

· 药理 ·

舒胃汤对功能性消化不良大鼠小肠 ICC 细胞 IP3R, RyR 表达的影响

王小娟¹, 阳松威², 郭璇^{2*}, 姜苏南², 徐寅¹, 黄琳桂², 刘乐平², 田少聪²

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的:通过观察舒胃汤对功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)模型大鼠小肠 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)中 IP3 受体(inositol 1,4,5-triphosphate receptor, IP3R),Ry 受体(ryanodine receptor, RyR)蛋白及 mRNA 表达的影响,从钙离子通道调节角度探讨舒胃汤对 FD 的治疗作用及机制。方法:取 Wistar 大鼠 15 只,随机分成空白组、模型组与舒胃汤组(30.68 g·kg⁻¹)。模型组与舒胃汤组按复合病因造模法处理 21 d 复制 FD 模型,灌胃给药 14 d 后取血制备含药血清。取 2~3 周 Wistar 大鼠小肠平滑肌原代 ICC 细胞,传代培养后分为空白血清组(A 组),模型血清组(B 组),舒胃汤 5% 含药血清组(C 组),舒胃汤 10% 含药血清组(D 组),舒胃汤 15% 含药血清组(E 组)。待细胞融合至 60%~80% 时分别加入对应组别血清,继续孵育 24 h。提取细胞蛋白及总 RNA,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 IP3R,RyR 蛋白表达,实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测 IP3R,RyR mRNA 表达。结果:Western blot 检测发现,与 A 组比较,B 组 IP3R-1,IP3R-2,IP3R-3,RyR-1,RyR-2,RyR-3 蛋白表达均明显降低($P < 0.01$);与 B 组比较,D,E 组 IP3R,RyR 蛋白表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Real-time PCR 检测发现,与 A 组比较,IP3R,RyR mRNA 表达均明显降低($P < 0.01$);与 B 组比较,D,E 组 IP3R,RyR mRNA 表达明显升高($P < 0.01$)。结论:舒胃汤可通过上调 FD 模型大鼠小肠 ICC 细胞内 IP3R,RyR 蛋白及 mRNA 表达,发挥对功能性消化不良疾病的治疗作用。

[关键词] 舒胃汤; 功能性消化不良(FD); Cajal 间质细胞(ICC); IP3 受体(IP3R); Ry 受体(RyR)

[中图分类号] R22;R24;R256.3;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0097-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2018030097

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1856.042.html>

[网络出版时间] 2017-11-02 18:56

Effect of Shuwei Decoction on Expression of IP3R and RyR in Gastric Antrum ICC Cells in Rats Model of Functional Dyspepsia

WANG Xiao-juan¹, YANG Song-wei², GUO Xuan^{2*}, JIANG Su-nan², XU Yin¹,
HUANG Lin-gui², LIU Le-ping², TIAN Shao-cong²

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;
2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shuwei decoction on expressions of IP3 receptor (inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor, IP3R), ryanodine receptor (RyR) protein and mRNA expression of intestinal cells of Cajal (ICC) of rats model of functional dyspepsia (FD), in order to explore the mechanism of Shuwei decoction in the treatment of FD in the aspect of calcium channel adjustment. **Method:** Totally 15 Wistar rats were randomly divided into the blank group, the model group and the Shuwei decoction group (30.68 g·kg⁻¹). The

[收稿日期] 20170820(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373577);国家自然科学基金青年基金项目(81403384);湖南省自然科学基金项目(2017JJ3248);湖南省教育厅优秀青年科研项目(15B151)

