

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.01.01

脾虚四号方干预大鼠腹泻模型后结肠黏膜 微观结构的变化

康楠¹, 王凤云², 陈婷², 王晓鸽², 朱恩林¹, 唐旭东²

(¹北京中医药大学, 北京 100029;

²中国中医科学院西苑医院 脾胃病科, 北京 100091)

摘要:[目的]从微观结构的角度,观察脾虚四号方干预大鼠腹泻模型后,大鼠结肠黏膜的变化。[方法]采用水环境小平台站立法复合高乳糖饲料喂养的方法复制腹泻模型,通过透射电镜技术观察中药复方对大鼠腹泻模型结肠黏膜细胞微观结构的影响。[结果]模型组和正常组比较,模型组结肠上皮细胞损伤明显:微绒毛形态不规则且部分缺失;细胞膜破坏,出现裸核;线粒体内脊模糊不清、肿胀、电子密度改变;杯状细胞分泌异常活跃;细胞连接的缝隙连接明显增宽。中药干预组肠黏膜细胞损伤较轻,但仍存在微绒毛形态不规整,长短不齐,线粒体电子密度增高、形态不规则,杯状细胞分泌活跃等情况。另外,中药干预组结肠黏膜细胞出现异常隆起小体。[结论]小平台站立和高乳糖饲料喂养的方法造成的大鼠腹泻模型,其结肠黏膜细胞会出现微绒毛形态改变等微观结构的变化,而中药脾虚四号方干预可以缓解其电镜下黏膜损伤。

关键词:脾虚四号方;腹泻;小平台站立法;高乳糖饲料;透射电镜;结肠黏膜

中图分类号:R574.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-038X(2015)01-0001-05

Microstructure changes of the colon mucosa tissue in diarrhea rats after treating by Pixu Ⅳ Recipe

KANG Nan¹, WANG Feng-yun², CHEN Ting², WANG Xiao-ge², ZHU En-lin¹, TANG Xu-dong²
(¹Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; ²Department of Gastroenterology, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091, China)
Corresponding author: TANG Xu-dong, E-mail: txdly@sina.com.cn

Abstract:[Objective]To study the microstructure changes of the colon mucosa tissue in diarrhea rats after treating by Pixu Ⅳ Recipe. [Methods]Three-week-old male rats were fed with a high-fat-lactose diet, and were forced to stand on the multiple platform which was full of water around, in order to make the rats suffer from functional diarrhea. Through the transmission electron microscopy the effect of Chinese herbal compound prescription on the colon mucosal microstructure changes were observed. [Results]Compared to the normal group, the rats in model group had serious damage in their colonic mucosa; the shape of microvilli was irregular and even lost parts of the colonic mucosa; the cell membrane damaged; the naked nucleus appeared; the mitochondria swelled, the cristae shape was not clear and the electron density changed; the goblet cells were much more active; the gap junctions widened. All the above phenomena improved in the traditional Chinese medicine therapy group, but still existed. In addition, abnormal uplift corpuscle appeared in the distal colonic mucosa of the rats in the treatment group. [Conclusion]Pixu Ⅳ Recipe can relieve the microstructure changes of the colon mucosa tissue in the diarrhea rats, which are induced by the high-fat-lactose diet and modified multiple platform method.

Key words:Pixu Ⅳ Recipe; diarrhea; modified multiple platform method; high fat lactose diet; transmission electron microscopy; colon mucosa

腹泻的发病机制主要有 4 大类:肠腔内存在大量不能吸收的、有渗透性的溶质,使肠腔渗透压增加;肠腔内的水和电解质的过度分泌;肠蠕动加速;炎症所致的病理渗出物大量渗出。当然,不少腹泻并非由某种单一机制引起,而是多种因素共同作用下的结果。究其根本原因都是肠道对水和电介质的分泌与吸收的动态平衡被打破。而肠道对于水和电解质的分泌与吸收,肠黏膜上皮细胞结构与功能的正常是其必要条件。小肠是主要的吸收部位,吸收障碍机制亦较为复杂,进入大肠时仅剩余一些难吸收的物质,故大肠主要吸收其中的水分和盐类,一般情况下结肠可吸收进入其内 80% 的水和 90% 的 Na^+ 和 Cl^- ^[1],大肠结构的异常主要会影响水和电解质的吸收,本研究以结肠黏膜细胞的微观结构为观察对象,试图探讨中药复方干预对大鼠腹泻模型结肠黏膜细胞微观结构的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与实验室条件

