

痛泻要方组成药物对大鼠结肠平滑肌运动的影响及机制

魏睦新^{*}, 吴燕敏, 刘振清, 田琳

(南京医科大学第一附属医院中医科, 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察痛泻要方拆分成防风(RS)、白术(LA)和白芍(WPR)对离体大鼠结肠平滑肌的影响, 并探讨其部分机制。方法: 制备大鼠结肠平滑肌肌条, 以 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液为对照, 观察白术、白芍和防风对平滑肌自发收缩的影响和防风对乙酰胆碱(Ach)引起的肌条收缩的影响, 并用 3 种工具药(纳络酮(NLT)、心得安(XDA)、酚妥拉明(FILM))初步探讨了防风的作用机制。结果: 与 NS 组相比较, 白术、白芍均对大鼠平滑肌有促进收缩的作用, 且白术的作用大于白芍; 防风各剂量组 ($10 \sim 40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 均对平滑肌收缩有剂量依赖性的抑制作用。不同浓度的防风对 Ach 引起的肌条收缩作用均有抑制, 并呈剂量依赖关系。先用工具药充分孵育后再加入 RS, 与对照组(NS + RS)比较, NLT + RS 组面积的回升有统计学意义 ($P < 0.05$); FILM 组振幅和面积回升差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 与阴性对照组(NS)的差异则无统计学意义。结论: 痛泻要方主要成分白术和白芍对大鼠结肠平滑肌均有促进收缩的作用。防风有抑制作用, 其作用机制与肾上腺素能受体有关, 与胆碱能 M 受体可能也有一定关系。

[关键词] 中药; 防风; 白芍; 白术; 平滑肌; 结肠; 大鼠

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-131-04

Effect and Mechanisms of Composition of Tongxie Yaofang on *in vitro* Contraction of Colonic Smooth Muscle Strips of Rat

WEI Mu-xin^{*}, WU Yan-min, LIU Zhen-qing, TIAN Lin

(First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the *in vitro* effect of Radix Saposhnikoviae (RS), Largehead Atractylodes Rh (LA) and white paeony root (WPR) on the colonic smooth muscle strips of rats and study the possible mechanisms. **Method:** The colonic longitudinal smooth muscle strips of rats were prepared. Sodium chloride ($9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) was used as the control groups. We observed the effects of WPR, LA and RS on the spontaneous contraction of the muscle strips. To study its mechanisms further, we also observed the effects of three tool drugs (naloxone, propranolol and phentolamine) on the strips. **Result:** Compared with the control group, both LA and WPR had the promoting role on the *in vitro* contraction of colonic smooth muscle strips. In addition, the activity of LA was stronger than WPR. RS of different concentrations showed dose-dependent inhibitive effects on $10 \sim 40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in the spontaneous contraction of colonic muscle strips. When acetylcholine was Added, RS showed dose-dependent inhibitive effects on the contraction of muscle strips. Compared with the NS + RS group, the area of NLT + RS group had significant difference ($P < 0.05$), so were the peak and area of FILM + RS group ($P < 0.01$), while NS group was insignificant. **Conclusion:** RS showed inhibitive effect on the spontaneous *in vitro* contraction of colonic smooth muscle strips of rats, while LA and WPR showed promoting effect. The mechanisms of inhibition are supposed to have close relations with the α -adrenoceptor and maybe also related with the M-cholinergic receptor.

[Key words] Chinese herbs; Radix Saposhnikoviae; Atractylodes Rh; white paeony root; smooth muscle; colon; rat

[收稿日期] 20100122(006)

[基金项目] 江苏省卫生厅资助项目(RC2002049)

