

【实验研究】

健脾理气法调节实验性 FD 大鼠神经递质表达的研究

刘蔚雯 福建中医学院药学院(350108) 李冀 王皓宇 柴剑波 黑龙江中医药大学基础医学院(150040)

摘要:目的:观察健脾理气法对功能性消化不良(FD)大鼠胃肠组织神经递质表达的影响,探讨该法治疗 FD 的作用机制。方法:采用大鼠胃电节律失常模型,随机分为 4 组,应用免疫组织化学方法分别检测胃窦及十二指肠组织乙酰胆碱酯酶(AchE)、一氧化氮合酶(NOS)的表达水平。结果:FD 大鼠胃窦及十二指肠组织 AchE 及 NOS 的表达较正常对照组明显减少($P < 0.01$)。枳术饮可显著增加胃窦及十二指肠组织 AchE、NOS 的阳性表达($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论:健脾理气法治疗 FD 的作用机制可能在于调节胃窦及十二指肠神经递质 Ach、NO 的表达水平。

关键词:FD;健脾理气法;AchE;NOS;中医实验医学

doi:10.3969/j.issn.1003-8914.2009.02.007 文章编号:1003-8914(2009)-02-0209-03

Effect of Jianpi Liqi Method on neurotransmitter of Functional Dyspepsia Rats

Liu Weiwen Pharmacy College of Fujian college of TCM,350108,Fuzhou,Fujian,China;

Li Ji, Wang Haoyu Chai Jianbo Base College of Heilongjiang University of TCM,150040,Haerbin,Heilongjiang,China

Abstract: Objective: To investigate the effect of Jianpi Liqi Method on neurotransmitter in rats with functional dyspepsia and its mechanism. Methods: The rat model of electrogastric dysrhythmias was used. All model were divided into 4 groups at random. The distributions of acetylcholine esterase (AchE), nitric oxide synthase (NOS) in the sinus ventriculi and dodecadactylon were observed by immunohistochemistry. Results: Compared with the normal control group, the distributions of AchE and NOS positive nerves decreased significantly ($P < 0.01$) in model group, and increased significantly after treatment by Zhizhu Yin ($P < 0.01 \sim 0.05$). Conclusion: The therapeutic mechanism of Jianpi Liqi Method for functional dyspepsia may regulate the expression of Ach and NO in the sinus ventriculi and dodecadactylon.

Key words: FD; Jianpi Liqi Method; AchE; NOS

功能性消化不良(Functional dyspepsia, FD)是一种病因未明的慢性持续或反复发作的上腹不适或疼痛,并排除与症状有关的器质性病变的一组临床症候群,是常见的胃肠道功能性疾病。近年来研究表明^[1],胃肠动力障碍的病理生理学改变可能是 FD 发病的主要机制,调节胃肠运动的神经递质在其中的作用日益受到人们的重视。健脾理气中药及复方用于治疗 FD 证属脾虚气滞者,取得了较为满意的临床效果^[2,3]。我们以健脾理气法为指导,将枳实、白术以 1:1 比例配伍而成枳术饮。本研究采用隔日禁食喂养法复制实验性 FD 大鼠模型,通过观察枳术饮对 FD 大鼠胃窦及十二指肠组织乙酰胆碱酯酶(acetylcholine esterase, AchE)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)表达的影响,探讨健脾理气法治疗 FD 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 取清洁级雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 170~200g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提

供。

1.1.2 药品及剂量 枳术饮:由枳实、生白术各 50g 组成,常规水提,每 100ml 含生药 100g,置 4℃ 冰箱备用,临用时以蒸馏水配制成每毫升含生药 0.17g 的药液。西沙比利片:浙江昂利康制药有限公司产品,批号:5T1E062。临用时研细以蒸馏水配制成每毫升含生药 8.3mg 的药液。

1.1.3 试剂与仪器 AchE、NOS 抗体:由武汉博士德生物工程有限公司提供。BX-60 型 Olympus 光学显微镜:日本 Olympus 公司。MoticMed6.0 型数码医学图像分析系统:北京科以人图像技术公司。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模及给药 参照文献^[4]复制大鼠胃电节律失常模型。40 只大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,分别为正常对照组、模型对照组、阳性对照组(西沙比利组)、中药治疗组。除正常对照组外,其余 3 组采用不规则饲养方法喂养 4 周,即单日进食,双日禁食,以打乱正常饮食规律,自由饮水,每升饮水中加入 0.1mol/L 盐酸,以破坏胃内酸碱环境。于造模第 15 天开始给药,在保持造模条件不变的情况下,正常对照组

