

健脾化湿颗粒对 D-IBS 大鼠脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶及 5-羟色胺转运体表达的影响

王迎寒, 吕英超, 刘玉玲, 陈光辉, 张晓峰*, 马帅, 程建军, 赵素微
(河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院 中药研究所, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的:从脑中酪氨酸羟化酶,单胺氧化酶及 5-羟色胺(5-HT)转运体角度探讨健脾化湿颗粒改善腹泻型肠易激综合征(D-IBS)的作用机制。方法:SD 大鼠随机分为正常组、模型组、健脾化湿颗粒低、中、高剂量组(6.25, 12.5, 25 g·kg⁻¹)、阳性药组(匹维溴铵, 0.03 g·kg⁻¹),共 6 组,每组 10 只,除正常组外,其余各组大鼠均采用灌服番泻叶联合束缚应激的方法复制 D-IBS 大鼠模型,观察不同时间各组大鼠糖水偏爱度的变化,应用健脾化湿颗粒进行干预 14 d。应用免疫组化法和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶及 5-HT 转运体的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠糖水偏爱度显著下降($P < 0.01$),脑中酪氨酸羟化酶表达显著升高,单胺氧化酶及 5-HT 转运体表达显著下降($P < 0.01$)。模型组比较,中、高剂量组及匹维溴铵组大鼠糖水偏爱度显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);除阳性组大鼠单胺氧化酶相对表达量外,各治疗组大鼠脑中酪氨酸羟化酶阳性表达及表达量均显著降低,单胺氧化酶和 5-HT 转运体阳性表达及表达量均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与匹维溴铵组比较,中、高剂量组大鼠糖水偏爱度均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);中、高剂量组大鼠脑中酪氨酸羟化酶阳性表达及相对表达量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);中、高剂量组大鼠脑中单胺氧化酶及高剂量组大鼠脑中 5-HT 转运体阳性表达显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);低、中、高剂量组大鼠脑中单胺氧化酶及 5-HT 转运体相对表达量显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:健脾化湿颗粒降低 D-IBS 模型大鼠脑内 5-HT 含量与其下调脑中酪氨酸羟化酶表达,上调单胺氧化酶和 5-HT 转运体表达密切相关,这可能是其治疗 D-IBS 的作用机制之一。

[关键词] 腹泻型肠易激综合征(D-IBS); 健脾化湿颗粒; 酪氨酸羟化酶; 单胺氧化酶; 5-羟色胺转运体

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-00133-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181131

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.0910.002.html>

[网络出版时间] 2018-03-15 10:29

Effect of Jianpi Huashi Granule on Tyrosine Hydroxylase, Monoamine Oxidase and Serotonin Transporter Expression in Brain of Rats with Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome

WANG Ying-han, LYU Ying-chao, LIU Yu-ling, CHEN Guang-hui, ZHANG Xiao-feng*,
MA Shuai, CHENG Jian-jun, ZHAO Su-wei

(Key Laboratory for Research and Development of Chinese Traditional Medicine of Hebei Province,
Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Jianpi Huashi granule on tyrosine hydroxylase, Monoamine oxidase and serotonin transporter expression in brain of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS), and explore its mechanism. **Method:** SD rats were randomly divided into normal group,

[收稿日期] 20180108(016)

[基金项目] 河北省高等学校科学技术研究优秀青年基金项目(YQ2014002);承德医学院高层次人才科研启动基金项目(201602);河北省高校重点学科建设项目(冀教高[2013]4号)

