

痛泻要方加减引经药防风对肠易激综合征大鼠 水液代谢和5-HT系统的调控作用

张薇, 葛文静, 王慧森, 张雪侠, 刘明, 崔伟锋, 王军, 李更生, 梁瑞峰*
(河南省中医药研究院 中药研究所, 郑州 450004)

[摘要] 目的:探讨引经药防风对痛泻要方调控腹泻型肠易激综合征(IBS-D)大鼠水液代谢和5-羟色胺(5-HT)信号系统的影响。方法:将40只IBS-D SD大鼠随机分为模型组,痛泻要方缺防风组($26\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),痛泻要方全方组($30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和痛泻要方倍用防风组($34\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),另取10只正常SD大鼠作为正常组,除正常组外,其余各组采用母子分离联合乙酸灌肠法,建立腹泻型肠易激综合征大鼠模型,造模后各组灌胃给予相应药物,连续14 d,观察并计算腹泻指数和粪便含水量,微量法检测肠黏膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测5-HT的含量,化学发光法检测单胺氧化酶-A(MAO-A)活性,通过免疫组化法检测结肠中水通道蛋白4(AQP4)的表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测下丘脑和结肠中5-HT受体3(5-HT₃R),5-HT受体4(5-HT₄R)和5-HT转运体(SERT)的蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠的粪便含水量,5-HT含量,MAO-A酶活性,5-HT₃R表达均显著升高($P<0.01$),肠黏膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性,AQP4,5-HT₄R和SERT表达均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠的腹泻指数和粪便含水量、下丘脑与结肠中的5-HT含量,MAO-A酶活性,5-HT₃R蛋白表达均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),但痛泻要方缺防风组5-HT₃R蛋白表达未见明显差异,各给药组肠黏膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性,AQP4,5-HT₄R和SERT表达均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);与痛泻要方缺防风组比较,痛泻要方全方组和痛泻要方倍用防风组大鼠腹泻指数和粪便含水量,5-HT含量及MAO-A酶活性,5-HT₃R的蛋白表达均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性和SERT的蛋白表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:防风可增强痛泻要方改善IBS-D水液代谢、调控5-HT信号系统多靶点的效应,进一步证实了防风的引经增效作用。

[关键词] 防风;痛泻要方;肠易激综合征;水液代谢;5-羟色胺(5-HT)信号系统

[中图分类号] R2-0;R289;R256.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0056-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201138

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200304.1247.003.html>

[网络出版日期] 2020-3-5 08:29

Effect of Tongxie Yaofang with or Without Saposhnikoviae Radix on Water Metabolism and 5-HT Pathway in Irritable Bowel Syndrome Rats

ZHANG Wei, GE Wen-jing, WANG Hui-sen, ZHANG Xue-xia, LIU Ming, CUI Wei-feng, WANG Jun,
LI Geng-sheng, LIANG Rui-feng*

(Institute of Chinese Materia Medica, Henan Academy of Traditional Chinese Medicine,
Zhengzhou 450004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Saposhnikoviae Radix on Tongxie Yaofang in regulating water metabolism and 5-serotonin (5-HT) signal system in diarrhea type irritable bowel syndrome (IBS-D) rats. **Method:** The 40 IBS-D SD rats were randomly divided into model group, Tongxie Yaofang without Saposhnikoviae Radix group ($26\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Tongxie Yaofang decoction group ($30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Tongxie Yaofang with double Saposhnikoviae Radix group ($34\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), another 10 normal SD rats were selected as the

[收稿日期] 20191105(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873022);河南省中医药科学研究专项(2019ZYD09)

