

柴胡疏肝散对大鼠胃 Cajal 间质细胞活性及细胞内钙离子浓度的影响

宁海恩 凌江红 梁 纲 张 智 王煜姣

摘要 目的 观察柴胡疏肝散含药血清对大鼠胃 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)活性及细胞内钙离子(Ca^{2+})浓度的影响。**方法** 按照血清药理学通法制备大鼠含药血清,将血清分为柴胡疏肝散组(浓度为 5%、10%、20%)、多潘立酮组(10%)、空白组,急性分离并采用酶解法提取胃窦 ICCs 进行常规培养,免疫荧光染色法鉴定 ICCs,MTT 法测定 ICCs 对数生长曲线,以含药血清继续培养对数生长期的 ICCs 3 天后,通过 CCK-8 法检测 ICCs 活性,激光共聚焦显微镜进行 Fluo-3 荧光检测 ICCs 细胞内 Ca^{2+} 变化,比较各组含药血清对大鼠胃窦 ICCs 生长的影响。**结果** 成功分离、培养和鉴定 ICCs 后,通过各组含药血清作用,与空白组同期比较,多潘立酮组、柴胡疏肝散组 ICCs 活性与细胞内 Ca^{2+} 荧光强度均显著增强($P < 0.05$);与多潘立酮组同期比较,10%、20%柴胡疏肝散组 ICCs 活性与细胞内 Ca^{2+} 荧光强度均显著增强($P < 0.05$);与 5%柴胡疏肝散组同期比较,10%、20%柴胡疏肝散组 ICCs 活性(48、72 h)与细胞内 Ca^{2+} 荧光强度均显著增强($P < 0.05$)。**结论** 柴胡疏肝散可以通过增强细胞内 Ca^{2+} 浓度促进 ICCs 活性,促进其分化生长。

关键词 柴胡疏肝散;含药血清;Cajal 间质细胞;细胞活性;细胞内钙离子

Effects of Chaihu Shugan Powder on the Cytoactivity of Rat Interstitial Cells of Cajal and Intracellular Ca^{2+} Concentration NING Hai-en, LING Jiang-hong, LINAG Gang, ZHANG Zhi, and WANG Yu-jiao Department of Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning (530021)

ABSTRACT Objective To observe effects of Chaihu Shugan Powder (CSP) on the cytoactivity and intracellular Ca^{2+} concentration of rat interstitial cells of Cajal (ICCs). **Methods** CSP containing serum was prepared according to common methods of seropharmacology, which was then divided into three CSP groups (5%, 10%, 20% CSP containing serum), 10% Domperidone containing serum group, and the blank control group. ICCs in gastric antrum were rapidly isolated and extracted to perform routine culture. ICCs were identified by immunofluorescence staining. The logarithmic growth curve of ICCs was determined by MTT method. After 3 days culture of ICCs at the logarithmic phase, the cytoactivity of ICCs was detected by CCK-8 method. Intracellular Ca^{2+} changes of ICCs were tested by Fluo-3 fluorescence with laser scanning confocal microscope. Effects of drug containing serums in each group on the growth of ICCs in gastric antrum were compared. **Results** After successful isolation, culture, and identification of ICCs, the cytoactivity of ICCs and intracellular Ca^{2+} fluorescence intensity were significantly enhanced in the Domperidone group and the CSP groups, as compared with the blank group at the same time point ($P < 0.05$). Compared with the Domperidone group at the same time point, the cytoactivity of ICCs and intracellular Ca^{2+} fluorescence intensity were significantly enhanced in 10% and 20% CSP groups ($P < 0.05$). Compared with 5% CSP group at the same time point, the cytoactivity of ICCs (48 and 72 h respectively) and intracellular Ca^{2+} fluorescence intensity were significantly enhanced in 10% and 20% CSP groups ($P < 0.05$). **Conclusion** CSP could promote cytoactivity and growth of ICCs by enhancing intracellular Ca^{2+} concentration.

