

白术对大鼠肠道乙酰胆碱酯酶及 P 物质分布的影响

朱金照¹, 冷恩仁², 张捷¹, 许其增¹ (1. 南京军区福州总医院消化内科, 福建 福州 350025; 2. 第三军医大学大坪医院消化内科, 重庆 400038)

摘要:目的 观察白术对大鼠空肠乙酰胆碱酯酶(AchE)、P 物质(SP)阳性神经分布的影响。方法 32 只 Wistar 大鼠随机分成 3 个不同剂量白术组及对照组, 给大鼠灌服不同剂量白术煎液 6h 后, 采用组化法显示空肠肌间神经丛 AchE 阳性神经分布, 免疫组化法观察空肠 SP 阳性神经分布的变化。结果 白术能明显增加空肠肌间神经丛中 AchE 阳性神经的含量($P < 0.01$)及空肠黏膜下和肌间神经丛中 SP 阳性神经的含量($P < 0.05$)。结论 白术可通过影响空肠 AchE、SP 阳性神经的分布促进肠道运动。

关键词:白术; 乙酰胆碱酯酶; P 物质; 肠道运动

中图分类号: R282.71 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2003)01-0014-03

The effect of *Atractylodes macrocephala* on the distribution of acetylcholinesterase and substance P in jejunum of rats

ZHU Jin-zhao¹, LENG En-ren², ZHANG Jie¹, XU Qi-zeng¹ (1. Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital, Nanjin Military Area, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Gastroenterology, Daping Hospital, The Third Military University, Chongqing 400025, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of *Atractylodes macrocephala* on distributions of AchE and SP positive nerve in Jejunum of rats. **METHOD** 32 Wistar rats were randomly divided into different *Atractylodes macrocephala* group and control group. After the rats were given different dose of *Atractylodes macrocephala* decoction for 6 hour, distribution of AchE positive nerve in jejunal myenteric nerve plexus was showed by histochemistry; the immunohistochemistry was used to investigated the distribution of SP positive nerve in jejunum. **RESULTS** Distributions of AchE positive nerve in jejunal myenteric nerve plexus and SP positive nerve in jejunal myenteric nerve plexus as well as jejunal submucosa of rats increased significantly after *Atractylodes macrocephala* decoction was given. **CONCLUSION** The increased distributions of AchE and SP positive nerve in jejunum may play some role in the prokinetic effects on intestine of *Atractylodes macrocephala*.

KEY WORDS: *Atractylodes macrocephala*; acetylcholinesterase; substance P; intestinal transit

白术(*Atractylodes macrocephala*)是一种临床常用的健脾补气类中药。研究证明白术对肠道传输有明显促进作用^[1,2],但其机制尚不明确。乙酰胆碱(Ach)和 P 物质(SP)是胃肠道最重要的兴奋性神经递质。我们给大鼠灌服不同的白术煎液后,分别应用组织化学法及免疫组织化学法观察大鼠空肠胆碱能神经及 P 物质的分布变化,以探讨白术促进肠道运动的机制。

1 材料

材料 健康成年 Wistar 大鼠 32 只,雌雄各半,体重 170~230g,第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。白术(大坪医院中药局提供,经由大坪医院中医科杨国汉教授鉴定)分别制备成 12.5%、25%、50% 白术水煎液,分别相当于含生药 0.125g·mL⁻¹、0.25g·mL⁻¹、0.5g·mL⁻¹;碘化乙酰硫代胆碱(Fluka 产品);兔抗鼠 SP 多克隆抗体(北京中山生物技术有限公司提供);MAS-5 图像分析系统(美国)。

2 方法

32 只 Wistar 大鼠随机分为 3 个不同剂量白术组(下称

大、中、小剂量组)及对照组,每组 8 只,分别在灌服上述 3 种不同剂量白术煎液 10 mL·kg⁻¹(给药剂量根据我们以往实验)或同体积蒸馏水 6h 后取空肠标本。

2.1 空肠肌间神经丛 AchE 组织化学染色

空肠标本入 10% 甲醛 + 1% 氯化钙液中,4℃ 过夜。将空肠标本先用蒸馏水漂洗 5 min,然后将空肠剪成 0.5cm 长若干段入 0.01 mol/L PBS 液中,并选择与肠管直径相当的玻棒插入肠管,用钟表镊轻轻在肠系膜附着处沿肠管纵轴划痕,剥离出纵肌层。通过上述方法即可得到附于纵肌层的肌间神经丛。采用 Karnovsky-Roots 直接法对空肠肌间神经丛进行 AchE 组织化学染色。

2.2 SP 免疫组织化学染色

空肠标本入 4% 多聚甲醛 PB 液中固定 24h,常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋切片。按 S-P 法进行免疫组织化学染色。

