

针刺对便秘模型大鼠PGP9.5表达的影响

丁曙晴, 丁义江, 季新涛, 韩帖梅, 孙明明, 霍维宇, 黄书亮, 耿建祥

■背景资料

结肠慢传输型便秘症状顽固, 临床治疗困难。患者常长期依赖刺激性泻剂, 部分患者最终需手术切除传输迟缓的结肠缓解症状。近年来研究表明针刺疗效较好, 作用机制不明确。探讨针刺机制之一为改善肠神经系统神经元功能。

丁曙晴, 季新涛, 孙明明, 霍维宇, 南京中医药大学研究生部江苏省南京市 210046

丁曙晴, 丁义江, 南京中医药大学第三附属医院全国中医肛肠医疗中心 江苏省南京市 210001

韩帖梅, 黄书亮, 耿建祥, 南京中医药大学第三附属医院病理科 江苏省南京市 210001

江苏省中医药局基金资助项目, No. HL07061

作者贡献分布: 此课题由丁曙晴与丁义江设计; 实验研究由季新涛, 孙明明及霍维宇操作完成; 病理研究由韩帖梅、黄书亮及耿建祥完成; 图像分析由季新涛完成; 数据分析由丁曙晴完成; 本论文写作由丁曙晴与丁义江完成。

通讯作者: 丁曙晴, 副主任中医师, 210001, 江苏省南京市金陵路1号, 南京中医药大学第三附属医院全国中医肛肠医疗中心。njgczx@gmail.com

电话: 025-85885759

收稿日期: 2009-05-18 修回日期: 2009-06-30

接受日期: 2009-07-06 在线出版日期: 2009-07-28

Effect of acupuncture on PGP 9.5 expression in rats with experimental constipation

Shu-Qing Ding, Yi-Jiang Ding, Xin-Tao Ji,
Dian-Mei Han, Ming-Ming Sun, Wei-Yu Huo,
Shu-Liang Huang, Jian-Xiang Gen

Shu-Qing Ding, Xin-Tao Ji, Ming-Ming Sun, Wei-Yu Huo, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Shu-Qing Ding, Yi-Jiang Ding, National Chinese Medical Center of Colorectal Diseases, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Dian-Mei Han, Shu-Liang Huang, Jian-Xiang Gen, Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation of Jiangsu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. HL07061
Correspondence to: Shu-Qing Ding, National Chinese Medical Center of Colorectal Diseases, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. njgczx@gmail.com

Received: 2009-05-18 Revised: 2009-06-30

Accepted: 2009-07-06 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of acupuncture on the expression of PGP 9.5 (a neuronal marker in the enteric nervous system) in rats with experimental constipation.

METHODS: A total of sixty rats were used in the study, of which 15 rats were included in normal control group and the remaining 45 rats were in-

tragastrically administered with Rhubarb Decoction to induce experimental constipation. The resulting 36 model rats were equally divided into model control group, sham treatment group and acupuncture treatment group. Rats in the model control group ($n = 12$) were killed before treatment, while those in the acupuncture treatment group and sham treatment group were subjected to electroacupuncture or sham treatment for 14 days and killed. The intestinal canal about 5 cm away from the anus was taken. HE staining and immunohistochemical staining were then performed to determine the integrated absorbance (IA) of PGP9.5 staining.

RESULTS: The IA value was significantly higher in the normal group than the model control group (47.38 ± 9.04 vs 20.36 ± 9.12 , $P < 0.000$). No significant difference was noted in the IA value between the sham treatment group and the model control group (28.51 ± 9.43 vs 20.36 ± 9.12 , $P = 0.200$). The IA value was significantly higher in the acupuncture treatment group than the model control group and sham treatment group (41.39 ± 19.56 vs 28.51 ± 9.43 and 20.36 ± 9.12 , $P = 0.021$ and 0.002 , respectively) though no significant difference was observed between the normal control group and the acupuncture treatment group ($P = 0.297$).

CONCLUSION: Acupuncture can help improve the function of intestinal ganglion cells in rats with Rhubarb Decoction-induced slow-transit constipation.

