

通便汤对慢传输便秘模型的药效学研究

徐天舒¹, 钱海华^{2*}, 周青², 孟军³

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008; 2. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029; 3. 连云港市中医院肛肠科, 江苏 连云港 222001)

摘要:目的 观察通便汤对慢传输型便秘大鼠模型的影响, 探讨其通便机制。方法 随机将 SD 大鼠分为正常对照组及造模组。正常对照组给予蒸馏水灌胃, 造模组采用泻剂结肠法造模; 模型成功后, 造模组大鼠随机分为模型对照组、莫沙必利组、通便汤组。在运用药物干预的第 2、4、6 周分别进行结肠内存留粪便粒数、碳末推进率、结肠肌电试验、结肠 Cajal 间质细胞 (ICC) 形态学观察。结果 通便汤能显著缓解功能性便秘大鼠的便秘症状, 增强大鼠结肠组织的收缩幅度、促进肠蠕动, 改善受损的肠组织细胞, 较模型对照组具有明显优势 ($P < 0.01$)。结论 通便汤方具有确切的促进慢传输型便秘大鼠结肠传输功能的作用。

关键词:通便汤; 慢传输型便秘; Cajal 间质细胞; 结肠肌电试验

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2016)01-0058-04

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0058

Pharmacodynamic Effects of Tongbian Decoction on Slow Transit Constipation Model

XU Tian-shu¹, QIAN Hai-hua^{2*}, ZHOU Qing², MENG Jun³

(1. Gulou Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing, 210008, China; 2. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China; 3. Anorectal Department, Lianyungang Traditional Chinese Medicine Hospital, Lianyungang, 222001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect and mechanism of Tongbian Decoction on slow transit constipation Model. **METHODS** SD rats were divided into normal control group and model group. Normal control group were given distilled water, while the model group was treated by laxative colon method and divided into natural recovery group, mosapride groups and Tongbian Decoction soup. After the drug intervention of 2, 4 and 6 weeks, defecation amounts in colon, the rate of carbon powder proposed, colonic electrical test and the morphological observation of colon interstitial cells of Cajal (ICC) were measured. **RESULTS** Compared to natural recovery group, Tongbian Decoction group significantly alleviated the constipation symptoms of functional constipated rats, enhanced the contraction of colon tissue, promoted intestinal peristalsis and improved the damaged intestinal tissue cells ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Tongbian Decoction can promote the colonic transit activities of slow transit constipation model rats.

KEY WORDS: Tongbian Decoction; slow transit constipation; interstitial cells of Cajal; colonic electrical test

慢传输型便秘 (Slow transit constipation, STC) 作为临床常见难治疾病, 严重影响患者生活质量, 是目前亟待解决的临床热点问题。相关研究表明^[1], Cajal 间质细胞 (Interstitial cells of cajal, ICC) 参与了胃肠基本电节律调控和神经递质信号传导, 在胃肠动力基本功能单位 (肠神经系统-ICC-平滑肌细胞) 中居于核心作用, 起着关键性作用, 能直接调节支配肠内平滑肌活动和邻近器官的神经元活动。多数 STC 患者 ICC 异常、结肠肌间神经节和神经元减少, 导致对近端粪质传输产生收缩抵制, 最

终导致结肠传输速度减缓。我们在总结全国名老中医朱秉宜教授临床经验的基础上, 运用通便汤治疗 STC, 疗效确切^[2]。本研究拟建立 STC 大鼠模型, 通过动物实验和细胞实验, 进一步揭示通便汤对 STC 的干预作用, 部分诠释名医验方治疗 STC 的潜在作用机制。

1 材料

1.1 实验药物及试剂

SD 大鼠 145 ~ 165 g, 雌雄各半, 合格证号: SCXK-(苏)2014-0001, 由南通大学实验动物中心供

收稿日期: 2015-09-22; 修稿日期: 2015-12-03

基金项目: 国家自然科学基金 (81573979); 江苏省中医药科技项目 (YB2015118)

