

四君子汤对脾虚证胃肠动力障碍大鼠胃平滑肌 CaM-MLCK 信号通路的机制探讨

钟子劭¹, 张海燕², 张望², 何桂花¹, 叶振昊², 王静², 黄穗平^{2*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006; 2. 广东省中医院, 广州 510120)

[摘要] **目的:**通过实验探讨脾虚证胃肠动力障碍(gastrointestinal dysfunction, GID)的发病及四君子汤干预的作用机制。**方法:**将36只SD大鼠随机分为空白组、模型组、中药组和西药组,运用碘乙酰胺灌服+小平台站立+饥饿失常法塑造脾虚证GID动物模型,随后给予中药组四君子汤 $6.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和西药莫沙必利 $0.45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,通过胃排空测定、蛋白免疫印迹法(Western blot),免疫组化法,实时荧光定量PCR法(Real-time PCR)及 Mg^{2+} -ATPase活性检测对各组大鼠胃排空率及钙调素(CaM)-肌球蛋白轻链激酶(MLCK)通路改变进行检测。**结果:**模型组大鼠胃排空率较正常大鼠低($P < 0.01$),平滑肌CaM, MLCK蛋白表达量,MLCK mRNA及MLCK活性升高($P < 0.05, P < 0.01$);四君子汤干预后大鼠胃排空率升高($P < 0.05$),平滑肌CaM, MLCK蛋白, MLCK mRNA表达量及MLCK活性升高($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**脾虚证GID大鼠存在CaM-MLCK信号通路改变,四君子汤可能通过调节该信号通路舒缓胃平滑肌高张力而间接促进胃肠动力。

[关键词] 脾虚证; 胃肠动力障碍; 肌球蛋白轻链激酶; 四君子汤

[中图分类号] R285.5; R256.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0095-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018050095

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1526.034.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 15:26

Effect of Si Junzitang on CaM-MLCK Pathway in Rats with Spleen Deficiency and Gastrointestinal Motility Disorder

ZHONG Zi-shao¹, ZHANG Hai-yan², ZHANG Wang², HE Gui-hua¹,

YE Zhen-hao², WANG Jing², HUANG Sui-ping^{2*}

(1. The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pathogenesis of gastrointestinal dysfunction (GID) with spleen deficiency syndrome and the intervention effect of Si Junzitang. **Method:** Totally 36 rats were randomly divided into control group, model group, Si Junzitang group and mosapride group. Iodoacetamide gavage + small platform standing + irregular feeding were used to establish the rat model with spleen deficiency and gastrointestinal dysfunction. After modeling, Si Junzitang ($6.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and mosapride ($0.45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) were given to intervention groups by gavage; subsequently, gastric emptying detection, Western blot, immunohistochemical staining, Real-time PCR and Mg^{2+} -ATPase activity detection were performed to detect the changes in Calmodulin (CaM)-myosin light chain kinase (MLCK) pathway. **Result:** Compared with normal group, weight and gastric emptying rate were lower ($P < 0.01$), and CaM and MLCK protein and mRNA expressions and Mg^{2+} -ATPase

[收稿日期] 20170831(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373564,81302881);广东省自然科学基金项目(2015A030310389)

[第一作者] 钟子劭,在读博士,从事中西医结合诊治消化系统疾病研究, Tel:020-81887233, E-mail: zhongzishao@qq.com

[通信作者] *黄穗平,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事中西医结合诊治消化系统疾病研究, Tel:020-81887233, E-mail: gzdoctorhsp@126.com

activity of gastric antral smooth muscle were higher in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, weight and gastric emptying rate were higher ($P < 0.05$), and CaM and MLCK protein and mRNA expressions and Mg^{2+} -ATPase activity were lower in Si Junzitang group and mosapride group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Rats with spleen deficiency and gastrointestinal dysfunction show CaM-MLCK pathway disorder. Si Junzitang may indirectly improve gastric motility by regulating CaM-MLCK pathway.