Key Words: Slow-transit constipation; Model; Enteric nervous system; Intestinal neuron; PGP9.5 expression

Ding SQ, Ding YJ, Ji XT, Han DM, Sun MM, Huo WY, Huang SL, Gen JX. Effect of acupuncture on PGP 9.5 expression in rats with experimental constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2184-2187

摘要

目的: 观察针刺对便秘模型大鼠肠神经系统神经元标志物PGP9.5表达的影响。

方法: 将60只大鼠按照体质量及随机分组。正

■同行评议者

吕宾, 教授, 浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

常对照组15只, 45只大鼠予生大黄水煎液灌胃, 开始用量为100 g/(kg·d), 最后为1280 g/(kg·d), 45 d后造模36只, 治疗前处死12只作为造模未治疗前组对照, 剩余随机分为针刺组和空白治疗组, 各12只. 针刺组大鼠针刺天枢和足三里, 天枢加电针, 疏密波刺激10 min, 每日1次, 共计14 d; 空白治疗组不给予治疗. 2组14 d后处死, 取距离肛门5 cm肠管, 用HE染色和PGP9.5免疫组织化学染色, 采用Image-Pro Plus 5.0计算各组PGP9.5的综合吸光度值(LA值)分析肠神经节细胞的状况.

结果: 正常组PGP9.5表达的LA值($\times 10^4$)为 47.38 ± 9.04 , 治疗前组为 20.36 ± 9.12 , 2组比较有显著差异($P < 0.000$); 空白组为 28.51 ± 9.43 , 与治疗前组比较无统计学差异($P > 0.05$); 针刺组为 41.39 ± 19.56 , 与治疗前组和空白组比较均有统计学差异(均 $P < 0.05$), 与正常组比较无统计学差异($P > 0.05$).

结论: 针刺有助于改善大黄水煎液灌胃泻剂便秘模型大鼠神经节细胞功能.

关键词: 结肠慢传输性便秘; 模型; 肠神经系统; 肠神经; PGP9.5表达

丁曙晴, 丁义江, 季新涛, 韩帖梅, 孙明明, 霍维宇, 黄书亮, 耿建祥. 针刺对便秘模型大鼠PGP9.5表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2184-2187

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2184.asp>

0 引言

结肠慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)病因不明, 症状顽固, 常造成泻剂依赖, 治疗困难. 针刺治疗便秘首见于内经, 至今已积累了丰富的治疗经验, 对慢性便秘治疗安全有效^[1]. 我们采用针刺治疗该疾病, 取得较好的疗效^[2]. 为了阐明针刺是否通过影响肠神经系统的神经元途径起治疗作用, 我们采用其标志物蛋白基因产物PGP9.5的病理学改变探讨其作用机制, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年Wistar大鼠60只, 雌雄不限, 体质量170-240 g, 由南京江宁青龙山实验动物繁殖场提供, 质量合格证号SCXK(苏)2006-2008. 实验期间所有动物均标准饲料及蒸馏水喂养, 自由摄取. 生大黄: 1000 g, 购自南京市药材公司. 生大黄水煎液: 将1000 g生大黄粉碎浸泡于3000 mL蒸馏水中6 h后回流煮沸60 min, 过滤并浓缩至1000

mL, 得到100%生大黄水煎液. PGP9.5试剂及一抗: 购自北京中杉金桥公司, 即用型, 抗体批号为ZM-0137. 二抗购自广州迈新生物公司, DAB显色液购自美国基因公司. 针具: 采用0.25 mm \times 25 mm华佗牌一次性无菌针灸针, 华佗牌电子针疗仪SDZ-II型. 大鼠固定器: 采用南京中医药大学针药结合实验室制大鼠针刺固定器. 电子天平: FA1604, 上海天平仪器厂生产. 病理显微图像分析系统: 专业图像分析软件Image-Pro Plus 5.0版.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 按照体质量随机分组, 每组15只. 正常对照组, 饲以普通软饲料等待造模组造模成功并治疗结束; 造模组45只给予造模, 成功后随机平均分成治疗前组、针刺组和空白治疗组. 结肠慢传输性便秘动物模型制作参照文献[3]方法, 给予生大黄水煎液, 开始用量为100 g/(kg·d), 给药以每笼大鼠的平均体质量计算, 以后每日在前日的基础上加倍, 直到出现半数致泻保持此剂量到80%的稀便消失然后再在此基础上加倍给药, 最后用量为1280 g/(kg·d), 如此方法共饲养45 d.

