

• 实验研究 •

健脾清肠方含药血清对小鼠小肠 Cajal 间质细胞增殖的影响*

戴彦成¹, 张亚利¹, 郑 烈¹, 王立娟², 唐志鹏^{1△}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院消化内科/上海中医药大学脾胃病研究所 上海 200032;

2. 上海中医药大学教学实验中心, 上海 201203)

摘要: 目的 研究健脾清肠方含药血清(Jianpi Qingchang Decoction containing serum, JQD-CS)对小鼠小肠 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)增殖的影响。方法 体外培养小鼠小肠 ICC 并鉴定,制备 JQD-CS, MTT 检测不同浓度 JQD-CS 对 ICC 的增殖作用。结果 适度浓度($\leq 20\%$)的 JQD-CS, ICC 的 OD 值随着含药血清浓度的增加而升高。结论 适度浓度的 JQD-CS 可对 ICC 增殖分化起促进作用。

关键词: 健脾清肠方; Cajal 间质细胞; 增殖; 溃疡性结肠炎

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2017)01-0001-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.01.001

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因尚不明确的自身免疫性疾病,在临床表现上,除了黏液脓血便之外,还有腹痛、腹泻、里急后重等肠道动力紊乱的症状,并且严重影响患者生活质量^[1-2]。目前相关指南已将改善患者生活质量,诱导并维持临床缓解和黏膜愈合以及防治并发症列入 UC 的治疗目标^[3]。因此,尝试探索既可促使 UC 黏膜愈合,又可调节 UC 肠动力紊乱的补充和替代治疗策略成为 UC 治疗研究的思路之一^[4]。先前有学者发现脾气虚弱是 UC 发病的基础,热和瘀是 UC 病机关键^[5-6]。针对 UC 这一发病机制,课题组制定了健脾清肠方(Jianpi Qingchang Decoction, JQD)治疗 UC。研究发现:JQD 可以单独用来治疗初发型或者轻度 UC 患者,可明显改善其黏液脓血便、里急后重、腹泻的肠道症状和疲劳的全身症状,改善生活质量^[7-8]。Cajal 间质细胞(interstitial cell of Cajal, ICC)是消化道平滑肌的起搏细胞,已成为胃肠动力障碍性疾病的治疗靶点^[9]。ICC 损伤或功能障碍是 UC 肠道动力紊乱的关键因素之一^[10]。前期研究表明:JQD 通过抑制 NF- κ B/TNF- α 通路及调节细胞因子 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 表达,抑制了肠道炎症的级联放大反应;抑制

ICC 过度自噬,调控 ICC/平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)网络通路从而调节葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)模型小鼠异常肠道动力^[11]。但 JQD 对体外培养的 ICC 的作用机制尚未明确。本实验旨在通过体外培养小鼠小肠 ICC,利用 MTT 法观察 JQD 含药血清(containing serum, JQD-CS)对 ICC 增殖的影响,进一步探讨 JQD 治疗 UC 肠道动力紊乱的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周龄 Balb/c 小鼠 100 只,雄性,体重(20 $\pm$ 2)g,上海斯莱克动物有限公司提供,动物使用许可证号:SCXK(沪)2012-0002,用于含药血清的制备;SPF 级 9~12d 龄的 Balb/c 小鼠 20 只,雌雄均可,上海斯莱克动物有限公司提供,动物使用许可证号:SCXK(沪)2012-0002,用于小肠 ICC 的培养。

1.2 药品与试剂

JQD 组成:黄芪 30g,黄连 3g,党参 15g,马齿苋 30g,生地榆 15g,三七 6g,白及 3g,木香 6g,生甘草 6g。JQD 生药粉末难溶于水,故与 0.5%羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC)溶液制成混悬

* 基金项目: 国家自然科学基金(81403355, 81573892);上海市中医药新三年行动计划项目(ZY3-RCPY-2-2001)

