

血根碱对大鼠肠平滑肌细胞收缩的抑制作用

王慧^{1,2}, 王悦尚³, 刘兆颖⁴, 孙志良^{1,4*}

(1.湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2.山东省鲁南中药材资源开发工程技术研究中心, 山东 临沂 276005; 3.山东华禧药业有限公司, 山东 禹城 251200; 4.湖南省兽药工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘要:采用酶消化法原代培养大鼠肠平滑肌细胞,用倒置相差显微镜测定血根碱对大鼠肠平滑肌细胞收缩的影响。结果表明:酶消化法原代培养的大鼠肠平滑肌细胞纯度高(α -actin 检测阳性率达 90%以上),密度大,并呈现平滑肌细胞特有的“峰-谷”样排列;血根碱及阿托品可显著抑制肠平滑肌细胞收缩,抑制率分别为 32.22%和 34.99%;血根碱和阿托品联用对肠平滑肌细胞收缩的抑制率可达 68.8%,与单独使用血根碱或阿托品的抑制率差异显著;血根碱对乙酰胆碱、组胺及 KCl 诱导的肠平滑肌细胞的收缩具有显著的抑制作用;血根碱主要通过作用于细胞膜上的 M 受体、H1 受体和钙离子通道来实现对大鼠肠平滑肌细胞收缩的抑制作用。

关键词:血根碱;肠平滑肌细胞;舒张作用;大鼠

中图分类号:S865.1⁺²

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2012)05-0519-07

Inhibition effect of sanguinarine on contraction of rat intestinal smooth muscle cells

WANG Hui^{1,2}, WANG Yue-shang³, LIU Zhao-ying⁴, SUN Zhi-liang^{1,4*}

(1.College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Shandong Lunan Engineering Technology Research Center of Chinese Herbal Medicine Resources Development, Linyi, Shandong 276005, China; 3.Shandong Huaxi Pharmaceutical CO., LTD., Yucheng, Shandong 251200, China; 4.Hunan Engineering Research Center of Veterinary Drug, Changsha 410128, China)

Abstract: The influence of sanguinarine(SA) on contraction of smooth muscle cells isolated from rat intestines using collagenase digestion was measured by inverted phase-contrast microscope. The result showed that rat intestinal smooth muscle cells isolated by enzyme digestion showed high purity, high density and “peak-valley” arrangement which is unique to smooth muscle cells. SA and atropine showed significant inhibition on the contractions of the isolated cells, the inhibition rates were 32.22% and 34.99% respectively. The inhibition rate of SA together with atropine on the contraction of the isolated cells was 68.8% which was significantly different from those when SA and atropine were used separately. SA showed significant inhibition on the contractions of intestinal smooth muscle cells induced by ACh, HA or KCl. The results suggested that the inhibition effects of SA on contraction of rat intestinal smooth muscle cells were achieved mainly through M receptor, H1 receptor and calcium ions channels on the cell membrane.

Key words: sanguinarine; intestinal smooth muscle cells; relaxation; rat

肠道深部肌肉层(固有层)的收缩和舒张对肠道内容物起混合和推动作用^[1]。胃肠道平滑肌的规律

性运动及平滑肌细胞的内在调节通路受到高级调节系统,如肠神经系统、激素、药物等的控制^[2-3]。

收稿日期:2012-06-11

基金项目:教育部创新团队项目(IRT0963);湖南省科技计划项目(2011FJ3040)

作者简介:王慧(1984—),女,山东泗水人,博士,主要从事兽医药理与毒理学研究, wys450@163.com, *通信作者, sunzhiliang1965@yahoo.com.cn

随着对胃肠道药物和胃肠动力学研究的不断深入,对胃肠道平滑肌的研究已从器官、组织层面发展到细胞、分子层面。目前,药物对胃肠平滑肌细胞运动的调节机制主要通过运用分子生物学和细胞生物学等技术手段进行研究。

