

基于 SCF/C-kit 信号通路探讨黄连解毒汤对脑出血急性期模型大鼠胃损伤的影响

王春燕¹ 兰雅文¹ 唐明² 高召凯¹ 张增¹ 刘欢欢¹ 孔晓璇¹
李雯雯¹ 潘岳峰³ 安朋朋²

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东济南 250013; 2. 青岛市中医医院, 山东青岛 266033;
3. 青岛大学第一临床医学院, 山东青岛 266071)

摘要 目的:观察黄连解毒汤对脑出血急性期模型大鼠胃损伤的干预作用,并从干细胞因子/酪氨酸激酶受体(SCF/C-kit)信号通路方面探索其作用机制。方法:选择健康SD雄性10周龄大鼠进行实验。取部分大鼠采用自体血注入法制作脑出血模型,将造模成功的大鼠随机分为模型组、莫沙必利组和黄连解毒汤组,每组24只;另取24只大鼠仅进针不注入自体血,作为假手术组;另取24只常规饲养大鼠作为正常组。黄连解毒汤组大鼠予黄连解毒汤颗粒剂悬浊液54 mg/d灌胃,莫沙必利组大鼠予莫沙必利悬浊液0.27 mg/d灌胃,其余各组均灌胃给予生理盐水。分别于给药24 h、4 d、7 d后,随机取每组8只大鼠,处死取材。采用苏木精-伊红(HE)染色法观察各组各时期大鼠胃组织损伤情况并进行病理损伤评分,实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测各组各时期大鼠胃组织SCF、C-kit mRNA表达水平,蛋白免疫印迹(Western blot)法检测各组各时期大鼠胃组织SCF、C-kit蛋白相对表达量。结果:正常组与同期假手术组大鼠胃黏膜病理评分、胃组织SCF、C-kit mRNA及蛋白表达比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);正常组、假手术组上述指标不同时间点组内比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。模型组大鼠胃黏膜各观察时点病理评分均明显高于同期正常组、假手术组($P<0.01$),胃组织SCF、C-kit mRNA及蛋白相对表达量均明显低于同期正常组、假手术组($P<0.01$)。黄连解毒汤组、莫沙必利组大鼠各观察时点胃黏膜病理评分均明显低于同期模型组($P<0.01$),给药7 d时评分均明显低于同组给药24 h、4 d时($P<0.05$, $P<0.01$);黄连解毒汤组大鼠各观察时点胃黏膜病理评分均明显低于同期莫沙必利组($P<0.01$)。黄连解毒汤组、莫沙必利组大鼠各观察时点胃组织SCF、C-kit mRNA及蛋白相对表达量均明显高于同期模型组($P<0.01$),给药7 d时上述指标相对表达量均明显高于同组给药24 h、4 d时($P<0.05$, $P<0.01$);黄连解毒汤组大鼠各观察时点上述指标相对表达量均明显高于同期莫沙必利组($P<0.01$)。结论:脑出血急性期常继发急性胃黏膜损伤,黄连解毒汤对脑出血急性期胃黏膜损伤有一定的保护作用,其可能通过调控SCF/C-kit信号通路保护胃黏膜,有效减轻胃黏膜损伤。

关键词 脑出血;胃损伤;黄连解毒汤;SCF/C-kit信号通路;胃黏膜病理评分;莫沙必利

基金项目 山东省中医药科技发展计划项目(2017-321);青州市民生科技计划项目(18-6-1-69-nsh)

脑出血可归属于中医学“出血性中风”范畴^[1],是一种后果严重的脑卒中亚型,具有发病急、病情变化快及高致死率和致残率的特点,约占所有高死亡率脑卒中的23.4%^[2]。据统计,胃损伤是脑出血后较常见的并发症,发生率为1%~5%^[3]。脑出血后全身血管收缩,胃部血流减少,胃部细菌屏障减弱,表现为脘腹胀满、餐后腹胀、早饱、暖气、恶心和呕吐、腹泻以及便秘,严重时可出现呕血、便血等症状。研究表明,脑出血急性期胃损伤的发生甚至加重,严重影响了脑出血的预后^[4]。

对急性胃损伤病因的研究发现,Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)可能对胃部正常收缩具有重要影响。ICC是分布在胃部平滑肌细胞与神经细胞之间的一类间质细胞,其表面可以表达酪氨

酸激酶受体(C-kit),而作为C-kit受体自然配体的干细胞因子(SCF),与C-kit相结合可以激活SCF/C-kit信号通路,且该通路与ICC的发育有重要关联。当SCF或C-kit发生突变或其信号通路受损,会影响ICC发育、分化,使ICC数目减少。

