

小柴胡汤中柴胡不同剂量对正常大鼠胃窦组织 MTL, AChE, NO 含量的影响

曹峰¹, 唐阿梅^{2*}

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550003)

[摘要] **目的:**观察小柴胡汤中柴胡不同剂量对正常大鼠胃窦组织胃动素(MTL)、乙酰胆碱酯酶(AChE)、一氧化氮(NO)的影响,并探讨其作用机制。**方法:**40只大鼠随机分为4组:正常对照组、小柴胡汤组[柴胡高剂量组(高)、柴胡中剂量组(中)、柴胡低剂量组(低)]。每天ig给予相应的小柴胡汤水煎液药液浓缩剂(高、中、低剂量分别为13,10,9.1 g·kg⁻¹)或等容积生理盐水ig,连续3d。末次给药后,ELISA法测定胃窦组织MTL,AChE,NO的含量。**结果:**与正常对照组比较,柴胡剂量最高的小柴胡汤组(高)胃窦组织MTL,AChE的含量升高($P < 0.05$),而胃窦组织NO的含量则无统计学差异;小柴胡汤组(中)、(低)的胃窦组织MTL,AChE,NO与正常组比均无统计学差异。**结论:**应用高剂量柴胡的小柴胡汤促进胃动力的作用机制,可能与增加胃窦组织MTL,AChE的含量有关。

[关键词] 柴胡剂量;小柴胡汤;胃窦;胃动素;乙酰胆碱酯酶;一氧化氮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0232-04

[doi] 10.11653/syfy2013150232

Effect of Xiao Chaihu Decoction with Different Dosages of *Bupleurum chinense* on the Content of MTL, AChE, NO in Gastric Antrum in Normal Rats

CAO Feng¹, TANG A-mei^{2*}

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550002, China;

2. First Affiliated Hospital of Guiyang College of TCM, Guiyang 550003, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect and investigate the mechanism of Xiao Chaihu decoction with dosage of *Bupleurum chinense* on the content of motilin, acetylcholinesterase (AChE), nitrogen monoxide (NO) in gastric antrum in normal rats. **Method:** All 40 rats were randomly divided into 4 groups, including normal group, Xiao Chaihu decoction group (*B. chinense* high dose), Xiao Chaihu decoction group (*B. chinense* middle dose) and Xiao Chaihu decoction group (*B. chinense* low dose). All rats were given corresponding Xiao Chaihu decoction (high dose, 13 g·kg⁻¹·d⁻¹; middle dose, 10 g·kg⁻¹·d⁻¹, low dose, 9.1 g·kg⁻¹·d⁻¹) or equal volume of normal saline by gavage for 3 days. After the last administration, MTL, AChE and NO content in gastric antrum were measured with ELISA. **Result:** MTL and AChE contents in gastric antrum with Xiao Chaihu decoction groups (high dose) were increased than normal group ($P < 0.05$), but no difference was found between Xiao Chaihu decoction group (high dose) and normal group in NO content. The contents of MTL, AChE, NO in gastric antrum were no difference between the normal group and Xiao Chaihu decoction groups (middle and low

[收稿日期] 20130317(003)

[基金项目] 贵阳中医学院2010年度博士基金课题(2010297)

[第一作者] 曹峰,博士,讲师,从事中医防治原则理论研究,Tel:0851-5606103,E-mail: cflzhfe@126.com

[通讯作者] *唐阿梅,硕士,主治医师,从事中医内科防治临床研究,Tel:0851-8621261,E-mail: 86212932@qq.com

dose). **Conclusion:** The Xiao Chaihu decoction group (high dose) can promote gastric motility, and the action mechanism may be correlated with increased MTL and AChE contents in gastric antrum.

[**Key words**] dosage of *Bupleurum chinense*; Xiao Chaihu decoction; gastric antrum; MTL; AChE; NO

小柴胡汤在仲景原文中多用于治疗大便干燥难解的病证,提示小柴胡汤可能具有一定的促进胃肠动力的功效,这也被实验报道所证实^[1]。小柴胡汤原方中柴胡剂量大于方中药物的剂量,而现今文献报道中的小柴胡汤中多见诸药剂量相近,甚或有时柴胡剂量最小。笔者前期的实验研究显示,小柴胡汤可以降低正常小鼠胃内色素残留量,同时促进小肠推进,这种作用随柴胡剂量的增加胃肠运动增强。^[2]本文通过实验研究手段,观察不同柴胡剂量的小柴胡汤对正常大鼠胃窦组织胃动素(motilin, MTL)、乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)、一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)的影响,探讨柴胡剂量对小柴胡汤促进胃动力的影响及其作用机制,并为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠,体重(200±20)g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供。许可证号SCXK(渝)2012-0005。

