

胃痛消痞方对功能性消化不良大鼠血清及胃组织中Ghrelin、Leptin的影响

陈苏宁, 礼海, 史业东

■背景资料

功能性消化不良(FD)是最常见的消化内科疾病。该病的病因和发病机制至今尚未清楚, 西医无特效药, 多采取对症治疗, 而中医治疗FD可获得较满意的疗效。因此寻找促胃动力中药具有现实的理论意义和实用价值。

陈苏宁, 史业东, 中国医科大学附属盛京医院 辽宁省沈阳市 110004

礼海, 沈阳市第二中医医院 辽宁省沈阳市 110101

辽宁省科技厅自然科学基金资助项目, No. 20082101

作者贡献分布: 陈苏宁、礼海及史业东在该实验中贡献均等; 陈苏宁负责设计课题、文章撰写、修改及数据分析; 礼海负责数据整理、统计分析、文章撰写; 史业东负责动物实验、数据搜集、整理及数据统计分析。

通讯作者: 陈苏宁, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院中医科。

chensn@sj-hospital.org

电话: 024-96615-66311

收稿日期: 2010-05-25 修回日期: 2010-07-08

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-09-18

Influence of Weitongxiaopi Decoction on serum and gastric ghrelin and leptin in rats with functional dyspepsia

Su-Ning Chen, Hai Li, Ye-Dong Shi

Su-Ning Chen, Ye-Dong Shi, Department of Traditional Chinese Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Hai Li, the Second Traditional Chinese Medicine Hospital of Shenyang, Shenyang 110101, Liaoning Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20082101

Correspondence to: Professor Su-Ning Chen, Department of Traditional Chinese Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chensn@sj-hospital.org

Received: 2010-05-25 Revised: 2010-07-08

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To observe the influence of Weitongxiaopi Decoction (WTXP) on serum and gastric ghrelin and leptin in rats with functional dyspepsia of liver-depression and spleen-deficiency type.

METHODS: A rat model of functional dyspepsia was established by the improved tail clamp method. The rats with functional dyspepsia were then given WTXP or cisapride (CP) for 3 wk. After the treatment, serum and gastric ghrelin and leptin were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot, respectively.

RESULTS: The content of serum ghrelin was significantly higher (132.7 ± 10.78 vs 103.17 ± 13.46 , $P < 0.01$) and that of serum leptin was significantly lower (31.30 ± 5.81 vs 37.55 ± 4.32 , $P < 0.01$) in the WTXP group than in the CP group. The expression level of gastric ghrelin was significantly higher (150.87 ± 12.76 vs 118.97 ± 8.93 , $P < 0.01$) and that of gastric leptin was significantly lower (60.28 ± 9.28 vs 67.75 ± 5.67 , $P < 0.01$) in the WTXP group than in the CP group.

CONCLUSION: Weitongxiaopi Decoction can increase the levels of serum and gastric ghrelin but decrease those of serum and gastric leptin in rats with functional dyspepsia.

Key Words: Functional dyspepsia; Ghrelin; Leptin

Chen SN, Li H, Shi YD. Influence of Weitongxiaopi Decoction on serum and gastric ghrelin and leptin in rats with functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2800-2803

摘要

目的: 探讨胃痛消痞方对功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)肝郁脾虚型大鼠血清及胃组织中Ghrelin、Leptin含量的影响。

方法: 通过改良夹尾刺激法建立FD大鼠模型, 胃痛消痞方(中药)组与西沙必利(西药)组灌服相应药物3 wk, 模型组和对照组进行对照观察。利用ELISA、Western blot检测血清与胃组织中Ghrelin与Leptin的含量。

结果: 利用ELISA检测Ghrelin、Leptin含量, 中药组中Ghrelin含量显著高于西药组($132.7 \text{ mg/L} \pm 10.78 \text{ mg/L}$ vs $103.17 \text{ mg/L} \pm 13.46 \text{ mg/L}$, $P < 0.01$); 中药组中Leptin含量显著低于西药组($31.30 \text{ mg/L} \pm 5.81 \text{ mg/L}$ vs $37.55 \text{ mg/L} \pm 4.32 \text{ mg/L}$, $P < 0.01$)。Western blot检测Ghrelin、Leptin蛋白表达水平, 中药组中Ghrelin蛋白表达水平显著高于西药组(150.87 ± 12.76 vs 118.97 ± 8.93 , $P < 0.01$); 中药组中Leptin蛋白表达水平显著低于西药组(60.28 ± 9.28 vs 67.75 ± 5.67 , $P < 0.01$)。

