

腹泻型 IBS 脾虚肝郁证候与 5-HT, CRH 的相关性

王迎寒, 刘玉玲, 赵素微, 陈光晖, 胡楠, 于海龙, 张晓峰*
(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:**探讨腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)脾虚肝郁证与脑肠肽之间的关系。**方法:**采用灌服番泻叶联合束缚应激的方法建立腹泻型肠易激综合征大鼠模型,分别于建模前、建模第7,14,21,28天检测肠动力、内脏敏感性和5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT),促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)的表达。应用Maclab/4e四导生理记录仪描记大鼠结肠运动曲线,计算结肠运动指数;采用直肠扩张腹壁撤退反射(AWR)评分评价大鼠的内脏敏感性;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA),免疫组化法检测5-HT, CRH的含量;应用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)检测5-HT, CRH mRNA的表达量。**结果:**与建模前比较,建模第14,21,28天组大鼠结肠运动指数,AWR评分为3时的注水量、结肠和海马中5-HT, CRH及5-HT, CRH mRNA的表达均有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);与建模第7天组比较,建模第21,28天组大鼠结肠运动指数、结肠运动指数变化率,AWR评分为3时的注水量、结肠和海马中5-HT, CRH及5-HT, CRH mRNA的表达差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$);与建模第14天组比较,建模第21,28天组大鼠AWR评分为3时的注水量、结肠和海马中5-HT, CRH及5-HT, CRH mRNA的表达差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$),建模第28天组大鼠结肠运动指数、结肠运动指数变化率有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**5-HT, CRH与D-IBS脾虚肝郁证候密切相关,可能为D-IBS脾虚肝郁证病机的物质基础。

[关键词] 番泻叶; 腹泻型肠易激综合征; 脾虚肝郁; 脑肠肽; 腹痛; 腹泻

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0124-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180124

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170628.1607.014.html>

[网络出版时间] 2017-06-28 16:07

Correlation Between D-IBS with Spleen Deficiency and Liver Stagnation Symptoms and 5-HT, CRH

WANG Ying-han, LIU Yu-ling, ZHAO Su-wei, CHEN Guang-hui, HU Nan, YU Hai-long, ZHANG Xiao-feng*
(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 evaluate the correlation between spleen deficiency and liver stagnation, and brain gut peptides in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS). **Method:** A rat model of D-IBS was established through intragastric administration with Sennae Folium decoction combined with restraint stress. Rats were divided into several groups. The modeling groups were given Sennae Folium decoction combined with restraint stress. The colonic motility, visceral sensitivity and the expression of brain gut peptides were measured at 0 d, 7th d, 14th d, 21st d, 28th d after modeling. Maclab/4e 4-channel physiology recorder was used to record colon motion curves, and evaluate colonic motility index. The visceral sensitivity of rats was evaluated by colorectal distention, and water injection rate was recorded when the abdominal withdrawal reflex (AWR) was

[收稿日期] 20170426(012)

[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

[通讯作者] * 张晓峰,博士,教授,从事中药药理学研究,Tel:0314-2291142,E-mail:xiaofengzhang999@163.com

scored at 3. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), immunohistochemistry assay and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expression of brain gut peptides. **Result:** In 14th d, 21st d, 28th d groups, the colonic motility index, the water injection rate when AWR was scored at 3, the expressions of 5-HT, CRH, 5-HT and CRH mRNA in colon and hippocampus were significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from before modelling. In 21st d, 28th d group, the colonic motility index, the motility index change rate, the water injection rate when AWR was scored at 3, the expressions of 5-HT, CRH, 5-HT and CRH mRNA in colon and hippocampus were significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from those in the 7th d group. In 21st d, 28th d groups, the water injection rate when abdominal withdrawal reflex (AWR) was scored at 3, the expressions of 5-HT, CRH, 5-HT and CRH mRNA in colon and hippocampus were significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from those in the 14th d group. The colonic motility index and the motility index change rate in 28th d group were significantly different from those the 14th d group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The 5-HT and CRH are closely correlated with CRH and D-IBS with spleen deficiency and liver stagnation symptoms, which might be the material basis of spleen deficiency and liver stagnation syndrome in D-IBS.