[第一作者] 王迎寒,博士,讲师,从事中药药理学研究,Tel:0314-2290076,E-mail:wyh811018@163.com

[通信作者] * 张晓峰,博士,教授,从事中药药理学研究,Tel:0314-2290367,E-mail:xiaofengzhang999@163.com

model group, Jianpi Huashi granule low, middle and high dose groups ($6.25, 12.5, 25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and positive drug group (pinaverium bromide, $0.03 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), $n = 10$ in each group. Except the rats in normal group, all the other rats received intragastric administration of Sennae combined with restraint stress to establish D-IBS models. The changes of sucrose preference in different groups were observed at different time points, and Jianpi Huashi granule was used for 14 days. Then immunohistochemical method and Western blot were used to detect the expression levels of tyrosine hydroxylase, monoamine oxidase and serotonin transporter in brain. **Result:** In the D-IBS model group, the sucrose preference was decreased significantly, the expression of tyrosine hydroxylase in brain was significantly increased, and the expression levels of monoamine oxidase and serotonin transporter in brain were decreased significantly as compared with the normal control group ($P < 0.01$). After treatment, the sucrose preference was significantly increased in medium-and high-dose Jianpi Huashi granule groups and positive drug group ($P < 0.05, P < 0.01$); except the relative expression of monoamine oxidase in positive drug group, the expression levels of tyrosine hydroxylase in all other treatment groups were decreased significantly and the expression levels of monoamine oxidase and serotonin transporter were increased significantly as compared with the model group ($P < 0.05, P < 0.01$). As compared with the positive drug group, the sucrose preference was increased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$); the expression of tyrosine hydroxylase was decreased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$); the expression of monoamine oxidase in middle and high-dose Jianpi Huashi granule groups and the positive expression of serotonin transporter in high-dose Jianpi Huashi granule group were increased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$); the expression levels of monoamine oxidase and serotonin transporter were increased significantly in low, middle and high dose Jianpi Huashi granule groups ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Jianpi Huashi granule reduced the content of serotonin transporter in brain of rats with D-IBS, which was closely related to down-regulating the expression of tyrosine hydroxylase and up-regulating monoamine oxidase and serotonin transporter in brain. This may be one of the therapeutic mechanisms of Jianpi Huashi granule for D-IBS.

[**Key words**] diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS); Jianpi Huashi granule; tyrosine hydroxylase; monoamine oxidase; 5-hydroxytryptamine serotonin transporter

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛、腹泻或便秘、腹泻与便秘交替出现为主要症状的消化道功能性疾病,往往伴有不同程度的精神症状,如心烦、焦虑、抑郁等。该病发病率高,目前全球发病率约为11.2%^[1],且随着工作生活节奏的加快及精神压力的加大,常反复发作,给患者带来痛苦。根据罗马Ⅲ诊断标准,该病分为IBS便秘型(C-IBS),IBS腹泻型(D-IBS),混合型IBS(M-IBS)和不确定型IBS(U-IBS)4种亚型^[2]。到目前为止,该病各亚型的分布不一^[3],病因病机亦尚未完全阐明。近年来大量研究表明,IBS的发病与5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)在外周和中枢的异常高表达密切相关,而5-HT合成代谢通路的异常是5-HT表达异常的关键,亦是导致IBS临床症状的关键一环^[4-6]。5-HT受体的激动剂或抑制剂已作为治疗肠易激综合征的常用药,并广泛用于临床^[7]。中医药在治疗肠易激综合征具有一定的优势^[8],以痛泻要方、四逆散、逍遥散等为基础方的中

药方剂广泛应用于临床。健脾化湿颗粒由痛泻要方组分结合健脾方药组成,用于治疗腹泻型肠易激综合征。前期研究发现,D-IBS大鼠模型脑中5-HT含量及阳性表达均显著升高^[9-11],本课题通过灌服番泻叶联合束缚应激的方法复制D-IBS大鼠模型,用健脾化湿颗粒进行干预,检测了大鼠糖水偏爱度及脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶及5-HT转运体的变化,以期从5-HT的合成代谢角度完善健脾化湿颗粒的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠60只,体质量(250 ± 20)g,SPF级,购自北京维通利华生实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001。实验前1周大鼠饲养于承德医学院屏障环境动物实验室,以适应实验环境。本动物实验经承德医学院伦理委员会批准进行,批准编号CDMULAC-2014-003。