[第一作者] 张薇,实验师,从事中药药理及物质基础研究,E-mail:wzh1269@126.com

[通信作者] *梁瑞峰,硕士,副研究员,硕士生导师,从事中药药理及中药药性研究,E-mail:hnsxm009@163.com

normal group. Except for normal group, the rats in other groups were separated from their mothers and induced by acetic acid to establish D-IBS model. These rats in the each group were administered with corresponding drugs for 14 days. The diarrhea indexes and the water contents of the feces were observed and calculated. The $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activities in the intestinal mucosa were detected by micro method. The contents of 5-HT were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The activities of monoamine oxidase A (MAO-A) were detected by chemiluminescence method. The expressions of aquaporin 4 (AQP4) in colon were detected by immunohistochemistry. Protein expression levels of HT receptor 3 (5-HT₃R), HT receptor 4 (5-HT₄R) and serotonin transporter (SERT) in hypothalamus and colon were detected by Western blot. **Result:** Compared with normal group, the fecal water contents, contents of 5-HT in hypothalamus and colon, activities of MAO-A, expressions of 5-HT₃R were significantly increased in model group ($P < 0.01$), and the activities of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, expressions of AQP4, 5-HT₄R and SERT were reduced significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, the diarrhea indexes and fecal water contents, contents of 5-HT in hypothalamus and colon, activities of MAO-A, expressions of 5-HT₃R were significantly decreased in each experimental group, and the activities of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, expressions of AQP4, 5-HT₄R and SERT were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), however, there was no significant difference in the expression of 5-HT₃R protein in Tongxie Yaofang wituout Saposhnikoviae Radix group. Compared with Tongxie Yaofang wituout Saposhnikoviae Radix group, the diarrhea index, fecal water content, 5-HT content, MAO-A enzyme activity, and protein expression of 5-HT₃R were significantly decreased in Tongxie Yaofang group and Tongxie Yaofang with double Saposhnikoviae Radix group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and protein expression of SERT were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Saposhnikoviae Radix can enhance the effects of Tongxie Yaofang on improving the water metabolism of rats with IBS-D and regulating the multi-target of 5-HT signaling system, further confirming the synergistic effect of Saposhnikoviae Radix.

[Key words] Saposhnikoviae Radix; Tongxie Yaofang; irritable bowel syndrome; water metabolism; 5-serotonin(5-HT)signal system

肠易激综合征(IBS)是一种持续性或间歇性发作、以腹部不适或腹痛伴有肠道水液代谢失衡、排便习惯改变为特征的肠功能紊乱性疾病。IBS分为腹泻型(IBS-D),便秘型(IBS-C),混合型(IBS-M)和不定型(IBS-U),临床症状表现有所不同^[1]。其中,腹泻型肠易激综合征的主要症状是腹泻和内脏高敏感性。研究发现,肠上皮细胞基侧膜上的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 酶通过催化ATP,调节 Na^+ 及 K^+ 浓度参与水液调节代谢^[2],IBS大鼠小肠、结肠黏膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 酶活性明显降低^[3]。表达于肠细胞膜的水通道蛋白(AQP)在细胞膜上组成孔道,控制水分子在细胞内外的进出,参与水液分泌与吸收^[4]。5-羟色胺(5-HT)通路主要由5-HT的合成、转运、灭活、受体结合等环节组成,在调控肠道与中枢神经系统信号传递、神经递质释放、维持肠道运动、调节肠道分泌中发挥重要作用^[5]。5-HT信号通路异常可引起患者内脏敏感性增高和肠动力紊乱,与IBS发生发展有着密切关系^[6]。

痛泻要方为治疗脾虚肝旺之痛泻的代表方剂,

现代常运用于肠易激综合征、结肠炎等消化疾病,疗效确切。方中防风辛能疏散肝风,香可舒脾,又为脾经引经之药,兼具佐使之用。引经药运用得当,可增强方剂疗效,引经药的使用,是中医方剂配伍的重要特色,与现代医学的靶向给药具有高度相似性。课题组前期研究显示,防风可增强痛泻要方降低IBS-D内脏高敏感性的作用,调节脑肠肽水平,增加方中活性成分在脑、肠、肝及脾中的分布,初步证实了防风在痛泻要方中的引经增效作用^[7-8]。母子分离大鼠模型具有内脏高敏感性、结肠动力增强、肠上皮通透性增加的特征,与IBS疾病在多个方面相似,低浓度的乙酸灌肠可使大鼠产生慢性腹泻,排便频率增加,母子分离联合乙酸灌肠是较稳定的腹泻型肠易激综合征模型的复制方法。本研究在前期实验的基础之上,通过建立腹泻型肠易激综合征动物模型,明确痛泻要方加减引经药防风对肠易激综合征大鼠水液代谢和5-HT信号系统不同环节的影响,为IBS的治疗和引经药的应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 10只怀孕15~18 d的SPF级SD大鼠,由河南省实验动物中心提供,合格证号SCXK(豫)2015-0004。大鼠饲养于河南省中医药研究院实验动物中心,实验动物设施使用许可证号SYXK(豫)2019-0001。本实验经河南省中医药研究院实验动物伦理委员会批准,批准号HNZYJ2019-0002。