[**Key words**] Sennae Folium; diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; spleen deficiency and liver stagnation; brain gut peptides; abdominal pain; diarrhea

肠易激综合征(IBS)是一种常见的消化道功能性疾病,临床上以腹痛、腹泻或便秘、患者情志改变为主要症状。具有发病率高,易反复发作的特点,以腹泻型更为多见。其发病机制为多种因素共同作用的结果,而脑-肠轴功能异常是研究热点^[1-2],其中以 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)和促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)的研究为最。中医学根据临床症状的不同,将其归属于腹痛、腹泻、郁证等范畴。病机上与肝、脾、肾三脏关系密切,脾虚肝郁是腹泻型肠易激综合征(D-IBS)主要病机之一^[3]。目前,中医学关于腹泻型肠易激综合征的研究主要集中于健脾益气疏肝的中医方药治疗 D-IBS 的药效及机制^[4-5],多用番泻叶灌胃联合束缚应激的方法复制 D-IBS 大鼠模型,而对该病脾虚肝郁证候的本质的研究较少。因此,本课题为探究 D-IBS 中医脾虚肝郁证与脑肠肽的关系,选用番泻叶灌胃联合束缚应激的方法建立 D-IBS 大鼠模型,预找出脾虚肝郁与脑肠肽的关系。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 50 只,体重(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,批准日期 2014 年 4 月 10 日,批准编号 CDMULAC-2014-003。

1.2 试剂 Rat 5-HT 酶联免疫吸附测定(ELISA) Kit(上海索莱宝生物科技有限公司,批号 201406);

Rat CRH ELISA Kit(上海酶联生物科技有限公司,批号 201406);兔抗鼠 5-羟色胺抗体,兔抗鼠 CRH 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bc-1126R, bc-0382R);兔 Streptavidin-HRP Kit(北京康为世纪有限公司,批号分别为 bc-1126R, CW2035);5-HT, CRH 和 β -肌动蛋白(β -actin)引物合成[Invitrogen 公司贸易(上海)有限公司,批号 2014-6-16];trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 15596);DEPC(德国 Amresco 公司,批号 080210);TaKaRa RNA PCR Kit(大连宝生物工程有 限公司,批号 RR019A);DNA Marker(北京天根生化科技有限公司,批号 MD101-01);6 × DNA 电泳缓冲液(北京天根生化科技有限公司,批号 RT201-02)。

1.3 仪器 Maclab/4e 型四导生理记录仪, QUAD Bridge 型生物放大器(澳大利 ADInstrument 公司); YP200 型压力换能器(北京新航兴业科贸有限公司);Excelsior™ ES 型自动组织脱水机, Histocentre 3™ 型组织包埋机(美国 Thermo Scientific 公司); RM2125 型常规轮转石蜡切片机(德国 Leica 公司); TK-218 型恒温摊片烤片机(湖北泰维医疗科技有限责任公司);BH-2 型显微镜及摄像装置(日本 Olympus 公司);Multiskan MK 3 型酶标仪(美国 Thermo Labsystems 公司);HZQ-X100 型恒温震荡培养箱(江苏同君仪器科技有限公司), SORVALL Biofuge fresco 型冷冻离心机(德国 Kendro Labrotary 公司);DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂);ZF 型紫外透射反射分析仪(上海嘉鹏科技有限公司);iCycler PCR 仪(美国 Biorad Icyler 公

司)。

1.4 药物 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叶 *Cassia angustifolia* 的干燥小叶。

2 方法

2.1 D-IBS 大鼠模型的复制^[6] 50 只雄性 SD 大鼠,随机分为 5 组,每组 10 只,分别为正常组(D0:实验前 1 d 测量肠动力及内脏敏感性后取材),D-IBS 模型组(D7, D14, D21, D28:实验第 7, 14, 21, 28 天给予番泻叶后测肠动力、内脏敏感性、取材)。实验前 10 h 禁食,自由饮水。模型组大鼠分别予以番泻叶煎剂(生药 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃,每日 1 次,如此 2 周。之后在灌服完番泻叶煎剂后即用透明胶束束缚大鼠前上肢,胸部及肩部持续 1 h,再持续 2 周。

