

温中健脾方对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠粘膜肥大细胞的影响^{*}

★ 徐海珍^{**} 谢建群^{***} 施斌 张涛 (上海中医药大学附属龙华医院 上海 200032)

摘要:目的:从大鼠结肠粘膜肥大细胞(MC)的变化探讨温中健脾方治疗腹泻型肠易激综合征(IBS)的作用机理。方法:雄性 Wistar 大鼠 48 只,按体重随机分为正常组、模型组、温中健脾方组和得舒特组,每组 12 只。用番泻叶+束缚应激刺激造成腹泻型 IBS 动物模型,正常组和模型组给予高压消毒的饮用水灌胃,其余两组分别给予温中健脾方煎剂和得舒特水溶液灌胃进行治疗。治疗结束后处死动物,取结肠粘膜固定,制作石蜡切片,采用改良的甲苯胺蓝染色法进行 MC 染色,利用上海求为生物科技有限公司 MIQAS 医学图像定量分析系统及医学图像定量分析软件进行 MC 计数,并测量 MC 面积、周长、圆度及等效直径。结果:与正常组比较,各组大鼠结肠粘膜 MC 数目明显增多,大鼠结肠粘膜 MC 面积增大、周长增加、圆度变小、等效直径增大;与模型组比较,中药组和西药组大鼠结肠粘膜的 MC 面积明显减小、周长缩短、圆度有所增大、等效直径减小,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组及西药组比较上述各指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:温中健脾方可以减少腹泻型 IBS 大鼠结肠粘膜的 MC 数目,并能抑制 MC 活化脱颗粒,这可能是中药治疗 IBS 的作用机制之一。

关键词:温中健脾;腹泻型肠易激综合征;肥大细胞

中图分类号:R 285 **文献标识码:**A

The Effects of Wenzhongjianpi Decoction on the Mast Cell in the Colon Mucosa of Rats with Diarrhea Irritable Bowel Syndrome

XU Hai-zhen, XIE Jian-qun, SHI Bin, ZHANG Tao

Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032

Abstracts: Objective: To probe the effects of Wenzhongjianpi Decoction on the mast cell (MC) in the colon mucosa of rats with diarrhea irritable bowel syndrome (IBS). Methods: Forty-five male wistar rats were randomly divided into 4 groups: normal group (NG), model group (MG), Wenzhongjianpi group (WG) and Dicetel group (DG). The diarrhea IBS model was made by Fanxieye and bondage stress stimulus. The MCs were stained by toluidine blue, the population, area, perimeter, cyclo-dimension and equivalent diameter of the MCs were determined by quantified analysis system. Results: Compared with the NG, the population, area, perimeter and equivalent diameter of the MCs were significantly increased and the cyclo-dimension was decreased in MG, WG and DG. Compared with MG, the population, area, perimeter and equivalent diameter of the MCs were significantly decreased and the cyclo-dimension was increased in WG and DG. There were no significant differences between the WG and the DG. Conclusion: The Wenzhongjianpi decoction can reduce the number of the mucosal MCs in the diarrhea IBS rats, and can inhibit the activation and degranulation of the MC, which may be one of the actions mechanisms of Chinese herbs using to treat IBS.

Key words: Warming the middle-jiao and strengthening the spleen; Diarrhea irritable bowel syndrome; Mast cell

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)属于胃肠功能紊乱性疾病的一种,临床以腹痛、腹胀伴肠道习惯的改变(腹泻、便秘或腹泻便秘交替)为特征,症状持续存在或间歇

发作,但缺乏形态学和生化异常改变,其发病机制尚不清楚,目前多认为胃肠动力异常和内脏感觉异常是 IBS 症状发生的主要病理生理学基础。随着“免疫-神经-内分泌网络”

^{*} 基金项目:上海市科学技术委员会课题(No.044119643)