[Key words] spleen deficiency syndrome; gastrointestinal dysfunction; myosin light chain kinase; Si Junzitang

脾虚证是中医学的重要证型,传统理论认为脾主运化,是后天之本,气血生化之源,现代研究发现脾虚证与消化、免疫、内分泌、代谢、神经等系统的改变有关^[1-2]。而在消化系统方面,脾虚证的典型表现,如胃纳差、脘腹胀满、恶心、大便溏薄,均与消化系统,尤其是现代医学所认为的胃肠动力障碍(GID)密切相关。四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》,是中医健脾法的代表方,临床上多使用该方加减治疗脾虚证相关疾病,目前已有不少针对该方作用机制的研究^[1-4],但从胃肠平滑肌分子生物学角度研究脾虚证改变以及四君子汤干预机制的研究仍然较少^[5-6]。因此,笔者以调控胃肠平滑肌收缩的经典信号通路——钙调素(CaM)-肌球蛋白轻链激酶(MLCK)信号通路为切入点,假设脾虚证GID模型大鼠存在CaM-MLCK信号通路改变,并运用中医健脾法代表方四君子汤和西医经典促胃动力药莫沙必利对脾虚GID大鼠进行干预,探讨脾虚证GID的发病机制以及健脾中药的作用机制。

1 材料

1.1 试剂 RIPALysis Buffer(美国CST公司,批号0014); 预染蛋白 marker, Pierce BCA Assay Kit(Thermo公司,批号分别为00420903, H220533); Immobilon Western 化学发光底物, PVDF膜(美国Merck Millipore公司,批号分别为1623502, K5BA2255N); Anti-Calmodulin, Anti-Myosin light chain kinase 单克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab45689, ab76092); Anti- β -肌动蛋白(β -actin)(美国CST公司,批号4970); SV 二步法免疫组化试剂盒(博士德公司,批号12H01A); TriPure 核酸提取试剂, Transcriptor First Strand cDNA 合成试剂盒, FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)(瑞士罗氏公司,批号分别为93996120, 10274023, 18570700); 牛钙调素蛋白、猪肌球蛋白(美国Sigma公司,批号分别为SLBQ9006V, SLBK2472V); EnzChek 有机磷检测试剂盒(美国Thermo公司,批号1795389); 无糖型芝麻糊(南方黑芝麻集团公司)。

1.2 仪器 Mini-PROTEAN® Tetra 型电泳槽, Mini Trans-Blot® 型转印槽, ChemiDoc™ 型成像系统(美国Bio-Rad公司); BX53 型正置显微镜(德国Leica公司); Viia7 型荧光定量PCR仪(美国ABI公司); VictorX5 型多功能酶标仪(美国Perkin Elmer公司)。

1.3 动物 出生3d的SPF级雄性SD幼鼠,合格证号SCXK(粤)2013-0002,体质量3~8g,购于广东省实验动物中心,实验方案经广东省中医院伦理委员会批准,伦理编号2014044。

2 方法

2.1 造模 参考国外最新的GID模型造模方法^[7],于幼鼠10~16d时给予含碘乙酰胺的蔗糖溶液0.2mL/只灌胃,每日1次。平衡饲养,待上述黏膜损伤幼鼠至8周龄后进行中医脾虚证造模。脾虚证造模采用水环境小平台站立法联合饥饿失常法^[8-9],每日18:00至次日8:00将8周龄大鼠置于直径3cm,高15cm的圆柱形小平台上站立,平台下有深约10cm的水面,水温约25℃,隔日给予禁食,进食日足量喂食,造模时间14d。

2.2 分组与给药 将36只经过造模大鼠分成3组,模型组不给药,中药组给予中药汤剂四君子汤干预,西药组给予莫沙必利溶液干预。四君子汤组成参考2015年版《中国药典》,党参20g,白术(炒)20g,茯苓20g,甘草(炙)10g(江阴天江药业有限公司生产的中药颗粒剂,批号分别为1603039, 1602019, 1602028, 1601098); 枸橼酸莫沙必利片(快力,鲁南贝特制药公司,批号25150108)。大鼠给药剂量(每200g体质量)=人用药剂量 \times 0.018,则四君子汤给药剂量为6.3g \cdot kg⁻¹,莫沙必利给药剂量为0.45mg \cdot kg⁻¹,每日灌胃给药1次,共14d。选取9只未经造模的正常大鼠作为空白组。

