

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.19.013

旋覆代赭汤含药血清对食管平滑肌细胞 5-羟色胺 4 受体、环磷酸腺苷及钙离子浓度的影响

黄桢, 鲁军, 王霞, 杨东升, 张俊杰*

(浙江中医药大学, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053)

摘要 目的 探讨旋覆代赭汤治疗反流性食管炎的可能作用机制。方法 40 只大鼠随机分为旋覆代赭汤低、中、高剂量组及空白组, 每组 10 只, 旋覆代赭汤低中高剂量组给药量分别为 4.71、9.42、18.84 g/(kg·d), 每日 1 次, 连续灌胃 3 天, 空白组给予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃。末次灌胃后腹主动脉取血, 分离血清。旋覆代赭汤各剂量组分别设 5%、10%、20%、30% 共 4 个浓度, 采用 CCK-8 法检测各浓度对食管平滑肌细胞 (ESMC) 增殖的影响, 并筛选最佳给药浓度。原代培养 ESMC, 在运用 5-羟色胺 4 受体 (5-HT₄R) 激动剂 (马来酸替加色罗) 和抑制剂 (GR113808), 及腺苷酸环化酶 (AC) 的激动剂 (Forskolin) 和抑制剂 (SQ22536) 干预 5-羟色胺 (5-HT) 通路的信号传导, 再用筛选出的旋覆代赭汤含药血清孵育, ELISA 法检测胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 含量, 免疫荧光法检测 5-HT₄R 荧光强度, Ca²⁺ 探针检测细胞内 Ca²⁺ 浓度。结果 5% 旋覆代赭汤低剂量组对 ESMC 的增殖作用最强, 故选取用于后续实验。与 5-HT₄R 激动剂组比较, 5-HT₄R 激动剂加中药组 Ca²⁺ 荧光增强比值增加 ($P < 0.01$)。与 AC 激动剂组比较, AC 激动剂加中药组 5-HT₄R 荧光强度、Ca²⁺ 荧光强度显著增加 ($P < 0.01$)。与 5-HT₄R 抑制剂组比较, 5-HT₄R 抑制剂加中药组 5-HT₄R 荧光强度、Ca²⁺ 荧光增强比值、cAMP 浓度均增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 AC 抑制剂组比较, AC 抑制剂加中药组 5-HT₄R 荧光增强比值、Ca²⁺ 荧光强度、cAMP 浓度均增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 旋覆代赭汤可能是通过增加 5-HT₄R 表达, 继而激活 AC, 促进 cAMP 释放, 使胞内 Ca²⁺ 浓度升高, 引起食管平滑肌收缩, 从而减轻反流。

关键词 反流性食管炎; 旋覆代赭汤; 食管平滑肌细胞; 5-羟色胺 4 受体; 环磷酸腺苷; 钙离子

反流性食管炎 (reflux esophagitis, RE) 是胃液或混合肠液反流刺激等原因引起的食管黏膜炎性病损, 可导致食管黏膜出血、食管狭窄、吞咽困难等^[1]。近年来, RE 的发病率有不断上升的趋势, 其并发症 Barrett 食管、食管腺癌等已成为消化领域的研究热点^[2]。目前一过性食管下括约肌松弛被认为是引起 RE 的最主要因素, 可能与平滑肌细胞中的游离 Ca²⁺ 浓度有关^[3]。另外, 亦有研究^[4]显示, 5-羟色胺 (5-HT) 是参与调节胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质。RE 属于中医学“吞酸”“吐酸”“嘈杂”“胃脘痛”“食管瘕”等范畴。研究^[5]显示, 旋覆代赭汤治疗 RE 疗效显著。本研究观察旋覆代赭汤对食管平滑肌细胞 (ES-

MC) 中 5-HT、Ca²⁺ 的影响, 探讨旋覆代赭汤治疗 RE 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 45 只, 8 周龄, 体重 (220 ± 20) g, 由浙江中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2013-0016。本研究通过浙江中医药大学伦理委员会审批, 批件号: ZSLL-2016-130。