收稿日期: 2016-12-22

作者简介: 戴彦成(1982-),男,江苏扬中人,博士,主治医师,研究方向:中医药治疗炎症性肠病。

Δ 通信作者: 唐志鹏, E-mail: zhipengtang@sohu.com

液。参考《中药药理研究方法学》,根据实验动物和人临床给药剂量折算系数计算各组小鼠的给药剂量,按原生药计,小鼠给予 JQD 的给药剂量为 $17.1 \text{ g/kg/d}^{[12]}$ 。干细胞生长因子(美国 Sigma 公司); SMGM 培养液(美国 Gibco 公司);兔抗小鼠 c-Kit 抗体(一抗)(美国 Abcam 公司)、FITC 标记山羊抗兔 IgG(二抗)(美国 Invitrogen 公司)等。

1.3 实验仪器

CO₂ 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司);OLYMPUS 显微镜 BX53 型、荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司);酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 含药血清的制备^[13]

小鼠 3d 适应性饲养后,随机分为两组:含中药血清组给予 JQD 溶液,空白血清组给予等量 0.5% CMC-Na 溶液,灌胃时按照小鼠体质量给药($0.2 \text{ mL}/10 \text{ g/d}$),连续 7d,末次给药后 1h(灌胃前禁食不禁水 12h)腹主动脉取血,静置 2h 后, $3\,000 \text{ r/min}$ 离心 10min,无菌条件下分离血清。 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30min 灭活, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4.2 小鼠小肠 ICC 的培养及鉴定

将小鼠颈椎脱臼处死,放于预先盛有 75%乙醇的烧杯中浸泡 5min;无菌剪刀切开腹壁取出小肠(幽门环下 1cm 至回盲部),沿肠系膜边缘剪开肠道,在 Ca^{2+} -free 的 Hanks 液中反复漂洗,去除小肠内容物;将小肠组织用大头针固定在大培养皿中,皿中内置硅胶板并装有 Ca^{2+} -free 的 Hanks 液;剥离小肠黏膜和黏膜下层,用小剪刀将剥离黏膜层后的小肠组织剪碎。使用 II 型胶原酶分离细胞,消化酶由 II 型胶原酶 $1.3\sim 1.5 \text{ mg/mL}$ + 牛血清白蛋白(BSA) $2\sim 4 \text{ mg/mL}$ + 胰蛋白酶抑制剂 2 mg/mL + ATP 0.27 mg/mL 制成:将组织碎片置入消化酶中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中消化 35min。将分离后的组织使用 Ca^{2+} -free 的 Hanks 溶液反复冲洗数次,细口吹管反复吹打形成细胞悬浮液,并将悬浮液滴至培养皿中皿中内置盖玻片,盖玻片用鼠尾胶原预覆盖,静置沉淀 60min。吸去上清液,将含有 5% 抗生素及 5 ng/mL 干细胞因子的 SMGM 培养液使用移液器注入培养皿中,随后置于二氧化碳培养箱($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $95\% \text{ O}_2$, $5\% \text{ CO}_2$)中培养^[14]。

使用胰酶消化细胞,完全培养基重悬;在灭菌的 12 孔板中铺上细胞进行爬片;取细胞悬液分别滴于

圆片上, 30min 后,在培养皿中补加完全培养液,随后置于培养箱中培养 6h;取出培养皿,使用 PBS 液漂洗 3 次,每次 2min; 4% 多聚甲醛处理 60min; PBS 液漂洗 3 次,每次 2min; 使用 0.5% Txiton X-100 处理 20min; PBS 液漂洗 3 次,每次 2min; 用 3% H_2O_2 处理 15min; PBS 液漂洗 3 次,每次 2min; 一抗孵育 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜(1:100); PBS 液漂洗 3 次,每次 2min; 对应二抗孵育 1h (1:200), PBS 液漂洗 3 次,每次 2min; DAPI 复染, 5min; PBS 液漂洗 3 次,每次 2min; 封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.3 MTT 法检测 JQD-CS 对 ICC 增值作用^[15-16]

