

芪榔合剂对慢性传输型便秘小鼠结肠SP、VIP的影响

李勇, 王健, 李毅平, 胡晔, 汤健, 余莉芳

■背景资料

中医治疗CFC疗效明确,但多数限于临床疗效观察方面,对其作用机制的研究探讨较少,本文从胃肠激素方面讨论芪榔合剂对小鼠结肠SP、VIP的影响,探讨其通便的作用机制。

李勇, 王健, 李毅平, 胡晔, 汤健, 余莉芳, 上海中医药大学附属市中医医院消化科 上海市 200071

李勇, 2004年上海中医药大学博士, 副教授, 主要从事中西医结合治疗消化系统疾病的临床和实验研究。

作者贡献分布: 李勇与王健对此文所作贡献均等; 本课题由李勇, 王健及余莉芳共同设计; 研究过程由王健, 李毅平, 胡晔及汤健共同操作完成; 数据分析由李勇, 王健及余莉芳完成; 论文写作由李勇和王健完成。

通讯作者: 李勇, 200071, 上海市芷江中路274号, 上海中医药大学附属市中医医院消化科(上海市中医医院)。

liyong8256@sohu.com

电话: 021-56639828-2302/2303

收稿日期: 2007-08-02 修回日期: 2007-12-11

Effect of Qilang Decoction on substance P and vasoactive intestine polypeptide in the mucous enteric nervous system

Yong Li, Jian Wang, Yi-Ping Li, Ye Hu, Jian Tang, Li-Fang Yu

Yong Li, Jian Wang, Yi-Ping Li, Ye Hu, Jian Tang, Li-Fang Yu, Department of Gastroenterology, Shanghai Traditional Chinese Medicine Hospital, Shanghai 200071, China
Correspondence to: Dr. Yong Li, Department of Gastroenterology, Shanghai Traditional Chinese Medicine Hospital, 274 Zhijiang Middle Road, Shanghai 200071, China. liyong8256@sohu.com

Received: 2007-08-02 Revised: 2007-12-11

Abstract

AIM: To investigate the effect of Qilang Decoction on substance P (SP) and vasoactive intestine polypeptide (VIP) in mucous and muscular layers of colon and its possible mechanism.

METHODS: Fifty Kunming mice were divided into normal group (A), model group of constipated mice (B) and three different treatment groups (C, D, E). Positively stained SP and VIP were compared among the 5 groups using immunohistochemistry and pathology analysis system.

RESULTS: Strongly positive SP $[(9.35 \pm 2.44) \times 10^5, (7.69 \pm 4.16) \times 10^5]$ and VIP $[(9.48 \pm 4.54) \times 10^5, (6.65 \pm 3.30) \times 10^5]$ were found in the mucous membrane and muscular layers of the normal colon group compared with the negative group

($P < 0.05$). The SP and VIP level was higher in the mucous membrane layer than in the muscular layer. The SP level $[(5.25 \pm 0.72) \times 10^5, (5.61 \pm 1.59) \times 10^5, (5.61 \pm 2.03) \times 10^5]$ and the VIP level $[(4.19 \pm 1.13) \times 10^5, (7.27 \pm 2.27) \times 10^5, (3.40 \pm 1.51) \times 10^5]$ decreased considerably in the mucous membrane and muscular layers of the Qilang Decoction groups compared with the normal group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Qilang Decoction may regulate the distribution of SP and VIP in the colon by directly stimulating the peristalsis of the colon, decreasing the response of SP to the nerve cluster of the colon mucous membrane, and releasing SP, thus leading to increased excretion of intestinal juice, which lubricates the intestines for easy bowel movements.

