

体的抗肿瘤免疫功能,从而发挥抑制肿瘤的作用。

REFERENCES

- [1] TAN Z L, YIN H S, HUANG H, et al. Chemical ingredients of submerged cultivation mycelium of *Cordyceps sinensis* [J]. Food Sci(食品科学), 2008, 29(3): 328-321.
- [2] 高俊德, 马紫亮, 张喜财, 等. 冬虫夏草菌丝体分离培养及其与生药冬虫夏草化学成份的比较[J]. 中药通报, 1981, 6(1): 3-6.
- [3] 陈万群, 陈古荣. 冬虫夏草代用品研究进展[J]. 中草药, 1994, 25(5): 269-271.
- [4] 肖宏亮, 高孔荣, 谭盈科. 冬虫夏草及其菌丝体研究进展[J]. 中国食用菌, 1997, 16(2): 3-5.
- [5] 徐方云. 冬虫夏草及发酵虫草菌丝体的临床应用[J]. 药品评价, 2005, 2(4): 255-263.
- [6] 唐茂芝, 贝峰. 食用菌类食品作为功能性食品的优势和特点[J]. 食品科技, 1999, 25(3): 5-6.
- [7] 黄彩玲, 林勇, 肖柳英, 等. 青蒿琥酯对 S180 荷瘤小鼠免疫调节的作用及机制初探[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(2): 145-148.
- [8] 陈洪亮, 李伯涛, 张家祥. 免疫活性多糖的免疫调节作用及机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(1): 249-252.
- [9] RAMESH H P, THARANATHAN R N. Carbohydrates-the renewable raw materials of high biotechnological value [J]. Crit Rev Biotechnol, 2003, 23(2): 149-173.
- [10] 卫军, 顾振纶. 植物多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 1997, 16(1): 1-4.
- [11] 苏秀榕, 姜永江, 常亚青, 等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究III[J]. 营养学报, 2003, 25(4): 43-44.
- [12] 汪道鑫, 虞春华, 叶颖俊, 等. T 淋巴细胞的研究进展[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(24): 3193-3195.
- [13] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 北京科学出版社, 2004: 148-153.
- [14] 曹宇, 赵祯, 张瑶, 等. 2002. 紫外线照射小鼠 T 细胞 CD4 和 CD8 的表达[J]. 中国应用生理学杂志, 18(4): 403-405.
- [15] GUIDOTTI L G, ROCHFORD R, CHUNG J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection [J]. Science, 1999, 284(5415): 825-829.

收稿日期: 2015-10-25

当归黄芪半仿生提取物对腹部术后大鼠胃肠运动功能障碍的影响

吴国泰^{1,2}, 景琪¹, 刘五州¹, 妥海燕¹, 杜丽东^{1,2}, 任远^{1,2*} (1.甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2.甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 目的 观察当归黄芪半仿生提取物对腹部术后大鼠胃肠运动功能障碍的影响。方法 SD 大鼠结肠 2 处横向切口, 原位缝合, 建立腹部手术模型, 随机分为模型组、阳性对照组(西沙比利 $0.003\ 5\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、当归黄芪水提物组(AEA, 生药 $5.2\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、当归黄芪半仿生提取物(SEA)高、中、低剂量组(生药 $10.5, 5.2, 2.6\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 设假手术组, 每组 10 只, 术后 24 h 灌胃给药, 连续 10 d。观察大鼠一般状态, 记录首次排便时间和粪便量; 测定大鼠摄食量, 胃肠推进指数和血浆胃动素(motilin, MTL)和血清胃泌素(gastrin, GAS)水平; 观察结肠组织形态 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)结构, 检测结肠肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)、肌动蛋白和肌球蛋白含量。结果 术后大鼠排便减少、体质量减轻、胃肠推进指数减小($P<0.05$), 血浆 MTL 和血清 GAS 含量均降低($P<0.01$), 结肠平滑肌细胞间隙变大, 数量减少, ICC 结构明显损伤; MLCK、肌动蛋白和肌球蛋白含量明显下降($P<0.01$)。给药第 9 天, SEA 高、中剂量组体质量增加($P<0.05, P<0.01$), 首次排便时间缩短、排便量增多($P<0.05$), 且 24 h 食量增加($P<0.05, P<0.01$); 胃肠推进指数增加、血浆 MTL 和血清 GAS 含量均升高($P<0.05, P<0.01$), 结肠 ICC 细胞数量较多, 结构完整; 结肠 MLCK、肌动蛋白和肌球蛋白含量均有上升($P<0.05, P<0.01$)。结论 当归黄芪半仿生提取物对腹部术后大鼠胃肠运动功能障碍具有一定的治疗作用, 作用机制与升高血液 MTL 和 GAS 及结肠平滑肌收缩相关蛋白的含量有关。

关键词: 当归; 黄芪; 半仿生提取; 腹部手术; 胃肠功能障碍

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)05-0533-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.004

Effects of Semi Bionic Extraction of *Angelica Sinensis* and *Astragalus Membranaceus* on Gastrointestinal Motility Dysfunction after Abdominal Surgery in Rats

WU Guotai^{1,2}, JING Qi¹, LIU Wuzhou¹, TUO Haiyan¹, DU Lidong^{1,2}, REN Yuan^{1,2*} (1.Gansu University of Chinese