^{**} 作者简介:徐海珍(1977-),女,主治医师,青海人,上海中医药大学 05 级博士研究生,研究方向:中医药治疗消化系统疾病的临床和实验研究。

^{***} 通讯作者:谢建群,教授,博士生导师,Email: xiejianqun530305@yahoo.com.cn

理论的提出,逐渐认识到免疫系统与神经系统之间存在直接的双向交流,作为免疫系统中的重要细胞成分之一,肥大细胞(mast cell, MC)在这两个系统的信息传递中可能起着重要作用,研究证实,MC参与肠粘膜的免疫调节,受炎症等因素刺激激活后,可分泌多种介质如组胺、5-羟色胺、白细胞介素以及各种神经肽等,作用于末梢神经和组织中的内分泌细胞产生一系列临床症状^[1],因此推测广泛分布于肠道粘膜和粘膜下层的MC很有可能是神经和免疫因素诱发IBS的一个中心环节。本研究通过测定腹泻型IBS大鼠结肠粘膜MC数目,并测量MC面积、周长、圆度及等效直径等,旨在探讨MC在IBS发病中的作用,进一步研究温中健脾方治疗IBS的作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级雄性WISTAR大鼠共48只,体重(200±5)g,由上海中医药大学动物试验中心提供。冰乙酸、甲苯胺蓝及无水乙醇购自上海国药集团,温中健脾方(炮姜、柴胡、陈皮、白芍、防风等)购自上海众益达药房,得舒特(法国苏威制药)购自上海汇丰大药房中山南二路店。

1.2 动物分组 雄性Wista大鼠适应性饲养3d后称重,随机分为正常组、模型组、中药组及西药组,每组12只(分组时考虑体重情况,以保证试验前各组大鼠体重比较无显著性差异)。

1.3 实验方法 实验分为两个阶段,周期各2周,实验过程中自由进水。第一阶段:正常组用高压消毒的饮用水2 ml/只灌胃;模型、中药、西药组大鼠用番泻叶浸液(0.3 g/ml)2 ml/只灌胃;第二阶段:正常组大鼠饮用水灌胃后归笼,其余组大鼠灌胃1h后,参照Williams^[1]方法略作改变,用宽透明胶带束缚其肩部、前肢及胸部,限制大鼠用前肢搔抓头部,但不限制其活动,束缚时间为1h,之后中药组用温中健脾方水煎浓缩液2 ml/只干预,西药组用得舒特水溶液2 ml/只灌

胃干预,为使受试条件尽量一致,模型组大鼠束缚后用饮用水2 ml/只灌胃,共持续2周。实验结束前一天,大鼠禁食不禁水,次日用3%戊巴比妥腹腔注射麻醉,在距肛门口1.5 cm处取结肠组织,10%中性甲醛溶液固定24h后石蜡包埋,连续切片,厚度为4 μm。

MC用改良的甲苯胺蓝染色法进行染色^[2]。

1.4 图像分析及统计 图像分析系统采用上海求为生物科技有限公司MIQAS医学图像定量分析及医学图像定量分析软件进行分析,采用JVC TK-C1481BEC彩色摄像机及OLYMPUS BH2生物显微镜系统计数每个视野中的MC数目,并测量MC面积、周长、圆度及等效直径。每张切片至少分析3个视野,每组数据至少10个。

所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS11.0 for windows进行统计分析,组间比较用*t*检, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠结肠粘膜HE染色结果 结肠粘膜完整,中药和西药组有两只大鼠结肠粘膜HE染色可见粘膜下层轻度血管扩张,未见粘膜器质性损害及炎性细胞浸润。

2.2 大鼠结肠粘膜甲苯胺蓝染色结果 光镜(×200)下观察见MC胞浆被染成紫红色,胞核呈蓝色,散布于粘膜层和粘膜下层的小血管周围,细胞呈圆形或梭形或形状不规则,紫红色颗粒围绕细胞核散在分布或呈不规则形状,其中脱颗粒者胞膜破裂,有颗粒涌出,细胞不规则;未脱颗粒者胞膜完整,胞质均匀。

2.3 图像分析结果 采用JVC TK-C1481BEC彩色摄像机及OLYMPUS BH2生物显微镜系统计数MC每张切片随机选3个高倍视野(×400),计数MC总数(MC计数以平均每高倍视野的MC个数表示),并测量MC面积、周长、圆度及等效直径(结果见表1)。