KEYWORDS Chaihu Shugan Powder; drug containing serum; interstitial cells of Cajal; cytoactivity; intracellular Ca^{2+}

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(No. 81360544)

作者单位:广西医科大学第一附属医院中医科(南宁 530021)

通讯作者:凌江红, Tel: 0771-5356515, E-mail: 459183870@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.09.1091

研究证实,胃肠道 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)作为胃肠运动的起搏细胞,产生自主节律性慢波电位,通过突起和缝隙连接作用于胃肠平滑肌细胞,促进平滑肌节律性舒缩^[1]。胃肠神经递质也通过 ICCs 介导影响平滑肌,形成“神经递质-ICCs-平滑肌”功能结合体进行调控胃肠道的电生理和胃肠动力^[2,3]。ICCs 与胃肠动力障碍性疾病(disorders of gastrointestinal motility, DGIM)相关研究已成为近些年来研究热点。有研究表明,柴胡疏肝散是具有调控胃肠动力的中药复方^[4,5]。本研究从细胞水平验证柴胡疏肝散是否能够作用于 ICCs,并基于 ICCs 活性与细胞内钙离子(Ca^{2+})的变化关系进一步探讨柴胡疏肝散促胃动力的可能机制。

材料与方法

1 动物及分组 SPF 级 SD 大鼠 30 只,鼠龄约 2 个月,体重(150 ± 5)g,雌雄各半,由广西医科大学实验动物中心提供,合格号:SCXK(桂)2014-0002。实验前适应性饲养 1 周,自由进食、进水,保持环境通气、干燥,实验时进行简单随机分组:柴胡疏肝散组、多潘立酮组、空白组,每组 10 只大鼠并做好对应标志。

2 药物 柴胡疏肝散,采用张介宾《景岳全书》原方,组成:柴胡、陈皮各 6 g,香附、川芎、枳壳、白芍各 4.5 g,炙甘草 1.5 g,购自广西医科大学第一附属医院中药房。多潘立酮片,10 mg/片,西安杨森制药有限公司生产,批号: H10910003,购自广西医科大学第一附属医院药房。按照成人与实验动物体表面积折算,取人-大鼠换算系数 5.98,转换成实验所需药物浓度:柴胡疏肝散为 105%,多潘立酮为 0.1%,生理盐水为 0.9%^[6]。

3 试剂及仪器 同仁化工 CCK-8 试剂盒(上海科雅生物科技有限公司),Fluo-3-AM(北京泛博生物化学有限公司),M199 培养液(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Sciencell 公司),II 型胶原酶(美国 GIBCO 公司),兔抗大鼠 CD117/c-Kit antibody 一抗(美国 Pierce 公司),Dylight TM488 Conjugate 山羊抗兔 IgG 二抗(联科生物公司),抗荧光淬灭封片液(上海碧云天生物技术有限公司),D-Hanks 液、胰酶 0.25% + 0.02% EDTA、青霉素-链霉素溶液(杭州吉诺生物医药技术有限公司),水合氯醛、25%戊二醛(成都科龙试剂公司),MTT(上海江莱生物科技有限公司),二甲基亚砜(DMSO,上海慧颖生物科技有限公司),台盼蓝溶液(北京索莱宝科技有限公司)。Thermo Multiskan MK3 全自动酶标仪(上海赛默科技生物发展有限公司),激光共聚焦显微镜 META510(德国 Zeiss 公司),

CKX41 倒置式生物显微镜, BX53 型号四色正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),解剖显微镜(BIX-102G),电子天平 BS423S(德国 Sartorius 公司), SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),超低温冰箱(中国海尔集团), TYK-4021 型超纯水机(乌鲁木齐超纯水机厂), S/N27709-1462CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司),高速低温冷冻离心机(美国 Thermo 公司), S/N 高压消毒锅(日本三洋公司),微量移液器(德国 Eppendorf 公司)。

4 方法

4.1 含药血清制备 按上述实验分组及药物浓度,依据血清药理学制备方法^[7-10],按成人(60 kg/人)临床用药量的 10 倍,按 1:5 容积比,分别予柴胡疏肝散煎液(用蒸馏水浸泡 30 min,煎煮两次,30 min/次)后,过滤,去渣取汁,合并滤液加热蒸发,制成 1.05 kg/L 水煎浓缩液,4 ℃ 保存备用)、多潘立酮溶液(用蒸馏水溶解成 0.001 kg/L 溶液)、生理盐水灌胃,灌胃量 1.5 mL/100 g,每天两次,间隔 12 h,共 3 d,于末次灌胃 1 h 后,使用 10%水合氯醛行腹腔麻醉、腹主动脉取血,置真空采血管室温下静置至有血清析出,3 000 r/min 离心 20 min,分离血清,同组血清混合后,置于 56 ℃ 水浴中灭活 30 min,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,置 -20 ℃ 保存备用。假设所提取的各组合药血清浓度为 100%,用 M199 培养液稀释成 5%、10%、20% 的柴胡疏肝散含药血清浓度,如 10% 的柴胡疏肝散组配置:10 mL 柴胡疏肝散含药血清加 90 mL M199 培养液,10% 的多潘立酮、生理盐水含药血清浓度配置同法。

