

金荞麦提取物对肠易激综合征大鼠肥大细胞, PAR-2, SP 的影响

严晶^{1,2}, 刘丽娜^{1,2}, 陆茵², 尚文斌^{1,2}, 鲁俊³, 葛飞⁴, 余利华⁵,
彭雯⁶, 于希忠^{1,2}, 张颢^{1,2}, 赵娟^{1,2}, 孙志广^{1,6*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210023;
3. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 4. 海安县中医院, 江苏南通 226600;
5. 无锡市中西医结合医院, 江苏无锡 214041; 6. 江苏省第二中医院, 南京 210027)

[摘要] 目的: 观察金荞麦提取物(Fag)对肠易激综合征(IBS)模型大鼠内脏高敏感的作用以及对肥大细胞(MC), 蛋白酶激活受体-2(PAR-2), P物质(SP)的影响。方法: 将清洁级新生雄性乳大鼠采用新生期母鼠分离、乙酸灌肠、鸡卵清白蛋白腹腔注射的复合造模方法制备 IBS 内脏高敏感模型, 大鼠随机分为正常组(生理盐水), 模型组(生理盐水), Fag 低、中、高剂量组(0.14, 0.42, 1.26 g·kg⁻¹), 酮替芬组(0.18 mg·kg⁻¹), 每组 10 只, 连续灌胃 14 d。采用腹壁撤退反应(AWR)评估大鼠内脏敏感性, 免疫组化法(immunohistochemistry)检测大鼠结肠 MC 数量、脱颗粒程度, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PAR-2 蛋白表达, 免疫组化、酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠结肠 SP 水平。结果: 与正常组比较, 模型组 20, 40, 60 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)压力下 AWR 评分明显升高, 结肠 MC 数量, 脱颗粒程度, PAR-2, SP 表达明显上升($P < 0.05$); 与模型组比较, Fag 中剂量组(20, 40, 60 mmHg 压力下), Fag 高剂量组(20, 40 mmHg 压力下)的 AWR 评分, 远端结肠 MC 数量, 脱颗粒程度, PAR-2, SP 表达明显下降($P < 0.05$); 与酮替芬组比较, Fag 高剂量组 AWR 评分(40 mmHg 压力下), SP 水平降低($P < 0.05$)。结论: Fag 能降低 IBS 模型大鼠内脏敏感性, 其机制与抑制 MC 数量及活化脱颗粒程度, 下调 PAR-2 受体, 降低 SP 有关, 并且镇痛作用优于酮替芬。

[关键词] 金荞麦提取物; 肠易激综合征; 内脏高敏感; 肥大细胞; 蛋白酶激活受体 2; P 物质

[中图分类号] R285.5; R289.5; R243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0092-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2018020092

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1406.024.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 14:06

Effect of Fagopyri Dibotryis Rhizoma Extracts on Mast Cells Protease Activated Receptor 2 and Substance P in Rat Models of Irritable Bowel Syndrome

YAN Jing^{1,2}, LIU Li-na^{1,2}, LU Yin², SHANG Wen-bin^{1,2}, LU Jun³, GE Fei⁴, YU Li-hua⁵, PENG Wen⁶,
YU Xi-zhong^{1,2}, ZHANG Hao^{1,2}, ZHAO Juan^{1,2}, SUN Zhi-guang^{1,6*}

(1. First School of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. The Affiliated Hospital to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 4. Hai'an Hospital of Traditional Chinese Medicine Nantong 226600, China; 5. Wuxi Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wuxi 214041, China; 6. Second Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210027, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Fagopyri Dibotryis Rhizoma extracts (Fag) on mast cell

[收稿日期] 20170712(013)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81503536, 81603578); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20151008, BK20140959); 高等学校博士学科点专项科研基金联合项目(20133237110008); 江苏省高校自然科学研究面上项目(15KJB360008)

[第一作者] 严晶, 博士, 助理研究员, 主治医师, 从事中西医结合消化病学研究, Tel: 025-85811146, E-mail: yanjing@njucm.edu.cn

[通信作者] * 孙志广, 博士, 教授, 主任医师, 从事中西医结合消化病学研究, Tel: 025-86405066, E-mail: zhiguangsun@sina.com

