

肠康方对腹泻型肠易激综合征大鼠 SP, VIP 的影响

李雪¹, 沈明勤^{2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

[摘要] **目的:**观察肠康方对腹泻型肠易激综合征大鼠血浆 P 物质(SP)和大鼠组织血管活性肠肽(VIP)含量的变化,探讨肠康方对腹泻型肠易激综合征的治疗效果。**方法:**将 60 清洁级雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、马来酸曲美布汀组、肠康方低、中、高剂量组。除正常组外,其余各组均采用番泻叶刺激加束缚应激的方法 4 周,复制腹泻型肠易激综合征模型,造模成功后开始给药,马来酸曲美布汀组 ig 马来酸曲美布汀 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,肠康方低、中、高剂量组分别予以肠康方 1.1, 2.2, 4.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig 给药,正常及模型组 ig 等体积的生理盐水,每日 1 次,连续给药 3 周。给药结束后,进行腹壁撤退反射(AWR)评分,并采集腹主动脉血和盲肠上结肠组织,用酶联免疫分析法测定血浆 SP 和结肠组织 VIP 的含量。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠 AWR 评分,血浆 SP 水平明显上升($P < 0.01$),结肠 VIP 含量显著下降($P < 0.05$);与模型组比较,肠康方高、中、低剂量组 AWR 评分明显降低($P < 0.01, P < 0.05$),血浆 SP 水平明显降低($P < 0.05$),肠康方高、中剂量组结肠 VIP 含量明显升高($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**肠康方可能通过改善内脏高敏感性、降低血浆中 SP 的含量和升高结肠黏膜中 VIP 的含量,治疗腹泻型肠易激综合征。

[关键词] 肠康方; 腹泻型肠易激综合征; 血浆 P 物质; 血管活性肠肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0112-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120112

Effect of Changkang Formula on SP and VIP in Rats with Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome

LI Xue¹, SHEN Min-qin^{2*} (1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Jiangsu Provincial Institute of Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Changkang formula (CF) on plasma P substance (SP) and colon vasoactive intestinal peptide (VIP) in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS), and to explore its possible mechanism on D-IBS. **Method:** Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into 6 groups: the normal control group (normal saline), model group (normal saline), the maleate trimebutine group ($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the low-, middle and high-dose CF groups ($1.1, 2.2, 4.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The D-IBS model was induced in rats by senna-free drinking and stress-restraining for 4 weeks. The corresponding medicines were intragastrically administered to rats once daily for 3 weeks. The abdominal withdrawal reflex (AWR) was scored. The levels of SP in serum and VIP in tissue were detected by using the ELISA assay. **Result:** Compared with the normal group, AWR score and plasma SP level increased, colon VIP level decreased in the model group ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with the model group, AWR score and plasma SP level decreased, colon VIP level increased in the low-, middle and high-dose CF groups ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** CF had a therapeutic effect on D-IBS by improving visceral hypersensitivity, reducing the level of plasma SP, and elevating the level of colon VIP in rats.

[Key words] Changkang formula; diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; plasma substance P; vasoactive intestinal peptide

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS) 大便性状改变为临床表现,缺乏胃肠道结构和生化是一种持续或间歇发作,以腹痛、腹胀、排便习惯或 异常的肠道功能紊乱性疾病。现代研究认为,IBS

[收稿日期] 20140924(006)

[基金项目] 2012 年江苏省科技支撑计划-社会发展项目(BE2012776)

[第一作者] 李雪,在读硕士,从事药理学方向研究, Tel:18252067335, E-mail:xixue3224@126.com

[通讯作者] * 沈明勤,研究员,从事药理学方向研究, Tel:13372018896, E-mail:mqshen@163.com

是多因素共同作用的结果,其中内脏高敏感性(visceral hypersensitivity, VH)和脑肠互动(brain-gut interaction, BGI)是当前的研究热点^[1]。在IBS的治疗上,至今尚缺乏理想的根治药物。要想在治疗上取得突破,只有根据中医的方剂组方理论,运用中医“整体调理”的治病理念,进行标本兼治,才能有效地达到目的。中药复方肠康方是经多年治疗肠易激综合征临床实践总结的经验方,临床实验研究表明其可通过改善内脏高敏感来治疗IBS^[2]。本实验通过观察肠康方对大鼠血浆P物质(SP)和大鼠组织血管活性肠肽(VIP)的影响,初步探讨肠康方对腹泻型肠胃激综合征(IBS)的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雄性Sprague-Dawley大鼠60只,体重(200±20)g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号SCXK(沪)2012-0002。大鼠饲养环境温度22℃,相对湿度40%~70%。

