

四逆散有效成分对内脏高敏感大鼠 5-HT 信号通路的多靶点协同调控

张婧娴, 芮俊乾, 陈逸凡, 缪乐涛, 杨星昊*

(南京师范大学生命科学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:研究芍药苷、辛弗林、甘草酸对内脏高敏感大鼠 5-羟色胺(5-HT)信号通路的多靶点[色氨酸羟化酶 1 (TPH1)/5-羟色胺转运体(SERT)/5-羟色胺 3 受体(5-HT₃R)/5-HT₄RI 调控,探讨各成分间的协同交互作用,探索四逆散有效成分干预内脏高敏感状态的潜在机制。方法:SD 大鼠随机分为正常组,模型组,匹维溴铵组(15 mg·kg⁻¹),芍药苷组(50 mg·kg⁻¹),辛弗林组(50 mg·kg⁻¹),甘草酸组(50 mg·kg⁻¹),芍药苷+甘草酸组(25 mg·kg⁻¹+25 mg·kg⁻¹),芍药苷+辛弗林组(25 mg·kg⁻¹+25 mg·kg⁻¹),辛弗林+甘草酸组(25 mg·kg⁻¹+25 mg·kg⁻¹),芍药苷+辛弗林+甘草酸组(16.7 mg·kg⁻¹+16.7 mg·kg⁻¹+16.7 mg·kg⁻¹),四逆散组(10 g·kg⁻¹)。采用复合应激法建立结肠易激综合征(IBS)内脏高敏感大鼠模型;以大鼠一般状态评分和直肠扩张腹壁撤退反射(AWR)的最小容量阈值评价大鼠肠道敏感性程度;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠结肠组织 5-HT,TPH1,SERT,5-HT₃R,5-HT₄R 水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠结肠组织 TPH1,5-HT₃R,5-HT₄R mRNA 表达水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠结肠组织 TPH1,5-HT₃R 蛋白水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠一般状态评分和最小容量阈值显著下降($P < 0.01$),结肠组织 5-HT,TPH1,5-HT₃R 水平显著升高,SERT,5-HT₄R 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),TPH1,5-HT₃R mRNA 及蛋白表达显著升高,5-HT₄R mRNA 表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,芍药苷+辛弗林+甘草酸组结肠 5-HT,TPH1,5-HT₃R 水平明显降低,SERT,5-HT₄R 水平明显升高,TPH1,5-HT₃R mRNA 及蛋白表达明显降低,5-HT₄R mRNA 表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);TPH1,5-HT₃R,5-HT₄R mRNA 多靶点纠偏作用明显,最小容量阈值和一般状态评分明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),组内成分之间存在协同交互作用。结论:芍药苷+辛弗林+甘草酸组合对内脏高敏感大鼠结肠 5-HT 合成限速酶(TPH1)和相关受体(5-HT₃R,5-HT₄R)具有协同增效的调控作用,有效成分组合对 5-HT 通路的多靶点纠偏效应可能是四逆散改善大鼠内脏高敏感状态的重要机制。

[关键词] 芍药苷;辛弗林;甘草酸;5-羟色胺;四逆散

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0115-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181625

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180605.1303.001.html>

[网络出版时间] 2018-06-05 16:20

Multi-target Regulatory Effect of Active Ingredients of Sinisan on 5-HT Signal Pathway in Visceral Hypersensitivity Rats

ZHANG Jing-xian, RUI Jun-qian, CHEN Yi-fan, MIAO Le-tao, YANG Xing-hao*

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the multi-target regulatory effect of paeoniflorin, synephrine, glycyrrhizin and their combination on 5-hydroxytryptamine (5-HT) signaling pathway [tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)/serotonin transporter (SERT)/5-HT₃R/5-HT₄R], in order to explore the synergistic interaction between the ingredients and the action mechanism of the traditional Chinese medicine (TCM) prescription Sinisan

[收稿日期] 20180117(021)

[基金项目] 江苏省高校自然科学研究重大项目(15KJA360001)

[第一作者] 张婧娴,在读硕士,从事中药复方物质基础研究工作,E-mail:zhangjingxian92@126.com

[通信作者] *杨星昊,博士,教授,从事中药复方物质基础研究工作,E-mail:yangxinh@126.com

on the visceral hypersensitivity rats. **Method:** The SD rats were randomly divided into normal group, model group, pinaverium bromide group, paeoniflorin group, synephrine group, glycyrrhizin group, paeoniflorin + glycyrrhizin group, paeoniflorin + synephrine group, glycyrrhizin + synephrine group, paeoniflorin + glycyrrhizin + synephrine group and Sinisan group. The irritable bowel (IBS) visceral hypersensitivity rat model was established by the comprehensive stress method. The intestinal sensitivity of the rats was evaluated by the minimum capacity threshold of abdominal withdrawal reflex (AWR). The protein and mRNA expressions of 5-HT, TPH1, SERT, 5-HT3R, 5-HT4R in colon were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the normal group, the minimum capacity threshold value of AWR significantly decreased in the model group ($P < 0.05$), with significant differences in protein and mRNA expressions of TPH1, 5-HT3R, 5-HT4R and SERT ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of 5-HT, TPH1, 5-HT3R, and 5-HT4R were significantly improved, with a multi-target correction effect on TPH1, 5-HT3R, 5-HT4R mRNA expressions in the paeoniflorin + simvin + glycyrrhizin group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The value of minimum capacity threshold and the performance status significantly improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with an interaction between the components in the group. **Conclusion:** The combination of paeoniflorin, simvin and glycyrrhizin has a synergistic effect on the regulation of 5-HT synthase (TPH1) and related receptors (5-HT3R, 5-HT4R) in the colon of visceral hypersensitivity rats. The multi-target rectifying effect of the active ingredient combination on the 5-HT pathway may be an important mechanism for Sinisan to alleviate the visceral hypersensitivity of rats.