(MC), protease activated receptor-2 (PAR-2) and substance P (SP) in irritable bowel syndrome (IBS) rat models with visceral hypersensitivity. **Method:** IBS rat models were established through neonatal maternal separation, acetic acid enema and intraperitoneal injection with OVA. A total of 60 SD rats were randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline), low, middle and high-dose Fag groups (0.14, 0.42, 1.26 g·kg⁻¹) and ketotifen group (0.18 mg·kg⁻¹). After oral gavage for 14 days, visceral hypersensitivity was assessed based on abdominal withdrawal reflex (AWR) score. The number and degranulation of mast cells were observed by immunohistochemical staining (IHC); PAR-2 was measured by Western blot; and SP was evaluated by enzyme linked immunoabsorbent assay and IHC. **Result:** AWR score in model group was significantly higher than that of control group at the distension pressures of 20, 40, 60 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa); and the number and degranulation of mast cells, PAR-2 and SP expressions significantly increased. Middle-dose Fag group (at the distension pressures of 20, 40, 60 mmHg) and high-dose Fag group (at the distension pressures of 20, 40 mmHg) could effectively reduce AWR scores. And the number and degranulation of mast cells, PAR-2 and SP expressions were lower than those of model group. Furthermore, at the distension pressure of 40 mmHg, high-dose Fag group could lower than ketotifen-treated group in terms of the AWR score. **Conclusion:** Fag could alleviate the visceral hypersensitivity in IBS rat models. Its mechanism was related with the inhibition of the number and degranulation of intestinal mucosal mast cells, the down-regulation of PAR-2 and the reduction of SP.

[**Key words**] Fagopyri Dibotryis Rhizoma extracts (Fag); irritable bowel syndrome (IBS); visceral hypersensitivity; mast cell; protease activated receptor-2 (PAR-2); substance P (SP)

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是临床常见的慢性功能性肠病之一。有部分患者在急性胃肠道感染恢复之后,仍存在腹痛、腹部不适、腹泻等症状,称之为感染后IBS(post-infectious IBS, PI-IBS)。本病是多因素作用的结果,其中肠黏膜肥大细胞(mast cell, MC)是肠道主要的抗原感受器,参与肠“神经-免疫-内分泌”网络的调控。研究发现,IBS患者肠道MC数量及活化程度增加,并与腹痛程度呈正相关^[1-4],其释放的类胰蛋白酶激活蛋白酶激活受体-2(protease activated receptor-2, PAR-2),导致肠神经纤维中神经肽P物质(substance P, SP)显著增强,诱导内脏痛觉过敏等^[5]。临床已开始尝试使用肥大细胞膜稳定剂酮替芬(ketotifen)治疗IBS,但存在一些不良反应^[6]。金荞麦(Fagopyri Dibotryis Rhizoma, Fag)具有清热解毒、消痈排脓、健脾利湿、活血疗疮的作用,既往药理研究多集中在抗炎、抗菌、镇痛、抗肿瘤、抗氧化等方面,临床多用于治疗呼吸系统疾病、肠道系统疾病、肿瘤等^[7],其中对肠道系统疾病多局限于细菌性痢疾。而课题组长期临床实践及应用Arrowsmith软件^[8]发现,Fag亦可治疗IBS,其机制与降低内脏高敏感^[9-12]、改善肠黏膜屏障受损^[12]、抑制胃肠动力亢进^[13]等有关。本次实验首次采用复合造模方法,通过观察Fag对MC, PAR-2, SP的影响,进一步揭示Fag缓解IBS内脏高敏感的新机制,体现了Fag多成分、多靶点的作

用优势,拓宽了Fag的临床适应证范围,具有良好的临床应用价值和市场前景。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康SD大鼠,雄鼠10只,雌鼠20只,体重160~180g,由南京医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(苏)2012-0005。自由饮食、饮水,2周后分笼(每笼1只雄鼠,2只雌鼠),待雌鼠怀孕后单独饲养。出生后,幼鼠由母鼠喂奶,并只选择雄性SD乳大鼠作为研究对象。本研究所涉及的动物相关操作均在南京中医药大学伦理委员会的批准下进行,批准号为ACU-02(20130703)。