1.2 药物及试剂 炒白术、炒白芍、炒陈皮、防风均购于亳州市张仲景中药饮片有限责任公司,经河南省中医药研究院中药研究所的王慧森副研究员鉴定为正品。 Na^+/K^+ -ATP酶活性试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号BC0065);单胺氧化酶-A(MAO-A)试剂盒(美国Promega公司,批号V1401);5-HT酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号V18102103);兔抗水通道蛋白4(AQP4)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号bs-6786R);SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号SA1022);兔抗5-HT受体3(5-HT_{3R})抗体,兔抗5-HT受体4(5-HT_{4R})抗体,兔抗5-HT转运体(SERT)抗体和兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab-13897, ab-60359, ab-172884, ab-181602);山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(武汉三鹰生物技术有限公司,批号SA00001-2)。

1.3 仪器 Synergy NEO型多功能酶标仪(美国BioTek公司);RM2245型切片机(德国徕卡公司);FluorChem R型凝胶成像分析仪(美国ProteinSimple公司);CX31型显微镜(日本Olympus公司);DYCZ-24DN型电泳仪, DYCZ-40D型转膜仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 药物制备 痛泻要方(炒白术90 g,炒白芍60 g,炒陈皮45 g,防风30 g)用10倍量70%乙醇,回流提取2次,每次2 h,过滤后合并滤液,回收乙醇,将质量浓度调整为生药1.5 g·mL⁻¹;痛泻要方缺防风、痛泻要方倍用防风的药物制备同上,质量浓度为含生药1.3, 1.7 g·mL⁻¹;大鼠灌胃时给药体积均为20 mL·kg⁻¹,即给药剂量分别为30, 26, 34 g·kg⁻¹。

2.2 IBS-D模型建立、分组与给药 采用母子分离联合乙酸刺激建立IBS-D大鼠模型,即新生SD大鼠从出生后2~21 d每天与母鼠分开3 h,并从第22天开始离乳,选取雄性新生大鼠用0.5%乙酸0.5 mL直肠灌肠,每天1次,连续14 d。造模结束后,采用腹壁撤退反射(AWR)评估模型^[9],标准为0分,给予

刺激时,大鼠无反应;1分,大鼠身体保持稳定,头部偶尔扭动;2分,给予扩张刺激时大鼠腹背部肌肉收缩,但腹部未抬高;3分,腹部肌肉收缩强烈并且抬高桌面;4分,刺激时大鼠腹部收缩强烈,呈弓形,腹部、会阴部抬高地面。评分≥2分者为模型建立成功,取成功造模的大鼠40只随机分为4组:模型组、痛泻要方缺防风组(26 g·kg⁻¹,相当于临床成人剂量的10倍)^[6]、痛泻要方全方组(30 g·kg⁻¹)和痛泻要方倍用防风组(34 g·kg⁻¹)。另取10只新生大鼠作为正常组,正常组大鼠不进行母子分离,采用0.5 mL生理盐水灌肠。所有大鼠均于出生后第36天开始给药,正常组与模型组灌胃蒸馏水,其余组灌胃给予相应药物,每天1次,连续14 d。

2.3 腹泻指数及粪便含水量 于第35, 48天观察并计算当日9:00~15:00腹泻指数。腹泻指数=稀便率(每只大鼠所排稀便数与总便数之比)×平均稀便级(每只大鼠所有稀便级数总和与稀便数之比)。稀便级根据滤纸上污迹直径的大小分为4级:1级,污迹直径<1 cm;2级,污迹直径1~1.9 cm;3级,污迹直径2~3 cm;4级:污迹直径>3 cm。于第35, 48天将大鼠放入代谢笼内,收集1 h大鼠的粪便,称质量(湿重),然后置于烘箱70℃烘至恒重,再称质量(干重),粪便含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

2.4 ELISA检测血浆、下丘脑及结肠中5-HT含量 末次给药2 h后采用10%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,4℃1 400×g离心10 min,分离血浆;取血后迅速分离下丘脑、结肠,分别精密称取50 mg,加入生理盐水200 μL匀浆,1 400×g离心10 min,取上清按试剂盒说明书检测5-HT的含量。

2.5 化学发光法检测肠黏膜Na⁺-K⁺-ATP酶活性 取血后迅速分离结肠,洗去肠中内容物,滤纸吸干,剪开结肠用载玻片刮取肠黏膜,精确称质量后用生理盐水制备10%匀浆,4℃1 400×g离心10 min,取上清液根据试剂盒说明书检测Na⁺-K⁺-ATP酶的活性。