*基金项目:黑龙江省科技厅攻关项目资助(No. GC05C31604)

与模型对照组喂饲蒸馏水;阳性对照组喂饲西沙比利药液,中药治疗组喂饲枳术饮药液,以上各组均以 1ml/100g 体重灌胃,每日 1 次,连续 14d。

1.2.2 标本采集 各组动物于造模及用药结束前 1d (第 28 天),禁食 24h(不禁水、药),第 29 天脱颈处死后,立即剖腹,定位于距幽门胃端、肠端各 0.5cm 处,连同幽门一起取出。沿小弯侧剪开,将标本投入 4% 多聚甲醛液中固定 24h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成 5μm 连续切片。

1.2.3 免疫组织化学染色 以 S-P 法行胃窦及十二指肠组织 AchE、NOS 神经元免疫组织化学染色。具体步骤为:组织切片脱蜡入水;入 3% H₂O₂ 去离子水,室温孵育 10min,以阻断内源性过氧化物酶;EDTA 微波修复、复合消化酶修复抗原;滴加特异性抗体 AchE、NOS,4 过夜孵育,PBS 冲洗,2min × 3 次;滴加羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体,37 孵育 30min,PBS 冲洗,2min × 3 次;DAB 显色,显色后用流水充分

冲洗;苏木素复染,脱水透明,树脂胶封片。

1.2.4 图像分析 取同一染色条件下 AchE、NOS 切片,每张切片于 200 倍光镜下随机选取 5 个视野,观察阳性产物的分布及染色情况,采用病理图像分析系统检测 AchE、NOS 免疫反应阳性产物所占面积的比值(阳性产物面积/统计场总面积),计算阳性面积率(%)。

1.3 统计学方法 统计数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析、t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠胃窦组织 AchE、NOS 表达结果 AchE、NOS 免疫反应阳性产物呈棕黄色沉淀(图 1,2)定量分析表明,模型组 AchE、NOS 阳性面积率明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。西沙比利组及枳术饮组 AchE、NOS 阳性面积率较模型组显著增加 ($P < 0.01 \sim 0.05$) (表 1)。

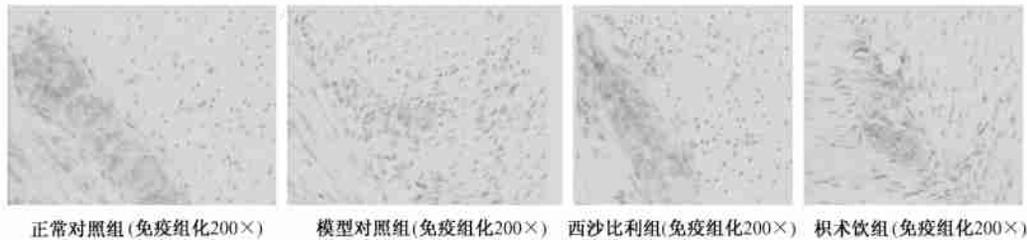


图 1 大鼠胃窦部 AchE 的表达

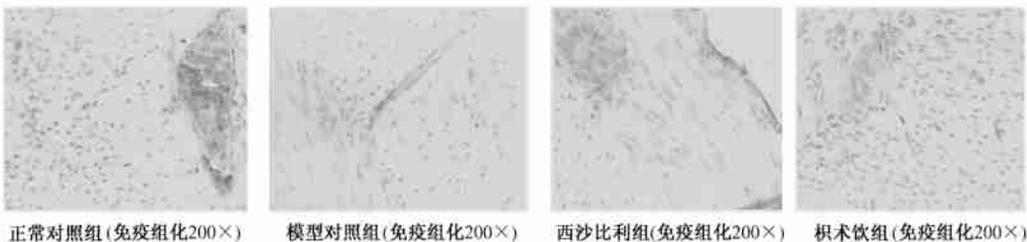


图 2 大鼠胃窦部 NOS 的表达

表 1 枳术饮大鼠胃窦组织 AchE、NOS 阳性面积率比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 g/kg	AchE	NOS
正常对照	—	6.15 ± 1.51 ^{##}	6.18 ± 1.27
模型对照	—	4.28 ± 1.06	3.92 ± 0.97
西沙比利	0.083	6.09 ± 1.42 ^{##}	6.11 ± 1.47 ^{##}
枳术饮	1.7	5.84 ± 1.45 [#]	5.73 ± 1.43 ^{##}