2.2 结肠运动指数^[7]测定 将压力换能器与四导生理记录仪相连,用注射器注满水,排净气泡,将自制的橡胶小囊的导管(直径 2 mm)与三通管(一端连接压力换能器,另一端连接 1 mL 注射器)相连,整个管路密闭。大鼠实验前禁食 16 h,自由饮水,实验时,在大鼠肛门内滴两滴液体石蜡以润滑肠道,轻轻将蘸有液体石蜡的橡胶小囊及导管经肛门插入 7 cm,用医用胶布把导管固定于大鼠尾根处,缓慢的向橡胶小囊内注水,一边注水一边观察记录仪描记,当描记曲线变化最灵敏时,停止注水,稳定 30 min,描记 30 min。分别观察 D0, D7, D14, D21, D28 组大鼠的结肠运动曲线,计算 5 min 内的结肠运动指数(用记录仪自带软件计算曲线下面积)及运动指数变化率[(建模后 - 建模前)结肠运动指数/建模前结肠运动指数 $\times 100\%$]。

2.3 内脏敏感性的测量^[8] 大鼠实验前 16 h 禁食不禁水,在清醒状态下,将液体石蜡润滑的 8 F 导尿管经肛门插入,气囊末端距离肛门 1.0 cm,用胶布把导管固定在大鼠尾根部。将大鼠放入特制的透明塑料桶笼内(18 cm \times 5 cm \times 7 cm)中,只能前后运动不能转身,适应 20 min 后,逐渐注水使气囊扩张,分别观察 D0, D7, D14, D21, D28 组大鼠腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分为 3 分时(腹背部肌肉较强烈收缩并把腹部抬离地面)的注水量,每次持续 30 s,重复 3 次,取其均值。

2.4 取材与处理 分别于建模前、建模 7, 14, 21, 28 d 处死相对应组(D0, D7, D14, D21, D28)大鼠,取海马和结肠。每组取 3 只大鼠的海马,4%多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋后切片,备用;其余大鼠海马

液氮速冻后 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。各组大鼠结肠分为若干小段,每组 3 只大鼠的一小段结肠经 4%多聚甲醛固定后,脱水,石蜡包埋,切片,备用;其余结肠液氮速冻后 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

2.5 5-HT, CRH 的测定 采用 ELISA 和免疫组化法检测 5-HT, CRH 的含量。取各组大鼠 30 ~ 60 mg 海马和结肠,按质量-体积(1:29)加入 PBS,充分研磨,制成组织匀浆, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测 5-HT, CRH 的含量。免疫组织化学法染色(一抗 1:2 200, PBS 作为阴性对照), DAB 显色,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。以胞浆中出现棕黄色反应物为阳性反应,无棕黄色的反应为阴性,棕黄色越深,说明阳性反应越强。应用 Image-pro plus (IPP) 图像分析软件对 5-HT, CRH 的表达进行半定量分析。每张片子随机选取 6 个不相互重叠的 $\times 400$ 视野,计算积分吸光度 IA, 均值作为该大鼠 5-HT, CRH 表达的数值。