[第一作者] 王小娟,主任医师,硕士生导师,从事消化病的研究和治疗,Tel:0731-88458239,E-mail:1047610399@qq.com

[通信作者] *郭璇,硕士,讲师,从事中医内科脾胃病研究,Tel:0731-88458239,E-mail:158571042@qq.com

model group and the Shuwei decoction group were treated by the compound etiological modeling method for 21 day to replicate the FD model. After intragastric administration for 14 d, blood was collected to prepare drug-containing serum. Intestinal smooth muscle in subcultured ICC cells was taken from 2-3-week-old Wistar rats, and were divided into blank serum group (group A), model serum group (group B), Shuwei decoction 5% -containing serum group (group C), Shuwei decoction 10% -containing serum group (group D), and Shuwei decoction 15% -containing serum group (group E). When the cells were fused to 60% -80%, corresponding serums were added to each group and incubated for 24 h. IP3R and RyR were detected by Western blot, and IP3R and RyR mRNA expressions were detected by Real-time PCR. **Result:** Western blot results showed that compared with group A, the expressions of IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1, RyR-2, RyR-3B protein in group B were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with group B, the expressions of IP3R, RyR protein in group D and E were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Real-time PCR results showed that mRNA expressions of IP3R and RyR were significantly decreased compared with group A ($P < 0.01$). Compared with group B, mRNA expressions of IP3R and RyR in group D and E were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shuwei decoction has a therapeutic effect on functional dyspepsia by up-regulating IP3R, RyR and mRNA expression.

[**Key words**] Shuwei decoction; functional dyspepsia (FD); intestinal cells of Cajal (ICC); inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (IP3R); ryanodine receptor (RyR)

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 为临床常见的,具有持续性或反复发作、迁延性、复发性的慢性胃肠道疾病^[1]。胃肠动力障碍是 FD 主要的发病机制之一,由于胃肠平滑肌张力减弱,收缩功能降低,胃电节律紊乱,导致胃肠消化功能损伤,进而产生早饱、腹胀、嗝气、呕吐等症状,临床发现 50% 以上的 FD 患者存在胃肠动力障碍。Cajal 间质细胞 (ICC) 是分布于整个胃肠道,参与胃肠慢波活动的起搏细胞,同时与肠神经 (enteric nervous system, ENS), 平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 相互连接成网络状结构 (ENS-ICC-SMC), 共同发挥胃肠调控作用^[2-3]。研究发现 ICC 与多种胃肠疾病具有紧密联系, ICC 功能与结构异常可能是 FD 发病的重要机制之一,因而该研究方向已引起广泛关注^[4]。

临床上对 FD 以对症治疗,缓解症状为主要治疗方法^[5],常用促胃动力药物 (如吗丁啉、莫沙必利等) 对 FD 有一定疗效,但长期服可导致肝肾及胃肠功能损害等副作用^[6]。中医对胃肠道疾病的治疗具有丰富临床经验,舒胃汤是湖南中医药大学第一附属医院王小娟教授多年治疗 FD 的经验方,在健脾、疏肝、理气的基础上由逍遥散化裁而成,临床治疗已取得明显疗效^[7-8]。课题组前期研究发现,舒胃汤可通过改善 FD 模型大鼠 ENS-ICC-SMC 超微结构,上调 Cx43 蛋白及 P 物质含量以及增强胃排空、小肠推进率等途径改善胃肠功能,发挥治疗作用,但暂未从细胞层面进行有关 ICC 细胞 Ca^{2+} 通道调节

研究^[9-12]。因此本实验通过研究舒胃汤对 FD 模型大鼠小肠 ICC 细胞中 IP3 受体 (IP3R), Ry 受体 (RyR) 蛋白和 mRNA 表达的影响,从 ICC 细胞 Ca^{2+} 通道调节角度探讨舒胃汤治疗 FD 的作用与机制。

1 材料

1.1 动物 雌性 Wistar 大鼠 15 只, SPF 级, 体重 200 ~ 220 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SYXK (湘) 2013-0005。动物实验开展已取得湖南中医药大学动物伦理委员会批准。

1.2 药物 舒胃汤由柴胡、香附、白术、枳实、白芍、延胡索、旋覆花、川楝子、焦神曲组成, 饮片粉末由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供, 批号 20170104。

1.3 试剂 超敏 ECL 发光液 (美国 Thermo 公司, 批号 130716-45); SYB GREEN PCR Mix, trizol 试剂盒 (北京康为世纪公司, 批号分别为 01171/10136, 03877/10125); 兔抗 IP3R-1 抗体, IP3R-2 抗体, IP3R-3 抗体, RYR-1 抗体, RYR-2 抗体, RYR-3 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 Ab108517, Ab55981, Ab55981, Ab2868, Ab196355, Ab560000); 鼠抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (美国 Proteintech 公司, 批号 60008-1-IG); 兔抗 c-Kit 抗体 (美国 Santa cruz 公司, 批号 sc-5535); 逆转录试剂盒 (立陶宛 Fermentas 公司, 批号 00212265)。