作者简介: 徐天舒 (1964—), 女, 江苏常州人, 南京大学医学院附属鼓楼医院主任中医师。* 通信作者: haihuaqian@126.com

应。

大黄细粉(批号:13091601);通便汤(南京中医药大学附属医院朱秉宜教授治疗STC临床验方,南沙参20g,麦冬20g,玄参30g,熟地黄30g,杏仁10g,白术40g,枳壳15g,厚朴10g,瓜蒌仁20g,火麻仁10g,郁李仁15g,莱菔子15g;以上药物均由南京中医药大学附属医院制剂部提供,通便汤方每1mL含3g生药,高压灭菌后分瓶装好备用);枸橼酸莫沙必利片(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:11101952);10%活性炭,杭州木材总厂提供;PBS粉,美国Sigma公司提供;DEPC溶液,南京凯基生物技术有限公司提供;氯化乙酰胆碱,美国Sigma公司提供;台氏液,配方为氯化钠8g,氯化钾0.2g,硫酸镁0.26g,磷酸二氢钠0.065g,碳酸氢钠1g,葡萄糖1g,氯化钙0.2g,共溶于1000mL蒸馏水备用,南京中医药大学附属医院动物实验中心提供;2.5%戊二醛电镜固定液,南京医科大学电镜室提供。

1.2 实验器材

SANYO -70℃冰箱,中国三洋电机;海尔-20℃冰箱,海尔电器;超纯水净化机,美国Millipore公司;866A恒温鼓风干燥箱,上海浦东荣丰仪器公司;各种规格微量加样器,德国EPPENDORF公司;FA100上皿电子天平,上海精科天平仪器厂;ALC-M离体组织器官试验系统,上海奥尔科特生物科技有限公司;透射电子显微镜,日本Hitachi(日立)-7650。

2 方法

2.1 模型建立与实验分组

SD大鼠随机分为正常组(24只)及造模组。造模组大鼠采用泻剂结肠法造模^[3],造模大鼠每日定时应用大黄细粉悬浊液进行灌胃,首次给药剂量为150mg/(kg·d),以后每日按150mg/(kg·d)递增,至一半大鼠达到腹泻时,维持此剂量至80%大鼠稀便消失,后续剂量再按每日150mg/(kg·d)递增至又见一半大鼠达到腹泻时再维持剂量,之后再加重,如此循环3次灌胃饲养。待第3次80%的大鼠稀便消失,维持当时的剂量1周,之后停止给药,诱导STC模型,STC模型成功的标准为:大鼠粪便含水量、排便量明显少于正常组。造模期间,正常对照组同时给予等量的蒸馏水灌胃。造模成功后,造模组大鼠随机分为通便汤组、莫沙必利组、模型对照组,每组24只。各组大鼠继续正常喂养1周。然后各组大鼠的处理及干预方式如下:①正常对照组:与

造模组大鼠同期饲养,与造模组同期处置;②通便汤组:造模成功后予以通便汤干预,给药剂量为33g/(kg·d);③莫沙必利组:造模成功后给予莫沙必利悬浊液灌胃,给药剂量为2.25mg/(kg·d)(按照指南^[4]成人与大鼠药物剂量换算标准,通便汤成人每日口服的饮片剂量为220g,莫沙比利成人每日的口服剂量为15mg);④模型对照组:造模成功后不给予任何药物干预,只给予自然喂养,与上述组同期处置。

2.2 标本采集

各组分别在第2、4、6周随机选择8只大鼠,进行标本采集。采集样本前,禁食不禁水24h,经口灌入10%活性炭混悬液2mL,等待30min后,颈椎脱臼处死。立即剖腹,取出大鼠全部肠段,取2份新鲜肠壁组织150mg,放入PBS液中清洗后,分别浸入中性多聚甲醛及戊二醛电镜固定液中,4℃冰箱中保存,检测各项指标,进行组间对比。