1.2 药物及试剂 肠康方由熟地黄,菟丝子,川黄连,防风,白芍,金荞麦等药味组成(生药由四川新荷花中药饮片股份有限公司提供,批号分别为1204021, 1205114, 1210027, 1204113, 1208097, 1211062,经江苏省中医药研究院李松林研究员检定均符合2010年版《中国药典》一部相关项下要求),加水煎煮,过滤,并浓缩。马来酸曲美布汀胶囊(山西振东安特生物制药有限公司,批号20131008-005),番泻叶(产地云南,亳州市沪谯药业有限公司,批号1310050432)。大鼠血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP),大鼠P物质(substance P, SP)酶联免疫检测试剂盒(南京建成生物工程研究所提供,批号均为20140515)。

1.3 仪器 Thermo Multiskan MK3型酶标仪(美国Thermo公司),Axioskop 40型显微镜(德国ZEISS公司),自制球囊导管,自制大鼠透明有机玻璃固定盒(18 cm×5 cm×7 cm)。

2 方法

2.1 动物分组 将60只大鼠,普通饲料适应性喂养1周后,按体重随机分组为正常组、模型组、马来酸曲美布汀组,以及肠康方低、中、高剂量组,每组10只。

2.2 D-IBS大鼠模型的制备^[3] 正常组普通饲料正常喂食,自由饮用纯净水,不予任何处理。除正常组外,其余各组均采用番泻叶刺激配合束缚应激的方法建立D-IBS大鼠模型。以番泻叶水(0.01 g·mL⁻¹·d⁻¹)替代纯净水,自由饮用1周,使其适应。

1周后,除正常组外,其余大鼠继续正常饮用番泻叶水,并使用统一拉力强度棉线将每只大鼠四肢末端固定于铁钉,腹部朝下,1 h后释放。该法隔日重复。连续3周。

2.3 给药 造模结束后第2天起开始ig给药。实验剂量按照实验动物研究“等效剂量”的计算方法,算出给药剂量。马来酸曲美布汀组ig马来酸曲美布汀15 mg·kg⁻¹,肠康方低、中、高剂量组分别予以肠康方1.1, 2.2, 4.4 g·kg⁻¹ ig给药,正常及模型组ig等体积的生理盐水,每日1次,连续给药3周。期间各组大鼠普通饲料喂养,自由饮用纯净水。大鼠每周称体重1次,每周ig给药量按体重变化调整。

2.4 腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分 大鼠实验前24 h禁食不禁水,乙醚麻醉,将石蜡油润滑后的带气囊的8F导尿管经肛门插入,使气囊末端插入肛门内7.0 cm(离肛门1.0 cm),在肛门外1.0 cm处将其固定在大鼠尾根部后,导管根部开口与注射器相连。大鼠苏醒后,将其放在18 cm×5 cm×7 cm特制的透明塑料筒中,使之不能前后移动,亦不能转侧。30 min适应后进行结直肠球囊扩张。每只大鼠给予球囊扩张3次,容量分别为1.0, 1.5, 2.0 mL,每次扩张持续30 s,间隔5 min,以防肠道缺血。每个容量重复3次,取3次评分的均值。

AWR评分标准^[2]:0分,给予结直肠扩张刺激时大鼠情绪基本稳定;1分,给予刺激时变得不稳定,偶尔扭动头部;2分,腹背部肌肉轻微收缩但腹部未抬高地面;3分,腹背部肌肉较强烈收缩并把腹部抬高地面;4分,腹部肌肉强烈收缩,腹部呈弓形并把腹部、会阴部抬高地面。

