小儿健脾膏对胃动力障碍大鼠胃肠组织中胃动素 mRNA 和蛋白表达的影响

杨伟金[1]，杨明华[2*]，陈婉姬[3](1.浙江中医药大学，杭州 310053；2.浙江省中药研究所有限公司，杭州 310023；3.浙江省立同德医院，杭州 310012)

摘要：目的 研究比较小儿健脾膏优化方和原方对胃动力障碍大鼠的影响，探讨其可能的分子生物学机制。**方法** 以胃排空率和小肠推进率为检测指标，分别测定小儿健脾膏原方和优化方对胃肠功能障碍大鼠胃肠功能的影响，并检测大鼠血清中胃动素(motilin，MTL)含量、胃液总酸度、胃蛋白酶活性，通过 Western blotting 实验测定大鼠胃肠组织中 MTL mRNA 和蛋白的相对表达量。**结果** 小儿健脾膏原方和优化方对胃肠功能障碍大鼠的胃排空和肠推进均有促进作用，二者疗效相当。小儿健脾膏原方和优化方组大鼠血清中 MTL 含量、胃液总酸度、胃蛋白酶活性较模型组显著升高，胃窦和十二指肠中 MTL mRNA 和 MTL 蛋白表达较模型组明显上升，优化方促胃肠 MTL 蛋白表达作用强于原方。**结论** 小儿健脾膏原方和优化方均有明显的促胃肠动力的作用，二者强度相当，其机制可能与促进 MTL 和胃蛋白酶分泌，提升胃窦和十二指肠 MTL mRNA 和蛋白表达有关。

关键词：小儿健脾膏；胃肠动力障碍；胃排空；小肠推进；胃动素；大鼠

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2021)21-2654-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.21.005

引用本文：杨伟金，杨明华，陈婉姬. 小儿健脾膏对胃动力障碍大鼠胃肠组织中胃动素 mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(21): 2654-2658.

Effect of Xiao'er Jianpi Plaster on Motilin mRNA and Protein Expression in Stomach and Intestine of Rats with Gastric Motility Disorder

YANG Weijin[1], YANG Minghua[2*], CHEN Wanji[3](*1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310023, China; 3.Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study and compare the effects of Xiao'er Jianpi plaster optimized prescription and original prescription, explore its possible molecular biological mechanism. **METHODS** The gastric emptying rate and small intestinal propulsion rate were used to detect the effects of the original and optimized prescriptions of Xiao'er Jianpi plaster on gastrointestinal function of rats with gastrointestinal dysfunction, and the content of motilin(MTL) in serum, total acidity of gastric juice, and stomach protease activity, the relative expression of MTL mRNA and protein in rat gastrointestinal tissues was determined by Western blotting experiment. **RESULTS** Both the original prescription and the optimized prescription of Xiao'er Jianpi plaster had promoting effects on gastric emptying and intestinal propulsion in rats with gastrointestinal dysfunction, and both had the same effect. The content of MTL in serum, total acidity of gastric juice, and pepsin activity of rats in the original and optimized formula of Xiao'er Jianpi plaster groups were significantly higher than those of the model group, and the expressions of MTL mRNA and MTL protein in the antrum and duodenum were significantly higher than those of the model group. The optimized formula promoted gastrointestinal MTL protein expression stronger than the original formula. **CONCLUSION** Both the original formula and the optimized formula of Xiao'er Jianpi plaster have obvious effects of promoting gastrointestinal motility, and their strengths are equivalent. The mechanism may be related to the promotion of MTL, pepsin secretion and the expression of MTL mRNA and protein in the antrum and duodenum.