1.4 仪器 DH-160I 型直热式二氧化碳培养箱 (上海三藤仪器公司); BA410E 型正置荧光显微镜 (厦门 Motic 公司); DYCZ-24EN 型电泳槽, DYCZ-40A

型转膜仪(北京六一生物科技有限公司); PIKO REAL 96型荧光定量RCP仪(美国Thermo公司); QL-901型旋涡混合器, TS-92型摇床(江苏海门其林贝尔公司); 164-5050型电泳仪(美国Bio-Rad公司); E-Gel Imager凝胶成像系统(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 按体重随机分组将15只Wistar大鼠分为3组, 即空白组、模型组、舒胃汤组, 每组5只。参照文献[13]方法, 除空白组之外, 其余2组大鼠按改良复合病因造模法(慢性束缚应激+饮食失节+过度疲劳+夹尾激怒)复制FD肝郁脾虚证模型, 即束缚3 h, (22±1)℃水中游泳10 min, 隔日禁食, 隔日足量给食, 隔日夹尾激怒30 min, 连续21 d。

2.2 药物制备 柴胡10 g, 香附8 g, 白术15 g, 枳实9 g, 白芍10 g, 延胡索8 g, 旋覆花8 g, 川楝子6 g, 焦神曲10 g, 于湖南中医药大学第一附属医院购买饮片粉末, 1 g粉末相当于生药量1 g, 加入蒸馏水稀释后于4℃冰箱中保存备用。

2.3 给药 造模结束后, 模型组与空白组大鼠给予等量蒸馏水, 根据前期实验研究结果^[4], 舒胃汤组大鼠以30.68 g·kg⁻¹剂量灌胃(相当于临床等效剂量1倍), 灌胃体积为10 mL·kg⁻¹, 每天灌胃1次, 连续灌胃14 d。

2.4 含药血清制备^[14] 末次给药2 h后, 腹主动脉取血, 室温静置30 min, 3 000 r·min⁻¹离心20 min, 收集血清, 56℃下灭活30 min, 过滤除菌。舒胃汤组大鼠血清以DMEM/F12培养基配制成5%, 10%, 15%含药血清培养液, 空白组、模型组血清以DMEM/F12培养基配置成15%血清培养液, 于-20℃冰箱中保存备用。

2.5 ICC原代细胞提取与含药血清处理 取2~3周Wistar乳鼠, 禁食后脱颈处死, 无菌条件下分离小肠, 置于解剖显微镜下锐性分离平滑肌层。将肌条剪碎至1~2 mm³大小, 加入消化液, 消化结束, 200目细胞筛网过滤, 收集滤液。1 000 r·min⁻¹离心5 min, 弃上清, 以DMEM/F12培养基重悬细胞, 置于等体积Ficoll400梯度密度液中, 1 500 r·min⁻¹离心10 min, 移液枪吸取液面交界处细胞层。以含20% FBS的DMEM/F12培养基重悬细胞, 将细胞以1×10⁹个/mL转入培养瓶, 于37℃ 5% CO₂ 孵箱培养。24 h后换液, 去除未贴壁细胞。再等量接种于培养瓶中, 分成5组, 每组设3个平行, 即空白血清

组, 模型血清组, 舒胃汤5%, 10%, 15%含药血清组, 每瓶细胞加入培养基4 mL。待细胞融合至60%~80%, 以5% FBS DMEM/F12培养基继续培养24 h, 以使细胞同步化。将已制备好的5组大鼠血清分别加入培养瓶中, 舒胃汤5%, 10%, 15%含药血清组先加入模型组大鼠血清, 24 h后再分别加入舒胃汤5%, 15%, 20%含药血清, 空白血清组与模型血清组则加入2次对应组血清, 继续培养24 h后进行检测。

2.6 ICC细胞c-Kit染色鉴定 取出细胞爬片, 磷酸盐缓冲液(PBS)润洗3次, 4%多聚甲醛固定30 min, PBS润洗3次, 0.5% triton-100通透30 min, PBS润洗3次。5% BSA封闭1 h, 一抗(c-Kit, 1:500)孵育4℃过夜, PBS润洗3次, 二抗(抗兔IgG标记荧光抗体)37℃孵育30 min, PBS润洗3次。DAPI工作液37℃孵育10 min, 90%甘油封片, 荧光显微镜观察。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测ICC细胞中IP3R, RyR蛋白表达 弃去细胞上清, 预冷PBS润洗3遍, 加入RIPA裂解液200 μL, 冰浴裂解30 min, 4℃下12 000 r·min⁻¹离心30 min, 取上清液, BCA法测定蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳, 再转入PVDF膜中, 脱脂奶粉室温封闭1 h。分别加入一抗(IP3R-1, 1:1 000; IP3R-2, 3, 1 mg·L⁻¹; RyR-1, 1:5 000; RyR-2, 1:500; RyR-3, 1 mg·L⁻¹; β-actin, 1:4 000)于4℃下孵育过夜。二抗(1:3 000)恒温孵育1 h。ECL发光液覆盖, 显影曝光处理。