2.5 指标检测 大鼠血清SP测定:给药结束后实验动物禁食不禁水24 h,各组大鼠以10%水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)麻醉后,从腹主动脉中采集动脉血5 mL于塑料软管中,3 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液保存于-20℃以下待测。采用酶联免疫分析法测定大鼠SP,操作按试剂盒说明书进行。大鼠组织VIP测定:大鼠麻醉状态下,取盲肠上结肠组织,用预冷生理盐水洗去血液,滤纸吸干,按1:9加入生理盐水制备匀浆,离心取上清,按照试剂盒说明书进行ELISA检测。

2.6 光镜标本制备 大鼠麻醉状态下,摘取盲端下1 cm处结肠组织2 cm,沿肠系膜纵向剪开,用冰冷生理盐水冲洗,立即固定于10%中性甲醛水溶液中,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,常规切片,HE染色,

显微镜下观察。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况描述 实验期间,无大鼠死亡现象出现。正常组大鼠精神状态良好,反应灵敏,毛发顺滑有光泽,食欲良好,大便呈黑色颗粒状。造模期间各造模大鼠精神萎靡,触碰不得,急躁易怒,活动减少,倦怠蜷卧,拱背,体重缓慢上升或略下

降,毛发稀松发黄缺少光泽,有稀软便排出,不规则形状,夹有黏液,或肛周体毛被稀便沾染。上述表现经药物干预后各治疗组大鼠均较模型组有明显好转。

3.2 对大鼠体重的影响 大鼠实验期间体重均呈上升趋势。自造模第 2 周起,正常组大鼠体重明显大于模型组大鼠 ($P < 0.01$),说明造模大鼠腹泻较严重,因而体重上升缓慢;第 7 周即给药第 4 周,各给药组大鼠体重明显高于模型组大鼠 ($P < 0.01$),说明肠康方对治疗大鼠腹泻有较好效果。见表 1。

表 1 肠康方对大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Changkang formula on weight of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体重/g						
		1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周
正常	-	187 ± 8.8	247 ± 12.0	302 ± 16.5	338 ± 16.4	357 ± 13.9	379 ± 15.6	406 ± 21.4
模型	-	188 ± 12.7	205 ± 10.9 ²⁾	234 ± 15.5 ²⁾	246 ± 14.4 ²⁾	252 ± 13.5 ²⁾	264 ± 13.1 ²⁾	278 ± 19.3 ²⁾
马来酸曲美布汀	0.015	187 ± 12.3	214 ± 9.7	242 ± 15.9	251 ± 16.3	258 ± 15.8	270 ± 20.6	309 ± 24.1 ⁴⁾
肠康方	1.1	188 ± 17.4	213 ± 18.3	238 ± 23.1	250 ± 26.9	258 ± 28.3	272 ± 31.7	303 ± 24.9 ⁴⁾
	2.2	188 ± 17.2	213 ± 16.1	241 ± 20.1	253 ± 20.3	264 ± 24.3	278 ± 24.7	304 ± 29.5 ⁴⁾
	4.4	187 ± 22.7	214 ± 14.9	241 ± 15.0	250 ± 14.6	254 ± 12.6	271 ± 14.7	296 ± 22.4 ⁴⁾

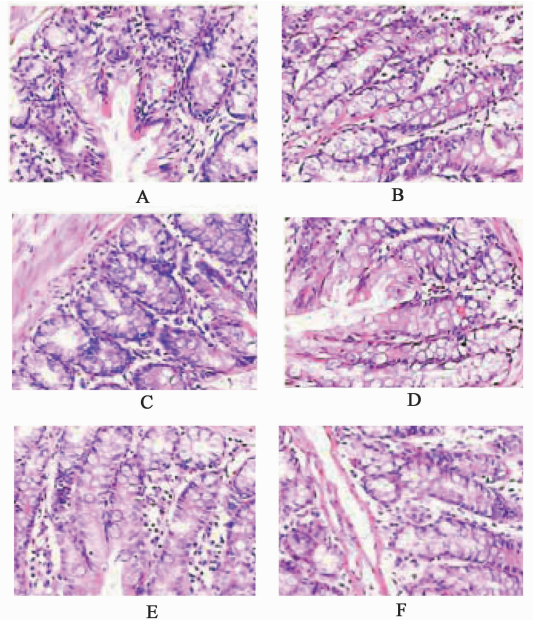
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 对大鼠结肠病理学的影响 肠内衬单层柱状上皮,黏膜完整,黏膜间散在中性粒细胞、淋巴浆细胞浸润,部分区形成淋巴滤泡,肌层及浆膜层均无明显异常。模型组黏膜间炎症细胞浸润较明显,个别组间质轻度水肿,各给药组黏膜炎症细胞浸润有不同程度改善。正常组及高剂量给药组鼠均无明显异常。见图 1。

