

补脾方药血清对离体脾虚大鼠壁细胞胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

隋峰, 王汝俊, 王建华, 杜群, 巫燕丽

隋峰, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405
王汝俊, 王建华, 杜群, 巫燕丽, 广州中医药大学脾胃研究所
广东省广州市 510405
国家自然科学基金资助项目, No. 30271650
项目负责人: 王汝俊 510405, 广州市白云区三元里 12 号, 广州中医药大学脾胃研究所. PiWeiYaoL@gzhtcm.edu.cn
电话: 020-36585555 传真: 020-36586563
收稿日期: 2004-11-18 接受日期: 2004-12-08

摘要

目的: 探讨脾虚状态的分子病理机制及补脾方药对其的影响。

方法: 采用血清药理学方法对分离后的大鼠壁细胞在体外给药, 并用荧光指示剂 Fura-2/AM 负载细胞, 使用双波长荧光分光光度计分别检测静息状态下壁细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 及胃泌素负荷后 $[Ca^{2+}]_i$ 动态变化情况。

结果: 静息状态下, 脾虚模型组大鼠壁细胞胞内 $[Ca^{2+}]_i$ (64.32 ± 12.82) 明显低于正常组 (76.64 ± 14.21) ($P < 0.05$), 加入胃泌素(终浓度 100 nM)后, 胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的增高幅度模型组 (13.43 ± 2.70) 明显大于正常组 (9.80 ± 2.12) ($P < 0.01$); 脾虚大鼠经补脾方药血清作用后各组的静息状态下 $[Ca^{2+}]_i$ 均介于正常组与模型组之间, 胃泌素刺激后胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的增高幅度也有不同程度的减小, 其中党参治疗组的增高幅度 (11.13 ± 2.46) 与模型组 (13.43 ± 2.70) 相比差异显著 ($P < 0.05$)。

结论: 脾虚大鼠壁细胞胞内静息状态下 $[Ca^{2+}]_i$ 降低和胃泌素刺激后胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的异常变化可能是脾虚证病理机制之一, Ca^{2+} 可能在分子水平上参与了脾虚证的形成。

隋峰, 王汝俊, 王建华, 杜群, 巫燕丽. 补脾方药血清对离体脾虚大鼠壁细胞胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):392-394
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/392.asp>

0 引言

我室自 1999 年建立大鼠壁细胞的分离和纯化方法后, 对脾虚证与壁细胞的关系进行了一系列的研究。前期我们分别采用整体和离体实验对大鼠脾虚模型大鼠及补脾方药作用后的壁细胞胃泌素受体结合容量及亲和力进行了初步探讨, 结果表明, 脾虚大鼠胃泌素受体结合容量降低而亲和力升高。为进一步从分子水平上深入揭示脾虚病理机制, 建立大鼠壁细胞的体外研究方法, 本实验又在原有基础上采用血清药理学方法对胞内受体后信号转导枢纽 - Ca^{2+} 进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley ♂ 大鼠, 体重 200 ± 20 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号: scxk (粤) 2003-0001。试剂: 链霉蛋白酶 (Sigma)、

[Leu¹⁵]-胃泌素 (Sigma)、Fura-2 / AM (Biotium) 均购于北京鼎国生物有限责任公司; Percoll (Pharmacia) 购于华美生物工程公司。主要仪器与设备: LS55 荧光分光光度计 (Perkinelmer), HZS-H 恒温水浴振荡器 (哈尔滨东联电子有限公司), XDS-1 倒置显微镜 (重庆光电仪器厂), TDZ5-WS 自动平衡离心机 (长沙湘仪离心机仪器公司), 多头磁力搅拌器 (常州国华电器厂)。

1.2 方法

1.2.1 药物及含药血清的制备 补中益气汤依中国药典的处方, 采用常规方法制备成 100% 水提液, 党参、白术制备成 66% 水提液; 按 1 mL/100 g, 连续给药 5 d, 1 次/d, 空白血清组给予等量的蒸馏水, 末次给药后 2 h, 眶静脉丛穿刺采血, 室温静置 2 h 后, 3 000 r/min, 10 min, 离心分离血清, 0.22 微孔滤膜过滤除菌, 置冰箱中保存备用^[1-2]。

1.2.2 动物分组与造模 大鼠随机分成正常对照和大黄脾虚组, 模型的制备采用我室常规方法, 大黄脾虚组用 100% 大黄水浸液 1 mL/100 g 灌胃大鼠, 2 次/d, 连续 10 d, 正常对照组给予等量蒸馏水。以上各组均常规喂养, 自由饮水, 第 11 d 处死动物, 分离壁细胞。