KEYWORDS: Xiao'er Jianpi plaster; gastrointestinal motility disorder; gastric emptying; small intestine propulsion; motilin; rats

胃肠动力障碍性疾病是由多种原因导致的以小肠推进减慢为特征的一组病症，其既是众多功能性消化道疾病的共同病理变化，又是加重疾病本身和产生继发性病症的因素[1]，其具体原因尚不明确，但有研究表明，胃肠动力障碍者的胃肠激素水平与正常人不同[2]。

基金项目：浙江省中医药科技计划项目(2012ZA002)；浙江省科技计划项目(编 2017C33156)

作者简介：杨伟金，男，硕士生　Tel: 13968519460　E-mail: 13968519460@139.com　*通信作者：杨明华，男，博士，教授，硕导　Tel: 13857181369　E-mail: ymh702@126.com

小儿健脾膏临床治疗小儿胃肠动力障碍性疾病疗效显著，已在临床应用十多年[3-4]，由丁香、肉桂、吴茱萸、山楂、白胡椒等组成，其可能药效物质为丁香酚、胡椒碱、桂皮醛、山楂酸、吴茱萸碱。小儿健脾膏具有外用加穴位贴敷等中医药特点优势，符合儿童临床用药需求，具有重要的临床应用价值。前期研究表明，该药促进胃肠动力作用明确[5-6]，本实验结合前期研究结果，对原方与优化方进行药效比较与作用机制的探索研究。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠，32 只，♀♂各半，体质量(200±20)g，由上海斯莱克动物实验有限公司提供，动物生产许可证号：SCXK(沪)2017-0015。

1.2 药品与试剂

小儿健脾膏(简称“原方”)、小儿健脾膏优化方(简称“优化方”)由浙江省立同德医院提供(每 1 g 软膏丸含 0.5 g 生药)，批号：20180608；盐酸左旋精氨酸(Sigma，批号：A5006)；羧甲基纤维素钠(国药集团化学试剂有限公司，分析纯，批号：F20110211)；葡萄糖(上海国药试剂，批号：20170427)；淀粉(海宁市丁桥镇建东淀粉厂，批号：GB/T8885)；薇婷脱毛膏[法国薇婷(中国)有限公司，批号：20170606]；奶粉(荷兰牛栏，批号：M076509)；活性炭粉末(上海远帆生物科技有限公司，批号：F20180528)；胃动素(motilin，MTL)ELISA 试剂盒(上海逸晗生物科技公司，批号：20180905)；SYBR Green qPCR 试剂盒(批号：28541)、逆转录试剂盒(批号：23120)购自康为世纪；BCA 蛋白定量试剂盒(批号：20180425)、化学发光检测试剂(批号：20171214)、预染蛋白 marker(批号：20180710)购自 Solarbio；Anti-MTL(Abcam，批号：CR32095-13)；Anti-GAPDH(Proteintech，批号：823E018)。

1.3 仪器

电子天平(慈溪市天乐衡器厂)；量尺(最小刻度为 1 mm)；Mastercycler PCR 仪(Eppendorf)；Nanodrop one 核酸定量仪(Thermo Scientific)；CFX-96 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-rad)；Micro17R 低温高速离心机(Thermo)；CMaxPius 酶标仪(SpectiaMax)；EPS300 电泳仪、VE 180C 电泳槽、VE186 转膜仪均购自上海天能科技有限公司。

1.4 营养性半固体糊配制

精密称取羧甲基纤维素钠 5 g，充分溶胀于 125 mL 蒸馏水中，随后加入奶粉 8 g、葡萄糖 4 g、淀粉 4 g 和活性炭 1 g，用玻璃棒搅拌均匀配置成 147 mL 含量为 1 g·mL^{-1} 的黑色半固体糊，冰箱冷藏备用，使用时恢复至室温。

2 方法

2.1 动物模型建立

大鼠胃肠动力障碍动物模型：取 24 只 SD 大鼠腹腔注射盐酸左旋精氨酸，剂量为第 1 天 5 g·kg^{-1}，第 2~5 天 2.6 g·kg^{-1}(加生理盐水后，调 pH 至 7)。对照组注射等量生理盐水。将模型组随机分为 3 组，对其中 2 组外敷小儿健脾膏原方或优化方。实验前用脱毛膏将腹部去毛。实验时，原方与优化方以绷带包扎将药物固定贴于腹部胃的位置，正常对照组和模型组以空白绷带包扎于腹部胃的位置，每天换药 1 次，连续 5 d。