2.3 胃排空检测 大鼠在试验前禁食18h。将芝麻糊兑温水配制成质量浓度为0.75g \cdot mL⁻¹的半固体,按0.01mL \cdot g⁻¹体质量给每只大鼠灌胃,记录灌入的半固体量V,30min后麻醉处死,迅速取出大鼠的胃。称取充满半固体的胃质量W₁,然后将胃沿大

弯侧剪开,将半固体洗净后再次称取胃质量 W_2 ,胃排空率 = $(W_1 - W_2) \cdot V^{-1}$ 。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测胃窦平滑肌组织 CaM, MLCK 的表达 处死大鼠后立刻取胃窦,将平滑肌层剥出后取约 100 mg 置于含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液 1 mL 中,匀浆后离心取蛋白上清液用于 Western blot 检测。使用 PierceBCA 试剂盒进行蛋白定量,按每样品总蛋白 20 μg 量加入 10% SDS-PAGE 凝胶中电泳,然后转印至 PVDF 膜上进行免疫检测。使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h,一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日加入二抗 (1:3 000) 孵育 1 h,使用 ECL 发光液在化学发光成像仪中显影成像,使用 ImageJ 1.51 软件测量条带灰度值。

2.5 免疫组化法检测胃窦 MLCK 表达 处死大鼠后立刻取胃窦,置于 4% 多聚甲醛缓冲液中固定,脱水、包埋、制成石蜡切片。检测时使用二甲苯,95%,90%,75% 乙醇梯度脱蜡,置于 3% H_2O_2 10 min 灭活内源性酶,枸橼酸缓冲液中抗原修复,随后使用博士德 SV 二步法试剂盒,3% BSA 封闭,滴加一抗 (1:200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,使用 DAB 显色,苏木素复染,封片观察。

2.6 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测胃窦平滑肌组织 MLCK mRNA 的表达 处死大鼠后立刻取胃窦,将平滑肌层剥出后置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。检测时使用 trizol 法提取 RNA,使用罗氏 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒进行反转录,使用罗氏 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 试剂盒进行荧光定量 PCR,PCR 程序设置为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min (酶激活),95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s (变性),60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (退火、延伸) 共 40 循环。使用的引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

引物	序列(5'-3')	长度/bp
MLCK	上游 ATCCAGTTCCTCGAGGACCAGA	138
	下游 CACCCTGATGTTCTCGCTCTCC	
β -actin	上游 GCGCAAGTACTCTGTGTGGA	160
	下游 AAGGGTGTAAAACGCAGCTCA	

2.7 胃窦平滑肌组织 Mg^{2+} -ATP 酶活性检测 肌球蛋白被 MLCK 激活后, Mg^{2+} -ATP 酶能水解 ATP,此过程产生有机磷,可通过 Mg^{2+} -ATP 酶水解 ATP

过程中产生的有机磷含量变化,测定 Mg^{2+} -ATP 酶活性。将 2.4 项中获取的蛋白上清液,使用 Amicon Ultra 超滤离心管将蛋白溶液置换成 Tris-HCl pH 7.5。使用 EnzChek 有机磷检测试剂盒,在 96 孔板配置 200 μL 体系为 DTT 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgCl_2 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl 60 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, tris 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, ATP 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 肌球蛋白 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 钙调素 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 20 \times Reaction buffer 10 μL , MESG 40 μL , PNP 2 μL , 组织总蛋白 20 μg ,同时使用有机磷对照品按说明书配置标准曲线,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,使用酶标仪检测反应前后 360 nm 吸光度 A ,根据标准曲线计算反应前后有机磷含量变化。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 19.0 进行统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据满足正态性及方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析;不满足正态性或方差齐性时,组间比较采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠体质量影响 造模后脾虚证 GID 模型大鼠体质量明显低于正常组大鼠 ($P < 0.01$)。药物干预后,四君子汤组大鼠平均体质量较模型组升高,但差异无统计学意义,莫沙必利组大鼠体质量则与模型组无明显区别。见表 2。