Key Words: Qilang Decoction; Diphenoxylate; Constipated mice; Substance P; Vasoactive intestine polypeptide

Li Y, Wang J, Li YP, Hu Y, Tang J, Yu LF. Effect of Qilang Decoction on substance P and vasoactive intestine polypeptide in the mucous enteric nervous system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 272-276

摘要

目的: 观察芪榔合剂对便秘小鼠结肠黏膜层和肌层P物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestine polypeptide, VIP)的影响, 初步探讨其通便作用机制。

方法: 50只昆明种小鼠随机分为5组: 阴性对照组(A组)、便秘模型组(B组)和大(C组), 中(D组), 小(E组)剂量芪榔合剂组。应用免疫组织化学技术和病理显微镜分析图像系统, 观察各组SP、VIP阳性染色区域的免疫组化指数, 并进行比较。

结果: 便秘模型组结肠黏膜层及肌层内SP、VIP呈强阳性表达, 与阴性组比较明显升高, 其中黏膜层SP、VIP含量高于肌层; C, D, E组黏膜层和肌层SP[黏膜层: $(5.25 \pm 0.72) \times$

■同行评议者

王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

10^5 、 $(5.61 \pm 1.59) \times 10^5$ 、 $(5.61 \pm 2.03) \times 10^5$ vs $(9.35 \pm 2.44) \times 10^5$; 肌层: $(2.28 \pm 0.82) \times 10^5$ 、 $(3.23 \pm 0.80) \times 10^5$ 、 $(3.45 \pm 0.88) \times 10^5$ vs $(7.69 \pm 4.16) \times 10^5$], VIP黏膜层: $[(4.19 \pm 1.13) \times 10^5$ 、 $(7.27 \pm 2.27) \times 10^5$ 、 $(3.40 \pm 1.51) \times 10^5$ vs $(9.48 \pm 4.54) \times 10^5$; 肌层: $(1.54 \pm 0.39) \times 10^5$ 、 $(1.40 \pm 1.30) \times 10^5$ 、 $(1.47 \pm 0.57) \times 10^5$ vs $(6.65 \pm 3.30) \times 10^5]$ 含量较模型组比较显著降低($P < 0.05$).

结论: 芪榔合剂能够调节结肠内SP、VIP含量, 其通便作用机制可能是直接刺激结肠蠕动, 使结肠黏膜神经丛中SP能神经反应性降低, SP释放减少, 导致肠液分泌增加达到润下通便作用.

关键词: 芪榔合剂; 复方地芬诺酯; 小鼠便秘模型; P物质; 血管活性肠肽

李勇, 王健, 李毅平, 胡晖, 汤健, 余莉芳. 芪榔合剂对慢性传输型便秘小鼠结肠SP、VIP的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 272-276
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/272.asp>

0 引言

慢性功能性便秘(CFC)主要是以大便排出困难、排便不适感及排便时间延长为主要症状的征候群, 其发病率男性可达9%-26%, 女性可达21%-34%^[1-4]. 其病因不明、无特征性病例改变, 治疗较困难, 我们在运用芪榔合剂治疗CFC取得较好临床疗效的基础上, 对芪榔合剂的通便作用进行进一步的动物实验研究, 证明其具有较好的促进肠蠕动、润下通便的作用, 同时我们应用免疫组织化学的方法, 对复方地芬诺酯诱导的慢性传输型便秘小鼠结肠P物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)2种主要的肽能神经递质进行了研究, 以探讨其通便作用的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 选用体质量 20 ± 2 g健康昆明小鼠50只, 雌雄各半, 中国科学院上海实验动物中心提供, 合格证号: 22148, 二级动物房饲养. 实验动物按照体质量、性别随机分为5组, 即阴性对照组、便秘模型组、大中小3个剂量中药组(每毫升分别含原生药2.9 g、1.45 g、0.72 g), 每组10只. 芪榔合剂由黄芪15 g, 槟榔20 g, 知母15 g, 玉竹15 g, 全瓜蒌30 g, 望江南30 g, 枳壳15 g组成, 煎煮、浓缩至每毫升含生药2.9 g, 置于冰箱内4℃保存, 实

验前配制成合适浓度. Leica RM2145型轮转切片; 中文IMS细胞图像分析系统、医学图像分析软件; 摄像机PANASONIC MV-CP410; Olympus BH2显微镜; 数码相机; 兔抗鼠SP、VIP多克隆抗体; EnVision试剂(即用型)等.