3 周龄清洁级 Wistar 雄性大鼠 36 只,购于斯贝福(北京)实验动物科技有限公司。动物在中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心饲养,饲养条件为 II 级,光照周期 12 h/12 h,室温 22~25℃,相对湿度 45%~60%,自由进食、饮水。

1.2 试剂

苏木精-伊红染色液(上海源叶生物科技有限公司),戊二醛(中镜科仪技术有限公司 GS2607),铬酸(中镜科仪技术有限公司 GP18456),环氧丙烷(上海江莱生物科技有限公司 LA09443),环氧树脂(SPI-CHEM spon812),醋酸双氧铀(SPI-CHEM 02624),柠檬酸铅(SPI-CHEM 02616),二甲砷酸钠(Sigma C0250)。

1.3 试验药物

脾虚四号方(参灵白术散加减),由中国中医科学院西苑医院药剂科制作。蒙脱石散(思密达),3 g×10 袋,产品批号:F17193。

1.4 仪器

泰维 TB-718 生物组织包埋机、Leica RM2235 组织切片机、Olympus bx51 显微镜、LEICA EM RAPIDS6 修块机、LEICA EM UC7 超薄切片机、LEICA HI1220 烤片机、HITACHI 透射电镜 HT7650,透射电镜由军区总医院八一脑科医院神经外科研究所进行。

1.5 造模方法

用高乳糖饲料喂养幼龄 Wistar 大鼠 14 d,造成腹泻模型。每日 22:00 至次日 7:00 将大鼠放在特制的方形水槽中的小平台上,平台周边注水,水深

1.5 cm,水温维持在(22±2)℃。大鼠在平台上可以自由活动,一旦动物进入睡眠状态就会因为肌肉舒张、松弛而落入水中,大鼠不得休息。将大鼠置于水平台,进行部分睡眠剥夺,大鼠不得休息。方形水槽大小为 112 cm×62 cm×41 cm,其内设置的 15 个小平台直径 8 cm,高 10 cm。

1.6 分组及给药

采用随机数字表将 36 只大鼠分为正常组、模型组、高剂量组(脾虚四号方临床等效剂量的 2 倍)、中剂量组(脾虚四号方临床等效剂量)、低剂量组(脾虚四号方临床等效剂量的 0.5 倍)及西药对照组(思密达临床等效剂量),每组 6 只。造模成功后,按每 100 g 体重大鼠给药 1 ml 以脾虚四号方(参苓白术散加减)或思密达(蒙脱石散)或生理盐水灌胃 7 d。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色结果

镜下各组结肠黏膜结构基本正常,上皮细胞排列整齐,黏膜固有层中含有大量管状大肠腺,大肠腺除吸收细胞和杯状细胞外,在腺体底部有少量未分化细胞和内分泌细胞。固有层内散在的孤立淋巴小结。