■同行评议者

魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院中西医结合科

结论:胃痛消痞方可以提高血清及胃组织蛋白中Ghrelin含量,降低Leptin含量。

关键词:功能性消化不良;胃促生长素;瘦素

陈苏宁, 礼海, 史业东. 胃痛消痞方对功能性消化不良大鼠血清及胃组织中Ghrelin、Leptin的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2800-2803
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2800.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是临床常见病,国内FD在社会人群中患病率在10%-30%,占消化门诊人数的40%以上^[1]。目前,西医治疗FD的药物主要以促胃动力药为主,如多巴胺受体阻滞剂或五羟色胺受体激动剂^[2-5]等,其疗效欠佳,并需长期服用,停药后易于复发。近年来,中药治疗FD方面由于其疗效突出,且不良反应小,引起医学界学者广泛关注。因此,探索及研究该病的机制和中药治疗方法,对研发新型有效、安全的药物治疗本病具有特别重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选择健康♂SPF级Wistar大鼠40只,12 wk,体质量180-220 g,由中国医科大学实验动物中心提供,动物使用许可证号SYSK(辽)2003-0019。碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG,PKA MPC-1,胃饥饿素(Ghrelin)及瘦素(Leptin)抗体购自北京中山生物技术有限公司;Ghrelin及Leptin酶联免疫吸附测定(ELISA法)试剂盒,由博士德生物工程有限公司提供。SW1022-ProfiBlot 48全自动蛋白印迹分析仪由美国Bioneer公司生产;RT-6000全自动酶标仪由美国雷杜公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模:采用随机数字表方法随机分为4组,即正常对照组、模型组、胃痛消痞方(中药)组,西沙必利(西药)组,每组10只。除正常对照组外,其余3组均采用改良夹尾刺激法制造FD肝郁脾虚模型^[6],即每日用长海绵镊子钳夹大鼠尾巴末端1/3处,以令其尖叫挣扎但不破皮为度(如有抓伤破皮,则用0.5%碘伏消毒受伤部位,以防感染),使其暴怒并与其他大鼠撕打,每次持续30 min,每日2次,连续刺激3 wk。造模期间,各组大鼠自由进食及饮水。大鼠出现躁动等紧张、焦虑反应,且进食量明显减少,即为造模

成功。

1.2.2 药物制备及给药:造模成功后,胃痛消痞方(柴胡、白芍、延胡索、炒枳实、炒砂仁、炒麦芽、焦山楂、炒鸡内金、党参、炙甘草、炒白术)由中国医科大学附属盛京医院药局负责煎煮制备;西沙必利,由西安杨森制药有限公司提供。给药剂量依据人和鼠给药剂量换算公式^[7] $dB = dARB/RA(WA/WB)1/3$ 进行计算,每日给予胃痛消痞方9 g/kg,西沙必利组给予含有2 mg/kg的药物,模型组及正常组给予灌服等量蒸馏水,每日2次灌胃,持续3 wk。

1.2.3 取材:在给药第21天后,禁食不禁水12 h,麻醉处死全部大鼠,心脏取血,分离血清,用于ELISA法检测血清中Ghrelin、Leptin的含量;每只大鼠取胃窦部组织100 mg,用蛋白印迹分析法检测胃组织中Ghrelin及Leptin蛋白表达水平,并于液氮中冷冻后在-80℃条件下保存待测。

1.2.4 Western blot蛋白印迹分析法检测胃组织中Ghrelin及Leptin蛋白表达:取标本解冻加入冰预冷的细胞裂解液500 μL,将组织块剪碎后,放入冰水浴中超声粉碎。4℃下12 000 r/min离心1 h取出上清。标准蛋白1 g/L,分别取蛋白样品,标准蛋白10 μL,标记清楚在空白管加入10 μL蒸馏水。每个管中加入2.5 mL碱性铜液混匀,室温放置20 min后分别加入0.25 mL酚试剂,混匀室温放置30 min,650 nm处、1 cm光径,空白管调零,测各管吸光度值。加入适当的分离胶2.5 mL,蒸馏水4 mL,凝胶液加至距离梳子齿约0.5 cm处,在分离胶上覆盖约15 mm的无水乙醇,30-40 min后胶体聚合。灌注分离胶后,加注少量去离子水,室温下充分聚合后,倾去去离子水,滤纸吸干,灌注浓缩胶,约30 min后聚合,拔出梳子。各标本蛋白上样50 μL;上清用10% SDS-PAGE分离, BIO-RAD电泳板,双板电泳条件为150 V, 30 mA, 1.5 h。硝酸纤维素膜在转印液中平衡10 min,胶在负极,膜在正极,经2 h, 50 V转印后TTBS洗膜1次。用含5%去脂奶粉的TTBS封闭,4℃过夜。取出膜后, TBS洗膜5 min×3次,加入一抗(1:400),置于室温下2 h。加入碱性磷酸酶标记的二抗(1:2 000),室温下2 h。清洗,显色,采用Image-Pro Plus6.0图像分析软件,记录每条蛋白电泳带的灰度值,进行定量分析。