[通讯作者] 魏睦新, Tel: (025) 86796130, E-mail: weimuxin@njmu.edu.cn

痛泻要方出自《丹溪心法》，该方由白术、白芍、陈皮、防风四药相合而成，能疏肝利脾，为治疗肝郁乘脾泄泻的经典方，长期以来一直应用于消化系统疾病的临床治疗，尤其是肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)等功能性肠病，疗效确切^[1-2]。但是，关于痛泻要方对胃肠运动影响的实验研究还较少^[3-4]。中草药成分较复杂，对胃肠运动的调节作用有可能是多靶点多层次的综合调节。因前人对陈皮的研究已较为透彻^[5]，故该实验重点观察了痛泻要方的其他药味——防风、白术和白芍对离体大鼠结肠平滑肌收缩的影响，为进一步了解痛泻要方全方的药理作用铺垫基础。

1 材料

清洁级 SD 大鼠 51 只，体质量(200 ±20) g，雄性，南京医科大学实验动物中心提供。

防风(RS)颗粒，批号 0712049；生白术(LA)颗粒，批号 0712129；杭白芍(WPR)颗粒，批号 0712019，均由江阴天江药业有限公司供应。用薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VIB)试验，紫外光灯下检视方法，进行质量控制。并符合颗粒剂项有关的各项规定(《中国药典》2000 年版一部附录 IC)。实验前将各颗粒分别溶解于纯水，经充分震荡混匀，离心，取上清液，白术(LA)、白芍(WPR)均制备成含生药 1 000 g·L⁻¹，防风(RS)制成 1 000, 2 000, 3 000, 4 000 g·L⁻¹ 4 个梯度溶液备用。实验药物浓度的确定：参照各中药的临床常用剂量，并通过预实验决定。

氯化乙酰胆碱(Ach)，上海三爱思试剂有限公司，批号 20060328；纳络酮(NLT)，北京四环医药科技有限公司，批号 0510191；心得安(XDA)，山西云鹏制药有限公司，批号 A071201；酚妥拉明(FTLM)，Novartis Pharma Schweiz AG, Switzerland, 批号 s0041；另配制 9 g·L⁻¹的 NaCl 溶液(NS)及 Krebs 液^[6]。微量多导体外器官水平浴槽及配套器材(日本国立生理研究所)；JZ101 肌张力换能器(新航机电公司)；RM-6240 四道生理记录仪(成都仪器厂)。

2 方法

2.1 方法 按文献^[7]方法制备离体大鼠结肠平滑肌肌条并悬挂于浴槽，以 1 mL·min⁻¹流速持续灌注 Krebs 营养液，并通入 950 mL·L⁻¹ O₂ + 50 mL·L⁻¹ CO₂ 的混和气体，控制浴槽温度(37 ±0.3)。

平滑肌运动效应观察：施加约 500 mg 预初张力，

平衡约 60 min，以肌条出现小幅规则、稳定的自发收缩为平衡标准；平衡后，滴加药物于浴槽中，加药顺序为 NS(空白对照)，LA, WPR 及 4 个浓度梯度的 RS，每种药物每次均滴加 40 μL，其终末浓度分别为 0.09, 10, 10, 10, 20, 30, 40 g·L⁻¹。加入药物并记录收缩曲线约 15 min 后，平衡约 20 min，待波形再次平稳后再加入下一种药物；分析对象为加入药物后 10 min 内的自发收缩曲线，实验结果 LA, WPR 及 RS 以最大振幅和曲线下面积占 NS 组的百分率表示。

收缩抑制效应观察：每次滴加 Ach(终浓度 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹)，并于 0.5 min 后分别滴加 NS 及 4 个浓度梯度的 RS，观察后加入 RS 对 Ach 曲线的影响；实验结果以最大振幅和曲线下面积占 NS 组的百分率表示。

抑制效应机制观察：滴加 NS 作为阴性对照，20 min 后依次滴加 NS, NLT(终浓度 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)，XDA(终浓度 10⁻⁴ mol·L⁻¹)，FTLM(终浓度 10⁻⁵ mol·L⁻¹)进行孵育，并皆于 2 min 后滴加 RS(终浓度 40 g·L⁻¹)，每次加入药物并记录收缩曲线约 15 min 后平衡约 20 min，待波形再次平稳后再加入下一种药物；分析对象为加入 RS 后 10 min 内的自发收缩曲线，实验结果以最大振幅和曲线下面积占 NS 组的百分率(NS%)表示。