2.3 观察指标

2.3.1 一般情况观察 观察各组大鼠的皮毛光泽、活动范围、精神情况、进食量、饮水量。第1月每3d记录1次大鼠体质量,以后则每7d记录1次大鼠体质量。

2.3.2 结肠存留粪便粒数 大鼠处死后,立即剖腹,记算整个结肠内粪便存留的粒数。

2.3.3 碳末推进试验 摘除自幽门部到回盲部的全部肠管,使之平展,在松弛状态下测量所截肠管的全长、活性炭在肠管内推进的前端与幽门之间的距离,计算活性炭末的推进百分比。碳末推进率(%)=碳末前端与幽门的距离(cm)/肠道总长度(cm)×100%。

2.3.4 结肠肌电试验 获取大鼠结肠组织,去除黏膜层,横切1圈,制成环形肌条长15mm×5mm,将肌条固定于ALC-M离体组织器官试验系统MPA2000型上,37℃台氏液温育1h后,用 10^{-4} mol/L乙酰胆碱作为刺激剂,以给药前5min肌条收缩平稳后的收缩平均振幅为正常值,给药后待肌条收缩稳定,以收缩稳定5min平均振幅值为效应值。计算肌条收缩幅度变化百分数=(效应值-正常值)/正常值×100%。

2.3.5 细胞形态学观察 获取结肠组织后,先在4℃下用2.5%~3%戊二醛固定2~3h。用0.1mol/L PBS液漂洗2次,每次固定1~2h,0.1mol/L PBS液漂洗2次,每次5min。分别用浓度为50%、

70%乙醇溶液作脱水处理,每次 10 min,80%、90%、100% 3 种浓度的丙酮脱水各 2 次,每次 10 min。将丙酮和环氧树脂包埋剂以 1:1 混合,置换 40 min。再将标本置于包埋模内包埋,60℃聚合 48 h。用 AO 超薄切片机,将其切成 1 μm 的半薄片,置于水面上展平,HE 染色。继续用 AO 超薄切片机,将其切成超薄切片,用铜网捞出,再用 70%乙醇配制的饱和醋酸铀染色 3 min,双蒸水漂洗,铅染液染 3 min,双蒸水漂洗,静置干燥后电镜观察。

2.4 数据分析及统计

实验数据分析采用 SPSS19.0 数据软件包进行处理,所得数据都以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 实验动物一般情况

造模期间有 5 只因灌胃不当而死亡,在随机分组后,各组大鼠均未出现死亡。与正常对照组比较,造模组大鼠精神欠佳,喜卧,行动力差,毛色干枯发黄、饮水量增多、不喜进食,尿液呈现深黄色。所有动物在取材时均未发现结肠黏膜色素沉着。正常组及造模组大鼠体质量均增长,未见明显差异。

3.2 结肠存留粪便结果

模型对照组大鼠结肠增粗、肠腔扩大,肠腔内有较多粒粪便,与正常对照组对比,有显著性差异($P < 0.01$);通便汤组、莫沙必利组在用药第 4 周之后,大鼠肠腔残留粪便明显减少,与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明通便汤组、莫沙必利组具有较好的增强肠道蠕动的的作用,但 2 组之间相比未见明显差异($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠结肠残留粪便粒数($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周
正常对照组	2.38±0.53	2.42±0.71	2.5±0.62
模型对照组	4.88±0.73**	4.71±1.08**	4.71±0.84**
通便汤组	4.87±0.58	2.43±0.26##	2.28±0.73##
莫沙必利组	4.38±0.55	2.50±0.15##	2.40±0.89##

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,## $P < 0.01$ 。

3.3 碳末推进试验结果

与正常对照组比较,各时间段模型对照组的碳末推进率明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);在用药 2 周后,和模型对照组相比,莫沙必利组碳末推进率有明显改善($P < 0.01$),通便汤组差异无统计学意义($P > 0.05$),提示莫沙必利组在用药 2 周后就可以改善大鼠结肠运输功能,而通便汤此时并

无明显作用。通便汤在用药 4、6 周后其碳末推进率较模型对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。通便汤和正常对照组、莫沙必利组之间比较,未见明显差异($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠结肠碳末推进率($\bar{x} \pm s, \%, n=8$)