经酶解法将 ICC 悬液用血球计数板计数接种, 96 孔板的每孔 5 000 个细胞,设 3 个复孔。每 3d 换一次液。将细胞分为空白组(含有抗生素及干细胞因子的 SMGM 培养液和体积分数为 5% 空白血清)和不同浓度的含药血清组(含有抗生素及干细胞因子的 SMGM 培养液和体积分数分别为 5%、10%、20%、40%、60% 的含药血清),并依次处理 0、24、48、72h。第 0 天开始,每天的固定时间,在每孔中加入 $20\mu\text{L}$ 的 0.5% (5 mg/mL) 的 MTT 液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养 4h;连续干预 3d。终止培养,吸去孔内的培养液。每孔加入 $150\mu\text{L}$ 的 DMSO,置于摇床上低速振荡 10min,酶标仪波长 490nm 处测量各孔的光密度(optical density, OD)值。根据测得 OD 值,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制曲线。

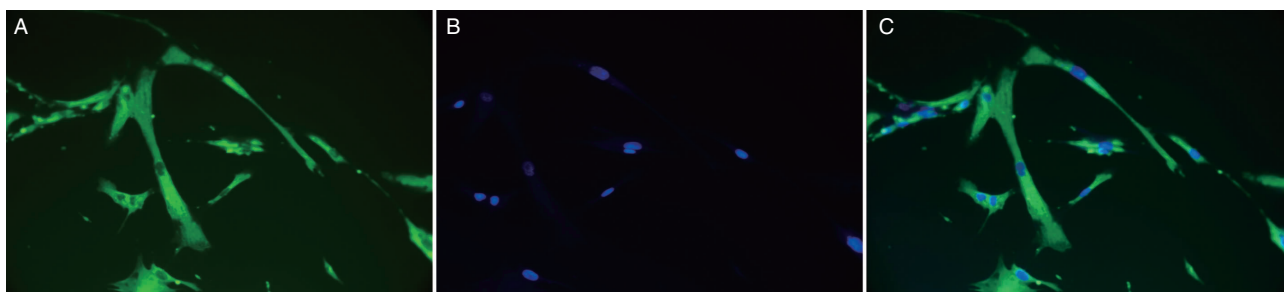
1.4.4 统计方法

采用 SPSS18.0 软件进行处理,所有实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间均数的两两比较采用最小显著(LSD)法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICC 的形态和鉴定培养

24h 后可见有少量细胞贴壁;继续培养至 48h,可见大量细胞贴壁生长。激光共聚焦显微镜下观察,培养的绝大部分细胞表面 c-Kit 蛋白的表达呈绿色阳性显色,且胞体和突起均明显着色;DAPI 复染细胞核,可见其呈蓝色。细胞胞体呈三角形或梭形,细胞核大,核周有少量的胞浆,相邻细胞借助突起形成网络样结构。以上表明所培养的细胞具有明显的 ICC 的形态特征(图 1)。



A: ICC 的胞浆和突起 c-Kit 蛋白表达呈绿色阳性显色; B: DAPI 复染 ICC 细胞核呈蓝色显色; C: A 和 B 融合

图 1 激光共聚焦显微镜下 ICC 形态($\times 630$)

2.2 不同浓度 JQD 含药血清对 ICC 增殖的影响

当含药血清浓度 $\leq 20\%$ 时,随着培养时间的延长和浓度的增加,ICC 的 OD 值呈上升趋势;但在血清浓度高于 40% 时,OD 值呈下降趋势;尤其当血清浓度为 60% 时,严重抑制细胞生长(图 2)。当作用 72h 时,不同浓度 JQD 含药血清组对 ICC 增殖的 OD 值差异有明显差异($P<0.05$)。与空白组相比,5%JQD 含药血清组、10%JQD 含药血清组、20%JQD 含药血清组、40%JQD 含药血清组、60%JQD 含药血清组的 OD 值差异均具有统计学意义($P<0.05$)。与 20%JQD 含药血清组相比,40%JQD 含药血清组、60%JQD 含药血清组的 OD 值差异均具有统计学意义($P<0.05$)。与 40%JQD 含药血清组相比,60%JQD 含药血清组的 OD 值差异均具有统计学意义($P<0.05$)(表 1)。