1.2 药物及试剂 番泻叶(安国市昌达药业有限公司,批号1305001),由承德医学院中药研究所

植化室赵春颖教授鉴定为豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* 的干燥小叶。匹维溴铵(得舒特,法国苏威特公司,批号 635375);健脾化湿颗粒(由炙黄芪、益智仁、炒白术、茯苓、砂仁、乌药、陈皮、炒白芍、防风、炙甘草 10 味中药按比例配伍,经过水低温动态提取、冰冻浓缩、喷雾干燥、干法制粒等现代制备工艺制备而成,承德医学院中药研究所提供);兔抗大鼠酪氨酸羟化酶抗体,兔抗大鼠单胺氧化酶抗体,兔抗大鼠 5-HT 转运体抗体,山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)/辣根过氧化物酶(HRP)二抗,兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)(北京博奥森生物技术有限公司,货号分别为 bs-0016R, bs-11297R, bs-1893R, bs-0295G-HRP, bs-0061R);兔 Streptavidin-HRP 试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 54140);BCA 蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,货号 P1511);还原型 5XSDS 上样缓冲液(碧云天生物研究所,货号 P0015);脱脂奶粉(美国 BD 公司,批号 4239539);SuperECL Plus 超敏发光液(美国 Applygen Technologies 公司,批号 P1020);四甲基乙二胺(TEMED,美国 Sigma 公司,批号 M146);30% 丙烯酰胺(碧云天生物技术研究,批号 20161021);过硫酸铵(美国 Solarbio 公司,批号 1024D0313);预染 Marker(美国 Thermo Scientific 公司,批号 00389282);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,0.45 μm)。

1.3 仪器 BX53 型显微医学影像工作站(日本 Olympus 公司);Scieintz-48 型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司);Velocity18r 型台式高速冷冻离心机(澳大利亚 Dynamica 公司);KD-2258 型组织切片机,KD-P 型摊片机,KD-BM III 型生物组织冷冻包埋机(金华科迪仪器设备有限公司);GZX-9240MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博远实业有限公司);KD-TS3A 型自动组织脱水机(浙江省金华科迪仪器设备有限公司);DYCZ-40D 型迷你转印电泳仪,DYCZ-24DN 型迷你双垂直电泳仪,WD-9405B 型水平摇床,DYY-7C 型转印电泳仪电源(北京市六一仪器厂);Tanon 6100 型电化学发光成像系统(北京原平皓生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 药物的配制

2.1.1 番泻叶水浸液 将番泻叶捡择后置于沸水中浸泡 30 min,双层纱布过滤,药渣再加入沸水,浸泡 20 min,双层纱布过滤,合并滤液,减压浓缩,制成生药 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.2 健脾化湿颗粒 将颗粒加入 0.9% 的生理

盐水溶解,分别配制成生药 0.625, 1.25, 2.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.3 阳性药 将匹维溴铵药片碾碎后加入 0.9% 的生理盐水溶解,配制成 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬药液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,用时摇匀。

2.2 D-IBS 大鼠模型的复制^[12]与药物干预 60 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、健脾化湿颗粒低、中、高剂量组、匹维溴铵药组,共 6 组,每组 10 只。适应性饲养 1 周后开始复制模型:各组大鼠实验前禁食 12 h,自由饮水,除正常组外,其余各组大鼠分别给予番泻叶水浸液($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃,每日 1 次,连续 14 d。14 d 后在灌服完番泻叶后立即用透明胶带束缚大鼠的前上肢,胸部及肩部 1 h,每日 1 次,再持续 14 d;正常组大鼠全程只给予生理盐水灌胃,剂量均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。正常组每日只给予生理盐水灌胃;模型组束缚结束后给予生理盐水灌胃;匹维溴铵组束缚结束给予匹维溴铵($0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃;低、中、高剂量组束缚结束后分别给予低、中、高剂量的健脾化湿颗粒灌胃,剂量分别为 6.25, 12.5, 25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中,健脾化湿颗粒中剂量相当于成人临床剂量的等效剂量。

