#### 研究快报 RAPID COMMUNICATION



## 旋覆代赭汤对胃窦平滑肌细胞收缩和钙离子浓度的影响

时昭红, 陶春晖, 石拓, 林丽莉, 王湘宁, 韦秀明

#### ■背景资料

胃是道人20%-54%,52%的对疾了大作障方作研究力床病发生。54%,52%的对疾了凝疗病健制。高占多少的对疾了凝疗病健制的多点,高占多肠的富赭动有中系疾胃,高占多肠的富赭动有中系统的方位,该运治的汤力效药统病肠其达消%,运治的汤力效药统

时昭红,石拓,武汉市第一医院消化内科 湖北省武汉市430022

陶春晖, 林丽莉, 王湘宁, 韦秀明, 湖北中医学院中医系 湖北 省武汉市 430061

武汉市卫生局临床重点学科研究基金资助项目, 武卫No. [2004]241

作者贡献分布: 时昭红对此文做出主要贡献; 此课题由时昭红、石拓及陶春晖设计; 研究过程由陶春晖、林丽莉及王湘宁操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陶春晖与林丽莉完成; 数据分析由陶春晖、林丽莉及韦秀明完成; 本论文写作由时昭红、陶春晖及林丽莉完成.

**通讯作者**: 时昭红, 教授, 430022, 湖北省武汉市中山大道215号, 武汉市第一医院消化内科. ycfyx2000@126.com

电话: 027-85855332

収稿日期: 2009-06-24 修回日期: 2009-08-29 接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-10-08

# Effects of Xuanfu Daizhe Decoction on cell contraction and intracellular calcium concentration in rat gastric antral smooth muscle cells

Zhao-Hong Shi, Chun-Hui Tao, Tuo Shi, Li-Li Lin, Xiang-Ning Wang, Xiu-Ming Wei

Zhao-Hong Shi, Tuo Shi, Department of Gastroenterology, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Chun-Hui Tao, Li-Li Lin, Xiang-Ning Wang, Xiu-Ming Wei, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Supported by: the Foundation of Wuhan Hygiene Bureau for Clinical Key Disciplines, Wu Wei No. [2004]241 Correspondence to: Professor Zhao-Hong Shi, Department of Gastroenterology, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China. ycfyx2000@126.com

Received: 2009-06-24 Revised: 2009-08-29 Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-10-08

#### Abstract

**AIM:** To observe the effects of different concentrations of serum from rats medicated with Xuanfu Daizhe Decoction on cell contraction and intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>) concentration in rat gastric antral smooth muscle cells (SMCs).

**METHODS:** After single SMCs were isolated and cultured, motilin or different concentrations (5%, 10% or 20%) of serum from rats medicated with XuanFu Daizhe Decoction were added, respectively. The contraction of SMCs was then

determined, and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration was measured using the o-cresolphthalein complexone (CPC) method.

**RESULTS:** Serum from rats medicated with XuanFu Daizhe Decoction could significantly stimulate the contraction of gastric antral SMCs in a concentration-dependent manner (P < 0.05). After cell contraction was induced, the total intracellular calcium concentration showed no significant difference among each serum treatment group and control group.

**CONCLUSION:** Serum from rats medicated with XuanFu Daizhe Decoction can induce obvious contraction of gastric antral SMCs in rats perhaps via a mechanism involving activation of inositol trisphosphate receptor to stimulate the release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores.

Key Words: Xuanfu Daizhe Decoction; Medicated animal serum; Gastric antral smooth muscle cells; Ca<sup>2+</sup>

Shi ZH, Tao CH, Shi T, Lin LL, Wang XN, Wei XM. Effects of Xuanfu Daizhe Decoction on cell contraction and intracellular calcium concentration in rat gastric antral smooth muscle cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2936-2939

#### 摘要

目的: 观察不同浓度旋覆代赭汤含药血清对 大鼠胃窦平滑肌细胞(SMC)Ca<sup>2+</sup>浓度的影响, 并探讨其对胃SMC收缩力作用机制.

方法: 分离大鼠胃窦SMC, 加入不同浓度 (5%、10%、20%)含药血清和胃动素, 观察含药血清对胃窦SMC收缩作用, CPC法检测细胞 Ca<sup>2+</sup>总浓度变化.