2.8 实时荧光定量PCR法(Real-time PCR)检测ICC细胞中IP3R, RyR mRNA表达 以trizol试剂盒提取组织细胞总RNA, 将提取的总mRNA按SYBR法处理, 逆转录成cDNA, -80℃冰箱保存。反应体系: RNA Template, 6 μL; Primer Mix, 3 μL; RNase-Free Water, 4.5 μL; 5×RT Buffer, 6 μL; dNTP Mix (2.5 mmol·L⁻¹ Each), 6 μL; DTT (0.1 mol·L⁻¹), 3 μL; HiFiScript (200 U·μL⁻¹), 1.5 μL, 每个指标3孔, 每孔10 μL, 共30 μL。取少量RNA以1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶图像成像系统观察RNA纯度。经上海生工设计Real-time PCR引物序列, IP3R-1: 上游5'-GGTCAACTCCGTCAACTG-3', 下游5'-TCTTACCACATCACCTCCTT-3', 长度100 bp; IP3R-2: 上游5'-CATCGTCATCATCATCGT-3', 下游5'-GCAGGTTGTCTTGAGAAT-3', 长度109 bp; IP3R-3: 上游5'-GTTCTTCTTCATTGTCAT-3', 下游5'-GATTTCTCTTTCTTCTG-3', 长度103 bp; RyR-1: 上游5'-

CTCCTTCATTAACAAGTTC-3', 下游 5'-GTCTTCAG
TTCTTCATCA-3', 长度 105 bp; RyR-2: 上游 5'-
TCACAGCCAATCATCAAC-3', 下游 5'-CTTCCTCA
GACTACCA-3', 长度 106 bp; RyR-3: 上游 5'-
TTCGCTATCAACTTCATC-3', 下游 5'-TTCCTCATC
ATCCTCATT-3', 长度 111 bp; β -actin: 上游 5'-GG
TCAGGTCATCACTATCG-3', 下游 5'-TGCCACAGG
ATTCCATAC-3', 长度 88 bp。反应程序为 95 °C
10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 共 40 循环, 60 ~ 95 °C
分析溶解曲线。

2.9 统计学处理 所有数据用 Excel 软件处理,
SPSS 19.0 软件分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间计量
资料对比作方差齐性和正态性检验, 满足方差齐性,
以 one-way ANOVA 法进行方差分析, 不满足方差齐
性, 则以非参数法检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计
学意义。

3 结果

3.1 FD 模型大鼠小肠原代 ICC 细胞观察与鉴定
原代 ICC 细胞重悬接种至培养瓶, 培养 24 h 后开始
贴壁生长, 倒置显微镜发现细胞边缘清晰, 呈三角形、
梭形、星形或椭圆形, 细胞质较少, 细胞核较大, 有 2
至 4 个明显的短突起, 突起间相互连接。见图 1。

**3.2 FD 模型大鼠小肠原代 ICC 细胞免疫荧光染色
鉴定** c-Kit 荧光染色发现, ICC 细胞体呈现绿色荧
光, 提示 c-Kit 为阳性, DAPI 复染细胞核后可见细胞
核呈蓝色荧光。免疫表型分析提示 c-Kit 阳性细胞
即为 ICC 细胞, 而非平滑肌细胞。见图 2。