1.2 药物

旋覆代赭汤根据其在《伤寒论》中原方的剂量换算^[6]: 旋覆花 15 g, 赭石 5 g, 清半夏 15 g, 生姜 25 g, 人参 10 g, 炙甘草 15 g, 大枣 15 g, 由浙江中医药大学门诊部提供, 水煎浓缩成含生药量 1 g/ml 的药液, 置冰箱中 4℃ 保存。

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY17H270017); 浙江省中医药科技计划项目 (2016ZA046)

* 通讯作者: zhangjunjie70@aliyun.com, (0571) 86633105

1.3 主要试剂及仪器

胎牛血清 (批号: 20150520), 杭州四季青生物工程有限公司; DMEM 培养基 (批号: 1897299), Sigma 公司; 平衡盐溶液 (Hanks 液, 批号: 20170331), 吉诺生物医药技术有限公司; 磷酸缓冲盐溶液 (PBS, 批号: 02/2019)、CCK-8 试剂盒 (批号: D824FD0251)、大鼠蛋白激酶 A ELISA 试剂盒 (批号: 201710), 均购自上海生工生物工程有限公司; FITC-羊抗兔 IgG (批号: BST12E02A05)、FITC-羊抗小鼠 IgG (批号: BST12E02A01)、5-羟色胺 4 受体 (5-HT₄R) 抗体 (批号: 003112A81113)、兔抗大鼠 α -平滑肌激动蛋白 (α -SMA, 批号: 4A4)、羊血清 (批号: 13B01A09)、DAPI 染液 (批号: 12D20B77)、4% 多聚甲醛 (批号: 12G30B69), 武汉博士德生物工程有限公司; 马来酸替加色罗 (批号: 189188-57-6), 上海陶素生化科技有限公司; GR113808 (批号: 3A/203952), TOCRIS 公司; Forskolin (批号: 15771)、SQ22536 (批号: 22969), Medchem Express 公司; 大鼠 cAMP ELISA 试剂盒 (批号: 1803251), 上海西唐生物科技有限公司; 免疫染色通透液 (0.2% Triton X-100, 批号: P0096)、钙离子荧光探针 (Fluo-3/AM, 批号: 09011711207), 上海碧云天生物技术有限公司; 水合氯醛 (批号: H607002), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

BSC-1500 II A2-X 型生物安全柜, Biobase 公司; 3111 型细胞培养箱、Heraeus Multifuge X1R 型高速离心机, Thermo 公司; 30050303 型多功能酶标仪, TECAN 公司; DS-Ri2 型高级分析倒置显微镜, Nikon 公司; LSM880 型激光共聚焦显微镜, ZEISS 公司。

1.4 原代细胞提取

采用随机数表法取 5 只大鼠用于分离正常大鼠原代 ESMC^[7], 实验前大鼠禁食未禁水 24 h, 10% 水合氯醛 0.35 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 腹部正中剪开, 暴露腹腔, 分离食管下端, 剪断并获取食管下 1/3, 立即放入含有 PBS 的培养皿中。将培养皿移入超净台内, 用 PBS 冲洗 3 次, 剥离食管黏膜、浆膜等杂质。转移至含有 DMEM 的培养皿中, 将其剪成约 1 mm² 的小块。再用巴氏吸管将组织悬液移入 15 ml 离心管, 室温 800 r/min 离心 5 min, 离心半径 8 cm。离心完毕, 弃去上清液, 加入约 2 ml 含 FBS 重悬组织, 移入 25 cm² 培养瓶中, 吸去 FBS, 将培养瓶倒置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中静置

培养 4~5 h, 待组织牢固贴于培养瓶上, 加入 20% FBS DMEM 培养基 3 ml 培养, 隔 3 天换 1 次液。

取常规传代第 3 代细胞, 激光共聚焦培养皿中待细胞贴壁。4% 的多聚甲醛室温下固定 10 min, 0.2% Triton X-100 通透 10 min。羊血清封闭 30 min, 滴加兔抗大鼠 α -SMA 单克隆抗体 (1:100), 置于湿盒中, 4℃ 冰箱过夜, 滴加 FITC-羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:50), 37℃ 避光孵育 1 h, DAPI 染液染核, 孵育时间 10 min, 激光共聚焦显微镜下观察细胞染色情况并拍照。