2.6 下丘脑和结肠中MAO-A活性测定 下丘脑、结肠组织精密称重,制备成10%的组织匀浆液,1 000×g离心10 min,取上清液4℃13 000×g离心15 min分离线粒体,蛋白定量后按照MAO-Glo试剂盒说明书操作,多功能酶标仪检测化学发光强度(RLU),分析大鼠脑和结肠组织线粒体悬液中MAO-A的活性。

2.7 免疫组化法检测结肠组织中AQP4表达 取大鼠结肠,多聚甲醛固定,脱水后包埋,常规切片,

脱蜡后水化,修复抗原,滴加AQP4一抗(1:500)孵育,SABC法孵育二抗(1:400),DAB显色,复染,显微镜下观察,以胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性表达。采用Image-Pro Plus 6.0软件分析AQP4阳性表达的平均积分吸光度AA。每张切片随机选取5个视野,取平均值进行分析。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测下丘脑和结肠中5-HT₃R,5-HT₄R和SERT蛋白的表达 用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液分别提取下丘脑、结肠组织总蛋白,BCA法定量蛋白浓度,变性后等量蛋白经10% SDS-PAGE分离后转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭,2h后弃封闭液,TBST缓冲液漂洗后加入5-HT₃R(1:800),5-HT₄R(1:800),SERT(1:500)一抗,4℃过夜,滴加二抗(1:8000)室温孵育1h,洗膜后加入ECL显色液曝光拍照,用Image J软

件分析,以目的条带灰度值/内参GAPDH灰度值表示蛋白表达水平。

2.9 统计学分析 实验结果采用SPSS 22.0进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用One-way ANOVA,两两比较用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠腹泻指数和粪便含水量的影响 与正常组比较,模型组大鼠给药前、后的腹泻指数与粪便含水量均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠给药后的腹泻指数和粪便含水量均显著降低($P < 0.01$);与痛泻要方防风组比较,痛泻要方全方组、痛泻要方倍用防风组大鼠的腹泻指数及粪便含水量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1。

表1 痛泻要方加减引经药防风对大鼠腹泻指数和粪便含水量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

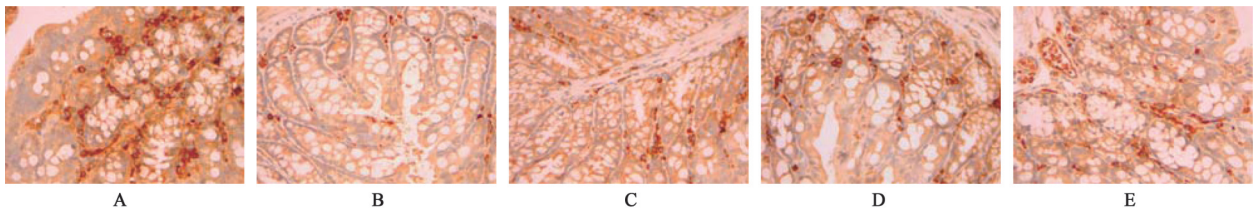
Table 1 Effect of Tongxie Yaofang with or without Saposhnikovia Radix on diarrhea indexes and fecal moisture contents of rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	腹泻指数		粪便含水量/%	
		给药前	给药后	给药前	给药后
正常	-	0	0	43.41±2.68	43.82±2.87
模型	-	1.37±0.27	1.39±0.26	54.56±3.37 ²⁾	53.60±3.63 ²⁾
痛泻要方防风	26	1.35±0.29	1.05±0.21 ³⁾	55.12±3.23	49.93±3.19 ³⁾
痛泻要方全方	30	1.40±0.28	0.93±0.22 ^{4,5)}	54.19±3.41	46.76±3.26 ^{4,5)}
痛泻要方倍用防风	34	1.41±0.27	0.84±0.19 ^{4,6)}	55.27±3.34	45.29±3.04 ^{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⁾ $P < 0.01$;与痛泻要方防风组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表2-6同)。

3.2 对大鼠结肠Na⁺-K⁺-ATP酶活性和AQP4表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜Na⁺-K⁺-ATP酶活性显著降低,AQP4表达显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠结肠黏膜Na⁺-K⁺-ATP酶活性升高,AQP4表达明显增加($P <$

0.05 , $P < 0.01$);与痛泻要方防风组比较,痛泻要方全方组Na⁺-K⁺-ATP酶活性明显升高($P < 0.05$),痛泻要方倍用防风组大鼠结肠中Na⁺-K⁺-ATP酶活性,AQP4表达均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图1,表2。