2.2 统计学方法 采用 SPSS 软件进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并作 One-Way ANOVA 统计处理， $P < 0.05$ 为显著性界值。

3 结果

3.1 白术(LA)、白芍(WPR)对离体大鼠结肠平滑肌的收缩效应 滴加 NS 对平滑肌没有明显收缩效应，以 NS 对照组的结肠平滑肌自发收缩为 100%，LA 及 WPR 对大鼠结肠平滑肌的收缩振幅及面积均有促进作用(图 1)，与 NS 组相比有统计学差异(P 均 < 0.05)。LA 的促进作用[振幅(0.18 ±0.07) g, 面积(2.82 ±1.78) gs] 大于 WPR[振幅(0.10 ±0.08) g, 面积(1.09 ±0.84) gs]，两者比较振幅有统计学差异($P < 0.05$)，而面积无统计学差异。

3.2 防风(RS)

3.2.1 RS对离体大鼠结肠平滑肌自发收缩的影响

以 NS 对照组的结肠平滑肌自发收缩为 100%，RS 各组均对平滑肌收缩有一定程度的抑制作用(振幅统计 $P < 0.01$ ；面积统计 $P < 0.01$)，在 10 ~40 g·L⁻¹ 随浓度的增大而增强(图 2)。用 Fisher PLSD 法多

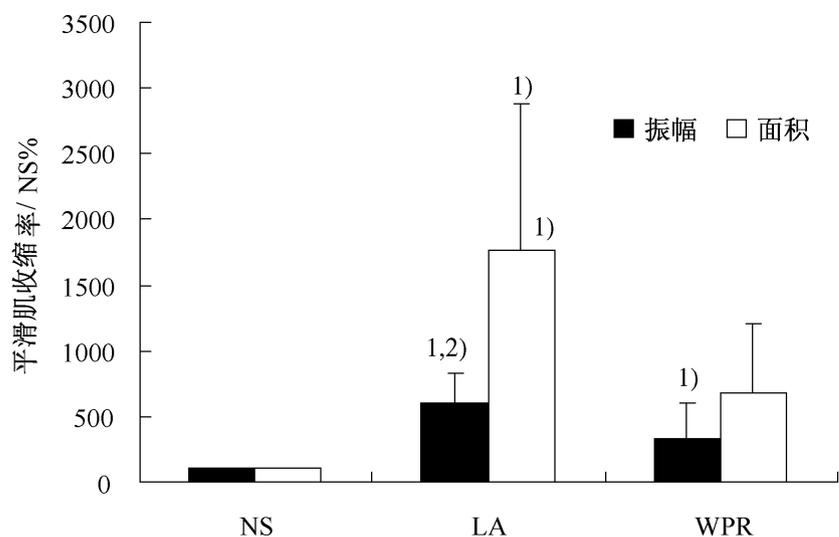


图 1 WPR, LA 对离体大鼠结肠平滑肌收缩作用的影响 (均±s, n=6)。与 NS 组比较¹⁾ P<0.05; 与 WPR 组比较²⁾ P<0.05。

重比较, 各组最大振幅与 NS 组比较, RS 10 g·L⁻¹ 组 (93.65% ±9.08%) 差异无统计学意义, RS 20 g·L⁻¹ 组为 (84.97% ±15.37%, P<0.05), RS 30 g·L⁻¹ 组为 (82.57% ±11.35%, P<0.01), RS 40 g·L⁻¹ 组为 (67.75% ±9.43%, P<0.01)。各组最大收缩面积与 NS 组比: RS 10 g·L⁻¹ 组为 (86.17% ±5.52%, P<0.05), RS 20 g·L⁻¹ 组为 (74.5% ±5.34%, P<0.01), RS 30 g·L⁻¹ 组为 (60.6% ±14.48%, P<0.01), RS 40 g·L⁻¹ 组为 (41.59% ±13.81%, P<0.01)。

