论著

文章编号:1000-5404(2006)02-0166-03

藿香正气液对大鼠胃动素的影响

杨国汉[1],胡德耀[1],戴裕光[1],卿玉玲[2] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所中医科,重庆 400042;[2]太极集团科研处,涪陵 408000)

提 要:目的 观察藿香正气液对大鼠胃动素的影响及其临床意义。**方法** 80只Wistar大鼠随机分为藿香正气液组和对照组,在给大鼠分组灌服藿香正气液或生理盐水1、6 h后:①观察大鼠胃肠运动的变化;②运用放射免疫分析法测定血浆、胃窦和空肠组织匀浆中胃动素(MTL)的含量变化;③运用免疫组化法显示胃窦、空肠组织中MTL阳性产物的分布情况。**结果** ①应用藿香正气液后1、6 h,大鼠胃肠运动显著增强,以用药后1 h更为明显。②藿香正气液明显增加血浆、胃窦及空肠组织匀浆中MTL的水平,及胃窦和空肠组织中MTL的阳性产物的含量。**结论** 藿香正气液有促胃肠动力作用,该作用可能与其对胃动素的影响有关。

关键词: 藿香正气液;胃动素

中图法分类号: R285.5;R289.5;R322.44 **文献标识码:** A

Effect of Ageratum-liquid on motilin of rats

YANG Guo-han[1], HU De-yao[1], DAI Yu-guang[1], QIN Yu-ling[2] ([1]Department of Traditional Chinese Medicine, Institnte of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, [2]Division of Scientific Research Affairs, Taij Group, Fuling Chongqing 408000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Ageratum-liquid on motilin (MTL) of rats. Methods Eighty Wistar rats were randomly divided into Ageratum-liquid group and control group, At 1, 6 h after Ageratum-liquid or saline was taken, the changes of gastrointestinal motility of the rats were observed, the levels of motilin in the serum as well as the antrum and jejunal tissues were measured with radioimmunoassay, distributions of MTL-IR-positive nerve and product in the antrum and jejunum were exhibited by immunohistochemistry. Results The gastrointestinal motility of rats was markedly enhanced at 1, 6 h in Ageratum-liquid group. Ageratum-liquid could markedly increase the levels of MTL in the serum as well as the antrum and jejunal tissues, and enhance the expression of MTL-IR-positive product in the antrum and jejunum. Conclusion Ageratum-liquid has prokinetic effect. The prokinetic mechanism of Ageratum-liquid is closely related to the changes of motilin.

Key words: ageratum-liquid; motilin

藿香正气散来源于宋代《太平惠民和剂局方》,主要用于外感风寒、内伤湿滞所致的腹胀、食欲不振、恶心、呕吐等中焦寒湿证。近年将其研制成口服液后,临床应用有所扩大,已广泛用于多种胃肠功能紊乱的疾病,表现出良好的综合调理作用。究其原因,可能与每种药物含有十分复杂的多种活性成分,从而以不同的作用机制发挥效应有关。为进一步了解其作用途径,本研究观察了藿香正气液灌胃后大鼠血浆、胃窦及空肠组织中MTL(motilin)的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年(10~12周龄)Wistar大鼠80只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),清洁级,体质量170~230 g,雌雄兼用。

1.1.2 药物 藿香正气口服液(组方及制备均执行2000年版中华人民共和国药典标准):由太极集团涪陵制药厂提供。批号:010412066。2% 葡聚糖蓝-2000(DB-2000)溶液:Pharmacia产品。5%活性炭混悬液(以10%阿拉伯胶配制)。MTL放射免疫测试盒:解放军总医院东亚免疫研究所。MTL兔抗大鼠单克隆血清:北京邦定生物公司分装(Sigma Co)。