风火痰瘀虚毒是中风的致病因素,自王永炎院士提出“毒损脑络”的理论后,营卫失和、毒损脑络已成为出血性中风的重要病机,清热解毒法治疗出血性中风已越来越被临床所重视。课题组前期研究发现,大鼠脑出血急性期可引发胃黏膜损伤,其机制可能与胃ICC的结构变化和数目减少有关,而黄连解毒汤可通过调节大鼠胃动素(MTL)及血管活性肠肽(VIP)来改善胃的敏感性及胃的运动功能紊

乱,从而保护胃黏膜^[5-6]。基于前期研究,本研究将从SCF/C-kit信号通路着手,制作脑出血急性期大鼠模型,造模成功后即给予黄连解毒汤,观察给药后24 h、4 d、7 d三个时间点大鼠胃损伤及胃组织SCF、C-kit mRNA及蛋白相对表达量变化情况。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康SD雄性10周龄大鼠120只,体重(200±20)g,由山东大学动物实验中心提供,合格证号:0009256。本实验经青岛市中医医院伦理委员会审批通过(伦理审批号:2018HC11LQ019)

1.2 实验药物 黄连解毒汤药物组成:黄连9g,黄芩6g,黄柏6g,栀子9g。使用华润三九医药股份有限公司生产的同批次颗粒剂,6g生药可换算0.5g颗粒剂,使用时用蒸馏水配制为27mg/mL悬浊液。枸橼酸莫沙必利片,5mg/片,国药准字H19990317,山东临沂鲁南贝特制药有限公司生产,使用时用蒸馏水配制为0.09mg/mL悬浊液。

1.3 主要试剂 无水乙醇(批号:10009218)、二甲苯(批号:X112051),国药集团化学试剂有限公司;曙红Y(醇溶,批号:A600190),生工生物工程(上海)股份有限公司;苏木精(批号:H8070),北京索莱宝科技有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:WLA004)、SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒(批号:WLA013)、Western洗涤液(批号:WLA025)、ECL发光液(批号:WLA003),沈阳万类生物科技有限公司。

1.4 主要仪器 RM2235石蜡切片机(德国Leica公司),QH01-9030A电热恒温鼓风干燥箱(中国上海精宏公司),BX53显微镜(日本OLYMPUS公司),DP73显微镜拍照系统(日本OLYMPUS公司),NW10LVF超纯水系统(香港Heal Force公司),H-2050R超速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司),Exicycler 96荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(韩国BIONEER公司),DYY-7C电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 造模 取若干大鼠,适应性饲养3d,常规消毒麻醉,呈仰卧位固定于立体定向仪,消毒备皮,纵行切口,暴露并分离股动脉,取股动脉血50μL。根据大鼠立体定位图谱调整大鼠体位,使前囟和后囟基本在同一平面上;于头部正中行纵行切口,于前囟前0.2mm,中线左旁3mm处,用钻头钻孔,骨孔大小约1mm;缓慢注入自体血15μL(注射速度约10μL/min),静置7min,以同样速率继续注入自体血35μL;留针20min,缓慢退针,骨蜡封闭颅骨孔,缝合皮肤。术后采用动物行为学(Longa神经功能缺

损)评分评价模型大鼠神经功能,评分为1~3分说明造模成功^[7]。取24只大鼠行假手术,仅进针不注入。

2.2 分组 将造模成功的大鼠采用随机数字表法随机分为模型组、黄连解毒汤组、莫沙必利组,每组24只,行假手术的24只为假手术组,另取24只正常大鼠作为正常组。

2.3 给药 参照徐叔云教授的《药理实验方法学》^[8]进行人与动物等效剂量换算大鼠给药剂量,本研究黄连解毒汤、枸橼酸莫沙必利用量均根据人正常使用剂量换算动物等效剂量,且因本研究所用大鼠体重质量基本一致,故使用固定给药剂量。确认造模成功后,黄连解毒汤组大鼠每日给予黄连解毒汤54mg/d灌胃(每次灌胃给予1mL浓度为27mg/mL的黄连解毒汤颗粒剂悬浊液,每日2次),莫沙必利组大鼠每日给予枸橼酸莫沙必利0.27mg/d灌胃(每次灌胃给予1mL浓度为0.09mg/mL的枸橼酸莫沙必利悬浊液,每日3次),正常组、假手术组和模型组均给予生理盐水灌胃(每次1mL,每日2次)。各组均连续灌胃7d。