4.2 ICCs 的分离、培养与形态学观察 参照参考文献[11,12],取 SD 大鼠 3 只,雌雄不限,禁食 8 h,不禁水,10%水合氯醛腹腔麻醉,开腹取长约 3 cm 胃窦,沿胃小弯切开, D-Hanks 液冲洗 3 次,解剖显微镜下剥离胃黏膜层,取肌条切成 0.1 cm × 0.1 cm 大小的条块,加入 II 型胶原酶消化液(M199 配置,不含血清,浓度 1.3 mg/mL),37 ℃ 水浴箱消化 45 min,900 r/min 离心、3 min, D-Hanks 液重悬洗去消化液,再离心(900 r/min、3 min),弃 D-Hanks 液,加入完全培养基(M199、20%胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液),吹打 15 min,200 目筛网过筛、形成细胞悬液,种植细胞培养瓶(约 3 mL/瓶),置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养。每隔 2 日换液 1 次,倒置显微镜下观察细胞生长情况。当细胞生长稳定后,用血球计数板计数细胞数在 1×10^5 /mL 左右,台盼蓝染色确定细胞活力在 85%左右时可用于检测。

4.3 ICCs 对数生长曲线测定 采用 MTT 法,以 M199 完全培养基调整 ICCs 浓度,接种至 96 孔培养板培养 24 h 后,加入 MTT 液培养 4 h,去掉 MTT 液,加入 DMSO,振荡,酶标仪单波长 450 nm 处测 OD 值,之后分别在细胞培养的第 2~14 d 重复上述操作。以培养细胞的天数(d)为横坐标,以 OD 值为纵坐标,制作细胞生长曲线。

4.4 ICCs 免疫荧光鉴定 取对数生长期细胞,经无水甲醛(20℃预冷)固定,5%脱脂奶粉封闭 10 min,加入兔抗大鼠一抗(1:30),4℃冰箱孵育过夜,PBS 液冲洗 3 遍,加入山羊抗兔二抗(1:200)标记,37℃培养箱孵育 1 h,抗淬灭封片液封片后于正置荧光显微镜下观察并拍照。

4.5 CCK-8 法检测各组含药血清 ICCs 分化活性 取对数生长期细胞,胰酶 37℃消化成细胞悬液,调整浓度为 0.5×10^5 个/mL,接种于 96 孔板,12 h 充分贴壁后开始换液并取每 10 孔加入同浓度含药血清,300 μ L/孔,按组别浓度依次加入,于培养箱分别培养 24、48、72 h 后加入 CCK-8,分别孵育 4 h 后于酶标仪进行上机检测波长为 450 nm,测量各组细胞 OD 值。

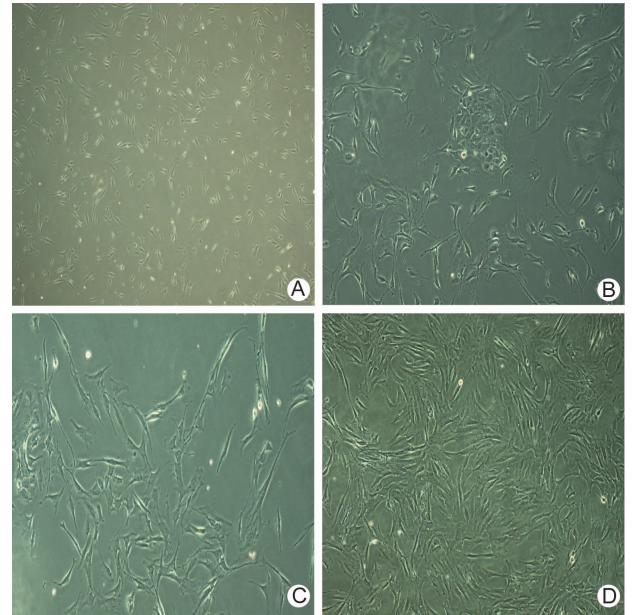
4.6 激光共聚焦显微镜技术测定 ICCs 内 Ca^{2+} 浓度 取上述符合要求的细胞用 D-Hanks 缓冲液(无酚红)冲洗细胞两次,在避光的情况下加入 0.1 mL Fluo-3-AM 探针染料工作液,于 37℃温箱中避光孵育 60 min,D-Hanks 液液再清洗,备用检测,细胞荧光强度使用自带软件 NIS 测定。测定时开启激光共聚焦扫描显微镜,将培养皿置于载物台上,绿色荧光探针聚焦定位、固定视野,先检测加含药血清前的细胞内 Ca^{2+} 荧光强度(fluorescent intensity, FI)作为静息值 F_0 ,采集数据,接着使用移液枪小心隔空滴入 50 μ L 的含药血清 3 滴于激光聚光点细胞团面上,保持连续动态扫描、检测 FI 值的变化,时长为 2 min,测定峰值 $F_{\max}$ 采集数据,同时进行拍照采图。峰高(ΔFI) = $F_{\max} - F_0$,代表含药血清引起的 FI 变化值。用 FI 平均变化值来间接反映细胞内游离钙离子浓度的相对水平^[13]。

