

## 论著

文章编号:1000-5404(2013)21-2278-04

### 泻剂结肠大鼠模型阿片受体表达变化

吴劲松<sup>1,2</sup>, 刘宝华<sup>1</sup>, 童卫东<sup>1</sup>, 李凡<sup>1</sup>, 张安平<sup>1</sup>, 付涛<sup>1</sup>, 李春穴<sup>1</sup> (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科, 全军便秘诊治中心<sup>1</sup>; 050082 石家庄, 白求恩国际和平医院普通外科二科<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 探讨3种阿片受体亚型(MOR、DOR、KOR)在泻剂结肠大鼠模型结肠内的表达变化及意义。方法 使用7~8周龄Wistar大鼠20只,体质量(200±20)g,雌雄各半,按随机数字表法分为对照组( $n=10$ )及泻剂结肠组( $n=10$ ),单只分笼饲养(环境温度18~28℃,相对湿度40%~80%)。对照组饲以普通饲料,泻剂结肠组饲以含酚酞饲料。通过RT-qPCR及Western blot法对阿片受体在结肠中的表达进行相对定量分析。结果 3种阿片受体亚型在泻剂结肠组及对对照组大鼠结肠内均有不同程度的表达。RT-qPCR检测显示泻剂结肠组MOR、DOR及KOR mRNA相对表达水平均明显高于对照组[(5.093±1.410) vs (1.092±0.222), (2.612±0.612) vs (1.032±0.082), (2.607±0.327) vs (0.995±0.109),  $P<0.01$ ]。Western blot检测显示泻剂结肠组MOR、DOR及KOR的表达较对照组明显升高[(0.361±0.023) vs (0.152±0.021), (0.246±0.059) vs (0.159±0.005), (0.309±0.018) vs (0.201±0.015),  $P<0.01$ ]。结论 各阿片受体亚型在泻剂结肠大鼠结肠中表达均明显增强,提示其对泻剂结肠大鼠结肠运动及分泌功能可能存在明显的抑制作用。

**[关键词]** 阿片受体;便秘;泻剂;结肠;表达;大鼠

**[中图分类号]** R-332;R394.3;R574.62

**[文献标志码]** A

### Expression of opioid receptors in colon of cathartic colon rats

Wu Jinsong<sup>1,2</sup>, Liu Baohua<sup>1</sup>, Tong Weidong<sup>1</sup>, Li Fan<sup>1</sup>, Zhang Anping<sup>1</sup>, Fu Tao<sup>1</sup>, Li Chunxue<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of General Surgery, Center of Constipation, Diagnosis and Treatment, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; <sup>2</sup>Second Department of General Surgery, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang, Hebei Province, 050082, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the expression of 3 subtypes of opioid receptors,  $\mu$  (mu-opioid receptor, MOR),  $\delta$  (delta-opioid receptor, DOR), and  $\kappa$  (kappa-opioid receptor, KOR), in the colon of rats with cathartic colon. **Methods** Twenty Wistar rats of either sex at an age of 7 to 6 weeks, weighing 200±20 g were randomly divided into control group ( $n=10$ , fed with normal chow) and cathartic colon group [ $n=10$ , fed with 3 cycles of 200 mg/(kg·d) phenolphthalein first and then increased by this dose till 80% of rats having loose stool disappeared]. RT-qPCR and Western blotting were adopted to detect the expression of the 3 subtypes of opioid receptors. **Results** All 3 subtypes of opioid receptor were expressed distinctly in the colon between cathartic group and control group. RT-qPCR indicated that the expression of MOR, DOR and KOR at mRNA levels were significantly higher in cathartic colon group than in control group (5.093±1.410 vs 1.092±0.222, 2.612±0.612 vs 1.032±0.082, 2.607±0.327 vs 0.995±0.109,  $P<0.01$ ). While Western blot analysis showed their protein levels were in consistence with their mRNA levels between the 2 groups (0.361±0.023 vs 0.152±0.021, 0.246±0.059 vs 0.159±0.005, 0.309±0.018 vs 0.201±0.015,  $P<0.01$ ), showing that all 3 subtypes of opioid receptor expressed more intensively ( $P<0.001$ ). **Conclusion** Three subtypes of opioid receptors are enhanced in the cathartic colon, suggesting that colonic motility and secretion are significantly suppressed in slow transit constipation.