1.5 旋覆代赭汤含药血清制备及浓度筛选

采用随机数表法将大鼠分成旋覆代赭汤低、中、高剂量组以及空白组, 每组 10 只。旋覆代赭汤中剂量组给药量为 9.42 g/(kg·d) (依据人临床等效剂量换算^[8]), 加倍 [18.84 g/(kg·d)] 和减半 [4.71 g/(kg·d)] 分别为旋覆代赭汤高、低剂量组给药量, 空白组给予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 连续 3 天。末次灌胃后禁食不禁水 3 h, 取 10% 水合氯醛按 0.35 ml/100 g 腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 分离血清, 经水浴灭活、微孔膜过滤, -80℃ 冻存备用。

收集对数期 ESMC, 数量调至 7000 个/孔, 以空白组血清为对照, 旋覆代赭汤血清设 5%、10%、20%、30% 共 4 个浓度, 按比例与含 DMEM 培养基混合培养 24 h, 设 5 个复孔。采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况, 测量各孔吸光度 (OD) 值, 细胞增殖率 (%) = [A (加药) - A (空白)] / [A (0 加药) - A (空白)] × 100%。A (加药): 具有细胞、CCK-8 和旋覆代赭汤血清的吸光度; A (空白): 具有 CCK-8 而无细胞的吸光度; A (0 加药): 具有细胞、CCK-8 和空白血清的吸光度, 选择对 ESMC 增殖作用最强的浓度进行后续实验。

1.6 细胞分组

ESMC 细胞分成 10 组: 空白血清组、5-HT₄R 激动剂组 (马来酸替加色罗)、5-HT₄R 抑制剂组 (GR113808)、5-HT₄R 激动剂 + 中药组、5-HT₄R 抑制剂 + 中药组、AC 激动剂组 (Forskolin)、AC 抑制剂组 (SQ22536)、AC 激动剂 + 中药组、AC 抑制剂 + 中药组、中药组。

1.7 细胞培养及指标检测方法

1.7.1 ELISA 法检测大鼠 ESMC 内 cAMP 浓度
将状态良好的第 3 代 ESMC 消化接种于 24 孔板中, 调整细胞浓度为 50 × 10⁴ 个/ml, 每孔 200 μ l, 补

足培养基, 培养箱培养 24 h。分组同上, 每组设 3 个复孔。细胞贴壁后, 弃去上清, 加入含有药物的培养基, 使马来酸替加色罗、GR113808、Forsko-lin、SQ22536 最终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$, 处理 30 min 后, 再加入浓度筛选后的旋覆代赭汤含药血清 $10 \mu\text{l}$, 与上述药物共同作用 6 h, 弃去上清, 每组加入 $200 \mu\text{l}$ PBS 重悬细胞, 移入 1 ml EP 管中。空白血清组加入空白血清 $10 \mu\text{l}$, 中药组加入筛选后的旋覆代赭汤含药血清 $10 \mu\text{l}$, 均培养 6 h。 -80°C 反复冻融, 按 ELISA 试剂盒说明进行检测。

1.7.2 免疫荧光法检测 5-HT₄R 荧光强度 ESMC 接种于激光共聚焦培养皿中, 细胞浓度为 50×10^4 个/ml, 每孔 $100 \mu\text{l}$, 分组同上, 每组设 4 个复孔。细胞贴壁后, 弃上清, 加入含有药物的培养基 $200 \mu\text{l}$ 处理 30 min 后, 再加入浓度筛选后的旋覆代赭汤含药血清, 共同作用 6 h, 弃上清, 加入 4% 的多聚甲醛室温下固定 10 min, 0.2% Triton X-100 通透 10 min。羊血清封闭 30 min, 滴加 5-HT₄R 抗体 (1:100), 湿盒 4°C 冰箱过夜, 滴加 FITC-羊抗兔 IgG 二抗 (1:50), 37°C 避光孵育 1 h, DAPI 染核, 孵育时间 10 min, 激光共聚焦显微镜下观察并拍照, 用 ZEN blue edition 2.5 软件进行荧光强度分析, 每皿选 3~5 个视野选择 4 个形态良好的细胞, 以平均荧光强度反映 5-HT₄R 的水平。

