

养荣润肠舒合剂对慢传输型便秘模型大鼠结肠中 c-Kit、SP 与 VIP 的影响^Δ

张虹玺*(辽宁中医药大学附属第三医院, 沈阳 110005)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3476-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.07

摘要 目的:研究养荣润肠舒合剂对慢传输型便秘(STC)模型大鼠结肠Cajal间质细胞中酪氨酸激酶受体蛋白CD117(c-Kit)、P物质(SP)与肠肌间神经丛血管活性肠肽(VIP)的影响。方法:sc盐酸吗啡(2.5 mg/kg),每天1次,连续45 d以复制大鼠STC模型。120只大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、麻仁丸(阳性对照,14.7 g/kg)组与养荣润肠舒合剂高、低剂量[15、7.5 g(生药)/kg]组。复制模型成功后ig给药,每天1次,连续10 d。采用免疫组化法染色,光镜下观察大鼠结肠c-Kit、SP、VIP分布,并测定其表达。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠结肠c-Kit、SP阳性细胞数量减少、表达减弱,VIP阳性数量增加、表达增强,差异有统计学意义($P<0.01$),细胞形态出现明显异常;与模型组比较,麻仁丸组和养荣润肠舒合剂高、低剂量组大鼠结肠c-Kit、SP阳性细胞数量增加、表达增强,VIP阳性细胞数量减少、表达减弱,差异有统计学意义($P<0.05$),细胞形态有一定改善。结论:养荣润肠舒合剂对STC模型大鼠结肠中SP、VIP含量及c-Kit的表达有一定改善作用。

关键词 养荣润肠舒合剂;慢传输型便秘;Cajal间质细胞;血管活性肠肽;P物质

The Effects of Yangrong Runchangshu Mixture on c-Kit, SP and VIP in the Colon of Rats with Slow Transit Constipation

ZHANG Hong-xi (The Third Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110005, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Yangrong runchangshu mixture on tyrosine kinase receptor protein CD117 (c-Kit), substance P (SP) and myenteric nerve plexus vasoactive intestinal peptide (VIP) in the colon interstitial cell of Cajal of rat with slow transit constipation (STC). METHODS: Morphine hydrochloride (2.5 mg/kg) was given sc once daily for 45 consecutive days to establish STC rat models. 120 rats were randomized into a normal control (isometric normal saline) group, a model (isometric normal saline) group, Maren pill (positive control, 14.7 g/kg) group and Yangrong runchangshu mixture high-dose and low-dose [15 and 7.5 g(medicinal materials)/kg] groups. After successful establishment of the models, drugs were given ig once daily for 10 consecutive days. Immunohistochemical method was employed for staining. The changes in the structure and c-Kit, SP and VIP expressions in rats' colonic tissues were observed under the light microscope. RESULTS: Compared to the normal control group, those in the model group demonstrated weaker expressions of c-Kit and SP and less positive cells in colon, stronger expression of VIP and more positive cells, with statistical significances ($P<0.01$); cellular morphology became abnormal obviously. Compared to the model group, those in Maren pill group and Yangrong runchangshu mixture high-dose and low-dose groups showed stronger expressions of c-Kit, SP and more positive cells in colon, weaker expressions of VIP and less positive cells with statistical significances ($P<0.05$); cellular morphology was improved to some extent. CONCLUSIONS: Yangrong runchangshu mixture can improve the contents of SP and VIP and the expression of c-Kit in rats with STC to some extent.

KEYWORDS Yangrong runchangshu mixture; Slow transit constipation; Interstitial cell of Cajal; Vasoactive intestinal peptide; Substance P

便秘是一种临床常见疾病,同时也是多种疾病的一种临床症状。随着现代人饮食结构改变和精神心理、社会因素影响,便秘发病率有逐年增高的趋势。流行病学资料显示,我国

便秘发生率为10%~15%,其中60岁以上的老年患者占18%~23%。如果把排便困难的主诉作为便秘的评定标准,发病率远超50%^[1]。而这其中又以结肠的传输功能障碍、肠内

=====

(30):3 154.

[7] Plaza F, Gabler F, Romero C, *et al.* The conversion of dehydroepiandrosterone into androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (androstenediol) is increased in endometria from untreated

women with polycystic ovarian syndrome[J]. *Steroids*, 2010,75(12):810.

[8] Sai Y, Kaneko Y, Ito S, *et al.* Predominant contribution of organic anion transport in polypeptide oatp2b1 to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal caco-2 cells[J]. *Drug Metab Dispos*, 2006,34(8):1 423.