1.2 方法 复方地芬诺酯100片, 用研钵研碎后加入100 mL蒸馏水中, 配制成复方地芬诺酯混悬液(2.5 g/L), 用前摇匀. 炭末汁配制^[5]: 准确称取阿拉伯树胶50 g, 加水400 mL, 煮沸至溶液透明, 称取活性炭末25 g加至上述溶液中煮沸3次, 待溶液凉后加水定容到500 mL, 于冰箱4℃保存, 用前摇匀. 模型制备与评价^[6]: 阴性对照组(A组)给蒸馏水, 其余4组给复方地芬诺酯混悬液30 min后给予每只动物0.4 mL炭末汁, 从给炭末汁完即开始记录时间, 于当日记录各组小鼠首次排出黑色粪便时间; 8 h排便总粒数; 8 h不排便动物数; 20 h排便总粒数. (1)便秘模型组(B组)和3个剂量中药组(按大中小剂量分别为C、D、E组)均以灌胃方法给予50 mg/kg复方地芬诺酯, 灌胃量为0.02 mL/g, 30 min后便秘模型组给予同等剂量蒸馏水ig, 3个剂量中药组分别给予相应剂量中药ig, 灌胃量为0.025 mL/g, 连续ig 4 wk, 末次ig 70 min后脱臼处死小鼠, 剪取小鼠近端结肠2 cm, 纵行剖开, NaCl(含Na 9 g/L)漂洗后, 固定于40 g/L中性甲醛溶液中, 常规脱水、石蜡包埋, 常规切片机切片, 厚约4 μm. 分别进行HE染色和免疫组化染色. 采用EnVision免疫组化染色法(两步法), 光学显微镜下, 采用中文IMS细胞图像分析系统, 每张片随机取3个视野, 对SP、VIP含量进行定量分析, 并对免疫组化指数进行统计.

统计学处理 计量资料以mean±SD表示, 组间比较采用方差分析, 两组间比较采用LSD-*t*检验, 用SPSS12.0软件包进行数据统计, $P < 0.05$ 表示统计学上差异有显著性.

2 结果

2.1 小鼠慢性传输型便秘模型评价 B、C、D、E组与A组比较, 首次排出黑便时间明显延长($P < 0.05$); 小鼠8 h、20 h排便总粒数明显减少; 不排便动物数明显增多. B、C、D和E组间比较小鼠首次排出黑色粪便时间, 8 h、20 h排便粒数无明显差异($P > 0.05$), 说明造模成功(表1).

2.2 小鼠结肠形态学改变 各组动物, 结肠黏膜结构完好, 上皮无剥脱, 固有腺体无异常, 间质无充血、水肿、炎细胞浸润, 肌间神经丛、肌细

■ 研发前沿

慢性传输型便秘的发生机制目前尚不明确, 近年来研究表明肠神经系统与慢性传输型便秘有关, 神经肽在便秘的发生过程中具有重要作用, 尤其与SP、VIP数量的变化关系密切.

■相关报道

《慢性传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛内VIP能神经、SP能神经的免疫组化研究》一文以复方苯乙哌啶(地芬诺酯)制备大鼠慢传输型便秘模型并探讨大鼠结肠SP、VIP含量变化。

表 1 各组动物排便粒数(mean \pm SD, $n = 10$)

分组	首次排黑便时间(min)	8 h排便粒数	不排便动物数	20 h排便粒数
A	156 \pm 22.24	44.3 \pm 7.82	0	97.5 \pm 13.38
B	419.4 \pm 88.24 ^a	7.6 \pm 7.29 ^a	4	56.1 \pm 17.40 ^a
C	419.4 \pm 62.26 ^a	9.1 \pm 9.08 ^a	4	57.5 \pm 11.74 ^a
D	434.2 \pm 61.35 ^a	7.0 \pm 7.41 ^a	4	59.2 \pm 15.38 ^a
E	435.5 \pm 61.89 ^a	8.5 \pm 6.85 ^a	3	54.1 \pm 17.21 ^a

^a $P < 0.05$ vs A组.