3.4 对大鼠 AWR 评分的影响 在所有扩张容量下,正常组大鼠 AWR 评分较模型组明显降低 ($P < 0.01$),说明模型组大鼠内脏敏感性明显增加;给药 21 d 后,肠康方剂量组大鼠 AWR 评分均比模型组减少 ($P < 0.05$),说明肠康方剂量组大鼠内脏敏感性均有所改善,但肠康方组 AWR 评分不一致,说明内脏敏感性的改善和肠康方的剂量高、低有联系。见表 2。

3.5 对 D-IBS 大鼠血浆 SP 和结肠 VIP 的影响 正常组大鼠血浆 SP 含量明显低于模型组大鼠,肠康方各剂量组大鼠血浆 SP 含量均明显低于模型组大鼠 ($P < 0.01$),且各剂量组大鼠血浆 SP 含量随着肠康方的剂量增高而降低。

与正常组大鼠比较,模型组结肠组织中 VIP 含量较高,且有显著性差异 ($P < 0.05$);与模型组大鼠比较,肠康方低、中、高剂量组大鼠结肠组织中 VIP 水平升高,除肠康方低剂量组外,肠康方中、高剂量组均有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 3。



A. 正常组;B. 模型组;C. 马来酸曲美布汀 15 mg·kg⁻¹组;D. 肠康方 1.1 g·kg⁻¹组;E. 肠康方 2.2 g·kg⁻¹组;F. 肠康方 4.4 g·kg⁻¹组

图 1 肠康方对大鼠结肠组织形态学的影响(HE, ×200)

Fig.1 Effects of Changkang formula on colon tissue morphology (HE, ×200)

4 讨论

越来越多的证据表明,内脏高敏感性在 IBS 发病机制中起重要作用^[4]。胃肠动力和内脏感觉相互影响,又都受肠神经和中枢神经系统的支配。而

表 2 肠康方对大鼠 AWR 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Changkang formula on AWR in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AWR/分
正常	-	1.40 ± 0.70
模型	-	4.73 ± 0.60 ²⁾
马来酸曲美布汀	0.015	3.27 ± 1.22 ⁴⁾
肠康方	1.1	4.07 ± 0.83 ³⁾
	2.2	3.20 ± 1.21 ⁴⁾
	4.4	2.86 ± 1.29 ⁴⁾

表 3 肠康方对大鼠血浆 SP 和结肠组织 VIP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Changkang formula on plasma SP and colon VIP in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SP/ng·L ⁻¹	VIP/ng·L ⁻¹
正常	-	68.90 ± 2.53	12.58 ± 2.90
模型	-	90.27 ± 8.72 ²⁾	10.23 ± 1.38 ¹⁾
马来酸曲美布汀	0.015	60.30 ± 12.01 ⁴⁾	13.27 ± 1.35 ⁴⁾
肠康方	1.1	72.10 ± 2.78 ⁴⁾	11.23 ± 1.38
	2.2	66.34 ± 13.18 ⁴⁾	11.93 ± 1.50 ³⁾
	4.4	58.26 ± 5.51 ⁴⁾	12.34 ± 1.58 ⁴⁾

将肠神经和中枢神经联系在一起,调控胃肠运动、分泌和感觉功能的神经-内分泌网络就是脑肠轴。而脑肠肽是调节胃肠道运动的重要物质,与 IBS 发病密切相关。它们包括 5-羟色胺(5-HT),胆囊收缩素(CCK),P 物质(SP),血管活性肠肽(VIP),胃动素(MTL),生长抑素(SS),神经肽 Y(NPY),一氧化氮(NO),降钙素基因相关肽(CGRP)等。这些介质在调节内脏感觉和胃肠道运动中起重要作用^[5]。