2.4 取材 各组分别于给药24h、4d、7d后,随机各取8只大鼠,脱颈法处死,规定时间内切除全胃,沿胃大弯侧剪开,流水清洗胃内容物,肉眼观察胃的大体观、有无出血点及溃疡。随即取各组大鼠胃自贲门至幽门宽约0.5cm的条形组织,放入10%甲醛溶液中固定24h,蒸馏水冲洗24h,脱水、透明、浸蜡、包埋,制成3μm切片,置于烤片机内烤30min后,备用苏木精-伊红(HE)染色使用。取各组大鼠胃窦距幽门0.5cm的条形组织收集于冻存管中,液氮速冻后,保存于-80℃冰箱中,备用实时荧光定量PCR(quantitative Real-Time PCR, RT-PCR)法、蛋白免疫印迹(Western blot)法的检测。

2.5 观察指标

2.5.1 HE染色法观察大鼠胃组织病理形态 取各组各观察时点大鼠胃组织样本,包埋切片,将展开的切片移到载玻片上,于60℃温箱中放置2h,烘干,常规脱蜡至水,苏木素染色5min,盐酸酒精分化,自来水返蓝,伊红染色3min,依次浸入75%、85%、95%的乙醇中脱水各2min,用二甲苯及无水乙醇透明,滴加中性树胶封片,晾干。通过光镜观察胃黏膜的组织形态及病理变化。

2.5.2 胃黏膜损伤病理评分 按照文献[9]中的标准对各组各观察时点大鼠胃黏膜损伤程度进行评分。

2.5.3 RT-PCR法检测大鼠胃组织SCF、C-kit mRNA表达 取各组各观察时点大鼠胃组织样本,加入1mL TRIpure裂解液,混匀后室温静置5min;再加入200μL氯仿,静置3min;4℃、10000×g离心

10 min, 将得到的水相转移到新的离心管中; 加入等体积异丙醇, 置于-20 ℃条件下过夜; 15 h后再次离心, 弃上清; 加入1 mL 75%乙醇, 4 ℃、3400×g离心3 min, 弃上清; 室温静置5~6 min使残余乙醇挥发; 加30 μL RNase-free ddH₂O室温静置2 min, 提取总RNA, 检测RNA的浓度, 进行反转录, 得到对应的cDNA, 置于-20 ℃保存, 进行荧光定量分析。本研究使用2^{-ΔΔCt}方法分析样本mRNA相对表达量。引物序列见表1。

表1 各引物序列

名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
C-kit	上游: TGCCCGAAACAAGTCATCTC	109
	下游: TGAGGGTTCAACTTTATCCACAT	
SCF	上游: GATAACCCTCAACTATGTCG	135
	下游: TTAAGCTTCAAGCTTCAGAAAT	
β-actin	上游: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC	155
	下游: GGCCGGACTCATCGTACTCCTGCTT	

2.5.4 Western blot法检测大鼠胃组织SCF、C-kit蛋白表达 取各组各观察时点大鼠胃组织样本, 加入相应裂解液, 使用低温冷冻离心机, 4 ℃、离心半径12 cm、12 000 r/min, 离心10 min, 分离上清得到蛋白质抽提物, 配置BCA工作液, 酶标仪测定蛋白浓度, 制备蛋白上样液, 后行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温摇床封闭2 h, 加入TRPV1一抗(稀释度为1:500), 4 ℃孵育过夜。次日, 用Western洗涤液(TBST)对样本进行洗膜10 min×3次, 用山羊抗兔的二抗(稀释度为1:2000)室温孵育2 h, 再次用TBST洗膜10 min×3次, 最后用ECL发光液使其发光、显影。使用Quantity One软件对样本数据进行灰度等相关分析, 在进行目的蛋白的相对含量测定时, 使用同一目的蛋白与内参照的灰度比值来表示其相对表达量。

2.6 统计学方法 采用SPSS 27.0软件对数据进行统计

学分析。本研究所有计量资料均符合正态分布、方差齐性, 用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 2组数据比较用两独立样本t检验, 多组数据比较用单因素方差分析LSD检验。以P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠胃组织病理形态比较 正常组及假手术组大鼠胃组织均未见明显炎性细胞浸润及水肿, 黏膜层、黏膜下层、肌层、浆膜层均正常。假手术组大鼠偶可见黏膜下层、黏膜层充血。模型组大鼠胃组织可见大量的炎性细胞浸润, 黏膜血管可见显著充血、出血、水肿, 大量红细胞聚集, 上皮细胞大面积脱落, 腺体结构被破坏, 层次紊乱, 细胞组织间隙增大, 多处缺损, 出现溃疡性病变。黄连解毒汤组、莫沙必利组大鼠胃黏膜层炎性细胞数目较模型组明显减少, 偶见血管扩张, 黏膜水肿不明显, 黏膜层连续完整, 胃腺排列、腺管构造均正常, 未见黏膜溃疡。见图1、图2、图3。