结果: 5%、10%、20%旋覆代赭汤含药血清刺激胃窦SMC,随剂量的增加细胞收缩活动逐渐增强(P<0.05). 细胞收缩后,各剂量组与无钙缓冲液组的细胞内钙离子总浓度相比较无明显差异.

结论: 旋覆代赭汤可使胃窦SMC明显收缩, 其

■同行评议者 管冬元,副教授, 上海中医学院实 基础医学教研室 中医学教研室 机制可能是与 $IP_3R$ 使细胞内质网释放 $Ca^{2+}$ 引起胃窦SMC  $Ca^{2+}$ 升高有关.

#### 关键词: 旋覆代赭汤; 含药血清; 胃窦平滑肌细胞; 钙离子

时昭红,陶春晖,石拓,林丽莉,王湘宁,韦秀明.旋覆代赭汤对胃窦平滑肌细胞收缩和钙离子浓度的影响.世界华人消化杂志2009:17(28):2936-2939

http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2936.asp

#### 0 引言

胃肠道为中空的肌性器官, 其肌层由数层平滑 肌构成, 胃肠动力性疾病的发生与平滑肌收缩 的改变密切相关. Ca2+在介导平滑肌细胞收缩反 应中起核心作用, 是重要的"第二信使". 外来 刺激作用细胞膜, 引起细胞内游离Ca<sup>2+</sup>的浓度升 高, 启动平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC) 的兴奋-收缩偶联过程. 旋覆代赭汤出自《伤寒 论》, 是用以治疗伤寒解后胃虚气逆, 心下痞硬 之痰气痞, 具有涤痰化饮, 镇肝降逆, 调补脾胃 之功效. 研究表明[1-2], 旋覆代赭汤具有较强的促 胃动力作用, 但是关于其含药血清对胃窦SMC Ca<sup>2+</sup>的影响尚未见报道. 本实验通过镜下观察 含药血清对胃窦SMC收缩作用, 并应用CPC法 检测含药血清对大鼠胃窦SMC收缩后Ca<sup>2+</sup>总浓 度变化, 探讨旋覆代赭汤含药血清对大鼠胃窦 SMC收缩的作用机制.

#### 1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠 & , 体质量180-250 g, 10只, 购自华中科技大学同济医学院实验动物学部, 动物许可证号为scxk(鄂)2004-0007. 旋覆代赭汤方中中药由湖北省武汉市中西结合医院中药房提供. II 型胶原酶、大豆胰蛋白酶抑制剂、胃动素均购自Sigma公司. 高糖DMEM培养液购自Gibco公司. 胎牛血清购自三利公司. N2-羟乙基哌嗪-N-2, 2-乙烷磺酸(HEPES)购自Amerseco公司. BSA购自Roche公司. 台盼蓝购自北京有机化工厂. 钙试剂购自上海复星长征医学科学有限公司. Hepes-Ringer缓冲液按照文献[3]配制.

#### 1.2 方法

1.2.1 旋覆代赭汤的制备: 旋覆代赭汤根据《伤寒论》161条原剂量折算, 由旋覆花9 g、代赭石30g、生晒参6 g、生姜15 g、炙甘草9 g、半夏9 g, 大枣4枚组成. 将上述中药饮片置于煎煮容器内, 加相当于药材量5倍的冷水浸泡60 min, 煮沸

30 min; 再加3倍量水继续煎煮20 min; 煎煮液浓缩后, 制成含煎剂2.52 g/mL(根据人与动物体表面积换算, 相当于成人每日剂量的11倍)的浓缩液200 mL.

1.2.2 旋覆代赭汤含药血清的制备: 按文献[4]制备含药血清.

