

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.12.019

麻枳降浊方对便秘型肠易激综合征大鼠肠道间质细胞的影响

杨倩^{*}, 杜姚¹, 郭子敬¹, 邱贝¹, 张云凤²

(1. 河北省中医院, 河北省石家庄市中山路 389 号, 050011; 2. 河北医科大学研究生学院)

摘要 目的 探讨麻枳降浊方治疗便秘型肠易激综合征 (IBS-C) 的可能作用机制。方法 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为正常组 10 只和造模组 50 只, 造模组采用冰水灌胃法建立 IBS-C 模型, 将造模成功的 48 只大鼠随机分为模型组 9 只、阳性药组 10 只、高剂量组 10 只、中剂量组 10 只、低剂量组 9 只, 阳性药组给予西沙必利片 3.6 mg/(kg·d) 灌胃, 高、中、低剂量组分别给予麻枳降浊方颗粒剂 25.2、12.6、6.3 g/(kg·d) 灌胃, 模型组给予等量蒸馏水灌胃, 正常组正常饲养。14 天后, HE 染色观察肠组织病理变化, 免疫组织化学法检测肠组织 Cajal 间质细胞 (ICC) 数量和形态的变化, 并采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统分析 c-kit 基因阳性表达面积和积分光密度 (IOD)。结果 模型组大鼠肠道 ICC 细胞突起变短, 带状、网状结构不明显, 各给药组大鼠肠组织 ICC 数量、形态、分布及网状连接与正常组相似。模型组大鼠 c-kit 的阳性表达面积及 IOD 较正常组显著减少 ($P < 0.05$)。高、中剂量组和阳性药组 c-kit 阳性表达面积及 IOD 较模型组增多 ($P < 0.05$), 并且高、中剂量组显著高于阳性药组 ($P < 0.05$)。结论 麻枳降浊方可能通过增加肠组织 ICC 细胞数量, 改善 ICC 形态结构, 增加肠道传导功能, 从而改善 IBS-C。

关键词 便秘型肠易激综合征; Cajal 间质细胞; 麻枳降浊方; c-kit 基因

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是以腹痛或腹部不适及大便习惯改变、粪便性状异常为特征的慢性功能性肠道疾病。研究表明, 存在于胃肠道内的 Cajal 间质细胞 (interstitial cell of cajal, ICC) 是平滑肌慢波活动的起搏细胞, 参与胃肠道电活动, 作为 c-kit 基因编码的 III 型酪氨酸激酶受体是 ICC 的特异标记物^[1]。本研究通过冰水灌胃建立便秘型肠易激综合征 (IBS-C) 大鼠模型^[2], 以 c-kit 作为 ICC 免疫学标记物, 观察麻枳降浊方对 IBS-C 大鼠小肠、结肠及回盲部平滑肌 ICC 的影响, 为临床提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 60 只, 雄性, 体重 (140 ± 20) g, 由河北医科大学试验动物中心提供, 实验动物许可证号: 冀医动管字 1202182 号。

1.2 药物及试剂

麻枳降浊方颗粒剂: 麸炒枳实 (0.7 g/袋, 批

号: 1111073, 相当于饮片 6 g), 女贞子 (2.3 g/袋, 批号: 1111203, 相当于饮片 10 g), 墨旱莲 (0.7 g/袋, 批号: 1108155, 相当于饮片 10 g), 火麻仁 (2.0 g/袋, 批号: 1108215, 相当于饮片 10 g), 由广东一方制药有限公司提供, 溶于蒸馏水配成浓度为 1.6、3.2、6.4 g/ml 溶液。西沙比利片 (西安杨森制药有限公司, 国药准字: H10960289), 溶于蒸馏水配成 0.9 mg/ml 溶液。兔 c-kit 抗体免疫组化试剂盒 (批号: bs-10005R, 北京四正柏生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

7640 型全自动生化分析仪 (日本日立株式会社); BX63 + DP72 正置研究级显微镜 (日本奥林巴斯株式会社); TDL-5-A 离心机 (上海安亭实验设备有限公司); Humalyzer2000 半自动生化仪 (德国豪迈公司); MK3 酶联免疫检测仪 (芬兰雷勃公司)。

1.4 动物分组及处理

将 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为正常组 10 只和造模组 50 只, 造模组采用冰水灌胃法^[2]建立 IBS-C 大鼠模型, 即每日 8:30 给予大鼠冰水混

基金项目: 河北省科技支撑计划 (10246141D)

* 通讯作者: yang0311qian@126.com, (0311) 85990298

合物(生理盐水)灌胃,共 14 天。以大鼠粪便质硬、形态变小、含水量减少为造模成功标准,共有 48 只大鼠成功建立模型,造模成功率为 98.33%。将造模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组 9 只、阳性药组 10 只、高剂量组 10 只、中剂量组 10 只、低剂量组 9 只。阳性药组给予西沙必利片 3.6 mg/(kg·d)灌胃,高、中、低剂量组分别给予麻枳降浊方颗粒剂 25.2、12.6、6.3 g/(kg·d)灌胃,模型组给予等量蒸馏水灌胃,正常组正常饲养,连续 14 天。