[**Key words**] paeoniflorin; synephrine; glycyrrhizin; 5-hydroxytryptamine (5-HT); Sinisan

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是临床常见的肠功能紊乱性疾病,以腹部不适或腹痛伴有排便习惯的改变为特征,发病机制尚不完全清楚。内脏高敏感(visceral hypersensitivity, VHS)是指内脏组织对各种伤害性或生理性刺激的感受阈值降低,感受性增强。大量研究证实,IBS 患者存在广泛的内脏痛觉过敏和痛觉异常,内脏高敏感性是导致 IBS 患者腹痛或腹部不适的重要病理生理基础,作为 IBS 的生物学标记受到广泛关注^[1-3]。

5-羟色胺(5-HT)信号通路介导了内脏敏感性增高和肠动力障碍。人体内 95% 的 5-HT 源自胃肠道,5-HT 信号通路在调制肠道和中枢神经系统感觉信号传递、调控外周神经递质释放、维持肠道蠕动,调节肠壁分泌功能中发挥关键作用^[4]。5-HT 信号通路主要由 5-HT 的生物合成、回收转运、灭活、受体激活等重要环节组成,通路中生物合成、重摄取、受体结合激活等环节相互协同,相互制约,共同维持肠道的正常生理功能。大量研究表明,外周 5-HT 水平增高或 5-HT 受体表达异常等因素可致 5-HT 信号通路异常^[5-6],引起 IBS 患者内脏敏感性增高和肠动力紊乱,出现痛阈减低、腹泻、便秘等症状^[7],与 IBS 发生发展有密切关系^[8-9]。目前 5-HT 受体及其转运体已作为肠易激综合征治疗药物的主要靶点,5-HT 受体拮抗剂和激动剂已作为 IBS 治疗的

流药物^[1]。

四逆散为东汉张仲景《伤寒论》所载名方,由柴胡、白芍、枳实、甘草组成,具有透邪解郁、疏肝理脾之功效,适用于肝气郁结、横逆犯胃或脾虚不运,影响肝不疏泄的肝脾失和证。此方作为疏肝解郁、调和肝脾的经典名方,传统用于治疗胁肋胀闷、脘腹疼痛等,近年广泛用于治疗由肝脾失调引起的消化系统疾病,如肠易激综合征等^[10],但作用机制和有效物质基础尚未完全阐明。已有研究显示,四逆散对 5-HT 及 5-HT₃ 受体(5-HT₃R) mRNA 表达具有调控作用^[6],提示四逆散可能蕴含了调控 5-HT 通路的有效成分和独特作用机制,值得深入研究。

笔者前期应用液质联用技术进行了四逆散大鼠体内代谢研究,鉴定 65 个不同类型的体内代谢成分,并重点研究了芍药苷、甘草素、异甘草素、川陈皮素、芒柄花黄素等 7 种药代标记物在大鼠血液、脑、肝、脾组织中代谢趋势^[11-12]。芍药苷、甘草酸、辛弗林分别为四逆散中白芍、甘草、枳实的主要有效成分和指标性成分,具有体内滞留时间长、药物代谢特征显著和化学类型代表性等特点。药理研究表明,辛弗林能显著拮抗 5-HT 引起的兔离体小肠(空肠和回肠)收缩增强^[13],可以改善慢性应激大鼠的行为状态^[8],芍药苷可使血虚肝郁证模型大鼠大脑海马 5-HT 含量明显升高^[14],具有抗抑郁、改善睡眠的作

用^[10],甘草酸对胃黏膜损伤有明显的保护与修复作用^[15]。但这些成分对 5-HT 通路中关键环节的调控缺乏系统研究报道。为了探索四逆散中有效成分对 5-HT 信号通路的影响,本研究选取辛弗林、芍药苷、甘草酸为对象,采用 IBS 内脏高敏感大鼠为模型,研究有效成分对 5-HT 合成、转运、受体等多环节的影响,探索中药有效成分组合的协同调控作用。本研究有利于揭示复方配伍的科学内涵,而且可为创制新型组分中药提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级雄性 SD 大鼠,体质量(200±20)g,由江苏大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(苏)2013-0011,动物伦理委员会编号为 NNU-IACUC-A012。

1.2 药物及试剂 匹维溴铵片(abbott products SAS,批号 H20120127);芍药苷(paeoniflorin, C₂₃H₂₈O₁₁,纯度 98%,批号 FY15891216),辛弗林(synephrine, C₉H₁₃NO₂,纯度 98%,批号 FY17110305),甘草酸(glycyrrhizin, C₄₂H₆₂O₁₆,纯度 95%,批号 FY12410705),由南通飞宇生物科技有限公司提供;中药饮片购自南京先声再康药店,经南京师范大学龚祝南教授鉴定。四逆散提取物:由本实验制备,按照四逆散处方(柴胡 9 g,白芍 9 g,枳实 9 g,甘草 9 g),称取适量药材饮片,加入 8 倍水浸泡 2 h,水煎煮提取 2 次,每次 1 h。合并提取液,60℃减压浓缩至生药 1.5 g·mL⁻¹,临用前用蒸馏水配成所需浓度。大鼠酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(苏州卡尔文生物科技有限公司,批号 E20160501A);RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus,逆转录试剂盒 RT Master Mix,PCR 试剂 SYBR Green(大连生物工程公司,批号分别为 AA5601-1,AK4901,AKA304);引物均由上海捷瑞生物工程有限公司设计及合成;RIPA 裂解液,BeyoECL Star(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0013B, P0018A);Page Ruler Prestained Protein Ladder(美国 Thermo Scientific 公司,批号 26616);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为 10494-1-AP, SA00001-2);5-HT_{3R},色氨酸羟化酶 1(TPH1)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab13897, ab52954)。

1.3 仪器 Mini 型蛋白电泳系统、电转系统(北京六一生物科技有限公司);HZ-9310K 型摇床(华利达实验设备有限公司);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);NanoDrop 2000C 型

超微量分光光度计,PCR System 9700(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);TGL-16M 型冷冻高速离心机(湘仪实验室仪器开发有限公司);LightCycler96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士 Roche 公司);DNM-9606 型酶标分析仪(北京朗普新技术有限公司)。

