

四逆散对肝郁证模型大鼠胃肠组织细胞形态 及胃肠激素的影响

邓青秀, 彭延娟, 彭 成^{*}, 李武明
(成都中医药大学实验动物研究中心, 四川 成都 610075)

[摘要] 目的: 研究四逆散对肝郁证模型大鼠胃肠组织细胞形态及胃肠激素的影响。方法: 将大鼠分为 3 组: 空白对照组、肝郁模型组、四逆散治疗组。通过运用模具加水浴方法制备肝气郁结证候动物模型。观察各组大鼠的症状表现、胃肠组织形态学变化、胃肠超微结构变化, 测定大鼠的智力、胃肠激素。结果: 四逆散能使模型大鼠活动及体重均增加, 学习记忆能力增强, 使大鼠胃肠的病理改变得以很好的恢复, 能提高血清中胃泌素、血浆中胃动素和血管活性肠肽的含量, 降低血浆中生长抑素的含量。结论: 四逆散通过保护胃肠黏膜, 调节胃肠激素, 使肝胆疏泄及脾胃升降恢复正常, 气机调畅。

[关键词] 四逆散; 肝郁证; 超微结构; 胃肠激素

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)06-0033-04

The Effects of Sinisan on the Histiocyte Morphologic and Hormone of Gastroenteric in the Liver-Qi Depression Syndrome Rats

DENG Qing-xiu, PENG Yan-juan, PENG Cheng^{*}, LI Wu-ming
(Laboratory Animal Center, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** The effects of Sinisan on the histiocyte morphologic and hormone of gastroenteric were studied in the Liver-Qi depression syndrome rats. **Methods:** The rats were divided into three groups: control, model and

[收稿日期] 2006-11-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39970928)

[通讯作者] * 彭成, Tel: (028) 87785016; E-mail: pengchengcao@163.com

Sinisan. This animal model is made by the method of confining the rats' movement. The animal syndrome, the histiocyte morphologic and ultrastructure change of gastroenteric were observed, the animal intelligence level and Hormone are measured. **Results:** Sinisan can increase the movement, body weight and intelligence level of rats. The pathological and ultrastructure change in gastroenteric serum were improved, the plasma level of motilin, gastrin and vasoactive intestinal polypeptide were increased, the somatostatin was decreased. **Conclusion:** By adjusting gastroenteric hormone level and protecting gastroenteric mucous membrane, Sinisan can regulate dysfunction of live gallbladder, spleen and stomach.

[**Key words**] Sinisan; Liver-Qi depression gastroenteric; ultrastructure; gastroenteric

肝气郁结证是中医临床最常见的证候之一,是中医情志致病的代表证候。肝郁证是由于情志不遂,致肝疏泄不及,肝气郁结所致。本实验通过运用模具加水浴方法^[1]制备肝气郁结证候动物模型,用疏肝理气的代表方四逆散作为治疗药物,研究四逆散对肝郁证模型大鼠胃肠组织细胞形态及胃肠激素的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物 SD 大鼠,雌雄各半,体重 170~210 g。由成都中医药大学实验动物研究中心提供,许可证号:04-11 号,检疫后备用。

1.2 实验药物 四逆散(柴胡 6 g、白芍 6 g、枳实 6 g、炙甘草 6 g)的药材均购自同仁堂成都分店。经中药鉴定教研室老师鉴定均为正品。参照《中华人民共和国药典》中药制剂通则:取柴胡、枳实先加水 10 倍浸泡 3 h,用水蒸气蒸馏法提取挥发油 6 h,挥发油放入棕色瓶中,分离药渣,保留药液,以上二者均待用;将白芍、甘草加水 12 倍浸泡 1 h,煎煮 2 h,煎煮 3 次:分离药渣,保留药液。将所有药液混匀浓缩药液至 1 g 生药/mL,并加入挥发油,配制成四逆散提取液,4 ℃冰箱储存备用。给药时,用蒸馏水配成 0.24 g 生药/mL 浓度。

1.3 实验仪器 CB3201 数字描记式小动物活动观测仪(中国川北电子工业公司生产);电子天平 PA2003(上海天平仪器厂生产);倒置显微镜(日本生产);H-600 型透射电镜(日本生产);XH-6010 闪烁计数仪(西安二六二厂生产)。

