

养血润肠方对实验性小鼠血虚型慢性功能性便秘结肠肌间神经丛 5-HT 和 AchE 的影响

★ 邱剑锋^{1*} 肖诚² 李国栋¹ 舒涛¹ (1 中国中医科学院广安门医院肛肠科 北京 100053; 2 中日友好医院临床研究部 北京 100029)

摘要:目的:研究养血润肠方对实验性小鼠血虚型慢性功能性便秘结肠肌间神经丛 5-HT、AchE 的影响。方法:取健康小鼠 72 只,随机分正常对照组、模型组、乳果糖组和养血润肠方小、中、大剂量组。正常对照组和模型组给予生理盐水,其他各组分别给予乳果糖口服液和不同剂量养血润肠方。各组动物灌服药物 14 天后,处死,分离大肠,行免疫组化染色分析。结果:模型组 5-HT、AchE 神经递质的阳性表达的神经细胞数量较正常组明显减少,养血润肠方治疗各组均可使结肠肌间神经丛 5-HT、AchE 则有不同程度的增加,而乳果糖则没有增加结肠肌间神经丛 5-HT、AchE 阳性表达的作用。结论:养血润肠方有调节慢性功能性便秘小鼠结肠肌神经丛 5-HT、AchE 的作用。

关键词:养血润肠方;5-羟色胺;乙酰胆碱酯酶;慢性功能性便秘;中药

中图分类号:R 282.5 **文献标识码:**A

The Affection of Yangxuerunchang Formula on 5-HT and AchE in Colonic Homogenate and Serum of Blood-deficiency Type Chronic Functionality Constipation Mice

QIU Jian-feng¹, XIAO Cheng², LI Guo-dong¹, SHU Tao¹

1 Gangchang Department, Guang An' men Hospital, the China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053

2 China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029

Abstract: Objective: To probe the affection of Yangxuerunchang formula (YXRCF) on 5-HT and AchE in Colonic Homogenate and Serum of Blood-deficiency Type Chronic Functionality Constipation (CFC) Mice. Method: Seventy-two healthy mice were divided into six groups randomly. i. e. normal group (NG), model group (MG), LOL group (LoG) and YXRCCF low (YIG), middle (YmG), high (YhG) dose group. NG and MG were given normal sodium, any other group were given LOL or different dose YXRCCF. After intra-gastric infusing two weeks, all mice were killed, colon were taken, then immunohistochemical stain of frozen section were made. Result: YXRCCF can increase the quantities of positive-cells of 5-HT and AchE in myenteric plexus of CFC modeled mice colon. LOL group can't increase the quantities of positive-cells of 5-HT and AchE in myenteric plexus of CFC modeled mice colon. Conclusion: YXRCCF can adjust the content of 5-HT and AchE in colonic homogenate and serum of Blood-deficiency type chronic functionality constipation mice.

Key Words: Yangxuerunchang formula; 5-HT; AchE; Chronic Functionality Constipation; Traditional Chinese medicine

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康小鼠 72 只,体重 25~30 g,雌雄各半,由中国医学科学院实验动物中心提供。将 72 只小鼠随机分为 6 组(空白对照组、模型组、乳果糖组、养血润肠方小剂量组、养血润肠方中剂量组、养血润肠方大

剂量组),各组雌雄各半。

1.2 造模方法

参照许海尘等^[1]文献方法,将分组好的小鼠分别置入小鼠代谢笼(广安门医院动物中心提供),SPF 环境饲养。适应 3d 后,实验组小鼠皮下注射盐酸吗啡,2.5 mg/(kg·d),共 45d,对照组注射等量等

* 作者简介:邱剑锋,男,汉族,1976 年生,江西赣县人,医学博士,中国中医科学院广安门医院肛肠科主治医师,研究方向:肛肠疾病的临床研究。E-mail: qiu Jianfeng2004@hotmail.com