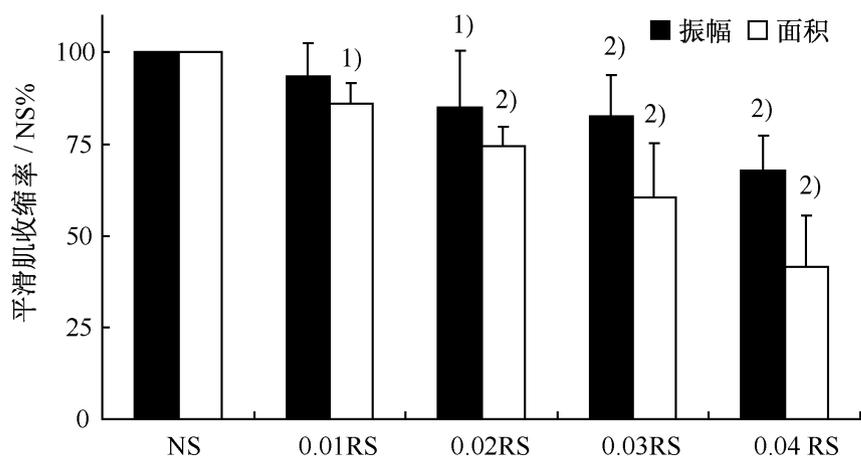


图 2 不同浓度 RS(g·L⁻¹) 对离体大鼠结肠平滑肌自发收缩的影响 (均±s, n=6)。与 NS 组比较¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01。

3.2.2 RS 对 Ach 引起的离体大鼠结肠平滑肌收缩的影响 不同浓度的 RS 可抑制加入 Ach 后引起的离体大鼠结肠平滑肌收缩振幅 (P<0.01) 和面积 (P<0.01)。用 Fisher PLSD 法多重比较, RS 10 g·L⁻¹ 组与 NS 组的差异振幅和面积无统计学意义, 最大振幅 RS 20 g·L⁻¹ 组、RS30 g·L⁻¹ 组与 NS 组的差异也无统计学意义, 但 40 g·L⁻¹ 组 (58.37% ±23.41%) 与 NS 组比较差异有统计学意义 (P<0.05); 而收缩面积与对照组相比, 3 组均有统计学

差异。RS 20 g·L⁻¹ 组为 (61.05 ±19.53)% (P<0.05), RS 30 g·L⁻¹ 组为 (49.32 ±18.73)% (P<0.05), RS 40 g·L⁻¹ 组为 (38.07 ±20.42)% (P<0.01)。结果见图 3。

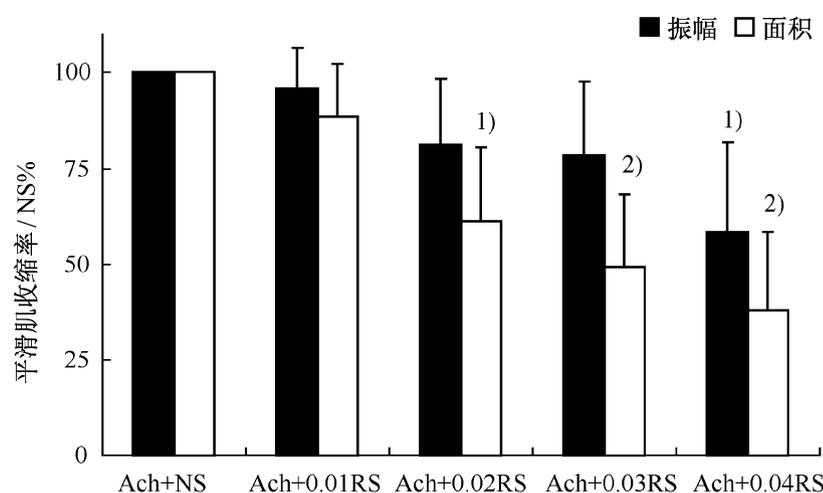


图 3 不同浓度 RS(g·L⁻¹) 对 Ach(终浓度 10⁻⁶ mol·L⁻¹) 引起离体大鼠结肠平滑肌收缩的影响 (均±s, n=6)。与 Ach+NS 组比较¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01。