^Δ 基金项目:辽宁省科学技术厅2012年科学技术计划项目(No.2012020108-206)

* 主任医师,硕士生导师,博士。研究方向:中医药防治便秘。电话:024-31323600-2505。E-mail:zhanghongxi999@163.com

(收稿日期:2015-01-14 修回日期:2015-03-10)

(编辑:张静)

容物传输缓慢所引起的慢传输型便秘(Slow transit constipation, STC)占据着主导地位。近年来,STC的诊疗有了一定突破,尤其是中医药在其防治方面显示出了较大优势。

中药复方养荣润肠舒合剂是依据名老中医经验,在大量的临床实践基础上总结出的经验方,由黄精、桃仁、枳壳、肉苁蓉等12味中药组成,具有滋阴养血、补气润肠之功效,临床主要用于治疗STC,总有效率达92.50%^[2-3]。基于此,笔者通过观察结肠肌酪氨酸激酶受体蛋白CD117(c-Kit)、P物质(SP)、神经丛血管活性肠肽(VIP)的分布和含量变化,进一步研究养荣润肠舒合剂的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

CX31型显微镜(日本Olympus公司);HH.W21.600型电热恒温水箱(河北黄骅航天仪器厂);Kryostat 1720型切片机(德国Leitz公司);RX250型图像分析系统(德国Leica公司)。

1.2 药品与试剂

养荣润肠舒合剂[辽宁省中医研究院,批号:05010137,规格:500 ml/瓶,180 g(生药)/500 ml];麻仁丸(北京同仁堂股份有限公司,批号:11020139,规格:10 g/100粒);兔抗鼠c-Kit多克隆抗体、兔抗鼠SP多克隆抗体、兔抗鼠VIP多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司;免疫组化SP试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);多聚赖氨酸、柠檬酸缓冲液、固定液、二甲苯、无水乙醇、甲醛等购自北京华美生物公司。

1.3 动物

SPF级SD大鼠120只,28~32周龄,♀♂兼半,体质量320~350 g,由辽宁中医药大学实验动物中心提供[动物使用合格证号:SCXK(辽)2009-0013]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

120只大鼠随机分为5组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、麻仁丸(14.7 g/kg)组与养荣润肠舒合剂高、低剂量[15、7.5 g(生药)/kg]组,ig给药,每天1次,连续10 d。参考文献[4],sc盐酸吗啡(2.5 mg/kg),每天1次,连续45 d以复制STC大鼠模型;正常对照组sc等量等渗生理盐水。按成人体质量60 kg计算,实验用生药量为成人用量的10、5倍,给药体积为25 ml/kg。

2.2 取样

末次给药2 h后,ip 25%乌拉坦(0.4 ml/100 g)麻醉大鼠,然后将大鼠四肢固定在解剖盘上,打开胸腔,暴露心脏,将注射器针头刺入左心室,开始灌流生理盐水,同时剪开右心耳放血;右心耳流出的血水由红色转为淡红色,再转为无色透明,然后换成4%多聚甲醛进行灌流固定,直至大鼠四肢僵硬颤抖为止。迅速打开腹腔,分离大肠,切取大鼠的近端结肠段组织约15 mm,放入预先准备好的装有固定液的小瓶中二次固定。

2.3 各组大鼠结肠中c-Kit、SP、VIP分布与表达的测定

2.3.1 包埋 将所取组织标本在4%多聚甲醛-0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4,内含0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC))中浸泡过夜后取出,以擦镜纸包好,用大头针穿好编号,以流水冲洗2 h,将组织内的所含固定液清洗干净。梯度乙醇脱水,二甲苯透明、浸蜡,然后除去大头针,展开擦镜纸,将熔化的石蜡倒入包埋框内中,用加温的镊子将肠管垂直向下放入蜡中,待蜡

开始出现凝结时贴上编号,自然冷却后放入冰箱中进一步冷却。

2.3.2 切片准备 将免疫组化用的载玻片浸泡于盐酸乙醇中24 h后,用自来水漂净,将其置于37℃烤箱中烤干,再浸于多聚赖氨酸溶液中1 min,然后再一次将其置于37℃烤箱中烤干制成防脱片的载玻片备用。

2.3.3 组织切片 固定蜡块于切片机机头上,使组织标本包埋面与刀口平行,调整蜡块与刀口接触后连续切片。先粗切,后薄切,使切片厚度为3 μm。按需要切取蜡片,多余弃掉。先放在冷水中预展,在弯头镊的牵引下,用载玻片捞起转入(45±2)℃的水中,用弯头镊将蜡片分片(每张1~2片),选择所需蜡片,放在染色架上。

