

银杏叶复方对肉兔小肠黏膜形态及上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量的影响

李 焰^{1,2}, 王 华^{1,2}, 尹会方^{1,2}, 黄其春^{1,2}, 邱木兰¹, 张继欣¹

(1. 龙岩学院生命科学学院, 龙岩 364000; 2. 福建省高校预防兽医学重点实验室, 龙岩 364000)

摘 要: 为研究银杏叶复方对肉兔小肠黏膜形态及上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量的影响, 试验选择 40 只 30 日龄统一断奶的雌性健康新西兰兔, 随机分为 4 组, 每组 5 个重复, 每个重复 2 只。基础日粮为玉米-豆粕-草粉型, 其中对照组 I 组饲喂基础日粮, 试验 II、III、IV 组饲喂分别在基础日粮中添加 0.50%、1.00% 和 1.50% 的银杏叶复方, 试验期 30 d。结果表明, 1.00% 和 1.50% 银杏叶复方组的空肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度(V/C)显著高于对照组 ($P < 0.05$), 0.50% 和 1.00% 组回肠 V/C 比值也显著高于对照组 ($P < 0.05$); 1.00% 和 1.50% 银杏叶复方组的空肠淋巴细胞数量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 0.50% 银杏叶复方组的十二指肠杯状细胞数量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。基于试验结果推断: 饲料中添加 1.00% 的银杏叶复方制剂, 可维持和养护断奶肉兔的小肠黏膜组织。

关键词: 银杏叶复方; 断奶肉仔兔; 肠黏膜形态; 淋巴细胞; 杯状细胞

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0529-05

Influence of *Ginkgo biloba* compound on the morphology of small intestine mucosa and the number of intraepithelial lymphocytes and goblet cells in meat rabbits

LI Yan^{1,2}, WANG Hua^{1,2}, YIN Hui-fang^{1,2}, HUANG Qi-chun^{1,2}, QIU Mu-lan¹, ZHANG Ji-xin¹

(1. Collge of Life Science of Longyan University, Longyan 364000;

2. Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Educational Commission of Fujian Province; Longyan 364000)

Abstract: To study *Ginkgo biloba* compound on the morphology of small intestine mucosa and the number of intraepithelial lymphocytes and goblet cells in meat rabbits, forty 30-day-old New Zealand weaned female rabbits were randomly divided into four groups, five repetitions in each group and two in each repetition. All the animals were fed with the mixture of corn-soybean-grass meal as basal diet, while the control group I was fed with the basal diet, and the testing group II, III and IV were fed with the basal diet with 0.50%, 1.00% and 1.50% of the *Ginkgo biloba* compound, respectively, for thirty days. The results showed that the animals fed with 1.00% and 1.50% of *Ginkgo biloba* compound exhibited a significant higher jejunal villus and V/C were higher than that of the control group ($P < 0.05$), as well as 0.50% and 1.00% *Ginkgo* compound group showed much more ileac V/C than the control group ($P < 0.05$). Similarly, 1.00% and 1.50% *Ginkgo biloba* compound group showed much more jejunal lymphocytes, and 0.50% *Ginkgo biloba* compound group showed more duodenal goblet cells than the control group ($P < 0.05$). The data suggested that *Ginkgo biloba* compound at 1.00% dosage could conserve and maintain their intestinal mucosa in the meat rabbits.

Key words: *Ginkgo biloba* compound; weaned pediatric rabbits; intestinal mucosa morphology; lymphocytes; goblet cells

银杏叶味甘、苦、涩, 性平, 主要具有敛肺平喘、活血化瘀止痛的作用。银杏叶片是利用现代制药工艺从传统中药银杏的叶中提取有效成分研制而

成的中成药制剂。其提取的有效成分主要为黄酮类物质和萜内酯类, 因其广泛的现代药理学作用, 已被广泛应用于临床各科^[1]。但由于提取工艺复杂、

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 福建省科技厅自然科学基金项目 (2012J01142) 和福建省科技厅科技重点项目 (2011N0024) 共同资助。

