

苦豆子总碱对糖尿病胃轻瘫大鼠
胃窦平滑肌作用机制的影响

牛彩琴¹, 买文丽², 张团笑^{2*}

(1. 川北医学院 中西医临床医学系, 四川 南充 637007;
2. 川北医学院 基础医学院, 四川 南充 637007)

[摘要] **目的:**观察苦豆子总碱(total alkali *Sophora alopecuroids*, TASa)对糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DGP)大鼠胃窦平滑肌活动的影响。**方法:**①腹腔注射链脲佐菌素建造糖尿病大鼠模型;②测定糖尿病大鼠胃内色素残留率和小肠传输速率以证实 DGP 模型的建立;③用恒温灌流浴槽,将标本分为正常组(NS)和 DGP 模型组,模型组分:TASa, TASa + 异搏定(1×10^{-7} mg·L⁻¹), TASa + 酚妥拉明(1×10^{-6} mg·L⁻¹), TASa + 苯海拉明(1×10^{-6} mg·L⁻¹), TASa + 消炎痛(1×10^{-6} mg·L⁻¹)和 TASa + 阿托品(1×10^{-6} mg·L⁻¹)6 组,以探讨 TASa 对 DGP 大鼠胃窦平滑肌的作用及机制。**结果:**TASa 能增强 DGP 大鼠胃窦平滑肌收缩波的振幅、持续时间和收缩面积($P < 0.01$),但对频率无显著影响;异搏定能明显抑制 TASa 收缩平滑肌的作用,而阿托品、酚妥拉明、苯海拉明和消炎痛无影响。**结论:**TASa 可能是激活 Ca²⁺ 通道而加强 DGP 大鼠胃窦平滑肌的收缩作用。

[关键词] 苦豆子总碱; 糖尿病胃轻瘫; 胃窦平滑肌; 钙离子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0151-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050151

Effects of Total Alkali *Sophora alopecuroids* on Gastro Antrum Smooth Muscle Strips in Diabetic Gastroparesis Rats NIU Cai-qin¹, MAI Wen-li², ZHANG Tuan-xiao^{2*} (1. Department of Clinical in Chinese and Western Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China; 2. Basic Medicine College, North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of the total alkali *Sophora alopecuroids* (TASa) on gastro antrum smooth muscle strips in diabetic gastroparesis rats and the possible mechanisms. **Method:** Forty wister rats were randomly divided into the control group (10 rats) and model group (30 rats). Rats in the model group were given intraperitoneal injection of streptozotoc to induce type I diabetic model. Weight, concentration of blood glucose, residual rate of gastric pigment and intestinal conduction velocity were detected. The isolated perfusion method was used to record amplitude, duration, area and contraction frequency of the gastro antrum smooth muscle *in vitro*. The strips of model group were divided into six groups: TASa group, TASa + 1×10^{-7} mg·L⁻¹ verapamil group, TASa + 1×10^{-6} mg·L⁻¹ phentolamine group, TASa + 1×10^{-6} mg·L⁻¹ benzhydramine group, TASa + 1×10^{-6} mg·L⁻¹ indomethacin group, TASa + 1×10^{-6} mg·L⁻¹ atropine group. The contraction effects of TASa were investigated. **Result:** TASa could increase gastro antrum smooth muscle's contraction amplitude, contraction duration and contraction area, had no effect on contraction frequency. Verapamil could inhibit the gastro antrum smooth muscle contraction of TASa, but atropine, phetolamine, benzhydramine and indomethacin had no contraction effect. **Conclusion:** TASa may activate calcium channel, increase calcium flow to the interior of the cell and increase gastro antrum smooth muscle's contraction.

[Key words] total alkali *Sophora alopecuroids*; diabetic gastroparesis; gastro antrum smooth muscle; Ca²⁺

[收稿日期] 20140708(006)
[基金项目] 四川省教育厅重点项目(08ZA109,14ZA0182)
[第一作者] 牛彩琴,副教授,硕士,从事中医学教学科研与临床工作,Tel:0817-2242262,E-mail:niucaiqin@126.com
[通讯作者] *张团笑,教授,硕士,从事生理学教学与科研工作,Tel:0817-3352020,E-mail:niucaiqin@126.com

糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis,DGP)是继发于糖尿病(diabetes mellitus,DM)基础上以胃肠运动障碍为特点的常见疾病,表现为腹胀、早饱、厌食、嗝气、恶心、呕吐等症状,成为降低患者生活质量的重要并发症^[1],它可能是自主神经功能障碍、胃肠激素分泌异常、高血糖、平滑肌损害以及微血管病变等因素综合影响的结果^[2-3]。现代医学对该病尚无特效疗法,大多选用促胃肠动力药,但未能从根本上缓解 DGP 的病情^[4]。祖国医学对胃肠运动障碍疾病的治疗有着丰富的经验和理论,中药材药源丰富、应用安全,开发胃肠动力新药有着广阔的前景。但目前大多停留在中药复方的临床观察,对其成分及作用机制的研究还没有深入^[5]。苦豆子总碱(total alkali *Sophora alopecuroids*,TASa)是从中药苦豆子的干燥全草和种子提取的总生物碱,具有清热解毒、祛风燥湿的作用^[6],它能使正常回肠、胃窦平滑肌的收缩加强^[7-8]。但对 DGP 模型大鼠胃窦平滑肌的影响未见报道,本实验将 DGP 大鼠胃窦平滑肌的离体肌条置于恒温灌流浴槽,观察 TASa 对 DGP 大鼠胃窦平滑肌活动的影响及作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康成年 Wistar 大鼠 40 只,体重 200 ~ 250 g,雌雄不拘,由兰州大学实验动物中心提供,合格证号医动字第 14-006 号。

1.2 药物与试剂 TASa(兰州大学第一附属医院,批号甘卫药灭制准字(97)022-02,苦豆子总碱 ≥ 95%,用生理盐水配制成 5,10,20 g·L⁻¹备用),异搏定(Vera,批号 00701)和阿托品(Atro,批号 000916)均为上海禾丰制药有限公司,苯海拉明(Denz,批号 00032331 江苏兴化制药厂),酚妥拉明(Phet,批号 20000502),消炎痛(Indo,批号 01595)和链脲佐菌素(STZ,批号 S0130)均为 Sigma 公司产品,Krebs-Henseleit(K-H)液的成分等其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 六套离体恒温灌流肌槽(兰州大学化学系玻璃仪器厂),IBM 电脑两台,内置 BL-410 智能型生物信号处理系统(成都泰盟电子有限公司),JH-2 型张力传感器(中国北京航天医学工程研究所),One Touch Horion 型血糖仪、血糖纸(深圳强生医疗器材有限公司),721-100 型分光光度计(上海天普分析仪器有限公司)。

2 方法

2.1 DM 动物模型的建立 实验前禁食 18 ~ 24 h,饮水不限。40 只大鼠随机分为 2 组:对照组(正常大鼠, $n = 10$ 只)一次性 ip 0.1 mmol·L⁻¹ 的柠檬酸缓冲

液 2 mL·kg⁻¹;模型组(DM 大鼠, $n = 30$ 只)一次性 ip 用 0.1 mmol·L⁻¹ 的柠檬酸缓冲液配制的 2% STZ 60 mg·kg⁻¹。3 d 后禁食,不禁水 6 h,采尾血测空腹血糖,以血糖持续 1 周 ≥ 16.9 mmol·L⁻¹ 为 DM 模型造模成功^[9-10]。

2.2 DGP 胃肠动力的测定 DM 造模成功 10 周后,2 组大鼠禁食不禁水 24 h 后,将 1 g·L⁻¹ 的美蓝溶液 0.4 mL 经口胃管灌入,30 min 后处死大鼠,开腹后取全胃和小肠。陈霞等法^[10]测定胃的排空和小肠传输速率,以确定 DGP 动物模型的建立。

2.3 离体胃窦肌条的制备 实验前禁食 24 h,饮水不限。距幽门约 0.5 cm 处,平行于胃窦环形肌纤维走向切取肌条(8 mm × 2 mm),此为胃窦环形肌条,置于 37 ℃ 恒温的盛有 5 mL K-H 液的灌流浴槽中,持续通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体,用线将肌槽内肌条的一端固定于肌槽底部的挂钩上,另一端固定在肌槽上方的 JH-2 张力换能器上。经张力换能器将肌条的收缩波输入配有 BL-410 系统的电脑进行记录和分析,给予 1.0 g 的负荷,每 20 min 更换 1 次 K-H 液,温育 90 min,待胃窦肌条的自发活动平稳后即可进行实验。

