

中药藿香正气水对大鼠结肠平滑肌收缩的机理研究

李康^{1*}, 陈思亮², 周文良², 王媛媛³

(1. 药科学院, 广东药学院, 广州 510006; 2. 中山大学生命科学学院, 广州 510275;
3. 临床医学院, 广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 探索中药藿香正气水肠道作用机理。方法: 运用肌肉张力测量技术研究藿香正气水对大鼠结肠平滑肌收缩的影响。结果: 藿香正气水能够抑制由激动剂—卡巴胆碱(CCH)和KCl引起大鼠结肠平滑肌的收缩。结论: 藿香正气水抑制收缩的作用与抑制平滑肌细胞膜上钙通道的开放是相关的。

[关键词] 藿香正气水; 肠道; 机理; 肌肉张力

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0131-04

Mechanism of Effect of Huoxiang Zhengqi Liquid on the Spontaneous Contraction of Colonic Muscle From Mice

LI Kang^{1*}, CHEN Si-liang², ZHOU Wen-liang², WANG Yuan-yuan³

(1. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. College of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. College of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the intestinal mechanism of Huoxiang Zhengqi Liquid (HZL). **Method:** The spontaneous contraction of colonic muscle from mice were studied using muscle tension measurement technology. **Result:** HZL could inhibit the spontaneous contraction caused by CCH or KCl of colonic muscle from mice. **Conclusion:** The effect of HZL on the spontaneous contraction is related with inhibition of Ca^{2+} channel.

[收稿日期] 2010-01-04(003)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(30801515)、中国博士后科学基金项目(2005037618)和广东省自然科学基金博士启动项目(5301048)

[通讯作者] * 李康, Tel: (020) 39352136, E-mail: likang229@yahoo.com.cn

质的变化, 初步研究成果表明花椒水提物能显著影响SD大鼠尿样中内源性物质的代谢, 对其中与抗肿瘤、镇痛、降血脂等作用相关的物质代谢有显著的影响, 具体的机理尚不明确, 有待进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] 孙向明, 杜鹃, 南莉莉. 代谢组学中代谢指纹分析技术进展[J]. 食品与药品, 2008, 9(10): 62.
[2] 李运伦. 代谢组学是研究中医症候实质和方剂原理的重要技术平台[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 3

(32): 187.

- [3] 郑瑾, 张丽娟. 花椒药用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(11): 69.
[4] 臧林泉, 胡枫, 韦敏, 等. 花椒挥发油抗肿瘤药理研究[J]. 蛇志, 2006, 18(3): 183.
[5] 张湘杰, 何永恒. 花椒、延胡索、没药、三七-四味中药止痛作用的药理学研究进展[J]. 中国中药现代远程教育, 2009, 7(1): 96.
[6] 王娅娅. 花椒籽油提取、分析检测及降血脂功能作用研究[D]. 陕西师范大学硕士论文, 2007.

[Key words] Huoxiang Zhengqi Liquid; intestinal; mechanism; muscle tension

藿香正气水出自宋代的《太平惠民和剂局方》，方由藿香、大腹皮、白芷、紫苏、茯苓、半夏、白术、陈皮等药组成。具有解表化湿、理气和中之效。主治外感风寒、风伤湿滞所致恶寒、发热、头痛、胸膈满闷、脘腹胀痛、恶心呕吐、肠鸣泄泻、舌苔白腻等症^[1]。彭志辉等^[2]人运用正交设计的方法，对乙酰胆碱刺激的离体兔十二指肠影响为药效指标，进行实验，分析了各药味在方中的作用及其相互作用。发现藿香正气水中起到解痉作用的是其中五味药，作用强度依次为陈皮、厚朴、苍术、半夏和广藿香油。但是运用肌肉张力技术从离子通道水平来研究藿香正气水的作用机理还没有报道。本实验研究了藿香正气水对大鼠结肠平滑肌收缩的影响。

1 材料

1.1 大鼠 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 150 ~200 g 由中山大学药学院实验动物中心提供。