4.7 统计学方法 应用 SPSS 16.0 统计软件,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,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 ICCs 形态观察(图 1) 在倒置显微镜下,24 h:完全贴壁,呈梭形、菱形或三角形,可见细胞突

起;72 h:可见梭形、菱形、三角形,每个细胞都有 1~2 个核,核大,核周胞浆少,并从核区向胞体发出 2~5 条长突起,与邻近 ICCs 突起、胞体相互连接,形成网络状,同时由于这种连接细胞之间也呈现出聚集成团生长的现象。第 6、8 d ICCs 网络状、聚集现象最明显。



注:A 为 24 h($\times 40$);B 为 72 h($\times 100$);C 为 6 d($\times 100$);D 为 8 d($\times 100$)

图 1 ICCs 形态观察 (倒置显微镜,无染色)

2 ICCs 对数生长曲线(图 2) 1~3 d 细胞处于潜伏期,4~8 d 细胞处于对数生长期,其中 6~8 d 生长最为明显,9 d 后进入平台期。

3 ICCs 免疫荧光鉴定结果(图 3) 对数生长期 ICCs 形态特征明显,胞体呈三角形、圆形或梭形;细胞核大,核周有少量胞浆;从胞体发出 2~5 条长突起,并与邻近细胞形成网络;表面 c-Kit 蛋白呈阳性表达,胞体和突起均明显着色,呈绿色阳性显色。

4 各组胃 ICCs 活性比较(表 1) 与空白组同期比较,各时间点 5%、10%、20% 柴胡疏肝散、多潘立酮组 ICCs 活性均显著增强($P < 0.05$)。与多潘立

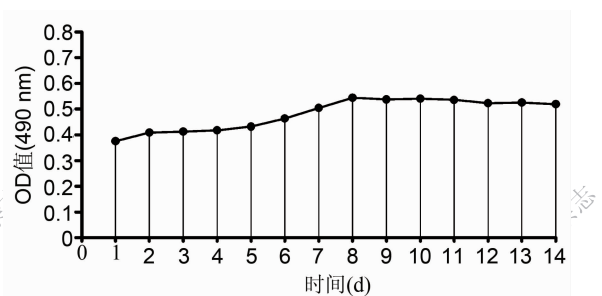
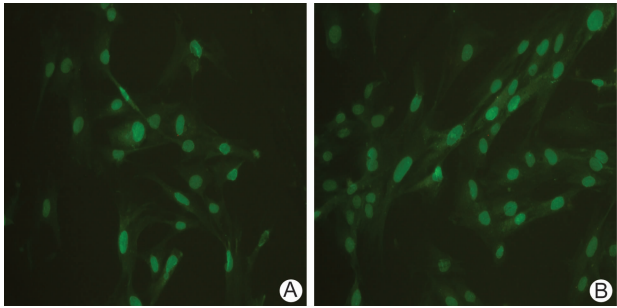


图 2 ICCs 对数生长曲线

表 1 各组胃 ICCs 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ICCs 活性(OD 值)		
		24 h	48 h	72 h
空白	10	0.39 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.05
多潘立酮	10	0.47 ± 0.04 *	0.48 ± 0.08 *	0.53 ± 0.02 *
5% 柴胡疏肝散	10	0.51 ± 0.05 *	0.50 ± 0.07 *	0.51 ± 0.02 *
10% 柴胡疏肝散	10	0.54 ± 0.02 *△	0.58 ± 0.08 *△▲	0.63 ± 0.09 *△▲
20% 柴胡疏肝散	10	0.56 ± 0.05 *△	0.65 ± 0.11 *△▲	0.75 ± 0.08 *△▲○