1.2.3 游离单个大鼠胃窦SMC的制备: 参考文献 [2]方法, 成年SD å 大鼠经麻醉, 无菌剖腹取胃, 剪取胃窦(距幽门约0.5 cm), 剪碎成1-2 mm<sup>2</sup>的小 肌块,用含0.1%胶原酶和0.01%大豆胰蛋白酶抑 制剂的消化液消化2次,制成胃窦SMC悬液.台 盼蓝检测细胞活性, 调整细胞数目为 $2.5 \times 10^7$ /L. 1.2.4 旋覆代赭汤含药血清对大鼠胃窦SMC收缩 反应的影响: 在24孔培养板中分设5组, 每组3孔, 将250 uL的胃窦SMC悬液依次加入24孔培养板 中, 不同组中分别5%、10%、20%的含药血清 10 uL, 空白对照组中加入10%的未含药血清10 μL, 胃动素组中加入, 加入生理剂量胃动素10<sup>-10</sup> mol/L(此剂量对平滑肌细胞的收缩效应最强)[3] 10 μL. 每孔终反应体积为1 mL. 作用60 s后, 再 分别加入80 μL 2.5%戊二醛终止反应. 在倒置显 微镜下测量, 用显微测微尺随机测量在视野中 细胞长轴变化情况, 计算细胞长度和细胞收缩 变化百分率. 细胞收缩变化百分数 = (给药组细 胞平均长度值-对照组细胞平均长度值)/对照组 细胞平均长度值×100%.

**统计学处理** 结果以mean±SD表示, 统计学 分析用SPSS12.0软件进行方差分析, 样本均数 之间两两比较采用*t*检验.

#### 2 结果

2.1 旋覆代赭汤含药血清对大鼠胃窦SMC收缩 效应的影响 旋覆代赭汤代对大鼠胃窦平滑肌均 有明显的收缩作用. 其中, 20%含药血清组对于

#### ■研发葡沿

对胃肠动力学及 其相关疾病的研 究是近十几年来 国际国内医学研 究的热点, 运用中 药治疗胃肠运动 障碍疾病已逐渐 得到人们重视, 本 课题紧紧围绕临 床急需解决的关 键技术进行研究, 具有较高的研究 价值和研究前景. 尤其是对中药现 代化研究,提高中 医药竞争力意义 重大.

#### ■相关报道

#### ■创新盘点

本课题首次从细 胞分子水平来探 讨旋覆代赭汤促 进胃动力的作用 机制. 从信号转导 通路的角度来探 讨旋覆代赭汤治 疗胃动力障碍疾 病的可能机制.

大鼠胃窦SMC收缩作用最强, 20%含药血清组与 胃动素组无明显差异(表1).

CN 14-1260/R

ISSN 1009-3079

2.2 旋覆代赭汤含药血清对大鼠胃窦SMC总 Ca<sup>2+</sup>的影响 5%、10%、20%的含药血清、胃动 素、无钙的缓冲液组引起细胞收缩后, 所测细 胞内 $Ca^{2+}$ 总浓度分别为:  $0.119\pm0.0128$  mmol/L、  $0.111 \pm 0.0269 \text{ mmol/L}, 0.116 \pm 0.0331 \text{ mmol/L},$  $0.121 \pm 0.0131 \text{ mmol/L}$ ,  $0.124 \pm 0.0317 \text{ mmol/L}$ . 5%、10%、20%的含药血清组、胃动素组、空 白对照组(0.118±0.0379 mmol/L)与无钙缓冲液 组比较无显著差异; 20%的含药血清组与胃动素 比较也无明显差别.

#### 3 讨论

胃动力障碍(gastric dysmotility)疾病是临床常见 胃肠道疾病之一,是以胃运动异常,胃正常的生 理性协调运动被扰乱为特征, 出现胃平滑肌收 缩下降、张力低下, 正向节律性传导能力下降 的一类疾病. 中医学虽然没有"胃动力障碍疾 病"这一病名,但根据胃动力障碍疾病的临床 表现,可将其归于痞证、嗳气、呕吐、呃逆、 反胃等范畴. 旋覆代赭汤主要用于伤寒失治或 误治,导致脾胃虚弱,而脾胃虚弱,脾失运化,痰 湿内生, 气机阻滞, 胃气上逆之"痞证".

代二庆 et al<sup>[2]</sup>研究发现旋覆代赭汤能明显 增大食管肌条的收缩幅度及加快其收缩频率. 于强 et al[5-6]研究表明本方能提高大鼠血清中 胃动素和胃泌素的水平, 促进胃的排空. 本实验 通过检测不同浓度旋覆代赭汤含药血清对胃窦 SMC作用后长度的改变, 结果表明旋覆代赭汤 对胃窦SMC有明显的收缩作用.