表 2 枳术饮大鼠十二指肠组织 AchE、NOS 阳性面积率比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 g/kg	AchE	NOS
正常对照	—	6.12 ± 1.35 ^{##}	4.81 ± 1.12 ^{##}
模型对照	—	4.23 ± 1.03	2.85 ± 0.71
西沙比利	0.083	6.10 ± 1.28 ^{##}	4.47 ± 1.08 ^{##}
枳术饮	1.7	5.78 ± 1.43 [#]	4.11 ± 0.97 ^{##}

注:与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (下同)。

2.2 对大鼠十二指肠组织 AchE、NOS 表达结果 AchE、NOS 免疫反应阳性产物呈棕黄色沉淀(图 3,4)。定量分析表明,模型组 AchE、NOS 阳性面积率明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。西沙比利组及正常对照组 AchE、NOS 阳性面积率较模型对照组显著增加 ($P < 0.01 \sim 0.05$) (表 2)。

3 讨论

消化道运动主要由肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 调控,ENS 由肠肌间神经丛和粘膜下神经丛构成,作为 ENS 一对主要的神经递质,乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 和一氧化氮 (nitrogen monoxidum, NO) 对胃肠运动的兴奋和抑制起着重要的调节作用。在 ENS 中,胆碱能神经释放经典递质 Ach,为胃肠动力