血根碱(sanguinarine, $C_{20}H_{15}O_5N$)是一种苯菲啶异喹啉类生物碱,主要存在于罂粟科、蓝堇科及芸香科等植物中,具有抗菌、抗肿瘤、增强免疫力等作用,在传统及当代医药中起重要作用^[4-9]。血根碱对心肌、骨骼肌及血管平滑肌的收缩具有不同的调节作用^[10-13],但对胃肠平滑肌运动的影响鲜有报道。笔者所在课题组拟研究血根碱对肠平滑肌细胞(intestinal smooth muscle cell, ISMC)收缩的抑制作用,并探讨其作用机理。课题组的前期研究表明,血根碱对兔离体肠平滑肌收缩有明显的抑制作用,其抑制机理可能与肠平滑肌上M受体、H1受体和L型钙离子通道有关。为进一步探寻血根碱抑制肠平滑肌活动的机理,笔者采用酶消化法原代培养大鼠肠平滑肌细胞,利用倒置相差显微镜测定血根碱对大鼠 ISMC 收缩的影响,旨在从细胞水平探明血根碱对 ISMC 收缩的抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

SPF(specific pathogen free, SPF)级 SD 大鼠,体质量 250 ~ 300 g,雌、雄各半,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为 SCXK(湘)2009-0004。

1.2 主要仪器及试剂

主要仪器:MCO-18AC型二氧化碳培养箱(日本三洋公司)、VS-840K-U型超净工作台(苏净集团苏州安康空气技术有限公司)、Z323K型低温冷冻高速离心机(Hermlle Labortechnik GmbH)、倒置相差显微镜(日本Olympus)、显微照相系统(Nikon E200)、60 mm×15 mm细胞培养皿(Coring)。

主要试剂:II型胶原酶、二甲基亚砜、大豆胰蛋白酶抑制剂;高糖DMEM培养液、胎牛血清;鼠抗 α -actin单克隆抗体、SABC免疫组化试剂盒和DAB显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);硫酸阿托品注射液、乙酰胆碱、组胺、氯化钾(国药

集团化学试剂有限公司);98%血根碱(湖南美可达生物试剂有限公司);50%戊二醛(成都市科龙化工试剂厂)。

1.3 方 法

1.3.1 Hepes Ringer 缓冲液和 PBS 液的配制

Hepes Ringer 缓冲液的配制:准确称 Hepes 5.84 g、NaCl 5.9 g、KCl 0.97 g、 NaH_2PO_4 0.39 g、 $CaCl_2$ 2.40 g、 $MgCl_2$ 5.89 g、谷氨酸钠 0.85 g、谷氨酰胺 0.56 g、葡萄糖 2.07 g 和 BSA 1 g,逐一加入到 900 mL 蒸馏水中,充分搅拌溶解后,补水至 1 L,用 Tris 碱调节 pH 至 7.2,分装,灭菌,备用。

PBS 液的配制:准确称取 NaCl 8 g、KCl 0.2 g、 KH_2PO_4 0.2 g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.63 g,逐一加入到 900 mL 蒸馏水中,充分搅拌溶解后,补水至 1 L,调 pH 值至 7.4,分装,灭菌,备用。

1.3.2 大鼠 ISMC 的原代培养及鉴定

1) 酶消化法原代培养大鼠 ISMC。根据文献[7-8]方法,将禁食 24 h 的 SD 大鼠常规断椎处死,放入盛有 75%乙醇的大烧杯内浸泡 2 ~ 3 min,在超净工作台上将大鼠放入无菌托盘内,于无菌条件下取中段小肠 10 cm,用生理盐水反复灌肠冲洗,移入含 300 U/mL 青霉素、300 U/mL 链霉素的 Hepes Ringer 缓冲液中,浸泡 15 min,以杀灭肠壁内外的微生物。在解剖学显微镜下,沿肠系膜下纵行切开肠段,用皮内针固定好四角,仔细剥离黏膜层,翻转至外侧,撕去肠系膜,刮去浆膜层,反复用镊子侧脚刮肠段的内外层,直至在显微镜下能观察到透明的肌层为止。将剥离好的小肠放入无菌平皿内,将小肠组织块剪碎后,放入 50 mL 离心管内,加入含 0.1%II 胶原酶和 0.01%胰蛋白酶抑制剂的 Hepes Ringer 缓冲液 10 mL,37 °C 消化 30 min,期间不时摇动。当小肠组织块变白松软,液体变浑浊后,加培养液,终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用含 20%胎牛血清的 DMEM 重新悬浮,过 250 μ m 孔径筛网,即得到游离 ISMC。用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液将细胞浓度调至 5×10^4 个/mL,接种至培养瓶中,放入培养箱内,培养箱温度设置为 37 °C,并在 95% O_2 和 5% CO_2 条件下培养。24 h 后给细胞换液,弃去未贴壁细胞,加入培养液继续培养。之后

