TRPM7/ANO1 pathways in cultured interstitial cells of Cajal from mouse

- small intestine[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(6): 2422–2436.
- [5] Chen J, Du L, Xiao YT, et al. Disruption of interstitial cells of Cajal networks after massive small bowel resection[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(22): 3415–3422.
- [6] Groneberg D, Zizer E, Lies B, et al. Dominant role of interstitial cells of Cajal in nitrergic relaxation of murine lower oesophageal sphincter[J]. *J Physiol*, 2015, 593(2): 403–414.
- [7] Masuda T, Yano F, Omura N, et al. Effect of low dose aspirin on chronic acid reflux esophagitis in rats[J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(1): 72–80.
- [8] 贾波, 邓中甲, 黄秀深, 等. 白术茯苓汤不同配伍对脾虚大鼠胃泌素、胃动素、血管活性肠肽的影响[J]. *中医杂志*, 2002, 43(12): 938–940.
- [9] 汪晓奕, 朱凌云. 胃食管反流病中西医治疗的进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(4): 488–493.
- [10] Savarino E, Gemignani L, Pohl D, et al. Oesophageal motility and bolus transit abnormalities increase in parallel with the severity of gastro oesophageal reflux disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 34(4): 476–486.
- [11] de Miranda Gomes PR Jr, Pereira da Rosa AR, Sakae T, et al. Correlation between pathwayological distal esophageal acid exposure and ineffective esophageal motility [J]. *Acta Chir Lugosl*, 2010, 57(2): 37–43.
- [12] Martinucci I, de Bortoli N, Giacchino M, et al. Esophageal motility abnormalities in gastroesophageal reflux disease [J]. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2014, 5(2): 86–96.
- [13] 房俊, 杨晓俊, 喻春钊, 等. 胃食管反流病发病机制研究进展[J]. *中华普通外科学文献(电子版)*, 2013, 7(3): 217–221.
- [14] 程阔菊, 罗云, 彭雷, 等. Cajal 间质细胞在胃肠功能紊乱中的研究进展[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2015, 24(6): 749–750.
- [15] 陈健海, 仲婕, 王凡, 等. 胃肠道 Cajal 间质细胞起搏功能的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(1): 184–188.
- [16] Chen JH. Ineffective esophageal motility and the vagus: current challenges and future prospects [J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2016, 9: 291–299.
- [17] Yan S, Yue YZ. Aqueous extracts of *Herba Cistanche* promoted intestinal motility in Loperamide-induced constipation rats by ameliorating the interstitial cells of Cajal [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017: 6236904.
- [18] Jiang F, Zhou JY, Wu J, et al. Yangyin Runchang Decoction improves intestinal motility in mice with atropine/diphenoxylate-induced slow-transit constipation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017: 4249016.
- [19] 张程程. 电针对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦 Cajal 间质细胞超微结构及干细胞因子-kit 信号途径的影响[J]. *针刺研究*, 2017, 42(6): 482–488.
- [20] Radenkovic G, Radenkovic D, Velickov A. Development of interstitial cells of Cajal in the human digestive tract as the result of reciprocal induction of mesenchymal and neural crest cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(2): 778–785.
- [21] Velickov A, Mitrovic O, Djordjevic B, et al. The effect of bilberries on diabetes-related alterations of interstitial cells of Cajal in the lower oesophageal sphincter in rats[J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32(6): 639–647.
- [22] Liang J, Wu YL, Chen BJ, et al. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(5): 435–443.
- [23] Chai Y, Huang Y, Tang H, et al. Role of stem cell growth factor/c-kit in the pathogenesis of irritable bowel syndrome [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(4): 1187–1193.
- [24] Tan YY, Ji ZL, Zhao G, et al. Decreased SCF/c-kit signaling pathway contributes to loss of interstitial cells of Cajal in gallstone disease[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(11): 4099–4106.
- [25] Lin XL, Tang XD, Cai ZX, et al. NPs/NPRs signaling pathways may be involved in depression-induced loss of gastric ICC by decreasing the production of mSCF [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149031.
- [26] Zhang LM, Zeng LJ, Deng J, et al. Investigation of autophagy and differentiation of myenteric interstitial cells of Cajal in the pathwayogenesis of gastric motility disorders in rats with functional dyspepsia[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2017, 65(4): 533–539

(收稿: 2018–06–11 在线: 2018–10–21)

责任编辑: 李焕荣  
英文责编: 张晶晶