1.2.3 大鼠壁细胞的分离与纯化 在本室以往基础上加以改进^[3]: 大鼠脱颈椎处死, 剖腹取胃, 结扎贲门和幽门。在胃底部做一小切口, 用玻璃棒将胃袋翻转, 然后在胃底与胃体之间结扎, 弃去胃底, 用生理盐水将胃袋冲洗干净。把预先配制好的链霉蛋白酶 (Pronase) 液约 2.5 mL (1g/L) 注入胃袋。然后将胃袋放入预先通氧的 Medium A (MA) 中 37℃ 水浴消化 30 min 后转入 Medium B (MB) 中 37℃ 用磁力搅拌器搅拌两次, 各 10 min, 收集每次 MB 中打下的细胞悬液; 再重新将胃袋放入新鲜的 MA 中孵育 20 min, 用新鲜的 MB 搅拌两次, 各 10 min, 每次收集 MB 中打下的细胞悬液; 然后再将胃袋放入新鲜的 MA 中孵育 10 min, 用新鲜的 MB 搅拌两次, 各 10 min, 每次收集 MB 中打下的细胞悬液。所有收集到的细胞悬液均用 200 目尼龙网过滤, 过滤液 4℃ 1 000 r/min 离心 5 min, 倾出上清液, 沉淀用 Medium C (MC) 混悬以供纯化。孵育过程皆充以 950+50 mL/LCO₂。取 10 mL 专用离心管, 用吸管在管底分别铺 2 mL 预先配制好的 60% 和 40% Percoll 液制成不连续密度梯度分离液, 将细胞悬液 1 mL 左右铺在最上层, 然后 4℃、2 000 r/min、离心 20 min 进行纯化, 收集 40% 与 60% Percoll 交界面处的壁细胞, MC 洗两次, 再用 MC 混悬备用。

1.2.4 壁细胞 Fura-2/AM 的负载及加药^[4] 将纯化后的模型组细胞悬液随机分为脾虚模型组、补中益气汤治疗组、党参治疗组及白术治疗组。将细胞悬液的浓度调整约为 1.5×10^9 cells/L, 正常及脾虚组给予终浓度 200 mL/L 的空白血

清, 补中益气汤、党参及白术治疗组分别给予等量的药物血清, 37℃作用 20 min. 用 MC 液洗两次后, 加入终浓度 1 μmol/L 的 Fura-2/AM, 37℃避光孵育 45 min, 然后加入 MC 液重复两次洗去残存细胞外液的 Fura-2/AM, 重新加入 2 mL MC 液调整细胞数至 1.5×10^5 cells/L 备用.

1.2.5 壁细胞胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定^[5-6] 将负载 Fura-2 的细胞悬液 2 mL 加入双波长荧光分光光度计的专用石英杯内, 分别测定给药前后的荧光强度变化. 测定参数为: 激发波长 340 nm 和 380 nm, 发射波长 510 nm, 狭缝 5 nm. Ca^{2+} 浓度的计算公式如下: $[Ca^{2+}]_i = Kd \times (S_{f2}/S_{b2}) \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$, 其中 Kd: Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数, 为 224 nmol/L; R: 每次所测得的荧光比值; S_{f2} : 在无 Ca^{2+} 状态下 380 nm 激发的荧光强度; S_{b2} : 在饱和 Ca^{2+} 状态下 380 nm 激发的荧光强度; R_{max} : 指 Fura-2 的所有结合部位均为 Ca^{2+} 所饱和, 即缓冲液中加终浓度 1 μmol/L 的 TritonX-100 所测得的 340 nm/380 nm; R_{min} : 指所有 Fura-2 均为游离形式时所测得的荧光比值, 即过量的 EGTA 存在下 (本实验终浓度为 5 nmol/L, pH>8.5) 所测得的 340 nm/380 nm (注: 在计算 Ca^{2+} 之前, 均减去在没有负载 Fura-2/AM 的细胞中测到的自发荧光).

统计学处理 采用统计软件 SPSS11.0 分析, 实验数据均以 mean±SD 表示, 用 *t* 检验处理, $P < 0.05$ 为有统计学差异.

2 结果

静息状态下, 脾虚模型组大鼠壁细胞胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显低于正常对照组 ($P < 0.05$), 各治疗组介于脾虚模型组与正常对照组之间; 加入胃泌素后, 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均有所升高, 但模型组升高幅度明显高于正常组 ($P < 0.01$), 各治疗组的增高幅度处于二者之间, 其中党参治疗组与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$) (表 1).