**[Key words]** opioid receptor; constipation; cathartics; colon; expression; rats

Supported by the International Cooperation Project of Chongqing (CSTC201110010), the National Natural Science Foundation of China (81100259) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA10061). Corresponding author: Liu Baohua, Tel: 86-23-68757956, E-mail: llh57268@163.com

**[基金项目]** 重庆市国际合作计划项目(CSTC201110010);国家自然科学基金(81100259);重庆市自然科学基金(CSTC2011jjA10061)

**[通信作者]** 刘宝华,电话:(023)68757956,E-mail: llh57268@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130926.1356.005.html>(2013-09-26)

泻剂结肠(cathartic colon)是慢传输型便秘(slow transit constipation,STC)的重要表现,其发生与STC患者长期服用刺激性泻剂(irritant laxative)关系密切。长期服用泻剂的STC患者结肠X线表现为结肠袋缩小或消失,肠腔管径呈非传输性的扩张、收缩,类似于病理性狭窄,多出现于右半结肠<sup>[1]</sup>。对泻剂结肠进行病理研究,发现其存在黏膜萎缩、表浅点状溃疡、慢性炎症导致的黏膜肌层反应性增厚、黏膜下脂肪样浸润及纤维化等表现<sup>[1]</sup>。STC作为一种“功能性”良性疾病,尽管其对患者的工作、生活均带来严重影响,但最终需要手术治疗的仍为少数,这给便秘研究带来困难。张连阳等<sup>[2]</sup>模拟STC患者长期服用刺激性泻剂的特点,建立了大鼠泻剂结肠模型,解决了STC研究所需的标本问题。Li等<sup>[3]</sup>的研究也证明泻剂结肠大鼠模型可实际应用于STC研究。

阿片受体分为 $\mu$ (mu-opioid receptor,MOR)、 $\delta$ (delta-opioid receptor,DOR)、 $\kappa$ (kappa-opioid receptor,KOR)3种亚型,均大量表达于肠道神经系统(enteric nerve system,ENS)<sup>[4-5]</sup>。目前,阿片类药物被广泛应用于中-重度疼痛的治疗,其对胃肠道功能的影响亦引起了研究人员的重视。在长期使用阿片类药物进行非肿瘤性疼痛治疗的患者中,约40%的患者有过便秘,而对照组仅有7.6%的患者发生便秘;在需要使用泻剂进行治疗的患者中,仅46%达到满意的疗效<sup>[6]</sup>。STC表现为重度胃肠道功能障碍,与阿片类药物所致的便秘表现有相似之处,提示肠道阿片受体表达数量、部位或活性的改变可能在STC病程中起着重要作用。本研究拟通过对阿片受体(MOR、DOR、KOR)在泻剂结肠大鼠模型结肠内的表达进行相对定量分析,探讨阿片受体在慢传输型便秘病程中所起的作用,旨在为进一步探索结肠阿片受体对STC患者的作用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

7~8周龄Wistar大鼠20只,由第三军医大学实验动物中心提供,体质量(200±20)g,雌雄各半,按随机数字表法分为对照组及泻剂结肠组各10只。各组大鼠单只分笼饲养,饲养环境温度18~28℃,相对湿度40%~80%。对照组饲以普通饲料,泻剂结肠组以混有酚酞的饲料喂养,起始剂量200mg/(kg·d),以后200mg/(kg·d)递增,直至出现半数大鼠粪便变稀,保持此剂量至80%的大鼠稀便消失,完成1个循环。在此基础上继续按200mg/(kg·d)递增剂量给药至半数大鼠粪便变稀。如此循环3次,待最后1次80%的稀便消失1周后停止给药,饲以普通饲料待处理。首次腹泻剂量为1200mg/kg,最终药物剂量为3400mg/kg。普通饲料饲养1周后,大鼠禁食24h(自由饮水)后断颈处死,取距回盲部约3cm处长约2cm结肠组织,置于-70℃保存备用。

