

九节龙皂苷对胃肠平滑肌功能的兴奋作用

徐志立 陶小军 张明波 窦德强 康廷国

摘要 目的 考察九节龙皂苷对大鼠及小鼠不同状态下胃肠功能的兴奋作用。方法 给予正常小鼠及阿托品导致胃肠功能障碍小鼠九节龙皂苷后测定其胃排空及肠推进,分别测定在正常克氏液和低钙克氏液中孵育的大鼠离体小肠收缩性,并用 Western blot 法检测九节龙皂苷对便秘大鼠肠肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 表达的影响。结果 九节龙皂苷可促进正常及胃肠功能障碍小鼠的胃排空及肠推进,增强大鼠离体小肠收缩性,且可刺激便秘大鼠 MLCK 的表达。结论 九节龙皂苷可促进平滑肌 MLCK 的表达,进而增强胃肠平滑肌运动功能。

关键词 九节龙皂苷 胃肠功能 肌球蛋白轻链激酶

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.09.012

Stimulating Effects of Ardisiposilioside - I on Gastro - intestinal Function. Xu Zhili, Tao Xiaojun, Zhang Mingbo, et al. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning 116600, China

Abstract Objective To investigate the stimulating effects of ardisiposilioside - I (ARD - I) on gastro - intestinal function. **Methods** The gastric emptying and intestinal propulsion in normal mice or gastro - intestinal dysfunction mice induced by atropine were determined respectively, the contractibility of isolated intestine in rats was researched, and the expression of myosin light chain kinase (MLCK) in intestine in rats was detected by Western blot method. **Results** ARD - I could promote the gastric emptying and intestinal propulsion in mice in any state, improve the contractibility of isolated intestine in rats incubated in normal krebs solution or low calcium krebs solution, and enhance the expression of MLCK in intestine in rats. **Conclusion** ARD - I showed stimulating effects obviously on gastro - intestinal function, which might be reached by increasing the expression of smooth muscle MLCK.

Key words Ardisiposilioside - I (ARD - I); Gastro - intestinal function; Myosin light chain kinase (MLCK)

川产九节龙 (*Ardisia pusilla* A. DC.) 系九节龙的全草植物,为紫金牛科紫金牛属,是南方多省传统药,在民间使用较多,主要含三萜皂苷等成分,具有活血通络、消肿止痛、抗炎止咳功效^[1]。九节龙皂苷 I (ardisiposilioside - I, ARD - I) 是九节龙含有的五环三萜类皂苷成分,具有抗肿瘤及增强免疫等多种药理活性^[2,3]。目前,关于 ARD - I 对胃肠功能的调节作用研究较少。本研究采用经典药理模型,考察 ARD - I 对胃肠平滑肌收缩功能的影响。

材料与方法

1. 动物、仪器、药品及试剂:昆明种小鼠,体重 22 ~ 25g,雌雄各半;SD 大鼠,体重 170 ~ 220g,雌性,购自大连医科大学实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(辽)2013 - 0003。主要仪器:HW - 400S 恒温平滑肌槽、BL - 420F 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);JM - 250 型电泳仪、转膜仪(大连竞

迈生物科技公司);UVP 凝胶成像系统(英国 UVP 有限公司);MA240D 电子分析天平(上海第二天平仪器厂)。主要试剂:ARD - I 为中国人民解放军第四军医大学口腔医院提取的标准品,实验时用蒸馏水配制所需药物浓度;阿托品(上海信谊金朱药业有限公司,批号:120203,规格:2ml:1mg);盐酸肾上腺素注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号:110411,规格:1ml:1mg);果导片(大同云岗有限公司,批号:1306028,规格:50 毫克/片);新斯的明(上海信谊金朱药业有限公司,批号:120203,规格:2ml:1mg);复方地芬诺酯片(常州康普药业有限公司,批号:1306028,规格:2.5 毫克/片)。凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒、凯基全蛋白提取试剂盒、凯基蛋白分子质量 Marker(南京凯基公司,批号:20120910、20120914、20120910);肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)一抗(美国 Abcam 公司, No. 76092)。克氏液配制方法参照文献[4],pH 值为调节 7.4;低钙克氏液中氯化钙终浓度 1.25mmol/L, pH 值调至 7.4。

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2012M510834)