1.7.3 细胞内 Ca^{2+} 浓度检测 分组同上, 每组设 4 个复孔。将第 3 代 ESMC 细胞加入 0.2 ml $5 \mu\text{mol/L}$ Fluo-3/AM, 避光置 37°C 孵育 30 min, 吸出染液, 以 Hanks 液洗 3 次, 加入 0.2 ml Hanks 液后, 加入药物处理 5 min, 激光共聚焦显微镜观察拍照, 激发波长 488 nm, 发射波长 522 nm, 采样频率为 488 Hz, 每皿选 3~5 个视野选择 4 个形态良好的细胞, 用 ZEN blue edition 2.5 软件进行荧光强度分析, 以加药后荧光强度增高的比值来衡量钙浓度的变化, Ca^{2+} 荧光增强比值 = $(F_{\text{加药}} - F_{\text{基础}}) / F_{\text{基础}}$, $F_{\text{加药}}$ 为加入药物后的荧光强度, $F_{\text{基础}}$ 为加药前的基础荧光强度。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 所有计量数据符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ESMC 细胞观察及鉴定

原代培养的 ESMC 培养 3~4 天有少量细胞从组织块周围爬出, 2 周时细胞生长为单层, 铺满瓶底, 细胞形态不规则, 成梭形、三角形或菱形, 4 周时细胞排列致密, 呈“峰谷样”生长。ESMC 中 α -SMA 呈阳性, 细胞纯度较高。

2.2 旋覆代赭汤含药血清浓度筛选结果

表 1 示, 在 5%、10%、20%、30% 药物浓度下, 旋覆代赭汤低、中剂量组对 ESMC 干预后 OD 值较空白组均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而旋覆代赭汤高剂量组仅在 5% 浓度下 OD 值较空白组升高, 并且在 30% 浓度下 OD 值较空白组降低 ($P < 0.01$)。旋覆代赭汤低剂量组在 5%、10%、20%、30% 药物浓度下增殖率分别为 188.68%、152.49%、168.36%、137.5%, 旋覆代赭汤中剂量组分别为 153.28%、155.66%、138.12%、132.73%, 旋覆代赭汤高剂量组分别为 168.24%、122.07%、84.13%、71.80%, 提示 5% 旋覆代赭汤低剂量组对 ESMC 的增殖作用最强, 故选取用于后续实验。

2.3 各组 ESMC 中 5-HT₄R、 Ca^{2+} 表达及 cAMP 浓度比较

表 2 示, 与空白血清组比较, 中药组、5-HT₄R 激动剂组和 5-HT₄R 抑制剂组的 5-HT₄R 荧光强度显著增加, 中药组和 5-HT₄R 激动剂组、AC 激动剂组 Ca^{2+} 荧光增强比值及 cAMP 浓度显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 5-HT₄R 激动剂组比较, 5-HT₄R 激动剂加中药组 Ca^{2+} 荧光增强比值增加 ($P < 0.01$)。与 AC 激动剂组比较, AC 激动剂

表 1 各组血清在不同浓度条件下食管平滑肌细胞增殖情况比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	5%	10%	20%	30%
旋覆代赭汤低剂量组	5	$1.22 \pm 0.16^{**}$	$1.06 \pm 0.19^{*}$	$1.05 \pm 0.20^{**}$	$0.81 \pm 0.07^{**}$
旋覆代赭汤中剂量组	5	$1.05 \pm 0.17^{**}$	$1.07 \pm 0.14^{*}$	$0.91 \pm 0.07^{*}$	$0.79 \pm 0.05^{**}$
旋覆代赭汤高剂量组	5	$1.12 \pm 0.13^{**}$	0.90 ± 0.18	0.67 ± 0.08	$0.56 \pm 0.04^{**}$
空白组	5	0.78 ± 0.04	0.79 ± 0.11	0.74 ± 0.11	0.66 ± 0.04