1.2 药物及试剂 金荞麦提取物(蓼科植物金荞麦*Fagopyrum dibotrys*的干燥根茎,其提取物(粉末状)含生药12.5 g·g⁻¹,亦为金荞麦胶囊成分,由南通精华医药有限公司提供,批号E12629,并经该公司施甜甜中药师鉴定为正品);富马酸酮替芬片(上海衡山药业有限公司,批号130201);佐剂液态铝(Imject Alum,美国Thermo公司,批号QD217412A);卵清白蛋白V级(OVA,美国Sigma公司,批号SLBB4340V);羊抗大鼠PAR-2抗体(美国Santa Cruz公司,货号Sc-8205);小鼠抗大鼠SP抗体(美国Abcam公司,货号14184);大鼠SP酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(中国Ameko公司,货号AE90561Ra);小鼠抗大鼠肥大细胞类胰蛋白酶抗体

(美国 Abcam 公司, 货号 ab2378); β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (中国 Bioworld 公司, 货号 AP0060)。

1.3 仪器 YB-6D 型石蜡包埋机 (上海华岩公司), RM2135 型石蜡切片机 (德国莱卡公司), QP-B 型切片漂烘仪 (合肥力飞电子科技有限公司), 80i 型光学显微镜 (日本 Nikon 公司), EnSpire 型多功能酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司), Mini Protean 3 Cell 型 SDS-PAGE 凝胶电泳系统, Mini Trans-Blot 型电转印槽, GelDoc 2000 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法:

2.1 模型制备 参考文献 [14-16] 进行改良, 制备 IBS 大鼠模型。从出生第 2~21 天每天母婴分离 3 h (9:00—12:00), 不予哺乳; 第 8~21 天在母婴分离的基础上每天用 0.5% 乙酸直肠内刺激 1 次, 即用石蜡油润滑后的连续硬膜外导管 (直径 1 mm) 经肛门插入 0.5~1 cm, 注入 0.5% 的乙酸 0.2 mL, 用手压迫肛门并将乳大鼠尾巴抬高 30 s。每隔 2 d 增加 0.1 mL, 直至 0.5 mL 为止。至第 22 天起, 正常饲养至第 41 天; 第 42, 46 天分别予腹腔注射 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ OVA (每 30 mg OVA V 级加入质量浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Imject Alum 1 mL 中) 1 mL; 第 47~57 天正常饲养。正常组大鼠分别在上述对应的时间段内, 幼鼠、母鼠同一笼, 每天予等量 0.9% 生理盐水直肠给药, 等量 PBS 腹腔注射。造模结束后大鼠回笼, 常规饲养, 自由饮食。第 58 天进行腹壁撤退反射 (abdominal withdrawal reaction, AWR) 检测, 评价内脏敏感性。

2.2 AWR 检测 参考文献 [9] 操作, 分别给予 20, 40, 60, 80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 压力, 观察结肠扩张 (colorectal distension, CRD) 所产生的反应。每次扩张持续 20 s, 间歇 2 min, 每个强度重复 3 次, 取平均值。评分标准参照 Al-chaer^[17], 0 分, 结肠扩张刺激时大鼠情绪基本稳定; 1 分, 给予刺激时开始出现不稳定, 偶有扭动头部; 2 分, 给予刺激时腹背部肌肉轻微收缩但腹部不抬离地面; 3 分, 给予刺激时腹背部肌肉较强烈收缩并有腹部抬离地面情况; 4 分, 给予刺激时腹部肌肉强烈收缩, 腹部呈弓形, 腹部、会阴部抬离地面。干预前后各做 1 次。

2.3 分组及给药 将造模成功的大鼠采用随机数字法分为模型组, Fag 低、中、高 ($0.14, 0.42, 1.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组, 酮替芬组 ($0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只, 另设正常组 10 只。Fag 组 (成人口服剂量

为 $9 \times 0.4 \text{ g} \cdot (60 \text{ kg})^{-1}$, 大鼠中剂量按成人 7 倍量给药), 酮替芬组予相应药物混悬液灌胃 (ig), 正常组、模型组予等量 0.9% 生理盐水 ig, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/d, 给药 2 周, 并再次评价内脏敏感性。

2.4 取材 禁食 12 h, 予 0.4% 戊巴比妥钠 ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉, 打开腹腔, 取距肛门 8 cm 处结肠 3 cm, 用 4 °C 生理盐水冲洗, 吸干, 平均分为 3 段, 1 段放入 4% 多聚甲醛固定液中固定, 其余 2 段分别放入冻存管, -80 °C 保存, 待测。