### 1.2 材料与仪器

MOR(sc-27072)、KOR(sc-7493)、DOR(sc-7492)单克隆抗体(Santa Cruz,Dalaas,USA),分析纯酚酞(天津方正,批号20120320),Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒、SYBRGreen(Toyobo,Japan),RNA提取试剂TRNzol(北京天根)。2×PCR Mix Taq(北京天根)。蛋白定量仪、PAGE垂直电泳仪、凝胶成像系统、琼脂糖凝胶电泳仪(Bio-Rad),紫外分光光度计(Beckman),PCR仪(ABI)。

### 1.3 RT-qPCR检测

组织加液氮研碎,总RNA提取使用TRNzol提取试剂,严格按照说明书步骤操作。引物通过Primer Premier 5设计。 $\beta$ -actin为内参,上游引物:5'-ACCCCGTCTGCTGACCGAG-3',下游引物:5'-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3',片段长度249bp;DOR上游引物:5'-CCGTTCCGAGAGCTGCTGTG-3',下游引物:5'-GGGAACTGGAGCCTGCATAC-3',片段长度267bp;KOR上游引物:5'-TCCCTGTATCATCACCGCTGTC-3',下游引物:5'-CTCCAAAAGGCCAAGAATTCATCA-3',片段长度210bp;MOR上游引物:5'-ACCCCCGAAATGCCAAAAT-3',下游引物:5'-CCGGCATGATGAAAGCGAAGA-3',片段长度196bp。逆转录制备cDNA及RT-qPCR反应均在PCR System 7500中进行。2 $\mu$ g RNA用于逆转录反应,按照Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒说明进行操作。PCR反应体系:取逆转录的产物cDNA 2 $\mu$ L、上下游引物各0.5 $\mu$ L、2×PCR Mix Taq(北京天根)10 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7 $\mu$ L,共20 $\mu$ L加入RT-PCR扩增反应体系。反应条件:94℃预变性5min,94℃30s,57℃30s,72℃30s,30个循环,最后72℃延伸10min。每个样本取10 $\mu$ L按顺序进行琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad凝胶成像仪成像。取逆转录的产物cDNA 2 $\mu$ L、上下游引物各0.5 $\mu$ L、SYBRGreen 10 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7 $\mu$ L,共20 $\mu$ L加入RT-qPCR扩增反应体系。反应条件:94℃预变性5min,94℃30s,57℃30s,72℃30s,40个循环,最后72℃延伸10min。结果以对内参 $\beta$ -actin相对表达倍数表示。

### 1.4 Western blot检测

在液氮中研磨结肠组织成微末,取80mg组织粉末至1.5mL EP管中,每管加适量(约100 $\mu$ L/10mg)蛋白裂解液(50mmol/L Tris pH 7.4,150mmol/L NaCl,1% Triton X-100,1% Sodium Deoxycholate,0.1% SDS,1mg/mL Aprotinin)。冰上裂解20~30min,低温离心(4℃,12000r/min,15~20min)。取上清,装入新EP管中,以BCA法蛋白测浓度。蛋白样品行SDS-PAGE电泳分离并转至PVDF膜。转膜完成后TBST(20mmol/L Tris,140mmol/L NaCl,0.1% Tween-20,pH 7.6)洗膜1次,倒掉废液加适量5%脱脂奶粉,摇2h。TBST洗膜3次,每次10min。一抗孵育稀释,4℃过夜。转至室温摇置30min。TBST洗膜3次,每次10min。根据一抗加二抗,摇床摇2h。TBST洗膜3次,每次10min。 $\beta$ -actin蛋白作为内参,Bio-Rad凝胶成像系统成像,结果以各受体与 $\beta$ -actin电泳条带灰度值比值表示。

### 1.5 统计学分析

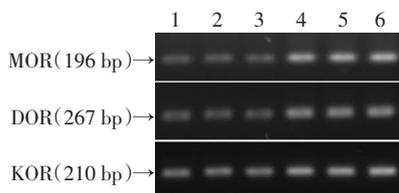
Quantity One软件处理RT-qPCR及Western blot图片,采集各条带光密度值,以目的条带与内参条带光密度的比值作为相对表达量。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 21.0统计软件,组间