1.4 实验试剂 血管活性肠肽(VIP)试剂盒由美国 DiaSorin 公司提供,批号:040113。胃动素(MTL)试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免所提供,批号:040226。胃泌素(Gas)试剂盒由北京北方生物技术研究所提供,批号:国药准字 S10940100。生长抑素(SS)试剂盒由海军放免技术中心提供,批号:040215。电镜固定液:25%戊二醛溶液 360 mL,

NaH₂PO₄·2H₂O 8.9 g, Na₂HPO₄·12H₂O 87 g, 3 者加水至 3 000 mL。

2 实验方法

2.1 大鼠肝郁证胃肠运动障碍动物模型的建立及分组 40 只 SD 大鼠随机分为 3 组,分别为:空白对照组 10 只,肝郁模型组 15 只,四逆散治疗组 15 只。模型的制备:将造模大鼠装入特制的铁桶(直径 5 cm,高 12 cm)中,使之不能随意运动,同时在铁筒中加水使大鼠从剑突以下浸入水中,水深约 15~18 cm,水温控制在 20±2 ℃,使大鼠在水中站立 4 h,1 次/d,连续造模 10 d。治疗组造模方法同上,在第 11 d 停止造模后,灌胃四逆散药液 10 mL/kg,连续 5 d。空白对照组灌胃 0.9% N.S 10 mL/kg。

2.2 造模期间观察 SD 大鼠的一般情况及活动、摄食量、体重、被毛、大便性状、自发活动和智力的改变。

2.3 四逆散对肝郁证大鼠胃肠组织形态的影响 第 16 d 动物在乙醚浅麻下,取胃幽门部、空肠组织各两块,把一块胃和空肠立即投入 10% 甲醛液内固定,石蜡包埋,HE 染色,光学显微镜观察。另一块胃和空肠立即投入电镜固定液内固定,包埋,超薄切片,透射电镜观察。

2.4 四逆散对肝郁证大鼠胃肠激素的影响 于末次给药 30 min 后,股动脉取血 4 mL 置于含 60 μL 10% EDTA-Na₂ 和 800 U 抑肽酶的试管中混匀,离心 5 min,转速 ≤2 000 r/min,分离取血浆,置-20 ℃冰箱保存,待测血浆 MTL, Gas, VIP 及 SS。按照免疫试剂盒规定要求进行放射免疫法测定。

2.5 数据统计方法 结果采用 SPSS11.0 统计软件处理,组间比较用单因素方差分析。

3 实验结果

3.1 四逆散对肝郁证一般情况的影响 空白组大鼠被毛光泽、色白,精神佳、活泼,摄食正常,大小便正常。模型组大鼠初期表现为烦躁不安,抓咬模具,

易激惹, 不断嘶叫。3 d 后活动逐渐减少, 精神萎靡不振, 纳呆, 饮食饮水减少甚至不思饮食。困倦嗜睡, 喜好扎堆, 反应减慢, 背毛失去光泽, 枯黄, 粪便干。造模大鼠体重减轻(见表 1), 自发活动减少, 学习记忆能力明显减弱。经四逆散治疗后, 大鼠活动增加, 精神好转, 摄食量增多, 反应灵敏, 背毛恢复光泽, 大便正常, 体重明显增加, 自发活动增加, 学习记忆能力有所好转。

表 1 各组大鼠体重变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物 (只)	造模前 (g)	造模后 (g)	治疗后 (g)
空白对照组	—	10	191.89 ± 7.06	203.78 ± 8.44	206.11 ± 4.72
肝郁模型组	—	8	185.00 ± 5.76	183.27 ± 17.69 ²⁾	
肝郁+ 四逆散治疗组	2.4	10	186.08 ± 9.21	182.45 ± 8.79 ²⁾	200.60 ± 9.11

注: 与空白对照组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。(下同)

由表 2 可以看出造模后大鼠到达平台的时间明显增加, 经过治疗后减少, 与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠智力变化情况($\bar{x} \pm s$)

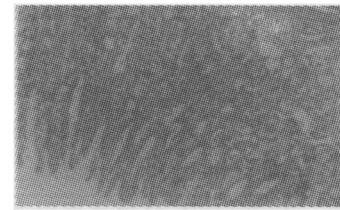
组别	剂量 (g/kg)	动物 (只)	给药天数 (d)	智力 (秒)
空白对照组	—	10	—	14.13 ± 9.58 ²⁾
肝郁模型组	—	8	—	33.25 ± 17.03
肝郁+ 四逆散组	2.4	10	5	13.70 ± 6.36 ²⁾