2 方法

2.1 实验动物分组及给药 将大鼠随机分为正常组,模型组,匹维溴铵组(15 mg·kg⁻¹),芍药苷组(50 mg·kg⁻¹),辛弗林组(50 mg·kg⁻¹),甘草酸组(50 mg·kg⁻¹),芍药苷+甘草酸组(25 mg·kg⁻¹+25 mg·kg⁻¹),芍药苷+辛弗林组(25 mg·kg⁻¹+25 mg·kg⁻¹),辛弗林+甘草酸组(25 mg·kg⁻¹+25 mg·kg⁻¹),芍药苷+辛弗林+甘草酸组(16.7 mg·kg⁻¹+16.7 mg·kg⁻¹+16.7 mg·kg⁻¹),四逆散组(10 g·kg⁻¹),自然恢复组,每组 6 只。从造模第 22 天开始,除正常组和模型组外,各组连续灌胃给药 7 d,每日 1 次,自然恢复组给予等量纯净水。在参考有关文献[16-18]和四逆散复方提取物中相关成分含量的基础上,经预实验对不同剂量(低、中、高剂量 12.5, 25, 50 mg·kg⁻¹)筛选后确定芍药苷组、辛弗林组、甘草酸组和成分组合组的适宜给药剂量。四逆散组和匹维溴铵组给药剂量参照标准成人剂量和“实验动物与人按体表面积等效剂量换算比率表”^[19]确定。

2.2 内脏高敏感大鼠模型的建立 参照复合应激法^[16]进行内脏高敏感大鼠模型制备。大鼠适应性喂养 7 d 后随机分组,除正常组常规饲养外,其余各组大鼠每天随机选取 2 种应激方式进行干预:行为束缚(置于自制固定管内 3 h),强迫游泳(20℃, 60 min),湿笼饲养(12 h),食物剥夺(24 h),饮水剥夺(12 h)。相邻 2 d 的干预方式不重复,连续造模 21 d,每种干预方式平均使用 2~3 次。

2.3 大鼠一般状态评价 参照文献[20]中相应的评分标准对大鼠的行为、毛发、睡眠、排便性状、活跃程度等进行评分。大鼠的正常状态即为所观察项目的正常或一般程度,分别将各组大鼠进行评分和归入不同的等级(如模型组 10% 的大鼠的行为状态为扎堆贴边,90% 的大鼠为少动,则该组大鼠的最后均值为 10%×1+90%×2=1.9),得分越低说明大鼠实际状态与正常状态的差异越显著。

2.4 大鼠内脏高敏感性评价 采用国际通用的直肠扩张腹壁撤退反射(AWR)评分和引起 AWR 的最小容量阈值作为敏感性的评价指标。实验前将大鼠

12 h 禁食不禁水,在乙醚麻醉下,将凡士林润滑的橡胶球囊经肛门插入大鼠直肠,气囊末端距离肛门 5 cm 左右,固定好气囊。在大鼠清醒状态下,适应 30 min 后,依次按照 20,40,60,80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 不同级别注气,观察并参照标准进行 AWR 评分^[16]。观察到大鼠腹部抬起时,出现身体呈弓形时的压力(单位为 mmHg),即为引起 AWR 的最小容量阈值。每只大鼠测定 3 次,每次间隔 5 min,取平均值,并以正常组最小容量阈值为基准,计算每组与正常组之间的差异程度即阈值偏离度, [如正常组最小容量阈值为 A,模型组为 B,则阈值偏离度 = (|B - A|)/A]。

2.5 大鼠结肠组织样本采集 大鼠末次灌胃 2 h 后,断头处死,取大鼠肛门上方 3 cm 处结肠 3 段,每段 1 ~ 2 cm,分别用生理盐水和 PBS 缓冲液冲洗 (pH 7.4),滤纸吸干,精密称质量,用液氮迅速冷冻, -80 °C 保存备用。

表 1 引物设计序列

Table 1 Primer design sequence

| 引物名称 | 上游序列 | 下游序列 | 片段长度/bp |
|--------|----------------------------|----------------------------|---------|
| TPH1 | 5'-TGAGTCCCGAAATCGAAGC-3' | 5'-TCGGATCCGTACAACAGCAC-3' | 118 |
| 5-HT3R | 5'-GGTGACCCGCTGTAGCCTT-3' | 5'-CACTCGCCCTGATTATGAA-3' | 112 |
| 5-HT4R | 5'-CGTTCTTCGCAATGTTATC-3' | 5'-GGACCAACTCAATGGCACC-3' | 115 |
| GAPDH | 5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3' | 5'-CCACAGTCTTCTGAGTGCA-3' | 126 |

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测结肠组织 5-HT3R, TPH1 蛋白表达 按 RIPA 裂解液说明书提取组织蛋白,制 5% 的浓缩胶与 10% 的分离胶,蛋白上样,浓缩胶 90 V 恒压,分离胶 120 V 恒压电泳、恒流湿转膜至 PVDF 膜上 (注意保持低温,防止温度过高使胶融化),5% 脱脂牛奶常温封闭 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次各 5 min,一抗 GAPDH (1:8 000), TPH1 (1:2 500), 5-HT3R (1:500) 4 °C 封闭过夜,洗膜 3 次,各 5 min,二抗 (1:8 000) 室温封闭 1 h,洗膜 3 次,ECL 化学发光曝光拍照,以目的条带灰度值/GAPDH 灰度值表示蛋白相对表达量。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。以 TPH1, 5-HT3R, 5-HT4R mRNA 表达水平为基进行三维聚类分析,比较各组对 5-HT 合成和受体响应环节的综合调控差异。

3 结果

3.1 对大鼠一般状态和肠道压力最小容量阈值的

2.6 ELISA 测定大鼠结肠 5-HT, 5-HT3R, 5-HT4R, TPH1, SERT 蛋白表达水平 取大鼠结肠组织块用 PBS 缓冲液洗净,加入适当的生理盐水进行组织匀浆,离心取上清。分别按照 ELISA 试剂盒说明操作,应用全自动酶标仪测其在 450 nm 处吸光度 *A*,采用 CurveExpert1.3 绘制标曲,并计算对应的浓度。

2.7 Real-time PCR 测定结肠组织 5-HT3R, 5-HT4R, TPH1 mRNA 表达水平 取大鼠结肠组织,采用 trizol 抽提法提取总 RNA,以 OligodT 为引物反转录成 cDNA,反转录条件:37 °C 15 min,85 °C 5 s。用 cDNA 样本进行荧光定量 PCR 扩增,反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 34 s,95 °C 延伸 15 s,40 个循环,反应结束后根据测得样品 *C_t* 值及标准曲线,求出待测样品的相对起始浓度,用目的基因的相对起始拷贝数除以相应的 GAPDH 内参的相对起始拷贝数得到目的基因 mRNA 表达的相对值。引物序列见表 1。