1.2.5 ELISA法检测血清中Ghrelin、Leptin的含量:ELISA检测方法严格按照试剂盒说明进行操作。

统计学处理 各组各方法所测数据均以mean±SD表示,各组间差异应用统计学软件SPSS13.0

■研发前沿

中药对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠血清及胃组织中Ghrelin、Leptin含量的影响是目前治疗功能性消化不良领域中比较热门的研究。而亟待解决的问题是中药促胃肠激素分泌的作用机制。

■相关报道

近年来许多研究表明Leptin与Ghrelin是一对生物学效应相对抗的脂肪因子,他们相互作用,共同参与调节机体的能量代谢。

■创新亮点

本文首次研究了胃痛消痞方对肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠模型血清及胃组织中Ghrelin、Leptin含量的影响,对研发新型有效、安全的药物治疗本病具有重要的意义。

表 1 胃痛消痞方对FD模型大鼠血清及胃组织中Ghrelin蛋白的影响

	空白对照组	模型组	中药组	西药组
血清(mg/L)	162.57 ± 12.83 ^b	64.37 ± 6.45	132.70 ± 10.78 ^{bd}	103.17 ± 13.46 ^b
胃组织	171.98 ± 16.19 ^b	80.22 ± 6.47	150.87 ± 12.76 ^{bd}	118.97 ± 8.93 ^b

^b*P*<0.01 vs 模型组; ^d*P*<0.01 vs 西药组。

表 2 胃痛消痞方对FD模型大鼠血清及胃组织中Leptin蛋白的影响

	空白对照组	模型组	中药组	西药组
血清(mg/L)	23.86 ± 5.16 ^b	43.74 ± 6.38	31.30 ± 5.81 ^{bd}	37.55 ± 4.32 ^b
胃组织	51.64 ± 7.89 ^b	76.47 ± 10.14	60.28 ± 9.28 ^{bd}	68.75 ± 5.67 ^b

^b*P*<0.01 vs 模型组; ^d*P*<0.01 vs 西药组。

进行方差分析,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃痛消痞方对FD模型大鼠血清及胃组织中Ghrelin蛋白的影响 各治疗组Ghrelin含量均低于空白对照组(*P*<0.01),但高于模型组(*P*<0.01);中药治疗组Ghrelin水平高于西药组(*P*<0.01,表1,图1A)。

2.2 胃痛消痞方对FD模型大鼠血清及胃组织中Leptin蛋白的影响 各治疗组Leptin含量均低于空白对照组(*P*<0.01),但高于模型组(*P*<0.01);中药治疗组Leptin水平高于西药组(*P*<0.01,表2,图1B)。

3 讨论

Ghrelin是由胃和下丘脑弓状核神经元释放的脑肠肽,其通过旁分泌、自分泌和内分泌产生,联系胃肠道和中枢调节消化系统功能。Ghrelin是中枢和外周调节胃酸分泌的活性肽之一,通过迷走神经参与调节中枢和外周的胃酸分泌。研究显示^[8],空腹血浆非酰基化Ghrelin水平和血浆总Ghrelin水平在FD患者显著降低,本实验也证明了这一观点。而Leptin是一种主要由白色脂肪组织分泌的蛋白质类激素,可以固定大脑对食欲的反应,能影响机体的摄食、能量代谢等功能,与其他胃肠激素协同作用进而达到调节胃肠功能作用。有学者研究发现,FD患者由于血清Leptin水平的异常从而改变了其对摄食及胃运动的调节,产生早饱、餐后饱胀不适等症状;FD患者血清Leptin水平的改变也可能是由于患者长期摄食减少,而导致的机体一种适应性反应。

■应用要点

胃痛消痞方可以升高血清及胃组织蛋白中Ghrelin的含量,同时降低血清及胃组织中Leptin蛋白的含量,为临床上应用胃痛消痞方治疗肝郁脾虚型功能性消化不良提供了理论和实验依据。