2.5 免疫组化法检测肠组织 MC 及 SP 水平 将组织脱水、石蜡包埋、切片, 进行 MC, SP 免疫组织化学染色。切片在 400 倍视野下, 随机选取 MC 数目最多的 5 个视野进行计数, 计算 5 个视野 MC 总数和脱颗粒率的平均值。MC 脱颗粒率 = (脱颗粒 MC 数/MC 总数) $\times 100\%$ 。片子在 200 倍视野下, 随机选择 5 个视野, 采用 Image-Pro Plus 6.0 进行 SP 免疫组化阳性表达半定量分析, 计算积分吸光度 IA。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肠组织 PAR-2 蛋白表达 按 1:5 加入混有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解 500 mL, 匀浆, 4 °C, $12\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 离心后取上清。蛋白定量后再取等分的上清, 含匹配蛋白量 50 μg , 分离电泳、转膜、染色, 剪膜, 脱色、封闭、洗膜。稀释一抗 (1: 1 000) 后孵育, 4 °C 震荡过夜。稀释二抗后, 37 °C 下振荡 90 min。加 ELC 荧光底物显色, 曝光并采集图片。

2.7 酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测肠组织 SP 水平 按 1:9 加入生理盐水制备结肠组织匀浆, 离心 ($3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min) 取上清。按照试剂盒说明书进行 ELISA 实验, 测定各孔的 A, 采用 Curve Expert 1.3 进行标准曲线的绘制, 并计算出对应的浓度。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件, 原始数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布采用 One-Way ANOVA 检验, 不符合正态分布用 Wilcoxon 秩和检验。以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠的一般状况比较 正常组大鼠被毛光泽色白, 活动良好, 饮食正常; 造模后大鼠被毛失去光泽, 枯黄, 不易变干, 活动减少, 喜好扎堆, 困倦嗜睡, 饮水量、饮水量减少。经 Fag 及酮替芬治疗后, 被毛逐渐恢复光泽, 活动增加, 饮食、饮水量增加。

3.2 对 IBS 模型大鼠内脏敏感性的影响 与正常组比较, 模型组在 20, 40, 60 mmHg 下 AWR 评分增

加,肠道痛觉敏感性增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示造模成功。与模型组相比,在 20,40 mmHg 压力下,Fag 中、高剂量组、酮替芬组可有效减少 AWR 评分 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);在 60 mmHg 压力下,Fag

高剂量组、酮替芬组亦可减少 AWR 评分 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),降低肠道痛觉敏感。与酮替芬组相比,Fag 高剂量组可明显降低 40 mmHg 下 AWR 评分,效果优于酮替芬组。见表 1。

表 1 Fag 对 IBS 内脏高敏感模型大鼠 AWR 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Fag on AWR scores in rat model of irritable bowel syndrome with visceral hypersensitivity ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
正常	-	0.40 ± 0.52	1.20 ± 0.42	2.20 ± 0.63	3.20 ± 0.42
模型	-	1.60 ± 0.70 ¹⁾	2.60 ± 0.84 ²⁾	3.40 ± 0.52 ²⁾	3.60 ± 0.52
Fag	0.14	1.60 ± 0.52	2.40 ± 0.52	3.20 ± 0.42	3.60 ± 0.52
	0.42	1.00 ± 0.47 ³⁾	2.40 ± 0.84 ³⁾	3.00 ± 0.67	3.50 ± 0.53
	1.26	0.70 ± 0.48 ⁴⁾	1.70 ± 0.48 ^{4,5)}	2.50 ± 0.53 ⁴⁾	3.30 ± 0.48
酮替芬	0.000 18	0.80 ± 0.42 ⁴⁾	2.00 ± 0.67 ⁴⁾	2.80 ± 0.42 ³⁾	3.50 ± 0.53

注:相同压力下与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与酮替芬组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2,图 2 同)。

3.3 对 IBS 模型大鼠远端结肠 MC 的影响 MC 类胰蛋白酶免疫组化阳性表现为胞质浅黄色或棕黄色颗粒,主要分布于肠黏膜固有层、黏膜下层、血管附近。未脱颗粒的 MC 细胞形态完整,胞质均匀,清晰;脱颗粒的 MC 细胞膜破裂,形态不规则,有少量颗粒漏出,积聚在周围。与正常组相比,模型组大鼠结肠黏膜 MC 数量、脱颗粒程度显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比,Fag 高剂量组、酮替芬组可减少 MC 数目及脱颗粒程度 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),Fag 中剂量组仅可抑制 MC 活化脱颗粒 ($P < 0.05$)。见表 2,图 1。