2.2 动物分组及给药

对照组：不经任何处理的大鼠；模型组：构建大鼠胃肠动力障碍动物模型；优化方组：使用优化方对模型动物进行处理，所用剂量为 5 g·kg^{-1}(以所含生药计)；原方组：使用原方对模型动物进行处理，所用剂量为 5 g·kg^{-1}(以所含生药计)。每组 8 只。

2.3 胃排空率和肠推进率测定

于末次给药前禁食不禁水 20 h 之后，各组大鼠灌胃给予炭末半固体营养糊，每只 3 mL，20 min 后眼球取血，取血后脱颈处死，立即剖腹，结扎胃贲门和幽门。

胃排空率：取出完整的胃，称量完整的胃质量，记为胃全重，把胃打开，收集胃内容物于试管中，再用滤纸将胃黏膜表层的水分吸掉，称量胃的净重，记为胃净重，逐一记录并保留标本，计算胃排空率。胃排空率(%)=[1–(胃全重–胃净重)/炭末半固体营养糊灌胃量]×100%。

小肠推进率：轻柔分离出整个小肠组织，用皮尺精确测量从幽门口到盲肠端小肠长度和含有染色炭末的小肠长度。若颜色显示为黑色则提示炭末已推进至此处。小肠推进率(%)=含有染色剂的小肠长度/整个小肠长度×100%。

2.4 胃酸总酸度、胃蛋白酶活性和血清中 MTL 含量的测定

2.4.1 胃酸总酸度　将“2.3”项中的胃内容物以 3 000 r·min^{-1} 离心 10 min，收集上清液，作为胃液，以 pH 计测定胃液的 pH 值。胃液酸度以 H^+浓度

C(H^+)表示。

2.4.2 胃蛋白酶活性 自制蛋白管：取内径为 1 mm、长为 10 cm 的毛细玻璃管，使其内部充满鸡蛋清，于 85 ℃下固定，两端以石蜡封口，于冰箱中冷藏备用，实验前去除两端，将其掰至约 2.5 cm 备用。活性测定：取胃液 2 mL 于试管中，加入上述自制蛋白管 2 根，给试管加塞，于 37 ℃水浴保温 24 h，分别测量蛋白管两端的透明部分的长度(mm)，求 2 根蛋白管 4 端透明部分的长度值的平均值 X，再计算胃蛋白酶活性单位(胃蛋白酶活性单位=X^2×16)。

2.4.3 血清中 MTL 含量 将“2.3”项下所取血以 3 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液，按照大鼠 MTL 的 ELISA 试剂盒说明书操作，用酶标仪测定血清中 MTL 含量。

2.5 qPCR 试验

于末次给药前禁食不禁水 20 h，各组大鼠取血后断颈处死，快速取胃组织和肠组织，去除黏膜和浆膜后置于–80 ℃冰箱冻存，备用。

使用 Trizol®试剂从组织中分离出 TotalRNA。按照 Gotscript™RT 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。qPCR 使用 SYBR 快速 qPCR 混合物进行。确定增殖标记蛋白 Ki-67(Ki67)、p53、Bax、Bcl-2 和 GAPDH 表达水平。引物序列见表 1。qPCR 条件：95 ℃，10 min 变性；95 ℃，10 s；60 ℃，60 s；40 次循环。使用 2%琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳。该基因的相对表达水平是使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算的，并被归一化到 GAPDH。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因	上游引物	下游引物
R-MTL	ATGCTGACCTCCCAGATT GAAG	GGTTGTTCACACTCCCAT TCG
R-GAPDH	ATGATTCTACCCACGGCA AG	CTGGAAGATGGTGATGG GTT