3.2.3 工具药物对 RS 抑制平滑肌收缩作用的影响

先用 3 种工具药充分孵育后再加入 RS(40 g·L⁻¹), 与对照组(NS+RS) 比较, XDA 组差异振幅和面积均无统计学意义; NLT+RS 组振幅 (72.6% ±15.26%) 的差异无统计学意义, 面积的回升 (56.53% ±15.83%) 有统计学意义 (P<0.05); FTLM 组振幅 (88.92% ±9.93%) 和面积 (91.5% ±12.59%) 回升差异均有统计学意义 (P<0.01), 与阴性对照组 (NS) 的差异则无统计学意义 (图 4)。

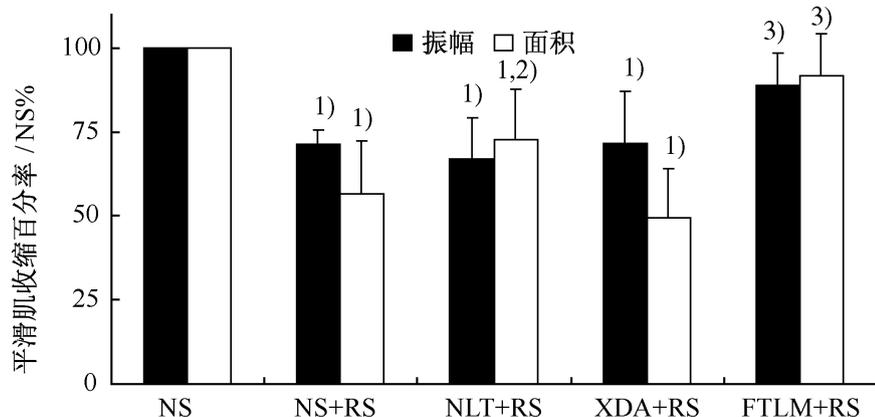


图 4 3 种药物充分孵育后对 RS(终浓度 40 g·L⁻¹) 抵制离体大鼠结肠平滑肌收缩作用的影响 (均±s, n=6)。与 NS 组比较¹⁾ P<0.01; 与 NS+RS 组比较²⁾ P<0.05, ³⁾ P<0.01。

4 讨论

在古代文献记载中, 痛泻要方的主治症状描述, 与功能性肠病最为吻合, 现代报道也发现, 很多治疗 IBS 的验方, 均以该方为基础发展而成^[1-2]。IBS 是功能性胃肠病中研究最活跃的一种疾病, 从临床角度可以分为腹泻型, 便秘型和腹痛型 3 种, 均与肠道平滑肌调节紊乱, 运动异常有关。但是就其病理来

说,腹痛型以平滑肌痉挛为主,腹泻型以平滑肌运动亢进有关,而便秘型则是运动抑制。呈现为不同甚至相反的机制。为什么痛泻要方对不同均能取得效果,单纯用中医“抑木扶土”来解释,很难被现代医学接受。研究传统方药的药理效应和机制具有理论意义和临床价值。

《药性赋》云:“白术,其用有四,利水道,有除湿之功;强脾胃,有进食之效;佐黄芩有安胎之能;君枳实有消痞之妙。”“白芍,其用有四,扶阳气大除腹痛,收阴气陡健脾经,坠其胎能逐其血,损其肝能缓其中。”现代大量药理学研究亦显示白术、白芍能促进平滑肌的收缩运动:如李建军魏睦新^[8]等通过研究清胰汤对豚鼠离体结肠平滑肌收缩活动的影响发现,白芍对结肠平滑肌有直接的显著的兴奋作用;覃俊佳^[9]等同时应用在体试验和离体实验的方法研究了白芍泻下作用的机制,认为白芍通过促进小肠、大肠的推进运动而起到泻下的作用;朱金照^[10]等运用胃排空率测定和小肠推进功能测定等在体实验方法对 15 味中药促胃肠动力作用进行了筛选研究,结果显示白术对胃排空及肠道传输均有促进作用;我们课题组以往的研究亦表明:25% 白术水煎剂可明显促进小鼠胃排空及小肠推进功能,使正常小肠张力增高,使麻痹小肠振幅加大,恢复节律性收缩。本实验运用了离体实验方法,结果表明白术、白芍均能促进大鼠结肠平滑肌的收缩,且白术的作用强于白芍。

