

肉苁蓉炮制前后对大鼠肠神经递质及 VIP、SP 表达的影响

范亚楠 王 佳 贾天柱 拉斯卡 史 辑

摘 要 **目的** 研究肉苁蓉炮制前后对正常大鼠润肠通便作用。**方法** 将 SD 大鼠灌胃给予相对应的供试品溶液,观察大鼠胃肠激素和肠神经递质等指标,比较各组结肠病理切片变化情况以及结肠组织中 P 物质(SP)和血管活性肠肽(VIP)的分布和含量的变化。**结果** 与正常对照组比较,各治疗组血清中 AchE 显著升高 ($P < 0.01$),ET-1、NO 有下降的趋势。与正常对照组比较,各治疗组结肠组织中 5-HT 显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),AQP3 显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。从结肠的病理切片图可以看出,生肉苁蓉水提高剂量组和阳性药对照组接近于正常组,其余治疗组比较,差异无统计学意义。对正常大鼠结肠组织中 VIP、SP 免疫组化定性表达的数据中可以发现,与正常对照组比较,各治疗组 SP 显著升高 ($P < 0.01$),VIP 有上升的趋势。与制品粉末低剂量组比较,生品水提组、生品粉末组 SP、VIP 显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且生品组均好于制品组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),水提组好于粉末组,不同剂量组比较,高剂量组好于低剂量组。**结论** 肉苁蓉炮制前后对正常大鼠具有不同程度的润肠通便作用,其中生品的通便作用好于制品,旨在为临床合理使用肉苁蓉生制品提供一定依据。

关键词 肉苁蓉 肠神经递质 炮制 通便 免疫组化

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.014

Effects of Cistanche Before and After Processing on Intestinal Neurotransmitters Of Rats and the Expression of VIP, SP. Fan Yanan, Wang Jia, Jia Tianzhu, et al. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning 116600, China

Abstract **Objective** To investigate the laxative effect of Cistanche before and after processing. **Methods** SD rats were filled to give corresponding test solution, to observe the gastrointestinal hormones and neurotransmitters, as well as the change of content and colon tissue of substance P (SP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) in the distribution. **Results** Compared with normal group, the AchE of treatment group significantly increased in serum ($P < 0.01$), ET-1 and NO have a tendency to decline. Compared with normal control group, the 5-HT of treatment group significantly increased in colon tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and AQP3 drops significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$). It can be seen from the colon pathological section diagram, the water high dosage of group and positive medicine group were better than normal group, the treatment group was no significant difference. We can find that colon tissues of normal rats in the VIP, SP immunohistochemical expression of qualitative data, compared with normal control group, the SP of treatment group significantly increased ($P < 0.01$), VIP had a tendency to rise. Compared with products powder low dose of group, raw water extraction group, raw powder group of SP and VIP increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And raw product group was better than the products group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), water extraction was better than powder group, from the different dose groups, high dose group was better than low dose group. **Conclusion** Cistanche before and after processing of normal rats had different degree of laxative action, which will provide a scientific basis for clinical rational use of Cistanche.

Key words Cistanches herba; Gastro-intestinal neurotransmitter; Processing; Laxative; Immunohistochemical

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉(*Cistanche desertico-*

la Y. C. Ma)或管花肉苁蓉[*C. tubulosa* (Schenk) Wight]的干燥带鳞叶的肉质茎,性温、味甘咸,归肾、大肠经,有沙漠人参之称^[1,2]。具有补肾壮阳、润肠通便和抗衰老等作用^[3~5]。中医上讲便秘是脾胃失衡的一种表现,与胃肠动力学关系紧密。肉苁蓉是润肠通便的药物,临床主要用于老年性便秘等虚弱型患者通便治疗。本课题组之前探讨过肉苁蓉不同炮制品对便秘大鼠通便作用的差异,为了验证润肠通便的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81473350);国家自然科学基金青年基金资助项目(81001635);辽宁省自然科学基金资助项目(201602490)