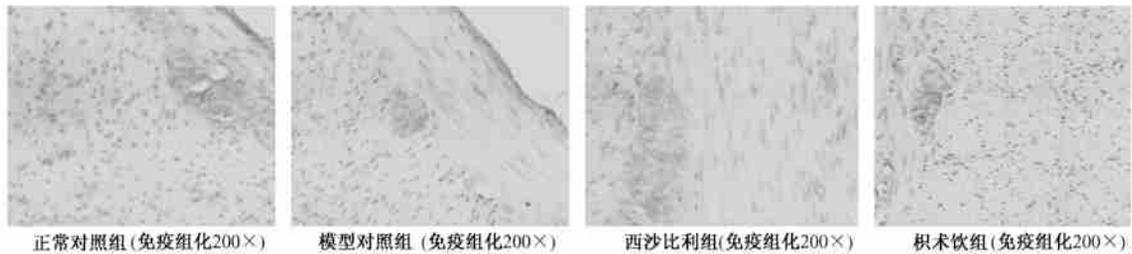


图3 大鼠十二指肠部 AchE 的表达

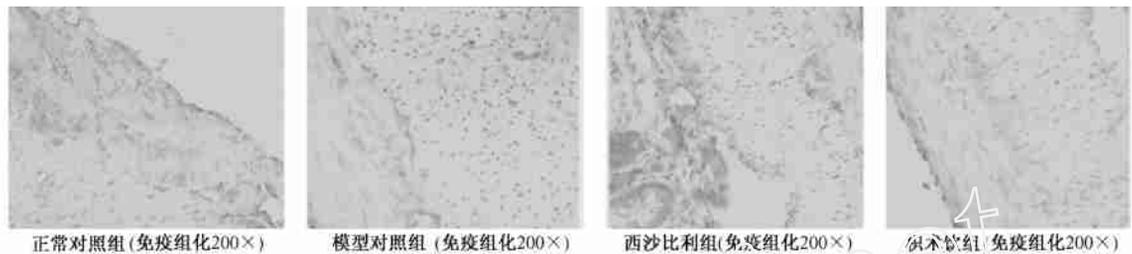


图4 大鼠十二指肠部 NOS 的表达

兴奋性递质,具有促进胃肠蠕动的作用,AchE是Ach的特异性降解酶,与Ach的代谢密切相关,AchE与合成Ach的胆碱乙酰化酶是同时存在的,故通常用 AchE 免疫组化显示作为 Ach 传递部位的标志,在测定含量时,二者呈正相关^[5]。ENS 的神经支配除胆碱能和肾上腺素能神经外,还存在非肾上腺素能非胆碱能(nonadrenergic noncholinergic,NANC)神经,NO 是 NANC 的抑制性神经递质,可引起胃肠道平滑肌松弛。NOS 是 NO 合成的关键酶,研究表明^[6],胃肠道肌间神经丛有较多的 NOS 阳性神经元分布,说明 NO 在调节胃肠运动中的重要地位。NO 合成需要消耗 NOS,NOS 因而减少,在测定含量时,二者呈负相关。本实验中,模型组大鼠胃窦及十二指肠组织 AchE、NOS 阳性神经元表达明显减少,表明 Ach、NO 在胃窦及十二指肠的表达异常可能是 FD 发病的神经生物学基础。张伟刚等研究证实^[7],大鼠胃电节律失常时,胃窦肌间神经丛 AchE 神经含量明显低于正常组,提示 FD 大鼠胃窦部 Ach 含量及活性显著降低。伍氏等研究表明^[8],肝胃不和型 FD 大鼠幽门胃端、肠端 NOS 阳性表达较对照组明显降低,情志舒方可显著升高 FD 大鼠 NOS 的阳性表达,抑制 NO 的过度释放,以改善胃肠动力。上述文献报道与我们的研究结果相一致。

FD 的临床表现具有多样性,根据其脘腹满闷不舒,纳食不馨的主要证候特点,FD 在中医学中属于“痞满”范畴,其证多由饮食不节,脾虚失运,气机阻滞,升降失司所致,治宜健脾和胃,理气消痞之法。遵循“法随证立”、“以法统方”的原则,以枳实、白术组方而成枳术饮。以往的研究显示^[9],枳术饮对小鼠胃肠运动具有显著促进作用。本实验结果表明,经枳术饮治疗后,

FD 大鼠胃窦及十二指肠组织 Ach 阳性表达明显增加,NO 明显减少,表明健脾理气法的疗效机制与调节 ENS 兴奋性和抑制性神经递质的表达有关。该法健脾与行气并施,则补行结合,虚实兼顾,以达补而不滞,消不伤正之目的,本研究从实验角度证实该法消补兼施,标本同治的合理性,故健脾理气消痞法应作为 FD 的主要治法之一,其作用机制可能是通过调节胃窦及十二指肠神经递质的表达,使 Ach 增加,NO 减少,以促进胃肠运动,达到治疗 FD 的目的。

参考文献

- [1] Tack J, Bisschops R, De Marchi B. Cause and treatment of functional dyspepsia[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2001, 3: 503—508.
- [2] 毛秉豫, 黄国锋. 健脾理气中药对功能性消化不良患者胃肠动力及血浆胃动素作用的研究[J]. 新中医, 2003, 35(5): 31—33.
- [3] 陶琳, 张声生, 汪红兵, 等. 健脾理气活血方治疗功能性消化不良临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(7): 11.
- [4] 张勇, 王振华. 大鼠胃电节律失常模型的建立[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(7): 612.
- [5] 伍早安, 李国成, 胡道松. 肝胃不和型功能性消化不良大鼠幽门括约肌乙酰胆碱酯酶及一氧化氮合酶的表达[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2004, 12(1): 9.
- [6] 彭曦, 汪仕良. 一氧化氮与胃肠运动[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(5): 445.
- [7] 张伟刚, 王振华. P 物质对大鼠胃肌电作用的研究[J]. 中华消化杂志, 1999, 19(2): 143.
- [8] 伍早安, 杨军. 肝胃不和型 FD 大鼠幽门括约肌两端神经递质的变化[J]. 实用临床医学, 2003, 17(3): 4.
- [9] 李冀, 刘蔚雯, 肖洪彬, 等. 枳术汤治疗功能性消化不良的配伍研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25: 199—201.

作者简介: 刘蔚雯(1967—), 副教授, 医学博士, 研究方向: 方剂治法与配伍规律研究。

(本文校对: 肖洪彬 收稿日期: 2008-10-22)