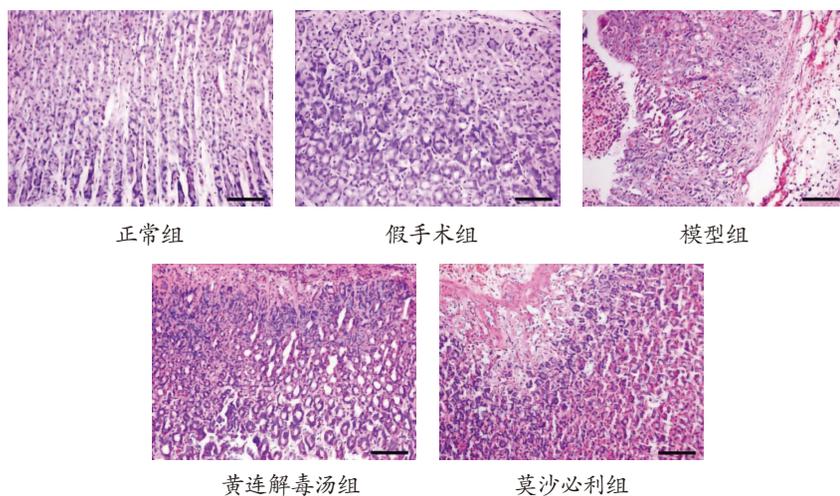


图1 各组大鼠给药24 h胃组织病理形态(HE染色, ×200)

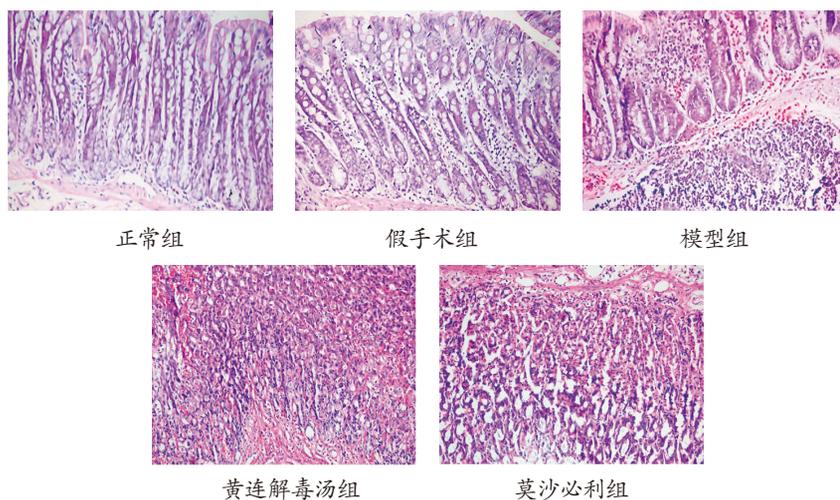


图2 各组大鼠给药4 d胃组织病理形态(HE染色, ×200)

实验研究

3.2 各组各观察时点大鼠胃黏膜损伤病理评分比较 模型组大鼠各观察时点胃黏膜损伤病理评分均明显高于同期正常组、假手术组 ($P < 0.01$), 其中给药4 d时评分明显高于给药24 h时 ($P < 0.01$), 给药7 d时评分明显低于给药4 d时 ($P < 0.01$)。各给药组各观察时点胃黏膜损伤病理评分均明显低于同期模型组 ($P < 0.01$), 给药4 d时评分均明显高于同组给药24 h时 ($P < 0.01$), 给药7 d时评分均明显低于同组给药24 h、4 d时 ($P < 0.05, P < 0.01$); 黄连解毒汤组大鼠各观察时点胃黏膜病理评分均明显低于同期莫沙必利组 ($P < 0.01$)。见表2。

3.3 各组各观察时点大鼠胃组织SCF、C-kit mRNA表达比较 模型组大鼠各观察时点胃组织SCF、C-kit mRNA表达均明显低于同期正常组、假手术组 ($P < 0.01$), 其中给药4 d时上述指标表达明显低于给药24 h时 ($P < 0.01$), 给药7 d时上述指标表达明显高于给药4 d时 ($P < 0.01$)。各给药组大鼠各观察时点上述指标表达均明显高于模型组 ($P < 0.01$); 各给药组组内比较, 给药4 d时各指标表达最低 ($P < 0.01$), 而给药7 d时各指标表达最高 ($P < 0.01$)。黄连解毒汤组大鼠各观察时点上述指标表达均明显高于莫沙必利组 ($P < 0.01$)。见表3。

