

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.11.023

疏肝和胃方对内脏高敏感大鼠 CaMK II 表达的影响

徐亭亭^{1,2}, 朱生樑¹, 张秀莲¹, 程艳梅¹

1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院消化科(上海 200437); 2. 上海中医药大学研究生院(上海 201203)

【摘要】 目的 观察疏肝和胃方对内脏高敏感钙调蛋白激酶 II (CaMK II) 表达的影响。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 32 只, 随机分为模型组、疏肝和胃方组、雷贝拉唑组及空白对照组 4 组, 每组 8 只。采用鸡卵清蛋白联合食管酸灌注建立内脏高敏感模型。免疫组化法观察各组大鼠脊髓 CaMK II 含量的表达及阳性神经元个数。**结果** 与空白对照组比较, 模型组 CaMK II 含量的表达、阳性神经元个数明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组、西药组 CaMK II 含量的表达、阳性神经元个数明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 在阳性神经元个数方面, 中药组低于西药组 ($P < 0.05$); 在 CaMK II 表达方面, 中药组与西药组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 疏肝和胃方可能通过抑制 CaMK II 表达降低内脏高敏感。

【关键词】 疏肝和胃方; 内脏高敏感; CaMK II

Effects of Shugan Hewei Decoction on the expression of CaMK II in visceral hypersensitive rats

XU Ting-ting^{1,2}, ZHU Sheng-liang¹, ZHANG Xiu-lian¹, CHENG Yan-mei¹

1. Department of Gastroenterology, Yueyang Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437; 2. Postgraduate School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203

Abstract: Objective To observe the effects of Shugan Hewei Decoction on the expression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) in visceral hypersensitive rats. **Methods** 32 healthy male SD rats were randomly divided into the model group, Shugan Hewei Decoction group, rabeprazole group and blank control group, eight rats in each group. The model of visceral hypersensitivity was established by the chicken ovalbumin combined with esophageal acid perfusion. The expression of CaMK II in spinal cord and the number of positive neurons of rats in each group were observed by immunohistochemistry. **Results** Compared with the blank control group, the expression of CaMK II and the number of positive neurons in the model group were increased significantly ($P < 0.05$); compared with the model group, the expression of CaMK II and the number of positive neurons in the Shugan Hewei Decoction group and rabeprazole group were decreased significantly, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). The number of positive neurons in the Shugan Hewei Decoction group was less than that in the control group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference on the expression of CaMK II between the Shugan Hewei Decoction group and rabeprazole group ($P > 0.05$). **Conclusion** Shugan Hewei Decoction could decrease the visceral hypersensitivity by the inhibition of CaMK II expression.

Keywords: Shugan Hewei Decoction; visceral hypersensitivity; CaMK II

胃食管反流病 (gastroesophageal reflux disease, GERD) 是指胃及十二指肠内容物反流至食管引起的烧心、泛酸等一系列症状。其中只有胃食管反流症状, 内镜下未见黏膜损伤者称为非糜烂性胃食管反流病 (non-erosive gastroesophageal reflux disease, NERD)。在东亚国家, GERD 的发病率正在逐年上升, 据报道, 在 5 年的时间内已经从 2.5% ~ 4.8% 上升至 5.2% ~

8.5%^[1]。有调查显示, 在美国及欧洲, GERD 对高达 20% 人群的生活质量产生影响, 在澳大利亚为 12% ~ 15%, 在亚洲为 2% ~ 5%; 其中, 约 50% ~ 70% 有烧心或者酸反流相关性症状的患者存在 NERD 疾病^[2]。本病发病率高, 症状明显, 生活质量下降, 复发率高, 治疗十分困难。疏肝和胃方为导师朱生樑教授多年临床经验总结, 并根据患者症状加减, 疗效显著^[3-5]。现观察疏肝和胃方对内脏高敏感钙调蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 表达的影响, 为中医药治疗 NERD 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

[基金项目] 上海市科委科技支撑重大项目 (13401902801)

[作者简介] 徐亭亭, 女, 博士生, 主要从事中医治疗脾胃病的临床研究工作

[通讯作者] 朱生樑, 主任医师, 博士生导师。

E-mail: zhushengliang999@163.com

1.1.1 动物 SD 雄性大鼠, SPF 级, 32 只, 体质量 (225 ± 50) g, 由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院提供。动物合格证号: SCXK(沪)2012-0002。