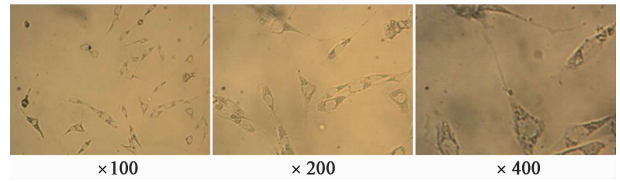


图 1 ICC 原代细胞显微形态
Fig. 1 Micro morphology of ICC primary cells

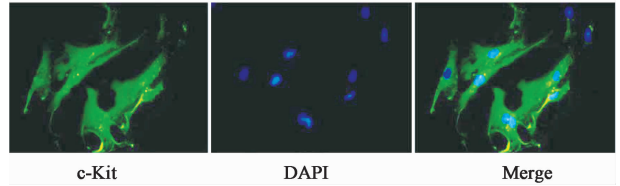


图 2 原代 ICC 细胞免疫荧光(c-Kit, $\times 400$)
Fig. 2 ICC primary cells(c-Kit, $\times 400$)

**3.3 舒胃汤对 FD 模型大鼠小肠 ICC 细胞中 IP3R,
RyR 蛋白表达的影响** 与空白血清组比较, 模型血
清组 ICC 细胞中 IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1,
RyR-2, RyR-3 水平明显降低 ($P < 0.01$), 提示模型
建立成功。与模型组比较, 舒胃汤 10% 含药血清组
大鼠 IP3R-3, RyR-2 和 RyR-3 表达明显升高 ($P <$
0.01), IP3R-1, IP3R-2 明显升高 ($P < 0.05$), 舒胃汤
15% 含药血清组 IP3R-1, RyR-2, RyR-3 表达明显升
高 ($P < 0.01$), RyR-1 表达明显升高 ($P < 0.05$)。见
表 1, 图 3。

**3.4 舒胃汤对 FD 模型 ICC 细胞中 IP3R, RyR
mRNA 表达的影响** 与空白血清组比较, 模型血清组
大鼠小肠 ICC 细胞中 IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1,

表 1 舒胃汤对 FD 模型 ICC 细胞中 IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1, RyR-2, RyR-3 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Shuwei decoction on protein IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1, RyR-2, RyR-3 in ICC of FD model rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IP3R-1/ β -actin	IP3R-2/ β -actin	IP3R-3/ β -actin	RyR-1/ β -actin	RyR-2/ β -actin	RyR-3/ β -actin
空白血清	0.505 \pm 0.095	0.462 \pm 0.043	0.406 \pm 0.007	0.432 \pm 0.133	0.478 \pm 0.006	0.510 \pm 0.111
模型血清	0.162 \pm 0.029 ²⁾	0.104 \pm 0.015 ²⁾	0.056 \pm 0.029 ²⁾	0.120 \pm 0.064 ²⁾	0.132 \pm 0.030 ²⁾	0.120 \pm 0.043
舒胃汤 5% 含药血清	0.151 \pm 0.023	0.119 \pm 0.015	0.080 \pm 0.037	0.178 \pm 0.069	0.146 \pm 0.060	0.140 \pm 0.102
舒胃汤 10% 含药血清	0.281 \pm 0.047 ³⁾	0.274 \pm 0.033 ³⁾	0.286 \pm 0.032 ⁴⁾	0.277 \pm 0.079	0.360 \pm 0.074 ⁴⁾	0.350 \pm 0.055 ⁴⁾
舒胃汤 15% 含药血清	0.425 \pm 0.083 ⁴⁾	0.399 \pm 0.097	0.400 \pm 0.114	0.310 \pm 0.093 ³⁾	0.419 \pm 0.059 ⁴⁾	0.410 \pm 0.097 ⁴⁾

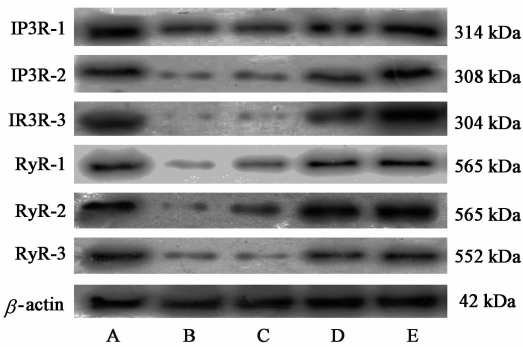
注: 与空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

RyR-2, RyR-3 水平均明显降低 ($P < 0.01$), 提示模型
建立成功。与模型血清组比较, 舒胃汤 10%, 15% 含
药血清组大鼠 IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1, RyR-2,
RyR-3 表达均明显升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