1.1.3 仪器 高速低温离心机(7SS-15R):Beckman;分光光

作者简介:杨国汉(1962-),男,湖北省天门市人,副主任医师,副教授,主要从事中西医结合方面的研究。电话:(023)68757728

收稿日期:2005-03-20;修回日期:2005-06-21

度计(721-A:四川);全自动放射免疫 r 计数仪(FJ-2108):西安;内切式组织匀浆器(2S-83-1):浙江;自动图像分析系统(MAS-V):美国;光学显微镜:Olympus;Du-7500 分光光度计:Beckman。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理　实验前禁食不禁水 24 h。将大鼠按随机数字表法随机分成藿香正气液组(实验组,灌服藿香正气液 10 ml/kg)及对照组(灌服同体积生理盐水),各组动物数为 40 只。每只小鼠灌胃量均为 10 ml/kg,全给药量按成人剂量根据体表面积换算。每组动物再进一步分为 2 组(每组为 1 个时相点,设 1、6 h 2 个时相点),最后共 4 组,每组动物 20 只。各组在分别灌药或生理盐水后,于开腹取标本前 20 min 灌入 2% DB-2000 0.4 ml,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉,开腹留取下腔静脉血,并用文献方法测定胃内 DB-2000 相对残留率及小肠推进比,同时于冰盒上取胃窦、空肠标本。

1.2.2 胃排空及肠推进测定　参考文献[1]方法进行。大鼠在灌入 2% DB-2000 0.4 ml,经 20 min 后脱颈至死,开腹取全胃肠,自幽门括约肌处取胃,沿大弯侧剪开,将胃内残留色素充分洗于 4 ml 去离子水中,3 500 r/min 离心 15 min,取上清滤液,以 721-A 型分光光度计于 620 nm 测吸光度,为其胃内残留色素吸光度值,求出与空白对照组均值的百分比,即为各样本的胃内色素相对残留率。同时量取幽门括约肌至色素最前端及至盲肠的距离,以二者之比为小肠推进比。

1.2.3 血浆及胃窦、空肠组织匀浆中 MTL 含量　用解放军总医院东亚免疫研究所提供的 MTL 放射免疫分析药盒,按说明书提供的方法测定。

1.2.4 胃窦、空肠组织 MTL 免疫组织化学染色　按文献[2]方法进行。

1.2.5 MTL 免疫组化片的图像分析采用 Vanderwinden 法[3]

选取相同染色条件下不同时相点的切片,每时相点 8 张,每张切片于 200 倍光镜下随机选取 5 个视野观察黏膜、黏膜下层及肌间神经丛中阳性神经纤维及产物的分布、染色情况,进行判断、评分。其标准为:++++ 特别密集(4 分);+++ 密集(3 分);++ 中等(2 分);+ 稀疏(1 分);- 阴性(0 分)。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Excel 2002 统计学软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 灌服藿香正气液 1、6 h 后大鼠胃肠动力的变化

灌服藿香正气液 1、6 h 后,大鼠胃排空和肠推进均显著增强,其中以用药后 1 h 更明显($P<0.01$),6 h 后有下降趋势($P<0.05$),见表 1。

表 1　灌服藿香正气液 1、6 h 后对大鼠胃排空与肠推进的影响

组别	胃内色素残留率(%,$\bar{x} \pm s$)		肠内色素推进率(%,$\bar{x} \pm s$)	
	1 h	6 h	1 h	6 h
对照组	87.00 ± 17.68	87.00 ± 17.68	59.64 ± 5.73	59.64 ± 5.73
藿香正气液组	32.48 ± 9.63[a]	57.39 ± 12.46[b]	79.45 ± 5.04[a]	65.81 ± 5.25[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较

2.2 藿香正气液对大鼠血浆及胃窦、空肠组织匀浆中 MTL 的含量的影响

应用藿香正气液后大鼠血浆、胃窦和空肠组织匀浆中 MTL 含量明显升高,且以应用藿香正气液 1 h 后较明显,6 h 后呈下降趋势。其中应用藿香正气液 6 h 后血浆中 MTL 的含量与对照组比较无明显差异($P>0.05$),见表 2。

表 2　藿香正气液对大鼠血浆及胃窦、空肠组织匀浆中 MTL 含量的影响(pg/ml, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	血浆		胃窦		空肠组织匀浆	
	1 h	6 h	1 h	6 h	1 h	6 h
对照组	257.73 ± 79.45	284.04 ± 81.35	100.24 ± 38.91	106.72 ± 37.34	189.27 ± 96.25	212.67 ± 98.37
藿香正气液组	512.82 ± 151.37[a]	302.15 ± 147.84	172.37 ± 59.84[b]	145.43 ± 43.85[a]	437.85 ± 112.62[b]	347.62 ± 107.83[a]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较

