

益气养血法对小鼠胃肠动力影响的实验研究

蒋卫忠*

(青岛市海慈医疗集团, 山东 青岛 266033)

[摘要] 目的: 观察以益气养血法组方药物对正常及便秘模型小鼠胃肠动力的影响。方法: 用酚红法检测胃排空功能; 墨水推进法检测小肠、结肠运动功能; 用 NADPH-黄递酶(NDP) 组化技术和分层铺片方法检测结肠肌间神经丛一氧化氮合酶(NOS) 阳性神经元的灰度值。用复方地芬诺酯制备便秘动物模型。结果: 益气养血法组方药物 3 个剂量组的小鼠胃排空率, 小肠和结肠推进率与正常对照组相比都有显著性差异($P < 0.001 \sim 0.05$)。便秘状态下 3 个剂量组的小鼠胃排空率, 结肠推进率和结肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元的灰度值与模型组相比都有显著性差异($P < 0.001 \sim 0.05$)。结论: 以益气养血法组方药物对小鼠胃肠动力具有促进作用, 可调节便秘小鼠结肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元的兴奋性。

[关键词] 胃肠动力; 肠肌间神经丛; 一氧化氮合酶; 便秘

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)01-0046-03

目前对慢性便秘治疗以胃肠动力药物为主, 症状虽有缓解, 但易复发。本研究根据中医对慢性便秘的认识及临床经验, 用益气养血法治疗慢性便秘, 组成以益气、养血为主的方药对正常及便秘模型小鼠进行实验研究。初步探求中药对胃肠动力的影响, 为临床治疗慢性便秘提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 18~22 g, 由中国科学院遗传研究所实验动物中心提供。

1.2 药品 益气养血法组方药物由黄芪、生首乌、当归、威灵仙、生白术、枳壳、广木香、焦槟榔、香橡皮组成。组成比例依次为 6:6:4:4:3:3:3:3:3。上方煮提成膏, 制成粉末(由西苑医院制剂室提供)。通便灵: 贵州宏宇药业有限公司(批号: 990713, 批准文号: ZZ-3346 黔卫药准字(1996)第 100963 号)。试验前各药以蒸馏水配制成溶液, 灌胃给药, 每只小鼠给 0.4 mL。益气养血方临床日用量为按成人 50 kg 体重计算单位体重日服提取物量, 以此折算动物给药剂量。大、中、小剂量分别为 0.96、0.48 和 0.24 g 提取物/kg 体重(相当于临床用量的 20、10 和 5 倍)。通便灵为 0.27 g 原药/kg 体重, 是临床日用量的 10 倍。复方地芬诺酯(江苏国营武进制药厂, 批号: 960307)。

2 方法

2.1 小鼠胃排空率 采用酚红法^[1]。取昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半。随机分为 6 组: 正常对照组、零点对照组每日给予等量蒸馏水灌胃。益气养血方大、中、小剂量组, 均给予 0.4 mL 提取物悬液, 含提取物量分别为 0.96 g/kg 体重、0.48 g/kg 体重和 0.24 g/kg 体重, 通便灵组给予 0.4 mL 通便灵悬液, 含 0.27 g 原药/kg。灌胃 5 天, 末次给药前小鼠禁食不禁水 24 h, 灌胃上述药液, 药后 1 h, 灌胃 0.05% 酚红液 0.8 mL/只。10 min 后脱颈处死, 立即取胃, 置于 0.1 mol/L NaOH 溶液 100 mL 中, 剪碎, 混匀, 静置 1 h, 取上清液 5 mL, 加入 20% 三氯乙酸 0.5 mL, 离心 15 min (3 000 r/min)。取上清液 1 mL, 加入 0.5 mol/L NaOH 溶液 4 mL 显色, 置日本 UV-240 紫外分光光度计 560 nm 处比色, 记录光密度。零点对照组, 灌胃酚红后, 立即处死取胃, 测量胃内酚红量, 方法同上。胃排空率(%) = $(1 - \text{实验组光密度} / \text{零点对照组光密度}) \times 100\%$