作者单位:116600 大连,辽宁中医药大学药学院

通讯作者:康廷国,电子信箱: kangtg@lnutcm.edu.cn

2. 半固体营养糊的配制^[5]:称取 5g 羧甲基纤维素,用 125ml 蒸馏水溶解。然后,依次加入 4g 白糖、8g 奶粉、4g 淀粉,边加边搅拌。混合,搅拌均匀后加入 1.5g 活性炭并搅匀,即可配制成含 150g 的营养糊和活性炭的约 150ml 混合物。4℃ 冷藏待用,用前复至室温。

3. 胃排空、小肠推进的测定^[6]:测定胃排空功能方法:小鼠脱颈椎处死且开腹,胃贲门和幽门用细线结扎,胃用剪刀取下后滤纸拭干,称量即为胃全重。沿胃大弯剪开胃体后洗去胃内容物,滤纸拭干,称量胃净重。胃残留率(%)=(胃全重-胃净重)/半固体营养糊×100%。小肠推进功能测定:处死动物,开腹,分离肠系膜,上端至幽门,下端至回盲部的肠管均用剪刀取出,置于托盘上。轻轻拉直,肠管长度作为“小肠总长”。从幽门至炭末前沿作为“炭末推进距离”。小肠推进率(%)=炭末推进距离/小肠全长×100%。

4. 测定 ARD-I 对正常小鼠胃排空、小肠推进作用^[4-7]:小鼠 50 只,均衡随机法分为 5 组。正常对照组灌胃给予等体积蒸馏水;ARD-I 高、中、低剂量组(100、50、25mg/kg)分别灌胃给予相应浓度 ARD-I 溶液,阳性对照组给予 1000mg/kg 果导。每日 1 次,连续 5 天,观察小鼠排便情况。末次给药 60min 后,灌胃给予半固体营养糊 0.8ml,10min 后处死小鼠,测定胃残留率和小肠推进率。

5. 测定 ARD-I 对阿托品致胃肠动力障碍小鼠胃排空、小肠推进作用^[4-7]:小鼠 60 只,均衡随机法分为 6 组。正常组,模型对照组,灌胃等体积蒸馏水,其余各组给药剂量同“测定 ARD-I 对正常小鼠胃排空、小肠推进作用”项中所述,每天 1 次,连续 5 天,末次给药 30min 后,模型对照组及给药组皮下注射 2mg/kg 阿托品,正常组皮下注射等体积生理盐水。50min 后给予每只小鼠 0.8ml 半固体营养糊,10min 后处死小鼠,测定各组小鼠胃残留率和小肠推进率。

6. ARD-I 对大鼠离体小肠收缩性作用的测定^[4]:实验前将大鼠禁食、不禁水 24h,处死后立即剖腹,取 2cm 小肠,用眼科镊子小心除去肠系膜,用克氏液冲洗肠内容物 2 次,在通气管和张力换能器之间固定肠管并保持肠管直立于 37℃ 恒温克氏液中,通空气,适应性孵育 30min 后,描记大鼠离体小肠正常收缩曲线为对照,滴加不同浓度 ARD-I 于孵育体系中并记录药物作用稳定后 10min 内收缩曲线。设定正常克氏液中小肠稳定收缩曲线的平均张力及平均振幅为 100%,其余为与其相比所得相对值。

7. 测定 ARD-I 对便秘大鼠肠平滑肌 MLCK 表

达的调节:(1)便秘大鼠模型的制备^[8]:30 只大鼠,随机选出 6 只大鼠作为正常对照组,灌胃给予等体积生理盐水。余下 24 只灌胃给予复方地芬诺酯 10mg/kg,每天 1 次,连续 14 天。可见给予复方地芬诺酯后,大鼠毛色光泽度降低,躁动不安,排便明显减少,且多干燥质硬,标志造模成功。便秘大鼠均衡随机分为 4 组,即便秘大鼠模型组,ARD-I 高、中、低剂量组,分别灌胃给予 ARD-I 100、50、25mg/kg,连续给药 7 天,每天给药 1 次,最后一次给药后处死大鼠,取小肠,利用凯基蛋白提取试剂盒,提取肠平滑肌总蛋白。(2)Western blot 法检测^[9]:用 anti-MLCK 抗体以及 GAPDH 抗体分别配成 1:1000 和 1:800 的浓度。转膜后与抗体 4℃ 孵育过夜,室温下脱色,摇床振荡,TTBS 洗 3 次,室温下用稀释二抗(1:2000)孵育 90min,显影,图像采集,Quantity One 软件扫描分析。以正常组大鼠肠 MLCK 表达量面积灰度值作为 100%,其余为与其比较所得相对值。