A. 正常组;B. 模型组;C. 痛泻要方防风组;D. 痛泻要方全方组;E. 痛泻要方倍用防风组(图2,3同)

图1 痛泻要方加减引经药防风对大鼠结肠组织中AQP4表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 1 Effect of Tongxie Yaofang with or without Saposhnikovia Radix on expression of AQP4 in colon of rats (IHC, ×400)

3.3 对大鼠血浆、下丘脑和结肠5-HT含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠血浆、下丘脑和结肠中5-HT含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,

各给药组大鼠血浆、下丘脑和结肠中5-HT含量均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与痛泻要方防风组比较,痛泻要方全方组、痛泻要方倍用防风组大鼠血

表 2 痛泻要方加减引经药防风对大鼠结肠 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性和 AQP4 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Tongxie Yaofang with or without Saposhnikoviae Radix on activity of Na⁺-K⁺-ATPase and expression of AQP4 in colon of rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Na ⁺ -K ⁺ -ATP/ U·mg ⁻¹	AQP4/AA
正常	-	3.32±0.44	0.38±0.09
模型	-	2.08±0.30 ²⁾	0.17±0.03 ²⁾
痛泻要方缺防风	26	2.51±0.36 ³⁾	0.23±0.04 ³⁾
痛泻要方全方	30	2.86±0.34 ^{4,5)}	0.26±0.05 ⁴⁾
痛泻要方倍用防风	34	3.05±0.41 ^{4,6)}	0.29±0.06 ^{4,5)}

表 3 痛泻要方加减引经药防风对大鼠 5-HT 含量和 MAO-A 酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Tongxie Yaofang with or without Saposhnikoviae Radix on content of 5-HT and activity of MOA-A of rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	5-HT/mg·L ⁻¹			MAO-A 酶活性/RLU×10 ³	
		血浆	下丘脑	结肠	下丘脑	结肠
正常	-	97.60±12.31	16.07±1.91	43.85±4.89	28.71±3.00	31.66±3.47
模型	-	173.18±25.36 ²⁾	25.32±3.36 ²⁾	69.35±9.06 ²⁾	20.74±2.26 ²⁾	24.08±2.77 ²⁾
痛泻要方缺防风	26	151.65±20.19 ³⁾	22.67±2.89 ³⁾	61.07±8.15 ³⁾	23.38±2.51 ³⁾	26.96±2.88 ³⁾
痛泻要方全方	30	128.03±17.57 ^{4,6)}	20.09±2.53 ^{4,5)}	54.13±7.30 ^{4,5)}	25.94±2.63 ^{4,5)}	27.77±3.19 ³⁾
痛泻要方倍用防风	34	116.22±14.86 ^{4,6)}	18.78±2.25 ^{4,6)}	48.51±5.81 ^{4,6)}	26.61±2.73 ^{4,6)}	29.81±3.26 ^{4,5)}

5-HT₃R 表达水平升高, 5-HT₄R 和 SERT 表达水平显著降低($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠 5-HT₄R 和 SERT 表达水平明显增加, 痛泻要方全方组与痛泻要方倍用防风组大鼠的 5-HT₃R 表达明显减少($P<0.05, P<0.01$); 与痛泻要方缺防风组比较, 痛泻要方全方组、痛泻要方倍用防风组大鼠结肠中 SERT 表达水平明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见图 2, 表 4。

3.6 对大鼠下丘脑中 5-HT₃R, 5-HT₄R 和 SERT 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠下丘脑中 5-HT₃R 表达水平升高, 5-HT₄R 和 SERT 表达减少($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠 5-HT₃R 表

浆、下丘脑及结肠中 5-HT 含量均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表 3。

3.4 对大鼠下丘脑和结肠中 MAO-A 酶活性的影响 与正常组比较, 模型组大鼠下丘脑和结肠 MAO-A 酶活性显著降低($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠下丘脑和结肠 MAO-A 酶活性均明显升高($P<0.05, P<0.01$); 与痛泻要方缺防风组比较, 痛泻要方全方组大鼠下丘脑、痛泻要方倍用防风组大鼠下丘脑和结肠 MAO-A 酶活性均明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表 3。

3.5 对大鼠结肠中 5-HT₃R, 5-HT₄R 和 SERT 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠结肠中