表 2 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠体质量影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Effect of Si Junzitang on weight in GID rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	治疗前	治疗后
正常	-	365.44 \pm 15.396	457.44 \pm 37.703
模型	-	256.22 \pm 16.415 ²⁾	354.00 \pm 17.937
四君子汤	6.3	260.78 \pm 18.647	358.44 \pm 23.298
莫沙必利	4.5×10^{-4}	266.78 \pm 10.826	333.33 \pm 16.210

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 6 同)。

3.2 四君子汤与莫沙必利对脾虚证 GID 大鼠胃排空率影响 模型组大鼠胃排空率较正常组低 ($P < 0.01$);四君子汤和莫沙必利干预后,与模型组比较,两组大鼠胃排空率均升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.3 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠胃窦平滑肌 MLCK, CaM 蛋白表达量的影响 与正常组比较,脾虚证 GID 模型大鼠胃窦平滑肌 MLCK, CaM 表达量升高;与模型组比较,四君子汤和莫沙必利干预后 MLCK, CaM 水平均下降;模型组与正常组、四君子

表 3 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠胃排空率影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Effect of Si Junzitang on gastric emptying rate in GID rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n=9$)

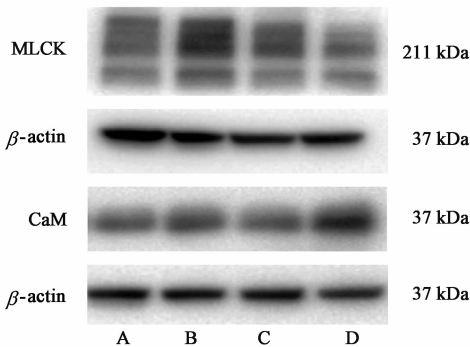
组别	剂量/g·kg ⁻¹	胃排空率/%
正常	-	0.63 ± 0.102
模型	-	0.37 ± 0.078 ²⁾
四君子汤	6.3	0.50 ± 0.074 ³⁾
莫沙必利	4.5 × 10 ⁻⁴	0.50 ± 0.094 ³⁾

汤组间 MLCK 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 CaM 差异无统计学意义。见表 4, 图 1。

表 4 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠胃窦平滑肌 MLCK, CaM 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Si Junzitang on MLCK and CaM expression in gastric antrum in GID rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MLCK/ β -actin	CaM/ β -actin
正常	-	0.56 ± 0.203	0.97 ± 0.22
模型	-	1.13 ± 0.589 ¹⁾	1.57 ± 0.80
四君子汤	6.3	0.64 ± 0.234 ³⁾	1.03 ± 0.29
莫沙必利	4.5 × 10 ⁻⁴	0.71 ± 0.442	1.39 ± 0.65



A. 正常组; B. 模型组; C. 四君子汤组; D. 莫沙必利组 (图 2 同)

图 1 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠胃窦平滑肌 MLCK 蛋白表达影响

Fig. 1 Effect of Si Junzitang on MLCK and CaM protein expression in gastric antrum in GID rats with spleen deficiency

3.4 四君子汤与莫沙必利对脾虚证 GID 大鼠胃窦平滑肌 MLCK 免疫组化表达的影响 MLCK 蛋白在胃窦肌层细胞浆中表达, 脾虚证模型大鼠平滑肌组织 MLCK 表达量较正常组高, 经过四君子汤和莫沙必利干预后, MLCK 表达量较模型组减少。见图 2。

3.5 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠胃窦平滑肌组织 MLCK mRNA 表达量影响 脾虚证模型大鼠胃窦平滑肌组织中 MLCK mRNA 表达量较正常大鼠升高 ($P < 0.01$)。四君子汤和莫沙必利干预后, 与模型组比较大鼠胃窦平滑肌组织 MLCK mRNA 表达量降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