2.2 透射电镜结果

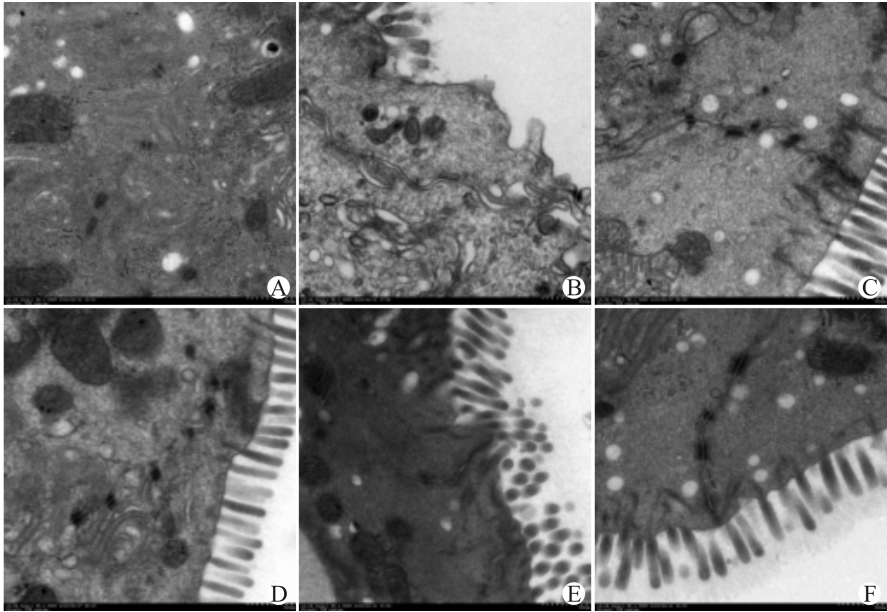
微绒毛的变化:相对于正常组,模型组结肠上皮细胞损伤明显,微绒毛形态不规则且部分缺失,细胞膜破坏,出现裸核,次级溶酶体,细胞器溢出细胞外;西药组结肠黏膜上皮细胞微绒毛形态规整,细胞器结构正常,近似于正常组表现;高剂量组结肠黏膜上皮细胞微绒毛形态较为规整,中、低剂量组肠黏膜上皮细胞微绒毛则表现出长短不一的情况。

细胞连接的变化:相对于正常组,模型组结肠上皮细胞连接的缝隙连接明显增宽,视野下桥粒数量减少。西药组、高中低剂量组细胞连接也有增宽,但相对于模型组有明显改善,其中以西药组改善最为明显。

线粒体的变化:相对于正常组,模型组结肠上皮细胞线粒体内嵴模糊不清、肿胀、空泡化、形态不规则、线粒体膜亦不清晰。西药组线粒体肿胀明显,高、中、低剂量组存在线粒体电子密度增高,中、低剂量组相较于高剂量组,线粒体更接近正常。见图 1。

2.3 电镜下的特殊结构

中药组中低剂量组结肠黏膜观察到多处蕈状突起,大小是微绒毛的数十倍,有其独立的薄膜包被,基底部与上皮细胞分界明显,内部结构不明显,有些可见多个分区,电子密度略有不均匀,与临近上皮细胞胞质无明显差异,可观察到个别的与上皮细胞分离、脱落现象。见图 2。



A: 正常组; B: 模型组; C: 西药组; D: 低剂量组; E: 中剂量组; F: 高剂量组。
图 1 各组结肠黏膜透射电镜下微观形态

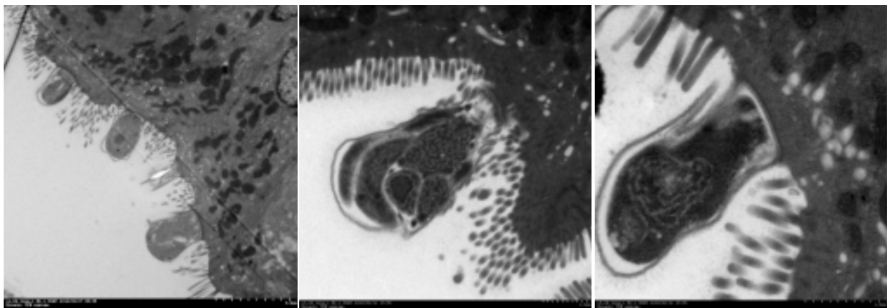


图 2 电镜下茸状突起

3 讨论

正常生理情况下,结肠腺呈直管状,长约 0.5 mm,主要由未成熟的吸收细胞、杯状细胞、未分化细胞和内分泌细胞组成。结肠腺中的吸收细胞顶面的微绒毛相对较短,终末网不发达,顶端胞质中含有大而清亮的小泡,当吸收细胞迁移到黏膜表面时,小泡消失,接近肠腺开口处的吸收细胞微绒毛增多、变长,至黏膜表面时完全成熟^[2]。结肠吸收细胞的主要功能是吸收水分和电解质,在吸收 Na^+ 和 Cl^- 的同时,伴有水分的被动吸收,吸收细胞基底侧膜上有丰富的钠钾 ATP 酶,可将细胞内的 Na^+ 泵出进入血液。结肠黏膜的吸收功能可能会因细胞结构的破坏、肠内环境的改变等因素而降低,造成水、电解质吸收障碍,引起便秘或者腹泻。