注:与空白组同期比较,* $P < 0.05$;与多潘立酮组同期比较,△ $P < 0.05$;与 5% 柴胡疏肝散组同期比较,▲ $P < 0.05$;与 10% 柴胡疏肝散组同期比较,○ $P < 0.05$



注:A 为第 6 d;B 为第 8 d

图 3 ICCs 免疫荧光鉴定结果 (免疫染色,×200)

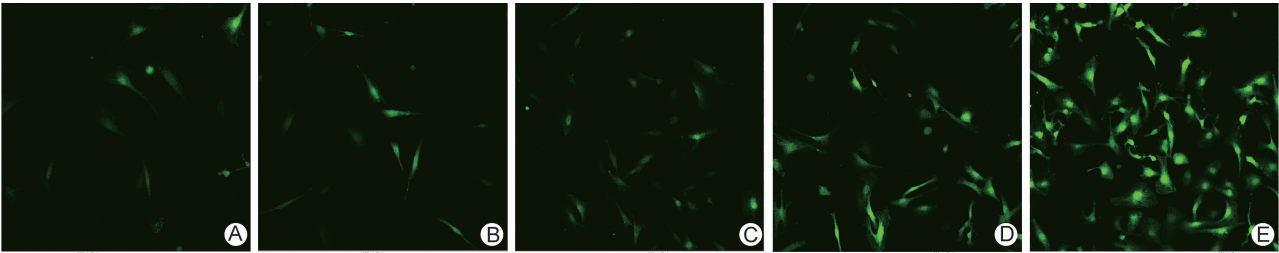
酮组同期比较,各时间点 10%、20% 柴胡疏肝散组 ICCs 活性均显著增强($P < 0.05$)。与 5% 柴胡疏肝散组同期比较,48、72 h 10%、20% 柴胡疏肝散组 ICCs 活性均显著增强($P < 0.05$)。与 10% 柴胡疏肝散组同期比较,72 h 20% 柴胡疏肝散组 ICCs 活性显著增强($P < 0.05$)。

5 各组胃 ICCs 内 Ca^{2+} 荧光强度比较(表 2, 图 4) 与空白组比较,5%、10%、20% 柴胡疏肝散组

表 2 各组胃 ICCs 内 Ca^{2+} 荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	峰高(ΔFI)
空白	11	115.35 ± 10.28
多潘立酮	11	240.16 ± 71.08 *
5% 柴胡疏肝散	11	234.48 ± 47.56 *
10% 柴胡疏肝散	11	469.42 ± 77.00 *△▲
20% 柴胡疏肝散	11	499.49 ± 94.78 *△▲

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与多潘立酮组比较,△ $P < 0.05$;与 5% 柴胡疏肝散组比较,▲ $P < 0.05$



注:A 为空白组;B 为多潘立酮组;C 为 5% 柴胡疏肝散组;D 为 10% 柴胡疏肝散组;E 为 20% 柴胡疏肝散组

图 4 各组胃 ICCs 内 Ca^{2+} 荧光强度比较 (Fluo-3-AM 探针染色,×200)

与多潘立酮组 ICCs 内 Ca^{2+} 荧光强度均显著增强($P < 0.05$)。与多潘立酮组同期比较,10%、20% 柴胡疏肝散组 ICCs 内 Ca^{2+} 荧光强度均显著增强($P < 0.05$)。与 5% 柴胡疏肝散组同期比较,10%、20% 柴胡疏肝散组 ICCs 内 Ca^{2+} 荧光强度均显著增强($P < 0.05$)。