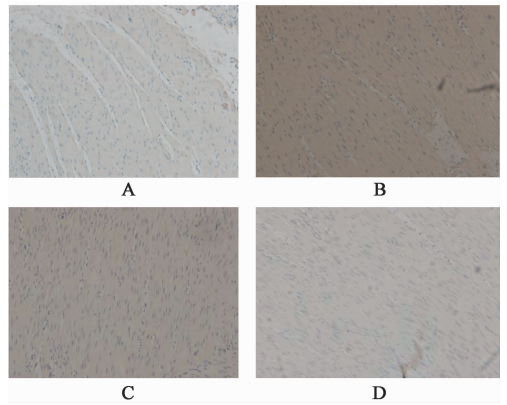


图 2 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠胃窦平滑肌 MLCK 表达影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of Si Junzitang on MLCK expression in gastric antrum in GID rats with spleen deficiency (IHC, ×200)

表 5 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠胃窦平滑肌组织 MLCK mRNA 表达量影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Si Junzitang on MLCK mRNA expression in gastric antrum in GID rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MLCK
正常	-	1.13 ± 0.370
模型	-	2.42 ± 0.769 ²⁾
四君子汤	6.3	1.42 ± 0.455 ⁴⁾
莫沙必利	4.5 × 10 ⁻⁴	1.37 ± 0.424 ⁴⁾

3.6 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠胃窦平滑肌组织肌球蛋白 Mg²⁺-ATP 酶活性影响 与正常组比较, 脾虚证模型大鼠胃窦平滑肌组织中肌球蛋白 Mg²⁺-ATP 酶活性升高 ($P < 0.01$)。四君子汤和莫沙必利干预后, 与模型组比较大鼠胃窦平滑肌组织中肌球蛋白 Mg²⁺-ATP 酶活性降低 ($P < 0.01$)。见表 6。

表 6 四君子汤对脾虚证 GID 大鼠胃窦平滑肌组织肌球蛋白 Mg²⁺-ATP 酶活性影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Si Junzitang on Mg²⁺-ATPase activity in gastric antrum in GID rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	有机磷生成量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	171.26 ± 1.587
模型	-	166.00 ± 2.844 ²⁾
四君子汤	6.3	161.35 ± 2.519 ⁴⁾
莫沙必利	0.45 × 10 ⁻⁴	162.15 ± 0.870 ⁴⁾

4 讨论

本实验参考前期研究方法^[7-9], 在大鼠幼年期使用碘乙酰胺灌服, 造成幼年期胃肠黏膜的损伤, 能使大鼠在成年后出现胃排空延迟以及内脏高敏感,

同时也对应中医脾虚证“慢性长期”的特点;待大鼠成年后则使用小平台站立法模拟劳倦过度,隔日禁食模拟饥饱失常的中医病因,塑造脾虚证的疾病状态。该模型经过笔者实验的验证,能较好模拟中医脾虚证以及现代医学 GID 的疾病状态。

MLCK 是平滑肌收缩的关键蛋白。当平滑肌细胞收到电信号刺激,内质网和胞外钙离子向胞浆释放,胞内钙离子浓度升高,并与 CaM 形成 Ca^{2+} 形成复合物,进而激活 MLCK,MLCK 进一步使肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化,使肌球蛋白与肌动蛋白产生相对滑动,从而使平滑肌细胞产生收缩。这条经典通路已被众多实验所验证^[10-12]。因此,笔者假设脾虚证 GID 模型大鼠平滑肌存在 CaM-MLCK 信号通路改变,四君子汤能通过 CaM-MLCK 通路增强模型大鼠胃窦平滑肌收缩。

