

益气养血温阳方对泻药性便秘大鼠结肠 Cajal 间质细胞表达影响

吴至久, 王飞*

(成都中医药大学基础医学院, 成都 610075)

[摘要] **目的:**通过研究益气养血温阳方对泻药性便秘大鼠结肠 Cajal 间质细胞含量的影响,阐明益气养血温阳方治疗泻药性便秘的机制。**方法:**大鼠按照 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 大黄煎剂灌胃,再按每日 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 递增,至半数以上动物出现腹泻,如此反应用药 3 月,造成“泻药性便秘”动物模型。将 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、阳性对照(福松 $1.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、模型组、益气养血温阳方低、中、高剂量($8.35, 16.7, 33.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组。阳性对照组、模型组、益气养血温阳方低、中、高剂量组给予大黄建立便秘大鼠模型,阳性对照和益气养血温阳方低、中、高剂量组按剂量给予药物治疗 2 周,取大鼠结肠组织,采用 RT-PCR 方法检测结肠中 Cajal 间质细胞表达。**结果:**益气养血温阳方高剂量组结肠组织 Cajal 细胞 mRNA 相对表达量为 0.36508 ± 0.047 ,中剂量组为 0.37097 ± 0.040 ,与模型组大鼠结肠组织中表达为 0.29855 ± 0.046 比较,有显著差异($P < 0.05$)。**结论:**益气养血温阳方通过改变 Cajal 间质细胞表达,促进结肠运动,起到治疗便秘的作用。

[关键词] 便秘; Cajal 间质细胞; 益气养血; 温阳通便

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0219-04

Effects of Yiqi Yangxue Wenyang Formula on Interstitial Cells of Cajal in the Rat colon of Constipation caused by Laxatives

WU Zhi-jiu¹, WANG Fei^{2*}

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects and mechanism of Yiqi Yangxue Wenyang formula on interstitial cells of cajal in the rat colon of constipation caused by laxatives. **Method:** The rat constipation model was caused by laxatives on. First day rats were ig given rhubarb $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, second day given $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 3 months, until half rats appeared diarrhea. The modelling rats were treated with Yiqi Yangxue Wenyang formula for two weeks, interstitial cells of cajal in colon was observed by RT-PCR. **Result:** The interstitial cells of cajal in rat colon in the Yiqi Yangxue Wenyang formula high dose group was 0.36508 ± 0.047 , the medium group was 0.37097 ± 0.040 , that was higher than that in the model group is 0.29855 ± 0.046 ($P < 0.05$). **Conclusion:** The Yiqi Yangxue Wenyang formula can treat constipation by adjust interstitial cells of cajal in colon.

[Key words] constipation; interstitial cells of cajal; tonifying qi and blood; Warming yang to promot defecation

便秘在胃肠道疾病中最为常见,特别是在女性和老年人群中最为常见。我国 60 岁以上的人患病率为 11.5%^[1],同时随着年龄增加而增加^[2],随着我国人口老龄化的加剧,便秘发病率会增加,而且在

这部分老年人中有较多患者长期口服泻药的用药史,国外有文献报道在调查 7 324 人中有 77.6% 选择口服泻剂治疗便秘经历^[3],这样会更加加重便秘的症状和治疗难度。

[收稿日期] 20120616(005)

[基金项目] 2009 年四川省教育厅课题(09ZA021)

[第一作者] 吴至久,博士研究生,从事肛肠疾病研究,Tel:13990718231,E-mail:wzj549cq@yahoo.com.cn

[通讯作者] *王飞,教授,博士生导师,从事呼吸病与老年病研究,Tel:18980880213,E-mail:wangfei896@163.com

Cajal 间质细胞 (interstitial cells of cajal, ICC), 是胃肠起搏细胞, 并具产生、传导电慢波, 调节胃肠道平滑肌运动的功能, 也具有传递神经递质的作用。近年来研究发现, Cajal 间质细胞与慢传输性便秘有密切关系。本研究采用 RT-PCR 方法检测结肠中 Cajal 间质细胞表达, 揭示益气养血温阳方对泻药性便秘大鼠结肠调节的机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 (200 ± 20) g, 由成都中医药大学动物房提供, 许可证号 SCXK(川)2008-11。

1.2 药物及试剂 大黄免煎剂: 四川新绿色药业科技发展股份有限公司, 批号 0908064。益气养血温阳方组成: 白术 30 g, 黄芪 30 g, 当归 10 g, 肉苁蓉 30 g, 槟榔 10 g 等 (由成都杏林大药房提供) 将上述药物用蒸馏水浸泡 30 min, 煎煮 3 次 (40 min) 过滤, 合并滤液后加热蒸发, 制成 400% 水煎溶液 (即含生药量 4 g · mL⁻¹), 于 4 °C 冰箱中保存备用。Trizol (Invitrogen 公司, 规格 100 mL, 批号 1298938), 2 × Taq PCR Master Mix (博迈德生物公司, 批号 262330BH) RT-PCR 试剂盒 (Ferment 公司, 批号 00054052), 琼脂糖粉末 (美国 Sigma 公司)。