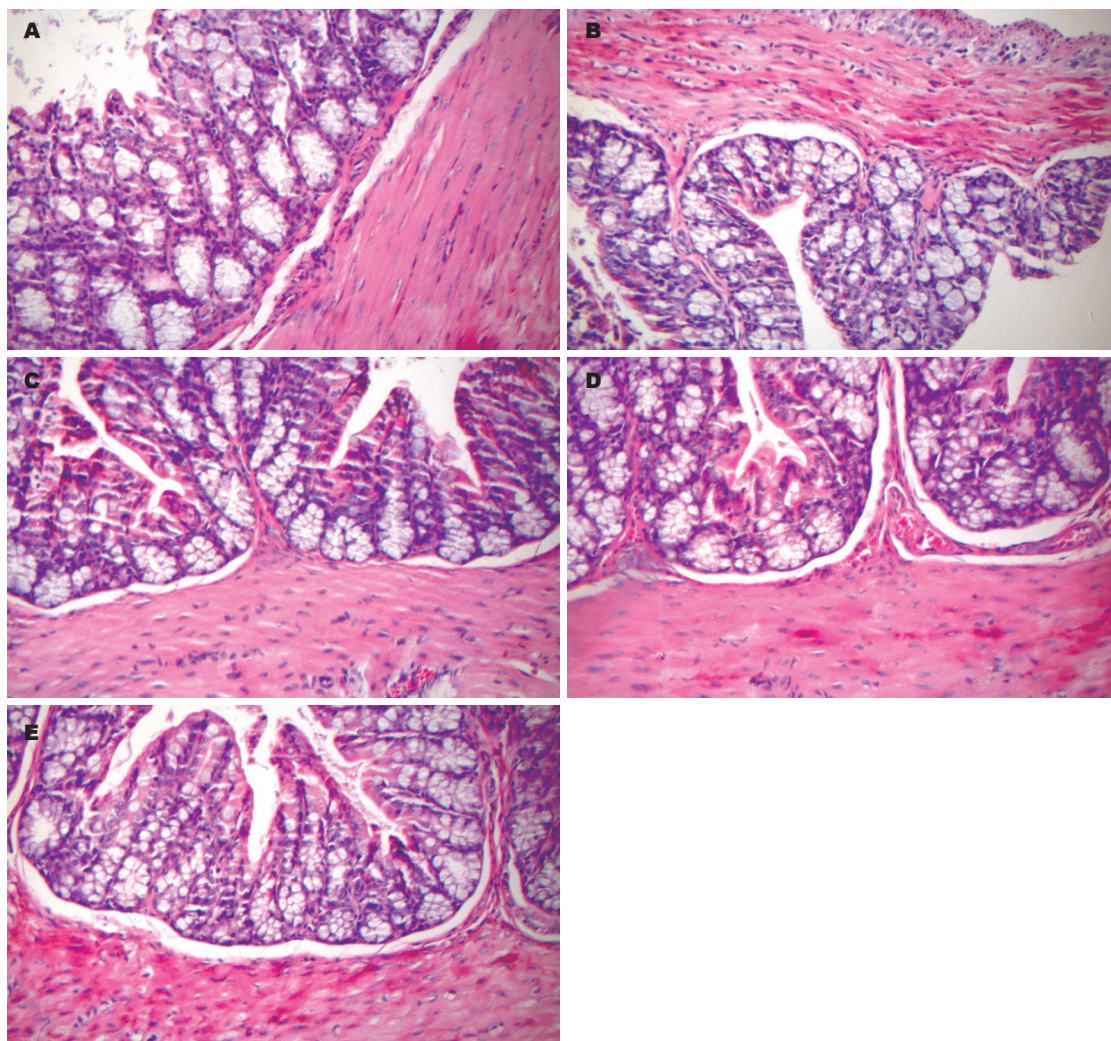


图 1 芪榔合剂对小鼠结肠形态学的影响(H&E \times 200). A: 阴性对照组; B: 便秘模型组; C: 大剂量中药组; D: 中剂量中药组; E: 小剂量中药组.