影响 与正常组比较,模型组大鼠形体消瘦,少动易怒,易醒倦卧,毛色晦暗枯乱,稀便明显增多,一般状态评分显著降低 (*P* < 0.01),最小容量阈值显著下降 (*P* < 0.01),符合内脏高敏感特征。与模型组比较,匹维溴铵组最小容量阈值极明显升高 (*P* < 0.01),一般状态评分未见显著性差异。与模型组比较,甘草酸组或芍药苷组一般状态评分和最小容量阈值未见显著性差异;辛弗林组最小容量阈值显著升高 (*P* < 0.05),一般状态评分未见显著性差异。与模型组比较,芍药苷 + 甘草酸组、芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组和四逆散组的最小容量阈值明显升高 (*P* < 0.05, *P* < 0.01),一般状态评分明显改善 (*P* < 0.05, *P* < 0.01);芍药苷 + 辛弗林组最小容量阈值极显著升高 (*P* < 0.01),一般状态评分未见显著性差异。见表 2。

3.2 对内脏高敏感大鼠结肠组织中 5-HT, TPH1, SERT, 5-HT3R, 5-HT4R 含量的影响 对 5-HT 信号通路的影响,与正常组比较,模型组大鼠结肠组织

表 2 四逆散有效成分对内脏高敏感大鼠一般状态 and 肠道压力最小容量阈值的影响

Table 2 Effect of active ingredients of Sinisan (AIS) on rats behavior's appearance and abdominal with drawal reflex (AWR)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 一般状态 评分/分 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) | 最小容量阈值 /mmHg ($\bar{x} \pm s, n = 6$) | 阈值 偏离度 /% |
|-----------|----------------------------|--|---|-----------------|
| 正常 | - | 36.20 ± 1.32 | 49.01 ± 2.47 | - |
| 模型 | - | 19.61 ± 1.48 ²⁾ | 19.72 ± 1.93 ²⁾ | 59.76 |
| 匹维溴铵 | 15 | 27.95 ± 1.37 | 29.63 ± 2.38 ⁴⁾ | 39.54 |
| 芍药苷(P) | 50 | 24.76 ± 1.49 | 25.43 ± 2.62 | 48.11 |
| 辛弗林(S) | 50 | 22.28 ± 1.44 | 31.66 ± 2.50 ³⁾ | 35.40 |
| 甘草酸(G) | 50 | 22.68 ± 1.33 | 23.44 ± 2.19 | 52.17 |
| P + G | 25 + 25 | 30.00 ± 1.47 ³⁾ | 40.55 ± 1.96 ³⁾ | 17.26 |
| P + S | 25 + 25 | 32.32 ± 1.22 ⁴⁾ | 38.66 ± 2.30 ⁴⁾ | 21.12 |
| S + G | 25 + 25 | 28.02 ± 1.21 | 25.66 ± 2.48 | 47.64 |
| P + S + G | 16.7 + 16.7 + 16.7 | 34.65 ± 1.01 ³⁾ | 39.91 ± 2.42 ³⁾ | 18.57 |
| 四逆散 | 1 × 10 ⁴ | 32.13 ± 1.66 ⁴⁾ | 41.62 ± 2.19 ⁴⁾ | 15.08 |

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⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同);1 mmHg = 0.133 kPa。

5-HT 水平极显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,匹维溴铵组、芍药苷 + 甘草酸组、芍药苷 + 辛弗林

组、芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组和四逆散组结肠组织 5-HT 水平显著改善($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,辛弗林 + 甘草酸组和单一成分组结肠组织 5-HT 水平未见显著性差异。与正常组比较,模型组 TPH1, 5-HT3R 蛋白和 mRNA 水平极显著上调($P < 0.01$), 5-HT4R 蛋白和 mRNA 水平显著降低($P < 0.05$), SERT 蛋白水平极显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,匹维溴铵组 TPH1 蛋白水平极显著下调($P < 0.01$), 5-HT4R 蛋白和 mRNA 水平显著上调($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,芍药苷 + 甘草酸组、辛弗林 + 甘草酸组、芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组和四逆散组 TPH1 蛋白和 mRNA 水平显著下调($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,芍药苷 + 甘草酸组、芍药苷 + 辛弗林组、芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组和四逆散组 5-HT3R 蛋白和 mRNA 水平显著下调($P < 0.05, P < 0.01$), 5-HT4R 蛋白和 mRNA 水平显著上调($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,芍药苷 + 甘草酸组和四逆散组 SERT 蛋白水平显著上调($P < 0.05$)。与模型组比较,芍药苷组 5-HT3R 蛋白和 mRNA 水平极显著下调($P < 0.01$), 辛弗林组 5-HT4R 蛋白和 mRNA 水平极显著上调($P < 0.01$)。见表 3, 4。