作者单位:116600 大连,辽宁中医药大学药学院(范亚楠、贾天柱、史辑);116600 大连,国家中医药管理局炮制原理解析重点实验室(王佳、贾天柱、史辑);116600 大连,辽宁省中药炮制工程技术研究中心(贾天柱、拉斯卡、史辑)

通讯作者:史辑,副教授,硕士生导师,电子信箱:lnshiji@163.com

作用,明确其作用机制,笔者应用 ELISA 法和免疫组化法对大鼠进行了实验研究,为临床合理使用肉苁蓉生制品提供科学依据。

材料与方法

1. 实验动物:SD 大鼠,体质量 180 ~ 220g, SPF 级,均由辽宁长生生物技术有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(辽)2015 - 0001。

(2) 药物与试剂:肉苁蓉购自内蒙古王爷地有限公司,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为列当科植物肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma)的干燥带鳞叶的肉质茎;每组受试物的配制方法为,生肉苁蓉水提物:生品肉苁蓉蒸 2h,切 6mm 厚片,70℃ 烘干。取肉苁蓉片水提 3 次,合并水煎液浓缩到一定浓度即可。制肉苁蓉水提物:取生肉苁蓉加黄酒浸泡 8h,加乙醇量为 1:1,蒸 16h,切 6mm 厚片,70℃ 烘干。取酒制肉苁蓉片水提 3 次,合并水煎液浓缩到一定浓度即可。生肉苁蓉粉末:生品肉苁蓉蒸 2h,切 6mm 厚片,70℃ 烘干。取肉苁蓉片粉碎成粉末,过 60 目筛,加一定量的水制成一定浓度的药液。制肉苁蓉粉末:取生肉苁蓉加黄酒浸泡 8h,加乙醇量为 1:1,蒸 16h,切 6mm 厚片,70℃ 烘干。取酒制肉苁蓉片粉碎成粉末,过 60 目筛,加一定量的水制成一定浓度的药液。通便灵胶囊(济南利蒙制药有限公司,批号:12090202);内皮素-1(ET-1)试剂盒(批号:BPE30591);乙酰胆碱酯酶(AchE)试剂盒(批号:BPE30063);水通道蛋白 3(AQP3)试剂盒(批号:BPE30361);5-羟色胺(5-HT)试剂盒(批号:BPE30326);一氧化氮(NO)试剂盒(批号:BPE10868);均由上海朗顿生物技术有限公司提供;其余试剂为分析纯。(3) 实验仪器:酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);石蜡切片机(莱卡);TGL-16C 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);奥林巴斯 BX53 显微镜;电子天平(上海友声衡器有限公司);涡旋混合器(上海青浦沪西仪器厂);恒温恒湿箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2. 实验方法:(1) 分组:取 SD 大鼠,适应性喂养 1 周后,随机分成 10 组,每组 8 只,分别为正常对照组、阳性药对照组、生肉苁蓉水提高剂量组(生水高)、生肉苁蓉水提低剂量组(生水低)、制肉苁蓉水提高剂量组(制水高)、制肉苁蓉水提低剂量组(制水低)、生肉苁蓉粉末高剂量组(生粉高)、生肉苁蓉粉末低剂量组(生粉低)、制肉苁蓉粉末高剂量组(制粉高)、制肉苁蓉粉末低剂量组(制粉低)。取正常大鼠,除正

常对照组外,其余各组大鼠按 1ml/100g 体质量的剂量上午灌胃给予相对应的供试品溶液,连续 8 天,正常对照组同法同量灌胃生理盐水。(2) 样本的采集与检测:所有大鼠分别于末次给药后禁食不禁水 24h,腹主动脉取血,静置 30min 后,4℃ 3000r/min 离心 20min,收集血清,取上清测定,-70℃ 低温保存。剖取回盲瓣 2cm 后的结肠组织 2cm,用生理盐水冲净内容物,滤纸吸干,加入适量的 PBS(pH7.4),4℃ 3500r/min 离心 15min,取上清待测,-70℃ 低温保存。血清 AchE、ET-1、NO 和结肠组织 5-HT、AQP3 的测定均按照试剂盒说明书进行。取回盲部以下结肠组织 2cm 浸入 10% 甲醛,根据病理切片及免疫组化步骤石蜡包埋、切片、染色,观察结肠病理切片及结肠组织中 P 物质(SP)和血管活性肠肽(VIP)的分布和含量的变化。

3. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异进行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果与分析

1. 各组大鼠血清中 ET-1、AchE、NO 含量的比较:与正常对照组比较,各治疗组 AchE 显著升高($P < 0.01$),ET-1、NO 有下降的趋势。与制品粉末低剂量组比较,生品粉末低剂量组 AchE 有降低的趋势,ET-1、NO 有升高的趋势。与生品水提高剂量组比较,生品水提低剂量组 ET-1、NO 有升高的趋势,AchE 有降低的趋势,不同剂量组比较,各组均是高剂量组为佳,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。且同剂量生品水提组与粉末组比较,生品水提组 AchE 有升高的趋势,ET-1、NO 有下降的趋势,生品水提组好于生品粉末组。且同剂量生品水提组与制品水提组比较,生品水提组 AchE 有升高的趋势,ET-1、NO 有下降的趋势,生品水提组治疗效果好于制品水提组,详见表 1。

(2) 各组大鼠结肠组织中 AQP3、5-HT 含量的比较:与正常对照组比较,各治疗组 5-HT 显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),AQP3 显著下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与制品粉末低剂量组比较,生品粉末低剂量组 AQP3 显著下降($P < 0.05$),5-HT 有升高的趋势。与生品水提高剂量组比较,生品水提低剂量组 AQP3 有升高的趋势,5-HT 有降低的趋势,不同剂量组比较,各组均是高剂量组为佳,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。且同剂量生品水提组与粉末组比较,生品水提组 5-HT 有升高的趋势,AQP3 有下降的趋势,表明生品水提组好于生品粉末组。且同剂量

表 1 各组大鼠血中 ET-1、NO、AchE 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	剂量(g/kg)	ET-1 (ng/L)	AchE (ng/L)	NO(μmol/L)
正常对照组	8	—	137.09 ± 6.53	2.68 ± 0.46	44.55 ± 6.23
阳性药对照组	8	0.5	134.96 ± 6.79	3.39 ± 0.16 ^{**#}	32.42 ± 9.89 ^{***#}
生水高组	8	5.48	116.56 ± 25.38	3.39 ± 0.16 ^{**#}	38.02 ± 13.67
生水低组	8	1.37	121.90 ± 14.26	3.33 ± 0.08 ^{**}	39.24 ± 11.26
制水高组	8	5.48	127.64 ± 20.29	3.22 ± 0.33 ^{**}	39.18 ± 7.03
制水低组	8	1.37	135.18 ± 31.74	3.17 ± 0.32 ^{**}	39.00 ± 9.64
生粉高组	8	5.48	119.44 ± 22.29	3.28 ± 0.68 ^{**}	38.11 ± 6.94
生粉低组	8	1.37	122.27 ± 20.79	3.14 ± 0.30 ^{**}	41.54 ± 6.70
制粉高组	8	5.48	128.90 ± 9.54	3.15 ± 0.22 ^{**}	42.74 ± 4.35
制粉低组	8	1.37	136.96 ± 10.21	3.00 ± 0.14	43.70 ± 6.61

与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与制粉低组比较, # $P < 0.05$

生品水提组与制品水提组比较,生品水提组 5-HT 有升高的趋势,AQP3 有下降的趋势,生品水提组治疗效果好于制品水提组,详见表 2。

3. 结肠病理切片结果:正常组结肠黏膜层,单层柱状上皮细胞排列整齐,可见到大量吸收细胞与杯状细胞,黏膜下层可见小动脉、静脉及淋巴管,肌层薄厚均匀无异常改变(图 1)。与正常组比较,对照组与生水高组两组结肠形态、结构都很正常,可见黏膜层单层柱状上皮细胞,吸收细胞与杯状细胞排列较整齐,黏膜下层仍可见小动脉、静脉及淋巴管,肌层薄厚均匀无异常改变,黏膜肌层薄厚较均匀,该两组治疗结果接近于正常组。生水低组、制水高、制水低组、生粉高、生粉低组 5 组结肠形态、结构均属正常,黏膜层单层柱状上皮细胞,收细胞与杯状细胞,种细胞的活跃性差点,黏膜下层,黏膜肌层薄厚均匀,形态、结构没有改变。制粉高组、制粉低组较之正常组在镜下观察两组未见形态、结构明显改变,只是黏膜层单层柱状