3.4 各组各观察时点大鼠胃组织SCF、C-kit蛋白表达比较 模型组大鼠各观察时点胃组织SCF、C-kit蛋白表达均明显低于同期正常组、假手术组 ($P < 0.01$), 其中给药4 d时上述指标表达明显低于给药24 h时 ($P < 0.01$), 给药7 d时上述指标表达明显高于给药4 d时 ($P < 0.01$)。各给药组大鼠各观察时点上述指标表达均明显高于模型组 ($P < 0.01$); 各给药组组内比较, 给药4 d时各指标表达最低 ($P < 0.01$), 而给药7 d时各指标表达最高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。黄连解毒汤组大

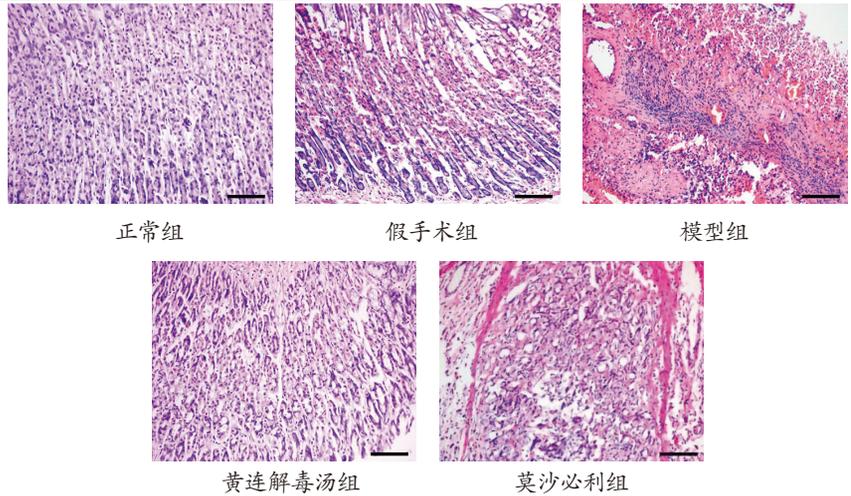


图3 各组大鼠给药7 d胃组织病理形态 (HE染色, $\times 200$)

表2 各组各观察时点大鼠胃黏膜损伤病理评分比较 ($\bar{x} \pm s$) 单位:分

组别	胃黏膜损伤病理评分		
	给药24 h (n=8)	给药4 d (n=8)	给药7 d (n=8)
正常组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
假手术组	0.13 ± 0.35	0.25 ± 0.46	0.38 ± 0.52
模型组	11.63 ± 0.52 ^{###}	14.50 ± 0.54 ^{###▲▲}	12.50 ± 0.54 ^{###▲◆◆}
黄连解毒汤组	6.50 ± 0.53 ^{###▲▲★}	7.63 ± 0.52 ^{###▲▲★▲▲}	5.38 ± 0.52 ^{###▲▲★▲◆◆}
莫沙必利组	8.25 ± 0.46 ^{###▲▲}	9.38 ± 0.52 ^{###▲▲▲▲}	7.50 ± 0.54 ^{###▲▲▲◆◆}

注:与同期正常组比较, ** $P < 0.01$; 与同期假手术组比较, ### $P < 0.01$; 与同期模型组比较, ▲ $P < 0.01$; 与同期莫沙必利组比较, ★ $P < 0.01$; 与本组给药24 h比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与本组给药4 d比较, ◆◆ $P < 0.01$ 。