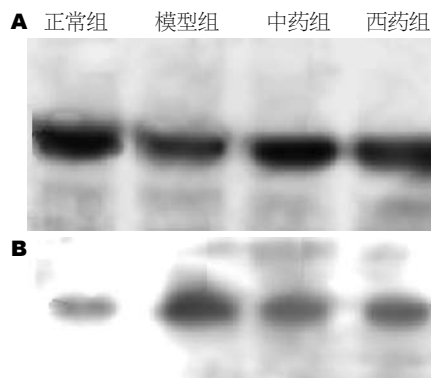


图 1 Western blot示胃痛消痞方对FD模型大鼠胃组织中Ghrelin和Leptin蛋白的影响。A: Ghrelin; B: Leptin。

综合Leptin与Ghrelin生理病理作用来看,他们是一对生物学效应相对抗的脂肪因子,共同参与调节机体的能量代谢,且Leptin与Ghrelin相互作用^[9]。Ghrelin相关神经元与Leptin相关神经元广泛重叠,Leptin与Ghrelin的分泌节律基本相同。Ghrelin能剂量性依赖地减弱Leptin对摄食的抑制作用,给予Ghrelin后可引起Leptin的mRNA表达增加并抵消Leptin引起的神经肽Y(neuropeptide Y, NPY) mRNA表达下降。另一方面,Leptin也能下调Ghrelin的表达,并且抑制Ghrelin引起的钙内流,进而抑制食欲。因此,研究两者的关系为进一步揭示FD发病机制奠定基础。从实验结果上看,用中医药治疗本病更具突出疗效。中医药治疗重视辨证论治,整体观念全面调节脏腑机能,与西药针对一点的靶向治疗更为全面。

FD在中医古籍中无此病名,就其临床表现当属中医之“胃痞”等症范畴。中医学对“胃痞”等证候病因病机的探析上,十分深入历代

医家阐述颇详。《素问·调经论》云：“有所劳倦，形气衰少，谷气不盛，上焦不行，下脱不通……”，论述了虚而有滞的病机，认为脾虚是其发病的重要病理基础。《素问·五运行大论》曰：“思伤脾”，已认识到FD的发病与精神、心理等因素相关。《景岳全书·痞满》对本病辨证颇为明细：“痞者，痞塞不开之谓；满者，胀满不行之谓。盖满则近胀，而痞则不必胀也。所以痞满一证，大有疑辨，则在虚实二字，凡有邪有滞而痞者，实痞也；无物无滞而痞者，虚痞也。”因此，在中医治疗上，应重视气机条畅与情志因素。胃痛消痞方在调节脾胃脏腑功能的同时，重视人体气机与情志的疏导。柴胡之药和解表里，疏肝理气，配伍健脾之药枢机条达，升降有序；实痞者，消滞泄实；虚痞者，调畅气机；可显柴胡泄热与理气之功。本方有四君之影，伏有白芍甘草汤与延胡索合用益气、缓急止痛疗效更佳。因此，本方其扶正而不矫正，益气而不补气，调畅而不通利，缓急而不镇痛，恰到好处，相得益彰。

4 参考文献

- 1 池肇春, 元玉琴, 董全江. 幽门螺杆菌感染及其相关疾病的诊断与治疗. 第1版. 北京: 军事医学科学出版社, 2008: 215-216
- 2 Holtmann G, Talley NJ, Liebrechts T, Adam B, Parow C. A placebo-controlled trial of itopride in functional dyspepsia. *N Engl J Med* 2006; 354: 832-840
- 3 Chiba T, Tokunaga Y, Ikeda K, Takagi R, Chishima R, Terui T, Kudara N, Endo M, Inomata M, Orie S, Suzuki K. Effects of itopride hydrochloride and ranitidine in patients with functional dyspepsia: comparison between prokinetic and acid suppression therapies. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1878-1881
- 4 Zeng J, Zuo XL, Li YQ, Wei W, Lv GP. Tegaserod for dyspepsia and reflux symptoms in patients with chronic constipation: an exploratory open-label study. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 529-536
- 5 Boeckxstaens GE, Tytgat GN, Wajsb E, van Nueten L, de Ridder F, Meulemans A, Tack J. The influence of the novel 5-HT₄ agonist R137696 on the proximal stomach function in healthy volunteers. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 919-926
- 6 郭海军, 林洁, 李国成. 功能性消化不良的动物模型研究. 中国中西医结合消化杂志 2001; 9: 141-142
- 7 孙敬方. 动物实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 357
- 8 郝国强, 王德征, 费乃昕, 薛承锐. Ghrelin对急性胰腺炎大鼠胃肠动力的影响作用. 安徽医药 2008; 12: 216-217
- 9 陈莹. 功能性消化不良患者血清Ghrelin和瘦素水平以及心理因素的研究. 天津: 天津医科大学, 2008: 1-67

■同行评价

本文选题尚可, 设计合理, 方法科学, 具有一定的临床意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)