1.5 观察指标及方法

1) 末次给药 24 h 后处死大鼠,取回盲部、结肠(距肛门 5 cm)、小肠(距回盲部 5 cm),生理盐水冲洗,10% 中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色观察肠组织病理变化。2) 采用 c-kit 蛋白单克隆抗体的免疫组织化学染色法,以 c-kit 抗体为标记物观察大鼠肠道组织中 ICC 的数量及形态变化。具体操作:对各组大鼠肠组织进行石蜡包埋、切片,脱蜡及抗原修复后,滴加一抗,湿盒内 4℃ 孵育过夜(时间 ≥ 18 h);DAB 显色,苏木素复染,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。以 PBS 代替一抗做阴性对照,光镜下观察阳性部位为棕黄色或褐色着色。采用 Image-Pro Plus 6.0 (美国 Media Cybernetics 公司)图像分析 c-kit 系统分析阳性表达面积和积分光密度(OD)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 各组大鼠肠组织病理结果

HE 染色显示,各组大鼠结肠、小肠及回盲部肠组织结构完整,未见充血、水肿、糜烂等病理改变。

2.2 各组大鼠肠组织中 ICC 数量及形态比较

免疫组化法染色结果显示,正常组大鼠 ICC 呈

棕黄色或褐色,胞体较大,呈纺锤形或梭形,数个细胞突起,细胞核呈梭形,主要分布于环肌层肌间神经丛;模型组大鼠肠组织 ICC 的数量和分布较少,突起变短,分支减少,缝隙连接变少,其形成的细胞网状结构不完整,呈退行性病理改变;各给药组大鼠肠组织 ICC 的数量、形态、分布及网状连接与正常组相似,高、中、低剂量组与阳性药组肠组织 ICC 的形态及分布无明显差异。

2.3 各组大鼠肠组织 c-kit 阳性表达面积和 IOD 比较

表 1 示,模型组大鼠肠组织各部位 c-kit 阳性表达面积和 IOD 均显著低于正常组 ($P < 0.05$)。高、中剂量组和阳性药组各部位 c-kit 阳性表达面积及 IOD 均较模型组显著升高 ($P < 0.05$),且高、中剂量组显著高于阳性药组。

3 讨论

IBS-C 是一种常见的功能性肠病,缺乏器质性、结构性及生化异常的指标。研究表明,间质细胞与众多胃肠运动性疾病关系密切,ICC 的发育分化障碍、结构或分布异常、病理损害以及衰老时的凋亡或退行性改变都可能成为胃肠动力障碍性疾病发生的关键^[1]。实验研究表明,若 ICC 和平滑肌细胞间通讯传导受损,可导致胃肠运动功能障碍^[2]。c-kit 信号途径与小肠 ICC 的发育有关,破坏 c-kit 的表达可阻止 ICC 发育成熟,从而导致肠道无慢波产生^[3],影响胃肠道动力。c-kit 信号通路对维持 ICC 表型、胃肠节律性收缩起着至关重要的作用,缺乏此信号 ICC 会导致平滑肌产生异常的不规则慢波、收缩运动障碍或不能产生有效的推进性收缩运动,从而出现胃肠动力障碍症状^[7-8]。

IBS-C 以腹痛、大便难为主症,属中医学“便秘”“腹痛”“脾约”等范畴。中医认为,便秘多由饮食不节、情志失调、外邪犯胃、禀赋不足等原因引起,主要病机为热结、寒凝、气滞、气血阴阳亏虚引起肠道传导失司。此外,“浊毒”与 IBS-C

表 1 各组大鼠肠组织 c-kit 阳性表达面积及 IOD 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性面积			IOD		
		盲肠	结肠	小肠	盲肠	结肠	小肠
正常组	10	219.43 ± 14.30	490.95 ± 17.73	892.62 ± 18.74	63.57 ± 5.63	178.14 ± 10.19	272.45 ± 7.72
模型组	9	164.67 ± 19.07*	386.53 ± 15.92*	807.02 ± 3.96*	37.51 ± 5.02*	148.89 ± 8.35*	203.95 ± 17.21*
阳性药组	10	179.55 ± 12.16 [△]	439.38 ± 17.11 [△]	836.77 ± 35.05 [△]	44.46 ± 9.19 [△]	161.34 ± 6.68 [△]	236.43 ± 20.46 [△]
低剂量组	9	187.58 ± 16.06	452.85 ± 13.52	827.14 ± 19.95	45.00 ± 6.38	161.76 ± 4.88	239.57 ± 9.48
中剂量组	10	206.06 ± 11.45 ^{△△}	477.57 ± 13.80 ^{△△}	880.46 ± 13.65 ^{△△}	59.04 ± 7.60 ^{△△}	171.52 ± 3.96 ^{△△}	260.54 ± 4.57 ^{△△}
高剂量组	10	212.60 ± 13.66 ^{△△}	476.98 ± 13.73 ^{△△}	882.98 ± 23.35 ^{△△}	62.78 ± 5.21 ^{△△}	171.80 ± 5.18 ^{△△}	269.83 ± 7.15 ^{△△}