1.3 仪器 超净工作台 (苏州净化设备有限公司), JA40003 型电子天平 (上海良平仪器有限公司), 磁力搅拌器 (FKA 公司), 低温离心机 (Trenmo 公司美国), PCR 仪 BO-RAD 凝胶成像系统 (Bio-rad, 美国), 超低温冰箱 (SANYO, 日本)。

2 方法

2.1 大鼠便秘模型建立 参照童卫东教授方法^[4]。各组动物按雌雄分笼饲养, 保持室温 18 ~ 27 °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 清洁、安静, 通风良好。适应性喂养 1 周后, 开始造模。对照组用普通干饲料喂养, 同时每天以蒸馏水 10 mL · kg⁻¹ 灌胃 1 次, 大黄组普通饲料, 同时每天以大黄免煎剂水溶液 (10 mL · kg⁻¹) 灌胃 1 次, 首次给药剂量为 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 再按每日 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 递增, 至半数以上动物出现腹泻, 维持此剂量, 至半数以上动物稀便消失, 再按 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 递增, 如此循环并维持大多数动物有腹泻作用饲养 3 月。本次实验第 6 天出现大多数造模大鼠大便变稀软, 大黄用量为 1 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 如此维持 10 d, 大多数大鼠稀便消失, 增加大黄用量至 1 600 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 再次半数以上大鼠出现稀便, 如此维持 17 d, 增加大黄用量至 2 400 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 再次半数以上大鼠出现稀

便, 如此维持 21 d, 增加大黄用量至 3 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 绝大多数动物再次出现稀便, 维持此剂量 29 d, 共循环 4 次, 大黄最终计量为 3 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 停药 1 周后, 饲养普通饲料待处理。

2.2 分组与给药 大黄模型 5 组随机分为治疗药物低、中、高剂量组 (8.35, 16.7, 33.4 g · kg⁻¹, 分别相当治疗药物 5, 10, 20 倍成人剂量)、模型对照组、阳性药物对照组 (福松 1.65 g · kg⁻¹)、对照组为空白对照组。模型组和空白对照组 4 mL · kg⁻¹ 生理盐水。治疗用药 2 周为 1 个疗程, 均治疗 1 疗程。

2.3 取材 停药 1 周后大鼠禁食 24 h, 用 5% 的活性碳混悬液 1 ~ 2 mL 灌胃, 灌胃后 30 min 用颈椎脱臼法处死, 立即剖腹, 取幽门到直肠末段的全部肠道, 在松弛状态下测量肠道的全长及活性碳混悬液在肠道内推进的长度, 并计算活性碳混悬液在肠道内推进的长度与肠道的全长的百分比。同时取大鼠大肠, 生理盐水冲洗干净, 立即切成 0.5 cm × 0.5 cm 组织块, 迅速放入液氮中冷冻, 组织彻底冻透后, 放入 -80 °C 冰箱中保存, 备用于 RT-PCR 检测。

2.4 试验步骤 ①将大鼠结肠组织用生理盐水冲洗干净, 放入 EP 管, 存入液氮, 在高温灭菌的研钵里研磨成粉末, 放入 EP 管, 再加入 1 mL TRIzol, 用移液器吹打均匀。②室温静置 5 min, 按照 1 mL TRIzol 使用 200 μL 氯仿的比例加入氯仿, 混匀。室温静置 5 min 使之分层后, 4 °C 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min。③小心取上层水相液至另外一离心管中, 加入等体积异丙醇, 混匀。室温放置 10 min。④4 °C 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清。⑤在 EP 管中加 1 mL 75% 乙醇, 来回颠倒离心管将沉淀悬浮起来。室温 7 500 r · min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清。⑥室温静置 15 min 使 RNA 沉淀干燥, 加适当体积的 DEPC 处理水溶解后, -70 °C 保存。⑦取 5 mL RNA 样本, 加 DEPC 水 1.5 mL, 以紫外分光光度计分析 RNA 的量, 所用 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.7 ~ 2.0。⑧制备 1% 的琼脂糖凝胶, 加入 Greenview 染色。⑨用无 RNA 酶的枪头取 5 μL 的 RNA 样品与 6 × Loading buffer 1 μL 混匀, 小心加入点样孔中。⑩盖上电泳槽的盖子, 打开电源, 120 V, 15 min, RNA 由负极跑向正极。⑪取出凝胶, 在凝胶成像系统上分析 RNA 电泳结果。⑫参照 AMV Reverse Transcriptase (Ferment) 操作说明进行 RNA 的逆转录反应。⑬引物设计: 引物均由 Primer Premier 5.0 设计软件设计, Invitrogen 公司合成。引物序列 c-kit 前引物: 5'-GCCAAAGAAGAC AACGAC-3', 273 bp;