8. 统计学方法:结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 统计学软件对数据进行统计分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ARD-I 对正常小鼠胃排空和小肠推进的促进作用:ARD-I 给药组及果导阳性对照组与正常组相比胃残留率减小,小肠推进率增加,且随着 ARD-I 剂量的增加,此效应呈剂量依赖性增强($P < 0.05$, $P < 0.01$,表 1)。

表 1 ARD-I 对正常小鼠胃排空和小肠推进的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	胃残留率(%)	小肠推进率(%)
正常对照组	-	71.54 ± 5.02	70.44 ± 5.17
ARD-I 高剂量组	100	53.32 ± 2.69**	91.23 ± 10.15**
ARD-I 中剂量组	50	60.08 ± 3.45*	83.50 ± 9.14*
ARD-I 低剂量组	25	65.13 ± 6.84	72.56 ± 6.68
果导对照组	1000	50.42 ± 2.65**	93.17 ± 12.58**

与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2. ARD-I 对阿托品致胃肠动力障碍小鼠胃排空和小肠推进的促进作用:小鼠给予阿托品后,小鼠胃排空及小肠推进率显著降低,显示阿托品可抑制胃肠功能。而给予小鼠 ARD-I 后,高、中剂量组小鼠胃排空与肠推进均明显改善,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$,表 2)。100mg/kg ARD-I 促进胃排空及肠推进作用与 1000mg/kg 果导的促进作用

相当($P > 0.05$),虽然 50mg/kg ARD - I 的促进胃排空作用弱于果导阳性对照组($P < 0.01$),但对小肠推进率的作用与果导组相当($P > 0.05$)。

表 2 ARD - I 对阿托品致胃肠动力障碍小鼠胃排空和小肠推进的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	胃残留率 (%)	小肠推进率 (%)
正常对照组	-	65.23 $\pm$ 3.54	73.26 $\pm$ 4.57
模型对照组	-	80.4 $\pm$ 2.26 [△]	56.34 $\pm$ 4.99 [△]
ARD - I 高剂量组	100	63.0 $\pm$ 8.73 [*]	82.0 $\pm$ 4.72 [*]
ARD - I 中剂量组	50	71.05 $\pm$ 5.66 ^{*#}	76.2 $\pm$ 6.12 [*]
ARD - I 低剂量组	25	74.87 $\pm$ 4.27 ^{**}	67.8 $\pm$ 7.42 [#]
果导对照组	1000	59.21 $\pm$ 3.59 [*]	87.3 $\pm$ 11.8 [*]

与正常对照组比较, [△] $P < 0.01$;与模型对照组比较, ^{*} $P < 0.01$;与果导对照组比较, [#] $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

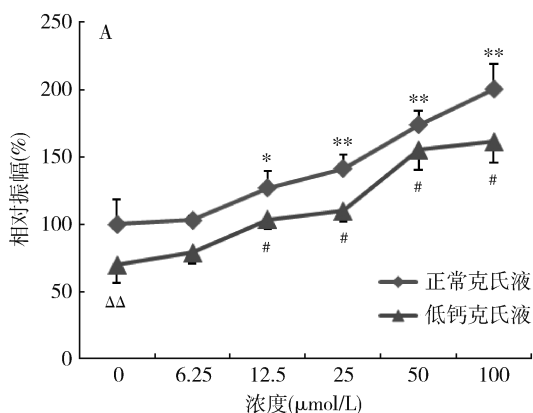


图 1 九节龙皂苷对大鼠离体小肠收缩性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

与正常克氏液中未加 ARD - I 对照组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$;低钙克氏液中未加 ARD - I 模型组与正常克氏液中未加 ARD - I 对照组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$;与低钙克氏液中未加 ARD - I 模型组比较, [#] $P < 0.01$

4. 对于大鼠离体小肠收缩,ARD - I 显示与阿托品、肾上腺素的相互拮抗及与乙酰胆碱的相加作用:第 1、第 4、第 7 组均表示正常克氏液中大鼠离体小肠(正常对照组)收缩幅度,第 2、第 5 组代表分别加入 1 μ mol/L 阿托品、1 μ mol/L 肾上腺素,大鼠离体小肠收缩振幅明显下降($P < 0.01$);第 8 组表示加入 1 μ mol/L 乙酰胆碱后,小肠收缩显著增强($P < 0.01$)。再加入 25 μ mol/L ARD - I 后,可见 ARD - I 可显著拮抗阿托品、肾上腺素所致的小肠收缩性抑制,显著相加乙酰胆碱所致小肠收缩性兴奋(分别见第 3、第 6、第 9 组,图 2)。