基金项目: 甘肃省自然科学基金(1212RJZA079), 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室开放基金(ZDSYS-KJ-2013-006)

作者简介: 吴国泰, 男, 博士, 副教授 Tel: 13919102724 E-mail: wgt@gszy.edu.cn *通信作者: 任远, 男, 教授 Tel: (0931)8762653 E-mail: Leyuan816@163.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To study effects of semi bionic extraction of *Angelica sinensis* and *Astragalus membranaceus*(SEA) on gastrointestinal motility dysfunction in abdominal surgery rats, and to explore its mechanisms. **METHODS** The abdominal cavities of SD rats were opened, two transverse incisions were operated at colon appendix. After operation at 24 h, the rats were randomly divided into operation model group, positive control group (0.003 5 g·kg⁻¹ of cisapride), aqueous extract of *A. sinensis* and *A. membranaceus*(AEA) control group(5.2 g·kg⁻¹ of AEA), high, medium and low dose group of SEA(10.5, 5.2, 2.6 g·kg⁻¹ of SEA), sham operation group. Treatments were lasted 10 d. The general state of the rats, the time of first defecation and stool weight in 6 h were recorded, food intake and gastrointestinal propulsive index were measured, the levels of motilin(MTL) and gastrin(GAS) in blood were measured by ELISA; morphology and colonic interstitial cells of Cajal(ICC) were observed; the content of myosin light chain kinase(MLCK), actin and myosin were detected. **RESULTS** The gastrointestinal propulsion index(GPI), the levels of MTL and GAS in blood were reduced($P<0.01$), vascular smooth muscle was dilated, thinning, muscle fibrosis was visible, granulation, the ultra-structure of ICC was damaged, the contents of MLCK and actin were decreased after the operation($P<0.01$). The body weight of rats were increased, the first defecation time was shortened in the high or medium dose of SEA group($P<0.05$), the amount of defecation was increased, and food intake increased($P<0.05$, $P<0.01$); GPI and the content of MTL and GAS in blood increased. Colonic pathological change was improved and the number of ICC was increased and the content of MLCK, actin and myosin were increased in high or medium dose of SEA group($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** The certain therapeutic effect of SEA on gastrointestinal motor dysfunction are determinate in abdominal operation rats, the mechanisms associates with the levels of MTL and GAS in blood, and the smooth muscle contraction associates proteins.

KEY WORDS: *Angelica sinensis*; *Astragalus membranaceus*; semi bionic extraction; abdominal operation, gastrointestinal dysfunction

胃肠道的自主运动是消化道最重要的功能之一,胃肠功能紊乱是普外科术后的常见并发症,其主要病理生理表现为胃排空延迟、肠推进减慢、胃肠协调运动节律紊乱等,临床表现为恶心、呕吐、腹胀、腹痛、排气排便困难或腹泻等,目前尚无有效的治疗手段和药物^[1-2]。中医认为术后胃肠功能紊乱关键病位在脾和胃肠,与肝相关,病因病机复杂,以气滞血瘀、腑气不通、痰湿热毒为标,以气血津液亏虚为本,虚中有实,实中有虚,虚在脏,实在腑,腑气不畅,脏气运化无权而致病,宜概括为“正虚邪实”^[3]。由当归补血汤加减形成中药复方临床用于腹部术后肠麻痹的治疗,获得了较好的疗效^[4-6],但目前治疗腹部术后胃肠功能紊乱的文献报道大多仅为单纯的临床疗效观察,缺乏规范的符合现代循证医学的实验研究及其作用机制的研究。本研究旨在依据传统中医理论,结合临床实践,进一步研究当归黄芪配伍使用对腹部手术后胃肠功能紊乱的疗效并探讨可能的作用机制,为当归黄芪在促进胃肠运动功能方面的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

当归饮片(批号:131101)和黄芪饮片(批号:140201)购自甘肃中医药大学附属医院,经甘肃中

医药大学刘峰林博士鉴定,当归饮片为伞形科当归属多年生草本植物当归 *Angelica sinensis*(Oliv.) Diels 干燥根的生切片;黄芪饮片为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongolicus*(Bge.) Hsiao 的干燥根片。

大鼠胃泌素(gastrin, GAS)、胃动素(motilin, MTL)ELISA 试剂盒(批号:201406)、兔抗肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)(批号:140414)、肌球蛋白1抗(批号:140418)、SMA-1抗(批号:130830)、DAB 显色试剂盒(批号:980601W),均由武汉博士德生物工程有限公司提供;西沙比利片(浙江昂利康制药有限公司,批号:20130305,规格:每片5 mg);注射用青霉素钠[华北制药股份有限公司,批号:20130726,规格:每瓶0.96 g(160万单位)];注射用硫酸链霉素[华北制药股份有限公司,批号:20130612,规格:每瓶1 g(100万单位)];水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司,批号:20120505)。

1.2 动物

SD大鼠,♂,70只,SPF级,体质量(180±20)g,由甘肃中医药大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(甘)2011-0001。SPF级大鼠生长繁殖饲料由北京科奥协力饲料有限公司提供,室温(20±2)℃,相对湿度(50±5)%,12 h明暗交替,