作者简介: 李 焰, 女, 副教授。E-mail: 529783204@qq.com

成本高无法将其开发为新型饲料添加剂。中医讲究辨证施治,通过扶正祛邪,调整肺腑功能而使阴阳平衡,体现了其整体性、灵活性、有目的性的特征。因此利用我国银杏叶这一优势资源,遵循中药配伍的相须、相使原则,开发出新的银杏叶复方,通过合理搭配,使银杏叶更能发挥药效,适合在生产中加以推广,是我们研究的目的。前期研究中,以健脾益气、养阴活血化痰中医理论为指导,将经典的健脾益气方“四君子汤”进行化裁,利用银杏叶与党参、黄芪、白术等中草药配制成银杏叶复方制剂,研究了银杏叶复方对预防实验性脾虚证小鼠各种生理机能的影响,结果表明银杏叶复方具有提高脾虚小鼠消化酶活性、促进肠道吸收功能和抗疲劳作用^[2-3]。对脾虚模型小鼠的免疫功能研究表明,脾虚小鼠存在神经-内分泌-免疫网络之间的调节失衡,最终引起脾虚时的机体免疫功能低下,经银杏叶复方治疗后上述免疫失调得到明显纠正^[4]。在此基础上,本试验旨在研究银杏叶复方对肉兔小肠黏膜形态及上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量、分布的影响,为科学利用我国银杏叶这一优势资源、研究一种以银

杏叶为主的中草药饲料添加剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 银杏叶复方的制备

银杏叶干粉由长沙博健生物科技有限公司提供,产品标准号:Q/ADPG001-2008;黄芪、党参、白术、茯苓购于福建紫金医药连锁有限公司,质量符合中华人民共和国兽药典(2005版)标准。上述5种药物经植物粉碎机粉碎,过12目筛,按照5:2:1:1:1的比例混匀。

1.2 试验设计与动物分组

40只30日龄统一断奶的健康新西兰兔,全部为雌性,随机分为4组,每组5个重复,每个重复2只。基础日粮为玉米-豆粕-草粉型,具体配方见表1。其中试验I组为对照组饲喂基础日粮,试验II、III、IV组饲喂分别在基础日粮中添加0.50%、1.00%和1.50%的银杏叶复方。各组饲粮原料经粉碎,按不同组别混匀,制成直径为8mm颗粒料。试验期30d,试验兔自由采食,日常管理按常规进行。

表1 基础饲粮组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (DM basis)

原料% Ingredient	组成 Composition	营养水平 Nutrient level	组成 Composition
苜蓿草粉/% Alfalfa meal	25.7	消化能 DE/MJ·kg ⁻¹	11.90
玉米/% Corn	20	粗蛋白质/% Crude protein	19.37
豆粕/% Soybean meal	20	粗纤维/% Crude fibre	9.82
麸皮/% Wheat bran	15	钙/% Calcium	0.50
米糠/% Rice bran	15	总磷/% Total P	0.58
食盐/% NaCl	0.3	赖氨酸/% Lys	0.99
预混料/% Premix	4	蛋氨酸/% Met	0.26

1.3 指标检测和方法

第30天饲养试验结束后,禁食1夜,于次日上午从每个重复组取1只仔兔断颈处死后分别从十二指肠、空肠和回肠中段切取约1cm²大小的组织样,用生理盐水冲洗净残余物,置于含甲醛4%的福尔马林液中固定,经脱水、浸蜡、包埋、切片等处理步骤、再经H.E染色,用中性树胶进行封片。

1.3.1 绒毛长度和隐窝深度的测定 光镜下观察比较各重复组肠黏膜形态结构,并应用Motic Images Plus 2.0照相处理软件,测量每个样品每个肠段的5根最长肠绒毛长度和5个最深隐窝深度进行统计,取其平均值。绒毛长度为肠腺开口至绒毛顶端的垂直高度,隐窝深度为绒毛根部上皮凹陷到固有层的距离。

1.3.2 小肠上皮内淋巴细胞和杯状细胞的测定 选3根绒毛完好、走向平直的绒毛,计数每100个肠

黏膜柱状上皮细胞间的上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量,求各重复组各肠段的平均值^[5]。

1.4 数据处理

采用SPSS10.0软件进行One-Way ANOVA分析和Duncan氏多重比较,结果以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 银杏叶复方对肉兔小肠黏膜形态的影响