2.3 对 MTL 免疫组化染色阳性产物的影响

MTL 免疫组化染色阳性产物呈棕黄色沉淀,胃窦黏膜及黏膜下层可见少许散在的 MTL-IR 阳性细胞及阳性纤维分布,黏膜中的 MTL-IR 阳性细胞呈圆形,着色淡。空肠黏膜及黏膜下层 MTL-IR 阳性细胞及阳性纤维易见,主要分布于黏膜层的绒毛上皮。肌层及肌间神经丛无明显的 MTL 表达。

应用藿香正气液后,胃窦黏膜 MTL-IR 阳性细胞增多,着色加深;胃窦黏膜下层 MTL-IR 阳性产物无明显变化;空肠黏膜、黏膜下层 MTL-IR 阳性细胞和神经纤维均明显增加。图像分析显示胃窦、空肠 MTL-IR 阳性产物的增加均以用药后 1 h 尤为显著($P<0.01$),6 h 后其增加有所下降($P<0.05$)。见表 3、4。

表 3　灌服藿香正气液 1、6 h 后大鼠胃窦组织 MTL 免疫组化染色图像分析(积分,$n=10$)

组别	胃窦黏膜		胃窦黏膜下层	
	1 h	6 h	1 h	6 h
对照组	0.84 ± 0.15	0.81 ± 0.21	0.83 ± 0.17	0.86 ± 0.21
藿香正气液组	1.47 ± 0.31[a]	1.14 ± 0.27[a]	0.94 ± 0.25	0.92 ± 0.21

a: $P<0.01$, 与对照组比较

表 4　灌服藿香正气液 1、6 h 后大鼠空肠组织 MTL 免疫组化染色图像分析(积分,$n=10$)

组别	空肠黏膜		空肠黏膜下层	
	1 h	6 h	1 h	6 h
对照组	1.65 ± 0.32	1.64 ± 0.29	1.61 ± 0.25	1.58 ± 0.24
藿香正气液组	2.58 ± 0.34[b]	2.01 ± 0.32[a]	2.81 ± 0.39[b]	1.95 ± 0.38[a]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较

3 讨论

藿香正气散收载于宋代《太平惠民和剂局方》,主要用于外感风寒、内伤湿滞所致的腹胀、食欲不振、恶心、呕吐等症。近年将其研制成口服液后,临床应用有

所扩大,已广泛用于多种胃肠功能紊乱的疾病,表现出良好的综合调理作用。究其原因,可能与每种药物含有十分复杂的多种活性成分,从而以不同的作用机制发挥效应有关。本研究观察到藿香正气液对大鼠胃及肠道的运动具有明显的促进作用,提示该药物有较好的促胃肠动力作用和较好的应用前景。

MTL 是20 世纪70 年代初 Brown 首先从猪小肠黏膜中提取分离出来的由22 个氨基酸组成的多肽,后来发现在大多数哺乳动物的胃肠道存在释放 MTL 的细胞。现已证实,MTL 主要对胃肠道移行复合运动(MMC)起非常重要的调节作用。实验观察到,应用藿香正气液 1、6 h 后,大鼠胃肠动力显著增强的同时,其血浆及胃窦、空肠组织中 MTL 的含量明显升高。形态学观察也显示胃窦黏膜及空肠黏膜、黏膜下层 MTL-IR 阳性产物明显增加。MTL 的这些变化趋势与藿香正气液促动力效应相一致,提示 MTL 释放增加与藿香正气液增强胃肠动力之间存在着一定关系。

