

# 枳实芍药散对大鼠肠道高敏性的影响

陈 萌\*, 张冬梅, 韦兰兰  
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 拆方观察枳实芍药散对大鼠肠道高敏性的影响及其作用机理。方法: 采用慢性应激刺激所致肠道高敏性大鼠动物模型, 观察了枳实芍药散及其拆方对肠道敏感性以及回盲及结肠黏膜下层肥大细胞(MC)计数、P物质(SP)免疫反应阳性纤维的影响。结果: 枳实芍药散提高肠道最小容量阈值, 减少收缩反射次数; 减少回盲及结肠组织内 MC 数量, 以结肠显著; 降低 SP 免疫反应水平, 结肠 SP 阳性面积较回盲部显著。结论: 枳实芍药散可降低肠道的敏感性, 其机制可能在于调节肥大细胞及其 P 物质的分泌。

[关键词] 枳实芍药散; 肠易激综合征; 肠道高敏性; 肥大细胞; P 物质

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)06-0049-04

## Effect of Immature Orange Fruit & Paeonia Powder on the Visceral Hypersensitivity in Rats

CHEN Meng\*, ZHANG Dong-mei, WEI Lan-lan  
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect and the mechanism of Immature Orange Fruit & Paeonia Powder (IOFPP) on the visceral hypersensitivity in rats. **Methods:** The visceral hypersensitivity rats induced by chronic stress excitation were used to observe the action of IOFPP on the intestinal tract sensitivity and mast cell(MC) count and substance P(SP) immunoreaction masculine fiber level in ileo-appendix and colon mucosa underlayer. **Results:** IOFPP can increase the visceral minimum volume threshold and decrease the frequency of contraction reflects. The MC counts in ileo-appendix and colon was reduced especially in colon and SP level in ileo-appendix and colon was degraded especially in colon after oral administration of IOFPP. **Conclusions:** adjustment to the secretion of MC and SP may be one of important mechanism of IOFPP, which can reduce the visceral hypersensitivity.

[Key words] IOFPP; IBS; intestinal tract sensitivity; MC; SP

肠易激综合征(Irritable Bowel Syndrome, IBS)是一种常见的慢性功能性肠道疾病, 病因及发病机制尚不明确。根据临床症状表现, IBS 属于《中医病证治法术语》中的“肠郁”<sup>[1]</sup>范畴, 散见于中医学腹痛、腹泻、便秘等门类文献中。枳实芍药散是来源于《金匱要略》的一首治疗腹痛、腹满的经方, 全方由枳实、芍药两味药物组成, 组方精简, 主治明确。本实验采

用慢性应激刺激所致肠道高敏性大鼠动物模型, 以肥大细胞(mast cell, MC)、P物质(substance P, SP)为指标, 观察枳实芍药散及其方中两味药物对该模型的治疗作用及其对 MC、SP 的影响, 探讨枳实芍药散治疗 IBS 的作用机制。

### 1 材料

**1.1 实验动物** 新生 SD 大鼠 60 只, 雌雄不限, 由中国医学科学院动物研究所提供(医动字第 02-0018429 号)。

**1.2 实验药品和试剂** ①实验用中药(枳实、芍药)购自北京同仁堂药店, 经北京中医药大学药用植物

[收稿日期] 2006-07-13

[通讯作者] \* 陈萌, Tel: (010) 64287011; E-mail: cmazy@126.

com

教研室鉴定及炮制。剂量比例按《金匱要略》中“上二味,等分,……服方寸匕,日三服”,一方寸匕等于 2 g,次数由三次改为两次,折合后为 3 g/次,再依照人单位体重生药量求得大鼠单位体重生药量,并扩大 10 倍,制成散剂,换算之后每次每种药物是 0.016 g,用时按给药剂量新鲜配制成混悬液。得舒特(匹维溴铵):法国苏威制药公司生产,批号:0027,50 mg/粒。依照上述换算后为 0.005 g/次。②甲苯胺蓝(北京化学试剂公司产品)。③抗 SP 抗体为兔多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司产品)。