表3 各组各观察时点大鼠胃组织SCF、C-kit mRNA相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SCF mRNA			C-kit mRNA		
	给药24 h (n=8)	给药4 d (n=8)	给药7 d (n=8)	给药24 h (n=8)	给药4 d (n=8)	给药7 d (n=8)
正常组	1.00 ± 0.01	1.02 ± 0.07	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.02
假手术组	0.98 ± 0.02	1.00 ± 0.04	0.99 ± 0.02	0.99 ± 0.01	0.99 ± 0.01	0.98 ± 0.02
模型组	0.40 ± 0.03 ^{###}	0.22 ± 0.05 ^{###▲▲}	0.31 ± 0.01 ^{###▲▲◆◆}	0.37 ± 0.02 ^{###}	0.18 ± 0.03 ^{###▲▲}	0.26 ± 0.01 ^{###▲▲◆◆}
黄连解毒汤组	0.57 ± 0.02 ^{###▲▲★}	0.43 ± 0.02 ^{###▲▲★▲▲}	0.65 ± 0.02 ^{###▲▲★▲▲◆◆}	0.59 ± 0.02 ^{###▲▲★}	0.46 ± 0.03 ^{###▲▲★▲▲}	0.67 ± 0.01 ^{###▲▲★▲▲◆◆}
莫沙必利组	0.51 ± 0.01 ^{###▲▲}	0.37 ± 0.02 ^{###▲▲▲▲}	0.60 ± 0.02 ^{###▲▲▲▲◆◆}	0.50 ± 0.01 ^{###▲▲}	0.35 ± 0.02 ^{###▲▲▲▲}	0.57 ± 0.01 ^{###▲▲▲◆◆}

注:与同期正常组比较, ** $P < 0.01$; 与同期假手术组比较, ### $P < 0.01$; 与同期模型组比较, ▲ $P < 0.01$; 与同期莫沙必利组比较, ★ $P < 0.01$; 与本组给药24 h比较, ▲▲ $P < 0.01$; 与本组给药4 d比较, ◆◆ $P < 0.01$ 。

鼠各观察时点上述指标表达均明显高于莫沙必利组 ($P < 0.01$)。见表4、图4、图5、图6。

4 讨论

中医认为出血性中风病因病机复杂, 营卫失和、毒损脑络是其重要病机。余学杰等^[10]认为火毒贯穿于中风急性期, 火热毒邪猛烈, 容易加重脏腑的损害, 因此以清热解毒为本病的治疗原则已逐步被临床认可。黄连解毒汤作为清热解毒的代表方, 始载于晋代葛洪所著的《肘后备急方》, 后在王焘的《外

台秘要》中被命名为黄连解毒汤，主治三焦热盛及各种实热火毒之证。方中以大苦大寒之黄连为君，泻中焦火热；辅以黄芩泻上焦火热，黄柏泻下焦火热，栀子通泻三焦火热从膀胱而出，使三焦热邪得清。诸药合用，共奏清热解毒之功。有研究表明，黄连解毒汤对脑出血急性期或者胃黏膜损伤的患者均有一定的治疗效果。如王革生等^[11]研究表明，中风发生后，急性脑出血的患者发生了严重的炎症反应，而以黄连解毒汤为代表的清热解毒法对急性脑出血的火毒证具有明显的临床改善作用。又如张建平^[12]运用黄连解毒汤治疗急性脑血管病患者50例，其中49例患者未发生急性脑血管病常见的应激性溃疡，从而猜想黄连解毒汤有保护胃黏膜的作用。

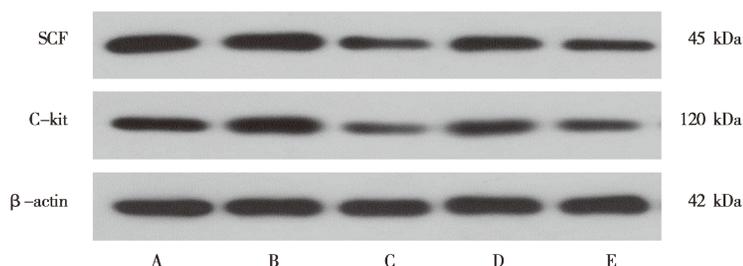
现代研究表明，ICC是消化道纵行肌和环形肌之间的一种特殊细胞，可产生并且传播慢波，控制胃平滑肌的运动；C-kit是ICC的特异性标志物，每1个C-kit单体与1个SCF分子结合，SCF二聚化会触发C-kit单体的结构改变，导致细胞内酪氨酸自动磷酸化，而SCF作用的发挥依赖于特定的受体与C-kit形成配基受体二聚体复合物，启动SCF/C-kit信号通路，对ICC的发育、分化及表型维持至关重要^[13]。正常情况下，中枢神经系统、胃神经系统及胃激素对胃部肌层组织起控制、调节作用。脑出血急性期患者处于应激状态下，中枢神经系统、胃神经系统被激活，C-kit及SCF表达发生异常，SCF/C-kit信号通路改变，导致胃Cajal间质细胞的数量减少，结构发生变化，胃电信号传递受阻，胃调节功能紊乱，胃黏膜受损，引起胃功能障碍^[14]。因此，SCF/C-kit信号通路可能是脑出血急性期胃损伤发生的关键因素。