1.1.2 药物与试剂 疏肝和胃方(旋覆梗 12 g, 柴胡 9 g, 延胡索 9 g, 黄连 3 g, 吴茱萸 3 g, 煅瓦楞子 30 g, 枳壳 12 g, 生姜 3 g, 焦栀子 9 g, 黄精 15 g, 厚朴 9 g, 香附 12 g, 甘草 6 g), 由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院提供。雷贝拉唑肠溶片(批号: 039131007), 上海信谊药厂有限公司; 戊巴比妥钠(批号: 18569802), 国药集团; 鸡卵清蛋白(PP0004), 美国 Sigma 公司; CaMK II 抗体(批号: bs-9921R), 北京索莱宝科技有限公司; 羊抗兔 Ig 二抗、山羊血清、DAB 显色试剂盒, 由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院中西医结合研究所提供。

1.1.3 仪器 樱花全自动密闭式组织脱水机(VIP-E300F), 日本樱花精机株式会社; 樱花包埋机, 日本樱花精机株式会社; OLYMPUS 显微镜(BX50), 奥林巴斯光学工业株式会社; OLYMPUS 全自动显微镜照相装置(PM-10AD), 奥林巴斯光学工业株式会社。

1.2 分组、造模及干预 32 只 SD 大鼠随机分为疏肝和胃方组、雷贝拉唑组、模型组、空白组共 4 组, 每组 8 只。

根据《食管内脏高敏感性动物模型的建立和评价》^[6]相关内容进行造模。在实验第 0 天采用鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA) 100 mg, 加氢氧化铝 200 mg 制备成 1.5 ml 溶液, 进行腹腔注射基础致敏。灌胃 14 天后进行食管酸灌注, 具体步骤如下: 使用 2% 戊巴比妥钠(每 100 g 大鼠体质量给予 0.2 ml) 进行腹腔麻醉, 麻醉后将大鼠固定于固定板上, 头部稍抬高, 沿腹壁及胃壁切开, 插入引流管, 收集由食管滴入的液体。引流管位置为食管及胃交界处上 2 ~ 3 cm 处, 并将导管固定。另一端使用 0.1 mol/L 盐酸泵入, 速度 10 ml/h, 共 50 min。

疏肝和胃方组造模后予以疏肝和胃方灌胃。疏肝和胃方采用单味中药颗粒(由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科提供), 根据人使用剂量是 SD 大鼠的 6.25 倍进行折算^[7], 故予以生药剂量为每日每千克 9.84 mg; 每次灌胃每 100 g 大鼠体质量给予 1 ml 药液, 每天 2 次, 从实验第 0 天至实验第 13 天, 共灌胃 14 天。

雷贝拉唑组造模后予以雷贝拉唑肠溶片灌胃, 每日剂量为 4.17 μg/g, 每次灌胃每 100 g 大鼠体质量给予 1 ml 药液, 每天 2 次。从实验第 0 天至第 13 天, 共灌胃 14 天。

模型组造模后, 正常饮食, 不予药物干预。空白组

正常饮食, 不予药物干预。

1.3 取材及指标检测

1.3.1 取材 末次给药后, 禁食不禁水, 24 h 后取材。食管及脊髓组织切片的制备: 食管酸灌注结束后开胸, 在左心室处注入约 200 ml 0.9% NaCl 溶液以冲洗全身血液, 然后用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L) 500 ml 加压灌注固定, 其中缓冲液中需含 4% 多聚甲醛。取食管下段黏膜, 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 以备光镜观察。1 h 后取出脊髓放入多聚甲醛中固定 18 ~ 20 h, 且维持温度为 4 ℃。再放入 4 ℃ 20% 蔗糖溶液中过夜。石蜡包埋、切片备用。