渗盐水共 45d。实验组小鼠第 1 天以 75% 酒精棉球擦拭尾部,使血管扩张充血,剪去鼠尾尖端(0.25~0.3 cm),然后将鼠尾伤口浸入 37℃ 左右温水中直至小鼠失去血液约 0.3ml,而后每周同法放血 1 次,共 6 次,造成血虚模型^[2]。这样就形成了血虚型便秘模型。

1.3 给药及检测方法

各组用药剂量:正常组和模型组不予任何药物,乳果糖组予乳果糖口服液 6.2 ml/(kg·d);养血润肠方各剂量组依次给予养血润肠方 17、34、68 g/(kg·d)。造模成功后次日,灌药组分别按动物体表面积换算法计算剂量灌服各组小鼠,每日 1 次,连续 14 天。正常和模型组则灌服等量生理盐水,每日 1 次,连续 14d。末次给药后,处死动物,打开腹腔,分离大肠,切取结肠段组织约 2 cm,10% 甲醛固定,行 5-羟色胺(5-HT)、乙酰胆碱酯酶(AchE)免疫组化染色。

1.4 染色组化结果判定

1.4.1 半定量分析 半定量分析标准为:所有视野未见阳性细胞为(-);有少数弱阳性神经元为(+),染色呈淡黄;阳性细胞较多见为(++),染色呈棕黄;阳性细胞多见为(+++),棕褐色。

1.4.2 图像分析 每组选 5 例染色良好的切片。在显微镜物镜放大 20 倍下观察。以肌间丛为中心每张切片随机选取 5 个视野。共 25 个视野摄入计算机。测量每个视野阳性染色区域的表面积密度。即面密度:单位观察空间内所含某相的表面积。最后计算每组的平均值。

1.5 统计学处理

实验数据应用 SPSS12.0 统计软件包进行统计学处理,等级资料采用 Ridit 分析检验,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。

2 实验结果

2.1 肌间神经丛 5-HT、AchE 表达的半定量分析

2.1.1 5-HT 阳性表达神经细胞半定量分析 见表 1。

表 1 各组 5-HT 阳性表达神经细胞半定量比较

组别	n	-	+	++	+++
空白对照组	12	1	2	2	7* [△]
模型组	12	6	3	2	1
乳果糖组	12	6	4	2	0
小剂量组	12	2	1	1	8* [△]
中剂量组	12	1	2	2	7* [△]
大剂量组	12	2	0	3	7* [△]

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与乳果糖组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.1.2 AchE 阳性表达神经细胞半定量分析 见表

2。

表 2 各组 AchE 阳性表达神经细胞半定量比较

组别	n	-	+	++	+++
空白对照组	12	0	1	2	9* [△]
模型组	12	8	2	1	1
乳果糖组	12	9	1	1	1
小剂量组	12	1	2	1	8* [△]
中剂量组	12	2	2	1	7* [△]
大剂量组	12	2	2	1	7* [△]

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与乳果糖组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.2 各组间 5-HT、AchE 免疫组化染色图像分析结果 见表 3。

表 3 各组 5-HT、AchE 神经元面密度值比较

组别	n	5-HT	AchE
空白对照组	25	0.59±0.90 [△]	0.54±0.16**
模型组	25	0.48±0.10	0.42±0.12
乳果糖组	25	0.52±0.12 [△]	0.48±0.14
小剂量组 (17g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	25	0.58±0.08**	0.57±0.11** [△]
中剂量组 (34g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	25	0.56±0.12**	0.53±0.16**
大剂量组 (68g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	25	0.55±0.11*	0.51±0.14*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与乳果糖组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3 讨论