2.4 离体胃窦肌条的分组和处理

2.4.1 TASa 对 DGP 胃窦肌条收缩的影响 对照组:正常肌条;DGP 组:DGP 胃窦肌条。每隔 2 min 累积加入 TASa 使其终质量浓度为 5,20,80 mg·L⁻¹,并测量其收缩波。

2.4.2 阻断剂对 TASa 增强 DGP 胃窦肌条收缩的影响 将 DGP 胃窦肌条分为 5 组:阿托品(1×10^{-6} mg·L⁻¹),酚妥拉明(1×10^{-6} mg·L⁻¹),苯海拉明(1×10^{-6} mg·L⁻¹),消炎痛(1×10^{-6} mg·L⁻¹)和异搏定(1×10^{-7} mg·L⁻¹)。向浴槽分别加入阻断剂温育 2 min 后,再依次加入 TASa (20 mg·L⁻¹),并测量其收缩波。

2.5 观测指标

2.5.1 血糖及体重 采用 One Touch Horion 血糖仪测大鼠尾血空腹血糖。

2.5.2 胃排空及小肠推进率用 721 分光光度计在 640 nm 波长检测的吸光度(A)。计算胃内色素残留率及小肠推进率。

胃内色素残留率 = (测定管 A/标准管 A) × 100%

小肠传输速率 = (a/A) × 100%

a 为小肠被美蓝染成蓝色的末端至幽门的距离,A 为小肠总长度即幽门至回盲瓣的距离。

2.5.3 平滑肌活动观察 平滑肌收缩波的振幅(g/

次)为肌条收缩的幅度;持续时间(s/次)是 1 个完整收缩波所用的时间;收缩面积(g·s/次,BL-410 系统自动生成)为波峰与基线围成的图形面积之和;频率(次/min)是计算每分钟内收缩波的次数。

2.6 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件处理,两组之间进行 *t* 检验,多组之间用方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 DM 动物模型的血糖及体重 造模 3 d 后,DM 组空腹血糖 (30.5 ± 0.76) mmol·L⁻¹ 始终维持在 16.7 mmol·L⁻¹ 以上,对照组血糖 (5.54 ± 0.27) mmol·L⁻¹ 低于 7 mmol·L⁻¹,两组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。10 周后 DM 组大鼠体重 (216 ± 4) g

明显低于对照组 (473 ± 9) g, ($P < 0.01$)。

3.2 DGP 动物模型 DGP 组胃内美蓝残留率 (52.60 ± 1.39)% 明显高于对照组 (41.91 ± 1.20)%, ($P < 0.01$),而小肠传输速率 (30.23 ± 0.91)% 明显低于对照组 (50.15 ± 1.06)%, ($P < 0.01$)。

3.3 TASa 对 DGP 胃窦肌条收缩的影响 TASa 能增加 DGP 胃窦肌条收缩波的振幅、持续时间和收缩面积,但对收缩频率无明显影响,见表 1。

3.4 阻断剂对 TASa 增强 DGP 胃窦肌条收缩的影响 异搏定能明显抑制 TASa 收缩 DGP 胃窦肌条的作用,而阿托品、酚妥拉明、苯海拉明和消炎痛则无影响,见表 2。

表 1 TASa 对 DGP 胃窦平滑肌活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effects of TASa on contractile activity of isolate gastric antra smooth muscle stips in DGP rats($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	TASa/mg·L ⁻¹	振幅/g/次	持续时间/s/次	收缩面积/g·s/次	频率/次/min
对照	—	1.58 ± 0.07 ¹⁾	16.15 ± 0.40 ¹⁾	15.03 ± 0.35 ¹⁾	4.00 ± 0.21
DGP	—	1.19 ± 0.03	12.81 ± 0.27	11.97 ± 0.23	3.95 ± 0.13
TASa	5.0	1.45 ± 0.03 ¹⁾	16.09 ± 0.30 ¹⁾	15.33 ± 0.44 ¹⁾	4.16 ± 0.22
	20.0	1.63 ± 0.04 ¹⁾	17.16 ± 0.43 ¹⁾	17.92 ± 0.51 ¹⁾	3.85 ± 0.14
	80.0	1.82 ± 0.05 ¹⁾	19.80 ± 0.52 ¹⁾	20.19 ± 0.75 ¹⁾	3.84 ± 0.11