上皮细胞,收细胞与杯状细胞变矮,活跃性差,黏膜下层未见浸润的炎性细胞,黏膜肌层薄厚仍较均匀、较排列较整齐。

表 2 各组大鼠结肠组织中 AQP3、5-HT 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	剂量(g/kg)	AQP3 (ng/ml)	5-HT (ng/ml)
正常对照组	8	—	4.90 ± 0.72 [#]	93.39 ± 12.28
阳性药对照组	8	0.5	4.64 ± 0.66	142.50 ± 21.31 ^{***#}
生水高组	8	5.48	3.20 ± 0.62 ^{***#}	128.33 ± 15.29 ^{***#}
生水低组	8	1.37	3.55 ± 0.79 ^{**}	125.27 ± 21.08 ^{***#}
制水高组	8	5.48	3.68 ± 0.58 ^{**}	118.09 ± 15.14 ^{***#}
制水低组	8	1.37	3.50 ± 0.81 ^{**}	109.05 ± 14.12
生粉高组	8	5.48	3.32 ± 0.65 ^{***#}	127.24 ± 10.74 ^{***##Δ}
生粉低组	8	1.37	3.35 ± 0.94 ^{***#}	113.41 ± 9.78 [*]
制粉高组	8	5.48	3.93 ± 0.23 ^{**}	101.32 ± 34.31
制粉低组	8	1.37	4.15 ± 0.56 [*]	96.47 ± 10.83

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与制粉低组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与制粉高组比较, Δ $P < 0.01$

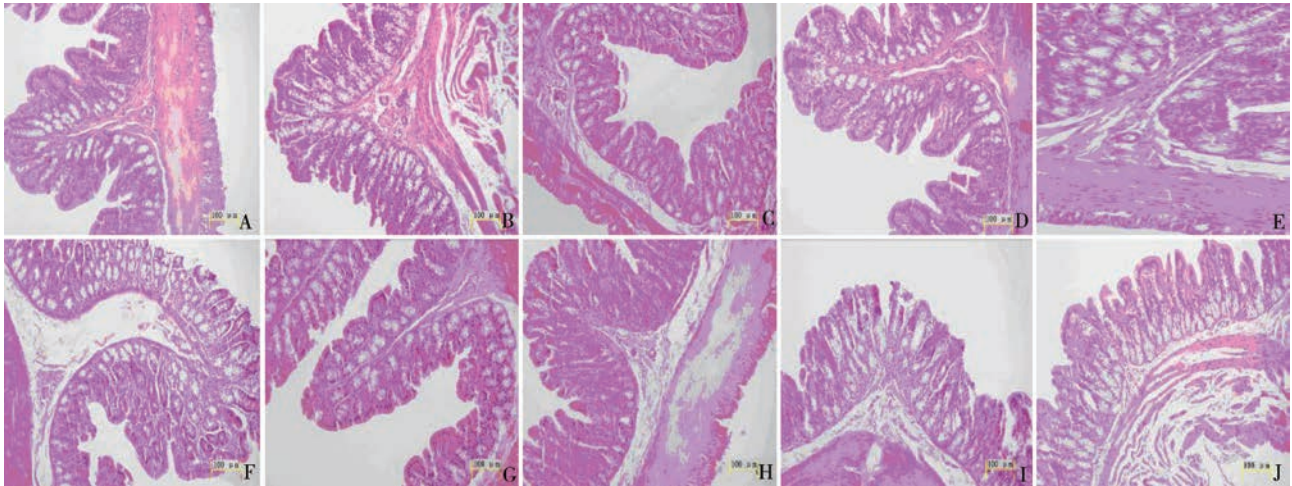


图 1 肉苁蓉对正常大鼠脾脏组织的影响(HE, ×20)