表1 各组间大鼠结肠粘膜MC的比较

	MC计数/个	MC面积/μm ²	MC周长/μm	MC圆度	MC等效直径/μm
正常组	0.889±0.323	86.32±20.09	35.57±3.53	0.847±0.043	13.11±1.376
模型组	2.056±1.11***	93.05±14.21	39.18±2.78**	0.762±0.082***	15.094±1.592***
中药组	1.333±0.485**▲	76.21±21.61▲▲	33.81±4.14▲▲▲	0.819±0.059▲	12.542±1.731▲▲▲
西药组	1.267±0.046**▲	77.17±25.24▲	33.40±5.77▲▲▲	0.849±0.032▲▲▲	12.322±2.309▲▲▲

注:与正常组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$,▲▲▲ $P < 0.001$ 。

结果显示,与正常组比较各组大鼠结肠粘膜MC数目明显增多,以模型组增多尤为明显,中药组及西药组有所下降,但尚未接近正常组水平;与正常组比较,模型组、中药组和西药组大鼠结肠粘膜MC面积增大、周长增加、圆度变小、等效直径增大,而与模型组比较,中药组和西药组大鼠结肠粘膜的MC面积明显减小,周长缩短,圆度有所增大,等效直径减小,差异有统计学意义;中药组与西药组间上述各指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$)

3 讨论

随着“免疫-神经-内分泌网络”理论的提出,人们逐渐认识到免疫系统与神经系统之间存在直接的双向交流,作为免疫系统中的重要细胞成分之一,MC在这两个系统的信息

传递中可能起着重要作用,而且MC及其活化程度与IBS症状的发生和严重程度呈一定程度的相关性^[3]。目前认为以感觉异常和动力改变为特征的内脏高敏感性是IBS的主要发病机制,MC、P物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)可能在这一病理生理机制中起重要作用^[1]。Hiatt和Katz早在1962年就在IBS患者的肌间神经丛中发现了MC^[4]。近年来研究发现,MC与神经系统功能、胃肠感觉和运动等都有不同程度的关系^[5],在IBS的发病中发挥着重要作用,包括炎症和粘膜的免疫生理、产生大量多功能生物化学介质,与神经免疫的联系和脑-肠轴的关系及在肠道高敏感性、胃肠动力紊乱中都起到重要作用^[6];MC释放的介质可使血管通透性改变、粘液分泌、肌肉收缩,还可吸引炎症细胞及刺激痛觉神经等,

因而造成局部失血、组织水肿、绒毛萎缩、吸收不良、大分子物质丧失及腹痛、腹泻等现象^[7]。

MC 与结肠动力异常:过敏肠组织内 MC 所含颗粒显著减少,外来抗原诱导的平滑肌收缩反应能被环氧化酶、脂氧化酶所抑制,推测是 MC 释放的花生四烯酸代谢产物(前列腺素、白三烯)直接作用于平滑肌所产生的效应^[8,9]。MC 释放的一系列介质影响肠道平滑肌运动、胃结肠反射等而引起肠动力异常。如组胺、5-HT、分别作用于肠粘膜及肠平滑肌上的相应受体可影响胃肠道运动,组胺就可加强小肠的肌电活动,刺激小肠的推进性蠕动,松弛肛门内括约肌。引近年研究表明 MC 可产生一氧化氮(NO)^[10],而 NO 又可调节 MC 介质释放。在 IBS 动物模型中常见的因束缚应激引起的结肠动力紊乱也是通过 CRF 依赖性机制和神经紧张素介导的 MC 脱颗粒来实现的^[9]。

MC 与内脏感觉过敏:MC 与胃肠道含神经肽(SP、CGRP)的感觉神经纤维接触紧密,在胃肠道、中枢神经系统与 MC 之间形成一双向通路,因而 MC 得以影响各种物理化学刺激对内脏传入神经的反应。与 MC 相邻的肠神经纤维含有 P 物质及(或)降钙素基因相关肽,后者与内脏痛觉传导有关^[11]。研究发现活化 MC 分泌产物可刺激或易化轴突反射(axon reflexes),诱导正向反馈环路,分泌的其它多能性细胞因子和其它炎症介质可作为神经和免疫系统信息交流的双向携带者,是神经-内分泌-免疫网络的重要组成部分。IBS 患者肠粘膜 MC 活化增多,采用 MC 稳定剂治疗 IBS 后患者症状明显减轻,这些均证实了 MC 与 IBS 内脏敏感性关系密切^[12],更有研究发现,若在 IBS 患者直肠扩张引起其顺应性下降和过强的反应性收缩,则同时会伴有肠 MC 数的增多,提示内脏感觉和肠运动与 MC 数存在关联^[13]。