差异行独立样本 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 RT-qPCR 检测 2 组大鼠结肠组织 MOR、KOR、DOR mRNA 的表达

RT-qPCR 检测显示, MOR、DOR 及 KOR mRNA 在两组大鼠结肠内均有表达(图 1)。泻剂结肠组 MOR、DOR、KOR mRNA 表达水平均较对照组明显升高( $P < 0.01$ , 表 1)。



1~3: 对照组; 4~6: 泻剂结肠组

图 1 RT-qPCR 检测检测 2 组大鼠结肠组织 MOR、DOR、KOR mRNA 的表达

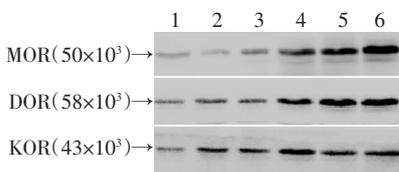
表 1 RT-qPCR 检测 2 组大鼠结肠组织 MOR、KOR、DOR mRNA 表达 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别	MOR	DOR	KOR
对照组	1.092 ± 0.222	1.032 ± 0.082	0.995 ± 0.109
泻剂结肠组	5.093 ± 1.410 <sup>a</sup>	2.612 ± 0.612 <sup>a</sup>	2.607 ± 0.327 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较

### 2.2 Western blot 检测 2 组大鼠结肠组织 MOR、KOR、DOR 蛋白的表达

Western blot 检测显示, MOR、DOR 及 KOR 蛋白在结肠中均有较强表达(图 2), 且泻剂结肠组均明显高于对照组( $P < 0.01$ , 表 2)。



1~3: 对照组; 4~6: 泻剂结肠组

图 2 Western blot 检测 2 组大鼠结肠组织 MOR、DOR、KOR 蛋白的表达

表 2 Western blot 检测 2 组大鼠结肠组织 MOR、KOR、DOR 蛋白表达 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	MOR	DOR	KOR
对照组	0.152 ± 0.021	0.159 ± 0.005	0.201 ± 0.0145
泻剂结肠组	0.361 ± 0.023 <sup>a</sup>	0.246 ± 0.059 <sup>a</sup>	0.309 ± 0.018 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较

## 3 讨论

随着社会的进步, 人类对生活质量的的要求逐步提高。STC 作为严重影响患者生活质量及身心健康的疾病, 日益受到重视。美国的 1 项问卷调查发现, 约 3%

被调查者被便秘困扰<sup>[7]</sup>。而 15% ~ 30% 便秘患者为 STC<sup>[8]</sup>。Fratini 等<sup>[9]</sup>将 STC 定义为排除盆底功能障碍、结肠缺乏正常生理活动且对药物失去反应的严重功能性便秘。STC 病因包括原发性肠道神经及平滑肌功能紊乱、ICC 细胞变性、感染、外源性神经毒性药物应用、肠道吸收功能异常、内源性吗啡肽及阿片受体功能异常等<sup>[10]</sup>。这些发病原因并非孤立, 而是相互间紧密联系。目前 STC 的治疗手段包括药物、生物反馈及手术治疗等。因 STC 病因复杂, 其治疗效果欠佳。