1.2 药品 藿香正气水(北京同仁堂)购自中顺堂药房(批号 4144658); 卡巴胆碱(CCH, 纯度 99%), 购自 sigma 公司。

1.3 化学试剂 KCl, NaCl, CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, NaH₂PO₄, MgSO₄, D-Glucose, 分析纯, 购自广州化学试剂厂。

1.4 溶液

(1) 肌肉张力测量所用溶液

正常 K-H 溶液由以下成分构成 (mmol/L): NaCl 117, KCl 4.7, CaCl₂ 2.56, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.8, KH₂PO₄ 1.2, Glucose 11.1。当溶液通入 5% CO₂/95% O₂ 混合气体后, 溶液的 pH 保持在 7.4 左右。

(2) 细胞内钙离子测量实验所用溶液

1. 正常 PSS 溶液由以下成分构成 (mmol/L): NaCl 140, KCl 1, CaCl₂ 1, MgCl₂ 6 H₂O 1, HEPES 5, Glucose 10。用 NaOH 调 pH = 7.4。

2. Ca²⁺-free PSS 溶液由以下成分构成 (mmol/L): NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 6, H₂O 1, HEPES 5, Glucose 10, EGTA 2。用 NaOH 调 pH = 7.4。

1.5 实验设备 BL-420E + 生物机能实验系统(成都泰盟公司); 超级恒温水浴槽 SC-15(宁波天恒仪器厂)。

2 方法

肌肉张力测量 大鼠适应性饲养 1 周后, 每次取大鼠 1 只, 禁食不禁水 24 h, 处死, 开腹, 迅速自肛门上 2 cm 处取长约 15 cm 结肠, 轻柔洗净, 剪成小段置于 4 ℃ K-H 溶液中, 通 95% O₂ + 5% CO₂ 备用。沿肠系膜剪开结肠, 取肠系膜对侧结肠纵肌肌条(约 1.5 cm) 放置到盛有洛氏液的恒温平滑肌浴槽中, 温度保持在 (37 ± 0.5) ℃, 持续通以 95% O₂ + 5% CO₂ 的混合气体, 将平滑肌条的一端固定于浴槽底部, 另一端连接张力换能器, 负荷 1 g 张力, 平衡 30 min, 通过微机程控的 BL-420 型生物信号系统记录平滑肌活动的情况, 先描记一段正常运动曲线, 每组加药前, 冲洗标本 3 次, 待舒缩恢复到用药前水平后再加下一组药, 实验中所用药物浓度均以最终浴槽浓度计算。

3 结果

3.1 肌肉张力测量的实验结果

3.1.1 在孵育液中加入 4 μL/mL 的藿香正气水后, 平滑肌的自主收缩会受到一定程度的抑制(如图 1), 抑制效果随时间逐步增大。

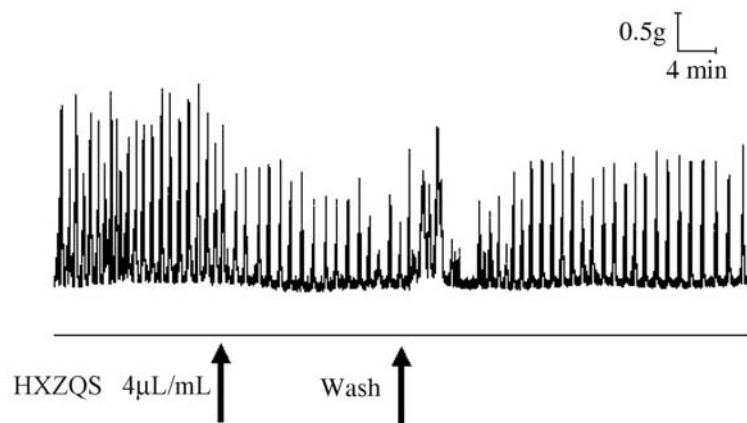


图 1 藿香正气水在平滑肌组织浴液中抑制自主收缩的反应 (n = 4)