2.3.4 免疫组化染色 免疫组化染色严格按照免疫组化法步骤进行操作。细胞浆出现褐色片状或颗粒状物为c-Kit阳性,出现黄色或棕黄色物质为SP、VIP阳性。每张切片选择5个高倍镜视野(×400)观察大鼠结肠中c-Kit、SP和VIP的分布。应用图像分析系统进行定量灰度扫描,以图像分析软件自动分析c-Kit、SP、VIP阳性细胞面积(×10⁴ μm²)以代表其表达水平。

2.4 统计学方法

采用SPSS 13.0软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用LSD检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠结肠中c-Kit、SP和VIP分布观察结果

免疫组化染色后光镜下观察,可见正常对照组大鼠结肠c-Kit分布于整个结肠肌层,纵肌层、肌间丛、环肌层、黏膜下环肌层表面4个区域均可见c-Kit分布,但以环肌层和肌间丛区域最丰富。与正常对照组比较,模型组大鼠结肠c-Kit阳性细胞数量明显减少,其中结肠纵肌层、肌间丛表面区域c-Kit明显减少,而环肌层和黏膜下环肌层表面区域c-Kit减少更为明显,部分模型此区域c-Kit阳性几乎消失;残存的c-Kit阳性细胞形态也出现异常,如细胞膜部分溶解,突起变短、变钝等。与模型组比较,麻仁丸组与养荣润肠舒合剂高、低剂量组大鼠结肠c-Kit阳性细胞数量增加,细胞分布密度也明显增大,病理改变得到改善。

所有切片肌层中均可见SP和VIP阳性表达的细胞。与正常对照组比较,模型组大鼠结肠SP阳性细胞数量减少,分布稀疏;VIP阳性细胞数量增加,分布密集。与模型组比较,麻仁丸组与养荣润肠舒合剂高、低剂量组大鼠结肠SP阳性细胞数量增加,VIP阳性细胞数量减少。各组大鼠结肠c-Kit、SP和VIP分布观察结果见图1。

3.2 各组大鼠结肠c-Kit、SP、VIP表达测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠结肠c-Kit、SP表达减弱,VIP表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,麻仁丸组与养荣润肠舒合剂高、低剂量组大鼠结肠c-Kit、SP表达增强,VIP表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠结肠c-Kit、SP、VIP表达测定结果见表1。

4 讨论

现已证明,神经递质对肠蠕动的调节起着重要作用,神经递质中与肠道运动有关的种类很多,且还在不断发现新的递质。其中,以SP为代表的兴奋性递质和以VIP为代表的抑制性递质研究较为广泛。在结肠中,SP分布于结肠的肌间神经丛、黏

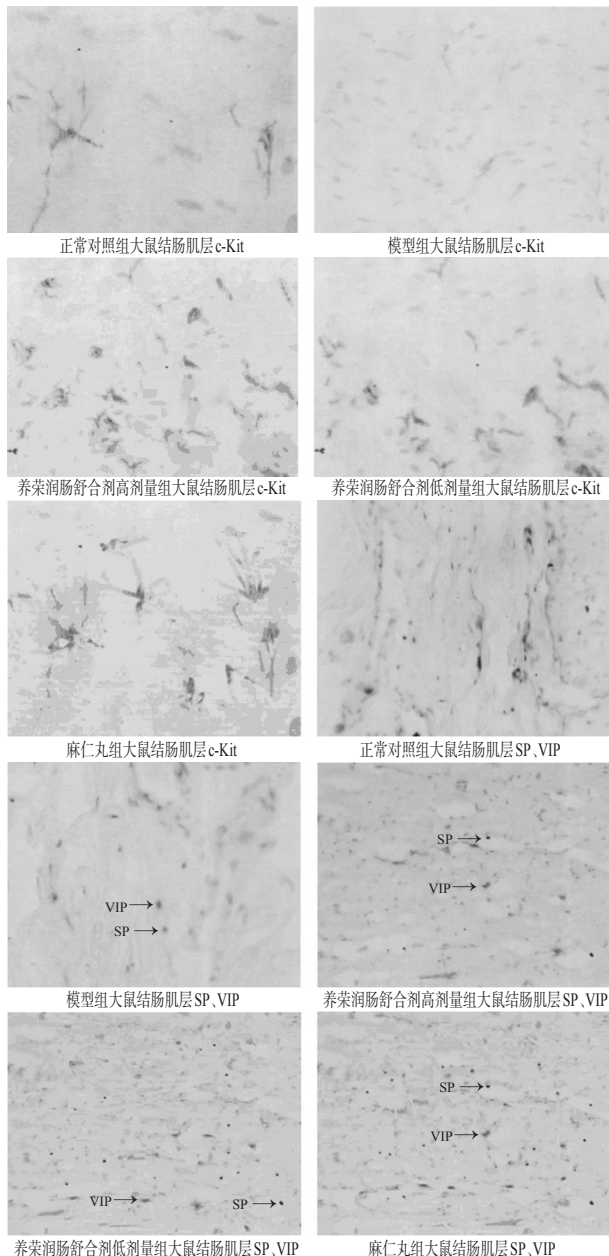


图1 各组大鼠结肠c-Kit、SP、VIP分布观察结果(×400)