1.2 药物与试剂 选用的中药材:北柴胡为伞形科植物 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根、黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根;党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根;清半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎与白矾共煮后干燥而成的炮制加工品;炙甘草(由甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 照蜜炙法加工;生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎、大枣为鼠李科植物枣 *Ziziphus jujube* Mill. 的干燥成熟果实。以上除生姜购自农贸市场外,其他实验用中药均购自同仁堂(贵阳)药店,所用中药均由我院生药教研室刘芑教授鉴定为正品。

古代应用小柴胡汤以柴胡与黄芩配伍比例 3:1 较多,而现代柴胡与黄芩配伍比例多为 1:1。^[3]为了探讨柴胡用量对小柴胡汤功效的影响,本文以实验研究手段观察柴胡剂量变化对小柴胡汤对正常大鼠胃动力的影响。小柴胡汤方中只有柴胡剂量变化,方剂中其余 6 味药选择现代常规剂量,且 3 组中这 6 味药剂量不变,将不同柴胡剂量的小柴胡汤分 3 组:小柴胡汤柴胡大剂量组(柴胡-黄芩比为 2.77:1),药物组成:北柴胡 40 g,黄芩 15 g,党参 15 g,清

半夏 15 g,炙甘草 15 g,生姜 15 g,大枣 4 枚(约 10 g)组成。用 800 mL 水浸泡 1 h,煎煮 30 min,过滤;再加入 800 mL,煎煮 30 min,过滤。合并,2 次煎取滤液,再煎取 100 mL,并将所得药液用双层纱布过滤,制作成 1.30 g·mL⁻¹ 的药液;小柴胡汤柴胡中剂量组(柴胡-黄芩比为 1:1),药物组成:北柴胡 15 g,余药药量及煎煮方法同小柴胡汤柴胡大剂量组,制作成 1.00 g·mL⁻¹ 的药液;小柴胡汤柴胡小剂量组(柴胡-黄芩比为 0.4:1),药物组成:北柴胡 6 g,余药药量及煎煮方法同小柴胡汤柴胡大剂量组,制作成 0.91 g·mL⁻¹ 的药液。3 组小柴胡汤水煎液均置 4℃ 冰箱中贮存备用。正常对照组为生理盐水组。

MTL, AChE, NO ELISA (美国 R&D 公司,产品批号 201211)进口分装试剂盒,由昆明绿盟科技有限公司提供。

1.3 仪器 Anke TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂);Bio-TEK ELX808 酶标仪(美国 BioTeck 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 大鼠在恒温(20±2)℃、相对湿度 50%~60% 的实验室条件下饲养,每日光照 12 h,自由取食、饮水。适应性喂养 7 d 后,40 只大鼠随机分为 4 组:小柴胡汤组(柴胡小)、小柴胡汤组(柴胡中)、小柴胡汤组(柴胡大)、及正常对照组,每组 10 只给药组分别灌胃给予相应的小柴胡汤水煎液(大剂量组,13 g·kg⁻¹·d⁻¹;中剂量组,10 g·kg⁻¹·d⁻¹;小剂量组,9.1 g·kg⁻¹·d⁻¹),正常对照组给予等容积生理盐水。连续 3 d。

2.2 动物处理及指标检测 末次给药前禁食不禁水 12 h,末次灌胃给药后,用 10% 水合氯醛 ip 麻醉。在 5~10 min 内腹主动脉采血后(另测其他指标),立即剖腹,取下整胃以冰冷的生理盐水冲洗干净,自幽门 0.2~0.3 cm 处取适量胃窦组织,以冰冷的生理盐水冲洗干净后称重。按质量体积比加生理盐水,制成 10% 的组织匀浆。将制成 10% 的组织匀浆置于离心机内 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液置 -80℃ 冰箱内储存备用。按试剂盒操作程序 ELISA 法测定胃窦组织 MTL, AChE, NO 含量。

2.3 统计学处理方法 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料相互比较采用方差分析,采用 SPSS