胞未见明显异常改变(图1).

2.3 小鼠结肠黏膜层及肌层SP、VIP含量的变化 B组结肠黏膜层及肌层SP、VIP阳性表达明显升高,与A组比较均有显著性差异($P < 0.05$);而中药治疗C、D、E组结肠黏膜层和肌层SP、VIP阳性表达明显降低,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$),组间比较无显著性差异

($P > 0.05$, 表2).

3 讨论

慢性传输型便秘的发生机制目前尚不明确,近年来研究表明肠神经系统与慢传输型便秘有关^[7-9],神经肽在便秘的发生过程中具有重要作用^[10-12].胃肠肽由胃肠神经分泌释放,而肠神经

表 2 不同组间SP和VIP免疫组化指数变化(mean \pm SD, $\times 10^5$, $n = 10$)

	A	B	C	D	E
SP 黏膜层	2.46 \pm 1.36	9.35 \pm 2.44 ^a	5.25 \pm 0.72 ^c	5.61 \pm 1.59 ^c	5.61 \pm 2.03 ^c
肌层	2.53 \pm 1.19	7.69 \pm 4.16 ^a	2.28 \pm 0.82 ^c	3.23 \pm 0.80 ^c	3.45 \pm 0.88 ^c
VIP 黏膜层	4.40 \pm 1.12	9.48 \pm 4.54 ^a	4.19 \pm 1.13 ^c	7.27 \pm 2.27 ^c	3.40 \pm 1.51 ^c
肌层	1.26 \pm 0.22	6.65 \pm 3.30 ^a	1.54 \pm 0.39 ^c	1.40 \pm 1.30 ^c	1.47 \pm 0.57 ^c

^a $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B组.

广泛存在于肠道黏膜层、黏膜下层、肌层. 神经肽是主要起传递信息作用的生物活性多肽, 扮演着神经激素、神经递质、神经调质和细胞因子等多种角色, 是调节胃肠功能的重要因素. 一般来讲, 黏膜下神经丛主要参与肠道分泌和吸收功能, 而肌间神经丛主要参与肠道运动功能的调节^[13]. 目前已确认的肠神经递质或调质多达数十种, 其中兴奋性递质主要包括SP、乙酰胆碱等; 抑制性递质包括VIP、NO、三磷酸腺苷(ATP)等.

SP是由胃肠道固有神经或外来神经释放, 存在于胃肠道黏膜神经丛、肌间神经丛, 是调节肠道作用最强的兴奋性肽能神经递质, 能抑制肠道黏膜分泌, 刺激肠道运动, 可直接作用大肠纵行肌环行肌引起收缩, 增加结肠收缩和运动^[13]. 国内外学者对慢性传输型便秘患者结肠进行研究后认为慢性传输型便秘的产生可能与结肠肌间神经丛内SP含量减少有关^[14-18], 可能是导致结肠传输功能减弱的原因之一. 实验结果显示, 模型小鼠黏膜层及肌间神经丛内SP含量较阴性对照组明显增多, 以黏膜层SP含量增多最明显.

我们认为慢性功能性便秘以气虚推动乏力、津亏肠道失润为本, 兼以肠道气滞为标. 芪榔合剂是我科治疗便秘的经验方, 全方由黄芪、槟榔、知母、玉竹、全瓜蒌、望江南、枳壳6味中药组成, 具有益气润下、理气导滞之功效, 我们长期临床实践应用证明本方具有良好的通便效果, 并且无腹痛、腹泻、停药后便秘反复加重等副作用. 本研究结果表明, 便秘小鼠结肠神经丛内SP含量释放增加, 而芪榔合剂各剂量组均可降低SP含量. 我们认为, SP含量增加可能是由于复方地芬诺酯抑制结肠蠕动, 为维持肠道正常生理, 黏膜层SP含量增加从而使肠液分泌减少, 继发性引起肠道内容物通过延迟; 而芪榔合剂可能直接作用于小鼠结肠刺激肠蠕动, SP能神经反应性降低, SP含量减少, 同时由于黏膜层SP含量的减少, 导致结肠黏膜分泌肠

液增加, 有利通便作用.