"血清药理学"由日本学者首次提出,就 是指在动物经口服给药一段时间后采血分离血 清, 用此含药血清进行体外药理实验的一种实 验方法[7]. 这种研究方法不仅可以排除中药制剂 的杂质成分、不同酸碱度、电解质等因素的影 响, 克服中药粗制剂直接加入反应系统所带来 的干扰, 而且含药血清能较接近地反映药物在 体内的状态, 使体外试验能较好地重复在体试 验的结果, 有利于从细胞分子水平阐明中药作 用机制[8]. 一般认为含药血清浓度不宜过高, 超 过某种限度,将对细胞或组织活动产生不利影 响, 以不超过20%为宜[9]. 我们实验也表明20%含 药血清组对于大鼠胃窦SMC收缩作用最强.

由于胃肠道平滑细胞膜上的钙通道远比骨 骼肌细胞膜上的钙通道多, 而钠通道又比骨骼

表 1 旋覆代赭汤对胃窦SMC的收缩作用  $(n = 10, mean \pm SD)$ 

分组	反应后(µm)	收缩百分数(%)
对照组	84.32 ± 8.21	_
胃动素组	$60.20 \pm 7.52$	$29.21 \pm 2.46^{ac}$
5%含药血清组	$69.76 \pm 6.86$	$17.28 \pm 2.04^{a}$
10%含药血清组	$65.21 \pm 7.15$	$22.66 \pm 2.56^{b}$
20%含药血清组	$60.58 \pm 6.74$	$28.15 \pm 2.64$ <sup>bc</sup>

°P<0.05, °P<0.01 vs 对照组比较; °P<0.05 vs 10%含药血清组

肌少许多, 所以钙离子和钙通道在胃肠平滑肌 动作电位产生中居主导地位[10]. 平滑肌细胞胞 质游离Ca<sup>2+</sup>在平滑肌细胞收缩过程中起重要的 "第二信使". 平滑肌收缩时的Ca<sup>2+</sup>来源于细 胞外液Ca2+内流和细胞内钙库Ca2+释放[11]. 肌质 网是平滑肌细胞的细胞内钙贮存库, 已证实肌 质网上存在着两种钙释放通道: IP,受体(IP,R) 和ryanodine受体(Ry<sub>3</sub>R)<sup>[12-15]</sup>. 这2种钙通道的开 放有赖于胞外胃肠肽等激动剂与其G蛋白偶联 受体结合后激活磷脂酶C(PLC),产生第二信使 IP3[16]. IP3受体接受IP3和钙离子的双重调节. IP3 介导Ca<sup>2+</sup>释放是量子化的, 具有"全或无"的 特性. 在无Ca<sup>2+</sup>条件IP,几乎不能诱导其受体开 放、当细胞Ca<sup>2+</sup>浓度升高时、IP<sub>3</sub>R释放Ca<sup>2+</sup>增加、 构成正反馈; 如果Ca<sup>2+</sup>浓度升高超过300 nmol/L 时, IP,R对IP,变得不敏感, Ca2+释放被抑制, 此 属负反馈,如此反复,形成了钙振荡(calcium oscillation)和钙波(calcium wave), 从而引起平滑 肌节律性的收缩[17].

本实验采用CPC法检测收缩后细胞Ca<sup>2+</sup>总 浓度, 显示在含钙与无钙的缓冲液悬浮的胃窦 SMC Ca<sup>2+</sup>浓度比较无明显差异. 胃动素对胃收 缩的调节不依赖胞外钙的存在, 而是作用于肌 细胞膜, 通过受体活化性钙通道, 使细胞内肌浆 网释放Ca<sup>2+</sup>引起胞内钙浓度升高, 造成平滑肌 细胞收缩[3]. 20%的含药血清组与胃动素收缩后 Ca2+总浓度也无明显差异. 由此推测引起的胃窦 SMC收缩时, Ca<sup>2+</sup>的升高可能来源于胞内钙库, 并且介导这一反应的第二信使是IP3途径.

目前对于胃动力障碍疾病的治疗, 西医多 以促胃动力药为主. 中医药治疗本病有着突出 的优势, 但是对于其机制的研究比较局限. 旋覆 代赭汤作为治疗胃动力障碍疾病的有效方剂, 目前的研究多以临床为主, 基础研究也多以在 体动物为主, 缺乏相应的细胞分子机制研究, 进 一步对旋覆代赭汤细胞分子作用机制的研究

#### 旋覆代赭汤作为 治疗胃动力障碍 疾病的有效方剂, 对其在细胞分子

■应用要点

学方面的作用机 制的研究有助于 进一步明确其作 用范围, 推广其在 临床上的应用.