SP 在肠道中主要存在于肠肌间神经丛和黏膜下神经丛,可增强胃肠蠕动,有强烈促消化道平滑肌收缩,加强结肠的集团推进运动,刺激小肠、结肠黏膜分泌水和电解质作用^[6]。李铁男等^[5]的研究表明肠易激综合征大鼠血浆 SP 水平均有显著升高;刘启泉等^[7]的研究表明 D-IBS 大鼠血浆 SP 含量明显高于正常组大鼠。

VIP 既作为一种胃肠道激素调节胃肠功能,同时又是 NANC 神经的主要递质,通过 cAMP 依赖的蛋白激酶途径和一氧化氮(NO)相关性途径来介导胃肠平滑肌的运动,引起胃排空减慢、参与结肠的节段非推进性运动和维持胃肠道规律的蠕动调节等作用^[8]。Morise K 等^[9]研究指出,肠易激综合征的症状包括腹痛、腹泻、便秘与空腹及餐后不同的 VIP 浓度紧密相关。张茹等^[10]研究发现腹泻型患者血浆和结肠黏膜内 VIP 含量降低,从而造成了肠道动力兴奋性背景,

以致肠道易发生蠕动性收缩,导致腹泻。

在本研究中观察到,D-IBS 大鼠模型组 AWR 评分明显高于正常组大鼠、血浆 SP 水平显著高于正常组大鼠、结肠黏膜 VIP 含量显著低于正常组大鼠。与模型组比较,马来酸曲美布汀组和肠康方各剂量组 AWR 评分均降低,说明肠康方能显著改善 D-IBS 大鼠内脏高敏感性;与模型组比较,肠康方各剂量组血浆 SP 水平均降低、结肠黏膜 VIP 含量均升高,说明肠康方能显著性降低 D-IBS 大鼠血浆 SP 水平及升高其结肠组织中 VIP 含量。其中升高结肠组织 VIP 含量方面,肠康方低、中剂量组效果比马来酸曲美布汀好。提示肠康方可能是通过降低血浆中 SP 的含量和升高结肠黏膜中 VIP 的含量,使其水平趋于正常,从而改善胃肠道动力及内脏敏感性,以达到治疗 D-IBS 的目的。

[参考文献]

[1] 唐庆林,宫秀群,冯根宝,等. 肠易激综合征大鼠内脏高敏感性与脑肠互动的研究[J]. 东南国防医药, 2012,14(1):1-4.

[2] 陆敏,黄厚才,钟荣玲,等. 肠康方对肠易激综合征内脏高敏感模型大鼠的作用[J]. 中国中西医结合消化杂志,2012,20(1):15-18.

[3] 李华燕,张涛,潘锋. 痛泻要方腹鸣型肠易激综合征大鼠结肠肥大细胞及辣椒素受体的影响[J]. 中国中医药科技,2011,18(5):400-402.

[4] Young Eun Joo. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor in irritable bowel syndrome and its correlation with abdominal pain [J]. J Neurogastroenterol Motil,2013,19(1):109-111.

[5] 李铁男,王兵,刘影,等. 菝葜提取物对肠易激综合征大鼠血浆 SP、CGRP 含量的影响[J]. 中医药学报, 2011,39(4):26-28.

[6] 刘美荣,王思明,肖瑞飞,等. 针刺足三里、太冲对腹泻型肠易激综合征大鼠胃肠激素 SS、SP 的影响[J]. 亚太传统医药,2012,8(12):1-3.

[7] 刘启泉,王维,王志坤,等. 隔山逍遥方对腹泻型肠易激综合征大鼠 IL-1 β 、5-HT、SP 含量的影响[J]. 新中医,2012,44(12):140-142.

[8] 程晓雯,林中,郑清华,等. 重症急性胰腺炎伴胃肠动力障碍大鼠结肠黏膜下血管活性肠肽神经元的变化[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(2):183-187.

[9] K Morise, A Furusawa, H Yamamoto, et al. Role of gut hormones in irritable bowel syndrome [J]. Nippon Rinsho,1992,50(11):2697-2702.

[10] 张茹,王福贤. 肠易激综合征患者血浆及乙状结肠黏膜中 VIP 及 SS 的含量[J]. 标记免疫分析与临床, 2004,11(2):81-83.

[责任编辑 周冰冰]