3.1.2 在孵育液中加入不同剂量的藿香正气水, 其终浓度 (μL/mL) 分别为 1, 2, 4, 5, 7, 观察其引起的自主收缩的反应。不同浓度的藿香正气水引起的反应具有浓度依赖性, 如图 2。

3.1.3 先在孵育液中加入某种抑制剂孵育 30 min, 如神经冲动的抑制剂—TTX (1 μmol · L⁻¹), 前列腺素 E (PGE) 合成的抑制剂—吲哚美辛 (indomethacin, 100 μmol · L⁻¹), P2Y 受体(ATP 受体的一种)的抑制剂—反应蓝-2(RB-2, 10 μmol · L⁻¹) 和 NO 合成的抑制剂—L-NNA (1 mmol · L⁻¹), 再加入 4 μL · mL⁻¹ 的藿香正气水, 45 min 之后换下一种抑制剂。发现这些抑制剂都不能明显阻断藿香正气

水的效果(如图 3)。

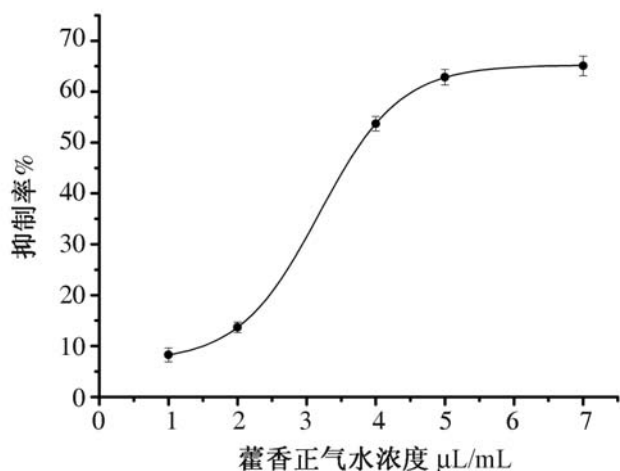


图 2 藿香正气水在平滑肌组织中引起的抑制自主收缩作用的浓度依赖性曲线 ($n=4$)

抑制率 % =

$$\frac{\text{加药前 10 min 内曲线下面积} - \text{加药后 10 min 内曲线下面积}}{\text{加药前 10 min 内曲线下面积} - \text{前负荷在 10 min 内曲线下面积}} \times 100\%$$

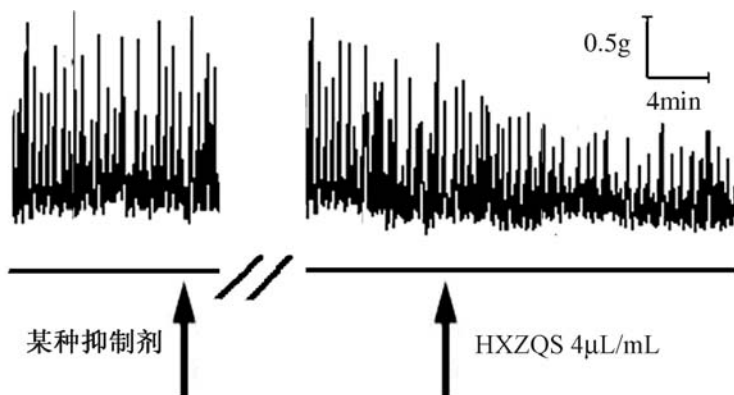


图 3 各种抑制剂对藿香正气水引起的收缩变化的影响

3.1.4 在孵育液中先不加(对照组)或加 4 μL/mL 的藿香正气水(实验组)预处理 3 min 后,再加入能够引起平滑肌收缩的激动剂—卡巴胆碱(2 μmol·L⁻¹)或 KCl(40 mmol·L⁻¹)。激动剂在对照组和实验组中都能促进平滑肌的收缩,但在实验组中的比率明显低于对照组的($P < 0.001$),如图 4~9。