5-HT 又叫血清素(serotonin),是一种杂环胺,人体内 5-HT 主要存在于胃肠道粘膜的嗜铬细胞,约占总量的 80%,其余的主要分布在血小板、松果体及脑部的 5-HT 能神经元中。5-HT 的生理功能:(1)能促进血管平滑肌细胞的收缩、增生、迁移,参与血压的调节,活化血小板,诱导血小板的聚集,刺激有丝分裂的发生,活化 T、B、NK 和吞噬细胞,参与中枢神经系统的神经传递,与其他神经递质一起,参与行为活动、情绪、食欲体温调节等^[3]。(2)作为一种兴奋性的神经递质,除直接兴奋平滑肌外,还可兴奋胆碱能神经元及非胆碱能神经元,对消化道表现出兴奋作用。(3)与胆碱能神经元有着十分密切的关系^[4]。(4)除直接作用于平滑肌外,还可调动内源性的 Ach 的释放,而 Ach 又可抑制 5-HT 能神经元的活动,二者构成一个调节的环路。(5)对 GABA 的释放具有两重性,阈下剂量的 SP(P 物质)对 5-HT 具有调制作用并与胆碱能机制有关^[5,6]。5-HT 在肠道中的主要作用是促进肠管蠕动、促进水电解质和粘液分泌,还可改善肠壁局部血液循环。

在生理条件下,Ach 的合成在胞浆内进行,合成后经轴浆运输至神经末梢内储存。缺血缺氧可以引起细胞变性,严重时可引起细胞坏死,使合成 Ach 的外部环境发生改变,影响 Ach 的合成,使 Ach 的释放减少,从而引起 AchE 活性减少。胃肠道脑啡

肽(ENK)能神经元是一种抑制性中间神经元,通过轴突突触抑制胆碱能递质的释放而抑制回肠收缩,即抑制 Ach 的释放^[7],从而影响 AchE 活性。

乙酰胆碱是目前公认的对肠道运动有重要调节作用的两种神经递质之一。它们通过与其受体结合,在胃肠蠕动中发挥启动性作用。它们是肠壁内最主要,也是最经典的神经递质^[8~10]。肠肌间神经丛内存在有多种不同性质的神经元,其中胆碱能神经元是数目最多,类型最复杂的一种神经元。AchE 是神经递质乙酰胆碱(Ach)的水解酶,可作为胆碱能神经元的标志物,其活性变化可反映出细胞的代谢状态,Ach 释放增多,则 AchE 活性越高,反之亦然^[11]。Ach 是肠道兴奋性递质,能刺激平滑肌收缩,参与上皮的吸收及分泌过程,而它又是兴奋肠肌收缩的递质^[12]。胆碱能神经元释放后,与平滑肌膜表面的 M 受体结合,使胃肠平滑肌收缩。M 受体有两种亚型:(1)和电位敏感 Ca^{2+} 通道耦联的 M 受体亚型,此型对乙酰胆碱作用很敏感,小剂量 Ach 使其开放。(2)和受体活化 Ca^{2+} 通道耦联的 M 受体亚型,该型受体对 Ach 作用极不敏感,大剂量 Ach 与 M 受体结合,打开电位敏感性 Ca^{2+} 通道或受体活动 Ca^{2+} 通道,致细胞外 Ca^{2+} 内流,细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,肌膜去极化。细胞内 Ca^{2+} 浓度升高继发性引起胞内 cGMP 含量升高,cGMP 促进肌质网释放 Ca^{2+} ,使胞内 Ca^{2+} 浓度进一步升高,胃肠平滑肌收缩。Ach 引起平滑肌收缩,必须要有足够的神经元释放,而且要有足够的受体结合,有研究表明刺激 STC 结肠后 Ach 释放减少^[13],STC 患者结肠对胆碱能神经激动剂的反应性明显减弱^[14]。乙酰胆碱是胃肠道重要的兴奋性神经递质。它能调节多种离子的跨膜转运:如促进钙离子内流、抑制平滑肌细胞膜的钾电流、活化氯离子通道及非选择性阳离子通道等;乙酰胆碱还能使平滑肌去极化,刺激胃肠壁内胆碱能神经产生兴奋性接头电位、影响平滑肌的电活动,使平台期电位幅值增加时程延长^[15]。研究发现慢传输型便秘患者结肠对胆碱能激动剂的反应明显减弱^[16]。