光镜观察结果见图1~图3。小肠黏膜形态的结果见表2。

由图1可见,对照组十二指肠绒毛呈低矮、不规则排列,各试验组十二指肠绒毛较对照组高,其中添加1.00%组的十二指肠绒毛排列紧密且有规则。

由图2可见,各试验组绒毛上皮细胞总体呈正常更新状态,绒毛排列密集有规则,绒毛边缘较完

整, 无明显脱落现象, 1.00%银杏叶复方组空肠绒毛排列整齐, 绒毛较宽、隐窝较浅、结构清晰, 1.50%次之, 对照组绒毛有明显的脱落现象, 绒毛周边不完整, 上皮层与固有层有分离现象, 排列稀疏且不规则。

由图 3 可见, 各试验组回肠绒毛长度均长于对照组, 回肠绒毛呈正常更新状态, 无绒毛脱落, 排列整齐且有规则; 对照组绒毛短, 有绒毛脱落现象, 排列较散乱。

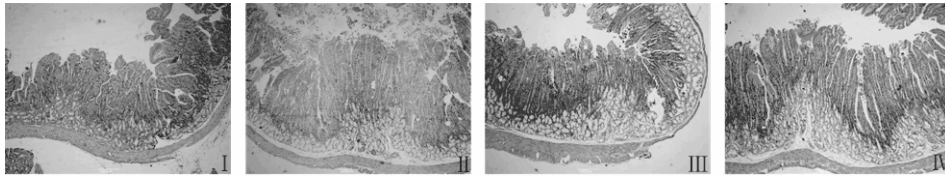


图 1 各组十二指肠光镜图

Figure 1 The light microscope photograph of duodenum in the four groups (40×)

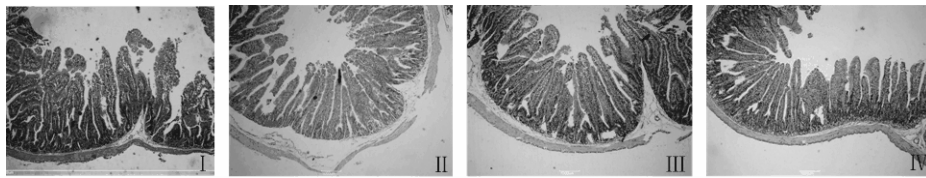


图 2 各组空肠光镜图

Figure 2 The light microscope photograph of jejunum in the four groups (40×)

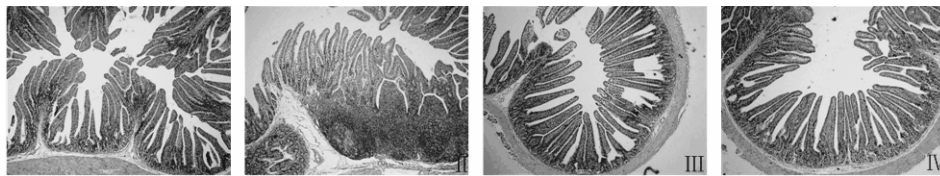


图 3 各组回肠光镜图

Figure 3 The light microscope photograph of ileum in the four groups (40×)

表 2 银杏叶复方对肉兔小肠黏膜形态的影响

Table 2 Effects of *Ginkgo biloba* compound on the morphology of small intestine mucosa in meat rabbits

形态 Pattern	项目 Item	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III	IV 组 Group IV
绒毛高度/ μm Villus height	十二指肠 Duodenum	1 166.60 \pm 141.63	1 174.98 \pm 165.06	1 251.16 \pm 254.42	1 218.05 \pm 423.25
	空肠 Jejunum	1 141.63 \pm 91.27 ^a	1 059.76 \pm 109.36 ^a	1 774.82 \pm 203.81 ^b	1 544.66 \pm 314.46 ^b
	回肠 Ileum	971.60 \pm 238.52	1 134.86 \pm 293.86	1 292.92 \pm 159.44	1 109.73 \pm 268.06
隐窝深度/ μm Crypt depth	十二指肠 Duodenum	241.37 \pm 28.34	209.10 \pm 27.75	212.59 \pm 48.48	222.09 \pm 37.01
	空肠 Jejunum	264.53 \pm 43.75 ^c	198.41 \pm 23.99 ^a	247.65 \pm 6.99 ^{bc}	216.39 \pm 16.34 ^{ab}
	回肠 Ileum	250.09 \pm 42.99	222.89 \pm 51.55	245.82 \pm 42.61	240.00 \pm 28.99
绒毛高度/隐窝深度 V/C	十二指肠 Duodenum	4.93 \pm 1.14	5.64 \pm 0.47	6.18 \pm 2.29	5.58 \pm 2.02
	空肠 Jejunum	4.32 \pm 0.95 ^a	5.20 \pm 1.21 ^a	7.16 \pm 0.74 ^b	7.29 \pm 1.31 ^b
	回肠 Ileum	3.89 \pm 0.79 ^a	5.07 \pm 0.36 ^b	5.37 \pm 0.96 ^b	4.57 \pm 0.65 ^{ab}

注: 同行不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: In the same row, the date followed with different small letters mean significant difference at the 0.05 level. The same below.