每 2~3 d 换液 1 次,待细胞长满瓶底约 80%左右时传代。

2) 细胞成活率检测。游离的单个 ISMC 用血球计数板计数。细胞活性以排斥台盼蓝的能力来确定(活细胞具有排斥台盼蓝的能力,细胞晶莹剔透,不被染色,而死细胞呈蓝色)。取细胞悬液 5 滴于载玻片上,加 1 滴 0.4%台盼蓝溶液,混匀,3 min 内于光学显微镜下用血细胞计数板计数。细胞存活率=活性细胞数/(活性细胞数+死细胞数)。试验要求细胞存活率在 90%以上。

3) ISMC 的免疫组化鉴定。将经酶消化法原代培养的长至融合的大鼠 ISMC,接种于预置有多聚赖氨酸涂布的盖玻片的 6 孔培养板中,培养 5 d 后进行 α -actin 免疫组织化学染色。同时设阴性对照。取出盖玻片,用 PBS 冲洗后,加入 4%的多聚甲醛,固定 30 min。采用免疫组织化学 ABC 法鉴定 ISMC。具体鉴定步骤:取 5 mL 30%的 H_2O_2 加入到 245 mL 纯甲醇中,混匀,室温浸泡固定后的玻片 30 min, PBS 冲洗 1~2 次;滴加 5%BSA 封闭液,室温作用 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加鼠源 α -actin 单克隆抗体,抗体按 1:50 倍稀释,37 °C 1 h 或 4 °C 冰箱过夜, PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG,20~37 °C 孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;用 DAB 显色试剂盒(AR1022)进行 DAB 显色;取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间为 5~30 min,蒸馏水洗涤;苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜观察。阴性对照组一抗加 PBS。

1.3.3 溶剂筛选

预试验结果表明,血根碱可在二甲基亚砜(DMSO)或甲醇中溶解,在水中溶解度较低。为选择能溶解血根碱并对细胞生长影响不大的最佳溶剂,故进行以下试验。

1) DMSO 对 ISMC 收缩的影响试验(分别考查 0.4%、0.3%、0.5%DMSO 对 ISMC 收缩的影响,3 组试验的方法完全相同,此处以 0.5%DMSO 组为例进行说明):向 24 孔细胞培养板中加入 270 μ L ISMC 悬液,再加入 30 μ L 5%的 DMSO,使 DMSO 终浓度为 0.5%,4 孔重复,混匀,作用 5 min 后,

加入 80 μ L 2.5%戊二醛固定液,终止反应。应用倒置相差显微镜测定 0.5% DMSO 作用后细胞的长度,并计算细胞收缩率。

2) 甲醇对 ISMC 收缩的影响试验(分别考查 0.04%、0.06%、0.08%甲醇对 ISMC 收缩的影响,3 组试验的方法完全相同,此处以 0.08%甲醇组为例进行说明):向 24 孔细胞培养板中加入 270 μ L ISMC 悬液,再加入 30 μ L 0.8%甲醇,使甲醇终浓度为 0.08%,4 孔重复,混匀,作用 5 min 后,加入 80 μ L 2.5%戊二醛固定液,终止反应。在倒置相差显微镜下观察细胞的形态,并测定细胞的长度,计算细胞收缩率。

3) PBS 对细胞收缩的影响试验(对照组):将 30 μ L PBS 液加于 270 μ L ISMC 悬液中,作用 5 min 后,加入 2.5%戊二醛固定液,终止反应,应用倒置相差显微镜测定细胞的长度,计算细胞收缩率。