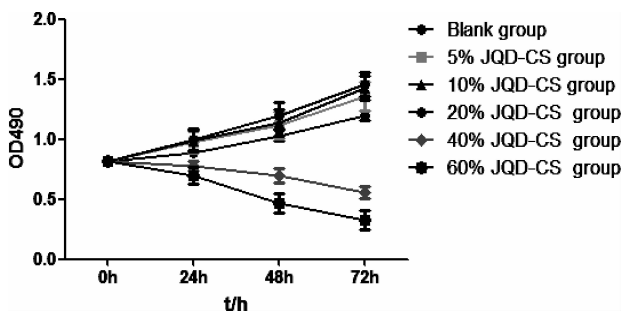


图 2 不同浓度 JQD-CS 对 ICC 增殖的作用

表 1 不同浓度 JQD-CS 作用 72h 对 ICC 增殖影响的比较
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	n	OD 值
空白组	3	1.21 ± 0.04
5% JQD-CS 组	3	$1.36 \pm 0.12^{\#}$
10% JQD-CS 组	3	$1.43 \pm 0.10^{\#}$
20% JQD-CS 组	3	$1.46 \pm 0.11^{\#}$
40% JQD-CS 组	3	$0.56 \pm 0.03^{**}$
60% JQD-CS 组	3	$0.33 \pm 0.08^{***}$

注:与空白组比较, $^{\#}P<0.05$;与 20%JQD 含药血清比较, $^{**}P<0.05$;与 40%JQD 含药血清比较, $^{***}P<0.05$

3 讨论

健脾清肠是中医药治疗 UC 的重要治则,所以在治疗上我们提倡健脾清肠,扶正祛邪为主,创制了 JQD。本方以黄芪健脾益气,托毒生肌,黄连清热燥湿止痢,黄芪和黄连共为君药;党参助黄芪健脾益气,马齿苋助黄连清解肠热止痢为臣药;佐以生地榆清热凉血止血,三七化瘀止血,白及护膜止血;使以木香理气消胀,生甘草清热解毒,调和诸药。全方共奏健脾益气,清热解毒,凉血止血,理气止痛的功效;具有标本兼治、气血双调的中医治疗特色,体现了中医“和”法治疗 UC 的特点^[17]。现代研究发现:JQD 方中的黄芪通过使肠道内双歧杆菌、乳酸杆菌含量上升,肠球菌、肠杆菌含量下降,从而肠道微生态失衡^[18]。黄连中的小檗碱可以减缓葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎的发生,其机制可能是小檗碱通过抑制肠道外来细菌感染、抑制中性粒细胞的迁移和聚集、促进修复因子的表达,从而使结肠炎得到恢复^[19]。