后引物:3'-CACAGACACCACTGGGATA-5'。 β -actin 前引物:5'-TCCTGTGGCATCCACG AAAC-3',314 bp;后引物:5'-TAGCAGGTGGCGTTTACGTTG-3'。^⑭取各扩增产物 10 μ L,经过琼脂糖凝胶电泳,溴化一锭染色后,用凝胶化学成像系统进行检测,并用 Quantity One 软件对各阳性条带的密度进行测定,同时将各个扩增产物的条带密度与相应的 β -actin 条带密度的比值作为该样本目的基因的相对表达量。

2.5 数据统计和分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用 SPSS 11.5 统计软件包进行分析,计量资料行组间配对用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态 60 只大鼠,50 只造模,10 只空白对照。其中有 43 只大鼠造模成功(7 只因灌胃不当或不能耐受大黄泻下作用而死亡),造模成功大鼠 43 只,其中阳性药物对照组 8 只,模型空白组 9 只,高剂量组 8 只,中剂量组 9 只,低剂量组 9 只,空白组 10 只。造模过程中模型组大鼠外观毛发耸立、精神萎靡,懒动,饮食减少,体重减轻或增长没有对照组那么明显,部分大鼠出现脱肛现象;排出大便颗粒细小、成串珠状及球状,质地明显干硬,数量明显少于空白组。而在益气养血温阳方治疗后,低、中、高剂量组大鼠上述症状有明显改善,而模型组大鼠改善不明显。

3.2 对泻药性便秘大鼠小肠推进功能的影响 益气养血温阳方治疗后,小肠碳末推进率有明显改善,与模型组比较有显著差异($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 对泻药性便秘模型大鼠大肠 C-kit mRNA 表达的影响 泻药性便秘大鼠模型组大肠 C-kit mRNA 相对表达量明显低于空白组、阳性对照组、益气养血温阳方治疗的高剂量组和中剂量组($P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

Cajal 间质细胞是分布在胃肠道神经细胞与平滑肌之间的一种特殊细胞,在光镜下其特征呈纺锤状或星状,核多为圆形或卵圆形,染色质分散,核周胞质少,有 2~5 个长的突起,相互连接形成网络,存在丰富的线粒体及中间丝,没有肌球蛋白丝,滑面内质网发达,高尔基体发育良好,有内质网小泡和大量包膜,具有中型肌细的微丝,较少粗肌丝,几乎没有微管和游离核糖体,基板多变不连续^[5]。目前认为 Cajal 间质细胞的功能主要有:其一为胃肠道运动的起搏点,产生慢波节律,这是其主要功能作用。其二

表 1 益气养血温阳方对泻药性大鼠小肠碳末推进率($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	小肠推进率/%
益气养血温阳方	33.4	8	$0.84 \pm 0.09^{1)}$
	16.7	9	$0.84 \pm 0.10^{1)}$
	8.35	9	$0.86 \pm 0.09^{1)}$
阳性对照模型	1.65	8	$0.79 \pm 0.09^{1)}$
空白对照	-	9	0.73 ± 0.07
空白对照	-	10	$0.77 \pm 0.09^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 益气养血温阳方对泻药性便秘大鼠结肠 C-kit mRNA 相对表达量影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	C-kit mRNA
			/ β -actin
益气养血温阳方	33.4	8	$0.365 1 \pm 0.047^{1)}$
	16.7	9	$0.371 0 \pm 0.040^{1)}$
	8.35	9	$0.314 9 \pm 0.048^{2)}$
阳性对照模型	1.65	8	$0.384 2 \pm 0.035^{1)}$
空白对照	-	9	$0.298 6 \pm 0.046^{2)}$
空白对照	-	10	$0.387 4 \pm 0.039^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与空白组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