有关 MTL 与中药促动力效应之间的关系研究报道[4,5],主要是观察血浆 MTL 水平的变化。由于血浆 MTL 水平易受其他因素干扰,波动较大,有时不能准确反映药物的作用。而胃肠组织中的 MTL 含量测定及应用免疫组化观察胃肠道 MTL-IR 阳性产物的分布变化,则更好地反映了 MTL 与藿香正气液促胃肠动力作用之间的关系。本实验采用 Sigma 公司提供的兔抗鼠 MTL 血清,以鼠胃窦、上段空肠石蜡切片进行免疫组化染色,研究大鼠胃肠道 MTL-IR 阳性细胞及阳性神经的分布情况,结果显示除胃窦、空肠黏膜有散在分布的 MTL-IR 阳性细胞外,黏膜下层亦可见 MTL-IR 阳性神经纤维分布,在胃窦黏膜 MTL-IR 阳性细胞呈圆形或椭圆形散在分布,细胞质着色较浅,上段空肠黏膜 MTL-IR 阳性细胞呈圆形、纺锤形或多边形,着色稍深,主要分布于绒毛、绒毛上皮或黏膜隐窝等处,与文献[6]报道基本相似。以往研究显示 MTL-IR 阳性产物主要分布于胃肠道的黏膜层,以激素形式通过内分泌途径发挥对肠道的调节作用[7]。最近发现 MTL 神经元及纤维还有存在于胃肠道肌间神经丛及中枢神经系统[8,9]。本实验结果则表明在大鼠胃窦及空肠的黏膜下神经丛有 MTL 阳性神经分布,且应用藿香正气液后空肠黏膜下神经丛 MTL 阳性产物含量明显增加。由此推测藿香正气液的促动力作用,一方面可能通过刺激胃肠黏膜的 MTL 细胞释放 MTL,以 MTL 的内分泌途径介导;另一方面,还有可能通过 MTL 的神经分泌或旁分泌途径介导。

既往研究表明血浆 MTL 常在 MMC Ⅲ相达到高峰,参与 MMC Ⅲ相收缩[10],在 MMC Ⅰ相注射 MTL,可缩短 MMC 的周期,并诱发 MMC Ⅲ相收缩。研究还进一步证实外源性 MTL 也能诱导胃窦的 MMC Ⅲ相活动,增强胃的收缩。Sasaki 等[11]则发现外源性 MTL 对马的小肠有直接的兴奋效应,对近端空肠尤其显著。藿香正气液促进 MTL 释放后,是通过 MTL 缩短 MMC 周期,增加 MMC Ⅲ相电活动,还是通过 MTL 直接兴奋胃肠平滑肌来增强胃肠动力,还有待进一步观察。

参考文献:

[1] 李 岩, 陈苏宁, 李宇权, 等. 芍药甘草汤、四逆散对胃排空及小肠推进功能影响的拆方研究[J]. 中华消化杂志, 1996, 16(1): 18-21.

[2] 郁树清, 张墨玲, 马丽云, 等. 大鼠脑内胃动素的免疫组织化学观察[J]. 天津医科大学学报, 1996, 2(1): 12-13, 18.

[3] VANDERWINDEN J M, De LEAT M H, SCHIFFMANN S N, *et al*. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of Hirschsprung's disease[J]. Gastroenterology, 1993, 105(4): 969-973.

[4] SATOH M, ITOH Z. Motilin and motilin receptor[J]. Nippon Rinsho, 1996, 54(4): 1092-1096.

[5] 朱金照, 陈东风, 冷恩仁. 胃肠肽在胃肠运动调节中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(8): 687-688.

[6] SAKAI T, SATOH M, KOYAMA H, *et al*. Localization of motilin-immunopositive cells in the rat intestine by light microscopic immunocytochemistry[J]. Peptides, 1994, 15(6): 987-991.

[7] MAAKE C, KLOAS W, SZENDEFI M, *et al*. Neurohormonal peptides, serotonin, and nitric oxide synthase in the enteric nervous system and endocrine cells of the gastrointestinal tract of neotenic and thyroid hormone-treated axolotls (Ambystoma mexicanum)[J]. Cell Tissue Res, 1999, 297(1): 91-101.

[8] LORDAL M, THEODORSSON E, HELLSTROM P M. Tachykinins influence interdigestive rhythm and contractile strength of human small intestine[J]. Dig Dis Sci, 1997, 42(9): 1940-1949.

[9] 周 吕. 第五讲 肠神经系统脑肠肽[J]. 中华消化杂志, 1996, 16(5): 287-289.

[10] XU S P, YI C Q. The influence of cisapride on the realease of some neuro transmitters in enteric myoplexus of guinea-pig[J]. J Clin Dig Dis, 1999, 11(2): 71-72.

[11] SASAKI W, YOSHIHARA T. The effect of motilin on the regulation mechanism of intestinal motility in conscious horses[J]. J Vet Med Sci, 1999, 61(2): 167-170.

(编辑 薛国文)