2.6 逆转录 PCR 检测 5-HT, CRH mRNA 的表达量 称取结肠和海马 80 ~ 100 mg,用 trizol 一步法提取总 RNA 并测定浓度,取总量为 2 μg 的 RNA 进行反转录,体系为 20 μL , 反转录条件如下: $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, $99 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。在 PCR 仪中进行扩增,反应体系为 20 μL , 反应条件如下: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, β -actin $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (CRH $58 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5-HT $59 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 退火 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 30 循环。5-HT 引物:上游 5'-ACATCACCTGGACGCTGCATT-3', 下游 5'-TTGCGCC TTTCCAGATGCTA-3'(扩增长度 175 bp); CRH 引物:上游 5'-CTCACAGCAACAGGAACTGAT-3', 下游 5'-TAG CCACCCCTCAAGAATGAAT-3'(扩增长度 420 bp); β -actin 引物:上游 5'-GAGAGGGAAA TCGTGCGTGAC-3', 下游 5'-CATCTGCTGGAA GGTGGACA-3'(扩增长度 452 bp), 实验重复 3 次,以 β -actin 作为内参。取 PCR 反应产物 5 μL 于 2%琼脂糖凝胶上进行电泳,电压 120 V,用紫外透射仪观察并摄取图像。用 Quantity One 4.6.2 凝胶定量分析软件进行半定量分析。各目的基因/ β -actin 条带作为 mRNA 表达水平参数。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,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 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 各组大鼠结肠运动指数及内脏敏感性的变化
与 D0 比较, D7, D14, D21, D28 组大鼠结肠运动指数显著升高 ($P < 0.01$), AWR 评分为 3 时的注水量显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 D7 比较, D21, D28 组结肠运动指数、运动指数变化率显著升高, 注水量显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 D14 比较, D28 组结肠运动指数、运动指数变化率显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), D21, D28 组大鼠注水量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 番泻叶对各组大鼠结肠运动指数及内脏敏感性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Effect of Sennae Folium on colonic motility index and visceral sensitivity in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	运动指数/ mmHg·s	运动指数变 化率/%	AWR 评分为 3 分 时的注水量/mL
D0	-	539.94 ± 47.31	-	1.46 ± 0.09
D7	6	785.51 ± 73.14 ²⁾	44.35 ± 7.58	1.13 ± 0.19 ¹⁾
D14	6	839.93 ± 65.78 ²⁾	56.01 ± 8.17	0.89 ± 0.14 ²⁾
D21	6	916.44 ± 58.36 ^{2,3)}	70.27 ± 13.45 ⁴⁾	0.82 ± 0.18 ^{2,3,6)}
D28	6	967.12 ± 61.69 ^{2,4,5)}	78.50 ± 15.84 ^{4,6)}	0.79 ± 0.10 ^{2,4,6)}

注: 1 mmHg = 0.133 kPa。与 D0 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 D7 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与 D14 组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

3.2 各组大鼠结肠及海马中 5-HT, CRH 的变化

表 2 番泻叶对各组大鼠结肠及海马中 5-HT, CRH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of Sennae Folium on content of 5-HT, CRH in colon and hippocampus in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	5-HT/pg·L ⁻¹		CRH/ng·L ⁻¹	
		结肠	海马	结肠	海马
D0	-	879.56 ± 123.74	257.33 ± 11.39	35.23 ± 2.91	9.14 ± 1.07
D7	6	1 198.10 ± 178.31 ¹⁾	273.52 ± 19.31	41.01 ± 4.33 ¹⁾	12.67 ± 1.93 ¹⁾
D14	6	1 432.88 ± 168.59 ²⁾	281.94 ± 23.27	45.50 ± 3.87 ²⁾	15.43 ± 1.25 ^{2,3)}
D21	6	1 727.30 ± 96.78 ^{2,4,5)}	306.55 ± 21.98 ²⁾	55.75 ± 3.86 ^{2,4,6)}	20.88 ± 0.94 ^{2,4,6)}
D28	6	1 953.14 ± 203.43 ^{2,4,6)}	330.15 ± 24.75 ^{2,4,5)}	66.62 ± 4.08 ^{2,4,6)}	25.19 ± 2.01 ^{2,4,6)}