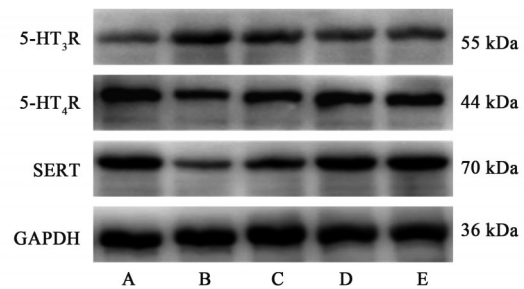


图 2 大鼠结肠中 5-HT₃R, 5-HT₄R 和 SERT 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of 5-HT₃R, 5-HT₄R and SERT in colon of rats

达水平降低, 5-HT₄R 和 SERT 的蛋白表达显著增加($P<0.05, P<0.01$); 与痛泻要方缺防风组比较, 痛泻

表 4 痛泻要方加减引经药防风对大鼠结肠和下丘脑中 5-HT₃R, 5-HT₄R 和 SERT 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Tongxie Yaofang with or without Saposhnikoviae Radix on expression of 5-HT₃R, 5-HT₄R and SERT in colon and hypothalamus of rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	结肠			下丘脑		
		5-HT ₃ R/GAPDH	5-HT ₄ R/GAPDH	SERT/GAPDH	5-HT ₃ R/GAPDH	5-HT ₄ R/GAPDH	SERT/GAPDH
正常	-	0.34±0.07	0.71±0.15	0.55±0.16	0.16±0.04	0.61±0.14	0.49±0.13
模型	-	0.53±0.16 ²⁾	0.30±0.08 ²⁾	0.17±0.05 ²⁾	0.43±0.12 ²⁾	0.24±0.05 ²⁾	0.23±0.05 ²⁾
痛泻要方缺防风	26	0.45±0.13	0.41±0.12 ³⁾	0.28±0.08 ³⁾	0.34±0.08 ³⁾	0.35±0.07 ³⁾	0.32±0.07 ³⁾
痛泻要方全方	30	0.39±0.12 ³⁾	0.47±0.12 ⁴⁾	0.39±0.10 ^{4,5)}	0.26±0.06 ^{4,5)}	0.44±0.09 ^{4,5)}	0.41±0.10 ^{4,5)}
痛泻要方倍用防风	34	0.37±0.11 ⁴⁾	0.50±0.13 ⁴⁾	0.44±0.14 ^{4,6)}	0.22±0.06 ^{4,6)}	0.46±0.11 ^{4,5)}	0.44±0.11 ^{4,5)}

要方全方组、痛泻要方倍用防风组大鼠下丘脑中5-HT₃R表达减少,5-HT₄R和SERT的表达增加($P < 0.05, P < 0.01$)。见图3,表4。

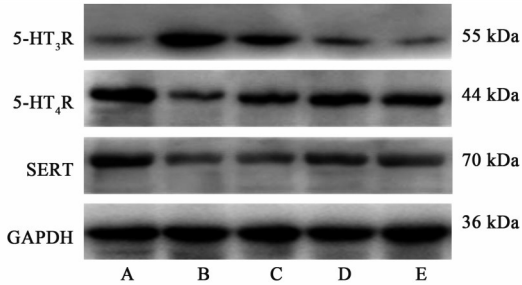


图3 大鼠下丘脑中5-HT₃R,5-HT₄R和SERT蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of 5-HT₃R, 5-HT₄R and SERT in hypothalamus of rats

4 讨论

痛泻要方为治疗肝脾不和之痛泻的代表方,现代常用于IBS,溃疡性结肠炎等肠道疾病的治疗,疗效确切^[10-11]。防风在方中兼具佐使之用,除有柔肝舒脾、燥湿止泻的功效外,还为脾经引经之药。引经药是中药实现靶向给药的载体,若引经药运用得当,可使药效靶向集中,疗效增强,在临床用药中颇具意义。本课题前期研究表明,防风能增强痛泻要方降低IBS-D内脏高敏感性的作用,增加方中活性成分在脑、肠、肝及脾中的分布,初步证实了防风在痛泻要方中的引经增效作用^[7-8]。但防风对痛泻要方调控水液代谢及5-HT信号系统的影响尚不明确。