讨 论

DGIM 是临床常见及多发的胃肠道疾病之一,以胃肠动力紊乱、分泌机能失调为特征,致使平滑肌张力及其收缩功能、正向节律性传导能力均表现下降的一类疾病。根据 DGIM 临床表现,可归属中医学“痞证”、“嘈杂”、“腹满”、“呕吐”、“呃逆”、“腹痛”等范畴,病位在脾、胃、肝、大小肠,涉及肺、肾,主要因情志不畅,恼怒、忧郁等情志失调,肝失疏泄,气机郁滞,横犯脾胃;或因素体脾虚,饮食不节、不洁而伤脾,致土虚木贼,发展成肝胃不和、肝郁脾虚、肝胃郁热等证。柴胡疏肝散主治肝郁气滞、肝胃不和之证,主要功效为疏肝理气、活血止痛,可以改善由于肝气横逆、郁结所导致的胁胀、胸闷不舒或恶心呕吐、食欲不振、脘腹胀满、肠鸣腹痛等胃肠道症状,起到促胃动力的作用效果^[14-17]。凌江红等^[18-20]研究发现,柴胡疏肝散能够改善消化不良行为和胃组织学表现,可能与其能上调中枢和外周胃泌素表达、下调外周胃组织生长抑素、胃泌素受体、胆囊收缩素受体 A mRNA 表达有关。但对于柴胡疏肝散是否能够作用于 ICCs 进而产生促胃

动力,这一机制尚未有报道。

本研究旨在从 ICCs 活性与细胞内 Ca^{2+} 的变化关系探讨柴胡疏肝散促胃动力的可能机制。ICCs 活性的改变对胃动力有重要的影响,有关研究发现胃肠动力障碍性疾病伴有 ICCs 数量的减少或缺失、网络结构破坏,导致该细胞活性的减弱或消失^[21-23]。本实验培养结果表明,根据所培养的细胞镜下形态学特征与细胞免疫荧光染色鉴定提示:所培养的细胞即是 ICCs^[24]。结合 ICCs 活性检测结果显示,与空白组、多潘立酮组同期比较,10%、20%柴胡疏肝散组 ICCs 活性显著增强,提示柴胡疏肝散可以增强 ICCs 活性。

ICCs 起搏电位的产生和慢波传播受离子环境、神经递质和激素等生物活性物质的影响,且与 Ca^{2+} 关系最为密切^[25,26]。细胞内 Ca^{2+} 浓度变化形成离子流参与 ICCs 自主节律性产生、起搏和慢波形成,ICCs 内 Ca^{2+} 振荡(即细胞内规律性 Ca^{2+} 浓度变化)与慢波同步^[27]。ICCs 内 Ca^{2+} 主要贮存于内质网/肌质网中,在维持胃体平滑肌收缩与舒张功能中发挥着核心作用^[28]。ICCs 内 Ca^{2+} 浓度检测结果显示:胃 ICCs 内 Ca^{2+} 荧光强度随柴胡疏肝散浓度增高而增强。由此推测:柴胡疏肝散促进 ICCs 活性的增强与细胞内 Ca^{2+} 浓度增加有关。