注:与 DGP 组相比¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 阻断剂对 TASa(20 mg·L⁻¹) 增强 DGP 胃窦平滑肌活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of TASa of 20.0 mg·L⁻¹ on contractile activity of isolate gastric antra smooth muscle stips in DGP rats after different antagonist($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	阻断剂/mg·L ⁻¹	TASa/mg·L ⁻¹	振幅/g/次	持续时间/s/次	收缩面积/g·s/次	频率/次/min
TASa	—	20.0	1.63 ± 0.04	17.16 ± 0.43	17.92 ± 0.51	3.95 ± 0.13
Atro + TASa	1 × 10 ⁻⁶	20.0	1.84 ± 0.06	16.71 ± 0.53	15.25 ± 0.37	3.84 ± 0.16
Vera + TASa	1 × 10 ⁻⁷	20.0	1.28 ± 0.03 ¹⁾	12.06 ± 0.27 ¹⁾	12.18 ± 0.28 ¹⁾	3.84 ± 0.16
Indo + TASa	1 × 10 ⁻⁶	20.0	1.58 ± 0.06	15.56 ± 0.52	16.81 ± 0.49	3.91 ± 0.22
Denz + TASa	1 × 10 ⁻⁶	20.0	1.40 ± 0.07	16.23 ± 0.82	16.43 ± 0.37	3.76 ± 0.14
Phet + TASa	1 × 10 ⁻⁶	20.0	1.69 ± 0.06	16.01 ± 0.53	15.70 ± 0.60	3.84 ± 0.11

注:与 TASa 组相比¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

DM 累及全身多组织器官,严重危害人类健康和生活质量。DM 胃肠动力障碍是由于代谢紊乱累及胃肠道功能障碍而引起的,是其慢性并发症在胃肠道的具体表现^[11]。DGP 是 DM 胃肠动力障碍中较为常见并发症,以胃蠕动减慢或缺如及胃排空延迟等为特征。DGP 的发病率可达 30% ~ 50%^[12-13]。本实验用 STZ 法建立 DM 模型 10 周后,测定胃内色素残留率和小肠传输速率,与对照组相比有显著性差异,表明胃肠动力明显下降,DGP 造模成功^[6]。

目前对 DGP 的治疗除控制血糖外,主要采用胃肠动力药,以增加胃肠的蠕动,而钙离子在介导平滑肌收缩反应中起核心作用^[14],即细胞内游离 Ca²⁺ 升高是启动平滑肌兴奋-收缩耦联的关键。Ca²⁺ 通过受体依赖性钙通道和电压依赖性钙通道进入细胞内而升高胞浆中游离 Ca²⁺, Ca²⁺ 与钙调蛋白(calmodulin, CaM) 结合,生成 4 Ca²⁺·CaM 复合物激活肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK),后者使横桥 ATP 酶活性提高,引发肌丝滑行和肌肉收缩。细胞外 Ca²⁺ 主要通过 L-型电压依

赖性钙通道进入胞内,该通道常随动作电位的发生而开放^[15-16]。本实验在使用 L-型电压依赖性钙通道阻断剂异搏定后,TASa 增强胃窦肌条的作用明显减弱,说明 TASa 主要是通过增强 L-型电压依赖性钙通道的活性,促使细胞外 Ca^{2+} 内流,从而增加胃窦肌条收缩波的振幅、持续时间和收缩面积。有报道 TASa 提高胆囊肌条的张力,可能是 TASa 作用于胆囊平滑肌细胞膜的钙通道,升高胞内 Ca^{2+} 的浓度而加强胆囊肌条的收缩^[17],与本实验的结果一致。

G 蛋白耦联受体是形成膜信号蛋白的主要组成之一,其受体的结构和功能得到了充分的证明,有助于进一步了解药物的作用机制^[18]。细胞膜上的 M 受体尤其是 $\text{M}_{2,3}$ 和 α_1 受体均属于 G 蛋白耦联受体,前者主要属于 $\text{G}_{\text{p/s}}$,后者则主要是 $\text{G}_{\text{q/11}}$,两种受体与其激动剂结合后,可激活 G 蛋白生成三磷酸肌醇(IP_3)与二酰甘油(DG),进而使胞内 Ca^{2+} 增加,增强平滑肌的收缩活动。多巴胺(DA)受体拮抗剂如甲氧氯普胺和 5-羟色胺(5-HT_4)受体激动剂如莫沙比利等都可促进胃肠运动,增加胃排空,二者殊途同归,前者是阻断 DA 受体增加乙酰胆碱(ACh)的释放,而后者则激活 5-HT_4 受体以增加 ACh 的释放,促进胃肠运动。本实验用 M 受体阻断剂阿托品温育肌条后,对 TASa 增加 DGP 胃窦平滑肌的收缩作用无影响,说明 TASa 增加 DGP 胃窦平滑肌的收缩作用与 M 受体无关。至于 TASa 对 DA 受体和 5-HT_4 受体是否有影响,还有待于进一步的研究。