注: 与空白血清组同浓度比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 各组食管平滑肌细胞中 5-HT₄R、Ca²⁺ 表达及 cAMP 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	5-HT ₄ R 荧光强度	Ca ²⁺ 荧光增强比值	cAMP 浓度 (pmol/ml)
空白血清组	16.64 ± 1.64 (4)	0.61 ± 0.27 (4)	19.05 ± 10.70 (3)
5-HT ₄ R 激动剂组	38.47 ± 3.50** (4)	1.29 ± 0.43* (4)	49.93 ± 0.30* (3)
AC 激动剂组	8.82 ± 0.67 (4)	1.11 ± 0.17* (4)	50.16 ± 0.27* (3)
5-HT ₄ R 抑制剂组	27.49 ± 1.59** (4)	0.63 ± 0.22 (4)	37.15 ± 6.04 (3)
AC 抑制剂组	12.44 ± 0.41 (4)	0.44 ± 0.18 (4)	35.57 ± 5.01 (3)
中药组	33.29 ± 8.35** (4)	1.24 ± 0.16** (4)	45.19 ± 4.62* (3)
5-HT ₄ R 激动剂加中药组	48.74 ± 10.50 (4)	3.27 ± 0.42 [△] (4)	49.13 ± 0.69 (3)
AC 激动剂加中药组	21.51 ± 2.16 [▲] (4)	4.37 ± 0.90 [▲] (4)	49.38 ± 0.83 (3)
5-HT ₄ R 抑制剂加中药组	40.40 ± 2.59 ^{##} (4)	3.58 ± 1.15 ^{##} (4)	49.93 ± 0.30 [#] (3)
AC 抑制剂加中药组	34.33 ± 2.59 ^{●●} (4)	3.25 ± 1.18 ^{●●} (4)	48.59 ± 1.54 [●] (3)

注: 5-HT₄R, 5 羟色胺 4 受体; AC, 腺苷酸环化酶; cAMP, 环磷酸腺苷; 与空白血清组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 5-HT₄R 激动剂组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 AC 激动剂组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 5-HT₄R 抑制剂组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$; 与 AC 抑制剂组比较, $\bullet P < 0.05$, $\bullet\bullet P < 0.01$; () 内为样本数

加中药组 5-HT₄R 荧光强度、Ca²⁺ 荧光增强比值显著增加 ($P < 0.01$)。与 5-HT₄R 抑制剂组比较, 5-HT₄R 抑制剂加中药组 5-HT₄R 荧光强度、Ca²⁺ 荧光增强比值、cAMP 浓度均增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 AC 抑制剂组比较, AC 抑制剂加中药组 5-HT₄R 荧光强度、Ca²⁺ 荧光增强比值、cAMP 浓度均增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

中医学认为, RE 多由于素体禀赋不足或饮食不节、情志失调、久病不愈、劳倦内伤等引起脾胃虚弱, 中焦气机升降失常, 气机痞塞, 而见心下痞闷“脾宜升则健, 胃宜降则和”, 胃气因虚上逆, 又兼嗳气、反胃、呃逆、反酸等症。病机多属于脾胃虚弱, 痰阻气逆, 升降失常, 故顾护脾胃、调畅气机为其基本治则, 常用旋覆代赭汤治疗本病。我们前期研究^[9-10]发现, 旋覆代赭汤能够干预 RE 的发生发展, 可修复钙离子通道, 引起胞内 Ca²⁺ 浓度升高, 提高食管平滑肌张力, 但通过何种途径仍未明确。