如表 2 所示, 与对照组相比, 各试验组的十二指肠和回肠绒毛高度均高于对照组 ($P>0.05$), 1.00%和 1.50%银杏叶复方组的空肠绒毛高度显著高于对照组 ($P<0.05$)。与对照组相比, 各试验组的十二指肠和回肠隐窝深度均低于对照组 ($P>0.05$), 0.50%和 1.50%银杏叶复方组的空肠隐窝深度显著

低于对照组 ($P<0.05$)。与对照组相比, 各试验组的十二指肠绒毛高度与隐窝深度比值均高于对照组 ($P>0.05$), 1.00%和 1.50%银杏叶复方组的空肠绒毛高度与隐窝深度比值显著高于对照组 ($P<0.05$), 0.50%和 1.00%银杏叶复方组的回肠绒毛高度与隐窝深度比值也显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表3 银杏叶复方对肉兔上皮内淋巴细胞数量和杯状细胞数量的影响

Table 3 Effects of *Ginkgo biloba* compound on the number of intraepithelial lymphocytes and goblet cells in meat rabbits

细胞数量 Cells number	项目 Item	I组 Group I	II组 Group II	III组 Group III	IV组 Group IV
淋巴细胞 Lymphocyte	十二指肠 Duodeum	4.40±1.50	7.06±2.43	5.66±1.31	6.07±3.54
	空肠 Jejunum	5.75±1.02 ^a	6.85±1.76 ^{ab}	9.25±1.11 ^c	9.13±1.69 ^{bc}
	回肠 Ileum	6.93±1.87 ^a	8.28±2.81 ^a	12.85±0.83 ^b	8.80±1.15 ^a
杯状细胞 Goblet cell	十二指肠 Duodeum	4.08±0.29 ^a	6.14±0.83 ^b	5.15±1.14 ^{ab}	4.63±0.58 ^a
	空肠 Jejunum	5.72±1.09	6.40±2.49	6.16±1.81	5.00±2.25
	回肠 Ileum	6.80±0.95	5.18±0.43	6.46±0.78	6.57±3.96

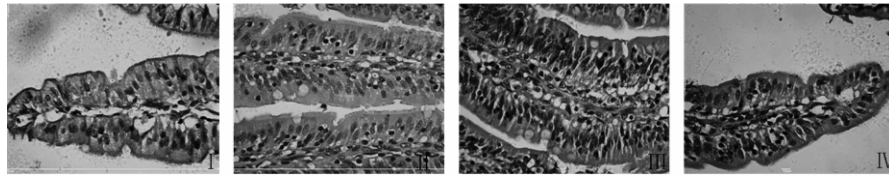


图4 各组空肠淋巴细胞光镜图(400×)

Figure 4 The light microscope photograph of the number of jejunum lymphocyte in the four groups

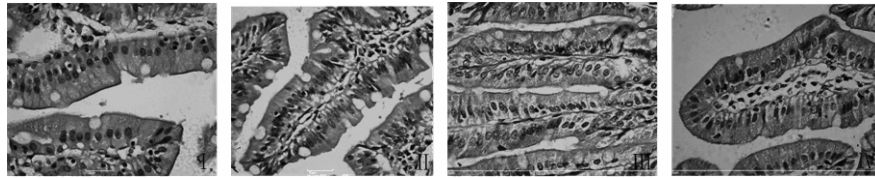


图5 十二指肠杯状细胞光镜图(400×)

Figure 5 The light microscope photograph of the number of duodeum goblet cell in the four groups