3 讨论

Ca^{2+} 是细胞内最重要的第二信使, 参与和调节多种生理和生化过程, 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化可引起广泛的细胞效应^[7]; 很多疾病或病理现象的产生均伴随着胞内 Ca^{2+} 浓度的异常, 如心脑血管缺血缺氧、高血压、痴呆、糖尿

病等均与胞内 Ca^{2+} 浓度的增高有关^[8], 而慢性低钙血症及维生素 D 缺乏症时, 肝细胞内 Ca^{2+} 浓度明显低于正常^[9]; 铜缺乏症时, 血小板内 Ca^{2+} 浓度降低等^[10].

Ca^{2+} 作为重要的胞内信号转导枢纽与壁细胞酸分泌功能的关系也已明确. 胃泌素、组胺和乙酰胆碱等酸分泌刺激因子作为第一信使作用于壁细胞表面的各自受体均可引起胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高, 从而激活各种 Ca^{2+} /Calmodulin (钙调素) 依赖性的蛋白激酶而最后引起 $H^+/K^+-ATPase$ (氢钾泵) 的活化产生泌酸反应^[11-12]. 有人用 Ca^{2+} 通道阻滞剂抑制胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高, 结果发现五肽胃泌素刺激的酸分泌明显减少^[13-14], 也有人将大鼠胚胎干细胞胃泌素受体的基因敲除, 结果壁细胞胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 增高了, 基础和负荷 (Carbacol 或组织胺刺激) 后的酸分泌亦有所增加^[15], 可见 Ca^{2+} 作为胞内重要的信使与壁细胞泌酸的生理功能关系密切.

脾虚是以消化系统为主的多系统、多器官功能低下的一种病理状态, 我们的研究表明脾虚大鼠壁细胞静息状态下胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显低于正常大鼠 ($P < 0.05$), 但胃泌素刺激后胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的增高幅度显著高于正常大鼠 ($P < 0.01$), 各治疗组中, 静息状态下胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 及胃泌素刺激后的胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的增高幅度介于二者之间, 这与我室前期整体研究结果基本一致, 表明血清药理学方法应用于壁细胞的体外研究是可行的. 该方法克服了整体实验操作复杂、用药时间长等缺点, 同时又避免了直接加药非药物因素影响等多缺点, 而且组内及组间易于保持平衡而导致样本间的离散度 (标准差) 较小阳性结果易于检出.

脾虚大鼠壁细胞静息状态下胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显低于正常大鼠, 说明脾虚大鼠壁细胞基础状态下在 Ca^{2+} -泌酸环节上可能处于低能量代谢状态; 胃泌素是一重要的酸分泌刺激因子^[16], 脾虚大鼠壁细胞胃泌素刺激后胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 增高幅度大于正常大鼠, 又表明脾虚大鼠壁细胞反应敏感性高于正常大鼠, 提示脾虚大鼠壁细胞胃泌素刺激的酸分泌通路在 Ca^{2+} 这一环节上可能出现了代偿, 这又与我们前期实验得出的“脾虚大鼠壁细胞基础状态酸分泌低下, 受刺激后亢进”的结论相一致, 其机制是否与壁细胞上的胃泌素受体亲和力增高 (我室前期研究结果) 相关尚有待进一步深入探讨. 脾虚经含药血清作用后的各组中, 静息状态下 $[Ca^{2+}]_i$ 均有所升高, 胃泌素刺激后的胞内

表1 静息状态 $[Ca^{2+}]_i$ 及胃泌素刺激后壁细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化

组别	n	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L, mean±SD)		增高幅度(%)
		静息状态	Gastrin 刺激后	
正常对照组	15	76.64 ± 14.21	84.15 ± 15.53	9.80 ± 2.12
脾虚模型组	15	64.32 ± 12.82 ^a	72.96 ± 13.96 ^a	13.43 ± 2.70 ^b
补中益气汤治疗组	15	67.14 ± 13.35	75.24 ± 14.06	12.06 ± 2.31
党参治疗组	15	69.75 ± 13.25	77.51 ± 13.54	11.13 ± 2.46 ^c
白术治疗组	15	66.08 ± 10.88	74.37 ± 11.61	12.55 ± 3.19

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 脾虚模型组.