2.3 图像分析

采用 MAS-5 图像分析系统,对 AchE 组化片及 SP 免疫组化片选取同一染色条件下的切片,每组 8 张,每张切片于

200 倍光镜下随机选取 5 个视野分别观察肌间神经丛中性神经及阳性神经元的分布及染色情况,将图像摄入计算机,设定基础统计面积,分别调定灰度值,滤去非阳性部分,通过计算机自动分析,得出平均阳性表达面积及面密度。

2.4 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 Excel 软件进行 *t* 检验。

3 结果

3.1 空肠肌间神经丛 AChE 组化染色结果 AChE 组化染色显示其阳性部位呈棕红色沉淀。空肠肌间神经丛铺片显示 AChE 阳性神经呈典型的网状分布,神经节内见分布较多的 AChE 阳性神经元。给大鼠应用不同剂量白术煎液 6h 后,空肠肌间神经丛中 AChE 阳性神经纤维增多,神经节变粗,节内 AChE 阳性神经元细胞明显增多,染色加深,其中尤以大、中剂量组明显。大、中剂量白术组大鼠空肠肌间神经丛 AChE 阳性神经含量较对照组显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(表 1,图 1 ~ 2)。

表 1 空肠肌间神经丛 AChE 组化染色结果(密度 %) $n = 8$

Tab 1 Results of AChE histochemistry stain of jejunal myenteric nerve plexus in rats

组别	对照组	白术组 (小剂量)	白术组 (中剂量)	白术组 (大剂量)
AChE	6.68 ± 0.86	7.45 ± 0.93	8.52 ± 1.35 ¹⁾	9.83 ± 1.52 ²⁾

注:与对照组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs control

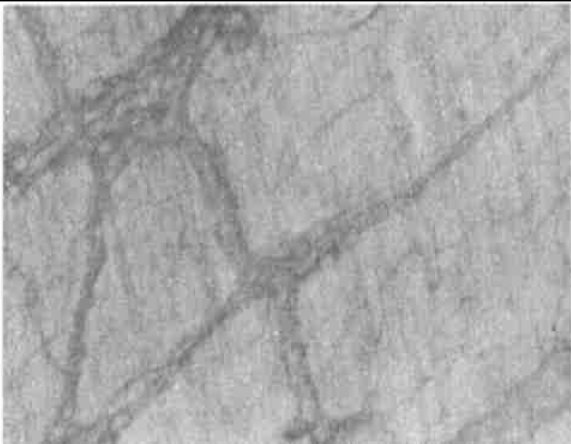


图 1 对照组空肠肌间神经丛 AChE 组织化学染色(×200)

Fig 1 AChE histochemistry stain of jejunal myenteric nerve plexus in control group(×200)

3.2 SP 免疫组化染色结果 免疫组化染色显示 SP 免疫反应阳性产物呈棕色沉淀。空肠黏膜、黏膜下层及肌间神经丛分布较丰富,肌层较少。给大鼠灌服白术煎液 6h 后,大鼠空肠黏膜中 SP 免疫反应阳性产物含量无明显变化,黏膜下层及肌间神经丛中 SP 免疫反应阳性产物含量明显增加,其中以大、中剂量组为明显 ($P < 0.05$)。(表 2,图 3 ~ 4)。

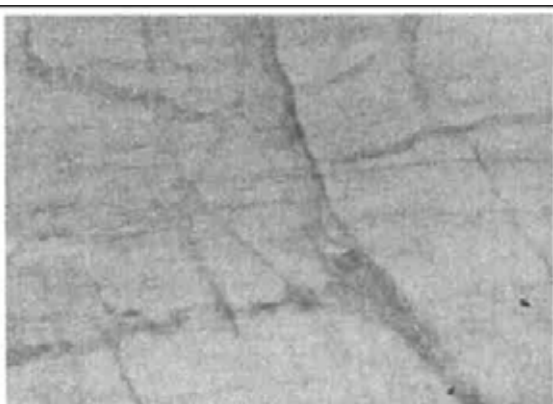


图 2 大剂量白术组空肠肌间神经丛 AChE 组织化学染色(×200)

Fig 2 AChE histochemistry stain of jejunal myenteric nerve plexus in *Atractylodes macrocephala* group with high dosage(×200)

表 2 大鼠空肠 SP 免疫组化染色结果(密度 %) $n = 8$

Tab 2 Results of SP immunohistochemistry stain of jejunum in rats

组别	黏膜层	黏膜下层	肌间神经丛
对照组	3.29 ± 0.43	2.74 ± 0.35	3.36 ± 0.38
白术组(小剂量)	3.22 ± 0.28	2.82 ± 0.37	3.68 ± 0.35
白术组(中剂量)	3.31 ± 0.32	3.01 ± 0.34	3.85 ± 0.39 ¹⁾
白术组(大剂量)	3.45 ± 0.29	3.22 ± 0.37 ¹⁾	3.97 ± 0.41 ¹⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$ vs control