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周
正常对照组	67.22±0.53	67.7±0.64	67.54±0.83
模型对照组	54.35±2.52**	53.13±2.24**	55.26±2.31**
通便汤组	53.12±2.48	63.71±1.62##	66.62±1.52##
莫沙必利组	67.45±1.69##	66.39±1.76##	63.79±1.83##

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,## $P < 0.01$ 。

3.4 离体结肠机电实验结果

给药 2 周,与正常对照组比较,模型对照组大鼠结肠收缩幅度明显降低($P < 0.01$),通便汤组、莫沙必利组与模型对照组比较,结肠收缩幅度无显著性差异($P > 0.05$)。给药 4 周,通便汤组结肠收缩幅度逐渐恢复,与模型对照组、莫沙必利组比较,有统计学意义($P < 0.05 \sim 0.01$);给药 6 周,通便汤组结肠收缩幅度恢复明显,与模型对照组比较,有显著性差异($P < 0.01$),与正常对照组无明显差异($P > 0.05$);莫沙必利组与模型对照组比较,无显著性差异($P > 0.05$)。说明通便汤具有改善大鼠结肠机电方面的优势,而莫沙必利却无此功效。见表 3。

表 3 各组大鼠结肠收缩幅度变化的比较($\bar{x} \pm s, \%, n=8$)

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周
正常对照组	4.74±0.17	4.37±0.19	4.35±0.84
模型对照组	1.69±0.87**	1.77±0.40**	1.82±0.69**
通便汤组	1.74±0.30	3.54±0.14##	3.58±0.23##
莫沙必利组	2.15±0.36	1.88±0.62 [△]	1.94±0.77

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,## $P < 0.01$;与通便汤组比较,[△] $P < 0.05$ 。

3.5 电镜观察 ICC 形态

通过透射电镜可以发现,正常对照组结肠 ICC 位于黏膜下环形肌层表面、环肌层与纵肌层之间,细胞核大,形态不规则,细胞膜完整,细胞质少,胞质内富有细胞器,发育良好,结构清楚。模型对照组部分细胞膜出现溶解,细胞质内细胞器数目减少,并且与周围平滑肌细胞和神经细胞之间的缝隙连接结构减少。通便汤组在给药 4 周时,与模型对照组相比,细胞受损情况逐渐恢复,给药 6 周恢复显著,而莫沙必利组则不能恢复造模引起的 ICC 的改变。见图 1。

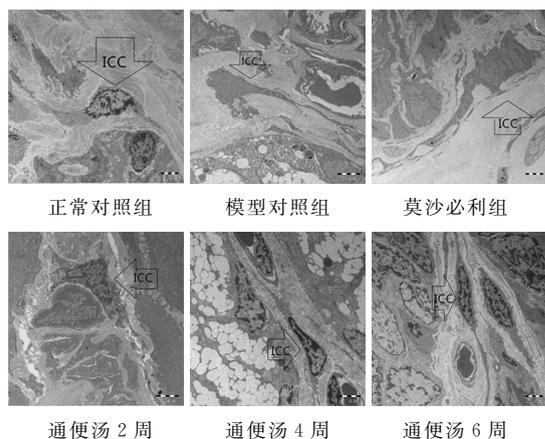


图1 结肠 ICC 形态电镜图(×800)

4 讨论

便秘作为一种症状,常导致患者每天早晨都困扰于如何排便,使得患者情绪沮丧,严重影响了患者的生活质量。国际上将功能性便秘分为3大类:正常运输型便秘、慢传输型便秘和出口梗阻型便秘^[5]。由于STC病因不清,临床治疗也较困难。现阶段西药多是对症治疗,临床上多使用泻剂,但长期服用泻剂后患者会产生依赖性,形成顽固性便秘。手术治疗对肠道损伤较大,部分患者术后会出现严重腹泻,生活质量明显降低。生物反馈和骶神经刺激的疗效仍不确定。因此针对STC的西医疗效仍未取得满意疗效。

