

大黄素对 MODS 大鼠结肠平滑肌细胞动力信号转导的影响

陈哲宇¹ 齐清会² 马 涛¹ 简 序³

摘要 目的 观察大黄素对细菌性腹膜炎所致多器官功能不全综合征(MODS)大鼠结肠平滑肌细胞动力的影响,探讨大黄素对该平滑肌细胞钙离子的作用机制。**方法** 制成大鼠 MODS 模型后观察大黄素对 MODS 大鼠结肠平滑肌肌条和平滑肌细胞收缩的影响;特异性的肌球蛋白轻链激酶抑制剂(ML-7)和选择性的蛋白激酶 C 抑制剂(Calphostin C)对大黄素收缩 MODS 大鼠结肠平滑肌的影响及大黄素对 MODS 大鼠结肠平滑肌细胞钙离子的影响。**结果** 大黄素能直接收缩 MODS 大鼠结肠平滑肌肌条和平滑肌细胞;ML-7 和 Calphostin C 可不同程度的抑制大黄素的收缩作用;MODS 状态下,大黄素仍然能升高细胞内钙离子的浓度;在 MODS 模型组肝素(三磷酸肌醇(IP₃)受体抑制剂,Heparine)和 ryanodine 受体(RyR)阻滞剂能抑制大黄素升高钙离子;钙离子螯和剂(EGTA)和尼莫地平(特异性的细胞膜电压依赖性钙通道抑制剂,nifedipine)没有明显作用。**结论** 大黄素能直接收缩 MODS 大鼠结肠平滑肌。它是通过升高钙离子的信号途径 ML-CK 和增加钙敏感性的 PKC α 信号途径来介导 MODS 大鼠平滑肌收缩的。升高 MODS 大鼠结肠平滑肌钙离子的机制主要是通过肌浆网上 IP₃ 和 RyR 两种钙离子通道作用的受体。

关键词 平滑肌;钙离子;MODS;大黄素

Effect of Emodin on Motility Signal Transduction in Colonic Smooth Muscle Cells in Rats with Multiple Organ Dysfunction Syndrome CHEN Zhe-yu, QI Qing-hui, MA Tao, et al *The West China Hospital of Sichuan University, Chengdu (610041)*

Objective To observe the effect of emodin on motility signal transduction and calcium ion in colonic smooth muscle cells (SMC) in rats with bacterial peritonitis caused multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Methods** Observation was conducted in colon of MODS model rats on (1) effects of emodin on the contraction of muscular strip and cells of colonic smooth muscle, and influences of specific myoglobin light chain kinase inhibitor (ML-7) and selective protein kinase C inhibitor (Calphostin C) on these effects; and (2) effect of emodin on calcium ion in SMC. **Results** Emodin could directly contract the muscular strip and cells of smooth muscle; ML-7 and Calphostine could inhibit these contractile action to some extent. Under MODS condition, emodin could still increase the intracellular calcium ion concentration; this effect could be inhibited by heparin (inosamine triphosphate receptor inhibitor IP₃ and ryanodine receptor inhibitor in MODS model but the calcium chelator EGTA and nifedipine (the specific cell membrane voltage dependent calcium channel blocker) showed no influence on it. **Conclusion** Emodin could directly contract the colonic smooth muscle in MODS model rats, which is mediated by raise the signal path MLCK of calcium ion and the PKC α path for increase calcium sensibility. The mechanism of increasing calcium ion is mainly through IP₃ and RyR the two calcium ion channel receptor in the sarcoplasm.

Key words smooth muscle; calcium ion; multiple organ dysfunction syndrome; emodin

在多年的临床实践中,发现大黄和以大黄为主的

下法方剂对多器官功能不全综合征(MODS)的治疗作用首先是从促进胃肠运动开始的。最近的研究表明,大黄的主要成分大黄素促进胃肠平滑肌的收缩与升高细胞内钙离子密切相关^[1]。本实验通过模拟细菌性腹膜炎致 MODS 的模型来观察大黄素对 MODS 大鼠结肠动力的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助(No. 30171198)

作者单位:1. 天津医科大学总医院中西医结合外科(天津 300070);