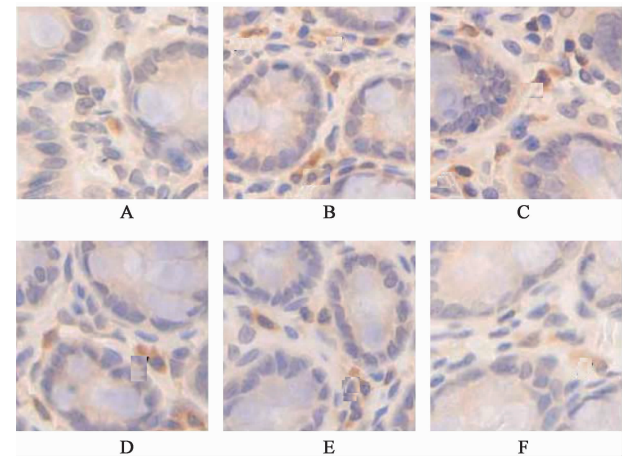
表 2 Fag 对 IBS 模型大鼠远端结肠黏膜 MC 数目、活化脱颗粒及 SP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of Fag on numbers and degranulation of MC and SP in distal colon of rat model of irritable bowel syndrome with visceral hypersensitivity ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	MC /个	MC 活化脱颗粒/%	SP / $\mu g \cdot L^{-1}$
正常	-	3.6 ± 0.55	16.68 ± 15.59	137.62 ± 27.92
模型	-	9.0 ± 1.00 ²⁾	55.11 ± 5.00 ²⁾	318.67 ± 23.15 ²⁾
Fag	0.14	8.6 ± 0.55	53.61 ± 6.78	316.62 ± 20.39
	0.42	7.6 ± 1.14	31.55 ± 4.84 ³⁾	281.86 ± 28.24 ⁴⁾
	1.26	7.0 ± 0.71 ³⁾	25.12 ± 9.56 ⁴⁾	201.04 ± 22.29 ^{4,5)}
酮替芬	0.000 18	5.6 ± 0.55 ⁴⁾	21.33 ± 6.91 ⁴⁾	227.95 ± 25.52 ⁴⁾

3.4 对 IBS 模型大鼠远端结肠 PAR-2 蛋白的影响 与正常组相比,模型组 PAR-2 蛋白表达明显增高 ($P < 0.01$)。与模型组相比,Fag 中、高剂量、酮替芬组 PAR-2 蛋白表达有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 2。

3.5 对 IBS 模型大鼠远端结肠 SP 的影响 与正常组相比,模型组 SP 水平显著增加 ($P < 0.01$)。与模



A. 正常组;B. 模型组;C. Fag 0.14 $g \cdot kg^{-1}$ 组;D. Fag 0.42 $g \cdot kg^{-1}$ 组;E. Fag 1.26 $g \cdot kg^{-1}$ 组;F. 酮替芬组(图 2,3 同)

图 1 Fag 对 IBS 模型大鼠远端结肠黏膜 MC 数目及活化的影响(免疫组化,×400)

Fig. 1 Effect of Fag on numbers and degranulation of MC in distal colon of rat model of irritable bowel syndrome with visceral hypersensitivity (IHC, ×400)

型组相比,Fag 中、高剂量组、酮替芬组 SP 水平显著降低 ($P < 0.01$);与酮替芬组相比,Fag 高剂量组 SP 水平降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

SP 免疫反应阳性呈棕黄色或棕褐色颗粒,位于腺体周围的固有层中、肠肌间神经丛、黏膜下神经丛,或见散在点状、线状结构,或见簇集分布。与正常组相比,模型组 SP 免疫反应阳性增多、增粗、染色增强,有显著统计学意义 ($P < 0.01$);与模型组相比,Fag 中、高剂量组、酮替芬组 SP 免疫阳性反应减弱 ($P < 0.05$);与酮替芬组相比,Fag 高剂量组 SP 免疫阳性反应减弱,有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