2.3 糖水偏爱度的测量^[13] 实验前,在隔噪音、安静的房间内,训练动物适应含糖饮水,每笼同时放置 2 个水瓶,第一个 24 h,两瓶均装有 1% 蔗糖水,随后的 24 h,一个瓶装有 1% 蔗糖水,一个瓶装纯净水。在 24 h 禁食禁水后,进行动物的基础糖水/纯水消耗实验。同时给予每只大鼠事先定量好的 2 瓶水:一瓶 1% 蔗糖水,一瓶纯水,1 h 后,取走 2 瓶并称量,计算动物的糖水偏爱度(糖水偏爱 = 糖水消耗/总液体消耗 $\times 100\%$)。测量时间为实验前(d0),给予番泻叶 7 d(d7),给予番泻叶 14 d(d14),药物干预 7 d(d21),药物干预 14 d(d28)。

2.4 取材与处理 药物干预 14 d,最后 1 次测量糖水偏爱度后处死大鼠,取脑(前额叶皮质)。将每只大鼠的前额叶皮质分为 2 份,每组随机抽取 3 只大鼠的一份前额叶皮质,经 4% 多聚甲醛固定后,脱水,石蜡包埋,切片,用作免疫组织化学染色检测酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体阳性表达;其余液氮速冻后 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存,用作后续蛋白免疫印迹(Western blot)实验。

2.5 各组大鼠脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体阳性表达 采用免疫组织化学法检测。前额叶皮质组织切片后常规脱腊至水,95 ~ 98 $^{\circ}\text{C}$ 抗原修复 30 min,37 $^{\circ}\text{C}$ 山羊血清封闭 30 min,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$

孵育(一抗 1:200, PBS 作为阴性对照)过夜、二抗 37 °C 孵育 2 h, DAB 显色, 镜下观察控制显色时间。以胞浆中出现棕黄色反应物为阳性反应, 棕黄色越深, 说明阳性反应越强; 无棕黄色的反应为阴性。每张片子随机选取 6 个不相互重叠的 ×400 视野, 并拍照, 应用 Image-pro plus (IPP) 图像分析软件对照片进行半定量分析, 计算积分吸光度 IA, 均值作为该大鼠酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体阳性表达的数值。

2.6 各组大鼠脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体表达量的检测 采用 Western blot 进行检测。各组随机抽取 6 只大鼠的前额叶皮质, 质量约 100 mg, 加入单去污剂裂解液 500 μL, 用 Sceptiz-48 高通量组织研磨器充分匀浆, 冰上震荡裂解 30 min; 放入台式高速冷冻离心机, 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清, 分装, 每管 50 μL, 备用。用 BCA 蛋白定量试剂盒检测各样本蛋白浓度。计算每个样本蛋白 25 μg 的体积, 分别取出, 变性后进行上样(5% 浓缩胶, 12.5% 分离胶), 电泳至至溴酚兰刚跑出边缘终止(浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V)。400 mA 恒流转膜 3 h, 一抗(酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体为 1:200 稀释; β-actin 为 1:2 000 稀释)4 °C 孵育过夜,