2.6 Western blotting 试验

利用蛋白裂解液促使组织裂解后以蛋白酶抑制剂抑制蛋白分解，经过高温变性后提取总蛋白，置于电泳仪中实施电泳以及湿法转膜，结束后分别加入一抗[Anti-MTL(1∶500)、Anti-GAPDH(1∶500)]、二抗[Anti-Rabbit(1∶1 000)]，分别于室温下孵育 1.5 h，缓冲液反复漂洗 3 次共 15 min，二抗漂洗结束后利用生物素辣根过氧化酶标记，测定各蛋白相对表达量。

2.7 统计学分析

本研究中所有数据均采用 SPSS 22.0 统计软件进行处理，计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间以 F 检验，组间以独立 t 检验，P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度胃排空率和小肠推进率

与对照组比较，模型组大鼠胃排空率和小肠推进率下降，差异有统计学意义(P<0.01)，说明造模后大鼠胃排空减慢，胃动力下降，小肠推进减慢，提示造模成功。与模型组比较，优化方组和原方组胃排空率和小肠推进率均显著提高(P<0.01)，且优化方效果较原方好。结果见表 2。

表 2 大鼠胃排空率和小肠推进率($\bar{x}\pm s$，n=8)

Tab. 2 Rat gastric emptying rate and small intestine propulsion rate($\bar{x}\pm s$, n=8) %

组别	胃排空率	小肠推进率
对照组	61.71±5.95	65.56±13.14
模型组	40.02±7.01[1)]	41.09±7.1[1)]
优化方组	55.18±6.90[2)]	57.31±5.31[2)]
原方组	53.33±4.25[2)]	55.21±6.14[2)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.01；与模型组比较：[2)]P<0.01。

Note: Compared with the control group, [1)]P<0.01; compared with the model group, [2)]P<0.01.

3.2 大鼠胃液总酸度、胃蛋白酶活性和血清中 MTL 含量

与对照组相比，模型组大鼠胃液总酸度、胃蛋白酶活性和血清中 MTL 含量显著降低(P<0.05 或 P<0.01)；与模型组相比，优化方及原方组大鼠胃液总酸度、胃蛋白酶活性和血清中 MTL 含量显著升高(P<0.05 或 P<0.01)。结果见表 3。

表 3 大鼠胃液总酸度、胃蛋白酶活性和血清中 MTL 含量($\bar{x}\pm s$，n=8)

Tab. 3 Total gastric juice acidity, pepsin activity and serum MTL content of rats($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	胃液总酸度 (pH 值)	胃蛋白酶 活性单位	血清中 MTL/ pg·mL^{-1}
对照组	2.42±0.29	430.7±31.2	310.7±11.9
模型组	2.06±0.15[1)]	217.1±32.4[2)]	208.5±15.2[2)]
优化方组	2.51±0.21[3)]	320.8±30.6[4)]	286.9±20.1[4)]
原方组	2.48±0.19[3)]	301.2±25.1[4)]	260.3±27.8[3)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.05，[2)]P<0.01；与模型组比较，[3)]P<0.05，[4)]P<0.01。

Note: Compared with the control group, [1)]P<0.05, [2)]P<0.01; compared with the model group, [3)]P<0.05, [4)]P<0.01.

3.3 qPCR 检测大鼠的胃窦与十二指肠 MTL mRNA

与对照组比较，模型组胃窦和十二指肠中 MTL mRNA 明显下降(P<0.01)；与模型组比较，原方组和优化方组中 MTL mRNA 明显上升(P<0.01 或 P<0.05)，且优化方效果略强于原方。结果见表 4。

表 4 大鼠的胃肠组织 MTL mRNA($\bar{x}\pm s$，n=8)