2.2 银杏叶复方对肉兔上皮内淋巴细胞数量和杯状细胞数量的影响

如表3所示,与对照组相比,各试验组的十二指肠淋巴细胞数量均高于对照组($P>0.05$),1.00%和1.50%银杏叶复方组的空肠淋巴细胞数量显著高于对照组($P<0.05$),见图4;1.00%银杏叶复方组的回肠淋巴细胞数量显著高于对照组($P<0.05$)。各试验组的空肠和回肠杯状细胞数量与对照组相比差异不显著($P>0.05$),0.50%银杏叶复方组的十二指肠杯状细胞数量显著高于对照组($P<0.05$),见图5。

由图4可以看出,对照组的肠黏膜上皮细胞大体上呈单层排列,部分绒毛的上皮细胞排列不规则呈散乱分布,细胞轮廓不清晰,散在于上皮内的淋巴细胞数量较各试验组少;各试验组的上皮层和固有层界限较清楚,上皮内淋巴细胞以小型淋巴细胞为主,为染色较深的近似小圆点,淋巴细胞分布较对照组更加密集,以试验III组空肠的上皮内淋巴细胞数量最多。

由图5可以看出,柱状细胞呈高柱状,胞核椭圆形,靠近细胞基部;杯状细胞呈高脚杯状,散在于柱状细胞之间,观察呈散在的空泡;对照组上皮层和固有层有分离现象,而各试验组上皮细胞核排

列紧密,单层整齐排列,杯状细胞轮廓清晰,其中试验II组十二指肠的杯状细胞数量较多。

3 小结与讨论

绒毛长度、隐窝深度、绒毛高度/隐窝深度(V/C)比值是衡量肠道消化吸收功能的重要指标。肠绒毛是吸收养分的主要组织,绒毛长度与肠上皮细胞数量有关,绒毛萎缩、面积减少,意味着绒毛成熟细胞减少,吸收功能降低;V/C比值综合反映小肠的功能状态,比值下降,表明小肠黏膜结构和功能受损^[6-7]。兔消化道不同部位在肠道健康和营养物质消化吸收中发挥不同作用,十二指肠和空肠主要吸收糖类、脂肪和蛋白质的消化产物,回肠则主要吸收胆盐,而挥发性脂肪酸在盲肠和结肠处吸收^[8]。本试验中,1.00%和1.50%银杏叶复方组的空肠绒毛高度和V/C比值显著高于对照组,0.50%和1.00%组的回肠V/C比值也显著高于对照组,表明饲料中添加适量的银杏叶复方,可维持和养护断奶肉兔的小肠黏膜组织。

黏膜免疫系统是机体免疫系统的重要组成部分,它在机体防御功能方面发挥着独特的作用,近年来日益受到重视。肠上皮内淋巴细胞是肠黏膜免

疫系统的前沿守护者,分泌细胞因子,防御病原体侵入黏膜等作用^[9],因此小肠上皮内淋巴细胞的数量可以反映小肠局部黏膜免疫屏障的完整及免疫防御功能的完善程度。杯状细胞是重要的免疫相关细胞,它可分泌黏液对肠黏膜上皮起润滑保护作用,且有研究表明,杯状细胞可能在肠黏膜损伤后的重建过程中起关键作用。因此,一定数量的杯状细胞对于维持黏膜屏障结构是不可少的^[10]。本试验中,1.00%和1.50%银杏叶复方组的空肠淋巴细胞数量显著高于对照组,0.50%银杏叶复方组的十二指肠杯状细胞数量显著高于对照组,说明一定水平的银杏叶复方制剂对肉兔肠道黏膜免疫细胞可能有保护作用。