1.2.2 大鼠处理: 正常组: 自实验开始至结束自然饲养, 不给予任何干预. 空白组: 造模成功后与针刺组在同一环境下固定, 以对照针刺组可能因恐惧等因素造成的肠动力紊乱. 针刺组: 为造模成功后给予针刺治疗, 将大鼠固定在自制的大鼠固定器上, 参照实验针灸学大鼠取穴对照表针刺天枢、足三里. 用华佗牌美容针刺入穴位0.5-0.7 cm, 天枢加电针, 左右交替, 疏密波刺激10 min, 每日1次, 共计14 d. 留取标本: 治疗前组造模成功后处死, 针刺组和空白治疗组实验结束后6 h处死, 均为脱颈椎处死后取距肛侧5 cm结肠全层, 1 cm \times 1 cm, 平铺至滤纸上后放入100 g/L中性甲醛固定. 免疫组织化学染色: 组织经常规取材处理后, 用PBS(pH7.4)冲洗, 柠檬酸pH6.0抗原修复, 高压锅煮沸, 每张切片加一抗(PGP9.5), 4℃冰箱过夜, 次日PBS冲洗, 加二抗, 室温下孵育30 min, 最后用DAB显色, 苏木素复染. 已知阳性切片作阳性对照.

1.2.3 结果评估: 肉眼观察每张染好的切片, 取肌层纵长10 mm为连续观察范围, 在中倍镜下观察图片至阳性染色区域, 换高倍镜下截取染色阳性面积图片, 每例10个视野后存储图像文件备图像软件分析. 经观察, 神经节数目多少与面积大小无关, 数目很少面积可以很大, 而数目很多面积可能非常小. 因此采用专业图像分析软

■ 研发前沿

目前研究已表明, 针刺治疗慢性便秘途径之一为调节肠神经系统功能, 可能通过调节肠神经元、Cajal间质细胞、各种兴奋性和抑制性脑肠肽类激素、突触功能和神经胶质细胞等起作用, 有待深入探讨.

■名词解释

PGP9.5: 是一种由2450个碱基组成, 包含212个氨基酸的神经元特异性羧基末端水解酶。在研究肠神经系统的形态特征及结构特点中, PGP9.5有良好的表达功能, 可显示阳性神经元形态, 特征性地评价肠神经节细胞功能。