本研究通过高乳糖饲料喂养^[3-4]复合水环境小平台站立^[5]的方法造成腹泻模型,模拟了现代人们长期饮食不节、精神紧张疲劳的生活状态。高乳糖饲料喂养会导致大量未消化的乳糖聚积在大鼠肠道内,形成高渗环境,使肠内渗透压增高而吸收大量水

分,引起渗透性腹泻;而水环境小平台站立法可以导致大鼠精神、肌肉紧张,属于应激状态。两种造模方法均未直接刺激胃肠黏膜,不会造成明显的器质性损伤,这正与实验结果相一致:各组结肠组织苏木精-伊红染色后在光学显微镜下未发现明显异常,组织形态良好。

随着放大倍数的进一步增大,透射电镜下的各组之间的组织黏膜超微结构表现出不同,特别是正常组与模型组之间。相对于正常组,模型组结肠上皮细胞损伤明显,细胞膜破坏,微绒毛形态不规则且部分缺失,出现次级溶酶体,细胞器溢出细胞外,线粒体内嵴模糊不清、肿胀、空泡化、形态不规则、电子密度改变、线粒体膜亦不清晰。杯状细胞分泌异常活跃,腺腔内囊泡融合,考虑黏液分泌量较大,腔内压力大造成。细胞连接的缝隙连接明显增宽,视野下桥粒数量减少。

这些结构的变化势必会影响细胞的功能,细胞膜的破坏会直接增加黏膜对水、电解质等物质的通透性,使跨细胞转运增加而屏障作用减弱。微绒毛

是肠上皮细胞吸收物质的主要部位,不论微绒毛的长度还是数量,都与细胞的代谢强度有着相应的关系^[6]。模型组上皮细胞的微绒毛形态不规整,长短粗细不一,有些出现肿胀、短缩,使有效的吸收面积减少,不利于物质的吸收,同时也可能意味着细胞的代谢异常。而西药组、中药高中低剂量组细胞的微绒毛相对于模型组则有明显改善,特别是西药组和高剂量组更为接近正常细胞的微绒毛形态,中、低剂量组视野内可观察到微绒毛长短不一,且以中剂量组为明显。

线粒体是细胞生物氧化的主要场所,三羧酸循环、呼吸链电子传递和氧化磷酸化等产能过程均在此进行,其结构的异常直接影响着细胞的能量代谢。线粒体是由双层膜包围的封闭囊状细胞器,内膜向内形成许多折叠,称线粒体嵴,线粒体嵴的长短、数量及排列方式与细胞的生理病理状态密切相关^[7]。相对于正常组,模型组结肠上皮细胞线粒体肿胀、空泡化、形态不规则、嵴模糊不清、外膜亦不清晰,这些都意味着线粒体功能降低,可能是组织缺血、缺氧或者是其他物理因素的影响。若线粒体功能障碍,则 ATP 产生减少,钠泵活性受抑制,大量水钠进入细胞,结果是细胞内水含量增加,整个细胞肿胀。但损害因素一旦得到改善,细胞、线粒体肿胀是可以恢复的。西药组线粒体肿胀明显,电子密度降低,可能西药并没有改善细胞内缺血、缺氧的状态,没能修复能量代谢的异常。而高、中、低剂量组,线粒体电子密度均有增高,线粒体可能处于功能活跃状态,这就有可能意味着中药复方可以改善细胞内的能量代谢,修复受损的细胞功能。

细胞连接是细胞间的联系结构,是细胞质膜局部区域特化形成的,种类较多,常见的几种类型包括:紧密连接、粘附连接、缝隙连接等等。细胞连接是相邻细胞之间通过细胞膜相互联系、协同作用的重要组织方式,对于维持组织的完整性非常重要,有的还具有细胞通讯作用^[8]。特别是紧密连接,可以防止细胞外大分子物质经细胞间隙进入组织,也可以有效防止深部组织的某些物质成分的外溢,是肠黏膜机械屏障的重要组成部分。本研究模型组结肠上皮细胞连接的缝隙连接明显增宽,视野下紧密连接、桥粒数量减少,这就是结肠黏膜对水、电解质等物质的通透性增加,当肠腔内出现高渗环境时组织液将更容易进入肠腔内,形成腹泻。而药物干预后的结肠黏膜,其细胞间隙虽然仍有增宽的情况,但相较于模型组已明显改善,其中西药组和中药低剂量组细胞连接结构明显、视野内数量相对较多,说明西药蒙脱石散和参苓白术散加减的中药复方可以有