IBS-D出现腹泻表明患者肠道水液代谢功能发生紊乱^[12]。Na⁺-K⁺-ATP酶可利用ATP能量经细胞膜转运细胞内外的Na⁺和K⁺,维持细胞内外离子平衡。腹泻发生时致病因子通过激活腺苷酸环化酶,促使ATP转化为环磷酸腺苷(cAMP),使肠黏膜细胞ATP含量减少,Na⁺-K⁺-ATP酶活性降低,促进肠黏膜细胞内K⁺排出,Na⁺等进入胞内,导致细胞肿胀坏死,进而引起肠腔中水分分泌增加而出现腹泻^[13]。分布于肠黏膜的AQP介导了肠腔中水液的跨膜转运,对平衡肠道细胞内外环境稳态及调控肠神经功能具有关键作用^[14]。AQP4在结肠近端表达高于远端,细胞的基底面和腔面的表达水平高于侧壁,黏膜顶部高于底部,这种空间排列的方向性与结肠吸收水分一致^[15]。本研究显示,IBS-D大鼠较正常大鼠的腹泻指数和粪便含水量明显增高,肠黏膜Na⁺-K⁺-ATP酶活性降低,AQP4表达减少;痛泻要方不同配伍组干预后大鼠的腹泻指数和粪便含水量均明显降低,Na⁺-K⁺-ATP酶活性升高,结肠中

AQP4表达增加;与痛泻要方缺防风组比较,痛泻要方全方组、痛泻要方倍用防风组大鼠的腹泻指数、粪便含水量,Na⁺-K⁺-ATP酶和AQP4表达水平均有显著性差异,表明防风可增强痛泻要方调控IBS-D水液代谢紊乱的作用。

IBS-D与应激刺激密切相关,常伴随抑郁、焦虑等精神障碍。神经胃肠病学研究发现,胃肠道由中枢神经系统、肠神经系统和自主神经系统共同支配,脑的各级中枢接受传入的信息,经整合后通过自主神经和神经内分泌网络将信息传递到胃肠道的肠道神经丛或直接作用于胃肠道效应细胞,引起胃肠动力及分泌的改变。内脏的各种感觉(如疼痛)也可影响中枢神经的情绪及行为,这种存在于中枢神经系统和胃肠间的神经-内分泌网络称为脑肠轴,机体通过脑肠轴的双向通路进行脑肠互动^[16]。5-HT信号系统是脑肠互动的一条重要途径,5-HT由肠道及中枢的5-HT能神经元生成,释放进入周围组织及血液,与不同的5-HT受体亚型结合调控相应的生理活动^[17]。在5-HT受体家族中,5-HT₃R和5-HT₄R与IBS发病机制关系最为密切。5-HT₃R可传递脑肠之间的信息,介导胃肠运动。当肠道受到不良刺激时,5-HT释放增加,与分布在初级传入神经元神经末梢的5-HT₃R相结合,向中枢神经传递伤害信号,引起内脏高敏感性等不良感受^[18]。激活5-HT₄R能够促进乙酰胆碱,P物质及一氧化氮等神经递质的释放,从而舒张肠道,促进肠道蠕动^[19]。发挥作用后的5-HT由SERT重摄取进入细胞^[20],在MAO-A的作用下代谢灭活^[21]。中枢系统及胃肠道5-HT信号系统中5-HT的合成、转运、灭活及与相应受体结合的任一环节异常均可导致胃肠道动力及分泌功能紊乱和内脏高敏感性的发生^[22-23]。本研究显示,IBS-D发生时5-HT信号系统的多个环节存在异常,表现为血浆、下丘脑和结肠5-HT含量增加,MAO-A酶活性降低,SERT和5-HT₄R表达减少,5-HT₃R表达水平升高。痛泻要方不同配伍均可降低模型大鼠的外周及中枢的5-HT含量,升高MAO-A酶活性,增加SERT和5-HT₄R的水平,抑制5-HT₃R的蛋白表达。痛泻要方全方组和倍用防风组调控5-HT信号系统不同环节的作用明显优于痛泻要方缺防风组,表明防风可增强痛泻要方调控肠易激综合征5-HT信号系统的效应。

综上所述,IBS-D发生时肠道水液代谢紊乱,5-HT信号系统中5-HT的合成、转运、灭活及与受体结合的每一环节均与IBS-D的发生发展相关。课题

组前期实验表明防风可提高痛泻要方活性成分白术内酯 I, 芍药苷和橙皮苷在大鼠肝、脾、脑和小肠中的浓度, 减少肺中白术内酯 I 和没食子酸的分布。因此, 笔者推测防风影响痛泻要方活性成分在靶组织的分布, 进而通过调控 IBS-D 水液代谢和 5-HT 信号系统不同环节而达到引经增效的作用。

[参考文献]

[1] GOOD L, ROSARIO R, PANAS R. New therapeutic option for irritable bowel syndrome: serum-derived bovine immunoglobulin [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(11): 3361-3366.