1.3 仪器 Spot II Advanced 真彩病理图像分析系统(北京东直门医院图像分析室)。

## 2 方法

2.1 动物模型制备<sup>[2]</sup> 新生 SD 大鼠每 10 只与其母鼠共饲一笼,发育至 25 d 后,将母鼠与幼鼠分离。分离后的大鼠每 5 只一笼,给予足够的食物和水。除正常对照组外,其它 5 组大鼠在出生后 8~21 d 内,每天给予直肠内醋酸刺激。将石蜡油润滑后的连续硬膜外导管(直径 1 mm)经肛门插入 2 cm,注入 0.5% 的醋酸 0.5 mL。正常对照组大鼠每天直肠内给予相同容积的 0.9% 生理盐水。

2.2 动物分组与给药方法 随机分成 6 组,即正常对照组、模型组、枳实芍药散组、枳实组、赤芍组、得舒特组,每组 10 只,6 组动物饲养条件相同。

在醋酸刺激停止后的第 2 d,各给药组给予相应药物灌胃,正常对照组与模型组给予相同容积的 0.9% 生理盐水,每日 2 次,连续给药 1 周。

2.3 肠道敏感性测定 ①直肠扩张引起腹部收缩反射的最小容量阈值:给药结束后的第 2 d,将大鼠于清醒状态下放入鼠固定器内。将石蜡油润滑后的 Braun 8F 导尿管经肛门插入,气囊末端距离肛门 1 cm。用胶布把导尿管和大鼠尾巴根部缠在一起,固定气囊。15 min 适应期后经导尿管外口向球囊内注入 26~28 °C 生理盐水扩张肠道,记录引起大鼠腹部收缩反射的最小注水量,即最小容量阈值。重复扩张 3 次,每次间隔 15 min,数据取均值。②注水量为 1.0 mL 时 3 min 内腹部收缩反射次数:测定最小容量阈值后的第 2 d,对大鼠进行注水量为 1.0 mL 时 3 min 内腹部收缩反射次数的测定。

2.4 标本制备 直肠扩张结束 1 h 后,腹腔注射 200 g/L 乌拉坦 2 mL/只处死动物,剖腹取动物的回

盲部 距肛门 3 cm 处的结肠各 0.5 cm,4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片(4 μm)。MC 染色采用甲苯胺蓝改良染色法<sup>[3]</sup>。神经纤维免疫组化染色采用免疫组化 Enr-Vision 法,组织切片脱蜡至水;加过氧化物酶阻断液 5 min;0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液微波抗原修复 8 min;加一抗置 37 °C 恒温箱 2 h;加二抗 30 min;加新鲜配制的 DAB 液镜控显色 8 min;苏木精-伊红复染。以大鼠胆囊组织作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

2.5 结果分析 ①Olympus-CH 光学显微镜,目镜内装有正方形网格实验系统 C<sup>64</sup>,随机连续计数 10 个高倍视野(×400)内肥大细胞数(淋巴滤泡和溃疡区除外),取其平均值。②用 Spot II Advanced 真彩病理图像分析系统分析 SP 免疫反应阳性纤维的阳性强度、阳性面积(为分析软件的相对值)。其中,阳性强度用 OD(opacity density)值表示,OD 值越大,染色越强。每张切片随机取两个视野进行分析,取其平均值。

2.6 统计学处理 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数的比较采用单因素方差分析,显著性水平设定  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

3.1 肠道敏感性检测结果 模型组大鼠最小容量阈值及注水量为 1 mL 时 3 min 内腹部收缩反射次数与正常对照组相比有显著性差异( $P < 0.01$ ),提示模型组大鼠肠道敏感性增高。枳实芍药散组与模型组比较,最小容量阈值增大( $P < 0.05$ ),注水量为 1 mL 时 3 min 内腹部收缩反射次数明显减少( $P < 0.01$ ),提示枳实芍药散组大鼠肠道敏感性降低。见表 1。