2.2 小鼠小肠推进率 采用墨水推进法^[1]。取昆明种小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组(无零点对照组), 分组及给药同 2.1。灌胃 5 d, 末次给药前小鼠禁食不禁水 12 h, 药后 2 h, 分别灌胃给予含有阿拉伯胶(100 g/L)的碳素墨水 0.2 mL, 20 min 后脱颈处死, 剖腹取出胃肠平铺于白纸上, 以墨水在小肠中的移行距离与小肠全长的百分比作为小肠推进百分率评价小肠推进速度。

[收稿日期] 2006-05-10

[通讯作者] * 蒋卫忠, Tel: 013153221260

2.3 小鼠结肠推进率 结肠墨水推进方法^[2]。取昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,随机分为 5 组(无零点对照组),分组及给药同 2.1。末次给药前禁食 24 h,给药后 1 h,在戊巴比妥钠(1%, 0.35 mL/100 g)轻度麻醉下开腹,在回盲处向结肠端注入含阿拉伯胶(100 g/L)的碳素墨水 0.1 mL,缝合创口,送回笼中,20 min 后脱颈处死,解剖取出整条大肠平铺于白纸上,测量墨水在大肠推进的距离,推进距离占大肠全长的百分比作为结肠的推进率。

2.4 对便秘模型小鼠的作用

2.4.1 模型制备

2.4.2 对造模小鼠胃排空的影响 取昆明种小鼠 70 只,雌雄各半,随机分为 7 组:益气养血方大、中、小剂量组,通便灵组、模型组、正常对照组、零对照组。前 5 组灌服 3 d 复方地芬诺酯 50 mg/kg, (2.5 mg/mL, 0.4 mL/只)造模^[3]。后两组灌服等量蒸馏水。3 d 后前 4 组开始给药,剂量同上;后 3 组灌服等量蒸馏水,连续 5 d。前 5 组继续同时灌服复方地芬诺酯 5 d,正常对照组、零对照组灌服等量蒸馏水。实验方法同 2.1。

2.4.3 对造模小鼠结肠推进的影响 取昆明种小鼠 66 只,雌雄各半,随机分为 6 组:益气养血方大、中、小剂量组,通便灵组,模型组、正常对照组。制备便秘模型及给药方法同 2.4.2,实验方法同 2.3。

2.4.4 对造模小鼠结肠肌间神经丛一氧化氮合酶阳性神经元兴奋性的影响 取昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,随机分为 6 组(同 2.4.3)。动物模型制备同 2.4.2,造模成功后,前 4 组开始灌服药物,剂量方法同 2.4.2。正常对照组灌服等量的蒸馏水。前 5 组继续灌服复方地芬诺酯,方法同前。4 w 后末次给药前禁食不禁水 24 h,给药后 2 h,剪取近端结肠(取材方法略)。采用分层铺片方法^[4]和 ND 组织化学方法^[5]。常规贴片、脱水、透明、封片。Olympus 显微镜观察和照相。

NOS 阳性神经元灰度值测定:采用北辰集团惠中电气服务公司的生物学图像分析系统 BHEC-100 测定 NOS 阳性神经元的灰度值。每张铺片随机选取 2 组肌间神经丛神经元细胞进行灰度值测定,2 者均值代表该片灰度值。

2.5 统计学方法 计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 *t* 检验、*F* 检验。计数资料应用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 对小鼠胃排空功能的影响 益气养血方大、中、小剂量组胃排空率较正常对照组有显著性差异,提示益气养血法组方药物有较好的提高小鼠胃动力的作用。结果见表 1。

3.2 对小鼠小肠推进的影响 益气养血方大、中剂量组小肠推进率较正常对照组有显著性差异,提示益气养血法组方药物有较好的提高小鼠小肠动力的作用。结果见表 1。

3.3 对小鼠结肠推进的影响 益气养血方大、中、小剂量组结肠推进率较正常对照组有显著性差异,提示益气养血法组方药物有较好的提高小鼠结肠动力的作用。结果见表 1。

表 1 益气养血方对小鼠胃排空、小肠推进、结肠推进功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 9 \sim 12$)