自由摄食、饮水,适应 7 d 后开始实验。

1.3 仪器

BS110 电子天平(德国赛多利斯公司); BX51-OLYMPUS 显微镜(日本奥林巴斯公司); TEKVIP5 组织脱水机(北京怡康勇佳科技有限公司); TEC5 组织包埋机(北京怡康勇佳科技有限责任公司); RM2135 石蜡切片机(德国 LEXICA 公司); LKB-V 型超薄切片机(瑞典 BROMMA 公司); 日立 H-600 型透射电镜(日本日立公司)。

1.4 受试物制备

取当归、黄芪饮片分别粉碎,过 20 目筛,按当归:黄芪(1:2)混匀,取 360 g,常压恒温搅拌提取 2 次,提取温度为 $(37\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$,第 1 次提取人工胃液用量 7 倍、第 1 次提取时间 2.0 h、第 2 次提取人工肠液用量 4 倍、第 2 次提取时间 2.0 h,提取液分别过滤,离心 $(3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}, 10\text{ min})$,取上清液,合并,减压浓缩至 1 200 mL,得当归黄芪半仿生提取物(semi bionic extraction of *A. sinensis* and *A. membranaceus*, SEA),每 100 mL 含原饮片 30.0 g)溶液备用^[7]。

另取当归、黄芪(1:2)混合物 360 g,按传统煎煮方法,加双蒸水 3 000 mL,浸泡 30 min,大火煮沸,文火煎煮 45 min,用 4 层纱布加 100 目筛过滤,滤渣再加水 2 000 mL,大火煮沸,小火煎煮 30 min,用 4 层纱布加 100 目筛过滤,合并滤液,减压浓缩配成含生药 $30\text{ g}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$ 的当归黄芪水提物(aqueous extract of *A. sinensis* and *A. membranaceus*, AEA)溶液备用。

1.5 动物手术、分组与给药

70 只大鼠随机抽取 10 只为假手术组,其余大鼠进行手术,手术组大鼠禁食不禁水 24 h 后,10%水合氯醛腹腔注射 $[0.3\text{ mL}\cdot(100\text{ g})^{-1}]$ 麻醉,开腹,盲肠下 2 cm 处结肠横向切口但不切断,口径约 2 mm,共 2 处相距 2 cm,行原位缝合,关腹;假手术组大鼠只打开腹腔,并立即关腹,术后大鼠单笼饲养且皮下注射 $20\,000\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 青霉素 G 钠和 $250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 硫酸链霉素,连续 3 d;术后 48 h 内禁食不禁水,每日灌胃 20%葡萄糖 2 次,间隔 8 h,第 3 天灌胃 20%饲料糊 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,第 4 天自由饮食;术后 24 h,手术大鼠随机分为手术模型组、阳性对照组、AEA 对照组、SEA 高、中、低剂量组,每组 10 只;假手术组及手术模型组按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃生理盐水,阳性对照组灌胃西沙比

利($0.003\,5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于临床 70 kg 成人日用量 7 倍),AEA 对照组灌胃 AEA(生药 $5.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于临床 70 kg 成人日用量的 7 倍),SEA 高、中、低剂量组分别灌胃 SEA(生药 10.5, 5.2, $2.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于临床 70 kg 成人日用量的 14, 7, 3.5 倍),术后 24 h 开始给药,连续 10 d。

1.6 指标检测

1.6.1 术后排便和活动情况 术后第 3 天给药 2 h 后各大鼠灌胃 20%饲料糊 $2\text{ mL}\cdot(100\text{ g})^{-1}$,观察并记录首次排便时间,每隔 1 h 检查 1 次,连续 10 h 以上未见排便者计 10 h。收集各大鼠 6 h 内粪便,称湿重,观察大鼠精神状态、活动情况等。

1.6.2 术后摄食量和小肠推进率 分别于术前和术后第 4, 6, 8 天上午 9:00 加饲料 50 g,次日 9:00 称剩余饲料重,并称体质量,计算 24 h 摄食量,摄食量=(饲料总量-饲料余量)/体质量 $\times 100$ 。

术后第 10 天末次给药 30 min 后各大鼠灌胃 10%阿拉伯胶与 5%活性炭混合液 $2.0\text{ mL}\cdot(100\text{ g})^{-1}$,45 min 后股动脉取血,处死大鼠,沿腹部正中切口,取出全部胃肠,分离系膜,测量小肠全长(幽门至回盲部)以及炭末推进的距离,计算胃肠推进指数,胃肠推进指数=炭末推进距离/小肠全长 $\times 100\%$ 。

1.6.3 血浆 MTL 和血清 GAS 含量 末次给药 75 min 后,各大鼠股动脉取血 2 份,每份约 2 mL,分别制备血浆和血清,用 ELISA 试剂盒按说明书测定血浆 MTL 和血清 GAS 水平。

1.6.4 结肠组织形态 测定完胃肠推进指数后,分离结肠组织,取距离回盲瓣 2 cm 处结肠组织 1 cm 置于 10%甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,切片(厚 $4\text{ }\mu\text{m}$),行 HE 染色,光镜观察组织形态。