1.3.4 血根碱对 ISMC 收缩影响的考查

分别考查血根碱对正常及乙酰胆碱、组胺、KCl 作用后 ISMC 收缩的影响。

1) 血根碱对正常 ISMC 收缩的影响试验(分别考查 80 μ mol/L 血根碱、20 μ mol/L 阿托品、80 μ mol/L 血根碱+20 μ mol/L 阿托品对正常 ISMC 收缩的影响,3 组试验的方法相同,此处以 80 μ mol/L 血根碱为例进行说明):向 24 孔细胞培养板中加入 ISMC 悬液,再加入 80 μ mol/L 血根碱,作用 5 min 后加入 2.5%戊二醛固定液,终止反应。在倒置相差显微镜下观察细胞的形态,测定细胞长度,计算细胞舒张率(即血根碱对细胞的抑制率)。

2) 血根碱对 10^{-4} mol/L 乙酰胆碱诱导的 ISMC 收缩的影响试验:向 24 孔细胞培养板中加入 ISMC 悬液,先加入 4~10 mol/L 乙酰胆碱,作用 1 min 后,再加入血根碱(按 5、10、30、60、100 μ mol/L 分次进行),作用 5 min 后,加入 2.5%戊二醛固定液,终止反应。在倒置相差显微镜下观察细胞的形态,测定细胞长度,计算细胞舒张率。

3) 血根碱对 10^{-4} mol/L 组胺诱导的 ISMC 收缩的影响试验。试验方法同血根碱对乙酰胆碱诱导 ISMC 收缩的影响试验,略。

4) 血根碱对 60 mmol/L 的 KCl 诱导 ISMC 收缩的影响试验。试验方法同血根碱对乙酰胆碱诱导

ISMC 收缩的影响试验, 略。

1.4 数据分析

用软件 Orige8.0 对给药前后平滑肌细胞长度值进行单因素方差分析, 并计算细胞收缩率和细胞舒张率。

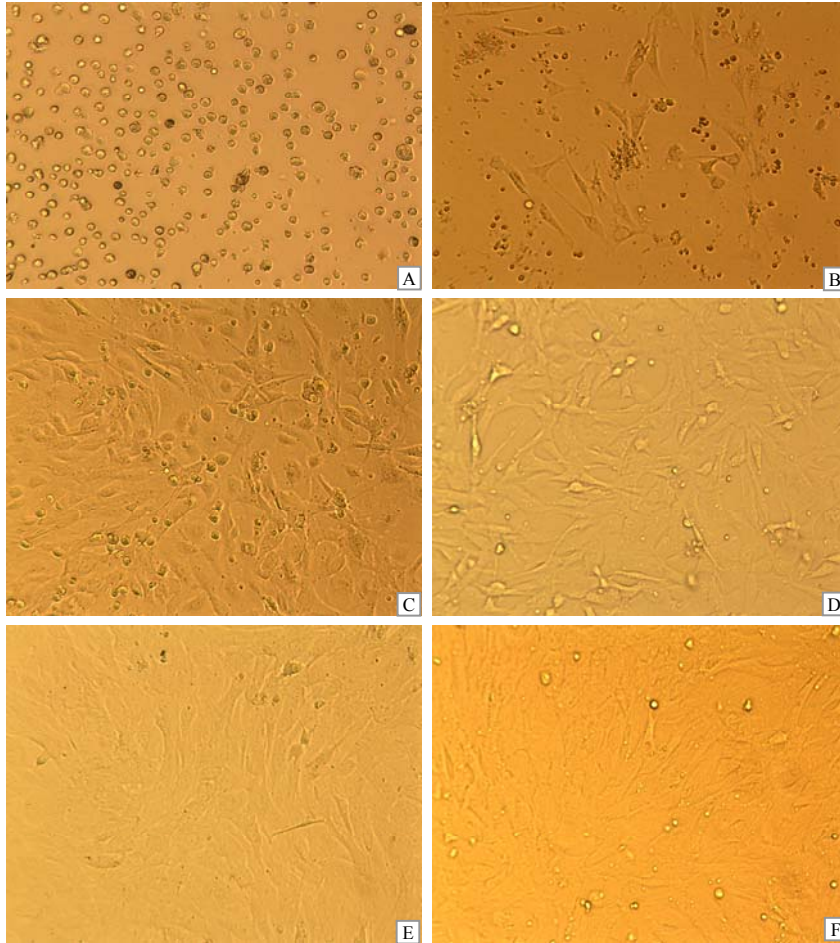
细胞收缩率=(对照组细胞平均长度 - 给药组细胞平均长度)/对照组细胞平均长度。