表 3 四逆散有效成分对内脏高敏感大鼠结肠组织中 5-HT, TPH1, SERT, 5-HT3R, 5-HT4R 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of AIS on protein expression of 5-HT, TPH1, SERT, 5-HT3R and 5-HT4R in colon of visceral hypersensitive rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 5-HT /μg·L ⁻¹ | TPH1 /ng·g ⁻¹ | SERT /ng·g ⁻¹ | 5-HT3R /ng·g ⁻¹ | 5-HT4R /ng·g ⁻¹ |
|-----------|----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常 | - | 1 151.49 ± 34.54 | 7 924.90 ± 871.74 | 15 729.60 ± 943.78 | 176.32 ± 8.82 | 89.22 ± 12.49 |
| 模型 | - | 1 784.95 ± 249.89 ²⁾ | 12 499.00 ± 1 749.86 ²⁾ | 13 727.34 ± 1 098.19 ²⁾ | 293.26 ± 46.92 ²⁾ | 63.89 ± 9.58 ¹⁾ |
| 匹维溴铵 | 15 | 1 230.62 ± 172.29 ⁴⁾ | 8 589.33 ± 575.08 ⁴⁾ | 15 180.36 ± 1 062.63 | 245.19 ± 29.42 | 71.82 ± 2.87 ³⁾ |
| 芍药苷(P) | 50 | 1 686.07 ± 84.30 | 11 971.59 ± 1 795.73 | 13 805.56 ± 1 242.50 | 129.63 ± 11.67 ⁴⁾ | 65.14 ± 3.26 |
| 辛弗林(S) | 50 | 1 656.54 ± 132.52 | 11 875.15 ± 1 425.02 | 13 889.73 ± 1 111.18 | 321.34 ± 25.71 | 49.87 ± 6.98 ⁴⁾ |
| 甘草酸(G) | 50 | 1 662.74 ± 133.02 | 11 200.92 ± 1 792.15 | 13 855.42 ± 1 385.54 | 323.60 ± 29.124 | 70.74 ± 5.66 |
| P + G | 25 + 25 | 1 292.66 ± 77.56 ⁴⁾ | 8 045.37 ± 804.54 ⁴⁾ | 14 569.44 ± 437.08 ³⁾ | 267.05 ± 37.39 ³⁾ | 78.76 ± 3.15 ³⁾ |
| P + S | 25 + 25 | 1 296.71 ± 155.61 ⁴⁾ | 8 182.10 ± 327.28 | 14 268.32 ± 428.05 | 252.40 ± 37.86 ³⁾ | 76.36 ± 5.35 ³⁾ |
| S + G | 25 + 25 | 1 391.71 ± 141.40 | 8 085.91 ± 959.29 ⁴⁾ | 14 044.69 ± 568.81 | 231.75 ± 44.03 | 71.93 ± 4.50 |
| P + S + G | 16.7 + 16.7 + 16.7 | 1 223.81 ± 97.90 ⁴⁾ | 7 801.57 ± 702.14 ³⁾ | 13 571.66 ± 542.87 | 230.33 ± 18.43 ³⁾ | 88.71 ± 9.76 ³⁾ |
| 四逆散 | 1 × 10 ⁴ | 1 216.46 ± 194.63 ³⁾ | 8 054.36 ± 563.81 ⁴⁾ | 13 418.52 ± 1 341.82 ³⁾ | 216.93 ± 6.51 ³⁾ | 86.92 ± 8.69 ⁴⁾ |

3.3 对内脏高敏感大鼠结肠中 5-HT3R, TPH1 蛋白表达的影响 对结肠组织 5-HT3R, TPH1 蛋白表达的影响 与模型组比较,芍药苷 + 甘草酸组、芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组和四逆散组 TPH1 蛋白水平显著下调($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,芍

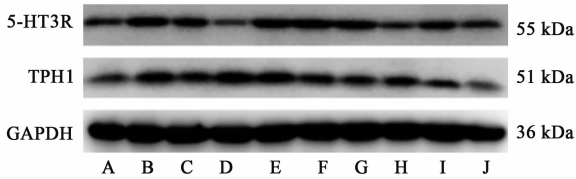
药苷 + 辛弗林组、芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组和四逆散组 5-HT3R 蛋白水平显著下调($P < 0.05, P < 0.01$)。实验组的 Western blot 谱蛋白表达趋势与 ELISA 蛋白分析结果基本一致。见图 1, 表 5。

3.4 有效成分及其组合 对 5-HT 信号通路的三

表 4 四逆散有效成分对内脏高敏感大鼠结肠组织中 TPH1,5-HT3R,5-HT4R mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of AIS on mRNA expression of TPH1,5-HT3R and 5-HT4R in colon of visceral hypersensitive rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | TPH1 | 5-HT3R | 5-HT4R |
|-----------|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 1.00 ± 0.07 | 1.01 ± 0.12 | 1.01 ± 0.13 |
| 模型 | - | 2.39 ± 0.36 ²⁾ | 1.89 ± 0.11 ²⁾ | 0.65 ± 0.05 ¹⁾ |
| 匹维溴铵 | 15 | 1.54 ± 0.17 | 1.42 ± 0.18 | 0.94 ± 0.08 ⁴⁾ |
| 芍药苷(P) | 50 | 2.07 ± 0.14 | 0.47 ± 0.04 ⁴⁾ | 0.76 ± 0.11 |
| 辛弗林(S) | 50 | 1.96 ± 0.06 | 1.81 ± 0.09 | 1.37 ± 0.12 ⁴⁾ |
| 甘草酸(G) | 50 | 2.00 ± 0.22 | 1.66 ± 0.17 | 1.37 ± 0.15 |
| P + G | 25 + 25 | 1.29 ± 0.08 ⁴⁾ | 1.13 ± 0.08 ⁴⁾ | 0.93 ± 0.08 ⁴⁾ |
| P + S | 25 + 25 | 1.46 ± 0.05 | 1.16 ± 0.03 ⁴⁾ | 0.93 ± 0.12 ⁴⁾ |
| S + G | 25 + 25 | 1.27 ± 0.03 ³⁾ | 1.83 ± 0.17 | 0.89 ± 0.09 |
| P + S + G | 16.7 + 16.7 + 16.7 | 1.15 ± 0.14 ³⁾ | 1.40 ± 0.11 ⁴⁾ | 1.04 ± 0.14 ³⁾ |
| 四逆散 | 1 × 10 ⁴ | 1.13 ± 0.10 ³⁾ | 1.31 ± 0.17 ⁴⁾ | 1.13 ± 0.16 ⁴⁾ |