防风在治疗消化系统疾病方面有着广泛的应用,本实验组此次实验的结果显示,在所应用防风的几个浓度组中,均对离体大鼠结肠平滑肌收缩表现出不同程度的抑制。

乙酰胆碱作为胆碱能神经释放的一种兴奋性神经递质,可激动胃肠平滑肌细胞膜上的 M 受体,导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,兴奋胃肠平滑肌并产生强烈的收缩运动,对胃肠运动调节有重要作用。当先给予 Ach 作用时,防风可部分抑制 Ach 所引起的结肠平滑肌的收缩,此结果提示防风对结肠平滑肌产生抑制作用可能与 M 胆碱受体被阻断有关。

纳络酮为阿片受体特异拮抗剂,心得安是 β -受体阻断剂,他们都不能明显阻断防风对离体肠肌的抑制作用,提示防风对结肠平滑肌的抑制作用与阿片受体和 β -受体关系不大。

肾上腺素能受体阻断剂酚妥拉明几乎可以完全阻断防风对离体肠肌运动的抑制作用,提示防风

对离体肠肌抑制作用的机制可能与肾上腺素能受体有较为密切的关系。

以上研究结果提示,痛泻要方中至少含有促进胃肠运动功能药和抑制胃肠运动功能药效的两类药物,在 IBS 等肠功能紊乱状态,如何发挥作用,还有待于进行全方,整体动物模型层面的进一步深入研究。根据以上离体平滑肌实验,推测痛泻要方很有可能是根据机体具体状况,起着不同的调节作用,且与肾上腺素能受体、胆碱能 M 受体有关。胃肠道运动的调节,非常复杂,受植物神经,脑肠肽类调节物质多方面多层次调节。从这个角度思考,胃肠道功能异常疾病(如 IBS)也很难说是某一单一因素引起的。所以现代医学一元论的理论指导下的治疗,效果不理想。而中医的体质调整、辨证论治下的复方治疗,一般认为是多靶点,多层次发挥效应的,反而能取得效果。

[参考文献]

- [1] 李熠萌. 中医辨证分型治疗腹泻型肠易激综合征的临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2009, S1: 52.
- [2] 苏国彬, 刘文华, 陈海滨, 等. 以痛泻要方为基本方治疗肠易激综合征随机对照试验的质量评价[J]. 中医杂志, 2008, 49(12): 1077.
- [3] 陈文莉, 郭良集, 莫宁, 等. 加味痛泻要方对家兔体外结肠平滑肌的作用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2007, 15(1): 38.
- [4] 潘锋, 张涛, 陈建永. 痛泻要方对腹泻型肠易激综合征 Cajal 间质细胞影响的研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(6): 1272.
- [5] 李伟, 郑天珍, 翟颂义, 等. 陈皮对大鼠胃平滑肌条收缩活动的作用及机制的探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 7(基础理论研究特集): 49.
- [6] 李晨, 魏睦新. 氢溴酸槟榔碱对豚鼠体外胃不同部位肌条作用及其机制[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2007, 15(2): 77.
- [7] 衣兰娟, 田琳, 梁宁霞, 等. 促结肠动力中药筛选及其机制[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(32): 3093.
- [8] 李建军, 杨小军, 轩辕青史, 等. 清胰汤对豚鼠离体结肠平滑肌收缩活动的影响[J]. 山东中医杂志, 2002, 21(3): 174.
- [9] 覃俊佳, 覃平, 罗宇东, 等. 白芍泻下作用机理的实验研究[J]. 中国中医药科技, 1998, 5(3): 155.
- [10] 朱金照, 冷恩仁, 陈东风, 等. 15 味中药促胃肠动力作用的筛选研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(5): 436.

[责任编辑 聂淑琴]