1.6.5 结肠 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)超微结构 取回盲部 2 cm 处结肠约 0.5 cm。沿系膜缘剖开,用冰生理盐水洗净内容物,置于 2.5%冷戊二醛溶液中 4°C 固定 24 h。制作电镜标本^[8],观察肠平滑肌细胞和 ICC 形态。

1.6.6 MLCK、肌球蛋白和肌动蛋白相对表达量 大鼠处死后,取盲肠下 2~3 cm 处结肠约 1 cm,洗净内容物,用 PBS 漂洗 2 次,用 10%中性甲醛溶液固定。用免疫组化法染色,用 Image-ProPlus 5.0 图像分析系统和 ETG 图像分析软件,随机选取 8 个视野,MLCK 和肌球蛋白表达量用平均光密度值表示,肌动蛋白表达量用平均灰度值表示,分别计算相对表达量。

1.7 统计学处理

用 SPSS17.0 统计软件处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,半定量资料采用 Ridit 分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SEA 对大鼠术后排便和活动情况的影响

假手术组大鼠皮毛光泽较好,体态活泼,粪便为棕黑色、形状规则,质硬,互不黏连;手术模型组、阳性对照组、AEA 对照组、SEA 高、中、低剂量组大鼠出现不同程度的精神萎靡,活动迟缓,排便量少等现象。与假手术组比较,术后第 3 天,各大鼠首次排便时间明显延长($P < 0.01$),6 h 内排便量明显减少($P < 0.01$);与手术模型组比较,阳性对照组、SEA 高、中剂量组大鼠首次排便时间明显缩短($P < 0.05$),阳性对照组和 SEA 高剂量组大鼠 6 h 内排便量明显增多($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 2 对大鼠体质量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of SEA on the body weight in rats ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	手术前体质量/g	手术后体质量/g		
			第 3 天	第 6 天	第 9 天
假手术组	—	207.0 $\pm$ 6.1	216.3 $\pm$ 7.4 ²⁾	221.2 $\pm$ 10.5 ²⁾	224.4 $\pm$ 9.5 ²⁾
手术模型组	—	209.2 $\pm$ 7.2	185.1 $\pm$ 11.6	187.8 $\pm$ 13.5	192.2 $\pm$ 11.6
阳性对照组	0.0035	206.5 $\pm$ 6.0	189.2 $\pm$ 10.4	197.5 $\pm$ 11.6	198.9 $\pm$ 11.3
AEA 对照组	5.2	211.1 $\pm$ 6.2	187.0 $\pm$ 12.3	194.2 $\pm$ 13.1	205.2 $\pm$ 12.6 ¹⁾
SEA 高剂量组	10.5	208.1 $\pm$ 7.0	190.8 $\pm$ 15.6	205.2 $\pm$ 13.6 ¹⁾	213.2 $\pm$ 10.1 ²⁾
SEA 中剂量组	5.2	209.2 $\pm$ 6.5	188.2 $\pm$ 12.7	201.2 $\pm$ 11.2 ¹⁾	210.9 $\pm$ 14.2 ²⁾
SEA 低剂量组	2.6	207.7 $\pm$ 6.6	189.0 $\pm$ 13.8	193.2 $\pm$ 12.1	203.7 $\pm$ 10.4 ¹⁾

注:与手术模型组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 对大鼠 24 h 进食量的影响

手术前各组大鼠 24 h 进食量差异无统计学意义,与假手术组比较,手术后大鼠 24 h 进食量显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与手术模型组比较,手术后第 4 天,阳性对照组、AEA 对照组和各给药组大鼠 24 h 进食量均有明显增加,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);术后第 6 天,AEA 对照组和 SEA 高剂量组大鼠 24 h 进食量显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);术后第 8 天,阳性对照组、AEA 对照组和 SEA 高、中剂量组大鼠 24 h 进食量均显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表 3。

表 1 SEA 对大鼠排便时间和排便量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of SEA on the amount of defecation in 6 h and defecation time in rats ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	首次排便时间/h	6 h 内排便重量/ $\text{g} \cdot (6 \text{ h})^{-1}$
假手术组	—	1.6 $\pm$ 0.8 ²⁾	5.3 $\pm$ 1.8 ²⁾
手术模型组	—	5.5 $\pm$ 2.6	1.9 $\pm$ 1.4
阳性对照组	0.0035	3.3 $\pm$ 1.3 ¹⁾	3.8 $\pm$ 1.6 ¹⁾
AEA 对照组	5.2	4.3 $\pm$ 2.4	3.8 $\pm$ 1.6 ¹⁾
SEA 高剂量组	10.5	3.4 $\pm$ 1.5 ¹⁾	3.3 $\pm$ 1.2 ¹⁾
SEA 中剂量组	5.2	3.7 $\pm$ 1.1 ¹⁾	2.8 $\pm$ 1.4
SEA 低剂量组	2.6	4.6 $\pm$ 2.1	2.5 $\pm$ 1.6

注:与手术模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 对大鼠体质量的影响

手术前各组大鼠体质量差异无统计学意义,与假手术组比较,手术后大鼠体质量显著减轻($P < 0.01$);与手术模型组比较,手术后第 6 天,SEA 高、中剂量组大鼠体质量显著增加($P < 0.05$);给药第 9 天,AEA 对照和 SEA 各剂量组大鼠体质量均显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表 2。