胃肠神经系统是中枢神经系统以外的最大、最复杂的神经系统, 由神经丛(ganglionated plexuses)、位于纵肌与环肌间的肌间神经丛(myenteric plexus)、深肌丛(deep muscular plexus)及黏膜下神经丛(submucosal plexus, SMP)组成, 各神经丛间由神经纤维相互连接形成网状系统<sup>[11]</sup>。ENS 对胃肠道生理功能的调节表现在多方面, 包括运动方式、胃酸分泌、经上皮细胞的液体流动、改变局部血流、营养物质的消化吸收、与胃肠免疫及内分泌系统相互作用等<sup>[12]</sup>。研究表明, 阿片受体(MOR、DOR、KOR)主要表达于肠肌间神经丛及黏膜下神经丛, 以及分布于肌肉间、黏膜、肠壁血管、淋巴结及邻近 Cajal 间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)等的神经纤维上<sup>[13]</sup>。阿片受体属于与 G 蛋白家族偶联的代谢型膜受体, 当阿片受体激活后, 随即产生浓度依赖性内吞效应, 进入细胞内, 通过激活  $K^+$  通道、膜超极化、抑制  $Ca^{2+}$  通道及环磷酸腺苷的生成发挥其生物学效应<sup>[13]</sup>。阿片受体激动剂能同时阻断 ENS 的兴奋性及抑制性神经元: 阻断兴奋性通路能抑制兴奋性神经递质(如乙酰胆碱)释放, 进而阻断肠道平滑肌张力依赖性蠕动收缩; 阻断抑制性通路能减少抑制性神经递质(如一氧化氮)释放, 增加平滑肌静息张力和非推进性蠕动<sup>[14]</sup>。新近研究显示, 吗啡作为非选择性的阿片受体激动剂, 能抑制 ENS 神经元细胞  $Na^+$  通道, 提高动作电位阈值、降低动作电位幅度, 从而降低神经元细胞兴奋性<sup>[15]</sup>。Bell 等<sup>[16]</sup>研究发现, 长期服用阿片类药物的患者中, 45% 大便次数  $< 3$  次/周。而阿片受体激动剂能明显影响胃肠道的运动及分泌功能<sup>[17]</sup>。Pol 等<sup>[18]</sup>报道,  $\mu$ -阿片受体在肠道表达上调将导致大鼠肠道功能障碍。Liu 等<sup>[19]</sup>研究发现, MOR、KOR 对泻剂结肠大鼠肠道运动功能的调节起着重要作用。

为建立 STC 典型的泻剂结肠大鼠模型, 本实验模拟 STC 患者常有的长期服用刺激性泻剂这一现象, 对大鼠饲以含酚酞饲料并逐步增加给药剂量, 通过 Western blot 及 RT-qPCR 对各阿片受体检测发现, 各亚型(MOR、DOR、KOR)在泻剂结肠大鼠近端结肠中

的表达较对照组均明显增高( $P < 0.01$ )。既往有研究表明,在泻剂结肠大鼠结肠内阿片受体活性明显高于对照组<sup>[14]</sup>。Brock 等<sup>[20]</sup>认为,吗啡及其他阿片类药物可使肠蠕动减慢、肠内容物所含水分和电解质被过度吸收、肠液分泌减少,从而导致便秘。Sanger 等<sup>[17]</sup>研究表明,吗啡能使分泌性神经元(secretomotor neurons)超极化并抑制肠黏膜的分泌活动。对STC患者结肠中内源性阿片肽的研究表明,脑啡肽(met-enkephalin)<sup>[21-22]</sup>、强啡肽(dynorphin)<sup>[20]</sup>表达无明显异常,而亮氨酸脑啡肽(leu-enkephalin)表达降低<sup>[23]</sup>。Ross 等<sup>[24]</sup>研究了小鼠肠道对吗啡耐受性的变化,提出结肠对阿片类药物耐受性降低是导致胃肠道功能障碍的基础之一。而无论内源性阿片肽或外源性阿片制剂,必须激活阿片受体才能发挥其生物学效应,因此阿片受体在结肠表达量的增多及活性增强可能在以运动功能紊乱为主要表现的STC中起重要作用。

本实验中,3种阿片受体亚型在泻剂结肠大鼠结肠中的表达均明显增高,其中MOR较KOR及DOR升高更为明显,也许提示着MOR在STC病程中起着更重要的作用,但这需要分别对3种受体进行更深入的研究方能证实。STC病因复杂,阿片受体在泻剂结肠中表达增强,可视为STC病程中结肠病理生理变化的结果,不能轻易将其认定为STC发病的启动因素。如果能对STC进行大规模的流行病学调查,总结其易感因素,再结合对阿片受体表达调控机制的研究,或许对揭示STC发病原因有明显的促进作用。