5-HT 必须和相应受体结合才能发挥正常生理功能^[1]。有研究^[2]发现, 5-HT 可以导致 ESMC 胞内游离 Ca²⁺ 浓度快速升高, 引起平滑肌收缩, 加入 5-HT₄R 特异性拮抗剂 GR113808 后, Ca²⁺ 浓度未发现明显升高, 证明 5-HT 是通过 5-HT₄R 发挥作用。5-HT₄R 属于 G 蛋白偶联受体, 通过激活 AC 产生第二信使 cAMP 而发挥调控平滑肌收缩、神经递质释放的作用^[3]。5-HT₄R 激活 AC, 使 cAMP 产生量增加, 从而激活 cAMP 依赖性蛋白激酶 A (PKA), 使钾离子通道关闭和膜发生去极化, 继而开放电压敏感性钙通道^[4]。Ca²⁺ 作为细胞第二信使, 随着 Ca²⁺ 内流的增加, 对平滑肌的收缩起

着重要的作用^[5]。

本研究首先筛选了用于实验的旋覆代赭汤含药血清的浓度, 结果发现, 旋覆代赭汤低、中剂量组在 5%、10%、20%、30% 药物浓度下, 及高剂量组 5% 药物浓度下, 对 ESMC 均有明显的增殖作用, 在高剂量 20%、30% 会产生抑制作用, 对细胞产生毒性。由于 5% 旋覆代赭汤低剂量组对 ESMC 的增殖作用最强, 故选用 5% 旋覆代赭汤低剂量。再次, 在运用 5-HT₄R 抑制剂干预通路的前提下, 旋覆代赭汤含药血清能使 5-HT₄R 的表达增加, cAMP 浓度升高, 使胞内 Ca²⁺ 浓度升高; 并且在运用 AC 抑制剂干预通路的前提下, 也能使 5-HT₄R 的表达增加, cAMP 浓度增加, 使胞内 Ca²⁺ 浓度升高。同时中药组与空白血清组相比, 也能明显使 5-HT₄R 的表达增加, cAMP 浓度增加, 使胞内 Ca²⁺ 浓度升高。以上结果说明, 旋覆代赭汤可能是通过作用于 5-HT₄R, 使 5-HT₄R 表达增加, 继而激活 AC, 促进 cAMP 释放, 打开电压门控钙通道, 最终使胞内 Ca²⁺ 浓度升高, 引起食管平滑肌的收缩, 减少一过性食管下括约肌的松弛发生频率, 减轻反流。至于旋覆代赭汤对 5-HT 信号通路, 尤其是 cAMP 释放后, 如何具体调控胞内 Ca²⁺ 浓度的变化仍需进一步研究。

参考文献

- [1] YAN C, LIANG WT, WANG ZG, et al. Comparison of stretta procedure and toupet fundoplication for gastroesophageal reflux disease-related extra-esophageal symptoms [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(45): 12882-12887.
- [2] CHONG VH, PADAM BC, HERMANTA RG, et al. Gastroesophageal reflux disorders among Nepalese residing in South-east Asia [J]. Med J Malaysia, 2013, 68(3): 234-238.
- [3] 张超, 卢王, 杨琦, 等. 胃食管反流病患者食管、胃运动

- 功能的研究 [J]. 山西医科大学学报, 2012, 43(2): 116-118.
- [4] 卢小芳, 王悦芬, 王彦刚. 5-HT 通路异常与胃食管反流病 [J]. 国际消化病杂志, 2014, 34(3): 163-166.
- [5] 杜昕, 袁红霞, 檀金川. 旋覆代赭汤加减治疗反流性食管炎临床研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 162-164.
- [6] 郝万山. 汉代度量衡制和经方药量的换算 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2005, 3(3): 48-51.
- [7] 谭玉珍. 实用细胞培养技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 142.
- [8] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [9] 张俊杰, 吴茂申. 旋覆代赭汤对反流性食管炎家兔食管下括约肌 L 型钙通道的作用研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(8): 1007-1011.
- [10] 张俊杰, 吴茂申. 旋覆代赭汤对反流性食管炎家兔食

管下括约肌受体操纵性钙通道调控作用的研究 [J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(9): 640-642.