5. ARD - I 对便秘大鼠 MLCK 表达的促进作用:以 GAPDH 为内参,比较 ARD - I 对正常组、便秘模型组、给药组 MLCK 表达的影响。如图 3 所示,与正常组比较,便秘大鼠肠平滑肌肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)表达明显降低,便

3. ARD - I 对大鼠离体小肠收缩性的兴奋作用:正常克氏液与低钙克氏液的钙离子浓度分别为 2.5、1.25mmol/L。由图 1A 结果可见,正常克氏液中加 ARD - I 前,大鼠离体肠管的相对收缩振幅为 100.0%,孵育液采用低钙克氏液,大鼠小肠收缩振幅显著降低为 69.8%;累加 ARD - I 12.5、25、50、100 μ mol/L 时,无论是正常克氏液中孵育的,还是低钙克氏液中孵育的大鼠离体肠管的收缩振幅均增高,并具有剂量依赖性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。对于无论是孵育在高钙克氏液中,还是孵育在低钙克氏液中的离体肠管相对张力,ARD - I 均显示明显刺激作用。

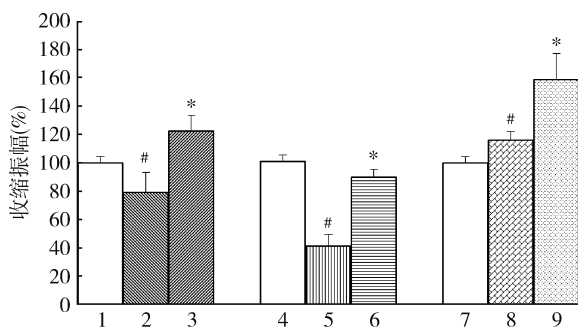
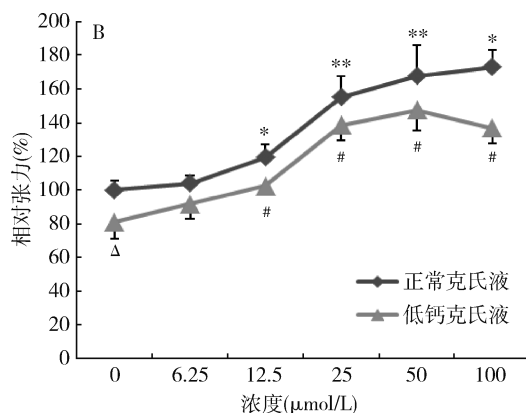


图 2 离体小肠中 ARD - I 对阿托品、肾上腺素的拮抗作用及与乙酰胆碱的相加作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