本实验还分别采用酚妥拉明、苯海拉明、消炎痛温育肌条后,对 TASa 增加其收缩的作用也无影响,表明 TASa 的作用与 α 受体、H 受体和前列腺素受体无关。有报道表明:TASa 加强胆囊平滑肌的收缩作用,与 M 受体,H 受体,壁内神经节受体, α 受体和前列腺素受体可能无关的结果一致^[17]。

本实验研究提示 TASa 可能是通过激活平滑肌细胞膜上钙通道,使胞内 Ca^{2+} 升高,加强胃窦平滑肌的收缩,改善胃肠动力,为临床许多胃肠动力失调性疾病,如 DGP、胃节律障碍、胃溃疡和肠炎等治疗提供理论指导。

[参考文献]

[1] Thazhath S S, Jones K L, Horowitz M, et al. Diabetic gastroparesis: recent insights into pathophysiology and implications for management [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2013,7(2):127-139.
[2] 彭涛,何劲松,魏寿江. 外科治疗 2 型糖尿病的主要

手术方式与机制[J]. 川北医学院学报,2014,29(1): 101-105.
[3] 刘云,孙岩,薛绮萍,等. 糖尿病胃轻瘫的诊断及发病机制[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(3):290-293.
[4] 钱秋海,王志程,赵懿,等. 糖胃安对四氧嘧啶糖尿病胃轻瘫模型大鼠 5-HT_{2A} 的影响[J]. 中国中药杂志, 2008,33(5):541-544.
[5] 张三印,董宇,杨鹏. 胃肠运动障碍发病机制与证治 [J]. 中医药学刊,2003,21(2):209-211.
[6] 牟新利,王武宝,巴杭,等. 中药苦豆子化学成分及生理活性的研究进展[J]. 新疆师范大学学报:自然科学版,2005,24(1):45-50.
[7] 张琳娜,白洁. 苦豆子药理作用的研究进展[J]. 宁夏医学院学报,2004,26(3):214-217.
[8] 牛彩琴,买文丽,张团笑. 苦豆子总碱对大鼠胃窦环形平滑肌作用机制的研究[J]. 四川中医,2012,30(11):55-58.
[9] 李春霞,秦晓民,徐敬东. 蒲黄对糖尿病胃轻瘫大鼠离体胃平滑肌条的作用[J]. 中成药,2004,26(5): 426-428.
[10] 陈霞,赵宏贤,徐富翠,等. I 型糖尿病胃轻瘫大鼠动物模型建立与优化[J]. 四川动物,2010,29(5): 630-632.
[11] Stevens J E, Jones K L, Rayner C K, et al. Pathophysiology and pharmacotherapy of gastroparesis: current and future perspectives [J]. Expert Opin Pharmacother,2013,14(5):1171-1186.
[12] 朱宏伟,施晓慧,刘红,等. 糖尿病动物模型研究概述 [J]. 川北医学院学报,2014,29(1):438-440.
[13] 刘云,孙岩,薛绮萍,等. 糖尿病胃轻瘫的诊断及发病机制[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(3):290-293.
[14] 戴芸. 钙离子在胃肠平滑肌收缩机制中的作用[J]. 国外医学:消化系疾病分册,2002,22(1):17-20.
[15] Zheyu C, Qinghui Q I, Lixin L, et al. Effects of emodin on Ca^{2+} signal transduction of smooth muscle cells in multiple organ dysfunction syndrome[J]. J Surg Res, 2006,131(1):80-85.
[16] 雷开键,黄燮南,吴芹,等. 灯盏花素抑制去甲肾上腺素而增强高钾诱发的细胞内钙升高[J]. 川北医学院学报,2004,19(4):6-7.
[17] 苏丽梅,戴贵东,丁娟,等. 苦豆子总碱对豚鼠离体胆囊平滑肌条收缩功能的影响[J]. 宁夏医科大学学报,2011,33(1):13-15.
[18] Hollmann M W, Strumper D, Herroeder S, et al. Receptors, G-proteins and their interactions [J]. Anesthesiology,2005,103(5):1066-1078.

[责任编辑 聂淑琴]