表 1 肠道敏感性检测( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	最小容量阈值 (mL)	收缩反射 次数(次)
正常对照组	1 mL	0.60 ± 0.13 <sup>2)</sup>	13.29 ± 3.05 <sup>2)</sup>
模型组	1 mL	0.47 ± 0.12	23.00 ± 4.73
枳实组	1 mL(含 0.016 g 枳实)	0.50 ± 0.07	18.92 ± 3.66 <sup>2)</sup>
赤芍组	1 mL(含 0.016 g 赤芍)	0.48 ± 0.09	21.38 ± 4.37 <sup>3)</sup>
枳实芍药散组	1 mL(含 0.016 g 枳实、 0.016 g 赤芍)	0.57 ± 0.13 <sup>1,4)</sup>	16.77 ± 3.03 <sup>2)</sup>
得舒特组	1 mL(含 0.005 g 得舒特)	0.42 ± 0.11	17.77 ± 3.03 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与得舒特组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。(下同)。每组剂量以下同。

3.2 MC 染色结果 光镜下 MC 胞浆呈紫红色,胞核呈蓝色,散在于黏膜下层,邻近血管、淋巴管及末梢神经周围;细胞呈圆形或梭形或不规则形;小细胞

胞浆少, 边界清; 大细胞胞浆多, 边界不清, 紫红色颗粒围绕细胞核散在分布或呈不规则形状。模型组大鼠回盲及结肠黏膜下层 MC 较正常对照组明显增多 ( $P < 0.01$ ), 细胞异型增多, 提示 MC 呈激活状态; 赤芍组、枳实芍药散组及得舒特组回盲肠黏膜下层 MC 较模型组减少 ( $P < 0.01$ ), 枳实组、赤芍组、枳实芍药散组及得舒特组结肠 MC 明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 提示药物对 MC 活性有降低作用。见表 2。

表 2 MC 计数检测 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	MC 计数(个)	
	回盲部	结肠部
正常对照组	1.7 ± 0.7 <sup>2)</sup>	1.8 ± 0.8 <sup>2)</sup>
模型组	4.1 ± 2.8	4.7 ± 1.8
枳实组	2.8 ± 1.6	3.3 ± 1.8 <sup>1)</sup>
赤芍组	2.1 ± 1.4 <sup>2)</sup>	2.4 ± 1.7 <sup>2)</sup>
枳实芍药散组	1.9 ± 1.0 <sup>2)</sup>	2.3 ± 1.2 <sup>2)</sup>
得舒特组	1.8 ± 0.7 <sup>2)</sup>	3.1 ± 1.4 <sup>1)</sup>

**3.3 神经纤维染色结果** SP 免疫反应阳性神经纤维呈棕黄色颗粒, 位于腺体周围的固有层中, 或见散在点状、线状结构, 或见簇集分布。模型组大鼠回盲及结肠 SP 免疫反应阳性纤维增多、增粗, 染色增强, 阳性强度均值均较正常对照组增大 ( $P < 0.05$ ), 提示 SP 免疫反应增强; 枳实芍药散组回盲及结肠 SP 免疫反应阳性纤维阳性强度均值、阳性面积较模型组减小 ( $P < 0.05$ ), 提示枳实芍药散对 SP 免疫反应有减弱作用。见表 3、表 4。

表 3 SP 免疫反应阳性面积检测 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	SP 阳性面积	
	回盲部	结肠部
正常对照组	1 084.98 ± 354.56 <sup>1)</sup>	890.09 ± 694.52 <sup>1)</sup>
模型组	1 725.88 ± 647.49	1 583.25 ± 760.46
枳实组	1 273.02 ± 714.67	741.40 ± 227.99 <sup>2)</sup>
赤芍组	1 478.00 ± 1 148.83	1 093.95 ± 696.70
枳实芍药散组	1 030.53 ± 336.33 <sup>1)</sup>	736.96 ± 262.00 <sup>2)</sup>
得舒特组	1 592.44 ± 668.67	1 150.23 ± 803.61

#### 4 讨论

20 世纪 70 年代以来, 人们普遍认为 IBS 是一种胃肠动力性疾病。随着研究的进一步深入, 发现内脏敏感性增高是 IBS 最重要的病理生理特征之一, 是 IBS 病人症状产生的基础和症状多样化的原因<sup>4)</sup>。关于内脏致敏的机制目前尚不明确, 涉及神