Fig 1 Distribution results of c-Kit, SP and VIP in colon of rats in all groups(×400)

表1 各组大鼠结肠c-Kit、SP、VIP表达测定结果($\bar{x} \pm s, \times 10^4 \mu\text{m}^2$)

Tab 1 Determination results of c-Kit, SP and VIP in colon of rats in all groups($\bar{x} \pm s, \times 10^4 \mu\text{m}^2$)

组别	n	c-Kit	SP	VIP
正常对照组	24	11.31 ± 2.03	21.14 ± 1.25	20.38 ± 1.28
模型组	24	6.05 ± 1.04*	13.36 ± 1.29*	18.95 ± 1.21*
养荣润肠舒合剂高剂量组	24	9.25 ± 1.12#	17.37 ± 1.82#	13.82 ± 1.96#
养荣润肠舒合剂低剂量组	24	8.23 ± 1.01#	15.35 ± 1.43#	16.71 ± 1.27#
麻仁丸组	24	8.17 ± 0.96#	15.16 ± 1.19#	16.64 ± 1.39#

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.05$

膜下和黏膜丛,属于胃肠肽中的速激肽族,其作为一种胃肠感觉和运动神经元的非胆碱能兴奋性神经递质,具有强烈地促进消化道平滑肌收缩,刺激小肠、结肠黏膜分泌水和电解质,促进胃肠蠕动的作用。已有研究表明,80%的便秘患者结肠平滑肌中缺乏SP。将STC患者手术中切除的乙状结肠进行免疫组化染色,结果发现,患者肌间神经丛SP免疫反应性较正常对照人群降低,两组间黏膜下神经丛的SP免疫反应呈阳性的神经细胞数无明显差异^[5]。VIP属于胃肠肽中促胰液素族,主要分布于胃肠道黏膜、中枢神经系统及肠壁神经丛,是一种非肾上腺能非胆碱能神经(NANC)抑制系统的神经递质,故VIP水平升高则胃肠道平滑肌松弛,结肠和直肠的紧张性降低,致使肠蠕动性收缩减少,导致便秘的发生。Cheng L等^[6]研究发现在SCT患者中VIP能通过增加环磷酸腺苷(cAMP)的量,来增加结肠的收缩抑制性。

在100多年前,Cajal首先发现存在于胃肠道的一种特殊的间质细胞,被称为Cajal间质细胞。近年的研究表明,Cajal间质细胞既是胃肠道慢波的起搏者,又参与NANC神经信息传递,其主要功能是作为胃肠道的起搏点(Pacemaker)产生慢波;同时,Cajal间质细胞还具有中介的作用,向平滑肌细胞传递肠神经信号,使得肠道平滑肌细胞运动受肠神经系统控制,这是其另一重要功能,因此Cajal间质细胞与胃肠运动具有紧密相关性^[7]。c-Kit蛋白是已发现的Cajal间质细胞表面的特异性标志物在肠神经信号传递中起重要作用,检测其含量可作为消化系Cajal间质细胞的定量指标。

本研究结果表明,养荣润肠舒合剂可增加模型大鼠结肠纵肌层、肌间丛表面的c-Kit阳性细胞数,增加SP、VIP阳性细胞数,增强c-Kit、SP表达,减弱VIP的表达。该结论可为其临床应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 桂林,刘云肖,马惠荣,等.补中益气汤加味治疗结直肠癌化疗便秘的疗效观察[J].中国药房,2010,21(27):2574.
- [2] 张虹玺,李彦龙.中药复方养荣润肠舒治疗虚性便秘的临床研究[J].中外健康文摘,2008,5(9):1502.
- [3] 李智勇,李春雨,田玲.养荣润肠舒合剂治疗慢性便秘的临床研究[J].辽宁中医杂志,2004,31(11):941.
- [4] 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.
- [5] 包云光,舒小莉,李小兵,等.肠神经系统递质和Cajal间质细胞在大鼠传输型便秘中的作用[J].中国当代儿科杂志,2009,11(6):481.
- [6] Cheng L, Biancani P, Behar J. Progesterone receptor A mediates VIP inhibition of contraction[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 298(3):433.
- [7] Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC)[J]. *J Smooth Muscle Res*, 2003, 39(5):137.

(收稿日期:2015-03-13 修回日期:2015-05-15)

(编辑:张静)