室温下二抗(1:2 000)孵育 2 h, 滴加电化学发光液, 1 min 后用 Tanon 6100 电化学发光成像系统曝光拍照, 曝光时间 10 s。照片用 WD-94BA 凝胶成像系统自带软件进行半定量分析, 测定目的条带灰度值。各目的蛋白的灰度值与 β-actin 条带灰度值的比值乘以 100% 作为该蛋白表达水平参数。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间差异均采用单因素方差分析中两两比较。若方差齐则采用 LSD 检验, 若方差不齐采用 Dunnett's T3 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 D-IBS 大鼠糖水偏爱度的影响 实验前, 各组之间比较无显著差异; d7 时, 各模型组的糖水偏爱度均下降, 但无显著差异; d14 后各模型组的糖水偏爱度与正常组大鼠比较明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$); 药物干预 7 d (d21), 中、高剂量组及匹维溴铵组大鼠糖水偏爱度与模型组比较明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 中、高剂量组与匹维溴铵组大鼠比较糖水偏爱度均显著升高 ($P < 0.05$); 药物干预 14 d (d28), 各治疗组与模型组大鼠比较糖水偏爱度均显著升高 ($P < 0.01$), 中、高剂量组与匹维溴铵组比较糖水偏爱度均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 健脾化湿颗粒对 D-IBS 大鼠糖水偏爱度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	d0	d7	d14	d21	d28	%
正常	-	69.98 ± 9.23	69.06 ± 13.01	68.74 ± 8.59	72.23 ± 10.05	70.41 ± 12.06	
模型	-	71.30 ± 12.82	64.25 ± 15.61	58.91 ± 10.33 ¹⁾	42.20 ± 7.15 ²⁾	32.38 ± 11.42 ²⁾	
匹维溴铵	0.03	67.96 ± 10.31	63.87 ± 10.13	56.37 ± 9.14	50.74 ± 7.08 ⁴⁾	54.27 ± 7.47 ⁴⁾	
健脾化湿颗粒	6.25	72.93 ± 9.10	64.08 ± 11.00	57.68 ± 8.30	53.41 ± 10.27	58.36 ± 10.29 ⁴⁾	
	12.5	71.79 ± 13.23	66.00 ± 15.26	58.62 ± 8.72	59.75 ± 8.45 ^{3,5)}	64.01 ± 9.56 ^{4,5)}	
	25	68.49 ± 8.99	63.46 ± 8.96	56.93 ± 9.37	63.01 ± 7.17 ^{4,5)}	67.34 ± 7.68 ^{4,6)}	

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与匹维溴铵组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对 D-IBS 大鼠脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠脑中酪氨酸羟化酶表达显著升高, 单胺氧化酶和 5-HT 转运体表达显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组大鼠脑中酪氨酸羟化酶表达显著降低, 单胺氧化酶和 5-HT 转运体表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与匹维溴铵组比较, 中、高剂量组大鼠脑中酪氨酸羟化酶表达显著降低, 单胺氧化酶表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 高剂量组

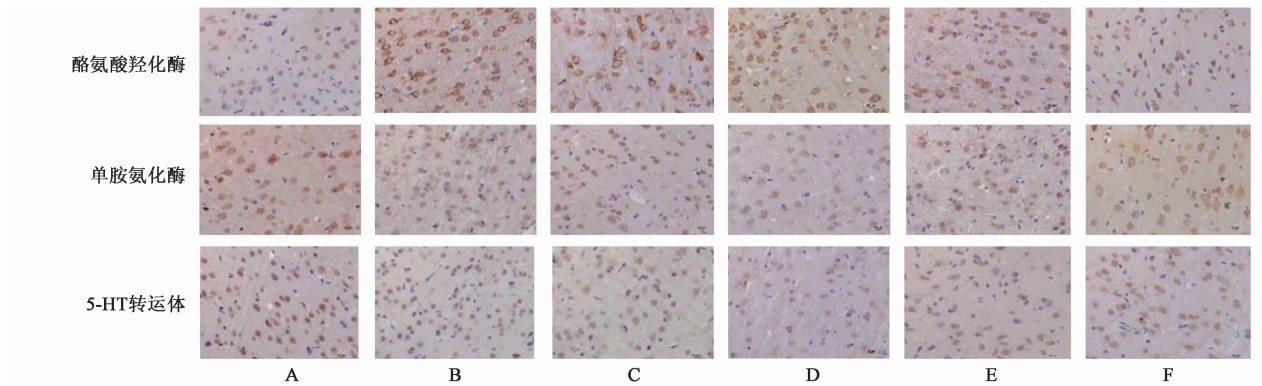
大鼠脑中 5-HT 转运体表达显著升高 ($P < 0.01$)。见表 2, 图 1。