与加药前对照组比较, [#] $P < 0.01$;与加 ARD - I 前实验组比较, ^{*} $P < 0.01$

秘大鼠给予 ARD - I 后,MLCK 表达量可显著升高。

讨 论

胃肠平滑肌的收缩与舒张是消化道最基本的运

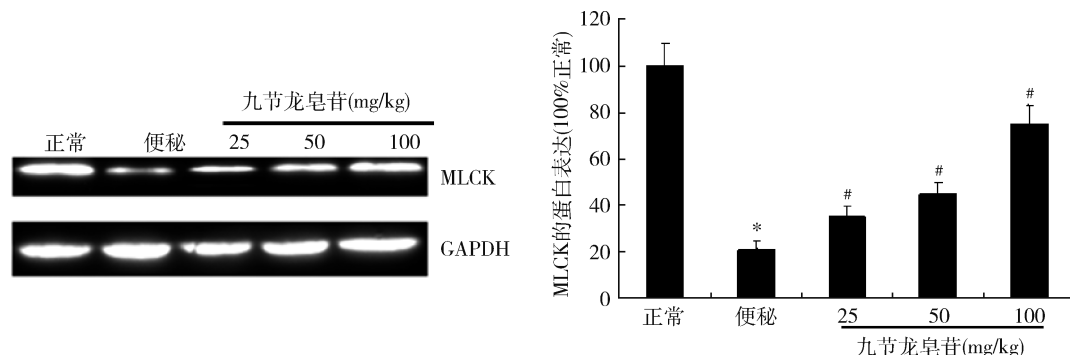


图 3 ARD - I 对便秘大鼠 MLCK 的蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$

动形式,肠蠕动与胃排空是胃肠平滑肌在神经、体液、细胞因子等调节下,电活动、机械活动互相协调的结果,是一个复杂的神经、肌肉高度协调的生理过程。胃肠动力障碍患者出现的早饱、恶心、腹泻、腹胀或便秘等症状,基本病理为胃排空及肠推进功能异常。小鼠胃排空、肠推进及大鼠离体肠平滑肌收缩是研究胃肠功能的常用方法。本实验结果表明,ARD - I 可剂量依赖性刺激正常小鼠和阿托品所致胃肠动力障碍小鼠的胃排空和肠推进,100mg/kg ARD - I 显著促进胃排空及肠推进,作用与 1000mg/kg 果导相当 ($P > 0.05$),虽然 50mg/kg ARD - I 的促进胃排空作用不及果导组 ($P < 0.01$),但对小肠推进率的作用与其相当 ($P > 0.05$)。12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ ARD - I 可明显促进孵育在正常或低钙克氏液中大鼠离体肠管的收缩,并呈剂量依赖性。并且,25 $\mu\text{mol/L}$ ARD - I 对大鼠离体肠管收缩的刺激效应与阿托品、肾上腺素有拮抗作用,与乙酰胆碱有相加作用。

普遍认为平滑肌收缩的分子机制是在 Ca^{2+} 参与下,肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 促进肌球蛋白调节轻链 (20kDa regulating myosin light chains, MLC20) 磷酸化,磷酸化 myosin Mg^{2+} - ATPase 活性增加,ATP 分解为 ADP 释放高能磷酸键,提供能量,促进肌球蛋白与肌动蛋白相互作用导致平滑肌收缩^[10]。其中 MLCK 是平滑肌收缩分子调控中的关键酶。胃肠平滑肌的 MLCK 基因敲除后,会出现严重的胃肠动力异常症状 (胃肠平滑肌松弛、小肠推动减慢)^[11]。也有研究表明,便秘大鼠肠平滑肌 MLCK 表达量亦显著降低^[11]。本实验结果表明:给予大鼠复方地芬诺酯造成便秘动物模型后,与正常大鼠相比,便秘大鼠肠平滑肌中 MLCK 表达量明显减少;给予 25、50 及 100mg/kg 的 ARD - I 后,便秘大鼠肠平滑肌 MLCK 表达量显著增加,提示 ARD - I 可能通过调节肠

MLCK 表达缓解便秘大鼠胃肠功能的抑制状态。总之,ARD - I 对正常及抑制状态的胃肠平滑肌收缩性均有明显促进作用,这种促进作用可能是通过促进平滑肌 MLCK 的表达实现的,关于其具体作用机制仍然需要深入研究。

参考文献

- 1 吴淑英,蔡杏栗,杨成梓. 九节龙的生药组织学研究 [J]. 中药材, 2016, 39(3): 527 - 529
- 2 曹伟宇,王鹏远,冯斌,等. 离体培养人肠道菌群对 ADS - II 生物转化的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(8): 1357 - 1361
- 3 党欢,冯斌,王鹏远,等. 九节龙皂苷抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 216 - 221
- 4 徐志立,张莹,陶小军,等. 环氧橙皮素对平滑肌肌球蛋白功能及肠平滑肌收缩性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 149 - 153
- 5 吴春福,陈多. 小鼠胃排空模型的探讨 [J]. 中国药理学通报, 1997, 13(3): 271 - 272
- 6 赵松岩,杨静玉,王金辉,等. 海星醇提取物促小鼠胃排空作用考察及有效部位确定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(10): 48 - 50, 55
- 7 徐芳,丁宝刚,刘孟安,等. 拆方研究胃肠舒片对小鼠胃肠动力障碍的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(3): 199 - 200
- 8 刘丽莎,张微,赵敏,等. 针刺大鼠俞募穴对慢性传输便秘小鼠结肠组织形态学的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1): 255 - 259
- 9 徐志立,陶小军,张莹,等. 五味子甲素对大鼠及小鼠平滑肌功能的抑制作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 127 - 129
- 10 Xu Z, Meng X, Zhang M, Kang T. Bi - directional regulation of ginsenoside Re on smooth muscle myosin of gizzard [J]. J Med Plant Res, 2011, 5(32): 7054 - 7060
- 11 Chen D, Xiong Y, Lin Y, et al. Capsaicin alleviates abnormal intestinal motility through regulation of enteric motor neurons and MLCK activity: Relevance to intestinal motility disorders [J]. Mol Nutr Food Res, 2015, 59(8): 1482 - 1490 (收稿日期:2016 - 12 - 28)

(修回日期:2017 - 01 - 14)