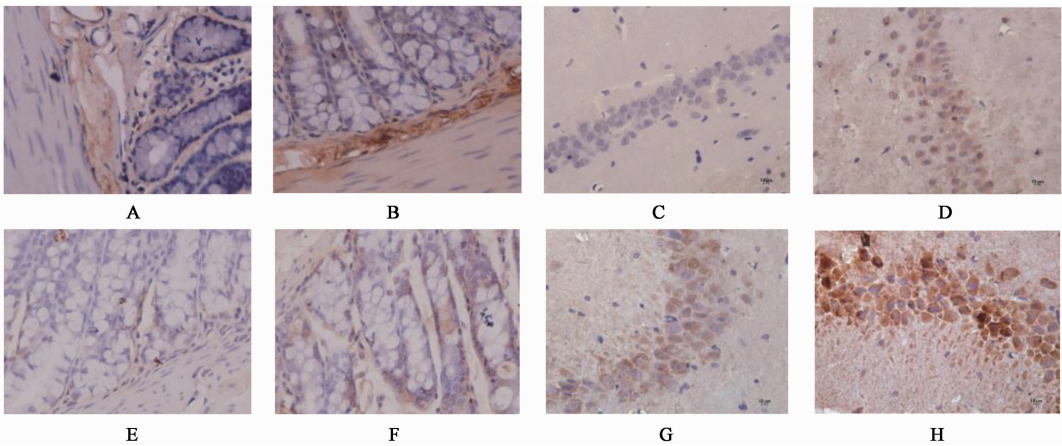
表 3 番泻叶对各组大鼠结肠及海马中 5-HT, CRH 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of Sennae Folium on expression of 5-HT, CRH in colon and hippocampus in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	5-HT		CRH	
		结肠	海马	结肠	海马
D0	-	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01
D7	6	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.01
D14	6	0.14 ± 0.01 ^{2,3)}	0.11 ± 0.01 ^{2,3)}	0.7 ± 0.01 ²⁾	0.11 ± 0.02 ^{2,4)}
D21	6	0.17 ± 0.01 ^{2,4,6)}	0.15 ± 0.02 ^{2,4,6)}	0.10 ± 0.01 ^{2,4,6)}	0.16 ± 0.01 ^{2,4,6)}
D28	6	0.20 ± 0.01 ^{2,4,6)}	0.17 ± 0.02 ^{2,4,6)}	0.13 ± 0.02 ^{2,4,6)}	0.19 ± 0.02 ^{2,4,6)}

5-HT 和 CRH 主要分布于结肠的黏膜层和黏膜下神经丛以及海马的 CA1, CA3 区。与 D0 比较, D7, D14, D21, D28 组大鼠结肠中 5-HT, CRH 含量及海马中 CRH 含量显著升高; D21, D28 组大鼠海马中 5-HT 含量亦显著升高; D14, D21, D28 组大鼠结肠与海马中 5-HT, CRH 的表达显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 D7 比较, D21, D28 组大鼠结肠 5-HT, CRH 含量升高显著; D28 组大鼠海马中 5-HT 含量及 D14, D21, D28 组大鼠海马中 CRH 含量升高显著; D14, D21, D28 组大鼠结肠 5-HT 的表达与海马中 5-HT, CRH 的表达显著增强; D21, D28 组大鼠海马中 CRH 的表达亦显著增强 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 D14 比较, D21, D28 组大鼠结肠 5-HT, CRH 的含量与表达均显著升高; D28 组大鼠海马中 5-HT 含量显著增多; D21, D28 组大鼠海马中 5-HT 表达及 CRH 含量与表达均显著增强 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2, 3, 图 1。

3.3 各组大鼠结肠及海马中 5-HT, CRH mRNA 的变化
与 D0 比较, D7, D14, D21, D28 组大鼠结肠与海马中 5-HT, CRH mRNA 的表达均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 D7 比较, D14, D21, D28 组大鼠结肠与海马中 5-HT, CRH mRNA 的表达均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 D14 比较, D21, D28 组大鼠结肠与海马中 5-HT, CRH mRNA 的表达均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4, 图 2。



A. D0 组大鼠结肠 5-HT; B. D28 组大鼠结肠 5-HT; C. D0 组大鼠海马 5-HT; D. D28 组大鼠海马 5-HT; E. D0 组大鼠结肠 CRH; F. D28 组大鼠结肠 CRH; G. D0 组大鼠海马 CRH; H. D28 组大鼠海马 CRH

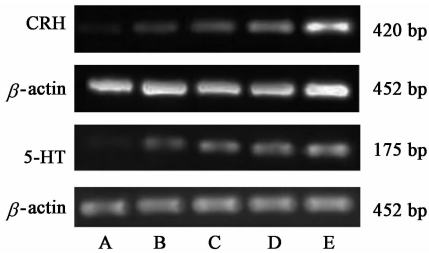
图 1 番泻叶对各组大鼠结肠及海马中 5-HT, CRH 蛋白相对表达量的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of Sennae Folium on expression of 5-HT, CRH in colon and hippocampus in each group (ICH, ×400)