4 讨论

肌间 ICC 细胞 (myenteric ICC, ICC-MY) 存在于

纵行肌和环形肌之间, 是一种重要的起搏细胞, 能自
动产生节律性的去极化, 从而产生慢波^[15-16]。ICC
细胞产生的自发性内向电流被称为起搏电流^[17-18]。
其自动产生去极化的关键结构—“起搏单位”, 是由
Ryanodine 敏感的钙库、三磷酸肌醇 (inositol 1, 4, 5-
triphosphate, IP3) 和钙敏感的通道及线粒体 4 个



A. 空白血清组; B. 模型血清组; C. 舒胃汤 5% 含药血清组; D. 舒胃汤 10% 含药血清组; E. 舒胃汤 15% 含药血清组

图 3 舒胃汤对 FD 模型 ICC 细胞 IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1, RyR-2, RyR-3 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Shuwei decoction on protein IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1, RyR-2, RyR-3 in ICC of FD model rats

表 2 舒胃汤对 FD 模型大鼠小肠 ICC 细胞中 IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1, RyR-2, RyR-3 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Shuwei decoction on IP3R-1, IP3R-2, IP3R-3, RyR-1, RyR-2, RyR-3 mRNA in ICC of FD model rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	IP3R-1	IP3R-2	IP3R-3	RyR-1	RyR-2	RyR-3
空白血清	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型血清	0.157 ± 0.006 ²⁾	0.133 ± 0.006 ²⁾	0.173 ± 0.006 ²⁾	0.177 ± 0.006 ²⁾	0.137 ± 0.006 ²⁾	0.150 ± 0.000 ²⁾
舒胃汤 5% 含药血清	0.153 ± 0.006	0.137 ± 0.006	0.167 ± 0.006	0.157 ± 0.006	0.143 ± 0.006	0.153 ± 0.006
舒胃汤 10% 含药血清	0.583 ± 0.015 ⁴⁾	0.527 ± 0.006 ⁴⁾	0.363 ± 0.006 ⁴⁾	0.483 ± 0.012 ⁴⁾	0.310 ± 0.000 ⁴⁾	0.330 ± 0.000 ⁴⁾
舒胃汤 15% 含药血清	0.830 ± 0.010 ⁴⁾	0.690 ± 0.017 ⁴⁾	0.850 ± 0.017 ⁴⁾	0.780 ± 0.000 ⁴⁾	0.690 ± 0.010 ⁴⁾	0.627 ± 0.006 ⁴⁾

离子活化离子通道^[27]。而在 ICC 钙库细胞器膜上的 IP3R 和 RyR, 是其重要的受体依赖型 Ca²⁺ 通道。其中 IP3R 引发 Ca²⁺ 周期性的释放, 调节 Ca²⁺ 的振荡规律^[28-29], 都与 ICC 自发性的节律化有密切联系^[30-31]。有研究表明, ICC-MY 产生的慢波起搏作用和细胞内外 Ca²⁺ 信号密切相关^[32-33]。当细胞 Ca²⁺ 信号受损时, ICC-MY 的起搏功能受到抑制, 从而导致出现胃肠道的动力障碍^[34]。ICC 能介导肠神经信号, 使慢波的频率受到影响, 并能通过电偶联与其相近的平滑肌细胞间的缝隙连接传导抑制性的连接后电位或兴奋性的连接后电位^[35-36], 从而使之超极化或是去极化, 进而能对胃肠平滑肌的收缩频率产生影响, 最终具有调节平滑肌推进活动中传播方向与速度的功能^[37-38]。

中医对 FD 的辨证分型目前尚未统一, 其病机古今医家各有论述, 而脾胃气机升降失调是 FD 基本病机, 因此疏肝健脾法为治疗 FD 的基本方法。舒胃汤方中柴胡辛行苦泄, 疏肝解郁, 条达肝气, 白术甘温健脾, 益气补虚, 两者共为君药, 以疏木郁之

部分组成^[19-20]。其中 IP3 受体 (inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor, IP3R) 和 Ryanodine 受体 (ryanodine receptor, RyR) 的激活首先发生, 促使对 IP3, RyR 敏感的钙库释放出钙离子^[21-22], 再引发线粒体进行钙的摄取, 使得细胞内部分区域内 Ca²⁺ 浓度减少, 最终导致低钙敏感通道开放、离子流动以及电位改变, 由此循环即可形成有规律的电位变化^[23]。此外 ICC 起搏电位的产生和细胞内 Ca²⁺ 的浓度、电压依赖性钙通道以及钙活化氯通道密切相关^[24-25]。细胞内 Ca²⁺ 浓度的上升与 IP3 水平的升高基本成正相关, 而 IP3 调节钙离子的释放需与其受体 IP3R 结合后才能引发^[26]。