17.0 for Windows 统计软件包进行统计学处理。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对正常大鼠胃窦组织 MTL, AChE, NO 的影响与正常对照组比较, 柴胡剂量最大的小柴胡汤组

(大) 胃窦组织 MTL, AChE 的含量升高 ($P < 0.05$), 而本组大鼠胃窦组织 NO 的含量虽有增加的趋势, 但与正常组相比无统计学差异; 小柴胡汤组(中)、小柴胡汤组(小)的胃窦组织 MTL, AChE, NO 与正常组比较, 均无统计学差异。见表 1。

表 1 小柴胡汤中柴胡不同剂量对正常大鼠胃窦组织 MTL, AChE, NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MTL /ng·g ⁻¹	AChE /nmol·g ⁻¹	NO /μmol·g ⁻¹
正常对照	-	0.87 ± 0.35 ²⁾	0.51 ± 0.12 ²⁾	0.11 ± 0.09
小柴胡汤(柴胡-黄芩 2.77:1)	13	1.36 ± 0.49 ¹⁾	0.76 ± 0.36	0.18 ± 0.12
小柴胡汤组(柴胡-黄芩 1:1)	10	1.17 ± 0.43	0.66 ± 0.30	0.14 ± 0.13
小柴胡汤组(柴胡-黄芩 0.4:1)	9.1	0.94 ± 0.39 ²⁾	0.55 ± 0.17	0.12 ± 0.07

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与小柴胡汤中柴胡高剂量(13 g·kg⁻¹)组比²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

依据仲景原文的记载,小柴胡汤有通利胃肠的作用。如《金匱要略·妇人产后病》有“大便坚,呕不能食,小柴胡汤主之”的记载;《伤寒论》148 条论述是表证未罢但不重,里有郁热,气机不调,津液不下,阳微结所致的大便干燥难解,并有服小柴胡汤后“得屎而解”的记载;230 条“阳明病,胁下硬满,不大便而呕,舌上白胎者,可与小柴胡汤”。小柴胡汤原方中柴胡剂量为半斤,剂量远大于方中黄芩、人参、甘草、生姜(各三两)的剂量,而现今文献报道中的小柴胡汤中,无论是柴胡的绝对还是相对剂量都比原方的剂量小。古代小柴胡汤方中的柴胡与黄芩的配伍比例差异非常大,除个别柴胡配伍比例极大的方剂外,通常柴胡与黄芩配伍比例在 1~5:1,其中以 3:1 较多^[3-4]。

为了找出小柴胡汤古今柴胡剂量的差异对胃动力的影响,笔者前期观察了不同柴胡剂量的小柴胡汤对正常小鼠胃排空和小肠推进功能的影响,发现不同柴胡剂量的小柴胡汤对正常小鼠胃排空和小肠推进功能的有明显的影 响。柴胡水煎剂和小柴胡汤均可以降低正常小鼠胃内色素残留量,同时促进小肠推进,两者的功效随柴胡剂量的增加而增强^[2],得出的结论也与一些实验报道结果相一致^[1,5]。MTL 是由胃肠黏膜分泌的含 22 个氨基酸的多肽,是启动消化间期胃肠移行性复合运动(migrating motor complex, MMC)的重要激素,具有促进胃肠动力的作用。^[6] AChE 可以迅速催化水解进入神经突触间隙的乙酰胆碱,终结神经冲动的传递^[7],乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)为胃肠动力兴奋性递质,

两者呈正相关^[8]。一般认为,NO 是非肾上腺素能非胆碱能(non-adrenergic non-cholinergic, NANC)神经元的一个抑制性递质,对消化道运动起抑制作用^[9],但近年来关于其对胃肠动力的作用认识尚有争议^[10]。本实验结果显示,柴胡剂量最大的小柴胡汤组(大)可以增加胃窦组织 MTL、AChE 的含量,而剂量较小的两组的胃窦组织 MTL、AChE、NO 与正常组均无明显差异。应用大剂量的柴胡的小柴胡汤增加胃动力的作用机制,可能与增加促进胃排空的胃窦组织 MTL、AChE 的含量有关。