实验结果显示:便秘模型小鼠结肠肌间 5-HT 和 AchE 神经阳性细胞数量和面密度均比正常组明显减少;养血润肠方各剂量组均可增加因便秘而减少的 5-HT 和 AchE 神经阳性细胞数量,乳果糖则没有此作用,养血润肠方各剂量组均可增加 5-HT 和 AchE 神经阳性细胞的面密度,乳果糖则无增加便秘小鼠结肠肌间神经丛 5-HT 神经阳性细胞的面密度

的作用。该实验阐明 5-HT 和 AchE 等递质的减少可能是慢性便秘的病因之一,为揭示慢性便秘的病因及其进一步治疗提供了实验基础。

参考文献

- [1]许海尘,林琳,张红杰,等.慢传输型便秘模型的建立及其机制探讨[J].医学研究生学报,2004,17(6):502~505
- [2]李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991.282
- [3]王强.5-羟色胺的检测及临床意义[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2004,25(2):149~151
- [4]Craig D A,Clarke D E. Pharmacological characterization of aneuronal receptor for 5- hydroxytry ptamine in guine pig ileum with properties similar to the 5- hydroxy tryptamine -4-receptors[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Cherapeutles,1990,253(3):1 378~1 386
- [5]肖强.P 物质对 5 HT 引起的大鼠回肠纵肌收缩效应的影响及其机制分析[J].生理学报,1989,41(3):313~317
- [6]Channel L A. Substance P mediates atropine sensitive response of guine pig ileum to serotonin[J]. Eur J Pharmacol,1983,87:485~489
- [7]Furness JB, Costa M. Transmitter neuroche mistry of neurons[M]. In:Furness J B, The enteric nervous system. New York & Edinburgh: Churchill Livingstone,1987.55
- [8]Liu L, Conlon JM, Joss J M, et al. Purification, characterization, and biological activity of a substance P- related peptide from the gut of the Australian lung fish, Neoceratodusforsteri[J]. Gen Comp Endocrinol,2002,125(1):104~112
- [9]Furuichi A, Makimoto N, Ogishima M, et al. In vivo assessment of the regulatory mechanism of cholinergic neuronal activity associated with motilityin dog small intestine[J]. Jpn J Pharmacol,2001,86(1):73~78
- [10]黄显凯,胥基太,童卫东.“泻剂结肠”大鼠结肠肌电活动及其对乙酰胆碱反应的变化[J].第三军医大学学报,2003,22(5):997~999
- [11]宋铁山,雷亚宁,胡松林.肠缺血后大鼠回肠乙酰胆碱酯酶阳性神经元的变化[J].咸宁医学院学报,2001,15(2):83~85
- [12]Jessen KR, Misky R, Hius J M. GABA as an autonomic neurotransmitter studies on intrinsic GABA ergic neurons in the myenteric plexus of the gut[J]. TINS,1987,10(6):255
- [13]Burleigh D E Evidence for a functional cholinergic deficit in human colonic issue resected for constipation[J]. J pharm Pharmacol,1988,40(1):55~57
- [14]assotti G, Chiarioni G, Imbimbo B P, et al impaired colonic motor response to cholinergic stimulation in patients with severe chronic idiopathic (slow transit type) constipation[J]. Dig Dis Sci,1993,38(67):1 040~1 043
- [15]Xue L, FukuLa H, Yamamoto Y, et al. Properties of junctionals in gastric-smooth muscle of the rat[J]. Jpn J Physiol,1996,46(1):123~130
- [16]刘宝华.乙酰胆碱和异丙肾上腺素在慢传输型便秘发生中的作用[J].第三军医大学学报,2004,26(12):1 045~1 048

(收稿日期:2007-05-28)