表 3 对大鼠 24 h 进食量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of SEA on the food intake during 24 h in rats ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	24 h 进食量/ $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$			
		手术前	术后第 4 天	术后第 6 天	术后第 8 天
假手术组	—	5.5 $\pm$ 0.7	5.3 $\pm$ 0.6 ²⁾	5.5 $\pm$ 0.9 ²⁾	5.6 $\pm$ 1.0 ¹⁾
手术模型组	—	5.1 $\pm$ 1.0	3.4 $\pm$ 0.9	4.2 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.7
阳性对照组	0.0035	5.2 $\pm$ 0.8	4.4 $\pm$ 0.7 ¹⁾	4.6 $\pm$ 0.6	5.2 $\pm$ 0.7 ¹⁾
AEA 对照组	5.2	4.9 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 0.5 ²⁾	5.1 $\pm$ 0.8 ¹⁾	5.6 $\pm$ 1.0 ¹⁾
SEA 高剂量组	10.5	5.3 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.6 ²⁾	5.5 $\pm$ 0.5 ²⁾	6.1 $\pm$ 0.6 ²⁾
SEA 中剂量组	5.2	5.2 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 0.8 ¹⁾	4.6 $\pm$ 0.8	5.2 $\pm$ 0.5 ¹⁾
SEA 低剂量组	2.6	4.8 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.9 ¹⁾	4.4 $\pm$ 0.6	4.8 $\pm$ 0.7

注:与手术模型组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.4 对大鼠胃肠推进指数的影响

与假手术组比较, 手术模型组大鼠胃肠推进指数显著降低($P<0.05$), 与手术模型组比较, 术后第 10 天, AEA 对照和 SEA 高、中剂量组胃肠推进指数显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 4。

表 4 对大鼠胃肠推进指数的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)
Tab. 4 Effects of SEA on the gastrointestinal propulsion index in rats ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胃肠推进指数
假手术组	—	$0.84 \pm 0.19^{1)}$
手术模型组	—	0.65 ± 0.16
阳性对照组	0.003 5	$0.84 \pm 0.13^{1)}$
AEA 对照组	5.2	$0.86 \pm 0.14^{1)}$
SEA 高剂量组	10.5	$0.87 \pm 0.11^{2)}$
SEA 中剂量组	5.2	$0.85 \pm 0.12^{1)}$
SEA 低剂量组	2.6	0.77 ± 0.13

注: 与手术模型组比较 $^{1)}P<0.05, ^{2)}P<0.01$ 。
Note: Compared with the model control group, $^{1)}P<0.05, ^{2)}P<0.01$ 。

2.5 对大鼠血浆 MTL 和血清 GAS 含量的影响

与假手术组比较, 给药第 10 天, 手术模型组大鼠血浆 MTL 和血清 GAS 含量均显著降低($P<0.01$), 与手术模型组比较, 阳性对照组、AEA 对照组和 SEA 高、中剂量组大鼠血浆 MTL 含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), AEA 对照组和 SEA 高、中剂量组大鼠血清 GAS 显著升高($P<0.05$

或 $P<0.01$)。结果见表 5。

表 5 对大鼠血浆 MTL 和血清 GAS 含量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)
Tab. 5 Effects of SEA on the content of MTL and GAS in rats blood ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	MTL/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	GAS/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
假手术组	—	$151.25 \pm 19.16^{2)}$	$185.12 \pm 13.95^{2)}$
手术模型组	—	90.37 ± 18.24	136.22 ± 22.05
阳性对照组	0.003 5	$114.50 \pm 21.05^{1)}$	131.77 ± 20.67
AEA 对照组	5.2	$136.22 \pm 20.74^{2)}$	$160.56 \pm 19.21^{1)}$
SEA 高剂量组	10.5	$124.52 \pm 23.01^{2)}$	$192.28 \pm 24.18^{2)}$
SEA 中剂量组	5.2	$121.02 \pm 24.53^{1)}$	$168.91 \pm 25.00^{1)}$
SEA 低剂量组	2.6	98.34 ± 13.11	156.75 ± 19.64

注: 与手术模型组比较, $^{1)}P<0.05, ^{2)}P<0.01$ 。
Note: Compared with the model control group, $^{1)}P<0.05, ^{2)}P<0.01$ 。

2.6 对大鼠结肠组织形态的影响

假手术组大鼠结肠平滑肌细胞及腺体细胞排列紧密, 细胞形状规则, 细胞间隙均匀, 未见空泡样改变, 未见血管扩张, 结肠组织结构正常, 未见炎症水肿; 手术模型组大鼠结肠平滑肌细胞间隙变大, 排列不齐, 胞浆减少、空泡样改变显著, 存在空泡样改变, 脂肪粒较多, 可见肠炎性肉芽; AEA 对照组及 SEA 高、中剂量组大鼠结肠平滑肌及腺体细胞排列较整齐, 细胞间隙稍大, 少量空泡样变, 细胞之间连接较好。结果见图 1。