A. 正常组; B. 模型组; C. 匹维溴铵组; D. 芍药苷组(P); E. 辛弗林组(S); F. 甘草酸组(G); G. P+S组; H. P+G组; I. P+S+G组; J. 四逆散组(图2同)

图 1 各组大鼠结肠中 5-HT3R,TPH1 蛋白的表达

Fig. 1 Expression of 5-HT3R and TPH1 in colon of visceral hypersensitive rats

表 5 四逆散有效成分对内脏高敏感大鼠结肠中 5-HT3R,TPH1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of AIS on expression of 5-HT3R and TPH1 in colon of visceral hypersensitive rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | 5-HT3R /GAPDH | TPH1 /GAPDH |
|-----------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 1.53 ± 0.25 | 2.55 ± 0.17 |
| 模型 | - | 2.21 ± 0.24 ²⁾ | 3.77 ± 0.31 ²⁾ |
| 匹维溴铵 | 15 | 1.86 ± 0.27 | 2.02 ± 0.40 ⁴⁾ |
| 芍药苷(P) | 50 | 1.38 ± 0.26 ⁴⁾ | 3.72 ± 0.57 |
| 辛弗林(S) | 50 | 1.94 ± 0.31 | 3.00 ± 0.33 |
| 甘草酸(G) | 50 | 2.06 ± 0.34 | 2.88 ± 0.32 ³⁾ |
| P + G | 25 + 25 | 2.13 ± 0.21 | 2.05 ± 0.27 ⁴⁾ |
| P + S | 25 + 25 | 1.63 ± 0.19 ³⁾ | 2.66 ± 0.37 ³⁾ |
| P + S + G | 16.7 + 16.7 + 16.7 | 1.77 ± 0.17 ³⁾ | 2.42 ± 0.25 ³⁾ |
| 四逆散 | 1 × 10 ⁴ | 1.68 ± 0.63 ⁴⁾ | 2.18 ± 0.44 ⁴⁾ |

维聚类分析主要实验组的 TPH1,5-HT3R,5-HT4R 表达的三维聚类分析结果见图 2。正常组、模型组

驻于明显不同的区域。辛弗林组、芍药苷组都明显偏离模型组,但与正常组仍有明显距离,甘草酸组未见明显偏离,单一成分组组内各点分散度较大。有效成分组合组内各点较为集中,有效成分组合组所驻区域明显接近正常组,与模型组有较大距离。芍药苷 + 甘草酸 + 辛弗林组与四逆散组驻于同一区域,较其他组更靠近正常组。

4 讨论

5-HT 信号通路参与了内脏高敏感的发生,介导外周和中枢对内脏感觉的传递。在 5-HT 信号传导过程中,合成限速酶(TPH)催化合成 5-HT,转运体(SERT)回收 5-HT,细胞膜上单胺氧化酶(MAO)灭活 5-HT。在 5-HT 受体家族中 5-HT3R 为腺体门控阴离子通道,调控肠道感觉神经元向中枢神经系统传递伤害信号,与内脏敏感性的调节密切相关。5-HT4R 是一种 G 蛋白偶联亲代谢性受体,通过开放电压敏感性钙通道,调控降钙素基因相关肽(CGRP),P 物质(SP)等重要神经递质的释放,影响胃肠道动力及内脏感觉。在正常状态下这些环节各司其职,维持胃肠功能的正常生理节律,这些环节失衡或异常直接导致了 5-HT 信号传递异常和胃肠功能病理状态。

有关文献报道,IBS 患者的痛阈减低与外周 5-HT 水平增高相关^[7]。本实验结果表明,模型组大鼠结肠 5-HT 显著升高,TPH1 表达极显著增加,SERT 表达极显著降低,该现象与文献报道结果相符^[21],在 5-HT 信号通路中,TPH1 直接影响 5-HT 的生物合成,SERT 完成 5-HT 转运摄取,它们是影响肠道局部 5-HT 浓度的重要生物分子。本研究结果

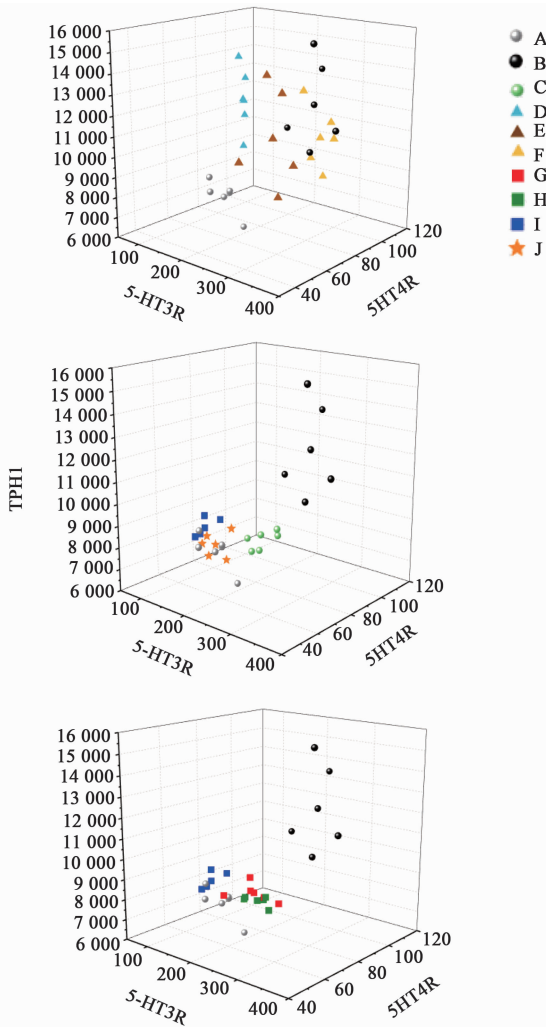


图 2 有效成分组合对内脏高敏感大鼠 TPH1,5-HT3R,5-HT4R 表达的多靶点纠偏作用

Fig. 2 Multi-target correction on TPH1, 5-HT3R and 5-HT4R expression in visceral hypersensitive rats by combination of active components

提示模型组大鼠外周 5-HT 系统 TPH1, SERT 环节异常可能是导致肠道组织中 5-HT 水平异常的重要原因,与内脏高敏感发生密切相关。与模型组比较,芍药苷 + 甘草酸组、芍药苷 + 辛弗林组和芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组结肠组织中 5-HT 水平极显著改善,与匹维溴铵组或四逆散组有相同的趋势。单一成分组 5-HT 水平与模型组比较未见明显差异。芍药苷 + 甘草酸组和芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组对结肠 TPH1 蛋白和 mRNA 水平有显著的下调作用,芍药苷 + 甘草酸组对 SERT 蛋白水平有显著上调作用,提示有效成分组合后 5-HT 合成减少和摄取增加可能是结肠组织 5-HT 水平下调的重要原因。