Ca²⁺ 浓度的调节主要是由钙库控制, 动作电位的形成则是通过细胞内 Ca²⁺ 的释放, 从而激活钙

不达, 补土虚之不运。香附、延胡索理气解郁, 行气止痛, 白芍养血柔肝, 令肝气条达无犯土虚, 枳实苦降辛散, 破气消痞, 诸药合用共为臣药。旋覆花行气降气, 有较好的降逆止呕作用, 善治噎气、呕吐等。川楝子舒肝, 行气止痛, 焦神曲消积化滞共为佐使药。全方运用扶土抑木之法, 使肝郁得解, 脾弱得健, 则肝郁脾虚诸症得愈。

本实验通过血清药理学的方法^[39], 观察 FD 肝郁脾虚证大鼠模型血清及舒胃汤含药血清对体外培养的胃肠道 ICC 细胞内 IP3R, RyR 蛋白及 mRNA 表达的影响。研究发现与空白血清组比较, 模型血清组的 IP3R, RyR mRNA 表达均明显降低, 即提示模型血清对正常 ICC 细胞有明显影响, 说明体外细胞模型复制成功。而经含药血清干预后, 除 5% 含药血清组无明显增加外, 10%, 15% 含药血清组中 IP3R, RyR 以及 mRNA 表达均明显升高, 说明 ICC 细胞内 Ca²⁺ 浓度也有明显提升, 能起到介导细胞信号的传递作用, 从而促进胃肠平滑肌的运动, 以起到治疗 FD 胃肠动力不足的作用。

[参考文献]

- [1] Kim S E, Park H K, Kim N, et al. Prevalence and risk factors of functional dyspepsia: a nationwide multicenter prospective study in Korea [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2014, 48(2):12-18.
- [2] Ward S M, Sanders K M. Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuro effector transmission in the gastrointestinal tract [J]. *J Physiol*, 2006, 576(3): 675-682.
- [3] Sanders K M, Koh S D, Ward S M. Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68(68):307-308.
- [4] 郭璇, 刘芸, 王小娟, 等. 舒胃汤对FD大鼠小肠深部肌间神经丛胆碱能神经-Cajal间质细胞-平滑肌网络结构损伤的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(4):454-459.
- [5] Okumura T, Tanno S, Ohhira M, et al. Prevalence of functional dyspepsia in an outpatient clinic with primary care physicians in Japan [J]. *J Gastroenterol*, 2010, 45(2):187-194.
- [6] 张声生, 杨静. 中医药治疗功能性胃肠病大有可为 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(33):3457-3461.
- [7] 谭华梁, 王小娟. 舒胃汤治疗肝胃不和型功能性消化不良30例临床观察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(9):93-94.
- [8] 李永静, 郭璇, 王小娟, 等. 舒胃汤治疗功能性消化不良肝胃不和型临床研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2013, 33(7):65-68.
- [9] 周恒, 郭璇, 王小娟, 等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃肠动力、血清干细胞因子及Cajal间质细胞修复与再生的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(3): 863-867.
- [10] 王小娟, 周恒, 郭璇, 等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃肠动力及ENS-ICC-SMC网络超微结构的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(24):134-139.
- [11] 郭璇, 谭华梁, 王小娟, 等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠Cx43蛋白的分布及Cajal间质细胞的修复与再生的影响 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2014, 22(11):652-657.
- [12] 徐寅, 郭璇, 弭艳红, 等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠P物质与胃窦Cajal间质细胞的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(6):206-209.
- [13] 郭海军. 功能性消化不良的动物模型研究 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2001, 9(3):141-142.
- [14] SANG D K, Ward S M, Sanders K M. Ionic conductances regulating the excitability of colonic smooth muscles [J]. *Neurogastroent Motil*, 2012, 24(8): 705-718.
- [15] 黄丽萍, 陈耀辉, 吴素芬, 等. 当归补血汤含药血清对血虚小鼠骨髓造血功能的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(2):18-20.
- [16] Dickens E J, Edwards F R, Hirst G D. Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation of slow waves in mouse stomach [J]. *J Physiol*, 2001, 531(3):827-833.
- [17] 刘宁, 李平, 张建英, 等. Cajal间质细胞研究进展 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2011, 19(6): 418-419.
- [18] 周英豪, 吉敏, 李成林. Cajal间质细胞与胃肠道疾病 [J]. *医学综述*, 2012, 18(13):1998-2001.
- [19] 王佐好, 许文变. 胃肠平滑肌起搏功能研究的最新动态 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(4): 319-323.
- [20] Sanders K M, Koh S D, Ward S M. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68(68):307-343.
- [21] ZHANG R X, WANG X Y, CHEN D, et al. Role of interstitial cells of Cajal in the generation and modulation of motor activity induced by cholinergic neurotransmission in the stomach [J]. *Neurogastroent Motil*, 2011, 23(9):e356-e371.
- [22] ZHANG Y, Carmichael S A, WANG X Y, et al. Neurotransmission in lower esophageal sphincter of W/Wv mutant mice [J]. *Am J Physiol-Gastr L*, 2010, 298(1):G14-24.
- [23] 孙洪兆, 赵术珍. Ca^{2+} 对离体骨骼肌收缩性的影响 [J]. *齐鲁师范学院学报*, 2010, 25(1):57-58.
- [24] Lowie B J, WANG X Y, While E J, et al. On the origin of rhythmic calcium transients in the ICC-MP of the mouse small intestine [J]. *Am J Physiol-Gastr L*, 2011, 301(5):G835-845.
- [25] Hashitani H, Suzuki H. Properties of spontaneous Ca^{2+} transients recorded from interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra in situ [J]. *J Physiol*, 2010, 583(2):505-519.
- [26] 黄芳, 曾晓荣, 杨艳, 等. 平滑肌细胞内的钙释放通道:IP3R [J]. *医学综述*, 2007, 13(2):87-89.
- [27] HUANG X, XU W X. The pacemaker functions of visceral interstitial cells of Cajal [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 62(5):387-397.
- [28] Kito Y, Suzuki H. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials [J]. *J Smooth Muscle Res*, 2003, 39(5):163-173.
- [29] Aoyama M, Yamada A, WANG J, et al. Requirement of ryanodine receptors for pacemaker Ca^{2+} activity in ICC and HEK293 cells [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(13):2813-2825.
- [30] Bayguinov P O, Hennig G W, Smith T K. Ca^{2+} imaging