VIP能神经按神经元功能不同分为运动神经元和分泌神经元. 前者其传出主要使胃肠括约肌舒张, 后者则主要刺激肠液分泌^[19], VIP可以使结肠运动减弱. 尽管VIP能神经是胃肠道运动的抑制性神经, 但国内外大量学者通过对慢性便秘患者及慢性传输型便秘大鼠结肠VIP能神经进行免疫组化研究认为, 其结肠肌层内VIP能神经呈减少趋势^[20], 并认为VIP是产生下行性抑制的重要因素, 其含量降低可能导致肠神经系统传输障碍, 产生传输减慢^[21], 同时由于VIP浓度降低可能引起结肠出现过度的阶段性蠕动, 使有效推动减弱^[22-25]. 结果显示, 模型小鼠黏膜层及肌间神经丛内VIP含量较阴性对照组明显增多, 以黏膜层VIP含量增多更明显; 而芪榔合剂各剂量组与模型组比较显著性下降, 说明芪榔合剂各剂量组均可降低VIP含量. 由于复方地芬诺酯作用于肠道平滑肌, 抑制结肠蠕动, 为恢复结肠正常的动力, 肠神经系统大量释放VIP, 使黏膜层分泌肠液增多, 并能抑制结肠阶段性蠕动, 使有效推动增强. 而芪榔合剂可能通过直接作用于结肠, 促进结肠的运动, 从而促进排便, VIP释放减少. 因此我们认为, 结肠内VIP含量升高可能是便秘早期肠神经系统的一种代偿性反应.

我们研究表明便秘小鼠结肠黏膜层及肌层SP、VIP含量明显升高, 可能与便秘病程较短及未使用接触性泻剂有关, 可能是便秘早期肠神经系统的一种代偿性反应; 芪榔合剂刺激小鼠肠蠕动, SP能神经反应性降低, SP含量减少, 由于黏膜层SP含量的减少, 导致结肠黏膜分泌肠液增加, 使粪便软化, 最终达到通便作用.

4 参考文献

- 1 于普林, 李增金, 郑宏, 朱汉民, 李玺, 何钦成, 王静思, 袁凯瑜, 姜中央, 段春波, 高芳堃. 老年人便秘流行病学特点的初步分析. 中华老年学杂志 2001; 20: 132-134
- 2 Pare P, Ferrazzi S, Thompson WG, Irvine EJ, Rance

■应用要点

本文为中药治疗慢传输型便秘机制研究奠定了基础, 为中药临床治疗慢传输型便秘提供理论基础.

■名词解释

1 P物质(SP): 是由胃肠道固有神经或外来神经释放, 存在于胃肠道黏膜神经丛、肌间神经丛, 是调节肠道作用最强的兴奋性肽能神经递质.

2 血管活性肠肽(VIP): 是由运动神经元和分泌神经元分泌的能够刺激肠液分泌、可以使结肠运动减弱的一种肠道肽类激素.