[Ca²⁺]_i增高幅度也有一定程度的降低,其中党参治疗组胃泌素刺激后的胞内[Ca²⁺]_i增高幅度与模型组相比差异显著,说明大鼠的脾虚状态经补脾方药作用后随着便溏、弓背、消瘦、背毛蓬松等整体状态恢复的同时微观病理指标亦有不同程度的恢复趋势。

总之,本实验采用血清药理学方法从中医方证角度对脾虚状态微观病理机制进行了初步探讨,表明:(1)脾虚大鼠壁细胞静息下胞内[Ca²⁺]_i及刺激后[Ca²⁺]_i的异常变化可能是脾虚证在分子水平上的病理机制之一,Ca²⁺的异常介导可能参与了脾虚证的病理形成过程;(2)补脾方药血清可从整体和微观不同程度调整脾虚大鼠的病理状态;(3)脾虚状态不仅仅表现为一种外在的整体的抽象概念,也与某些特定微观病理指标相联系。

4 参考文献

- 1 赵海磊,刘成,赵爱光.中药复方胃肠安血清诱导肝癌SMMC-7721细胞分化.世界华人消化杂志 2003;11:1345-1348
- 2 彭智聪,黄静宁,郭宝丽,张红玲.中药血清药理学实验方法研究进展.中国实验方剂学杂志 2001;7:57-59
- 3 聂克,王汝俊,王建华.大鼠胃壁细胞的分离方法.世界华人消化杂志 1999;7:994-995
- 4 Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, Docampo R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1998;273:22151-22158
- 5 台卫平,罗和生.黄连素对HT-29人结肠癌细胞系Ca²⁺的抑制作用.世界华人消化杂志 2003;11:1662-2664
- 6 Cobbold PH, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J* 1987;248:313-328
- 7 Mansilla-Olivares A. Calcium, the atom triggering life and cellular function. *Cir Cir* 2004;72:139-151
- 8 Yorek MA, Davidson EP, Dunlap JA, Stefani MR. Effects of bradykinin on cytosolic Calcium in neuroblastoma cells using the fluorescent indicator fluo-3. *Biochim Biophys Acta* 1993;1177:215-220
- 9 Gascon-Barre M, Hoddad P, Provincher SJ, Bilodeau S, Pecker F, Lotersztajn S, Vallieres S. Chronic hypocalcemia of vitamin D deficiency leads to lower intracellular calcium concentrations in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1994;93:2159-2167
- 10 Johnson WT, Dufaut SN. Intracellular calcium mobilization in rat platelets is adversely affected by copper deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1993;1175:263-268
- 11 Sachs G. Physiology of the parietal cell and therapeutic implications. *Pharmacotherapy* 2003;23(10Pt2):68-73
- 12 Yao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol* 2003;65:103-131
- 13 Niv Y, Vardi I. Calcium channel blocker decreases pentagastrin-stimulated alkaline-tide: a role for extracellular calcium in gastric acid secretion. *Isr J Med Sci* 1995;31:215-217
- 14 Niki S, Rokutan K, Nakamura K, Ogihara S, Kutsumi H, Saitoh T, Aoike A, Kawai K. Calcium-dependent signaling of acid secretion in isolated parietal cells from guinea pigs and its modification by ethanol. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1992;89:1484-1490
- 15 Hinkle KL, Bane GC, Jazayeri A, Samuelson LC. Enhanced calcium signaling and acid secretion in parietal cells isolated from gastrin-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G145-G153

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

NHE1基因调控细胞内酸碱平衡对胃癌细胞生物学行为的影响

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈刚, 王国安, 杨孟华

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈刚, 王国安, 杨孟华, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038

项目负责人: 刘海峰, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心. HaiFengLIU333@hotmail.com

电话: 010-88276549

收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2004-12-28

摘要

目的: 通过基因转染技术, 研究NHE1反义基因对SGC-7901胃癌细胞生物学行为的影响, 探讨通过酸化细胞内环境诱导肿瘤细胞凋亡从而治疗胃癌的新方法。

方法: 利用亚克隆技术构建人NHE1反义结构基因哺乳动物真核表达质粒, 通过DOTAP脂质体介导的转染技术将反义真核表达质粒和空载体分别转入SGC-7901胃癌细胞中,

经聚合酶链反应(PCR)对转染基因的整合鉴定后, 观察基因转染对细胞形态学、细胞内pH值、体外生长状况、细胞周期以及双层软琼脂克隆形成能力和裸鼠成瘤力的影响。

结果: 光镜及透射电镜下细胞形态恶性程度降低。Anti-7901细胞胞内pH值显著低于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901细胞内pH值(6.77±0.05 vs 7.24±0.03, 7.26±0.03, $P<0.01$)。Anti-7901细胞生长速度明显减慢, 出现接触抑制, 呈单层生长, 细胞凋亡率显著高于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901凋亡率(26.1% vs 5.12%, 4.48%, $P<0.01$)。Anti-7901细胞在双层软琼脂中集落形成率显著低于Zeo-7901和空白对照组SGC-7901细胞(9±3.54% vs 40±4.53%, 38.6±4.63%, $P<0.01$)。接种Zeo-7901细胞和空白对照组