细胞舒张率(细胞收缩的抑制率)=(给药组细胞平均长度 - 对照组细胞平均长度)/给药组细胞平均长度。

2 结果与分析

2.1 大鼠 ISMC 原代培养结果

用酶消化法分离得到的大鼠 ISMC 如图 1。



A 酶消化法分离的大鼠 ISMC ($\times 100$); B 大鼠 ISMC 培养后 24 h ($\times 100$); C 大鼠 ISMC 培养后 3 d ($\times 100$); D 大鼠 ISMC 培养后 4 d ($\times 100$); E 大鼠 ISMC 传代后 2 d ($\times 100$); F 大鼠 ISMC 传代后 3 d ($\times 100$)。

图 1 酶消化法原代培养的大鼠肠平滑肌细胞 (ISMC)

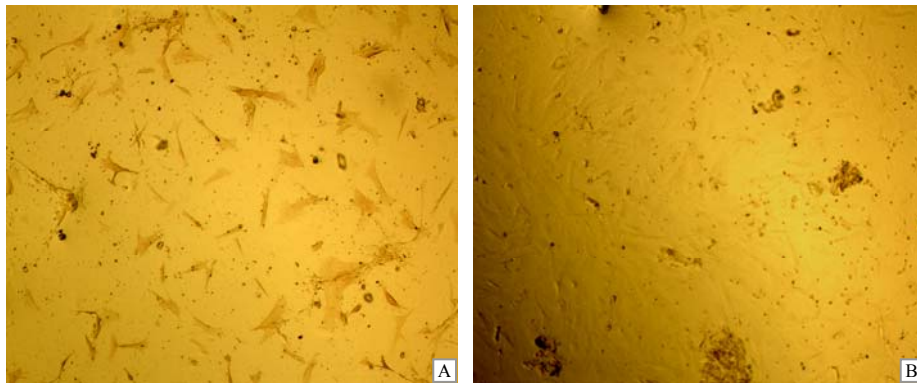
Fig.1 Rat intestinal smooth muscle cells isolated by collagenase digestion method

用酶消化法分离得到的大鼠 ISMC, 24 h 后细胞贴壁, 细胞密度大, 纯度高, 边缘清晰(图 1-B); 3 d 后长满瓶底, 呈不规则排列, 细胞呈三角型或梭状, 并形成细胞晕(图 1-C); 继续培养至第 4 天, 细胞长满瓶底, 呈放射状, “峰-谷”样排列, 可传代(图 1-D)。传代后的细胞培养 24 h 后开始贴壁, 48 h 后细胞呈长梭状、放射状或涡旋状(图 1-E); 3 d

后细胞均匀密集地长满培养瓶, 呈现平滑肌细胞特有的“峰-谷”样排列(图 1-F)。

2.2 ISMC 的鉴定结果

应用 α -actin 单克隆抗体免疫组化染色, 可见细胞被染成棕色或浅棕色, 核不着色, 呈浅蓝色阳性反应(图 2-A)。阴性对照组细胞没有被染色(图 2-B)。



A 阳性对照(×40); B 阴性对照(×40)。

图 2 大鼠 ISMC 的免疫组化鉴定结果

Fig.2 Rat intestinal smooth muscle cells identified by immunohistochemistry

经免疫组化鉴定, 酶消化法原代培养鼠 ISMC 可获得高纯度的细胞(α -actin 阳性率达 90%以上), 且生长良好。

2.3 血根碱对 ISMC 收缩反应的影响

2.3.1 不同溶剂对 ISMC 收缩的影响

在倒置显微镜下观察, 正常大鼠 ISMC 呈梭形, 胞质密度高, 表面光滑, 边缘整齐, 中间有一圆形或椭圆形的核, 细胞长度为 11.56 ~ 23.00 μm 。0.5%、0.4%、0.3%DMSO 组和 0.08%、0.06%、0.04%甲醇组细胞长度为 14.16 ~ 15.61 μm , 细胞生长良好, 无脱落、收缩、变形等发生。DMSO 组和甲醇组细胞长度与 PBS 组无显著差异, 细胞收缩率的差异也不显著(表 1) 因此, 0.5%、0.4%、0.3%DMSO 和 0.08%、0.06%、0.04%甲醇均可作为溶解血根碱的溶剂进行后续试验。本试验中选取 0.3%DMSO 为后续试验的溶剂。