1.3.2 CaMK II 阳性表达 免疫组化观察 T1 ~ T6 段脊髓 CaMK II 阳性表达^[8]。其阳性表达位于胞浆, 颜色为棕黄色, 主要分布在脊髓前角及中央带, 脊髓后角也有少量表达^[9]。阳性神经元细胞呈三角形或卵圆形。计数主要通过生物显微镜及图像分析软件进行统计, 每组脊髓选取 5 例标本, 每例标本选取 2 张切片, 每张切片在高倍显微镜(×400)下随机选取 5 个视野, 使用 IPP 6.0 图像分析软件统计 CaMK II 阳性神经元个数及光密度值(IOD 值), 取其平均值进行统计。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行分析处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据服从正态分布或近似正态分布且方差齐, 采用 *t* 检验或方差分析。若不服从正态分布及方差齐性, 则采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

脊髓 CaMK II 表达情况如下。模型组胞浆着色较深, 表达明显且神经元数量明显增多; 雷贝拉唑组阳性表达的神经元数量明显减少, 且着色较浅, 表达较弱; 与雷贝拉唑组比较, 疏肝和胃方组阳性表达的神经元数量更为减少, 且着色较雷贝拉唑组更浅, 表达更弱; 在各组 CaMK II 蛋白表达结果中, 空白组着色最浅, 表达最弱。见图 1。

与空白组比较, 模型组阳性神经元个数、CaMK II 阳性表达增多, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 疏肝和胃方组、雷贝拉唑组阳性神经元个数减少, CaMK II 阳性表达减少($P < 0.01$)。与雷贝拉唑组比较, 疏肝和胃方组阳性神经元个数减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 但疏肝和胃方组与雷贝拉唑组 CaMK II 阳性表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

3 讨论

随着研究的深入, 越来越多的学者认为 NERD 不是 RE 的轻度疾病, 而是一组异质性疾病。两者虽同属

于 GERD,但两者发病机制不尽相同。其中反流及食管抗反流机制异常,食管内脏高敏性,精神心理因素考虑为发病机制^[10]。食管高敏性是近年来研究的热点。Matthews^[11]在健康志愿者食管中反复短暂引入酸物质,食管的高敏感即可引出,并可维持长达 4 h。孟庆

伟^[12]认为该病为神经受体在酸暴露下引起高敏性。相关酸刺激可以通过扩大食管黏膜上皮细胞间隙到达感觉神经末梢,从而引起一系列症状。褚传莲等^[13]进一步总结为外周致敏和中枢致敏。

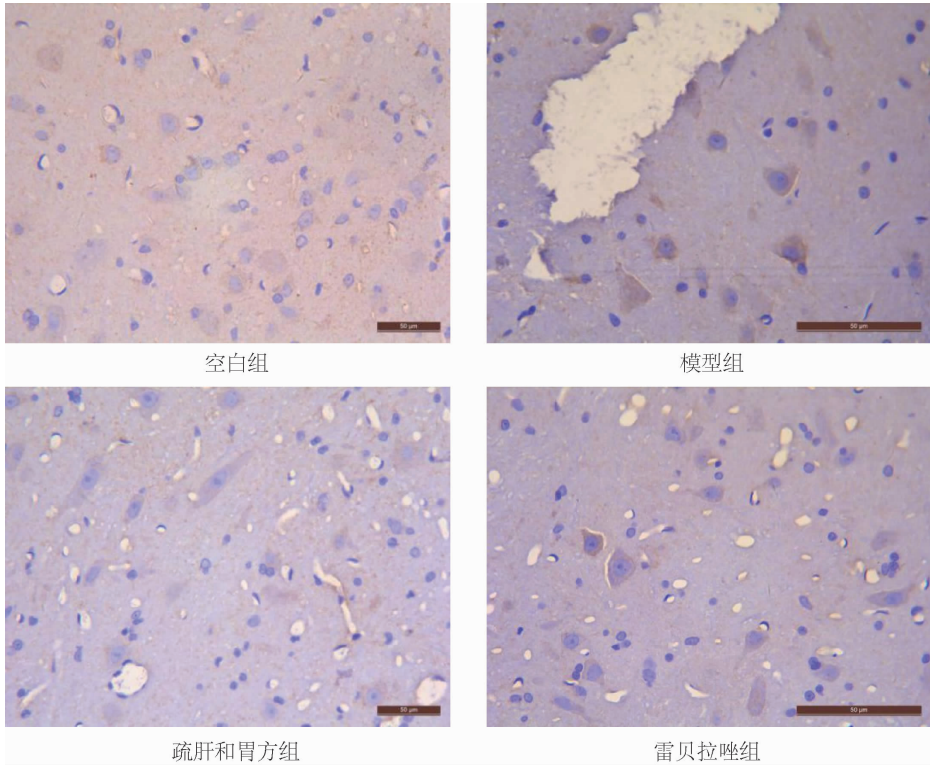


图 1 各组大鼠 CaMK II 表达(免疫组化染色,×400)