在 5-HT 通路的信号传导过程中,5-HT 受体发挥了举足轻重的作用。在 5-HT 受体家族中,5-HT₃

受体和 5-HT₄ 受体与 IBS 发病机制关系最为密切^[22],已成为重要的药物作用靶点。本实验中模型大鼠结肠 5-HT₃R 表达极显著升高,5-HT₄R 表达显著降低,这一结果与 IBS 临床研究结果相符^[23-24],说明外周 5-HT 通路中受体环节异常是导致内脏高敏感的另一重要因素。为了探讨有效成分对 5-HT 受体的调控作用,本研究考察了有效成分对 5-HT₃R 和 5-HT₄R 的影响。结果显示,芍药苷 + 甘草酸组、芍药苷 + 辛弗林组、芍药苷 + 甘草酸 + 辛弗林组对模型大鼠 5-HT₃R 和 5-HT₄R 蛋白和 mRNA 水平有显著改善作用,与四逆散组的趋势一致。提示有效成分组合后有利于调控 5-HT 多种受体,改善信号通路传导。

结果显示,有效成分组合对 5-HT 通路主要蛋白和 mRNA 表达的调控呈现协同增效规律。例如,芍药苷仅对 5-HT₃R 蛋白和 mRNA 表达具有下调作用,但芍药苷 + 甘草酸组合对 TPH1, 5-HT₃R, 5-HT₄R 蛋白和 mRNA 表达均有调控增效作用;辛弗林仅对 5-HT₄R 蛋白和 mRNA 表达具有上调作用,芍药苷 + 甘草酸组合对 5-HT₃R, 5-HT₄R 蛋白和 mRNA 表达具有协同调控作用。芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组合对 TPH1, 5-HT₃R, 5-HT₄R 蛋白和 mRNA 表达具有协同增效的调控作用。聚类分析法 (cluster analysis) 是将多变量研究对象分为相对同质的群组 (clusters) 的统计分析技术,具有数据处理简单、可视性好、能直观形象地体现分类效果等优点。为了考察相关实验组对 5-HT 通路的多靶点调控作用,本研究以 TPH1, 5-HT₃R, 5-HT₄R 蛋白表达水平为基进行了三维聚类分析。结果显示,模型组与正常组之间差异显著。甘草酸与模型组差异不明显,辛弗林组或芍药苷组与模型组有一定差异,但纠偏效果不明显,且组内差异较大。结果显示,有效成分组合组与模型组存在明显差异,具有显著纠偏效果。与单一成分组比较,有效成分组合组内各点较为集中,所驻区域位置明显趋于正常组。说明组内趋势明显,优于单一成分组。结果显示,芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组合与四逆散相似,对 5-HT 通路具有较好的多靶点纠偏作用。聚类分析直观显示了各组多靶点协同调控作用的分类趋势,提示芍药苷 + 辛弗林 + 甘草酸组合对模型大鼠 5-HT 信号通路异常状态具有较好的多靶点纠偏作用。

内脏敏感性增高已被广泛作为 IBS 的生物学标记,临床表现为疼痛阈值下降,即痛觉过敏,此病理特征可以在大鼠模型中得到很好体现,通过给予刺

激后的大鼠内脏敏感性增高,与 IBS 患者有很好的相似性。AWR 最小容量阈值已被广泛用于内脏高敏感评价^[20,25],一般状态评分常作为肠易激综合征药物的评价指标^[20]。匹维溴铵是胃肠道选择性钙通道拮抗剂,用于治疗肠易激综合征,能显著降低直肠对扩张的敏感性^[26],临床可以减低内脏敏感性,改善 IBS 患者腹痛、腹胀症状。结果显示,与模型组比较,匹维溴铵组显著改善模型大鼠最小容量阈值。芍药苷+甘草酸组、芍药苷+辛弗林组、芍药苷+辛弗林+甘草酸组和四逆散组显著改善模型大鼠最小容量阈值和一般状态评分,在一般状态评分和阈值改善程度(阈值偏离正常组 15.08%~21.12%)方面优于匹维溴铵(阈值偏离正常组 39.54%);与模型组比较,辛弗林组能够显著升高最小容量阈值,但阈值偏离较大(阈值偏离正常组 35.40%),一般状态评分未见显著差异;与模型组比较,芍药苷组、甘草酸组和辛弗林+甘草酸组最小容量阈值和一般状态评分均未见显著差异。从模型大鼠一般状态评分和最小容量阈值改善程度综合分析,芍药苷+甘草酸组合、芍药苷+辛弗林组合、芍药苷+辛弗林+甘草酸组合的内脏高敏感性改善作用优于单一成分,具有组合增效作用。

QIN 等^[27]发现,5-HT 信号通路调控辣椒素受体 TRPV₁ 磷酸化激活介导了内脏高敏感性的发生,揭示 5-HT 信号通路与内脏高敏感性的密切关系。一系列 5-HT_{3R} 受体抑制剂和 5-HT_{4R} 受体拮抗剂如西沙必利、莫沙必利、伦扎必利等已作为肠易激综合征治疗的主流药物。5-HT 受体拮抗剂或激动剂能改善腹痛、腹胀等症状,临床常用于治疗肠易激综合征,但普遍存在疗效不理想、毒副作用大等缺点,其中替加色罗、阿洛司琼等主流药物由于严重的毒副作用已退出市场^[2]。近年研究表明,选择性受体激动剂或拮抗剂易诱发 5-HT 信号系统产生自身负反馈,从而减弱药物疗效;增大用药剂量常引起受体持续兴奋或完全阻断,导致胃肠功能过度兴奋或抑制,易产生腹泻或便秘等不良反应^[28]。5-HT 通路中生物合成、重摄取、受体结合激活等环节环环相扣,相互协同相互制约,共同维持肠道的正常生理功能。本研究结果显示,芍药苷+辛弗林+甘草酸组合表现出对内脏高敏感大鼠 5-HT 合成及受体环节的多靶点协同调控和内脏高敏感状态的显著改善作用。从文献报道结合本研究结果进行分析,“有效成分协同增效”—“5-HT 通路多靶点调控”—“内脏高敏感状态改善”之间存在着因果联系,提示芍药