本研究结果显示，模型组大鼠的胃黏膜损伤病

表4 各组各观察时点大鼠胃组织SCF、C-Kit蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

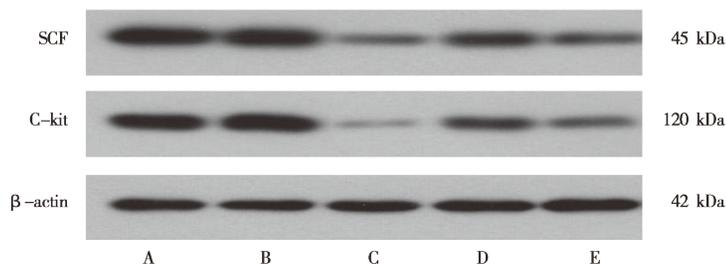
组别	SCF蛋白			C-kit蛋白		
	给药24h (n=8)	给药4d (n=8)	给药7d (n=8)	给药24h (n=8)	给药4d (n=8)	给药7d (n=8)
正常组	1.01±0.03	1.00±0.02	1.00±0.03	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.03
假手术组	0.98±0.03	0.98±0.02	0.99±0.03	0.98±0.03	0.99±0.02	0.99±0.03
模型组	0.56±0.05 ^{***}	0.27±0.02 ^{***}	0.36±0.03 ^{***}	0.52±0.03 ^{**}	0.28±0.03 ^{**}	0.37±0.05 ^{***}
黄连解毒汤组	0.71±0.03 ^{***}	0.57±0.02 ^{***}	0.77±0.04 ^{***}	0.72±0.03 ^{***}	0.58±0.02 ^{***}	0.78±0.05 ^{***}
枸橼酸莫沙必利组	0.63±0.03 ^{**}	0.47±0.02 ^{**}	0.69±0.05 ^{**}	0.58±0.04 ^{**}	0.47±0.02 ^{**}	0.65±0.03 ^{**}

注：与同期正常组比较，** $P < 0.01$ ；与同期假手术组比较，### $P < 0.01$ ；与同期模型组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与同期莫沙必利组比较， $\star\star P < 0.01$ ；与本组给药24h比较， $\blacktriangle P < 0.05$ ， $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ ；与本组给药4d比较， $\blacklozenge P < 0.01$ 。



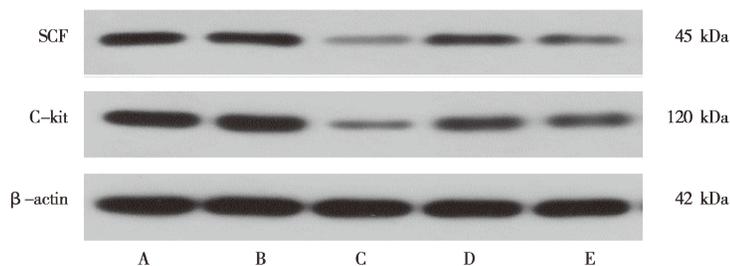
注：A.正常组；B.假手术组；C.模型组；D.黄连解毒汤组；E.莫沙必利组。

图4 各组大鼠给药24h SCF、C-kit蛋白电泳图



注：A.正常组；B.假手术组；C.模型组；D.黄连解毒汤组；E.莫沙必利组。

图5 各组大鼠给药4d SCF、C-kit蛋白电泳图



注：A.正常组；B.假手术组；C.模型组；D.黄连解毒汤组；E.莫沙必利组。

图6 各组大鼠给药7d SCF、C-kit蛋白电泳图

理评分明显高于正常组及假手术组，且不同观察时点评分差异较大，由此可以猜想在急性脑出血发生后24h胃黏膜损伤就已经出现，并且呈进行性加重，在第4日时达到高峰，到第7日胃黏膜损伤程度减轻，这与临床上脑出血急性期出现颅内水肿的高峰的时间一致^[15-16]。黄连解毒汤组及莫沙必利组大鼠