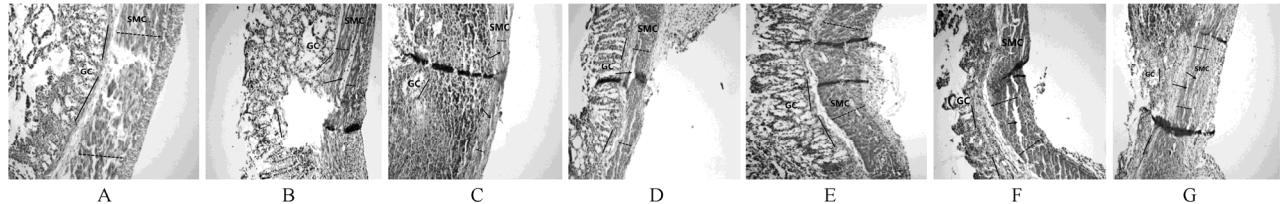


图 1 对术后大鼠结肠组织光镜下病理形态的影响(HE, $\times 100$)
A-假手术组; B-手术模型组; C-阳性对照组; D-AEA 对照组; E-SEA 高剂量组; F-SEA 中剂量组; G-SEA 低剂量组; 箭头所示为平滑肌间连接, 实线所示为 GC 排列, 虚线所示为 SMC 厚度。

Fig. 1 Effects of SEA on the pathomorphology of colon in rats(HE, $\times 100$)
A-sham group; B-operation model group; C-positive control group; D-AEA group; E-SEA high-dose group; F-SEA middle-dose group; G-SEA low dose group; the connection between smooth muscle cells are shown by arrows, GC are shown by real line, The thickness of SMC are shown by dashed.

2.7 对肠 ICC 超微结构的影响

假手术组大鼠结肠纵行肌间以及环形肌深部肌间相互连接紧密, 网络样结构完整, 平滑肌细胞内未见空泡, ICC 数量较多; 手术模型组大鼠结肠吻合口附近 ICC 的超微结构出现明显损伤, 大量线粒体的破裂溶解, ICC 数量减少; AEA 对照组及 SEA 高、中剂量组大鼠结肠平滑肌分布较为连续, 结构相对完整, 平滑肌细胞之间连接紧密, 无明显的间隙, ICC 细胞数量明显多。结果见图 2。

2.8 对肠组织 MCLK、肌球蛋白和肌动蛋白相对表达量的影响

与假手术组比较, 手术模型组 MCLK、肌球蛋白和肌动蛋白相对表达量明显下降($P<0.01$), 与手术模型组比较, AEA 对照组及 SEA 高、中剂量组 MCLK 相对表达量均有明显上升($P<0.01$), 阳性对照组、AEA 对照组和 SEA 高、中剂量组大鼠结肠肌球蛋白和肌动蛋白相对表达量均明显上升($P<0.05, P<0.01$)。结果见表 6。

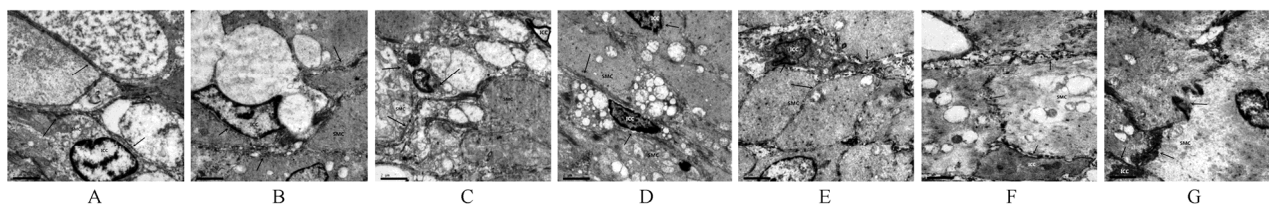


图2 SEA对术后大鼠结肠平滑肌层ICC形态的影响($\times 10\,000$)

A-假手术组; B-手术模型组; C-阳性对照组; D-AEA 对照组; E-SEA 高剂量组; F-SEA 中剂量组; G-SEA 低剂量组; 箭头所示为缝隙连接。

Fig. 2 Effects of SEA on the pathomorphology of ICC of colon in rats($\times 10\,000$)

A-sham group; B-operation model group; C-positive control group; D-AEA group; E-SEA high-dose group; F-SEA middle-dose group; G-SEA low dose group; The connection between SMC and ICC or SMC are shown by arrows.

表6 对大鼠结肠 MCLK、肌球蛋白和肌动蛋白表达的影响($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Effects of SEA on the expressions of MCLK, actin and myosin in rats($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	MCLK 相对 表达量 (光密度)	肌球蛋白 相对表达量 (光密度)	肌动蛋白 相对表达量 (灰度)
假手术组	—	$1.41 \pm 0.26^{(2)}$	$1.26 \pm 0.31^{(2)}$	$93.4 \pm 19.3^{(2)}$
手术模型组	—	0.58 ± 0.19	0.67 ± 0.14	175.9 ± 23.0
阳性对照组	0.003 5	0.66 ± 0.21	$0.92 \pm 0.20^{(1)}$	$112.3 \pm 30.4^{(2)}$
AEA 对照组	5.2	$0.94 \pm 0.15^{(2)}$	$1.01 \pm 0.28^{(2)}$	$119.0 \pm 23.8^{(2)}$
SEA 高剂量组	10.5	$1.26 \pm 0.25^{(2)}$	$1.16 \pm 0.35^{(2)}$	$113.5 \pm 30.4^{(2)}$
SEA 中剂量组	5.2	$1.11 \pm 0.13^{(2)}$	0.88 ± 0.36	$145.4 \pm 28.5^{(1)}$
SEA 低剂量组	2.6	0.80 ± 0.26	0.76 ± 0.23	159.2 ± 37.3

注: 与手术模型组比较 $^{(1)}P < 0.05$, $^{(2)}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, $^{(1)}P < 0.05$, $^{(2)}P < 0.01$.