作为肠神经系统调控平滑肌细胞运动中介,即调节神经递质作用。其三,ICC 有传导电流作用。国外学者 Rich A 等研究表明 ICC 的发育,成熟及功能表达都需要 C-kit 蛋白的正常表达,并起到决定性作用^[6]。所以用 C-kit 抗体可以选择性识别和标记 ICC 细胞。便秘作为胃肠动力障碍疾病的一种,很多国外学者^[7-9]研究发现慢传输性便秘(slow transit constipation,STC)患者结肠标本组织中 ICC 有明显减少。本实验研究结果也表明泻药性便秘模型大鼠结肠存在 ICC 的异常,便秘模型组大鼠结肠 ICC 数量明显减少,与空白组比较有显著差异($P < 0.05$),同时也说明长期大量运用大黄对结肠 ICC 有损伤作用,至于损伤是否可以完全恢复,还需要进一步研究。但通过益气养血温阳方灌胃治疗后大鼠结肠 ICC 数量明显升高,尤其是中、高剂量组升高明显,与模型组比较有显著差异($P < 0.05$),说明益气养血温阳方对泻药性便秘模型大鼠 ICC 数量增加是有效的,且存在一定的量-效关系,高剂量组改善作用更明显。

此前也有学者^[10]研究益气养血方法治疗便秘小鼠,观察到该方法可以促进小鼠胃肠动力作用。而我们在结合临床上老年患者长期便秘及口服泻药的特点,采用益气养血温阳的方法治疗泻药性便秘模型大鼠也取得了很好的效果,说明了我们的组方是符合该类型老年便秘患者的。

老年肝郁失眠证候大鼠模型的建立和评价

游秋云^{1,2}, 王平^{2*}, 田代志², 张舜波¹, 黄攀攀²

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065;

2. 湖北中医药大学国家中医药管理局老年性痴呆醒脑益智重点研究室, 武汉 430065)

[摘要] 目的:建立并评价复合型老年肝郁失眠证候大鼠模型。方法:Wistar 大鼠随机分为环境对照组,单因素模型组(睡眠剥夺组),复合型模型组,复合型模型+舒郁安神方 35 g·kg⁻¹·d⁻¹治疗组。采用 D-半乳糖腹腔注射 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 大鼠 6 周致亚急性衰老模型,然后采用夹尾刺激法致肝郁,每次刺激 30 min,1 日 2 次,持续 1 周,最后放入自制睡眠剥夺箱中进行快速眼动睡眠(REMS)剥夺 48 h,制作老年肝郁失眠证候大鼠复合型模型。观测大鼠体征、脑部自由基水平及血浆 6-酮-前列腺素 F1a(6-keto-PGF1a)、血栓素 B₂(TXB₂)含量。结果:与环境对照组、单因素模型组、舒郁安神方组比较,老年肝郁失眠证候复合型模型组大鼠丙二醛(MDA)、TXB₂ 含量均显著升高(P<0.01),而超氧化物歧化酶(SOD)活性、6-keto-PGF1a 含量及 6-keto-PGF1a/TXB₂ 均显著降低(P<0.01)。结论:老年肝郁失眠证候大鼠模型具有临床证候病理特征,是可行、可靠的复合型动物模型。

[关键词] 大鼠模型;睡眠剥夺;肝郁

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0222-04

[收稿日期] 20120626(017)

[基金项目] 湖北省科技厅研究与开发计划项目(2010BCB004)

[第一作者] 游秋云,博士,副教授,从事失眠等神经精神类相关中药药理学研究,Tel:15337237059,E-mail:youqiyun@126.com

[通讯作者] *王平,教授,博士生导师,从事老年脑病及失眠等心身疾病的中医药防治研究,Tel:027-68890008,E-mail:pwang54@yahoo.com.cn

[参考文献]

- [1] 于普林,李增金. 老年人便秘流行病学特点的初步分析[J]. 中华老年医学杂志,2001,20(2):132.
- [2] 阚志超,姚宏昌,龙治平,等. 天津市成年人慢性便秘调查及相关因素分析[J]. 中华消化杂志,2004,24(10):612.
- [3] Motola G, Mazzeo F, Rinaldi B, et al Self-prescribed laxative use: a drug-utilization review[J]. Adv Ther, 2002,19:203.
- [4] 童卫东,张胜本,刘宝华,等. 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响[J]. 世界华人消化杂志,2003,11(5):665.
- [5] Rumessen J J, Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal in human small intestine. Ultrastructural identification and organization between the main smooth muscle layers[J]. Gastroenterology,1991,100(5 Pt 1):1417.
- [6] Rich A, Miller S M, Gibbons S J, et al. Local presentation of Steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(2):G313.
- [7] Wedel T, Spiegler J, Soellner S, et al. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon [J]. Gastroenterology,2002,123(5):1459.
- [8] Lyford G L, He C L, Soffer E, et al. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation[J]. Gut,2002,51(4):496.
- [9] Lee J I, Park H, Kamm M A, et al. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon [J]. J Gastroenterol Hepatol,2005,20(8):1292.
- [10] 蒋卫忠. 益气养血法对小鼠胃肠动力影响的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(1):46.

[责任编辑 聂淑琴]