[2] RAO M C. Physiology of electrolyte transport in the gut: implications for disease [J]. *Compr Physiol*, 2019, 9(3): 947-1023.

[3] LIU D R, XU X J, YAO S K. Increased intestinal mucosal leptin levels in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(1): 50-61.

[4] CAMILLERI M, CARLSON P, CHEDID V, et al. Aquaporin expression in colonic mucosal biopsies from irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. *Clin Transl Gastroentero*, 2019, 10(4): e00019.

[5] LOWETTE K, DESMET A S, FARRÉ R M, et al. Fructose consumption impairs serotonergic signaling in the murine enteric nervous system [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2016, 28(9): 1438-1442.

[6] YU F Y, HUANG S G, ZHANG H Y, et al. Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(12): 3451-3459.

[7] 梁瑞峰, 葛文静, 王慧森, 等. 痛泻要方加减引经药防风对肠易激综合征大鼠内脏敏感性及脑肠轴不同靶点脑肠肽的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2): 152-157.

[8] 梁瑞峰, 葛文静, 魏征, 等. 防风对痛泻要方活性成分在正常大鼠体内的药动学和组织分布的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(19): 3802-3808.

[9] ZHU H M, LI L, LI S Y, et al. Effect of water extract from berberis heteropoda schrenk roots on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by adjusting intestinal flora [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 237: 182-191.

[10] CHEN M, TANG T C, WANG Y, et al. Randomised clinical trial: Tong-Xie-Yao-Fang granules versus placebo for patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 48(2): 160-168.

[11] GONG S S, FAN Y H, WANG S Y, et al. Mucosa repair mechanisms of Tong-Xie-Yao-Fang mediated by

CRH-R2 in murine, dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(16): 1766-1778.

[12] JARMUŽ A, ZIELIŃSKA M, LEŃ K, et al. Review: The role of MOP and DOP receptors in treatment of diarrheapredominant irritable bowel syndrome [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(18): 1462-1469.

[13] PONGKORPSAKOL P, YIMNUAL C, CHATSUDTHIPONG V, et al. Cellular mechanisms underlying the inhibitory effect of flufenamic acid on chloride secretion in human intestinal epithelial cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 134(2): 93-100.

[14] 宁晚玲, 刘李玖韬, 唐汉庆, 等. 从 AQP4 角度探讨脾主运化与水液代谢 [J]. *云南中医学院学报*, 2016, 39(5): 94-98.

[15] JONATHAN Y, STEPHEN K, QI W, et al. Characterization of AQPs in mouse, rat, and human colon and their selective regulation by bile acids [J]. *Front Nutr*, 2016, 3: 46.

[16] O'MALLEY D. Endocrine regulation of gut function—a role for glucagon-like peptide-1 in the pathophysiology of irritable bowel syndrome [J]. *Exp Physiol*, 2019, 104(1): 3-10.

[17] YU Y C, LI J, ZHANG M, et al. Resveratrol improves brain-gut axis by regulation of 5-HT-dependent signaling in the rat model of irritable bowel syndrome [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, doi: 10.3389/fncel.2019.00030.

[18] BINIENDA A, STORR M, FICHNA J, et al. Efficacy and safety of serotonin receptor ligands in the treatment of irritable bowel syndrome: a review [J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19(15): 1774-1781.

[19] WOHLFARTH C, SCHMITTECKERT S, HÄRTLE J D, et al. MiR-16 and miR-103 impact 5-HT4 receptor signalling and correlate with symptom profile in irritable bowel syndrome [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14680.

[20] 景富春, 张军. 5-羟色胺代谢动力学与功能性胃肠病的研究靶点 [J]. *胃肠病学*, 2014, 19(10): 625-627.

[21] LI Y, LI L, STEPHENS M J, et al. Synthesis, transport, and metabolism of serotonin formed from exogenously applied 5-HTP after spinal cord injury in rats [J]. *J Neurophysiol*, 2014, 111(1): 145-163.

[22] YU F Y, HUANG S G, ZHANG H Y, et al. Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(12): 3451-3459.

[23] KATSUMATA R, SHIOTANI A, MURAO T, et al. Gender differences in serotonin signaling in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Intern Med*, 2017, 56(9): 993-999.

[责任编辑 孙丛丛]