3 讨论

近年来中药现代化得到了长足的发展, 中药制剂的疗效的发挥很大程度上取决于中药提取、分离、精制等方法的选择以及工艺过程是否科学合理。半仿生提取法是从生物药剂学的角度, 模拟口服药物在胃肠道的转运过程, 将整体药物研究与分子药物研究法相结合, 本研究根据 SBE 法的原理, 采用人工胃肠液作为提取溶剂, 在 $37\,^{\circ}\text{C}$ 的环境中搅拌提取, 更好的模拟药物在胃肠道的转化转运特点, 制备了当归黄芪半仿生提取物^[7]。

胃肠道是人体最大的内分泌器官, 主要的胃肠激素 GAS、MTL、胆囊收缩素(CCK)、生长抑素(SS)、血管活性肠肽(VIP)、促胰液素(se-cretin)以及 P 物质等, 其中 GAS 和 MTL 是兴奋性胃肠激素, CCK、VIP 及 SS 是抑制性胃肠激素。胃肠激素分泌紊乱与临床上许多疾病的发生和发展有密切关系^[9]。宋瑞等^[10]研究发现术后 24 h 时, GAS 水平显著升高; 吴佩等^[11]研究发现术后 1~7 d 内 GAS 显著升高, 而徐荣等^[12]在腹部非胃手术患者的研究中发现术后 12 h 血清 GAS 水平有所下降,

24 h 逐渐恢复正常。本研究检测了实验大鼠肠-肠吻合术后第 10 天末次给药 75 min 后血清 GAS 水平, 结果显示术后 GAS 显著降低, 而 AEA 对照组和 SEA 高剂量组大鼠血清 GAS 显著升高, 可能与手术时神经反射和应激使得兴奋性胃肠激素分泌减少有关。腹部手术会使血浆 MTL 降低, 胃肠功能减弱, Breukink 等^[13]测定直肠癌手术对 MTL 的影响, 发现术后较术前显著降低。赵国海等^[14]研究腹部手术胃肠动力恢复前血浆 MTL 含量较动力恢复后明显减低。宋瑞等^[10]研究发现术后 24 h MTL 水平显著下降, 而且胃癌根治术及胰十二指肠切除术后 5 d MTL 仍持续处于低水平, 而腹腔镜胆囊切除术后 MTL 恢复较快。本研究结果显示手术模型组大鼠血浆 MTL 显著降低, 与上述研究结果相一致。

ICC 细胞是位于肠神经系统和平滑肌细胞之间的一类特殊的间质细胞^[15], 大量研究表明, ICC 的减少与胃肠动力紊乱性疾病相关^[16]。本研究结果显示, 假手术组大鼠结肠纵行肌间以及环形肌深部肌间相互连接紧密, 网络样结构完整, 腹部术后网络结构被明显破坏, 甚至缺失, ICC 细胞和胆碱能神经数目显著减少, 大量线粒体的破裂溶解, 而 SEA 能明显增多 ICC 细胞数量和胆碱能神经的增生, 恢复网络结构, 初步推测这可能是 SEA 调整腹部术后胃肠运动功能紊乱的机制之一。

平滑肌收缩蛋白质体系分为收缩蛋白质(包括肌球蛋白和肌动蛋白)、调节蛋白质(包括钙调蛋白、MLCK 和原肌球蛋白)和细胞骨架蛋白质(包括结蛋白和波形蛋白)^[17]。本研究结果显示假手术组大鼠结肠平滑肌肌球蛋白轻链激酶含量较高, 与假手术组比较, 手术模型组 MLCK、肌球蛋白和肌动蛋白含量明显下降, 与手术模型组比较, AEA 对照组及 SEA 高、中剂量组大鼠结肠 MLCK、肌

球蛋白和肌动蛋白含量均有不同程度的上升。提示手术刺激可能使大鼠 MLCK、肌球蛋白和肌动蛋白含量下降,活性降低,结肠平滑肌舒张,进而导致胃肠功能障碍;AEA 和 SEA 高、中剂量可能通过提高 MLCK、肌球蛋白和肌动蛋白含量,增加结肠平滑肌的收缩性而对抗胃肠功能障碍。