表 1 各组大鼠 CaMK II 阳性神经元个数及阳性表达量比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	阳性神经元个数 (个/视野)	CaMK II 表达含量 (平均 IOD 值)
空白组	3.24 ± 0.87	0.01 ± 0.01
模型组	$12.00 \pm 1.93^*$	$0.07 \pm 0.03^*$
疏肝和胃方组	$5.54 \pm 2.38^{\# \Delta}$	$0.02 \pm 0.01^{\#}$
雷贝拉唑组	$8.31 \pm 2.05^{\#}$	$0.03 \pm 0.01^{\#}$

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$;与雷贝拉唑组比较, $\Delta P<0.05$

内脏高敏感除了外周敏化之外,还包括中枢敏化,其中包括脊髓对传入信号扩大导致痛觉过敏。信号传递和处理通道主要在脊髓部分,而 CaMK II 从脊根神经节到脊髓后角均有分布^[14]。CaMK II 分布广泛,可以介导许多神经递质的磷酸化,传递或扩大兴奋;同时又可以自身磷酸化,导致长时程增强(LTP),在突触可塑性中发挥关键作用。当伤害性刺激消除后,神经递质仍可继续存在及传递兴奋,内脏可感受持续性疼痛^[15-16]。

阙红军等^[17]研究发现,在慢性疼痛大鼠中,模型组疼痛阈值及潜伏期均明显降低,对疼痛的感知增强,且

CaMK II 表达升高,而给予 CaMK II 抑制剂 KN-93 后疼痛明显降低,提示 CaMK II 与慢性疼痛及痛觉过敏有关。CaMK II 与多种致敏物质及应激通路有关,而连接两者的“开关”为 Ca^{2+} 内流。季恩飞等^[18]提出,NMDA 受体增高可引起 P38MAPK 表达的升高,P38MAPK 通路在应激过程中起至关重要的作用。NMDA 受体抑制剂(NK801)干预后则可明显抑制 P38MAPK 的表达,考虑为 NMDA 受体激活介导钙离子的内流,导致 P38MAPK 通路的激活。而钙离子内流则是 CaMK II 发挥其功能的重要物质基础,说明 CaMK II 在 P38MAPK 通路导致应激反应的作用中起到不可替代的作用。宋春风等^[19]认为,CaMK II 磷酸化可以影响 c-fos 基因表达:在许多细胞外刺激反应中,c-fos 基因表达上调可以持续传递伤害性信号,导致内脏高敏感^[20]。有研究表明,当 CaMK II 被激活后,对 nNOS 形成负反馈,导致 NO 减少,进而导致 NO 松弛平滑肌功能减弱引起疼痛加重^[15]。CaMK II 自身磷酸化的持续活化可以激活许多信号转导分子,包括蛋白激酶等致敏物质扩大原有表达,诱导 P 物质、脑源性神经营养因子,引起持续 Ca^{2+} 内流,从而扩大兴奋性,即长时程增强(LTP)^[16]。

突触的长时程延长可导致传入脊髓伤害性刺激信号反应增强,从而引起痛觉过敏。

本次研究发现,在 OVA 联合酸灌注的内脏高敏感动物模型中,CaMK II 在脊髓的阳性表达及阳性神经元个数明显升高,而在空白组大鼠中 CaMK II 阳性表达较弱,两者相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。推测 CaMK II 高表达与内脏高敏感有关,而 CaMK II 的表达升高即磷酸化水平升高。有研究提出,其可能机制为伤害性刺激引起细胞内 Ca^{2+} 迅速增多,从而导致 CaMK II 信号转导通路激活,同时被激活的 CaMK II 自身磷酸化,当 Ca^{2+} 水平降至正常后,CaMK II 自身磷酸化仍可维持一段时间,从而使神经兴奋性持续增强,导致内脏高敏感^[15]。与模型组比较,疏肝和胃方组在 CaMK II 阳性神经元细胞数量及阳性表达方面明显减少,考虑疏肝和胃方可能通过抑制 CaMK II 的表达降低内脏高敏感。现代药理研究发现,枳壳、枳实在胃肠道作用机制可能与降低 P 物质及血管活性肠肽等神经递质有关,而这些神经递质可以通过 CaMK II 磷酸化发挥其内脏高敏感作用。黄连、吴茱萸、延胡索、煅瓦楞子等可以抑制胃酸分泌、保护胃黏膜,减少伤害性刺激的传入,从而减轻痛觉过敏。