注:与正常组同部位比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与阳性药组同部位比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

关系密切,是该病的一个重要病因病机。浊毒既是一种伤及脏腑经络及气血阴阳的致病因素,同时也是脏腑功能紊乱、气血运行失常的代谢产物,日久蕴积体内而败坏脏腑^[3]。麻枳降浊方中火麻仁润肠通便为君药,枳实理气燥湿、化浊解毒为臣药,墨旱莲、女贞子滋阴补肾,扶正祛邪,标本兼顾,全方共奏滋阴润肠通便、理气化浊解毒之功效。实验结果显示,麻枳降浊方中、高剂量大鼠小肠、结肠及盲肠 c-kit 阳性面积及 IOD 值均较模型组显著增加,组织形态趋于正常组大鼠,提示麻枳降浊方能够改善 c-kit 的过低表达,改善结肠组织中的 ICC 的形态和功能,恢复胃肠道节律性收缩功能障碍。

参考文献

- [1] Torihashi S, Ward SM, Nishikawa S, et al. c-kit dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract [J]. Cell Tissue Res, 1995, 280 (1): 97-111.
- [2] 彭丽华,杨云生,孙刚,等.便秘型肠易激综合征新概念

模型的建立 [J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(1): 112-116.

- [3] 陈奇. 中药药理学研究方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1167-1169.
- [4] 刘宁, 李平, 张建英, 等. Cajal 间质细胞研究进展 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(6): 418-419.
- [5] 李睿明, 沈洪, 张蓓, 等. Cajal 间质细胞-胃肠道动力调节药作用靶点 [J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(20): 3229-3232.
- [6] 徐冰, 杨云生, 彭丽华, 等. 便秘型肠易激综合征大鼠肠道 Cajal 间质细胞的免疫组织化学研究 [J]. 临床医药实践杂志, 2005, 7(14): 485-487.
- [7] Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, et al. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of Cajal to a smooth muscle Phenotype [J]. Gastroenterology, 1999, 117(1): 140-148.
- [8] 罗云, 林琳, 张红杰, 等. 糖尿病慢传输运动结肠 Cajal 间质细胞和干细胞因子的变化 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(5): 458-463.
- [9] 王正品, 李佃贵, 杜艳茹, 等. 浊毒致病论与现代中医病因学 [J]. 中医杂志, 2010, 51(1): 11-13.

Effect of *Mazhi Jiangzhuo Fang* (麻枳降浊方) on Intestinal Interstitial Cell of Rats with Constipation Type of Irritable Bowel Syndrome

YANG Qian¹, DU Yao¹, GUO Zijing¹, QIU Bei¹, ZHANG Yunfeng²

(1. Hebei Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei Province, 050011; 2. Graduate School of Hebei Medical University)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Mazhi Jiangzhuo Fang* in the treatment of irritable bowel syndrome (IBS-C). **Methods** 60 Wistar rats were randomly divided into normal group (n = 10) and modeling group (n = 50). Rat models of IBS-C were established with ice water gavage method in modeling group. 48 completed modeled rats were randomly divided into model group (n = 9), positive drug control group (n = 10), high dose group (n = 10), middle dose group (n = 10) and low dose group (n = 9). Positive drug control group was given Cisapride tablets (3.6 mg/(kg · d)) by gavage. High, middle and low dose groups were given *Mazhi Jiangzhuo Fang* granules 25.2 g/(kg · d), 12.6 g/(kg · d) and 6.3 g/(kg · d) by gavage, respectively. Model group was given equivalent distilled water by gavage. Normal group was fed normally. After 14 days, the pathological changes of intestinal tissue was observed by hematoxylin and eosin stain (HE stain). Changes in amount and shape of interstitial cell of Cajal (ICC) were detected. The positively expressed proportion of c-kit gene and integral optical density (IOD) was analyzed with image analysis system of Image-Pro Plus 6.0. **Results** The protuberances of ICC in model group rats were shortened. Banding and reticulation structure were not obvious. The amount, shape, distribution and reticulated connection of rats' ICC in medication administration groups were similar to those in normal group. The positively expressed proportion of c-kit gene and IOD in model group were less than those in normal group (P < 0.05). The positively expressed proportion of c-kit gene and IOD in high and middle dose groups and positive drug control group were more than those in model group (P < 0.05), especially in high and middle dose groups (P < 0.05). **Conclusion** *Mazhi Jiangzhuo Fang* may improve IBS-C by increasing the amount of ICC, improving the shape and structure of ICC, and strengthening the rhythmic contraction of intestinal tract.

Keywords constipation; irritable bowel syndrome; interstitial cell of Cajal; *Mazhi Jiangzhuo Fang*; c-kit gene

(收稿日期: 2014-07-10; 修回日期: 2015-02-20)

编辑: 洪 涛