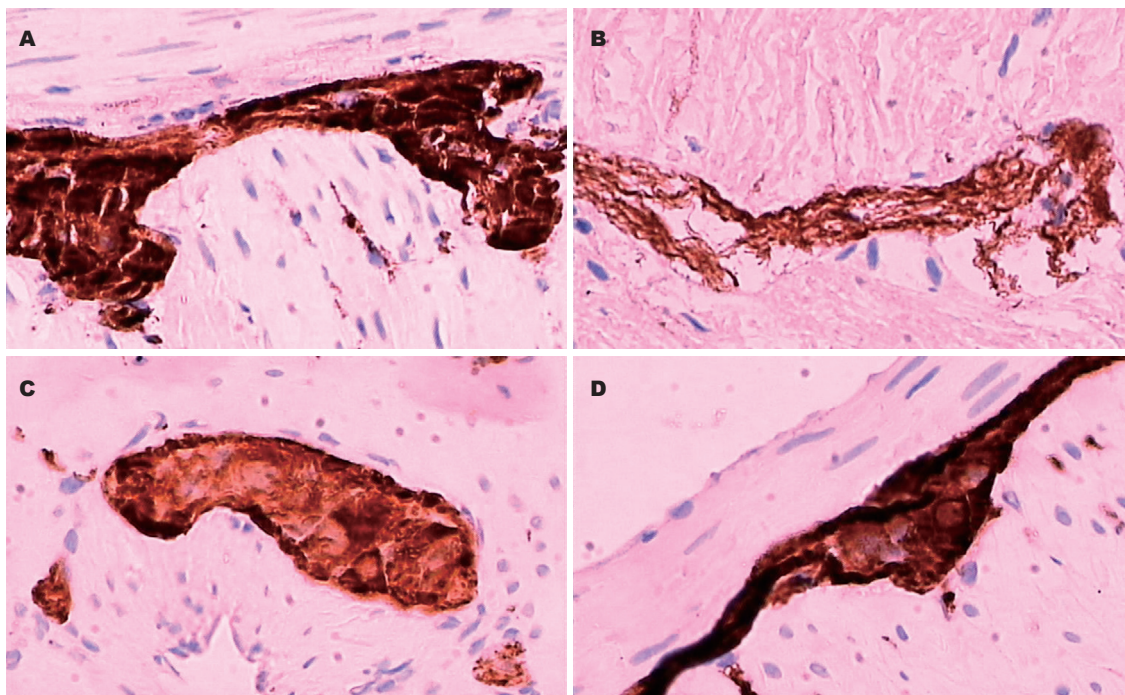


图1 各组大鼠肠肌间神经丛PGP9.5阳性表达($\times 400$)。A: 正常组; B: 治疗前组; C: 空白组; D: 针刺组。

件Image-Pro Plus提供的工具计算综合吸光度值(integrated absorbance, IA), 等于染色阳性面积 \times 平均阳性表达区密度, 此值与目标物质的总量成正比, 反映肠神经系统神经元状况。

统计学处理 用SPSS11.5统计软件进行统计分析。计量数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 各组间比较用方差分析法, 组间比较用LSD法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠结肠PGP免疫表达 正常组大鼠结肠环纵肌间神经丛可见正常神经节细胞, 节细胞阳性表达染色深且分布均匀(图1A)。治疗前组环纵肌纤维增粗, 部分断裂, 排列紊乱, 空泡样改变, 神经节细胞减少, 节细胞阳性表达染色下降(图1B)。空白组环纵肌纤维断裂有修复, 空泡样改变有所恢复(图1C)。针刺组: 环纵肌修复好转, 神经节细胞空泡样改变好转(图1D)。

2.2 各组IA值($\times 10^4$)的比较 正常组IA值与对照组比较有显著差异(47.38 ± 9.04 vs 20.36 ± 9.12 , $P < 0.000$); 空白组(28.51 ± 9.43)与治疗前组比较无统计学差异($P = 0.200$); 针刺组(41.39 ± 19.56), 与治疗前组和空白组比较均有统计学差异($P = 0.021$, 0.002), 与正常组比较无统计学差异($P = 0.297$)。

3 讨论

结肠慢传输性便秘是临床常见的难治性便秘

之一, 西药促肠动力药尽管有一定疗效, 但对心血管系统的不良反应日益引起人们的关注。由于患者长期依赖各种刺激性泻药帮助排便, 对各种药物治疗反应较差, 而针刺治疗临床有效, 日益受到重视。近年来, 对结肠慢传输性便秘的病因病理学研究显示其是“肠神经病”, 即肠神经系统功能及Cajal间质系统的异常^[4]。本课题旨在探讨针刺治疗结肠慢传输性便秘的作用机制是否通过肠神经系统神经元途径调控。

国内外动物便秘模型的制作主要通过口服复方地芬诺酯(止泻药)^[5]、接触性泻剂大黄和酚酞^[6]及阿密曲替林(抗抑郁药)^[7]等造成动物排便次数减少、便干等症状来实现。综观各种模型制作方法, 仅接触性泻剂对肠神经系统的损伤作用进行过系列研究^[8], 发现该方法建立的模型稳定, 且最接近STC模型病理学变化, 是目前研究STC的常用模型^[9]。临床所遇该类患者也长期服用各种刺激性泻剂并形成依赖。因此采用该种泻剂模型作为结肠慢传输性便秘模型来研究针刺作用机制应具有代表性。从本研究观察大黄水煎液灌胃确实可造成大鼠肠神经系统肌间神经系统破坏, 表现为肌肉断裂、空泡和神经元标志物表达下降, 刺激性泻剂灌胃停用后等待自然恢复已不能达到正常状态, 采用针刺后对由泻剂造成的便秘模型大鼠肠神经节功能恢复具有促进作用。