2. 大连医科大学第一附属医院;3. 天津医科大学总医院中心实验室

通讯作者:陈哲宇,现为四川大学华西医院博士后(成都 610041),

E-mail: zheyuchen@sina.com.cn

材料和方法

1 动物 选用 12 周雄性 Wistar 大鼠, 体重 (250 ± 25)g, 购自中国军事医学科学院动物实验中心。

2 药物 Heparine, ryanodine, EGTA, nifedipine, ML-7、大黄素、Ⅱ型胶原酶、大豆胰蛋白抑制剂、Calphostin C 购自 Sigma 公司。Fluo-3AM, F-127 购自 Molecular Probes 公司。

3 实验仪器 Bio-rad Radiance 2000 激光扫描共聚焦显微镜(美国伯乐公司); Cimas 2000 图像分析系统(北京航空航天大学); Biopac systems MP150 型多导生理仪(美国 Biopac 公司)。

4 方法

4.1 MODS 大鼠结肠平滑肌肌条的制备及检测方法 按文献^[2]方法于无菌条件下向腹腔内注射血清型 O127:H6 的大肠杆菌, 大鼠发生 MODS 后, 处死大鼠。迅速取出远端结肠, 去除黏膜层, 制成 15mm × 5mm 环行肌条。将肌条固定于多导生理仪上检测。检测方法: 以给药前 5min 肌条的张力和收缩波平均振幅为对照值, 给药后 5min 肌条的张力和收缩波平均振幅为效应值。幅度变化百分数 = (效应值 - 对照值) / 对照值 × 100%。

4.2 平滑肌细胞收缩的测定 按 Cook^[3]方法, 酶解分离 MODS 结肠平滑肌细胞, 用台盼蓝染色确定细胞活力达 90% 以上, 符合实验要求。细胞浓度稀释为 5 × 10⁵/ml, 取 0.25 ml 细胞混悬液, 加入所要求的实验试剂, 30 s 后加入 2.5% 的戊二醛终止反应。用图像分析系统测定平滑肌细胞长度。

4.3 平滑肌细胞钙离子浓度的测定 用含终浓度为 7.5 μmol/L Fluo-3 和 0.02% F-127 的 HEPES 缓冲液将平滑肌细胞孵育 1h 钙负载后, 加 DMEM 接种于 Chamber slider 上, 孵育 0.5 h。用共聚焦显微镜和 Lasersharp 软件收集并分析钙离子图像。

5 统计学方法 使用 SPSS 11.0 统计软件包进行 *t* 检验。

结 果

1 ML-7 和 Calphostin C 对大黄素收缩平滑肌肌条的影响 100 μmol/L 的大黄素作用于 MODS 大鼠远端结肠环行肌条作用后, 振幅平均升高 (0.73 ± 0.29); 10 μmol/L ML-7 与 100 μmol/L 的大黄素作用后肌条振幅平均升高 (0.53 ± 0.18), 两组比较, 差异有显著性 (*t* = 2.79, *P* < 0.05); 5 μmol/L Calphostin C 和 100 μmol/L 的大黄素作用后肌条振幅平均升高

(0.61 ± 0.15), 和单用大黄素组比较两组差异有显著性 (*t* = 2.29, *P* < 0.05)。

2 ML-7 和 Calphostin C 对大黄素收缩平滑肌细胞的影响 大鼠 MODS 状态下结肠平滑肌细胞长度是 (113.2 ± 30.4) μm, 应用大黄素后结肠平滑肌细胞长度是 (71.2 ± 21.9) μm; 应用前后比较, 差异有显著性 (*P* < 0.05)。将 ML-7 和 Calphostin C 分别与 MODS 状态下平滑肌细胞孵育后, 再用大黄素刺激收缩发现大黄素的作用被部分抑制。ML-7 和大黄素作用后, 平滑肌细胞的长度是 (91.1 ± 23.8) μm, 与单用大黄素比较, 差异有显著性 (*P* < 0.05); Calphostin C 和大黄素作用后, 平滑肌细胞的长度是 (85.3 ± 25.9) μm, 与单用大黄素比较, 差异有显著性 (*P* < 0.05)。

3 大黄素对 MODS 状态下平滑肌细胞钙离子的作用 设正常大鼠结肠平滑肌细胞静息时钙离子水平为 1.00 ± 0.07 (细胞数为 30), 经测量发现 MODS 组静息时钙离子水平为 0.70 ± 0.10 (细胞数为 31), 两组经大黄素刺激后钙离子均升高, MODS 组最高可达 1.60 ± 0.29。且钙离子在 30 ~ 50 s 内迅速达到高峰, 而后逐渐下降, 见图 1。