3.2 四逆散对肝郁证大鼠胃肠组织形态的影响

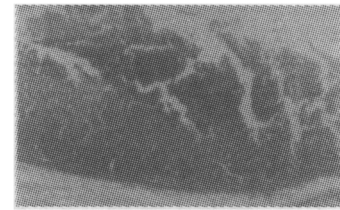
剖检观察: 模型组动物胃肠胀气, 胃肠壁均变薄, 胃、十二指肠、空肠充血水肿。经治疗后基本恢复正常。组织病理学观察: 由图 1 可以看出模型组动物胃、空肠黏膜缺损、脱落, 胃、空肠黏膜溃疡、坏死、渗出性炎症。治疗组大鼠胃肠病损基本恢复正常, 与空白对照组无显著性差异。

胃和空肠亚细胞超微结构观察: 由图 2 可以看出空白对照组动物胃黏膜上皮细胞和平滑肌细胞结构正常; 空肠吸收上皮细胞和平滑肌细胞结构正常。模型组动物胃黏膜上皮细胞线粒体肿胀: 主细胞内酶原颗粒减少, 线粒体肿胀, 减少, 粗面内质网扩张; 壁细胞线粒体肿胀; 平滑肌细胞核膜凹凸不平, 染色质固缩。空肠吸收上皮细胞微绒毛数量减少, 排列紊乱, 染色质边集, 线粒体肿胀, 嵴消失, 杯状细胞颗粒有脱落; 平滑肌细胞染色质边集。与模型组比, 治疗组动物胃黏膜上皮细胞微绒毛整齐, 线粒体正常;

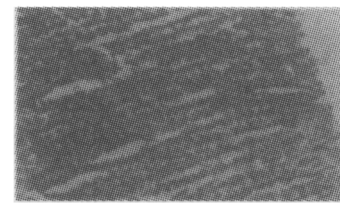
胃主细胞酶原颗粒增多, 线粒体增多, 粗面内质网正常; 壁细胞内线粒体增多, 结构正常; 平滑肌细胞核膜光滑平整, 染色质形态正常。空肠吸收上皮细胞微绒毛增加, 排列整齐, 长短一致, 细胞核明显, 染色质分布均匀, 杯状细胞正常, 线粒体形态正常。



空白组: 胃黏膜 10×10



模型组: 胃黏膜坏死 10×10



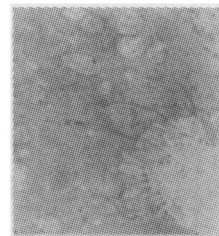
治疗组: 胃黏膜 10×10

图 1 胃肠组织病理学变化图片



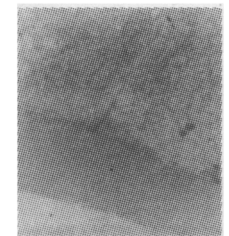
空白组: 小肠上皮细胞的微绒毛、连接复合体、线粒体全

17×1.4



模型组: 小肠上皮细胞微绒毛, 数量减少, 排列紊乱, 线粒体肿胀

17×1.4



治疗组: 小肠上皮细胞正常

17×1.4

图 2 胃肠的亚细胞超微结构变化

3.3 四逆散对肝郁证大鼠胃肠激素的影响 从表 3 可以看出: SD 大鼠造模后, 血清 Gas 水平降低, 但与空白对照组比较无差异, 治疗后 Gas 水平升高幅度也不大; 造模后血浆 MTL 水平与空白对照组比较有明显降低($P < 0.01$), 经四逆散治疗后 MTL 明显升高, 与肝郁模型组比较($P < 0.05$), 但仍未达到正常水平。

由表 4 看出: 模型组 SS 水平较空白对照组明显升高($P < 0.01$), 经四逆散治疗后血浆 SS 水平降低, 与模型组比较有差异($P < 0.05$), 模型组 VIP 水平明