组别	剂量 (g/kg)	胃排空率 (%)	墨水推进率 (%)	结肠推进率 (%)
大剂量组	0.96	68.97 ± 13.12 ³⁾	73.82 ± 13.04 ²⁾	81.68 ± 12.19 ^{3,4)}
中剂量组	0.48	60.72 ± 16.32 ²⁾	63.08 ± 10.22 ¹⁾	70.42 ± 19.45 ³⁾
小剂量组	0.24	59.12 ± 22.36 ¹⁾	56.37 ± 6.84	67.70 ± 23.01 ²⁾
通便灵组	0.27	57.05 ± 19.78 ¹⁾	64.19 ± 12.65 ¹⁾	52.52 ± 15.48 ²⁾
正常对照组	—	39.32 ± 13.38	50.5 ± 13.18	37.23 ± 8.59

注:与正常对照组比¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01, ³⁾ *P* < 0.001, 与通便灵组比⁴⁾ *P* < 0.05

3.4 对造模小鼠胃排空功能的影响 益气养血方大、中、小剂量组胃排空率与模型组均有显著性差异,说明便秘模型小鼠胃动力下降,用药后胃动力增加。结果见表 2。

3.5 对造模小鼠结肠推进的影响 益气养血方大、中、小剂量组结肠推进率与模型组均有显著性差异,说明造模后小鼠的结肠动力下降,用药后结肠动力提高。结果见表 2。

3.6 对造模小鼠结肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元灰度值的影响 正常对照组与模型组灰度值比有高度显著性差异,说明造模后小鼠结肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元染色加深,提示 NO 合成增多,使结肠蠕动减弱。用药后各组灰度值上升,大剂量组已达正常值。大、中、小剂量组的灰度值与模型组比均有高度显著性差异,说明 NOS 阳性细胞染色减弱,提示 NO 合成减少,结肠蠕动加强。结果见表 2。

表 2 益气养血方对造模小鼠胃排空、结肠推进、结肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元灰度值的影响($\bar{x} \pm s, n=9\sim 11$)

组别	剂量 (g/kg)	胃排空率 (%)	结肠推进率 (%)	灰度值
造模大剂量组	0.96	60.25 ± 30.80 ²⁾	62.46 ± 17.60 ^{2,4)}	152.47 ± 9.89 ²⁾
造模中剂量组	0.48	56.13 ± 17.00 ³⁾	59.76 ± 17.40 ²⁾	140.31 ± 16.92 ^{2,5)}
造模小剂量组	0.24	54.71 ± 31.24 ¹⁾	53.00 ± 11.70 ²⁾	133.38 ± 17.62 ^{2,5)}
造模通便灵组	0.27	47.13 ± 23.58 ¹⁾	51.29 ± 18.26 ¹⁾	130.98 ± 24.18 ^{2,5)}
模型组	—	27.15 ± 10.36	36.19 ± 5.54	103.51 ± 7.07 ⁵⁾
正常对照组	—	43.69 ± 16.65 ¹⁾	46.68 ± 11.32 ¹⁾	162.3 ± 8.0 ²⁾

注:与模型组比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$;与正常对照组比⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$

4 讨论

便秘模型小鼠的胃排空率下降、结肠推进率下降、结肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元染色加深,提示整个胃肠道动力下降。益气养血方特点是寓通于补,以益气、养血药物为主,合用行气药物。以黄芪为君,益气健脾、升阳通幽;臣以当归、生白术,当归可养血润燥,生白术可补气健脾;佐以生首乌助当归加强养血通便之功,焦槟榔行气导滞、缓泻通便,枳壳宽肠下气、协调气机,广木香升降诸气;使以威灵仙温通滞气、助通下之力。全方补而不滞,有健脾益

气,养血润肠,通便导滞之效,起到提高胃肠动力的作用,这给临床治疗慢性便秘提供了新的思路,同时体现了中医认识、治疗疾病的整体观念。为深入探讨益气养血法组方药物提高胃肠动力的机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 332.
- [2] 陈如山, 张永锋, 邓联民, 等. 结肠康泰对小鼠肠道运动功能影响的实验研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1998, 6(3): 157.
- [3] 万锦洲, 马锦星, 刘卉. 一种简易的小鼠便秘模型[J]. 中国药理学通报, 1994, 10(1): 71.
- [4] Costa M, Buffa R, Furness JB, et al. Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount preparation[J]. Histochemistry, 1980, 65(2): 157-165.
- [5] Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, et al. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissue[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(18): 7797-7801.