苷、辛弗林和甘草酸的有效组合对 5-HT 通路的多靶点纠偏效应是改善模型大鼠内脏高敏感状态的重要机制。

四逆散作为临床治疗肠易激综合征最常用的基础方,具有安全有效的优势^[29],从本研究结果推测,四逆散中药药苷、辛弗林和甘草酸采用“多因微效”方式对 5-HT 生物合成、受体等多靶点协同增效干预,较“单靶点阻断或兴奋”的化学药物更有利于达到 5-HT 信号通路平衡,恢复肠道功能的正常生理节律,这可能是四逆散临床发挥 IBS 疗效的重要物质基础。本研究结果显示,在内脏高敏感大鼠 5-HT 通路多靶点调控、内脏高敏感状态改善方面,芍药苷+辛弗林+甘草酸组合与四逆散具有相似趋势,提示该组合具备替代复方临床应用的潜力,值得进行深入研究和临床验证。以上结果不仅阐明了四逆散方剂配伍理论的重要性,也为芍药苷、辛弗林和甘草酸作为防治肠易激综合征的新型组分中药提供了科学依据。

本文仅对芍药苷、辛弗林、甘草酸组合对 5-HT 信号通路的协同调控效应及内脏高敏感的影响进行了探讨,这 3 个成分直接作用靶点及与 5-HT 系统上下游的关系笔者正在深入研究。

[参考文献]

- [1] 李聪,谢鸣,赵荣华,等. 肝郁脾虚证模型大鼠肝脏的蛋白组学研究[J]. 中华中医药杂志,2016,31(10): 4211-4215.
- [2] 郑君,林晓春,陈育尧,等. 甘草总黄酮抑制慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜腺体萎缩及机制研究[J]. 中国药理学通报,2014,30(1):113-117.
- [3] BIAN Z X. Novel insights about the mechanism of visceral hypersensitivity in maternally separated rats [J]. Neurogastroenterol Motil, 2012,24(7):593-596.
- [4] 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.
- [5] Lawal A, Kern M, Sidhu H, et al. Novel evidence for hypersensitivity of visceral sensory neural circuitry in irritable bowel syndrome patients[J]. Gastroenterology, 2006,130(1):26-33.
- [6] 高广州,郝英霞. 神经递质调节剂在肠易激综合征治疗中的应用[J]. 世界华人消化杂志,2017,25(34): 3025-3031.
- [7] Mnnikes H, Ruter J, Konig M, et al. Different induction of c-fos expression in brain nuclei by noxious and non-noxious colonic distension; role of afferent Cfibers and 5-HT₃ receptors [J]. Brain Res,2003,966(2):253.

- [8] 李胜男. 四逆散改善睡眠作用的有效组分体内代谢过程的研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2014:8-10.
- [9] 梁巧文. 基于5-HT信号系统枳芍散对肝郁脾虚型IBS的作用机理研究[D]. 广州:广州中医药大学,2016:41-42.
- [10] 谷春雨,李春梅,滕垂月,等. 加味四逆散治疗腹泻型肠易激综合症的临床研究[J]. 中医药导报,2017,23(18):73-76.
- [11] YAN Z, CHEN Y, LI T, et al. Identification of metabolites of Si-Ni-San, a traditional Chinese medicine formula, in rat plasma and urine using liquid chromatography/diode array detection/triple-quadrupole spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 885:73-82.
- [12] LI T X, YAN Z X, ZHOU C, et al. Simultaneous quantification of paeoniflorin, nobiletin, tangeretin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, liquiritin and formononetin from Si-Ni-San extract in rat plasma and tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Biomed Chromatogr,2013,27:1041.
- [13] 官福兰,王汝俊,王建华. 枳壳及辛弗林对兔离体小肠运动的影响[J]. 中药药理与临床,2002,18(2):9-11.
- [14] 李艳霞,张建军,王景霞,等. 芍药苷对血虚肝郁证大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴和单胺类神经递质的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,29(8):2591-2595.
- [15] Luthra P, Ford A C. The fall and rise of 5-hydroxytryptamine receptor antagonists in irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Gastroenterology, 2014, 147(2):527-536.
- [16] 李瑜,彭成,朱力阳,等. 芍药苷治疗内脏敏感性肠易激综合征的研究[J]. 中药与临床,2011,2(6):38-41.
- [17] 黄鹤飞,陈颖,朱晓新,等. 中药干预肠易激综合症的脑肠肽调节研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(11):208-217.
- [18] 郭珊珊,王谦,白立川,等. 芍药-甘草配伍的研究进展[J]. 中草药,2014,45(10):1481-1485.
- [19] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:50.
- [20] 周晨,胡浪,李天雪,等. 应激所致肠功能紊乱大鼠模型的建立及内源性标志物的评价[J]. 中国实验动物学报,2013,21(6):13-17.
- [21] 王迎寒,赵素微,陈光辉,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.
- [22] 黄柳向,李珍,李玲. 痛泻安脾汤联合马来酸曲美布汀片对腹泻型肠易激综合征肝郁脾虚证患者血清5HT和CGRP的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):188-191.
- [23] 梅冬雪. IBS-D患者肠黏膜5-HT₂、5-HT₃R水平的研究[D]. 唐山:华北理工大学,2016.
- [24] Federica C, Marco P, Germano G, et al. Synthesis and structure-activity relationship studies in serotonin 5-HT₄ receptor ligands based on a benzo [de] [2, 6] naphthridine scaffold[J]. Eur J Med Chem,2014,82:36-46.
- [25] 詹丽杏,李兆申,邹多武,等. 匹维溴铵治疗肠易激综合症的临床疗效及改变肛门直肠动力和内脏敏感性研究[J]. 中华消化杂志,2002,22(8):477-480.
- [26] Fioramonti J, Christen M O, Dupre I, et al. Effect of a selective calcium antagonist, pinaverium bromide, on sensitivity to rectal distention in experimental inflammation in rats [J]. Gastroenterology, 1997, 121(112):731.
- [27] QIN H, LUO J, QI S, et al. Visceral hypersensitivity induced by activation of transient receptor potential vanilloid type 1 is mediated through the serotonin pathway in rat colon[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 647(10):75-83.
- [28] Waugh N, Cummins E, Royle P, et al. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases; systematic review and economic evaluation [J]. Health Technol Assess,2013,17(55):1-212.
- [29] 陈稚. 枳实-白芍药对干预肝郁脾虚型IBS大鼠的配伍及药动学研究[D]. 广州:广州中医药大学,2014.

[责任编辑 周冰冰]