给药24 h、4 d、7 d时胃黏膜病理损伤评分均明显低于模型组,且在给药7 d时,2组评分均明显低于本组给药4 d时,提示黄连解毒汤与枸橼酸莫沙必利对脑出血急性期模型大鼠的胃黏膜均能起到一定的保护作用。模型组大鼠胃组织SCF、C-kit mRNA及蛋白表达均明显低于正常组、假手术组,说明脑出血急性期继发胃损伤可能是由于在应激状态下胃组织SCF、C-kit表达下降,SCF/C-kit信号通路发生异常改变所致。黄连解毒汤组及莫沙必利组大鼠各观察时点SCF、C-kit mRNA及蛋白表达均明显高于模型组,其中黄连解毒汤组上述指标表达均明显高于莫沙必利组,说明黄连解毒汤及枸橼酸莫沙必利均可通过增加胃组织SCF、C-kit mRNA及蛋白的表达量,启动SCF/C-kit信号通路,促进ICC的分化和发育,进一步调节胃神经信号的传递,从而保护胃黏膜,减轻胃损伤,且黄连解毒汤效果更佳。本研究也发现,黄连解毒汤、枸橼酸莫沙必利连续给药7 d时,大鼠胃黏膜病理评分降至最低水平,胃组织SCF、C-kit mRNA及蛋白表达水平达到最高,但仍低于假手术组及正常组,说明药物虽然可以通过上调SCF/C-kit信号通路,改善胃损伤,但在7 d内仍无法恢复至正常水平。

综上所述,黄连解毒汤对脑出血急性期继发胃损伤有明确的治疗作用,其可能的作用机制为调控SCF/C-kit信号通路,增加SCF、C-kit mRNA及蛋白的表达。但由于本研究为动物实验,样本较少,观察时间较短,下一步课题组拟加大动物实验样本量,酌情增加疗程,动态观察黄连解毒汤不同剂量对脑出血急性期继发胃损伤大鼠SCF/C-kit信号通路调控的差异性,同时课题组也拟进一步实施临床研究,观察不同剂量黄连解毒汤对脑出血急性期继发胃损伤患者的临床疗效。

参考文献

[1] 张伯礼,吴勉华,主编.中医内科学[M].北京:中国中医药出版社,2017:129.

[2] 中国卒中学会中国脑血管病临床管理指南撰写工作委员会.中国脑血管病临床管理指南(第2版)(节选):第5章 脑出血临床管理[J].中国卒中杂志,2023,18(9):1014.

[3] JI R J, SHEN H P, PAN Y S, et al. Risk score to predict gastrointestinal bleeding after acute ischemic stroke[J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14: 130.

[4] WIJDIKS E F, FULGHAM J R, BATTIS K P. Gastrointestinal bleeding in stroke[J]. Stroke, 1994, 25(11): 2146.

[5] 杨雪琳,唐明,周立娟,等.基于SCF/c-kit信号通路探讨调胃承气汤对脑出血急性期大鼠胃肠组织的影响[J].现代中西医结合杂志,2022,31(9):1194.

[6] 安朋朋,唐明,任志珍,等.黄连解毒汤对脑梗塞急性期大鼠胃肠动力的调节作用[J].中国中医药科技,2015,22(1):26.

[7] 李建香,刘云芳,王君君,等.基于脑肠肽CCK-8研究凉血通瘀方对急性脑出血模型大鼠的神经保护作用机制[J].江苏中医药,2022,54(5):71.

[8] 徐叔云.药理实验方法学[M].3版.北京:人民出版社,2002:202.

[9] MORINI G, GRANDI D. Methods to measure gastric mucosal lesions in the rat[J]. Curr Protoc Toxicol, 2010, Chapter 21: Unit 21.2. doi: 10.1002/0471140856.tx2102s43.

[10] 余学杰,李书珍,李晓燕,等.中风病“火毒”证候分析[J].中医学报,2015,30(2):222.

[11] 王革生,张允岭,张志辰,等.黄连解毒汤对急性脑出血与脑梗塞火毒证的效应差异及相关机制[J].中华中医药杂志,2013,28(11):3178.

[12] 张建平.黄连解毒汤为主治疗急性脑血管病50例[J].实用中医药杂志,1998,14(9):10.

[13] 田姣,王宝西,江逊.胃肠道Cajal间质细胞与干细胞因子/c-kit信号系统的研究进展[J].临床儿科杂志,2013,31(4):385.

[14] IINO S, HORIGUCHI S, HORIGUCHI K. Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal musculature of W (jic) c-kit mutant mice[J]. J Smooth Muscle Res, 2011, 47(3/4): 111.

[15] 唐明,安朋朋,杨秀丽.脑卒中急性期空腹胃电图动态变化分析[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(8):940.

[16] 安朋朋,张毅,王君,等.脑梗死急性期大鼠胃黏膜损伤情况及意义[J].山东医药,2018,58(12):22.

第一作者:王春燕(1993—),女,硕士研究生在读,研究方向为中医药治疗急危重症。

通讯作者:安朋朋,医学硕士,副主任医师,硕士研究生导师。anpengpeng1984@163.com

收稿日期:2023-10-05

编辑:吴宁