表 4 番泻叶对各组大鼠结肠及海马中 5-HT, CRH mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Sennae Folium on expression of 5-HT, CRH mRNA in colon and hippocampus in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	5-HT/ β -actin		CRH/ β -actin	
		结肠	海马	结肠	海马
D0	-	23.54 ± 2.75	30.17 ± 4.53	19.10 ± 2.47	22.48 ± 4.29
D7	6	43.61 ± 6.55 ²⁾	42.39 ± 6.82 ¹⁾	31.33 ± 5.70 ²⁾	34.51 ± 5.67 ²⁾
D14	6	60.13 ± 6.08 ^{2,4)}	56.76 ± 7.98 ^{2,3)}	45.79 ± 4.53 ^{2,4)}	47.65 ± 8.73 ^{2,3)}
D21	6	72.82 ± 7.36 ^{2,4,5)}	82.18 ± 9.45 ^{2,4,6)}	66.59 ± 6.01 ^{2,4,6)}	70.14 ± 6.24 ^{2,4,6)}
D28	6	84.57 ± 5.44 ^{2,4,6)}	101.22 ± 8.49 ^{2,4,6)}	80.17 ± 4.92 ^{2,4,6)}	85.19 ± 8.75 ^{2,4,6)}



A. D0 组; B. D7 组; C. D14 组; D. D21 组; E. D28 组

图 2 番泻叶对各组大鼠结肠及海马中 5-HT, CRH mRNA 相对表达量的影响

Fig. 2 Effect of Sennae Folium on expression of 5-HT, CRH mRNA in colon in each group

4 讨论

D-IBS 是临床常见的消化道功能紊乱性疾病, 发病率占消化科门诊的 25% ~ 50%^[9], 以腹痛、腹泻及情志的改变为特征, 且反复发作, 临床上现代医学常采用对症治疗, 起效快, 但远期疗效差。近年来, 关于 D-IBS 的研究, 大多数集中于其病理生理、发病机制 (某蛋白或因子的基因表达等) 以及某药治疗 D-IBS 的疗效观察、药物对相关因子的影响, 并且深入到基因水平, 取得了很好的成绩, 如: 病因方面涉及遗传、食物、炎症、精神心理等多方面因素; 其

发病机制为脑-肠轴功能异常、脑-肠肽、内脏高敏感、肠动力异常、肠黏膜屏障功能紊乱等多种因素共同作用的结果, 不能用其中某一因素单独解释。大量研究表明, 脑-肠轴功能异常在 D-IBS 发病机制中越来越受到重视^[10], 逐渐成为研究热点, 尤其是关于 5-HT, CRH 等脑肠肽的研究报道。5-HT 广泛分布于中枢神经系统和胃肠道, 参与胃肠运动、分泌、感觉等多方面的功能调节, 与 D-IBD 的发病密切相关; CRH 广泛分布于中枢和外周, 主要介导与应激相关的各种变化, 如应激引起的结肠高度运动、水样腹泻和结肠扩张的敏感性^[11]等消化道症状。治疗方面的研究更多, 多为“某药或某疗法治疗 D-IBS 的疗效及对某某的影响”, 而且关于作用机制的报道涉及病机的各个方面。

目前, 关于中医药在 D-IBS 的报道中, 大多为关于中医方药的疗效及作用机制的研究^[12], 但所建立的 IBS 模型只能模拟 IBS 的某些症状, 并不能完全模拟人类 D-IBS 的病机及症状, 与人类 IBS 在发病机制上存在着或大或小的差异。近年来, 国内关于 D-IBS 动物模型的建立方法, 有单一因素造模方法和两种方法联合建模方法^[12], 其中, 番泻叶煎剂

灌胃结合束缚刺激法在联合建模方法中应用比例最高(29.63%),被广泛应用于健脾止泻中药的作用机制研究,显然该模型所对应的中医证候应为脾气虚:因番泻叶为苦寒泻下药,苦寒易伤脾胃,长期给药,脾气受伤;束缚应激引起大鼠烦躁不安,肝气郁滞,横逆犯脾,从而加重脾虚症状,表现为脾虚肝郁证候。