因此,疏肝和胃方可能通过减少酸对食管黏膜的刺激,降低伤害性刺激传入,减少神经递质的激活,CaMK II 磷酸化程度也相应降低,从而导致神经兴奋性减少,进而缓解内脏高敏感。

参考文献:

- [1] You CR, Oh JH, Seo M, *et al.* Association between non-erosive reflux disease and high risk of obstructive sleep apnea in Korean population [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2014, 20(2):197-204.
- [2] Yang XJ, Jiang HM, Hou XH, *et al.* Anxiety and depression in patients with gastroesophageal reflux disease and their effect on quality of life [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(14):4302-4309.
- [3] 张秀莲,朱生樑,刘春芳. 疏肝和胃方改善非糜烂胃食管反流病主要症状的临床观察[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(2):622-625.
- [4] 程艳梅,张秀莲,刘春芳,等. 疏肝和胃方治疗非糜烂性胃食管反流病临床观察[J]. *上海中医药杂志*, 2013, 47(6):48-49.
- [5] 王高峰,程艳梅,曹慧杰,等. 朱生樑治疗难治性胃食管反流病经验[J]. *上海中医药杂志*, 2013, 47(12):19-21.
- [6] 杨敏,陈东风,房殿春. 食管内脏高敏感性动物模型的建立和评价[J]. *局解手术学杂志*, 2008, 17(2):77-79.
- [7] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.
- [8] 杨敏. 食管内脏高敏感性参与非糜烂性反流病发生的外周及中枢敏感化机制的研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2006.
- [9] 全淞铭,曹阳,于德水. 大鼠脊髓缺血再灌注损伤 CaMK II 的表达及作用研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2015, 23(12):1117-1122.
- [10] 刘沁媛,顾勤. 非糜烂性反流病中西医研究进展[J]. *山东中医杂志*, 2014, 33(7):607-609.
- [11] Mathews PJ, Knowles CH, Chua YC, *et al.* Effects of the concentration and frequency of acid infusion on the development and maintenance of esophageal hyperalgesia in a human volunteer model [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(4):G914-G917.
- [12] 孟庆伟. 食管内脏高敏感及其相关研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(7):568-573.
- [13] 褚传莲,杜全林,李延青. 非糜烂性反流病诊断研究中的几个热点问题[J]. *中华临床医师杂志*, 2013, 7(6):2618-2621.
- [14] 吴萍,许树长. 精神应激诱发内脏高敏感的中枢作用机制研究[J]. *胃肠病学*, 2014, 19(8):507-510.
- [15] 李鹏飞,李江敏,朱永平. 药物成瘾中的 CaMK II 信号转导机制[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2013, 22(6):412-415.
- [16] 田徐露,陈胜良,曹芝君. CaMK II 参与内脏痛觉调节的机制[J]. *胃肠病学*, 2011, 16(4):235-237.
- [17] 阚红军,于剑锋. 神经病理性疼痛引起大鼠空间记忆障碍和内侧面额叶 PSD95 以及 CaMK II-Thr305 的表达升高[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2015, 21(3):182-188.
- [18] 季恩飞,刘学文,田步先,等. NMDA 经 p38MAPK 信号通路诱导体外培养的皮肤神经元损伤[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(24):2648-2653.
- [19] 宋春风,孟丽,崔芳. 糖皮质激素对大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴 Ca^{2+} /CaMPK II 的影响[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2014, 22(1):1-4.
- [20] 孙鸿燕,董文斌,姜林. 母婴分离对新生鼠成年后内脏疼痛敏感性影响及机制研究[J]. *中华妇幼临床医学杂志*, 2014, 10(1):26-28.

编辑:季春来

收稿日期:2016-07-20