3.3 对 D-IBS 大鼠脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体蛋白表达量的影响 与正常组比较, 模型组大鼠脑中酪氨酸羟化酶蛋白相对表达量显著升高, 单胺氧化酶和 5-HT 转运体蛋白相对表达量显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组大鼠脑中酪氨酸羟化酶蛋白相对表达量显著降低, 5-HT 转运体蛋白相对表达量显著升高 ($P <$

表 2 健脾化湿颗粒对 D-IBS 大鼠脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Jianpi Huashi granule on positive expression of tyrosine hydroxylase, monoamine oxidase and 5-HT serotonin transporter in brain of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	酪氨酸羟化酶	单胺氧化酶	5-HT 转运体
正常	-	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.21 ± 0.01
模型	-	0.23 ± 0.02 ²⁾	0.06 ± 0.01 ²⁾	0.08 ± 0.02 ²⁾
匹维溴铵	0.03	0.19 ± 0.02 ³⁾	0.08 ± 0.02 ³⁾	0.13 ± 0.01 ⁴⁾
健脾化湿颗粒	6.25	0.20 ± 0.01 ³⁾	0.09 ± 0.02 ³⁾	0.11 ± 0.02 ³⁾
	12.5	0.17 ± 0.01 ^{4,5)}	0.11 ± 0.01 ^{4,5)}	0.14 ± 0.02 ⁴⁾
	25	0.15 ± 0.02 ^{4,6)}	0.13 ± 0.01 ^{4,6)}	0.17 ± 0.02 ^{4,6)}



A. 正常组; B. 模型组; C. 匹维溴铵组; D. 健脾化湿颗粒 6.25 g·kg⁻¹ 组; E. 健脾化湿颗粒 12.5 g·kg⁻¹ 组; F. 健脾化湿颗粒 25 g·kg⁻¹ 组(图 2 同)

图 1 健脾化湿颗粒对 D-IBS 大鼠脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of Jianpi Huashi granule on positive expression of tyrosine hydroxylase, monoamine oxidase and serotonin transporter in brain of rats(IHC, ×400)

表 3 健脾化湿颗粒对 D-IBS 大鼠脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Jianpi Huashi granule on positive expression of tyrosine hydroxylase, monoamine oxidase and serotonin transporter protein in brain of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	酪氨酸羟化酶 /β-actin	单胺氧化酶 /β-actin	5-HT 转运体 /β-actin
正常	-	23.01 ± 1.78	35.23 ± 1.31	79.81 ± 4.27
模型	-	39.25 ± 1.53 ²⁾	16.18 ± 1.67 ²⁾	42.75 ± 3.56 ²⁾
匹维溴铵	0.03	33.74 ± 3.03 ⁴⁾	17.42 ± 1.22	48.47 ± 3.85 ³⁾
健脾化湿颗粒	6.25	35.89 ± 2.97 ³⁾	20.39 ± 0.94 ^{4,6)}	57.32 ± 5.18 ^{4,5)}
	12.5	29.72 ± 3.11 ^{4,5)}	26.87 ± 2.58 ^{4,6)}	67.90 ± 5.42 ^{4,6)}
	25	27.06 ± 2.37 ^{4,6)}	31.16 ± 2.07 ^{4,6)}	69.94 ± 5.01 ^{4,6)}

此法建立的 D-IBS 大鼠模型属于中医学中的脾虚肝郁证模型,即脾虚在前,肝郁在后,从而土虚木乘,形成脾虚肝郁证;治宜以健脾益气为主,辅以疏肝。健脾化湿颗粒原方源于临床,由炙黄芪、炒白术、益智

0.05, $P < 0.01$); 健脾化湿颗粒不同剂量组大鼠脑中单胺氧化酶相对表达量显著升高 ($P < 0.01$)。与匹维溴铵组比较,中、高剂量组大鼠脑中酪氨酸羟化酶蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 健脾化湿颗粒不同剂量组大鼠脑中单胺氧化酶和 5-HT 转运体蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3, 图 2。