柴胡,《神农本草经》谓其“味苦平,主心腹,去肠胃中结气,饮食积聚,寒热邪气,推陈致新”,与同具有“推陈致新”作用的大黄相比,柴胡也有促进胃肠动力的作用,而其功效与剂量有着密切的关系。从药性理论阐释,如《素问·阴阳应象大论》所述“味厚则泄,薄则通”,味苦的柴胡若大剂量应用,则味厚走下而通利胃肠,促进胃肠动力;若小剂量的应用,则气味俱薄,“气薄则发泄”,轻清走上,有较好的升阳举陷的作用,如补中益气汤中的柴胡的绝对和相对剂量都相对偏小。因此,笔者认为小柴胡汤方中的主要药物柴胡的剂量可能就是方剂取效的关键。本实验研究的结果为临床上应用大剂量柴胡剂量的小柴胡汤用于通利胃肠的临床经验提供了一定的实验依据,目前仅观察了不同柴胡剂量的小柴胡汤对正常大鼠胃肠动力的影响,下一步准备在此基础上开展其对功能性消化不良(Functional dyspepsia, FD)动物模型作用的研究,以更进一步深入的探讨其作用机制。

苦参碱对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡及 Survivin 基因表达的影响

陈立波*

(吉林工业职业技术学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的:探讨苦参碱对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡的影响及其可能的分子机制。方法:应用不同浓度的苦参碱作用于人宫颈癌 HeLa 细胞,采用 MTT 法检测细胞增殖;Annexin V FITC/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期;RT-PCR 和 Western blotting 分析 Survivin 基因表达。结果:苦参碱对 HeLa 细胞的体外增殖具有抑制作用,量效关系显著,与对照组比较有统计学差异($P < 0.01$),半数抑制浓度(IC_{50})为 $2.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经流式细胞仪检测表明,苦参碱能使 HeLa 细胞 G_0 - G_1 期逐渐增加, G_2 -M 期和 S 期逐渐减少,并且随着剂量的增加,HeLa 细胞凋亡率明显增加($P < 0.01$)。苦参碱对 HeLa 细胞 Survivin 基因表达有一定的抑制作用($P < 0.01$),并呈剂量依赖性。结论:苦参碱能有效抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,诱导其凋亡,其作用机制可能与抑制 Survivin 基因的表达有关。

[关键词] 苦参碱; 宫颈癌; 增殖; 凋亡; Survivin 基因

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0235-04

[doi] 10.11653/syfy2013150235

Effects of Matrine on Proliferation, Apoptosis and Survivin Gene Expression in Human Cervical Cancer HeLa Cells

CHEN Li-bo*

(Jilin Vocational College of Industry and Technology, Jilin 132013, China)

[收稿日期] 20130314(005)

[通讯作者] *陈立波, 硕士, 副教授, 从事中药相关教学与研究工作, Tel:0432-64644341, E-mail:jlclb2@163.com

[参考文献]

[1] 叶勇, 石拓, 邱明义, 等. 小柴胡汤对正常大鼠胃肠激素影响的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2006, 14(3):144.

[2] 曹峰, 陈静, 赵博, 等. 不同柴胡用量的小柴胡汤对正常小鼠胃排空和小肠推进功能的影响[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(18):31.

[3] 吴贵娥. 小柴胡汤古代运用考探[D]. 北京: 北京中医药大学, 2005:30.

[4] 周志申. 浅析小柴胡汤柴胡剂量及其副作用[J]. 陕西中医, 2005, 26(3):266.

[5] 王宪龄, 申平, 李珍珍. 柴胡黄芩及其不同剂量比例配伍对小鼠小肠推进功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(4):1.

[6] Lin Ya-Ping, Yi Shou-Xiang, Yan Jie, et al. Effect of acupuncture at Foot-Yangming Meridian on gastric

mucosal blood flow, gastric motility and brain-gut peptide [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(15):2231.

[7] Karl Tsim, Hermona Soreq. Acetylcholinesterase: old questions and new developments [J]. Front Mol Neurosci, 2012, 5(2):101.

[8] 伍早安, 李国成, 胡道松. 肝胃不和型功能性消化不良大鼠幽门括约肌乙酰胆碱酯酶及一氧化氮合酶的表达[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2004, 12(1):9.

[9] 董艳平, 屈克义, 李文胜, 等. 隔山消对功能性消化不良大鼠一氧化氮和胆碱酯酶的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(1):24.

[10] P R R Gangula, K R Sekhar, S Mukhopadhyay. Gender bias in gastroparesis: is nitric oxide the answer[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(9):2525.

[责任编辑 聂淑琴]