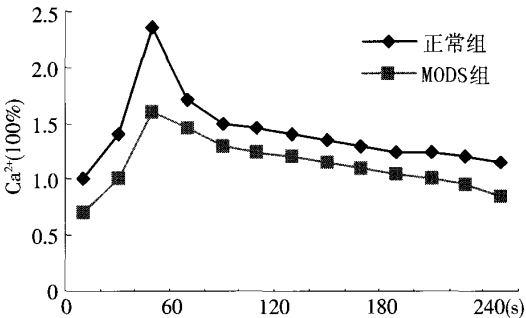


图 1 两组钙离子变化的比较

4 10⁻⁵ mol/L nifedipine 和 2 mmol/L EGTA 与 大黄素作用后细胞钙离子浓度与正常组比较几乎无变化。用 100 U/L Heparine 后, 大黄素引起的钙离子升高几乎消失, 仅为正常组的 0.27 ± 0.11, 两组比较差异有显著性 (*P* < 0.05); 用 10⁻⁶ mol/L ryanodine 后, 大黄素引起的钙离子升高被部分抑制, 为正常组的 0.72 ± 0.29, 两组比较差异有显著性 (*P* < 0.05), 见图 2。

讨 论

平滑肌细胞胞浆游离 Ca²⁺ 在平滑肌细胞收缩过程中起重要的“第二信使”作用, 平滑肌的细胞收缩依赖胞浆中游离 Ca²⁺ 的浓度, 平滑肌收缩时的钙离子来源于细胞外液 Ca²⁺ 内流和细胞内钙库 Ca²⁺ 释放^[4]。

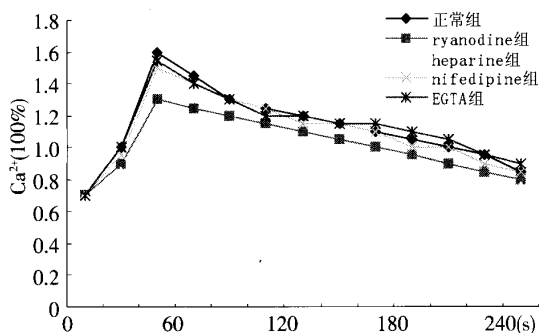


图 2 4 种钙阻滞剂对大黄素升高钙离子的影响

胞外 Ca^{2+} 可通过质膜离子通道进入细胞;胞内 Ca^{2+} 主要储存在肌质网,它的释放也是通过钙离子通道,该通道的调节机制至少有两个:一是三磷酸肌醇(IP_3)和其受体(IP_3R)结合后,引起钙通道开放。二是 T 小管去极化直接引起肌质网钙通道开放,称为 ryanodine 受体(RyR)钙通道。大量证据表明钙火花(calcium sparks)是由于 RyR 离子通道开放所致,所谓钙火花就是细胞内局部钙离子电流。它通过正反馈调节增加平滑肌细胞的收缩性,机制是:直接调整细胞内钙离子浓度或通过激活钙火花激活氯离子通道来使细胞膜电位去极化间接增加钙离子浓度^[5]。

马涛^[1]已研究证实大黄素升高正常结肠环形平滑肌钙离子可分为两个时相:一快速升高相,即钙离子迅速到达峰值;二持续升高相,即钙离子较快速升高期时下降,但仍高于静息期。 IP_3 介导细胞内 Ca^{2+} 释放可能是大黄素升高正常结肠环形平滑肌钙离子的主要作用机制。但是在 MODS 状态下,由于 IP_3 减少和 NO 的增多,导致细胞胞浆钙离子浓度减少,进而平滑肌运动功能减弱。那么大黄素是否还能收缩结肠平滑肌?实验发现在 MODS 状态下,大黄素仍然能升高结肠平滑肌细胞内钙离子的浓度。与正常情况下基本相似,可分为两个时相:快速升高相和升高相,即细胞膜受刺激后钙离子在 30~50 s 内迅速达到最高峰,而后逐渐下降,并在相当长一段时间内仍高于静息期时细胞内钙离子的浓度。因此,大黄素在 MODS 状态下调节胃肠收缩的重要机制之一是提高细胞内钙离子的浓度。