A. 正常对照组;B. 阳性对照组;C. 生品水提高剂量组;D. 生品水提低剂量组;E. 制品水提高剂量组;F. 制品水提低剂量组;G. 生品粉末高剂量组;H. 生品粉末低剂量组;I. 制品粉末高剂量组;J. 制品粉末低剂量组

4. 对正常大鼠结肠组织中 VIP、SP 免疫组化定性表达的影响:所有切片中均可见多少不等的 SP 和 VIP 阳性表达的细胞,阳性细胞多呈圆形或椭圆形,细胞中有棕黄色颗粒。与正常组比,的细胞较少,分

布稀疏。与正常组比较,各治疗组大鼠结肠组织中 SP 和 VIP 阳性表达细胞分布相对较密集,其中,阳性药对照组、生品水提高剂量组的 SP 和 VIP 阳性表达(图 2、图 3)。

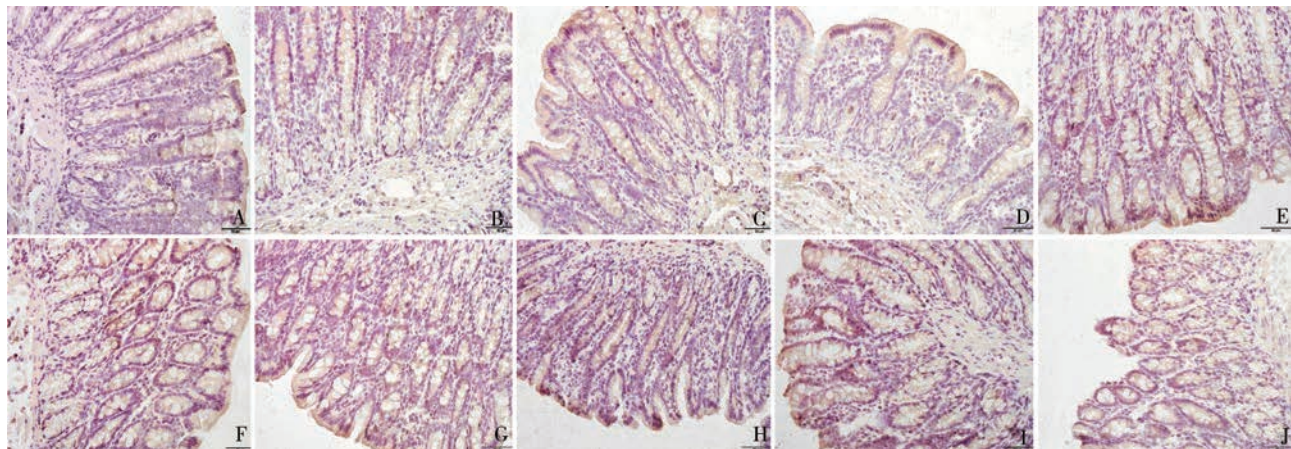


图 2 肉苁蓉对正常大鼠结肠组织中 SP 表达的影响(免疫组化, $\times 40$)