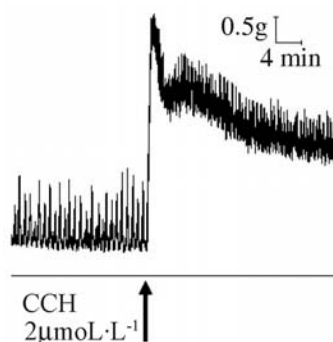


图 4 卡巴胆碱(2 μmol·L⁻¹)在对照组中引起的收缩变化 ($n=4$)

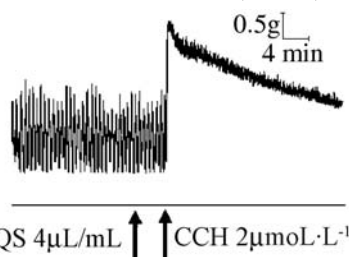


图 5 卡巴胆碱(2 μmol·L⁻¹)在实验中引起的收缩变化 ($n=4$)

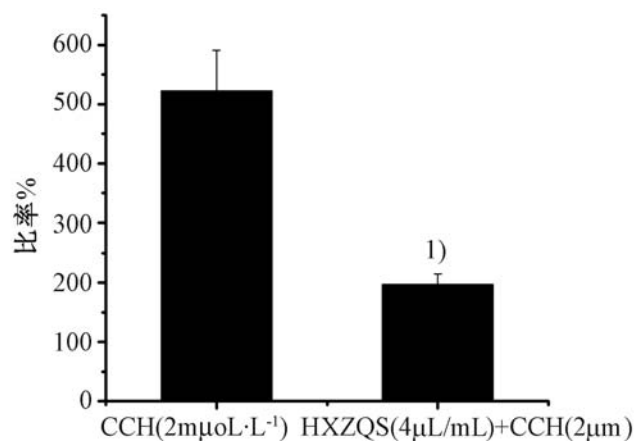


图 6 在对照组和实验组中,加卡巴胆碱(2 μmol·L⁻¹)后与加卡巴胆碱前 10 min 内曲线下面积比率的直方图对照 ($n=4$) (与不加 HXZQS 组比¹⁾ $P < 0.001$)

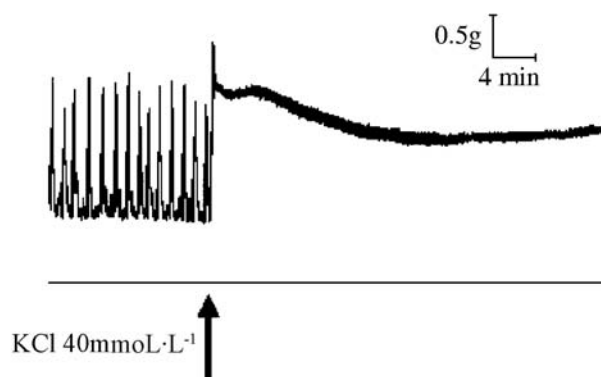


图 7 KCl(40 mmol·L⁻¹)在对照组中引起的收缩变化 ($n=4$)

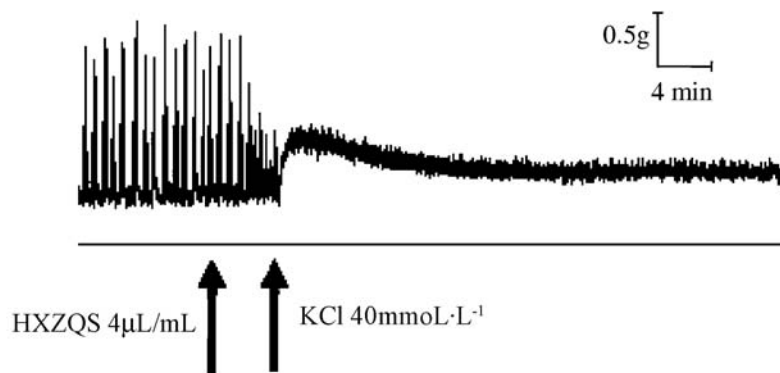


图 8 KCl(40 mmol·L⁻¹)在实验组中引起的收缩变化 ($n=4$)