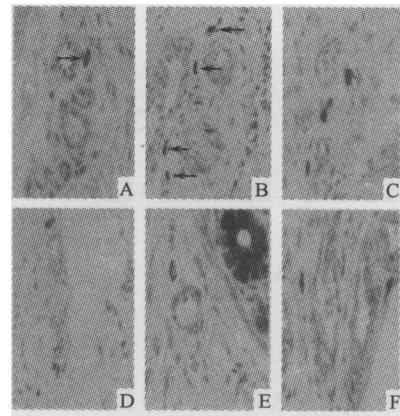


图 1 回肠黏膜 MC 甲苯胺蓝改良染色的光镜观察 ( $\times 200$ )

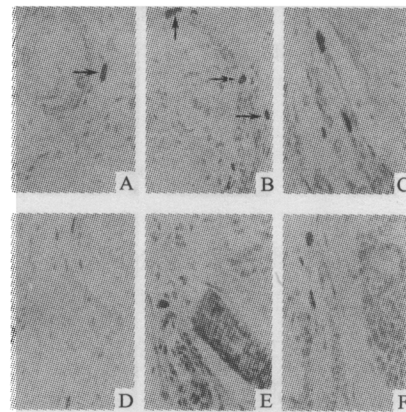


图 2 结肠黏膜 MC 甲苯胺蓝改良染色的光镜观察 ( $\times 200$ )

A: 正常组; B: 模型组; C: 枳实组;

D: 芍药组; E: 枳实芍药散组; F: 得舒特组

镜下见模型组 MC 较正常对照组明显增多, 细胞异型增多, 赤芍组、枳实芍药散组及得舒特组 MC 较模型组减少, 以结肠显著。

表 4 SP 免疫反应阳性强度检测 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	SP 阳性强度(OD 值)	
	回盲部	结肠部
正常对照组	0.128 3 ± 0.026 4 <sup>1)</sup>	0.112 6 ± 0.026 3 <sup>2)</sup>
模型组	0.159 3 ± 0.033 0	0.151 4 ± 0.035 1
枳实组	0.140 1 ± 0.031 5	0.141 1 ± 0.015 7
赤芍组	0.152 9 ± 0.024 6	0.137 1 ± 0.022 8
枳实芍药散组	0.131 3 ± 0.016 6 <sup>1,3)</sup>	0.124 4 ± 0.018 7 <sup>1)</sup>
得舒特组	0.159 8 ± 0.035 1	0.127 6 ± 0.034 0 <sup>1)</sup>

经-免疫-内分泌网络系统和交感神经系统的相互作用, 其中 MC 与神经之间的联络是免疫与神经系统相互作用的最基本内容之一, 因而有人提出肥大细胞-神经轴<sup>5)</sup> 或神经-肥大细胞轴<sup>6)</sup> 的概念。在此基础上, 我们选择 MC SP 作进一步研究。本实验研究发现 IBS 模型大鼠肠道敏感性明显增高, 回盲及结肠组织内 MC 明显增多, SP 免疫反应阳性纤维表达

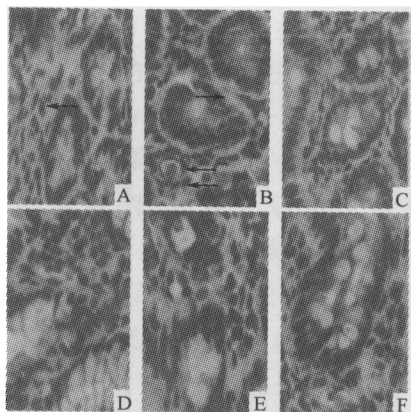


图 3 回肠黏膜 SP 免疫组化染色的光镜观察 (×400)