综上所述,饲料中添加1.00%的银杏叶复方制剂对肉兔小肠黏膜结构可能有保护作用,其作用与银杏叶复方组方中有效成分有关。前期研究中,将经典的健脾益气方“四君子汤”进行化裁,利用银杏叶与党参、黄芪、白术等中草药配制成了银杏叶复方制剂^[2]。近年来的文献报道表明“四君子汤”对机体免疫系统具有多方面的调节作用^[11]。本试验复方中银杏叶性味甘、苦、涩、平,归心、肺经,有敛肺,平喘,活血化瘀,止痛之功效,现代药理学研究表明银杏叶提取物对大鼠肠黏膜屏障功能具有保护作用^[12];白术作为我国传统的中草药中“扶正固本”类补益药物,白术茯苓汤及提取分离组分对胃肠激素及肠道局部免疫有一定的调节作用^[13],黄芪为临床常用的补气药,具有益气固表、利水消肿的作用,主要成分为黄芪多糖和黄芪皂苷,它不仅能够通过提高巨噬细胞活性而发挥免疫调节作用,而且对肠缺血再灌注损伤所致肠黏膜屏障功能破坏有明显的保护作用^[14]。在前期研究中,采用利血平复制脾虚证小鼠模型,观察银杏叶复方制剂对实验性脾虚证模型小鼠内脏器官发育及其抗氧化酶活性的影响。结果表明:银杏叶复方有促进脾虚小鼠脾胃发育和促进肝脏的解毒作用,对脾虚模型小鼠的肾、肺功能亦有改善作用^[15]。中医认为,人体生命活动的基本形式就是气机的升降出入,而气机的升降出入又具体体现在各脏腑的功能活动及其之间的协调关系。脾胃位居中焦,是升降的枢纽,脾胃的升降影响着各脏腑的阴阳升降,因此脾胃健运,脏腑才能和顺协调,元气才能充沛,生机才能洋溢活跃^[16]。再就五行生克关系而言,心属火,脾属土,火又生土,故银杏叶有利脾之功效。而方中黄芪、党参、白术、茯苓均为补气健脾药,黄芪补脾肺之气,升

阳固表;党参长于补中;茯苓兼能除湿,中湿得除,脾自健运;白术温运脾阳,燥湿利水,使方温而不燥。所以五味药相须相使,相得益彰^[3]。

参考文献:

- [1] 商丹,彭飞,赵艳芳. 银杏叶片临床应用研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(14): 1584-1585.
- [2] 李焰,王华,周孝琼,等. 银杏叶复方对实验性脾虚证模型小鼠消化酶活性和抗氧化性能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(21): 52-55.
- [3] 李焰,杨小燕,黄其春,等. 银杏叶复方对脾虚证小鼠肠道推进功能、抗疲劳和抗氧化作用的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(2): 170-173.
- [4] 李焰,杨小燕,黄其春,等. 银杏叶复方对脾虚证小鼠细胞因子、免疫球蛋白和血浆内几种神经肽含量的影响[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(6): 82-87.
- [5] 闫金坤,陈耀星,王子旭. 雌激素对大鼠肠黏膜结构及上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量、分布的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(9): 1267-1271.
- [6] 林谦,戴求仲,宾石玉,等. 饲料添加益生菌与酶制剂对黄羽肉鸡生长性能的影响及相关机理[J]. 动物营养学报, 2012, 24(10): 1955-1965.
- [7] 朱惠玲,韩杰,谢小利,等. L-精氨酸对脂多糖刺激断奶仔猪肠黏膜免疫屏障的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(1): 27-31.
- [8] 白秀娟,刘诚刚,杜智恒,等. PCR-DGG 技术分析断奶仔兔肠道微生物菌群结构及多样性[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(9): 64-69.
- [9] Reagley K W, Husband A J. Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function [J]. Crit Rev Immunol, 1998, 18: 237-254.
- [10] 常建星,陈双,蒋龙元,等. 小肠杯状细胞在大鼠休克后肠黏膜重建中的作用[J]. 中华胃肠外科杂志, 2005, 8(6): 510-512.
- [11] 王禾,张建华. 四君子汤免疫药理作用的研究进展[J]. 北京中医, 1995, 14(3): 52.
- [12] 张建平,许利剑,徐凛峰,等. 银杏叶提取物对大鼠实验性重症胰腺炎肠黏膜屏障功能的影响[J]. 江苏医药, 2004, 30(1): 18-20.
- [13] 张楠,贾波,祝捷,等. 白术茯苓汤提取分离组分对脾气虚大鼠血浆胃肠激素及肠道局部免疫功能的影响[J]. 中国医药导报, 2009, 6(29): 17-19.
- [14] 刘远梅,孙有成,胡月光. 黄芪对幼兔缺血再灌注后肠黏膜细胞凋亡的影响及对肠黏膜屏障的保护[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(2): 142-144.
- [15] 李焰,杨小燕,王华,等. 银杏叶复方制剂对实验性脾虚证模型小鼠内脏器官发育及其抗氧化酶活性的影响研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(15): 3120-3124.
- [16] 刘静凌. 胃炎胃溃疡的发病与中医脾胃的关系[J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(15): 22-24.