已有研究表明,钙调蛋白(CaM)是细胞内 Ca^{2+} 的主要信号转导分子,介导、调控由 Ca^{2+} 引起的一系列生理生化反应^[29]。当细胞内 Ca^{2+} 浓度增高时,通过一系列的反应使 CaM 结合蛋白磷酸化,肌丝滑行使平滑肌收缩^[30-32]。再者,也有研究表明干细胞生长因子(SCF)和原癌基因(c-Kit)对胃肠道 ICCs 分化、生长、发育和表型的维持具有至关重要的作用^[33]。因此,柴胡疏肝散通过调节、增加 ICCs 内 Ca^{2+} 浓度进行促进该细胞活性,也可能与调节 CaM 表达、SCF/c-Kit 通路作用相关,需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract[J]. Gut, 1996, 56(7): 905, 948.
- [2] Wang XY, Vannucchi MG, Nieuwmeyer F, et al. Changes in interstitial cells of Cajal at the deep muscular plexus are associated with loss of distention-induced burst-type muscle activity in mice infected by *Trichinella spiralis* [J]. Am J Pathol, 2005, 167(2): 437-453.
- [3] 侯晓华,陈建德. Cajal 间质细胞在胃肠运动中的作用[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(6): 360-360.
- [4] 王稹,钱屹. 柴胡疏肝散加减从肝论治慢性消化不良症 79 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(23): 3117-3118.
- [5] 刘汶,范萌,陈喆,等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良肝气郁结证患胃动及胃肠激素的影响[J]. 中医杂志, 2010, 51(1): 30-33.
- [6] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. 南昌大学学报(医学版), 1997, (4): 41-41.
- [7] 徐叔云主编. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982: 179-223.
- [8] 陈宁,宋冬雪,凌娜,等. 中药血清药理学方法的研究进展[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2014, 28(1): 40-43.
- [9] 葛金文,朱惠斌,王宇红,等. 关于中药血清药理学方法的再思考[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2008, 10(6): 16-22.
- [10] 李仪奎,吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(6): 569-570.
- [11] 李春穴,童卫东,刘宝华,等. Cajal 间质细胞的分离、培养方法探讨[J]. 消化外科, 2004, 3(4): 267-269.
- [12] 《解剖学报》编辑部. 《动物细胞培养-基本技术和特殊应用指南》出版[J]. 解剖学报, 2014, (4): 464.
- [13] 信芳杰,徐路. Ghrelin 对豚鼠胃窦平滑肌细胞钙离子浓度的影响及与 NO 关系研究[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(2): 216-220.
- [14] 黄李平,凌江红,吕军影,等. 逍遥丸结合西药个体化治疗对功能性消化不良患者临床疗效的影响[J]. 中医杂志, 2006, 47(4): 267-267.
- [15] 符小聪,胡珂,纪云西. 疏肝健脾法对功能性消化不良胃排空及血管活性肠肽影响的临床研究[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(2): 99-99.
- [16] 牛路芳,丘明义,石拓. 五个疏肝复方对胃肠运动功能影响的比较研究[J]. 中医杂志, 2006, 47(1): 56-56.
- [17] 牛路芳,石拓,付本升,等. 疏肝理气方剂对大鼠胃窦组织神经元及神经递质的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2006, 19(2): 35-37.
- [18] 凌江红,张钰琴,梁纲,等. 疏肝理气法对夹尾应激大鼠行为学及胃组织学的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(3): 299-302.
- [19] 凌江红,韦连明,张钰琴,等. 疏肝理气法对功能性消化不良大鼠下丘脑和胃窦胃泌素、生长抑素表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 3069-3072.
- [20] 张钰琴,凌江红,梁纲,等. 柴胡疏肝散对夹尾应激大鼠脑和胃组织 GASR mRNA 和 CCK-AR mRNA 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1081-1083.
- [21] Zarate N, Mearin F, Wang XY, et al. Severe idiopathic gastroparesis due to neuronal and interstitial cells of Cajal degeneration: pathological findings and management [J]. Gut, 2003, 52(7): 966.
- [22] Shafik A, Ahmed I, El Sibai O, et al. Interstitial cells of Cajal in reflux esophagitis: role in the pathogenesis of the disease[J]. Med Sci Monit, 2005, 11(12): BR452-BR456.
- [23] Nardo GD, Stanghellini V, Cucchiara S, et al. En-

- teric neuropathology of congenital intestinal obstruction: a case report [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(32): 5229–5233.
- [24] 刘勇, 齐清会. 大鼠胃 Cajal 间质细胞的分离与培养 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(4): 495–498.
- [25] 卢敏. 大鼠结肠 cajal 细胞库容性 Ca^{2+} 内流检测的临床价值 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2009, 12(6): 463–465.
- [26] 曾煜, 郭忻. 胃肠离子通道及其影响因素与平滑肌运动的研究进展 [J]. *中国药房*, 2007, 18(16): 1268–1269.
- [27] Torihasi S, Fujimoto T, Trost C, et al. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal [J]. *J Biol Chemistry*, 2002, 277(21): 19191–19197.
- [28] 周吕. 胃肠功能性动力疾病发病机制中的生理与病理生理 [J]. *中国实用内科杂志*, 2001, 21(10): 577–578.
- [29] 梁婧, 张晓蓉, 许艳华. 钙调蛋白的研究进展 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2010, 26(8): 500–501.
- [30] Kim HR, Appel S, Vetterkind S, et al. Smooth muscle signaling pathways in health and disease [J]. *J Cellul Molec Med*, 2008, 12(6A): 2165–2180.
- [31] Mizuno Y, Isotani E, Huang J, et al. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle *in vivo* [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(2): C358–C364.
- [32] Pfitzer G, Sonntag-Bensch D, Brkic-Koric D. Thiophosphorylation-induced Ca^{2+} sensitization of guinea-pig ileum contractility is not mediated by Rho-associated kinase [J]. *J Physiol*, 2001, 533(3): 651–664.
- [33] Wu JJ, Rothman TP, Gershon MD. Development of the interstitial cell of Cajal: origin, Kit dependence and neuronal and non-neuronal sources of Kit ligand [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 59(3): 384–401.