A. 正常对照组;B. 阳性对照组;C. 生品水提高剂量组;D. 生品水提低剂量组;E. 制品水提高剂量组;F. 制品水提低剂量组;G. 生品粉末高剂量组;H. 生品粉末低剂量组;I. 制品粉末高剂量组;J. 制品粉末低剂量组

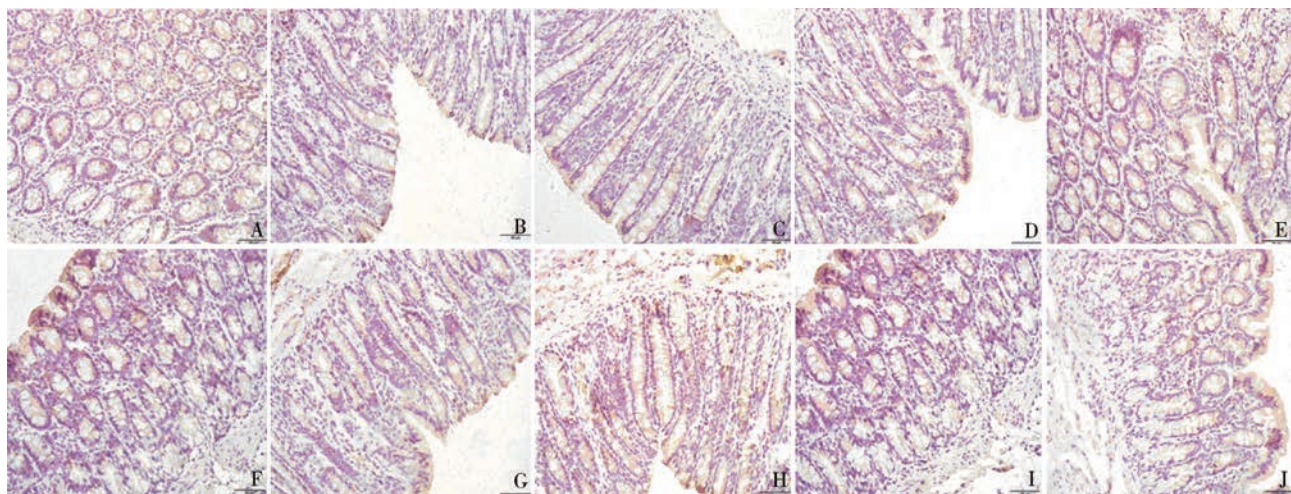


图 3 肉苁蓉对正常大鼠结肠组织中 VIP 表达的影响(免疫组化, $\times 40$)

A. 正常对照组;B. 阳性对照组;C. 生品水提高剂量组;D. 生品水提低剂量组;E. 制品水提高剂量组;F. 制品水提低剂量组;G. 生品粉末高剂量组;H. 生品粉末低剂量组;I. 制品粉末高剂量组;J. 制品粉末低剂量组

5. 大鼠结肠 SP、VIP 阳性细胞:与正常对照组比较,各治疗组 SP 显著升高 ($P < 0.01$),VIP 有上升的趋势。与制品粉末低剂量组比较,生品粉末低剂量组 VIP 显著升高 ($P < 0.01$),SP 有升高的趋势。与生品水提高剂量组比较,生品水提低剂量组 VIP、SP 有降低的趋势,不同剂量组比较,各组均是高剂量组为佳,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。且同剂量生品水提组与粉末组比较,生品水提组 SP、VIP 显著升高 (P

< 0.05 , $P < 0.01$),生品水提组好于生品粉末组。且同剂量生品水提组与制品水提组比较,生品水提组 SP、VIP 显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),生品水提组治疗效果好于制品水提组,详见表 3。

讨 论

便秘的发病机制及原因至今还未明确,多种原因都可引起便秘的产生,如饮食因素、遗传因素、精神心理因素等,这些因素中,胃肠动力学障碍占有主导地位

表 3 各组大鼠 SP、VIP 平均光密度值的比较
($\times 10^4 \mu\text{m}^2, \bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (<i>n</i>)	剂量 (g/kg)	VIP (ng/L)	SP (ng/L)
正常对照组	8	—	0.324 ± 0.020 ^{##}	0.253 ± 0.035
阳性药对照组	8	0.5	0.337 ± 0.020 ^{##}	0.304 ± 0.045 ^{***}
生水高组	8	5.48	0.364 ± 0.051 ^{##}	0.302 ± 0.041 ^{***}
生水低组	8	1.37	0.312 ± 0.064 ^{##}	0.260 ± 0.038 [#]
制水高组	8	5.48	0.273 ± 0.028 ^{*ΔΔ}	0.238 ± 0.038 ^{ΔΔ}
制水低组	8	1.37	0.260 ± 0.057 ^{**▲}	0.227 ± 0.016
生粉高组	8	5.48	0.308 ± 0.040 ^{##Δ}	0.231 ± 0.028 ^Δ
生粉低组	8	1.37	0.306 ± 0.079 ^{##}	0.228 ± 0.015
制粉高组	8	5.48	0.257 ± 0.012 ^{**\$}	0.226 ± 0.029
制粉低组	8	1.37	0.229 ± 0.039 ^{**}	0.221 ± 0.029