- [1] MADER R, KOCHER T, HAIRER J, et al. Investigation of serotonin type 4 receptor expression in human and non-human primate gastrointestinal samples [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18(9): 945-950.
- [2] 张婷. 5-羟色胺对大鼠食管平滑肌动力功能的影响及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [3] TACK J, CAMILLERI M, CHANG L, et al. Systematic review: cardiovascular safety profile of 5-HT₄ agonists developed for gastrointestinal disorders [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 35(7): 745-767.
- [4] 周航宇, 姜淮芜, 王明佳. 5-羟色胺及其受体研究进展 [J]. 山东医药, 2014, 54(12): 91.
- [5] 王昊, 邓春玉, 饶芳, 等. 5-羟色胺诱导冠状动脉收缩的机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(5): 825-831.

Effects of *Xuanfu Daizhe Decoction* (旋覆代赭汤) Containing Serum on 5-HT₄R, cAMP and Ca²⁺ in Esophageal Smooth Muscle Cells

HUANG Yan, LU Jun, WANG Xia, YANG Dongsheng, ZHANG Junjie

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

ABSTRACT Objective To investigate the possible action mechanism of *Xuanfu Daizhe Decoction* (旋覆代赭汤) in the treatment of reflux esophagitis. **Methods** A total of 40 rats were randomly divided into a blank group and low-, medium-, and high-dose groups of *Xuanfu Daizhe Decoction*, with 10 rats in each group. The low-, medium-, and high-dose groups of *Xuanfu Daizhe Decoction* were given 4.71, 9.42, 18.84 g/(kg · d) respectively once a day, continuously for 3 days. The blank group was given 10 ml/(kg · d) normal saline. Blood was taken from the abdominal aorta after the last gavage, and serum was separated. Four concentrations of 5%, 10%, 20% and 30% were set in each dose group of *Xuanfu Daizhe Decoction*. CCK-8 method was used to determine the effects of various concentrations on the proliferation of esophageal smooth muscle cells (ESMC), and to screen the optimal concentration. Primary culture of ESMC, and 5-hydroxytryptamine 4 receptor (5-HT₄R) agonist (tegaserod maleate) and inhibitor (GR113808), and adenylate cyclase (AC) agonist (Forskolin) and inhibitor (SQ22536) were used to interfere the signal transduction of 5-hydroxytryptamine (5-HT) pathway, and then incubated with the selected *Xuanfu Daizhe Decoction* serum. The intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) content was detected by ELISA. The fluorescence intensity of 5-HT₄R was detected by immunofluorescence method, and the intracellular Ca²⁺ concentration was detected by Ca²⁺ probe. **Results** The low-dose group of 5% *Xuanfu Daizhe Decoction* had the strongest proliferation effect on ESMC, so it was selected for subsequent experiments. Compared with the 5-HT₄R agonist group, the Ca²⁺ fluorescence enhancement ratio of the 5-HT₄R agonist plus Chinese medicine group increased ($P < 0.01$). Compared with the AC agonist group, the 5-HT₄R fluorescence intensity and Ca²⁺ fluorescence intensity of the AC agonist plus Chinese medicine group increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the 5-HT₄R inhibitor group, 5-HT₄R fluorescence intensity, Ca²⁺ fluorescence enhancement ratio, and cAMP concentration in the 5-HT₄R inhibitor plus Chinese medicine group increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the AC inhibitor group, the 5-HT₄R fluorescence enhancement ratio, Ca²⁺ fluorescence intensity, and cAMP concentration of the AC inhibitor plus Chinese medicine group increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Xuanfu Daizhe Decoction* may increase the expression of 5-HT₄R, then activate AC, promote the release of cAMP, increase the intracellular Ca²⁺ concentration, cause contraction of esophageal smooth muscle, and reduce reflux.

Keywords reflux esophagitis; *Xuanfu Daizhe Decoction* (旋覆代赭汤); esophageal smooth muscle cells; 5-hydroxytryptamine 4 receptor; cyclic adenosine monophosphate; calcium ion

(收稿日期: 2018-09-19; 修回日期: 2019-01-11)

编辑: 邓 媛