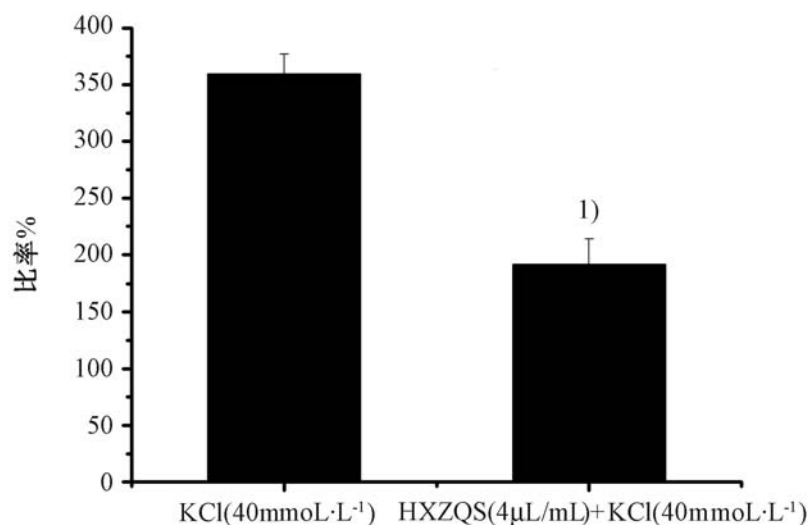


图 9 在对照组和实验组中,加 KCl(40 mmol·L⁻¹)后与加 KCl 前 10 min 内曲线下面积比率的直方图对照 ($n=4$)

比率 % =

$$\frac{\text{加药后 10 min 内曲线下面积} - \text{前负荷在 10 min 内曲线下面积}}{\text{加药前 10 min 内曲线下面积} - \text{前负荷在 10 min 内曲线下面积}} \times 100\%$$

3.1.5 平滑肌细胞内钙离子浓度测定 先把细胞孵育在无钙的 PSS 溶液 (Ca²⁺-free PSS) 中,加入

thapsigargin($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 排空钙库后, 再把孵育细胞的无钙 PSS 溶液(Ca^{2+} -free PSS) 换成正常 PSS 溶液(NPSS), 这时会出现一个明显的较长时程的胞内钙离子浓度上升相(全容量钙内流)。此时, 在上升相的平台期加入藿香正气水($4 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$) 后, 胞内的钙离子浓度明显下降(如图 10)。

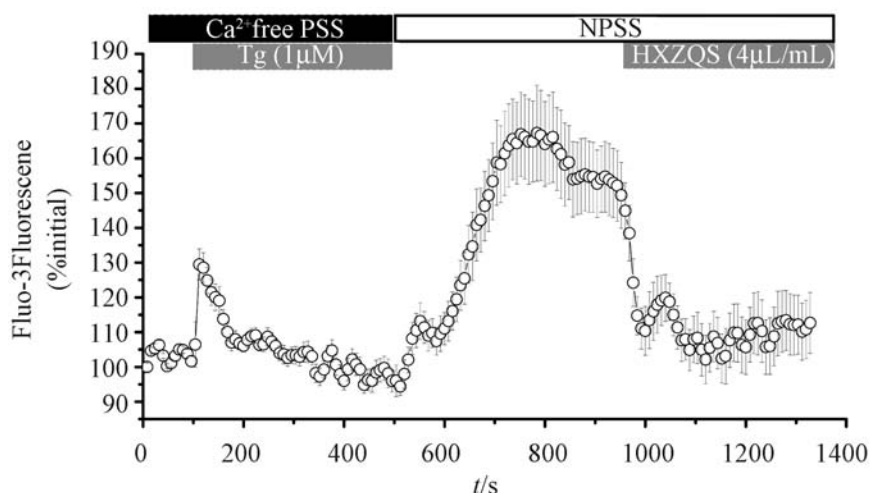


图 10 藿香正气水对全容量钙内流的作用 ($n = 4$)