表 1 不同溶剂作用下大鼠 ISMC 的细胞长度和收缩率

Table 1 Length and contraction rate of rat intestinal smooth muscle cells with different solvents

溶剂	细胞长度/ μm	细胞收缩率/%
0.5% DMSO	14.16±0.06	14.01±1.69
0.4% DMSO	15.39±0.70	10.54±1.49
0.3% DMSO	14.18±0.06	13.90±1.48
0.08%甲醇	14.49±0.21	12.07±0.47
0.06%甲醇	14.32±0.01	13.06±1.54
0.04%甲醇	14.41±0.32	12.59±1.13
PBS	15.61±0.89	—

2.3.2 血根碱对正常及乙酰胆碱、组胺、KCl 诱导 ISMC 收缩的影响

1) 血根碱对正常 ISMC 收缩的抑制率达 32.22%, 与 PBS 组差异显著, 与阿托品组抑制率(34.99%)差异不显著, 阿托品和血根碱联用对 ISMC 收缩的抑制有协同效应, 抑制率达 68.8%, 与血根碱或阿托品单用的抑制率差异显著。

2) 血根碱对乙酰胆碱诱导 ISMC 收缩的影响。乙酰胆碱可显著诱导 ISMC 收缩, 使细胞缩短。由表 2 可见, 5 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 血根碱对由乙酰胆碱诱导 ISMC 收缩的抑制作用明显, 其半数抑制浓度为 44.75 $\mu\text{mol/L}$, 其中, 5 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ 血根碱的抑制作用程度相近; 60 $\mu\text{mol/L}$ 血根碱的抑制率达 (62.94±1.2)%, 显著高于 5、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 血根碱组; 100 $\mu\text{mol/L}$ 血根碱的抑制作用降低(这可能是由于此药物浓度对细胞存在一定的毒性)。可见, 60 $\mu\text{mol/L}$ 血根碱对乙酰胆碱诱导 ISMC 收缩的抑制作用较好。

表 2 血根碱对乙酰胆碱、组胺和 KCl 诱导 ISMC 收缩的抑制率

Table 2 Sanguinarine inhibited contractions induced by ACh, HA and KCl in isolated rat small intestine

血根碱浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞舒张率(抑制率)/%		
	乙酰胆碱	组胺	KCl
5	(44.31±1.3)b	(23.75±2.02)b	(29.67±4.81)b
10	(47.64±2.42)b	(36.00±1.35)a	(33.33±2.96)b
30	(50.99±4.37)b	(38.50±1.6)a	(44.00±0.58)a
60	(62.94±1.2)a	(41.25±1.03)a	(46.33±2.03)a
100	(24.73±7.2)c	(14.33±4.67)c	(13.67±2.73)c

3) 血根碱对组胺诱导 ISMC 收缩的影响。 1×10^{-4} mol/L 组胺可诱导大鼠 ISMC 收缩。由表 2 可见, 5 μ mol/L 血根碱可抑制组胺诱导的大鼠 ISMC 收缩, 10~60 μ mol/L 血根碱的抑制作用更强, 其抑制率与 5 μ mol/L 血根碱组差异显著, 但 10~60 μ mol/L 血根碱组间抑制率差异不显著; 100 μ mol/L 血根碱对组胺诱导 ISMC 的抑制作用降低(这可能是由此浓度下药物对细胞开始产生亚慢性毒性所致)。可见, 10 μ mol/L 血根碱即可对组胺诱导的 ISMC 收缩达到较好的抑制作用。