REFERENCES

- [1] SUN B, XU J, ZHOU Z Q, et al. Functional delayed gastric emptying after abdominal operation: clinical analysis of 36 cases [J]. Chin J Pract Surg(中国实用外科杂志), 2003, 23(8): 465-467.
- [2] ZHOU Y D, XIAO Y, ZHAO Y P. Diagnosis and management of delayed gastric emptying after Whipple's operation [J]. Chin J Gen Surg(中华普通外科杂志), 2002, 11(17): 671-672.
- [3] WANG J J, WANG W H, RUAN X M, et al. Effect of abdominal needling in treating post-cardio surgical operational gastrointestinal dysfunction [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2008, 28(4): 310-313.
- [4] 李道五. 温中理气健脾和胃法治疗腹部术后胃肠功能紊乱 30 例观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8 (4): 60-61.
- [5] ZHOU X M, ZHOU X, Li Y M. Research progress of Danggui Buxue decoction [J]. Word Chin Med(世界中医药), 2013, 8(6): 705-707.
- [6] ZHOU X Q, YU K, YANG J F, et al. Modified "Danggui Buxue Decoction" for the treatment of postoperative enteroparalysis [J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2014, 48(5): 48-50.
- [7] LIU W Z, TUO H Y, WU G T, et al. Semi bionic extraction of Dangguibuxuetang [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2015, 31(5): 19-23.
- [8] SUN J H, GUO H, CHEN L, et al. Effect of electroacupuncture at "Tianshu" (ST25) on colonic smooth muscle structure and interstitial cells of Cajal in slow transit constipation rats [J]. Acupunc Res(针刺研究), 2011, 36(3): 171-175.
- [9] LU Y J, LIAN Z C. The impact of gastrointestinal hormone on gastric dynamic [J]. China Tropic Med(中国热带医学), 2005, 5(6): 1338-1339.
- [10] 宋瑞, 张惠卿, 陈学谦, 等. 腹部手术后胃肠激素变化的研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2010, 13(4): 323-324.
- [11] 吴佩, 吴采月, 赵唯信, 等. 腹部手术后血清胃泌素、胃酸水平的变化以及与应激性溃疡的关系[J]. 医师进修杂志, 1995, 18(3): 16-18.
- [12] 徐荣, 程华. 腹部手术对血清胃泌素水平的影响 [J]. 江西医学院学报, 2002, 42(6): 53-54.
- [13] BREUKINK S O, PIERIEJ P, GROND A J, et al. Laparoscopic versus open total mesorectal excision: a case-control study [J]. Int J Colorectal Dis, 2005, 20(5): 428-433.
- [14] ZHAO G H, ZHANG Y S, JIANG Y, et al. Measurement of plasma motilin and vasoactive intestinal peptide contents in postabdominal operation patients before and after gastrointestinal function recovery [J]. J Radioimmunol(放射免疫学杂志), 2001, 14(6): 323-324.
- [15] LI Z P, QIU Y, PENG Y. Relationship between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal motility [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol(胃肠病学和肝病学杂志), 2014, 23(9): 983-986.
- [16] TONG W D, LIU B H, ZHANG S B, et al. Colectomy for idiopathic slow transit constipation [J]. J Med Coll PLA(中国人民解放军军医大学学报), 2003, 18(1): 56-59.
- [17] HU Y H. Effects of acupuncture on regulative mechanism of thick myofilament in smooth muscle contraction and gastrointestinal pacing cell ICC in abdominal postoperative rat [D]. Guangzhou, Guangzhou University of Chinese Medicine, 2011.

收稿日期: 2015-08-23

从肺癌组织提取高纯度总 RNA 方法的优化及应用

程斌^{1,2}, 钟里科², 王增², 黄萍², 陈枢青^{1*} (1.浙江大学药学院, 杭州 310006; 2.浙江省肿瘤医院, 杭州 310022)

摘要: 目的 通过对传统 TRIzol 提取组织中 RNA 的方法进行优化, 建立一种较为简便、高效、经济的提取方法, 并用优化后的方法检测非小细胞肺癌组织中 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的 mRNA 表达水平。方法 非小细胞肺癌的组织标本(包括肿瘤组织和正常组织)36 例, 采用传统和优化后的方法提取肺癌组织及正常组织中 RNA, 以 SYBR Green 荧光实时定量 PCR 分析各组织中 ERCC1、RRM1、BRCA1 以及管家基因 GAPDH 的 mRNA 表达水平。结果 传统方法的 RNA 浓度和纯度分别为 $(0.76 \pm 0.07) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1.87 ± 0.04 , 优化方法的 RNA 浓度和纯度分别为 $(1.12 \pm 0.07) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1.95 ± 0.03 ; 琼脂糖凝胶电泳表明 RNA 没有降解, 各个引物的溶解曲线均呈单峰, 特异性良好。实时荧光定量显示, 肺癌组织中 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的相对 mRNA 表达高于正常组织; ERCC1 和 BRCA1 在不同病理类型(腺癌、鳞癌)的肿瘤组织中表达无显著性差异, RRM1 在肺鳞癌中的表达显著高于腺癌 ($P < 0.05$); 不同性别中的基因表达均无显著性差异。结论 相比传统方法, 利用优化后的方法提取样本的总 RNA 浓度、纯度和完整性均显著提高, 能满足各种基因表达和定量检测实验的需要。非小细胞肺癌中 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的表达水平与肿瘤增殖活性密切相关, 与临床

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划(2014KYB036)

作者简介: 程斌, 男, 副主任药师 Tel: (0571)88122120 E-mail: bbbuben@sina.com *通信作者: 陈枢青, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571)88122438 E-mail: chenshuqing@zju.edu.cn