■同行评价

本文设计合理,文字表达流畅,但总体评价一般。

- L. An epidemiological survey of constipation in canada: definitions, rates, demographics, and predictors of health care seeking. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3130-3137
- 3 郭晓峰,柯美云,潘国宗,韩少梅,方秀才,鲁素彩,郭慧平. 北京地区成人慢性便秘整群、分层、随机流行病学调查及其相关因素分析. *中华消化杂志* 2002; 22: 637
- 4 尉秀清,陈旻湖. 广州市居民功能性便秘流行病学调查. *胃肠病学和肝病学杂志* 2001; 10: 150
- 5 李业鹏,崔生辉,江涛,李燕俊,李玉伟,韩春卉,刘红蕾,张靖. 小鼠便秘模型的建立. *中国食品卫生杂志* 2000; 12: 1-4
- 6 李仪奎,王钦茂,周金黄. 中药药理实验方法学. 第1版. 上海: 上海科技出版社, 1991: 416
- 7 Voderholzer WA, Wiebecke B, Gerum M, Müller-Lissner SA. Dysplasia of the submucous nerve plexus in slow-transit constipation of adults. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 755-759
- 8 Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Ikeda T, Fukuzawa M. Regulation of the enteric nervous system in the colon of patients with slow transit constipation. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1540-1544
- 9 莫平,刘武红. Mu阿片受体在大鼠“泻剂结肠”肠道低反应中的应用. *消化外科* 2002; 1: 436-440
- 10 Sjölund K, Fasth S, Ekman R, Hultén L, Jiborn H, Nordgren S, Sundler F. Neuropeptides in idiopathic chronic constipation (slow transit constipation). *Neurogastroenterol Motil* 1997; 9: 143-150
- 11 刘诗,高再荣,钱伟,易粹琼. 慢性便秘患者直肠P物质和血管活性肠肽含量的变化. *中华内科杂志* 2001; 40: 608
- 12 潘仁智,王业皇,张苏闽. 便秘患者血清NO检测及其临床意义的初步探讨. *右江民族医学院学报* 2004; 26: 368
- 13 王志均. 胃肠激素. 北京: 科学出版社, 1985: 210-307
- 14 童卫东,张胜本,张连阳,高峰,杜文华,牟江洪. 慢性传输型便秘肠神经系统一氧化氮合酶和P物质的分布意义. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 380-382
- 15 丁义江,哈楠林,丁曙晴,徐文华,耿建祥. 结肠慢传输型便秘与突触素和P物质及血管活性肠肽的临床研究. *中华胃肠外科杂志* 2004; 7: 485-487
- 16 高峰,张胜本,张连阳,陈俐. 慢传输型便秘乙状结肠VIP、SP免疫组化研究. *中华消化杂志* 1998; 18: 34-36
- 17 Wedel T, Roblick UJ, Ott V, Eggers R, Schiedeck TH, Krammer HJ, Bruch HP. Oligoneuronal hypoganglionosis in patients with idiopathic slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 54-62
- 18 童卫东. 慢传输型便秘肠神经系统的研究进展. *国外医学外科学分册* 1999; 26: 212-214
- 19 张经济,连至诚,许冠荪. 结肠运动的发生与调节, 消化道病理生理学. 广州: 科技出版社, 1997: 1084-1090
- 20 何俊堂,刘海峰,房殿春,龙庆林,王国安. 慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛内VIP能神经、SP能神经的免疫组化研究. *消化外科* 2004; 3: 122-124
- 21 Wheatley JM, Hutson JM, Chow CW, Oliver M, Hurley MR. Slow-transit constipation in childhood. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 829-832; discussion 832-833
- 22 Cortesini C, Cianchi F, Infantino A, Lise M. Nitric oxide synthase and VIP distribution in enteric nervous system in idiopathic chronic constipation. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2450-2455
- 23 Milner P, Crowe R, Kamm MA, Lennard-Jones JE, Burnstock G. Vasoactive intestinal polypeptide levels in sigmoid colon in idiopathic constipation and diverticular disease. *Gastroenterology* 1990; 99: 666-675
- 24 El-Salhy M. Gastrointestinal transit in an animal model of human diabetes type 2: relationship to gut neuroendocrine peptide contents. *Ups J Med Sci* 2002; 107: 101-110
- 25 Forrest A, Parsons M. The enhanced spontaneous activity of the diabetic colon is not the consequence of impaired inhibitory control mechanisms. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003; 23: 149-158

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布 世界华人消化杂志 2006 年影响因子 0.373

本刊讯 2006年世界华人消化杂志的总被引频次为1855, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第104位, 内科医学类28种期刊的第7位. 2006年世界华人消化杂志的影响因子为0.373, 内科医学类28种期刊的第21位. 即年指标0.134, 他引率0.71, 地区数27, 基金论文比0.42, 海外论文比0.02, 学科影响指标 0.50. (总编辑: 马连生 2007-11-15)