(收稿: 2015-08-15 修回: 2016-05-20)

第二十八届中国中西医结合消化系统疾病学术会议在天津召开

第二十八届全国中西医结合消化系统疾病学术会议暨 2016 年中西医结合诊治功能性胃肠病高级研修班以及国家级名老中医危北海教授学术经验传承研讨会于 2016 年 7 月 7—9 日在天津市召开。会议收到全国各省市寄来的学术论文 400 余篇, 参会代表共 530 余人。

本次会议围绕着中西医结合诊治功能性胃肠病以及国家级名老中医危北海教授学术经验传承研讨开始。来自首都医科大学附属北京中医医院的陈詒教授着重阐述了危北海教授的“脾虚综合征”及“胃肠复元理论”学术思想及其临床应用。上海瑞金医院吴云林教授为我们详细解读了肝硬化门静脉高压食管胃静脉曲张出血的防治指南; 通过临床典型病例, 讲述了临床中存在胃炎样胃癌及 PPI 导致恶性溃疡的假性愈合的现象, 提出了重视内镜下对溃疡愈合瘢痕及慢性胃炎的观察及诊断。福建中医药大学第二人民医院杨春波教授详细地介绍了自己常用的 21 个“清热祛湿”方的临床选用。天津市第一医院陆伟教授重点分析了中药导致肝损伤的原因以及中药导致肝损伤如何防治问题。河北医科大学第二医院姚希贤教授提出中、西医和以中医为主体的中西医结合在临床工作中要适中则中、宜西则西, 需结合用药者则中西医结合治疗, 因病制宜, 选择应用。天津医科大学总医院消化科王邦茂教授介绍了肠道微生态与消化道肿瘤(胃癌、肠癌、肝癌)的关系, 并提出基于肠道微生态的肿瘤防治策略。天津医科大学第二医院张志广教授介绍了幽门螺杆菌感染诊治最新进展以及学习京都共识的心得体会。广州中医药大学附属第一医院胡玲教授为我们详细介绍了全国名老中医劳绍贤教授治疗脾胃病的 5 个经验方: 清浊安中汤、连葛救火汤、肠安方、脐腹疼痛方、祛脂养身汤。首都医科大学附属北京中医医院刘汶教授讲解了危北海教授“脾虚综合征”、“胃肠复元理论”在临床上的应用。

武汉协和医院侯晓华教授介绍了功能性胃肠病的发病、诊断及西医治疗方法。山西省中医院冯五金教授指出中医辨证和/或西医对症、脑神经递质调节药、心理疏导是治疗情志相关性胃肠病的三大基本治则。福建省第二人民医院柯晓教授详细介绍了排便障碍型便秘的发病机制, 并指出生物反馈治疗、中医辨证施治和针灸治疗排便障碍型便秘疗效确切。天津市第一中心医院陆伟教授指出未来治疗未来慢性乙型肝炎治疗方案为直接抗病毒治疗、免疫调节、HBV 抗原抑制、cccDNA 抑制等 4 种方案的综合治疗。北京中医药大学东方医院李军祥教授重点讲解了中医治疗溃疡性结肠炎的要点, 并明确了中西医结合治疗溃疡性结肠炎的切入点和指导意见。中国中医科学院西苑医院唐旭东教授介绍了调节肠道微生态临床方剂运用“三部曲”, 包括辨识泻秘主症、明确中医基本病机; 依据对泻秘的肠病辨证、明确证候兼夹, 采用方证对应治疗; 综合主病辨证与肠病一般辨证, 方证对应, 实施个体化治疗。

浙江中医药大学附属第一医院吕宾教授论述了抗生素、中药及化疗药物等三大类药物来阐述药物对肠道微生态系统、肠道能量代谢等影响及临床用药。上海中医药大学附属曙光医院刘成海教授提出应当重视自身免疫性肝炎(AIH)与药物性肝损、丙肝、脂肪肝等疾病的鉴别, 并论述了中医药联合激素的分期论治、抗炎保肝、抗肝纤维化等在 AIH 治疗中的重要作用。

本次会议还举办消化系统疾病疑难病例讨论, 上海瑞金医院、上海曙光医院、天津市第一医院挑选出 5 个疑难病例进行讨论, 大家讨论热烈, 对代表开阔视野, 解决临床实际问题有很大帮助, 受到代表的欢迎。

柯晓 唐艳萍 李军祥整理