- of activity in ICC-MY during local mucosal reflexes and the colonic migrating motor complex in the murine large intestine[J]. *J Physiol*, 2010, 588(22):4453-4474.
- [31] Jain D, Moussa K, Tandon M, et al. Role of interstitial cells of cajal in motility disorders of the bowel[J]. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98(3):618-624.
- [32] WANG J, MA M, Locovei S, et al. Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: size matters[J]. *Am J Physiol-Cell Ph*, 2007, 293(3):1112-1119.
- [33] Kostin S. Zonula occludens-1 and connexin 43 expression in the failing human heart[J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(4):892-895.
- [34] Goto K, Matsuoka S, Noma A. Two types of spontaneous depolarizations in the interstitial cells freshly prepared from the murine small intestine[J]. *J Physiol*, 2004, 559(2):411-422.
- [35] Sergeant G P, Mchale L J G, Thornbury K D. Activation of the cGMP/PKG pathway inhibits electrical activity in rabbit urethral interstitial cells of Cajal by reducing the spatial spread of Ca^{2+} waves[J]. *J Physiol*, 2006, 574(1):167-181.
- [36] ZHANG H, XU X, WANG Z, et al. Correlation between gastric myoelectrical activity recorded by multi-channel electrogastrography and gastric emptying in patients with functional dyspepsia [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2006, 41(7):797-804.
- [37] Nakajima Y, Mochida S, Okawa K, et al. Ca^{2+} -dependent release of Munc18-1 from presynaptic mGluRs in short-term facilitation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(43):18385-18389.
- [38] Johnston L, Sergeant G P, Hollywood M A, et al. Calcium oscillations in interstitial cells of the rabbit urethra[J]. *J Physiol*, 2005, 565(2):449-461.
- [39] 阴郝宏,谭余庆,霍海如,等. 中药血清药理学研究方法及其应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 1997, 3(6): 41-43.

[责任编辑 邹晓翠]