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与制粉低组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与生水高组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$; 与生水低组比较, [▲] $P < 0.05$; 与生粉高组比较, ^{\$} $P < 0.05$

位^[6]。现代中医认为,胃肠动力学障碍与胃肠激素、胃肠道-神经肌肉调控系统、内脏高敏感状态、胃肠道炎症、免疫因素等多种因素相关,其主要基础为小肠传输功能障碍及胃排空延迟,胃排空可直接反映出胃肠系统的功能^[7-9]。胃肠动力学异常与神经递质水平及特定的胃肠激素有关^[10]。SP、VIP、5-HT 和 NO 是重要的调节肠道功能的肠神经递质指标^[11]。通过实验发现,VIP 具有降低血压、扩张血管的功效,且能促进肠液的分泌,抑制胃液的分泌和消化道平滑肌的收缩^[12]。近几年,大量实验说明了 5-HT 与感觉异常和肠道动力有关^[13-15]。

本研究选取这些指标均能调节通便泻下作用,通过本实验可以看出,与正常对照组比较,各治疗组血清中 AchE 显著升高 ($P < 0.01$),ET-1、NO 有下降的趋势。与正常对照组比较,各治疗组结肠组织中 5-HT 显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),AQP3 显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。从结肠的病理切片图可以看出,生肉苁蓉水提高剂量组和阳性药对照组接近正常组,其余治疗组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对正常大鼠结肠组织中 VIP、SP 免疫组化定性表达的数据中可以发现,与正常对照组比较,各治疗组 SP 显著升高 ($P < 0.01$),VIP 有上升的趋势。与制品粉末

低剂量组比较,生品水提组、生品粉末组 SP、VIP 显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。且生品组均好于制品组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),水提组好于粉末组,不同剂量组比较,高剂量组好于低剂量组。此实验结果验证了生品润肠通便的作用更佳,为临床合理使用肉苁蓉生制品提供一定依据。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 I 部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:126
- 2 钟平. 沙漠人肉苁蓉[J]. 森林与人类, 2004,24(11):25
- 3 吴晓春,史颖. 肉苁蓉的研究与临床应用[J]. 甘肃中医,2007,20(12):49-51
- 4 宋志宏,雷丽,屠鹏飞. 肉苁蓉属植物的药理活性研究进展[J]. 中草药,2003,34(9):16-18
- 5 薛德钧,章明,詹永成,等. 肉苁蓉抗衰老活性成分的研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(11):687-704
- 6 Ferrara A, Pemberton JH, Grotz RL, et al. Prolonged ambulatory recording of an rectal motility in patents with slow-transit constipation[J]. Am J Surg,1994,167(4):7379
- 7 邢建峰,封卫毅,侯家玉. 小鼠胃排空及小肠推进实验方法的探讨[J]. 中医药实验研究,2003,26(4):50
- 8 Van Oudenhove L, Vandenbergh J, Geeraers B, et al. Relationship between anxiety and gastric sensor motor function in functional dyspepsia[J]. Psychosom Med,2007,69(5):455
- 9 刘劲松,侯晓华,柯美云. 第六届全国胃肠动力学术会议纪要[J]. 中华消化杂志,2006,26(1):62
- 10 Bharucha AE, Camilleri M, Low P A, et al. Autonomic dysfunction in gastrointestinal motility disorder[J]. Gut,1993,34(6):397
- 11 王梅,吕宾,范一宏,等. 刺激性泻剂对大鼠结肠肌间神经丛超微结构的影响[J]. 基础医学与临床,2005,25(4):434-436
- 12 Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune function[J]. Amino Acids,2011,1007(11):1184-1188
- 13 张卫平,江滨. 五羟色胺与慢性便秘[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(24):2551-2554
- 14 Kim YS, Choi SC, Park JM, et al. The effect of tegaserod on symptoms and quality of life in Korean women with irritable bowel syndrome with constipation[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2010,16(6):61-70
- 15 Camilleri M. Serotonin in the gastrointestinal tract[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes,2009,16(5):53-59

(收稿日期:2016-10-10)

(修回日期:2016-11-01)