图 3 对照组空肠组织 SP 免疫阳性物质的表达(S-P × 200)

Fig 3 Express of SP in jejunum in control group(S-P × 200)

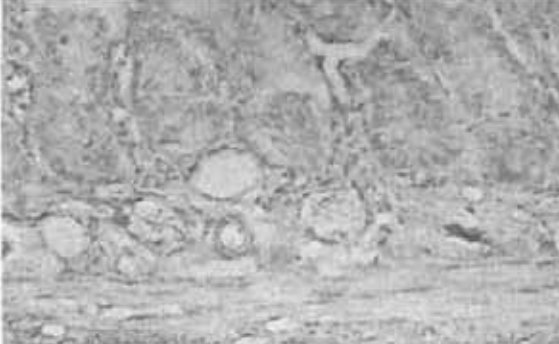


图 4 大剂量白术组空肠组织 SP 免疫阳性物质的表达(S-P × 200)

Fig 4 Express of SP in jejunum in *Atractylodes macrocephala* group(S-P × 200)

4 讨论

我们以往研究证明白术对肠道传输有明显促进作用^[1,2],但其机制一直不明确。胆碱能神经元是肠神经系统内数目最多的神经元^[3],由胆碱能神经元释放乙酰胆碱(Ach)可兴奋胃肠平滑肌并产生强烈的收缩^[4],且能诱导胃肠平滑肌的收缩运动^[5]。AchE 是 Ach 的水解酶,显示 AchE 是目前公认的显示 Ach 的方法,AchE 活性增强则代表 Ach 释放增加,胆碱能神经兴奋性增高^[6]。我们应用 Karnovsky-Roots 直接法显示 AchE,结果显示在空肠肌间神经丛中 AchE 阳性神经呈典型的网络状分布,神经节内分布较多的 AchE 阳性神经细胞。本实验中给大鼠灌服不同剂量白术煎液 6h 后,我们观察到随着给药剂量的增加,空肠肌间神经丛中的 AchE 阳性神经纤维明显增粗,神经节内神经元显著增多,染色加深,其中以大剂量组最明显($P < 0.01$),中剂量组次之($P < 0.05$)。从上述实验结果可以推测白术对肠道运动的促进效应的机制之一可能是通过增加空肠肌间神经丛 Ach 的释放有关。

SP 作为一种重要的胃肠肽广泛地分布于肠神经系统和整个胃肠道^[7],以往实验研究证明 SP 是胃肠运动调节中主要的兴奋性神经递质之一^[8,9],对胃肠道的兴奋作用表现为对胃肠纵行肌和环形肌有双重的收缩效应:包括直接的短时作用和紧随的由胆碱能神经释放 Ach 引起的长时作用。本实验结果显示,给大鼠灌服白术煎液后,给药剂量越大,空肠黏膜下神经丛、肌间神经丛中的 SP 免疫反应阳性神经、神经元含量增加也越明显,空肠黏膜中的 SP 免疫反应阳性产物无明显变化。结果提示空肠黏膜下神经丛及肌间神经丛中 SP 阳性神经的含量增加在白术的促进肠动力效应中也可能起着重要的作用。本研究结果为白术的临床应用提供了一

定的实验依据。

参考文献

- [1] 朱金照,冷恩仁,桂先勇,等. 白术、藿香等中药对胃排空、肠推进影响的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2000,6:21.
- [2] 朱金照,冷恩仁,陈东风,等. 15 味中药促动力作用的筛选研究[J]. 第三军医大学学报,2000,22:436.
- [3] Scheemann M, Schaaf C, Mader M. Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach[J]. J Comp Neurol, 1995,353:161.
- [4] Sims SM, Jiao Y, Preiksaitis HG. Regulation of intracellular calcium in human esophageal smooth muscles[J]. Am J Physiol, 1997,273:C1679.
- [5] Lee TL, Ang SB, Dambisya YM, et al. The effect of propofol on human gastric and colonic muscle contraction[J]. Anesth Analg, 1999,89:1246.
- [6] 徐三平,易粹琼. 西沙必利对胃肠神经递质释放的影响[J]. 临床消化病杂志,1999,11:71.
- [7] Maake C, Kloas W, Szendefi, et al. Neurohormonal peptides, serotonin and nitric oxide synthase in the enteric nervous system and endocrine cells of the gastrointestinal tract of neonatal and thyroid hormone-treated axolotls[J]. Cell Tissue Res, 1999,297:90.
- [8] Lordal M, Theodorsson E, Hellstrom PM. Tachykinins influence interdigestive rhythm and contractive strength of human small intestine[J]. Dig Dis Sci,1997,42:1940.
- [9] Wheatley IM, Hutson JM, Chow CW, et al. Slow-transit constipation in childhood[J]. J Pediatr Surg, 1999,34:829.

收稿日期:2001-12-10