在这些认识的基础上,我们分别采用可螯和细胞外游离钙离子的 EGTA、可阻断细胞外钙离子内流的特异性的细胞膜电压依赖性钙通道抑制剂 nifedipine、可阻断细胞内钙库肌质网 Ca^{2+} 释放的 IP_3 受体阻滞剂 heparine 和可阻断细胞内钙库肌质网 Ca^{2+} 释放 RyR 阻滞剂 ryanodine 与大黄素作用,以验证发生 MODS 时大黄素升高结肠平滑肌钙离子的机制是否与正常状态时一致。结果发现应用 heparine 后,大黄

素升高钙离子的作用几乎被完全抑制,表明 IP_3 介导的 Ca^{2+} 释放是大黄素升高 MODS 状态下结肠平滑肌钙离子的主要机制。用 ryanodine 后,大黄素升高钙离子的作用被部分抑制,证明 RyR 也参与大黄素升高钙离子的作用。目前已被证实 RyR 还参与钙离子诱导的钙离子释放(calcium induced calcium release, CICR)机制^[6],即细胞内钙的释放或细胞外钙内流可诱导 RyR 的开放,促使细胞内钙的进一步释放。本实验 IP_3 受体被阻断,大黄素升高钙离子的作用几乎被完全抑制,而 RyR 被阻滞大黄素升高钙离子的作用仅被部分抑制,从侧面也映证了这一点。因此,我们推测大黄素引起 MODS 状态下结肠平滑肌钙离子的升高首先是由于 IP_3 通道的开放,进而通过 CICR 作用,继发激活 RyR 释放钙,共同形成了细胞内钙的快速升高。应用 nifedipine 和 EGTA 后,大黄素升高细胞钙离子浓度没有被影响,说明细胞膜电压依赖性钙通道不参与大黄素升高钙离子的作用;MODS 状态下,细胞外钙离子在大黄素升高钙离子的机制中未发挥作用。

因此,大黄素升高 MODS 大鼠结肠平滑肌钙离子的机制主要是通过肌浆网上两种钙离子通道作用的受体; IP_3 受体和 RyR ,升高的钙离子主要来自细胞内钙库肌浆网。另外钙火花是否也参与升高钙离子,这需要进一步证实。

钙离子调节平滑肌收缩的经典机制为粗肌丝相关调节机制,又称为 Ca^{2+} -钙调蛋白-肌球蛋白轻链激酶依赖的机制(MLCK 途径)。那么,大黄素是否就是通过升高钙离子激活 MLCK 途径来介导平滑肌收缩的呢?实验中我们发现加入 ML-7(特异性的 MLCK 抑制剂)后,大黄素刺激结肠平滑肌的作用被大部分抑制,而不是全部被抑制,因此,激活 MLCK 途径并不是大黄素在 MODS 状态下收缩结肠平滑肌的唯一途径。

目前认为属于 $\text{PKC}\alpha$ 信号途径的细肌丝相关蛋白调节也参与平滑肌的收缩^[7],因此在实验中我们又加入 Calphostin C(选择性的 PKC 激酶抑制剂)。结果发现 Calphostin C 也能部分抑制大黄素刺激结肠平滑肌的作用,说明大黄素在 MODS 状态下收缩结肠平滑肌的作用中,增加钙敏感性的 PKC 信号途径,也发挥了作用。

总之,从细胞生物学角度来看,大黄素在 MODS 状态下收缩结肠平滑肌既依靠通过升高细胞内钙离子来激活 MLCK 途径,又依靠增加钙敏感性的 PKC 信号途径来发挥作用。

参考文献

- 1 马涛,齐清会,简序,等.大黄素对大鼠结肠环形平滑肌

- 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(11):1699—1702.
- Mao T, Qi QH, Jian X, et al. Effects of emodin on intracellular Ca^{2+} signaling in the circular smooth muscle cells of rat colon. World J Gastroenterol 2003;11(11):1699—1702.
- 2 陈哲宇, 齐清会. 多器官功能不全综合征大鼠结肠运动功能变化和机制的研究. 中华实验外科杂志 2004;21(3):341—342.
- Chen ZY, Qi QH. Changes of colon motility and mechanism in rats with multiple organ dysfunction syndrome. Chin J Exp Sur 2004;21(3):341—342.
- 3 Cook AK, Carty M, Singer CA, et al. Coupling of M2 muscarinic receptors to ERK MAP kinases and caldesmon phosphorylation in colonic smooth muscle. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000;278(3):G429—437.
- 4 Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. J Appl Physiol 2001;91(3):1438—1449.
- 5 Jaggar HJ, Porter VA, Lederer WJ, et al. Calcium sparks in smooth muscle. Am J Physiol Cell Physiol 2000;278(2):C235—C256.
- 6 Collier ML, Ji G, Wang Y, et al. Calcium-induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release. J Gen Physiol 2000;115(5):653—662.
- 7 Ji G, Barsotti RJ, Feldman ME, et al. Stretch-induced calcium release in smooth muscle. J Gen Physiol 2002;119(6):533—544.
- (收稿:2003-07-05 修回:2004-08-02)