Tab. 4 MTL mRNA of gastrointestinal tissue of rats($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	胃组织	肠组织
对照组	1.004±0.105	1.001±0.041
模型组	0.649±0.042[1)]	0.592±0.080[1)]
原方组	0.829±0.056[2)]	0.827±0.029[3)]
优化方组	0.857±0.065[3)]	0.858±0.048[3)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.01；与模型组比较，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。
Note: Compared with the control group, [1)]P<0.01; compared with the model group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

3.4 Western blotting 测定大鼠的胃窦与十二指肠 MTL 蛋白表达量

与对照组比较，模型组胃窦和十二指肠中 MTL 蛋白明显下降(P<0.01)；与模型组比较，原方组和优化方组中 MTL 蛋白明显上升(P<0.01 或 P<0.05)，且优化方 MTL 蛋白的上升幅度大于原方，提示小儿健脾膏对胃肠功能障碍大鼠的胃肠动力促进作用可能与增加 MTL 蛋白的表达有关。结果见图 1。

4 讨论

胃肠运动功能是消化道重要功能之一，其对饮食消化发挥混合、推进、贮存和屏障作用，是维持消化功能的基本保证。胃肠功能障碍是众多功能性消化道疾病的共同病理变化，也会导致疾病本身加重和继发性疾病的产生。胃肠动力障碍病理生理基础为胃排空延迟和小肠推进减慢[7]，所以本实验以大鼠胃排空率和小肠推进率为检测指标。

实验采用营养性半固体糊测定胃排空和小肠推进，可避免以往采用液体标示物以比色法测定时药物自身颜色对测定结果的影响；半固体糊较非营养性食料营养结构更符合生理状况，能更准确反映药物对胃排空生理机能的影响，可减少因食物形态(固体或液体)及成分的不同，导致胃排空机制不同产生的实验误差，与胃排空和小肠推进分开测定的实验比较，不仅节省实验成本，而且采用炭末营养性半固体糊，比溶液性标示物更能反映药物对小肠推进生理机能的影响[8]。但该测量方法对肠道长度的测量易受主观因素和操作技术的影响，操作时应用盲法进行排除。

MTL 属于脑肠肽激素，是促进胃肠动力的重要激素，由小肠上段黏膜分泌细胞合成，与胃肠平滑肌细胞相应受体高度亲和，可强烈刺激上消化道的机械运动和生理性肌电运动。移行性复合运动是指在清醒空腹状态下胃肠出现静息与收缩循环往复的周期性运动。移行性复合运动蠕动收

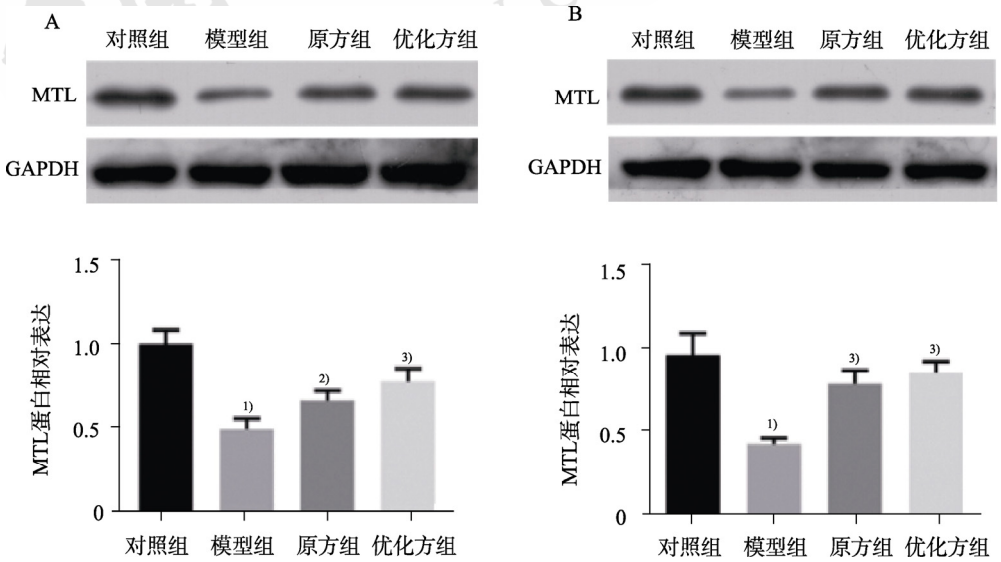

图 1 大鼠胃肠组织中 MTL 蛋白表达量($\bar{x}\pm s$，n=3)