4) 血根碱对 KCl 诱导的 ISMC 收缩的影响。60 mmol/L 的 KCl 可显著诱导大鼠 ISMC 的收缩, 使细胞缩小。由表 2 可见, 5~100 μ mol/L 血根碱可显著抑制 KCl 诱导 ISMC 的收缩; 5、10 μ mol/L 血根碱对 KCl 诱导 ISMC 收缩的抑制程度相近, 抑制率达 30%左右; 30、60 μ mol/L 血根碱对 KCl 诱导 ISMC 收缩的抑制程度最强, 与 5、10 μ mol/L 血根碱组的抑制程度存在显著差异, 但 30、60 μ mol/L 血根碱组间的抑制程度无差异; 100 μ mol/L 血根碱对 KCl 诱导 ISMC 收缩的抑制作用降低。可见, 30 μ mol/L 血根碱即可明显地抑制 KCl 诱导 ISMC 的收缩。

3 结论与讨论

血管平滑肌细胞的培养技术目前已很成熟, 国内外报道较多^[14], 但 ISMC 的培养由于存在易污染、难分离等问题, 目前尚未建立完善的培养方法。试验过程中, 笔者应用酶消化法培养大鼠 ISMC, 可得到大量较纯的平滑肌细胞, 且这些平滑肌细胞呈“峰-谷”样排列, 经免疫组化鉴定, 其纯度可达 90%以上, 可满足后续试验的要求。

ISMC 上存在一些离子通道, 如毒蕈碱类^[15]、胺类、肽类^[16]和一些嘌呤类^[17]等离子通道, 这些通道被某些激动剂激活后发挥其生理作用。当这些通道被激活后, 胞外离子内流产生内部电流, 从而使细胞发生去极化, 引起细胞收缩。受体操纵的离子通道可促进细胞外 Na^+ 和 Ca^{2+} 内流, 钙离子在平滑肌细胞兴奋-收缩偶联中起重要作用。胃肠平滑肌细胞上主要分布有 M 受体、H 受体、5-HT 受体及一些胃肠激素受体等^[17-18]。乙酰胆碱、组胺分别为 M 受体和 H1 受体激动剂, 该类受体被激活后, 可兴

奋 ISMC, 诱导细胞收缩, 促使胃肠平滑肌蠕动加强^[19]。本试验中血根碱对正常 ISMC 收缩具有抑制作用, 并显著抑制由乙酰胆碱、组胺诱导的 ISMC 的收缩, 且与阿托品存在协同作用, 表明血根碱对大鼠 ISMC 收缩的抑制主要是通过作用于 ISMC 上的 M 受体、H1 受体而发挥作用的。钙离子在调节胃肠平滑肌兴奋-收缩偶联中起重要作用, 细胞外钙离子内流和细胞内钙离子释放引起平滑肌细胞收缩, 其中, 外钙离子内流在胃肠平滑肌收缩中起主要作用^[20]。ISMC 上的外钙内流主要通过电压依赖性钙离子通道(voltage-dependent Ca^{2+} channel, VDCC), 尤其是 L 型钙离子通道^[21-22]。本研究中 KCl 可诱导 ISMC 收缩, 这是由于当 KCl 作用于细胞时, 细胞外 K^+ 浓度升高, 导致细胞外 K^+ 内流, 引起细胞膜发生去极化, 从而激活 VDCC, 促使细胞外钙离子内流, 最终诱导 ISMC 收缩。血根碱可显著抑制 KCl 诱导的 ISMC 收缩, 表明血根碱可通过作用于细胞膜上的钙离子通道来达到抑制 ISMC 收缩的作用。

综上所述, 血根碱对大鼠 ISMC 的抑制主要通过作用于细胞膜上的 M 受体、H1 受体和钙离子通道来发挥作用, 至于具体通过哪条途径, 是直接还是间接作用于钙通路尚需通过放射配基受体结合试验或膜片卡技术进行验证。

参考文献:

- [1] Martin F G, Robert F D, Charles O E, et al. Isolation and culture of human intestinal smooth muscle cells[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1984, 176: 503-507.
- [2] Sanders K M, Koh S D, Ward S M. Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 307-343.
- [3] Farrugia G. Role of interstitial cells of Cajal in health and disease[J]. Neurogastroenterol Motil, 2008, 20(1): 54-63.
- [4] Choi W Y, Jin C Y, Han M H, et al. Sanguinarine sensitizes human gastric adenocarcinoma AGS cells to trail-mediated apoptosis via down-regulation of AKT and activation of caspase-3[J]. Anticancer Research, 2009, 29: 4457-4466.
- [5] Janovska M, Kubala M, Simanek V, et al. Fluorescence of sanguinarine: Fundamental characteristics and analysis of interconversion between various forms[J].