有重要意义. 下一步, 我们将探讨旋覆代赭汤 对大鼠胃窦SMC中IP<sub>3</sub>R mRNA、CCKB/GASR mRNA、VIPR2 mRNA等表达的影响, 进一步揭 示其促进胃平滑肌动力的信号转导机制.

#### 4 参考文献

- 1 王长洪, 陈多, 吴春福, 陆宇平. 旋复代赭汤促胃肠动力作用的实验研究. 中国中西医结合脾胃杂志 1999; 7:4-7
- 2 代二庆, 李海英, 赵占考, 袁红霞, 刘子泉, 王义和. 旋 覆代赭汤及其拆方对大鼠离体食管肌条收缩活动的 影响. 现代中西医结合杂志 2004; 13: 1268-1270
- 3 周吕, 王新. 胃动素对大鼠胃平滑肌细胞收缩活动的作用. 生理学报 1996; 48: 165-172
- 4 李仪奎,吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案. 中国药理学通报 1999; 15: 569-570
- 5 于强, 袁红霞, 郭世铎. 旋覆代赭汤对酸性反流性食管炎模型大鼠胃窦黏膜胃泌素表达的影响. 天津中医药2006; 23: 275-278
- 6 于强,袁红霞,崔乃强.旋覆代赭汤对酸性反流性食管炎模型大鼠血浆胃动素水平的影响.中医药学刊2003;21:890-891
- 7 贺玉琢. 日本汉方药"血清药理学、血清药化学"的研究概况. 国外医学·中医中药分册 1998; 20: 3-7
- 8 赵万红, 曹永孝, 袁泽飞. 中药血清药理学的方法学探讨. 中药新药与临床药理 2002; 13: 122-124
- 9 潘卫松, 刘美凤, 石钺, 邢东明, 杜力军, 何希辉, 张宏

- 印. 血清药理学、血清化学和中药药代动力学. 世界科学技术-中药现代化 2002; 4: 53-56
- 10 陈哲宇. 胃肠平滑肌运动的细胞信号转导机制. 国外 医学·消化系疾病分册 2003; 23: 138-141
- 11 Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1438-1449
- 12 White C, McGeown JG. Regulation of basal intracellular calcium concentration by the sarcoplasmic reticulum in myocytes from the rat gastric antrum. *J Physiol* 2000; 529 Pt 2: 395-404
- 13 Carl A, Lee HK, Sanders KM. Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. Am J Physiol 1996; 271: C9-C34
- 14 McCarron JG, Flynn ER, Bradley KN, Muir TC. Two Ca2+ entry pathways mediate InsP3-sensitive store refilling in guinea-pig colonic smooth muscle. J Physiol 2000; 525 Pt 1: 113-124
- Takeuchi M, Watanabe J, Horiguchi S, Karibe A, Katoh H, Baba S, Shinozaki T, Miura M, Fukuchi M, Kagaya Y, Shirato K. Interaction between L-type Ca2+ channels and sarcoplasmic reticulum in the regulation of vascular tone in isolated rat small arteries. J Cardiovasc Pharmacol 2000; 36: 548-554
- 16 刘凯, 齐清会. 胃肠肽受体及受体后信号传导与胃肠动力. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1445-1449
- 17 Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ. The control of calcium release in heart muscle. *Science* 1995; 268: 1045-1049

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

消息。

### 《世界华人消化杂志》数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定,本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字,如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等.统计学数字采用阿拉伯数字,如1000-1500 kg, 3.5±0.5 mmol/L等.测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度.任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差.在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如3 614.5±420.8 g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成3.6±0.4 kg,过多的位数并无意义.又如8.4±0.27 cm,其SD/3 = 0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位.有效位数以后的数字是无效的,应该舍.末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括"0")且5之后全为0则舍.末尾时只可1次完成,不得多次完成.例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该23.48→23.5→24.年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写.如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30.百分数的有效位数根据分母来定:分母≤100,百分数到个位;101≤分母≤1 000,百分数到小数点后1位;余类推.小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!(科学编辑:李军亮2009-10-08)

■同行评价