#### 参考文献:

[1] Campbell W L. Cathartic colon. Reversibility of roentgen changes[J]. Dis Colon Rectum, 1983, 26(7): 445-448.  
[2] 张连阳,高峰,童卫东,等. 大鼠泻剂结肠模型的建立[J]. 世界华人消化杂志, 1998, 6(10): 864-866.  
[3] Li H Y, Yan X, Xue Q L, et al. Effects of nociceptin/orphanin FQ on rats with cathartic colon[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 141-145.  
[4] Bagnol D, Mansour A, Akil H, et al. Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract[J]. Neuroscience, 1997, 81(2): 579-591.  
[5] Poonyachoti S, Kulkarni-Narla A, Brown D R. Chemical coding of neurons expressing delta- and kappa-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum[J]. Cell Tissue Res, 2002, 307(1): 23-33.  
[6] Pappagallo M. Incidence, prevalence, and management of opioid bowel dysfunction[J]. Am J Surg, 2001, 182(5A Suppl): 11S-18S.  
[7] Johanson J. Constipation[C]. Washington, DC: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, NIDDK, 1994.  
[8] Bassotti G, Roberto G D, Sediari L, et al. Toward a definition of co-

lonic inertia[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(17): 2465-2467.  
[9] Frattini J C, Noguera J J. Slow transit constipation: a review of a colonic functional disorder[J]. Clin Colon Rectal Surg, 2008, 21(2): 146-152.  
[10] Knowles C H, De-Giorgio R, Kapur R P, et al. Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group[J]. Acta Neuropathol, 2009, 118(2): 271-301.  
[11] Furness J B. The enteric nervous system and neurogastroenterology[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(5): 286-294.  
[12] Furness J B. The Enteric Nervous System[M]. Oxford: Wiley-Blackwell, 2006: 132-198.  
[13] Poole D P, Pelayo J C, Scherrer G, et al. Localization and regulation of fluorescently labeled delta opioid receptor, expressed in enteric neurons of mice[J]. Gastroenterology, 2011, 141(3): 982-991.e8.  
[14] Wood J D, Galligan J J. Function of opioids in the enteric nervous system[J]. Neurogastroenterol Motil, 2004, 16(Suppl 2): 17-28.  
[15] Smith T H, Grider J R, Dewey W L, et al. Morphine decreases enteric neuron excitability via inhibition of sodium channels[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45251.  
[16] Bell T J, Panchal S J, Miaskowski C, et al. The prevalence, severity, and impact of opioid-induced bowel dysfunction: results of a US and European Patient Survey (PROBE 1)[J]. Pain Med, 2009, 10(1): 35-42.  
[17] Sanger G J, Tuladhar B R. The role of endogenous opioids in the control of gastrointestinal motility: predictions from *in vitro* modelling[J]. Neurogastroenterol Motil, 2004, 16(Suppl 2): 38-45.  
[18] Pol O, Alameda F, Puig M M. Inflammation enhances mu-opioid receptor transcription and expression in mice intestine[J]. Mol Pharmacol, 2001, 60(5): 894-899.  
[19] Liu B H, Mo P, Zhang S B. Effects of mu and kappa opioid receptor agonists and antagonists on contraction of isolated colon strips of rats with cathartic colon[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(11): 1672-1674.  
[20] Brock C, Olesen S S, Olesen A E, et al. Opioid-induced bowel dysfunction: pathophysiology and management[J]. Drugs, 2012, 72(14): 1847-1865.  
[21] Dolk A, Broden G, Holmstrom B, et al. Slow transit constipation (Arbuthnot Lane's disease). An immunohistochemical study of neuropeptide-containing nerves in resected specimens from the large bowel[J]. Int J Colorectal Dis, 1990, 5(4): 181-187.  
[22] Sjolund K, Fasth S, Ekman R, et al. Neuropeptides in idiopathic chronic constipation (slow transit constipation)[J]. Neurogastroenterol Motil, 1997, 9(3): 143-150.  
[23] Porter A J, Wattchow D A, Hunter A, et al. Abnormalities of nerve fibres in the circular muscle of patients with slow transit constipation[J]. Int J Colorectal Dis, 1998, 13(5/6): 208-216.  
[24] Ross G R, Gabra B H, Dewey W L, et al. Morphine tolerance in the mouse ileum and colon[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 327(2): 561-572.

(收稿:2013-08-12;修回:2013-09-23)

(编辑 龙亮)