效改善大鼠腹泻模型结肠黏膜细胞的细胞连接情况。

综上所述,高乳糖饲料喂养复合水环境小平台站立法造成的大鼠腹泻模型,虽然在光学显微镜下没有观察到明显的异常,但在细胞的超微结构上还是显示出了明显的差异,说明这种造模方法造成的腹泻会在超微观结构方面引起大鼠结肠黏膜上皮细胞的损伤,而无论是西药蒙脱石散还是中药复方的干预都在一定程度上改善了损伤情况。在维持微绒毛形态、细胞连接完整性方面,西药和中药复方可能都发挥了相应的作用,但在改善细胞能量代谢方面,中药复方的优势体现得更加明显。所以,参苓白术散加减的中药复方可能可以通过提高线粒体功能、改善肠上皮细胞微绒毛数量和形态以及改善细胞连接的结构与功能等方面调节结肠吸收分泌功能,增强水、电解质的吸收,从而减少粪便中的含水量,达到止泻的目的。

关于脾虚四号方干预后观察到的特殊结构,突起细胞外,如蘑菇状,大小约是微绒毛的数十倍,单个微绒毛肿胀形成这种结构的可能性较小,而且其有其独立的薄膜包被,基底部与上皮细胞分界明显,基本排除正常微绒毛的可能性。其内部结构不明显,有些可见多个分区,电子密度不均匀,但看不出有类似细胞器的结构,直径有大概 $1\sim 1.5\ \mu\text{m}$,长度大概有 $2\sim 3\ \mu\text{m}$,虽然多处突起的形状并不一致,但也不能排除细菌等微生物的可能性。其电子密度与临近上皮细胞胞质无明显差异,而且个别视野可观察到突起结构与上皮细胞分离、脱落的现象,不能排除为上皮细胞自身局部结构损伤脱落的情况。以上几种推测,细菌的可能性相对较大,这些特殊结构的出现是否与中药复方的干预有关,是否与腹泻的发生相关联,都需要进一步的深入研究与探讨。

参考文献

- [1] 姚 琴,曹济民,樊小力,等.生理学[M].北京:人民卫生出版社,2005:289—291.
- [2] 郭顺根,徐维蓉,刘黎青,等.组织学与胚胎学[M].北京:人民卫生出版社,2006:113—113.
- [3] WANJHIA V W, OHMINAMI H, TAKETANI Y, et al. Induction of the hepatic stearyl-CoA desaturase 1 gene in offspring after isocaloric administration of high fat sucrose diet during gestation[J]. Clin Biochem Nutr. 2013, 53:150—157.
- [4] BUENO J, TORRES M, ALMENDROS A, et al. Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhoea. Histological and ultrastructural changes[J]. Gut, 1994, 35:926—933.

药组成,具有芳香化浊、理气止痛、健胃导滞功效,主要用于各种原因引起的腹泻、腹痛、肠炎以及菌痢等胃肠道疾病的治疗^[9]。腹泻型 IBS 患者肠道感染恢复后仍存在持续慢性炎症反应,临床以腹痛、腹胀、腹部不适、黏液稀便为主要表现,但便常规及便培养又无明显感染征象,故不适于长期应用抗生素及解痉、止泻等药物治疗。本研究发现,胃肠安丸用于腹泻型 PI-IBS 疗效显著,这与其理气止痛、温胃降浊、和中导滞的功效密不可分,组方配伍注重攻补兼施、寒热并用,体现了中医治病“通因通用”的原则。