朱秉宜教授是全国著名肛肠专家、全国首批老中医药专家师承指导老师,享受国务院特殊津贴,从事治疗各类结直肠疾病60余年。我们在总结朱老临床经验的基础上,研制出治疗STC的临床验方通便汤。方中玄参甘咸寒,入肺胃肾经,启肾水以滋肠燥,使大便滋润,为君药;生地、麦冬甘寒质润,通其秘结最佳,而无滋腻之患,为臣药;火麻仁、郁李仁、瓜蒌仁、杏仁均为仁类药物,性味甘平又富含脂质,均能润肠通便,3者合用具有滋而不腻,润而不滞的优点,共为佐药;方中重用生白术,推动胃肠道气机,促使肠道蠕动功能增强,虽苦温燥湿,但其质润多脂,能促使肠道润而不干,粪质多而不燥,亦为佐药;配伍枳壳、厚朴、莱菔子行气导滞,3药共为使药^[6]。

本研究结果证明通便汤方能显著缓解功能性便秘大鼠的便秘症状,提高大鼠结肠组织的收缩幅度、促进肠蠕动,改善受损的肠组织细胞,较模型对照组

具有明显优势。结合相关文献报道^[7]:用于改善便秘的安慰剂在治疗早期,常常具有潜在的模仿影响活性药物来激活相同的大脑区域,达到类似治疗功效的作用,因此建议用于判断治疗便秘药物的实际疗效常需用药2周以上。本研究通过客观的动物和细胞实验,借助观察其结肠肌电活动、结肠ICC细胞形态,发现通便汤方的确切起效时间为用药后4~6周。

现代中医药的发展必须建立在继承名医经验的基础上。研发一个优秀的药物需要有以下基础:确切的临床疗效、产品的可推广性。通便汤方作为名医验方,临床疗效显著,由临床医生、药学专家共同参与建立“临床-动物-临床”的名医验方研发模式,为继承应用名医验方提供科学依据,也为名医验方的研发开启了道路。

参考文献:

- [1] Lino S, Horiguchi S, Horiguchi K. Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal musculature of W(jic) c-kit mutant mice[J]. *J Smooth Muscle Res*, 2011, 47(3/4): 111-121.
- [2] 张荣枝,杨光,钱海华.通便汤治疗便秘的临床对照观察[J].*湖北中医药大学学报*,2014, 16(4):80-82.
Zhang RZ, Yang G, Qian HH. Controlled clinical observation of Tongbian Decoction in treatment of constipation[J]. *J Hubei Univ Chin Med*, 2014, 16(4):80-82.
- [3] 黄显凯,胥基太,童卫东.“泻剂结肠”大鼠的结肠肌电生理变化及其意义[J].*中国普外基础与临床杂志*,2003, 10(1):28-29, 32.
Huang XK, Xu JT, Tong WD. The change of electromyophysiology of the rat with cathartic colon[J]. *Chin J Bases Clin General Surg*, 2003, 10(1): 28-29, 32.
- [4] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991:925.
Li YK. *Experiment Methodology of Traditional Chinese Medicine Pharmacology*[M]. Shanghai: Shanghai scientific and technical publishers, 1991:925.
- [5] Camilleri M, Bharucha AE, Di Lorenzo C, et al. American neurogastroenterology and motility society consensus statement on intraluminal measurement of gastrointestinal and colonic motility in clinical practice[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2008, 20(12): 1269-1282.
- [6] 丁超,顾红,陈玉根,等.“养阴润肠方”用药分析及其治疗慢传输型便秘药理学探究[J].*辽宁中医杂志*,2014, 41(11):2329-2331.
Ding C, Gu H, Chen YG, et al. Analysis on Yangyin Runchang formula and its pharmacy on treating STC[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2014, 41(11): 2329-2331.
- [7] Waitzberg DL, Logullo LC, Bittencourt AF, et al. Effect of synbiotic in constipated adult women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of clinical response[J]. *Clin Nutr*, 2013, 32(1): 27-33.

(编辑:董宇 杨巍敏)