前期课题组在研究健脾化湿颗粒的药效和作用机制时,应用番泻叶联合束缚应激的方法复制 D-IBS 大鼠模型,并检测不同时间点各组大鼠的结肠运动、内脏敏感性及治疗后各组大鼠脑肠肽的表达、受体 mRNA 和受体蛋白的表达等指标,发现 D-IBS 模型大鼠其结肠和脑中 5-HT, CRH 的表达显著升高^[8,14],治疗后症状及脑肠肽的表达有不同程度的降低。所采用的结肠运动和内脏敏感性的检测方法属重复测量,且在同一位置,时间间隔为 1 周,未发现该检测方法引起脑肠肽的明显变化,其原因可能有以下两点:首先肠动力检测负荷较小,对大鼠的刺激较轻,而内脏敏感性的刺激较大,但持续时间较短;再者,2 次测量时间间隔 1 周,大鼠恢复能力较强,因此,检测方法未对脑肠肽引起较大影响,方法可靠。课题组前期着眼于健脾化湿颗粒的机制方面,未研究在模型复制过程中,大鼠腹泻、腹痛症状与 5-HT, CRH 的变化情况,它们之间是否存在联系。故本文应用番泻叶灌胃联合束缚应激的方法复制了 D-IBS 大鼠模型,研究脾气虚与脑-肠轴功能之间的联系。结果显示:在建模过程中,随着番泻叶灌胃天数的增加,结肠运动指数、运动指数变化率及 AWR 评分为 3 分时的注水量均有显著变化,束缚应激对 AWR 评分为 3 分时的注水量的影响显著;结肠和海马中 5-HT, CRH 及其 mRNA 的表达亦随着建模天数的增加而增多,差异显著,且应用束缚应激后,5-HT, CRH 及其 mRNA 的表达亦显著增多。提示番泻叶苦寒,长期应用伤及脾胃,脾气渐虚,运化失职,模型大鼠表现在结肠动力增强,痛阈降低,可反映出临床上 D-IBS 患者出现腹痛腹泻的症状;束缚应激使大鼠情绪烦躁不安,模拟了人情志变化,引起肝气郁滞,肝旺克脾,脾气更虚,使腹痛症状更明显,体现中医脾虚肝郁证候的特点。从而笔者可以推测:脾虚肝郁证候在 D-IBS 发病机制中与脑-肠轴功能异常可能相关,具体表现在 5-HT, CRH 等脑肠肽的变化上。

由于笔者在中医脾虚肝郁证候方面只进行了初步的研究,尚未涉及 5-HT, CRH 相关受体及其下游

信号通路元件的变化,为以后的研究工作提出了问题、思路和方向。

[参考文献]

- [1] Young E J. 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.
- [2] 高伟,蔡春江,白鹏飞. 芳香化浊方治疗腹泻型肠易激综合征 70 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 339-340.
- [3] 黄彦铭,席娅,谭万初,等. 中医治疗腹泻型肠易激综合征研究现状[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(18): 50-52.
- [4] 李柏群,陈绍成,彭腾,等. 风芍六君子汤治疗脾虚腹泻型肠易激综合征的药效学研究[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2229-2233.
- [5] 伍伟雄,李茜,骆子牛. 疏肝健脾汤治疗腹泻型肠易激综合征疗效观察[J]. 山西中医, 2017, 33(3): 12-13.
- [6] 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, 14(6): 69-72.
- [7] 王迎寒,周淑媛,朱晓新,等. 戊己丸不同配伍方对炎症后肠易激综合征模型大鼠结肠运动及 5-羟色胺含量的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(13): 1226-1233.
- [8] 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.
- [9] 郭震浪,苏振宁,王正飞,等. 四君子汤合痛泻要方加减治疗腹泻型肠易激综合征的 Meta 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24): 209-214.
- [10] 王迎寒. 基于 5-羟色胺信号系统的戊己丸不同配伍方改善结肠运动的机制研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2013.
- [11] Nijssen M, Ongenaes N, Meulemans A, et al. Divergent role for CRF1 and CRF2 receptors in the modulation of visceral pain [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2005, 17(3): 423-432.
- [12] 朱莹莹,朱吾元. 中医药治疗脾虚泄泻机理研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(8): 1709-1712.
- [13] 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.
- [14] 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]. 中国老年学杂志, 2016, 36(14): 3357-3359.

[责任编辑 邹晓翠]