显降低,与空白组比较有显著差异($P < 0.01$),经治疗后血浆 VIP 水平有所升高,但未达到正常水平,与模型组比较无差异($P > 0.05$)。

表 3 肝气郁结对大鼠血清胃泌素和血浆胃动素的影响($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量 g/kg	动物 (只)	Gas (pg/mL)	MTL (pg/mL)
空白对照组	—	10	57.35 ± 12.91	477.14 ± 25.01 ²⁾
肝郁模型组	—	8	48.15 ± 13.62	346.14 ± 71.03
肝郁+ 四逆散组	2.4	10	50.74 ± 13.40	402.72 ± 44.04 ¹⁾

表 4 肝气郁结对大鼠血浆生长抑素水平和血浆血管活性肠肽的影响($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量 (g/kg)	动物 (只)	SS (pg/mL)	VIP (pg/mL)
空白对照组	—	10	76.93 ± 10.89 ²⁾	94.03 ± 7.73 ²⁾
肝郁模型组	—	8	107.15 ± 14.32	71.11 ± 11.21
肝郁+ 四逆散组	2.4	10	85.63 ± 15.26 ¹⁾	80.38 ± 12.88

4 讨论

胃肠上皮细胞损害是肝郁脾虚的病理基础。本实验研究发现肝郁能使动物的胃肠粘膜层、肌层发生显著的病变。亦导致消化吸收能力的下降,故模型动物表现出饮食减少,消瘦,毛色不泽等症状。也反映了肝郁证的实质是以消化吸收和消化道运动功能障碍为主,同时存在全身适应和营养代谢失调的一种病理状态。四逆散能明显增加胃主细胞中酶原颗粒的含量,提示四逆散能促进胃蛋白酶原的合成,提高胃蛋白酶的活性,从而提高消化能力。四逆散能使线粒体、粗面内质网、肠道微绒毛、平滑肌细胞很快的恢复接近正常状态,从而提高了大鼠的消化吸收功能。

胃肠激素是由胃肠道神经内分泌细胞分泌的生物活性肽。对消化道的分泌、运动、吸收、血流和细胞营养等功能起着调控作用。胃肠激素分泌的增多或减少均可引起胃肠道功能失调而导致疾病发生。

Gas 和 MTL 作为两种主要的胃肠激素作用于胃

肠组织,使胃肠运动机能兴奋^[2]。本实验研究结果表明,在应激刺激下造成的肝气郁结动物模型,其血清 Gas 和 MTL 水平显著低于空白对照组。说明血清 Gas 和血浆 MTL 水平降低也是肝气郁结证的病理生理学指标之一。四逆散能升高血清 Gas、血浆 MTL 的水平,从而促进胃壁平滑肌的收缩,促进了胃肠运动。VIP 可增加胃肠液和电解质的分泌,通过松弛胃肠道平滑肌,抑制胃肠运动。另外还可降低胃的紧张性,减慢胃排空^[3]。本实验研究结果,肝气郁结模型组的 VIP 含量低于空白对照组,分析原因可能是由于 SS 抑制 VIP 的分泌,导致 VIP 下降。经四逆散治疗后 VIP 含量升高。SS 对消化系统的生物学作用主要是抑制,它可抑制胃肠、胆囊的蠕动,抑制黏膜细胞的增殖,减少胃肠血流量;抑制胃酸、胃蛋白酶、肝胆汁及小肠液的分泌;抑制 MTL, CCK, VIP, 抑胃肽等各种胃肠激素的分泌^[4], SS 对基础状态,食物刺激和神经刺激的 Gas 释放有明显的抑制作用^[5]。本实验研究表明,肝郁模型组 SS 水平显著高于空白对照组,由此可以推断肝气郁结时血浆 SS 浓度升高,从而抑制 Gas, MTL, VIP 的分泌和释放,抑制胃肠运动。四逆散可抑制 SS 的分泌,可调节 Gas, MTL 和 VIP 的水平,保持胃肠激素相对稳定,从而改善胃肠运动。

[参考文献]

- [1] 董宇. 肝气郁结影响胃肠运动的实验研究[J]. 成都中医药大学硕士学位论文, 20030501.
- [2] 姜若兰. 胃肠激素与胃肠运动[J]. 中华消化杂志, 1996, 16(6): 353.
- [3] 展淑琴. 血管活性肠肽和 P 物质与胃肠运动[J]. 陕西医学杂志, 1998, 27(1): 33.
- [4] 张殿明, 徐隆绍. 神经内分泌学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1991. 320.
- [5] Raptis S. Effects of somatostatin and gastric secretion and gastrin release in man. Digestion. 1975, 13(): 15.