4 讨论

番泻叶联合束缚应激法建立 D-IBS 大鼠模型的方法是联合建模方法中应用比例最高(29.63%)的一种^[14],被广泛应用于中药的作用机制研究。该模型在前 2 周时只给予番泻叶灌胃,造成大鼠腹泻,后 2 周则是在给予番泻叶的基础上再施加束缚应激,

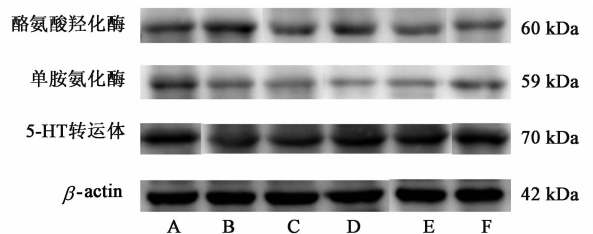


图 2 健脾化湿颗粒对 D-IBS 大鼠脑中酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体表达量的影响

Fig. 2 Effect of Jianpi Huashi granule on positive expression of tyrosine hydroxylase, monoamine oxidase and serotonin transporter in brain of rats

仁、茯苓、砂仁、乌药、陈皮、炒白芍、防风、炙甘草组成,内含痛泻要方(陈皮、炒白术、炒白芍、防风)组分,全方具有健脾理气、化湿止泻之功,用于治疗腹泻型肠易激综合征(脾虚肝郁证),有热者忌用。由此可见,健脾化湿颗粒所针对的证型与灌服番泻叶联合束缚应激建立的 D-IBS 大鼠模型的证候相同,

该模型适用于健脾化湿颗粒的作用机制研究。

糖水偏爱度反映了抑郁的核心症状,即兴趣缺乏,是慢性应激抑郁模型是否建立成功的一个普遍认可标准^[15]。IBS 患者以胃肠道症状为主,多伴有烦躁、焦虑、抑郁等精神症状,精神症状是兼症,与抑郁症不同;糖水偏爱度反应了兴趣缺乏情况,可用于检测 D-IBS 精神症状的程度。本课题采用灌服番泻叶联合束缚应激法复制 D-IBS 模型,用糖水偏爱度分析模型大鼠情志的变化,结果显示第 14 天,各建模组大鼠糖水偏爱并显著下降;第 21 天及第 28 天,模型组大鼠糖水偏爱度显著下降,符合 D-IBS 伴有情志改变的特点;经健脾化湿颗粒和匹维溴铵治疗后,大鼠糖水偏爱度显著升高,情志改变的症状得到改善,说明健脾化湿颗粒可改善模型大鼠的精神状态。

5-HT 是是众多脑肠肽的一种,广泛分布于消化道与中枢神经系统,具有多种生理作用:在肠道,5-HT 可调节肠运动、感觉和分泌功能,是痛觉传导的重要调节物质;在中枢神经系统,5-HT 作为中枢内源性镇痛的重要物质,可抑制外周伤害信息传递;另一方面可调节情绪,与情志异常有重要关系^[16]。5-HT 的量取决于 5-HT 的合成与代谢,其中酪氨酸羟化酶是 5-HT 合成的限速酶,它决定着 5-HT 的生成速度和生成量;而单胺氧化酶则是分解 5-HT,使其失活的酶;5-HT 转运体则通过把 5-HT 转移动细胞中,使其不再发挥生理作用,二者在 5-HT 代谢中具有重要作用,调节着 5-HT 水平^[17]。