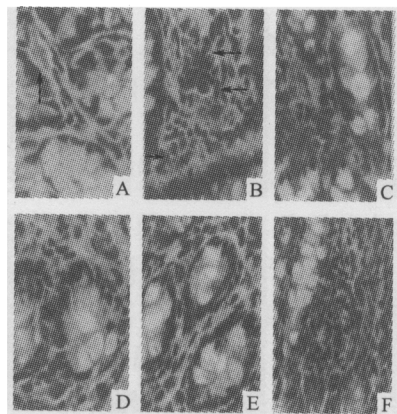


图 4 结肠黏膜 SP 免疫组化染色的光镜观察 (×400)

A: 正常组; B: 模型组; C: 枳实组;

D: 芍药组; E: 枳实芍药散组; F: 得舒特组

镜下见模型组 SP 免疫反应阳性纤维增多、增粗, 染色增强。枳实芍药散组较模型组 SP 免疫反应阳性纤维减少、变细, 染色减弱。

增强, 故提示本病的发生可能与 MC 的活化, SP 的分泌、释放异常有某种内在的联系。这与王伟岸等<sup>[7]</sup>、姚永刚等<sup>[8]</sup> 研究报道相一致。

目前西医尚未有一种药物或单一疗法对 IBS 完全有效, 而中医药在 IBS 治疗上有独特的优势。中医学认为, IBS 属于“肠郁”的范畴, 其主要病机是肝脾失调, 气机阻滞。枳实芍药散是来源于《金匱要略》的一首经方, 由枳实和芍药两味药物组成, 主治产后肠道气血郁滞所致的腹痛和腹满等症状。本实验发现枳实芍药散可使增高的内脏敏感性降低; 减少回盲及结肠组织内 MC 数量, 以结肠显著; 降低 SP 免疫反应水平, 结肠 SP 阳性面积较回盲部显著, 提示枳实芍药散对 MC 活性 SP 免疫反应有减弱作用。至于不同部位 MC 和 SP 的差异, 机制尚不明了, 可

能与 IBS 大鼠各段肠道分泌、对药物的吸收及动力失调的病理生理和神经机制以及 MC、SP 的异质性分布 MC 内含介质的生理功能差异有关。

《名医别录》记载, 枳实能消胀满、治心下急与痞痛、安胃气、止溏泄, 芍药能缓中、利大小肠、治中恶与腹痛。从张仲景遣方加减来看, 枳实和芍药也分别是治疗腹满和腹痛的最常用药物。本实验研究发现赤芍可减少回盲和结肠部 MC 数量, 但对 SP 的影响较弱; 枳实不仅可以减少结肠部 MC 的数量, 还可明显减少结肠 SP 阳性面积, 但对回盲部 SP 和 MC 影响甚小。由此看出, 枳实、赤芍只起到单方面作用, 其对 IBS 的治疗作用尚有待考证。

虽然枳实、赤芍有待进一步深入研究探讨, 但有一点比较明确, 枳实芍药散可调节 MC 分泌、活化, 调节 SP 分泌的紊乱状态, 改善胃肠道的分泌和运动, 降低内脏敏感性。因此, 枳实芍药散治疗 IBS 的一个重要机制可能在于调节肥大细胞及其 P 物质的分泌。

#### [参考文献]

- [1] 朱文锋. 中医病证治法术语[J]. 中医诊断学杂志, 1997, (3): 94.
- [2] AL-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [3] 龚志锦. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 267-272.
- [4] 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗. 肠易激综合症的发病机制[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2001, 10: 103-105.
- [5] Gottwald T, Coerper S, Schaffer M, et al. The mast cell-nerve axis in wound healing: a hypothesis[J]. Wound Repair Regen, 1998, 6: 8-20.
- [6] Keith IM, Jin J, Neal D Jr, et al. Cell relationship in a Wistar rat model of spontaneous prostatitis[J]. J Urol, 2001, 166: 323-328.
- [7] 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗. 结肠黏膜肥大细胞活化在肠易激综合症发病中的作用[J]. 中华消化杂志, 2003, 23(5): 263-266.
- [8] 姚永刚, 余保平, 徐龙, 等. 慢性内脏高敏性大鼠结肠内 P 物质及其 NK1 受体表达的改变[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2004, 13(4): 363-367.