研究证明轻度束缚^[14]应激在诱发肠道转运加快以及内脏敏感性增加的同时,并不导致溃疡形成,可以用来复制与应激有关的消化道症状和人的 IBS。因此我们用束缚应激刺激加番泻叶灌胃方法联合,造成腹泻型 IBS 大鼠模型。研究还发现,模型组大鼠结肠粘膜 MC 数目明显增多,周长、面积及等效直径增大,而圆度减小,而上述表现多是由于 MC 在某些因素刺激下被激活,MC 活化脱颗粒所致,由此可见在 IBS 模型中存在明显的激活、活化及脱颗粒,进一步说明 MC 确实在 IBS 发病中发挥一定的作用;经药物干预后,大鼠结肠粘膜 MC 计数较模型组减少,细胞面积较模型组明显减小,周长明显缩短,圆度有所增大,等效直径明显减小,且接近正常对照组,与正常组比较差异无统计学意义,而中药组与西药组之间无显著性差异,证明中药可以抑制束缚应激刺激所致的大鼠结肠粘膜 MC 数目的增加及其活化和脱颗粒,进而提示中药治疗 IBS 的机理部分是通过影响肠粘膜内 MC

数目及抑制 MC 脱颗粒实现的,并进一步证实了中药治疗 IBS 的有效性。

参考文献

- [1] Gut XY Mast cells: a possible enteric infection, food allergy link between psychological stress, and gut hypersensitivity in the irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 1998, 13: 980~989
- [2] 龚志锦. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 267~272
- [3] Guilarte M, Santos J, de Torres I, et al. Diarrhea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. [J]. *Gut*, 2007; 56(2): 203~209
- [4] Hiatt RB, Katz L. Mast cells in inflammatory conditions of the gastrointestinal tract[J]. *Gastroenterol*, 1962, 37(5): 541~545
- [5] Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, et al. The human mast cell: functions in physiology and disease [J]. *Front Biosci*, 2001, 1(6): D1109~1127
- [6] Gui XY. Mast cells: a possible link between psychological stress, enteric infection, food allergy and gut hypersensitivity in irritable bowel syndrome[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 1998, 13: 980~989
- [7] Addolorato G, Marsigli L, Capristo E et al. Anxiety and depression: a common feature of health care seeking patients with irritable bowel syndrome and food allergy [J]. *Hepato gastroenterology*, 1998, 45(23): 1559
- [8] Oliver MR, Tan DTM, Kirk DR. et al. Colonic and jejunal motor disturbances after colonic antigen challenge of sensitized rat [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(6): 199~206
- [9] Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L. Mast cell degranulation induces delayed rectal allodynia in rats: role of histamine and 5-HT [J]. *Dig Dis Sci*, 1998, 43(4): 727
- [10] Bissonnette EY, Hogaboam CM, Wallace JL, et al. Potentiation of tumor necrosis factor- α mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide [J]. *Immunol*, 1991, 14(7): 3060~3065
- [11] Iovino P, Azpiroz F, Dinning E, et al. The sympathetic nervous system modulates perception and reflex responses to gut distension in human [J]. *Gastroenterology*, 1995, 108: 680~686
- [12] Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L. Systemic lipopolysaccharide influences rectal sensitivity in rats: role of mast cells, cytokines, and vagus nerve [J]. *Am J physiol*, 2000; 279: G781
- [13] Hebden JM, Erah DO, Blackshaw PE, et al. Increased small bowel but not colonic permeability in post-infectious irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(suppl): A429
- [14] Williams CL, Villar RG, Peterson JM, et al. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1988, 94(3): 611~621

(收稿日期: 2007-04-10)

欢迎投稿! 欢迎订阅!