研究发现:UC 肠动力紊乱有以下机制:ICC 与平滑肌细胞、神经元之间的连接结构受损、数量减少,导致其调控肌细胞运动的中介功能降低,使胃肠道神经系统对肌细胞的调节作用减弱;ICC 线粒体数量减少、肿胀、溶解、形成空泡,导致线粒体能量供应减少,合成功能降低,粗面内质网扩张,胞质内空泡形成,使其对神经细胞兴奋的传导作用减弱^[20]。本课题在 JQD 体内抑制 ICC 过度自噬,调控 ICC/SMC 网络通路从而调节 DSS 模型小鼠异常肠道动力的研究基础上,分离培养小鼠小肠 ICC 并鉴定,观察 JQD-CS 对体外培养 ICC 增殖的影响。结果提示适度浓度的 JQD-CS 为 ICC 的增殖提供了较为良好的外环境,因而能促进 ICC 的增殖分化。这可能是 JQD 治疗 UC 肠道动力学紊乱的作用机制之一,但其深层的分子生物学作用机制(比如通过何种信号通路促进 ICC 增殖分化等)以及其他可能的作用机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Bassotti G, Antonelli E, Villanacci V, et al. Gastrointestinal motility disorders in inflammatory bowel diseases[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(1): 37-44.
- [2] 戴彦成, 唐志鹏, 李凯, 等. 溃疡性结肠炎中肠道动力学研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(7): 721-724.
- [3] Bressler B, Marshall JK, Bernstein CN, et al. Clinical practice guidelines for the medical management of nonhospitalized ulcerative colitis: the Toronto consensus[J]. Gastroenterology, 2015, 148(5): 1035-1058.
- [4] 戴彦成, 张亚利, 唐志鹏. 中医药治疗溃疡性结肠炎生存质量评价的现状与展望[J]. 世界中医药, 2015, 10(6): 951-953.
- [5] 李姿慧, 王键, 蔡荣林, 等. 参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 ERK、p38 MAPK 蛋白表达的影响[J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(6): 7-10.
- [6] 唐小琴, 王翼洲, 杨辉. 热瘀散对大肠湿热型溃疡性结肠炎患者外周血 TNF- α 、CRP 的影响[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(6): 42-44.
- [7] Dai YC, Zhang YL, Wang LJ, et al. Clinical presentation and treatment strategies for ulcerative colitis: A retrospective study of 247 inpatients[J]. Chin J Integr Med, 2016, 22(11): 811-816.
- [8] 戴彦成, 郑烈, 张亚利, 等. 健脾清肠方对溃疡性结肠炎患者生活质量作用的随机对照试验[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1926-1932.
- [9] Negreanu LM, Assor P, Mateescu B, et al. Interstitial cells of Cajal in the gut—a gastroenterologist's point of view[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(41): 6285-6288.
- [10] Dai YC, Tang ZP, Wang ZN, et al. Influence of shenqing recipe on morphology and quantity of colonic interstitial cells of Cajal in trinitrobenzene sulfonic acid induced rat colitis[J]. Chin Med Sci J, 2011, 26(1): 43-48.
- [11] 戴彦成, 郑烈, 张亚利, 等. 健脾清肠方对 DSS 诱导结肠炎小鼠肠道动力学影响的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(2): 123-128.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1103.
- [13] Fu L, Pang B, Zhu Y, et al. Ex Vivo Stromal Cell-Derived Factor 1-Mediated Differentiation of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Hepatocytes Is Enhanced by Chinese Medicine Yiguanjian Drug-Containing Serum[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 7380439.
- [14] Xu WD, Jiang X, Lan L, et al. Long-term culture and cryopreservation of interstitial cells of Cajal[J]. Scand J Gastroenterol, 2012, 47(1): 89-98.
- [15] 张智, 凌江红, 宁海恩, 等. 柴胡疏肝散含药血清对大鼠胃 Cajal 间质细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(30): 4792-4799.
- [16] 简小兰, 杨晓, 罗吉, 等. 健脾益气化瘀解毒方含药血清对结肠癌 HCT116 细胞增殖、周期、凋亡的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(11): 909-914.
- [17] 戴彦成, 张亚利, 张仁岭, 等. 基于传统文化“和”的思想防治溃疡性结肠炎理论与实践的探讨[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(11): 2611-2613.
- [18] 孙立群, 梁金花, 高月娟. 探讨纳米级中药黄芪对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群失调的调整作用[J]. 中国中医急症, 2012, 21(8): 1263-1265.
- [19] 王新, 唐丽, 杨造鹏, 等. 小檗碱对 DSS 结肠炎小鼠发挥保护作用的实验观察[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1132-1135.
- [20] 戴彦成, 张亚利, 唐志鹏. ICC 自噬调控——溃疡性结肠炎肠动力紊乱治疗的新靶点[J]. 胃肠病学, 2015, 20(6): 377-379.

(编辑:徐建平)

Effect of Jianpi Qingchang Decoction Containing Serum on Proliferation of Mice Intestinal Interstitial Cells of Cajal in Vitro

DAI Yancheng¹, ZHANG Yali¹, ZHENG Lie¹, WANG Lijuan², TANG Zhipeng¹

(1. Department of Gastroenterology, Institute of Digestive Disease, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China;

2. Teaching and Experiment Center Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

ABSTRACT: **Objective** To evaluate the effect of Jianpi Qingchang Decoction containing serum (JQD-CS) on proliferation of mice intestinal interstitial cells of Cajal (ICC) in vitro. **Methods** Cultivation and identification of mice intestinal ICC in vitro; preparation of JQD-CS. MTT method detected the proliferation of ICC intervened by different concentrations of JQD-CS. **Results** Moderate concentration (less than 20%) of the JQD-CS, the OD value of ICC increase with the increasing concentration of serum. **Conclusion** Moderate concentration of JQD-CS can promote the proliferation and differentiation of ICC.

KEY WORDS: Jianpi Qingchang decoction; interstitial cells of Cajal; proliferation; ulcerative colitis