马来酸曲美布汀是一种胃肠道运动调节剂,能直接选择性作用于消化道平滑肌的钙通道和钾通道,在交感神经兴奋状态下(消化道平滑肌收缩功能低下),马来酸曲美布汀可通过对肌间神经阿片受体的肾上腺素能神经 α 受体的作用来抑制去甲肾上腺素的游离,使乙酰胆碱的游离增加,最终达到促进平滑肌收缩目的。在副交感神经兴奋状态下(消化道平滑肌亢进),马来酸曲美布汀可通过对肌间神经丛阿片受体的胆碱能神经 K 受体的作用来抑制乙酰胆碱的游离,使乙酰胆碱的游离减少,从而达到抑制平滑肌收缩的目的,双向调节改善平滑肌运动异常所致的消化道症状。复方嗜酸乳杆菌片含有中国株嗜酸乳杆菌、日本株嗜酸乳杆菌、粪链球菌和枯草杆菌四种活菌成分,通过直接补充肠道正常生理菌群,分解糖类产生乳酸,提高肠道酸度,抑制肠道致病菌繁殖,改善肠道菌群失调,合成多种维生素及生物酶,维持正常新陈代谢,恢复肠道微生态平衡,提高机体免疫功能产生治疗效果^[10]。

通常治疗腹泻型 PI-IBS 主要以解痉、止泻、保护肠黏膜为主要方案,这种治疗对缓解症状有一定作用,但总体来说疗效不理想,易复发,严重影响患者生活质量。本研究通过 76 例腹泻型 PI-IBS 患者临床治疗观察结果证实,胃肠安与肠道活菌制剂联合,既能理气止痛、化浊导滞,又可调整患者肠道菌群失调,二者联合治疗腹泻型 PI-IBS 比单用马来酸曲美布汀疗效显著,值得临床推广应用。

参考文献

[1] THABANE M, MARRSHALL J K. Post infectious irritable bowel syndrome[J]. 世界胃肠病学杂志(英文版), 2009, 15:3591—3596.

[2] SPILLER R, GARSED K. Postinfectious irritable bowel syndrome[J]. Gastroenterology, 2009, 136: 1979—1988.

[3] MARSHALL J K, THABANE M, GARG A X, et al. Walkerton health study investigators. Eight year prognosis of postifectious irritable bowel syndrome following waterborne bacterial dysentery[J]. Gut, 2010, 59: 605—611.

[4] POKKUNURI V, PIMENTEL M, MORALES W, et al. Role of cytolethal distending toxin in altered stool form and bowel phenotypes ins rat model of postinfectious irritable bowel syndrome[J]. Neurogastro enterol Motil, 2012, 18:434—442.

[5] CHEN J, ZHANG Y, DENG Z. Imbalanced shift of cytokine expression between T helper 1 and T helper 2 (Th1/Th2) in intestinal mucosa of patients with Postinfectious irritable bowel syndrome[J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12:91—91.

[6] QIN H Y, XIAO H T, LEUNG F P, et al. JCM-16021, a chiese herbal formula, attenuated visceral hyperalgesia in tnbs-induced postinflammatory irritable bowel syndrome through reducing colcnicec cell hyperplasia and serotonin availability in rats[J]. Ecid Basde Complement Alternat Med, 2012:239638.

[7] MOTOMURA Y, GHIA J E, WANG H, et al. Enterochromaffin cell and 5-hydroxytryptamine responses to the same infectious agent differ in Th1 and Th2 dominant environments[J]. Gut, 2008, 57:475—481.

[8] 胡乐义,王巧民,姜彬言,等. 肠易激综合征患者肠道菌群的变化及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(1):86—88.

[9] 胡瑞,唐方. 胃肠安丸对肠易激综合征大鼠血清电解质、VIP 的影响[J]. 陕西中医, 2010, 31(7):914—916.

[10] 刘方,王承党. 肠道感染和肠道菌群与肠易激综合征[J]. 国际消化病杂志, 2008, 28(1):23—23.

(上接第 4 页)

[5] SUCHECKI D, TUFK S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat[J]. Physiol Behav, 2000, 68:309—316.

[6] LANGE K. Role of microvillar cell surfaces in the regulation of glucose uptake and organization of energy metabolism[J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2002, 282:C1—26.

[7] COGLIATI S, FREZZA C, SORIANO M E, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency [J]. Cell, 2013, 155:160—171.

[8] LIU Y, NUSRAT A, SCHNELL F J, et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction re-sealing in epithelia[J]. J Cell Sci, 2000, 113:2363—2374.