实验结果表明模型大鼠胃排空能力减弱,但平滑肌组织 CaM,MLCK 表达量升高,肌球蛋白 Mg^{2+} -ATPase 活性增高。使用四君子汤和莫沙必利对模型大鼠进行干预后,两组大鼠胃排空能力均较模型组增强,但平滑肌组织 CaM,MLCK 表达量和 Mg^{2+} -ATPase 活性均下降。这与一些运用四君子汤加味的实验研究结果不一致^[4-5]。笔者推测有如下几个原因,①胃平滑肌在胞内 Ca^{2+} 浓度下降时,仍会维持一定张力,有研究表明 MLCK 存在非激酶作用,能在缺乏 Ca^{2+} /CaM 复合物激活的情况下,与肌球蛋白头部作用使 ATP 酶激活。梁明丽^[13]的体外实验研究表明,随着 MLCK 浓度的增加,与肌球蛋白结合的肌动蛋白肌丝数目增加,所结合的肌丝的长度也增加。如果 MLCK 浓度过度升高,静息状态下粗肌丝与细肌丝结合长度过长,则可能使胃平滑肌长期处于高张力状态,当平滑肌再受到外界电信号或者化学信号的时候,能产生的收缩力将减弱。②《珍珠囊》云:“甘主缓……甘能缓急调中”,四君子汤中四味药均属甘味,能通过缓急调中达到补脾健脾的效果,这与实验中发现的四君子汤能通过降低平滑肌组织内 CaM,MLCK 表达量,减轻平滑肌静息状态下的高张力状态,间接提高胃排空吻合。③部分文献中使用的健脾干预方均在四君子汤基础上加入了运脾、理气、消食等药物,并非单纯的四君子汤,亦有实验表明运脾的代表药物苍术能使胃窦平滑肌 MLCK 表达量升高^[14]。因此笔者推测,健脾与运脾、理气药物对平滑肌的分子机制存在不同。

综上所述,脾虚证 GID 大鼠存在 CaM-MLCK 信号通路改变,四君子汤能使该信号通路恢复至基本

正常水平,因此笔者推测该信号通路改变可能是脾虚证 GID 的发病机制之一,四君子汤能通过调节该信号通路起到治疗作用。

[参考文献]

- [1] 秦建设,吕爱平. 脾虚证免疫与分子生物学方面的最新研究进展[J]. 中华中医药学刊,2007,25(2):328-329.
- [2] 何劲,周莉,陈家旭,等. 中医脾虚证实质研究进展[J]. 吉林中医药,2015,35(1):103-107.
- [3] 吴艳梅,马贤德,韩晓伟,等. 四君子汤治疗脾虚证实验研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(10):67-70.
- [4] 朱满堂,刘秀娣. 用加味四君子汤治疗脾虚型功能性消化不良的效果探讨[J]. 当代医药论丛,2015,13(17):42-43.
- [5] 陈斌,蔡光先,戴飞跃,等. 开胃进食汤超微颗粒对胃肠平滑肌细胞 MLCK 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2010,30(5):9-11.
- [6] 张望,张海燕,黄绍刚,等. 四君子汤对脾虚大鼠胃肠平滑肌细胞肌球蛋白轻链激酶含量的影响[J]. 广州中医药大学学报,2014,31(3):414-417.
- [7] LIU L S, Winston J H, Shenoy M M, et al. A rat model of chronic gastric sensorimotor dysfunction resulting from transient neonatal gastric irritation[J]. Gastroenterology,2008,134(7):2070-2079.
- [8] 刘晶,李峰,唐旭东,等. 功能性消化不良脾虚证动物模型的制作及评价[J]. 环球中医药,2015,8(6):701-705.
- [9] 杨茜,李峰,马捷,等. 水环境小平台建立脾虚证大鼠模型及其评价[J]. 山东中医杂志,2016,35(5):452-457.
- [10] HE W Q, PENG Y J, ZHANG W C, et al. Myosin light chain kinase is central to smooth muscle contraction and required for gastrointestinal motility in mice [J]. Gastroenterology,2008,135(2):610-620.
- [11] Martinsen A, Dessy C, Morel N. Regulation of calcium channels in smooth muscle: new insights into the role of myosin light chain kinase [J]. Channels (Austin), 2014,8(5):402-413.
- [12] Sanders K M, Koh S D, Ro S, et al. Regulation of gastrointestinal motility-insights from smooth muscle biology [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012,9(11):633-645.
- [13] 梁明丽. MLCK 对磷酸化肌球蛋白 ATP 酶活性及体外肌丝运动的影响[D]. 大连:大连医科大学,2006.
- [14] 刘芬,刘艳菊,田春漫. 苍术提取物调节脾虚证大鼠胃肠动力障碍的作用机制研究[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(12):825-829.

[责任编辑 邹晓翠]