抗生素加中药灌肠治疗急性盆腔炎 31 例

于 萍 韩书勤

笔者于 2002 年 6 月—2004 年 3 月对 31 例急性盆腔炎患者进行抗生素加中药灌肠治疗,与同期单纯运用抗生素治疗的 30 例患者进行对比观察。现将观察结果总结如下。

临床资料 根据《妇产科学》(乐杰主编,第 4 版,北京:人民卫生出版社,1994:258—261)中制定的诊断标准。将 61 例在我院住院治疗的急性盆腔炎患者随机分为 2 组,其中治疗组 31 例,年龄 20~59 岁,平均 (41 ± 12) 岁;病程 1~3 天,平均 2 天。对照组 30 例,年龄 17~58 岁,平均 (40 ± 13) 岁;病程 1~3 天,平均 2 天。上述两组患者经 χ^2 检验,差异均无显著性($P > 0.05$),具有可比性。

方 法

1 治疗方法 对照组:生理盐水 100ml 加入头孢噻肟钠 3.0g(30min 内滴完),每日 2 次静脉滴注,替硝唑注射液 100ml (内含替硝唑 0.5g,每日 1 次静脉滴注。治疗组:在对照组基础上加用中药灌肠治疗,基本方:附子 9g 肉桂 9g 水蛭 9g 败酱草 9g 鱼腥草 30g 红藤 30g 薏苡仁 30g 牡丹皮 12g 赤芍 12g 乳香 9g 九香虫 9g,用 500ml 水将上述中药置于砂锅中煎至 200ml 时将药汁沥出,待温热时用灌肠器灌入直肠后平卧 0.5h,1 日 2 次。两组共治疗 7 天。

2 观察项目 观察 7 天后两组、体温、血常规、妇科检查、白带、B 超等病情变化。

3 统计学方法 计数资料采用 χ^2 检验,率的比较采用 u 检验。

结 果

1 疗效评定标准 显效:治疗 7 天后,体温、血象恢复正常,白带清洁度由Ⅳ度或Ⅲ度转为Ⅱ度;妇检时下腹有轻度压痛,无反跳痛,阴道分泌物明显减少,B 超示双附件未增粗,未见包块。有效:体温及血象降至正常,妇检时下腹有轻度压痛、反跳痛,宫颈充血,阴道分泌物较治疗前明显减少,白带清洁度由Ⅳ度转为Ⅲ度,B 超示双附件未增粗;无效:治疗 7 天后上述症状、体征及实验室检查均无好转或中途改用其他治疗方法为无效。

2 两组疗效 治疗组 31 例,显效 6 例(19.4%),有效 19 例(61.3%),无效 6 例(19.4%),总有效率 80.6%;对照组 30 例,显效 1 例(3.3%),有效 12 例(40%),无效 17 例(56.7%),总有效率 43.3%。两组总有效率比较差异有显著性($u = 2.933, P < 0.01$)。

讨 论 盆腔炎是产后、经期、宫腔手术后及邻近器官感染蔓延而致,是妇科常见病,其主要病理改变是盆腔内炎性渗出,器官粘连而致组织增生、瘢痕形成。中医学认为本病的发生多由经行产后胞脉空虚之时,寒湿之邪入于胞宫,与血互结阻滞胞脉,致胞脉之血不畅,壅于下焦,蕴积于内,损坏血脉,化成脓毒所致。方中红藤、败酱草、鱼腥草、牡丹皮、赤芍、附子、肉桂、水蛭、薏苡仁等具有清热解毒、凉血、散瘀消炎、止痛排脓。全方配伍能温阳利湿,增强血液循环,减少渗出,抑制增生,促进组织的修复与再生。笔者在常规治疗的基础上,合并中药灌肠治疗急性盆腔炎明显提高显效率。患者可耐受,缩短病程,且无毒副反应。本法有简、便、效、廉等特点,值得临床推广应用。

作者单位:新疆喀什岳普湖县人民医院(新疆 844400)

(收稿:2004-07-09 修回:2004-09-24)