- Anal Bioanal Chem, 2009, 395: 235–240.
- [6] Chelombit'ko V A, Murav'eva D A. Bocconia microcarpe, source of the alkaloids chelerritrine and sanguinarine[J]. PHARmaceutical Institute, Pyatigorsk, 1968, 2(2): 103–105.
- [7] 梁宁霞, 衣兰娟, 田琳, 等. 鼠结肠平滑肌细胞的分离、培养与鉴定[J]. 江苏医药, 2005, 31(6): 433–436.
- [8] Gurgui M, Broere R, Kalf J C, et al. Dual action of sphingosine 1-phosphate in eliciting proinflammatory responses in primary cultured rat intestinal smooth muscle cells[J]. Cellular Signalling, 2010, 22: 1727–1733.
- [9] Larsson D E, Hassan S, Larsson R, et al. Combination analyses of anti-cancer drugs on human neuroendocrine tumor cell lines[J]. Cancer Chemother PHarmacol, 2009, 65: 5–12.
- [10] Chien M H, Cheng H W, Liao J W, et al. Induction of contracture and extracellular Ca^{2+} influx in cardiac muscle by sanguinarine: A study on cardiotoxicity of sanguinarine[J]. Journal of Biomedical Science, 2005, 12: 399–407.
- [11] Hu C M, Cheng H W, Cheng Y W, et al. Induction of skeletal muscle contracture and calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum vesicles by sanguinarine[J]. British Journal of PHarmacology, 2000, 130: 299–306.
- [12] Chien M H, Cheng H W, Cheng Y W, et al. Mechanisms underlying the induction of vasorelaxation in rat thoracic aorta by sanguinarine[J]. Jpn J PHarmacol, 2001, 85: 47–53.
- [13] Charbonneau C, Liberelle B, Hébert M J, et al. Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate/epidermal growth factor coating[J]. Biomaterials, 2011, 32(6): 1591–1600.
- [14] Inoue R, Isenberg G. Effect of membrane potential on acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum[J]. J Physiol, 1990, 424: 57–71.
- [15] Lee H K, Shuttleworth C W, Sanders K M. Tachykinins activate nonselective cation currents in canine colonic myocytes[J]. Am J Physiol, 1995, 269: 1394–1401.
- [16] Benham C D, Tsien R W. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle[J]. Nature, 1987, 328: 275–278.
- [17] Li C B, Yang X, Tang W B, et al. Arecoline excites the contraction of distal colonic smooth muscle strips in rats via the M_3 receptor-extracellular Ca^{2+} influx- Ca^{2+} store release pathway[J]. Canadian Journal of Physiology and PHarmacology, 2010, 88(4): 439–447.
- [18] Zullian C, Menozzi A, Pozzoli C, et al. Effects of α_2 -adrenergic drugs on small intestinal motility in the horse: An *in vitro* study[J]. The Veterinary Journal, 2011, 187(3): 342–346.
- [19] Bolton T B, Clark P. Effects of histamine, high potassium and carbachol on K efflux from longitudinal muscle of guinea-pig intestine[J]. J Physiol, 1981, 320: 347.
- [20] Dai Y, Liu J X, Li J X, et al. Effect of pinaverium bromide on stress-induced colonic smooth muscle contractility disorder in rats[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(3): 557–561.
- [21] 柯道平, 周华, 李忠稳, 等. 库容性 Ca^{2+} 内流介导大鼠远端结肠平滑肌收缩[J]. 中国药理学通报, 2006: 22(3): 344–348.
- [22] Kinoshita K, Sato K, Hori M, et al. Decrease in activity of smooth muscle L-type Ca^{2+} channels and its reversal by NF- κ B inhibitors in crohn's colitis model[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285(3): 483–493.

责任编辑: 王赛群