肠神经系统主要分为肌间神经丛和黏膜下神经丛, 神经丛内的肽能神经元是一种以多肽为神经递质的特殊神经元, 众多神经递质参与其中, 对结肠运动的调控起着主要作用. 肠神经系统的功能状态与肠动力是直接相关的. 我们可以通过对其标志物表达的检测来反映其功能状态. PGP9.5是一种由2450个碱基组成, 包含212个氨基酸的神经元特异性羧基末端水解酶, 在研究肠神经系统的形态特征及结构特点中, PGP9.5有良好的表达功能, 可显示阳性神经元形态, 特征性地评价肠神经节细胞的成熟度^[10]. 李瑞午 *et al*^[11]在研究针刺对大鼠胃肠肌间神经丛NO能神经元的影响, 针刺足三里有利于胃肠道功能的恢复. 展淑琴 *et al*^[12]研究电针大鼠足三里穴, 发现脑内P物质的基因表达增加. 曹东元 *et al*^[13]亦通过电刺激大鼠足三里发现结肠SP含量显著增高, 以促进胃肠运动. 目前国内尚没有利用PGP9.5特异性地反映肠神经系统神经节细胞的表达. 其表达与其对结肠动力的影响直接相关. 因此我们采用这一指标根据多组对照比较可以认为针刺有助于改善肠神经系统神经元破坏后神经节细胞的功能, 几乎恢复正常(针刺组与正常对照组比较无统计学意义). 针刺治疗通过调节肠神经系统的神经节细胞功能起效得到证实, 应该对结肠慢传输性便秘的临床治疗提供了一条针对病因治疗的新途径.

4 参考文献

- 1 孙明明, 丁曙晴, 丁义江. 慢性功能性便秘的针灸治疗进展. 结直肠肛门外科杂志 2007; 13: 192-194
- 2 丁曙晴, 丁义江, 王玲玲, 舒琳, 金洵, 蒋亚文. 针灸治疗慢性便秘31例临床疗效分析. 中华中医药学刊 2008; 26: 434-436
- 3 张连阳, 高峰, 童卫东, 张胜本, 黄显凯. 一种大鼠“泻剂结肠”模型的建立. 大肠肛门病外科杂志 1998; 4: 66-68
- 4 Bassotti G, Villanacci V. Slow transit constipation: a functional disorder becomes an enteric neuropathy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4609-4613
- 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 巫全胜, 吴曙光, 赵菊花, 郭科男, 董小君, 钱宁. 大鼠药物依赖性便秘模型的制作. 实验动物科学 2007; 24: 70-72
- 7 Tsusumi K, Kishimoto S, Koshitani O, Kohri H. Amitriptyline-induced constipation in cynomolgus monkeys is beneficial for the evaluation of laxative efficacy. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 657-659
- 8 易宏辉, 柳一红, 李富军. 大黄类泻剂对大鼠结肠肌间、黏膜下神经丛VIP能神经递质的影响. 中国医师杂志 2001; S1: 27-28
- 9 王岚, 彭成. 便秘动物模型的研究进展. 广州中医药大学学报 2007; 24: 174-176
- 10 刘丽, 施诚仁, 张忠德, 李敏, 张文竹. PGP9.5在SD大鼠肠神经节细胞成熟度评价中的作用. 中华小儿外科杂志 2003; 24: 254-257
- 11 李瑞午, 李翠红, 郭莹, 葛文津, 夏立营. 针刺对大鼠胃肠肌间神经丛NO能神经元的影响. 上海针灸杂志 2002; 21: 40-42
- 12 展淑琴, 赵晏, 郭新奎, 王会生. 电针对大鼠脑内P物质基础表达的影响. 山东中医药大学学报 2007; 31: 492-495
- 13 曹东元, 牛汉璋, 赵晏, 杜剑青, 朱忠良. 穴位刺激经初级传入反射引起SP释放. 中国针灸 2001; 21: 623-625

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

■同行评价

本研究设计合理, 方法可行, 结果可信, 有一定的参考价值.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)