4 讨论

在肌肉张力测量的实验中发现: 在孵育液中加入不同浓度(1, 2, 4, 5, 7 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 的藿香正气水都能不同程度地抑制大鼠结肠平滑肌的自主收缩, 抑制率分别为: 8.25%, 13.67%, 53.70%, 62.86%, 65.06%, 而且这种抑制反应具有浓度依赖性。研究已表明: 消化道的平滑肌细胞具有自主收缩的特性, 它的这种特性是由一种慢波电信号所介导的。当这种慢波传导到平滑肌细胞时会使细胞产生去极化, 激活膜上的钙通道, 使胞外的钙内流, 最终引起平滑肌的自主收缩。藿香正气水能抑制平滑肌的这种自主收缩, 说明它能够直接或间接地影响平滑肌细胞膜上钙通道的开放。

在孵育液中加入某种抑制剂孵育一段时间, 如神经冲动抑制剂—TTX($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 前列腺素 E (PGE) 合成抑制剂—吲哚美辛 (indomethacin), P2Y 受体(ATP受体的一种) 抑制剂—反应蓝-2 (RB-2) 和 NO 合成的抑制剂—L-NNA, 再加入 $4 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的藿香正气水, 发现这些抑制剂都不能明显阻断藿香正气水的作用。这说明藿香正气水抑制结肠的自主收缩不是通过神经起作用, 也不是通过产生常见的

舒张因子(PGE, ATP 和 NO) 起作用。同时, 在激动剂的实验中发现: 加入平滑肌收缩的激动剂—卡巴胆碱($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 KCl($40 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 都能促进平滑肌的收缩。现已证明, 卡巴胆碱促进收缩是其与胆碱能受体结合后, 兴奋神经肌肉接头的神经节使其释放促进收缩的激素, 这些激素作用于平滑肌细胞, 激活胞膜上的钙通道, 最终达到促进收缩的效果。KCl 促进收缩是由于当 KCl 加入到孵育液后, 会使胞外溶液中的 K^+ 离子浓度上升, 导致胞外 K^+ 离子内流, 使细胞去极化, 激活膜上的钙通道, 最终达到促进收缩的效果。经统计发现: 加卡巴胆碱后 10 min 内曲线下面积/加药前 10 min 内曲线下面积的比率为 520%, 加 KCl 的比率为 360%; 而经过 $4 \mu\text{L}/\text{mL}$ 的藿香正气水处理 3 min 后, 加卡巴胆碱的比率降为 200%, 加 KCl 的比率降为 190%。也就是说: 藿香正气水也能够抑制由激动剂—卡巴胆碱(CCH) 和 KCl 引起的收缩。这同样说明藿香正气水能够直接或间接地抑制平滑肌细胞膜上钙通道的开放, 达到抑制收缩的效果。

在胞内钙离子浓度测定的实验中发现: 先把细胞孵育在无钙的 PSS 溶液(Ca^{2+} -free PSS) 中, 加入 thapsigargin($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 排空钙库后, 再把孵育细胞的无钙 PSS 溶液(Ca^{2+} -free PSS) 换成正常 PSS 溶液(NPSS), 这时会出现一个较长时程的由全容量钙内流引起的胞内钙离子浓度上升相。此时, 在上升相的平台期加入藿香正气水($4 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$) 后, 胞内的钙离子浓度明显下降。这说明藿香正气水能够抑制胞外钙离子的内流, 也就证明了藿香正气水能够抑制平滑肌细胞膜上钙通道的开放, 这与前面收缩结果相一致。至于它是通过哪种途径、直接还是间接作用于钙通道, 尚需要进一步的实验证明。

[参考文献]

- [1] 陆蔚, 吴文金. 藿香正气方药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(增刊): 82.
- [2] 彭志辉, 陈立峰, 赵树慎. 正交设计法对藿香正气水组方的研究[J]. 湖南中医杂志, 1995, 11(2): 38.