前期实验表明,D-IBS 模型大鼠结肠运动加快,内脏敏感性增高,无论是结肠还是中枢神经系统中,5-HT 含量均显著升高,且其受体亦有显著变化,经健脾化湿颗粒治疗后,结肠运动减慢,内脏敏感性降低,5-HT 含量显著下降,其受体的表达水平也有改善^[9,11,18-19]。本实验着眼于对 5-HT 含量起决定作用的酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体,结果显示,模型组酪氨酸羟化酶显著升高而单胺氧化酶和 5-HT 转运体显著下降,说明三者 in D-IBS 的发病中起重要作用;经健脾化湿颗粒治疗后,酪氨酸羟化酶显著降低而单胺氧化酶和 5-HT 转运体显著升高,提示健脾化湿颗粒降低模型大鼠脑中 5-HT 含量,从而改善 D-IBS 腹痛、腹泻、精神症状的作用机制可能与调节酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶和 5-HT 转运体的表达有关。

factors for irritable bowel syndrome: a Meta-analysis [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012(10):712-721.

- [2] 刘新光. 肠易激综合征与罗马 III 诊断标准[J]. 胃肠病学, 2006, 11(12):736-738.
- [3] 李勤, 丰芬, 李源. 肠易激综合征的流行病学研究近况[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(3):143-145.
- [4] 史瑞瑞, 王晶. 脑肠肽与肠易激综合征相关性研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(8):1747-1750.
- [5] 樊江波. 蜘蛛香治疗肠易激综合征的作用和机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2008.
- [6] 孙刚, 杨云生, 彭丽华, 等. 肠易激综合征大鼠内脏敏感性和脊髓背角 5-HT 和 c-fos 的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(25):2718-2722.
- [7] 何侠垠, 戴宁. 5-羟色胺与肠易激综合征关系的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2010, 30(1):1-3.
- [8] 吴海波, 甘淳, 徐义勇, 等. 肠易激综合征中医治疗进展[J]. 陕西中医, 2006, 27(7):890-891.
- [9] 王迎寒, 赵素微, 陈光晖, 等. 健脾化湿颗粒对 D-IBS 模型大鼠脑中 5-HT 及 5-HTR3, 5-HTR4 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(2):255-261.
- [10] 赵立波, 王迎寒, 刘玉玲, 等. 健脾化湿颗粒对实验性 IBS-D 大鼠结肠黏膜 5-HT 表达的影响[J]. 重庆医学, 2014, 43(14):1713-1715.
- [11] 靳继伟, 王迎寒, 张晓峰, 等. 健脾化湿颗粒对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠 5-羟色胺、5-羟色胺 3 受体的影响[J]. 中国老年学, 2016, 36(14):3357-3359.
- [12] 徐海珍, 谢建群, 施斌, 等. 腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜炎性细胞因子的表达及温中健脾方对其影响的研究[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(6):69-72.
- [13] 李霞, 吴程焯, 肖世富, 等. 慢性不可预知轻度应激对大鼠旷场行为和糖水偏爱度影响的观察[J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(3):175-181.
- [14] 吴晓亮, 孙建华. 肠易激综合征国内实验研究现状的调查[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(35):3818-3823.
- [15] Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS[J]. Neuropsychobiology, 2005, 52(2):90-110.
- [16] 石君杰, 王海云, 宋李亚, 等. 逍遥散对肠易激综合征大鼠 5-羟色胺及 5-羟色胺转运体作用研究[J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(7):490-491.
- [17] 邱悦, 李怡, 胡浪, 等. 柴术宁肠方对肠易激综合征模型大鼠 5-羟色胺信号系统的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17):121-125.
- [18] 陈光晖, 刘玉玲, 王迎寒, 等. 健脾化湿颗粒对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠运动及中枢 c-fos 的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(12):1943-1948.
- [19] 杜海燕, 王迎寒, 张晓峰, 等. 健脾化湿颗粒对 D-IBS 模型大鼠内脏敏感性和脑中 CRF 及其受体的影响[J]. 实验动物科学, 2013, 30(5):15-19.

[参考文献]

- [1] Lovell R M, Ford A C. Global prevalence of and risk

[责任编辑 周冰冰]