A–胃组织；B–肠组织；与对照组比较，[1)]P<0.01；与模型组比较，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 1 MTL protein expression in gastrointestinal tissues of rats($\bar{x}\pm s$, n=3)

A–stomach tissue; B–intestinal tissue; compared with the control group, [1)]P<0.01; compared with the model group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

缩波可以从胃体移行至胃窦-十二指肠-空肠-回肠，可促进食物消化和消化道运动协调性，从而促进胃肠动力。有研究表明，MTL 参与了移行性复合运动的启动和调节[9]，对促进胃肠收缩具有重要意义。MTL mRNA 可指导 MTL 蛋白的合成，所以，本实验以 MTL 蛋白和 MTL mRNA 为分子生物学水平检测指标。

研究结果表明，优化方和原方对胃动力障碍大鼠的胃排空和肠推进均具有明显促进作用，二者疗效相当。二者对大鼠血清中 MTL 含量、胃液总酸度、胃蛋白酶活性、胃窦与十二指肠 MTL mRNA 和 MTL 蛋白表达均有明显提升作用，其中优化方对胃窦和十二指肠 MTL 蛋白表达的促进作用更为显著。

综上所述，小儿健脾膏原方和优化方对胃肠动力障碍大鼠均有明显的促胃肠动力的作用，强度相当。二者促胃肠动力的机制可能是促进了 MTL 及胃蛋白酶分泌，提升了胃窦和十二指肠 MTL mRNA 和 MTL 蛋白的表达。

REFERENCES

[1] YI X H, XIA F G, CHEN H F, et al. Effect of the flavanones in Fructus Aurantii on small intestinal propulsion function of mice[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2015, 26(2): 278-280.

[2] 唐红卫, 黄裕新, 高巍. 功能性消化不良胃动力异常与胃肠激素的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(6): 694-697.

[3] CHEN W J, YANG M H, YING J Z. Therapeutic evaluation on Xiao’er Jianpi plaster to treat infantile anorexia[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(6): 888-890.

[4] CHEN W J, YANG M H. Observation on curative effect of Xiao’er Jianpi cream in treating functional recurrent abdominal pain[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(4): 475-477.

[5] YANG X L, CHEN W J, XIE H Y, et al. Comparative study on the effect of Xiaoer Jianpi cream recipe and its disassembled prescription on the gastrointestinal muscle of Guinea-pig *in vitro*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(2): 178-181.

[6] XIE H Y, CHEN W J, YANG M H. Comparative study on the effect of Xiaoer Jianpi plaster recipe and its ingredients on the gastric and ileum smooth muscle of rats *in vitro*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(5): 670-673.

[7] HUANG Z Y, PENG S L, LUO C H. The effects of stir-baked SanXian combined with NiuYang CaoJie on gastrointestinal dysfunction of the mice[J]. West J Tradit Chin Med(西部中医药), 2017, 30(5): 18-20.

[8] ZHU J, ZHONG L Y, YE X D, et al. Comparison of dryness in different processed products of aurantii fructus and investigation of their effect on gastrointestinal function in rats with functional dyspepsia[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(22): 20-26.

[9] ZHAO P, DONG L, LAN K, et al. Effects of multiple gut hormones on human interdigestive migrating motor complex[J]. Chin J Dig(中华消化杂志), 2005, 25(2): 95-97.

收稿日期：2020-07-24

(本文责编：李艳芳)

http://www.chinjmap.com