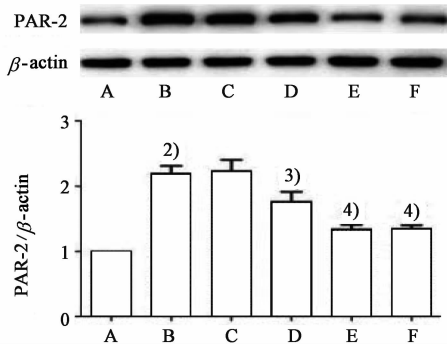


图 2 Fag 对 IBS 模型大鼠远端结肠 PAR-2 蛋白的影响
Fig. 2 Effect of Fag on PAR-2 protein expression in distal colon of rat model of irritable bowel syndrome with visceral hypersensitivity

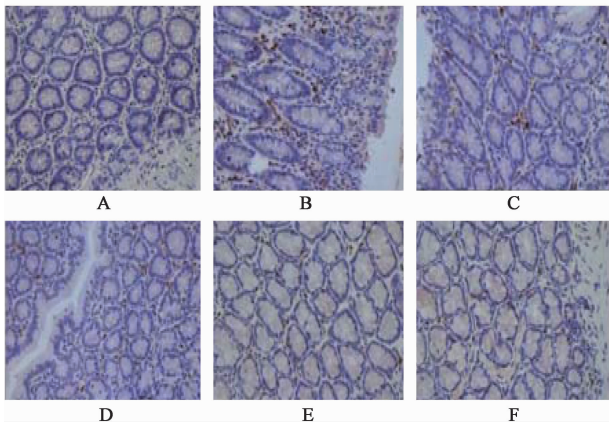


图 3 Fag 对 IBS 内脏高敏感模型大鼠远端结肠 SP 的影响 (免疫组化, $\times 200$)
Fig. 3 Effect of Fag on SP protein expression in distal colon of rat model of irritable bowel syndrome with visceral hypersensitivity (IHC, $\times 200$)

4 讨论

中医将 IBS 归属于“腹痛”、“泄泻”、“郁证”等范畴。多由七情失调,或饮食不洁(节)等,导致肝郁脾虚,运化失健。同时又因气滞或湿浊日久化热,伏藏于内,因此临床证候多以虚实并见、寒热错杂为突出表现,这也是本病治疗困难,易于复发的主要原因。

MC 广泛存在于胃肠道,其数量增多及活化脱颗粒程度增加受到精神压力、急性胃肠道感染、食物过敏等因素影响,继而释放多种介质,如类胰蛋白酶,组胺,五羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT),炎症因子等,导致 IBS 内脏痛觉过敏、结肠黏膜低度炎症、肠黏膜屏障受损等^[18],这可能是中医肝郁脾虚、湿热内蕴病机的现代中医本质之一。其中,类胰蛋白酶是一种具有多种生物学活性的天然蛋白酶,是 MC 激活和脱颗粒的重要标志。本实验中,课题组

模拟上述三大主因,采用复合造模方法,即新生期母鼠分离、乙酸灌肠、鸡卵清白蛋白腹腔注射成功复制 IBS 内脏高敏感模型。发现模型组远端结肠 MC 细胞数量、脱颗粒程度均较正常组显著增加,进一步证实 MC 与 IBS 发病密切相关,Fag 可抑制肥大细胞数量及活化脱颗粒,减轻内脏高敏感。

PAR-2 为 G 蛋白相偶联受体,类胰蛋白酶是其强有力的激活剂。研究发现 IBS 患者除肠黏膜 MC 数量增多外,其黏膜及肠道灌洗液中类胰蛋白酶含量亦增高^[19],将 IBS 患者肠活检组织的培养上清液灌入小鼠结肠中可导致小鼠躯体及内脏感觉过敏,丝氨酸蛋白酶抑制剂和 PAR-2 拮抗剂可阻断该效应^[20]。此外,IBS 结肠组织广泛存在 PAR-2 阳性的神经元^[21],短暂给予 PAR-2 激动剂可观察到持续 1 h 以上的 PAR-2 神经元膜电位的改变^[22],活化的 PAR-2 又可导致肠感觉神经元释放 SP 增加^[23]。SP 是常见脑肽之一,分布于中枢及外周系统,肠道中的 SP 主要存在于肠神经系统的内源性神经元中,是一种促炎症性感觉神经肽,能将肠道神经末梢的痛觉信号传递至脊髓水平,并上传至大脑,降低内脏感觉阈值^[24]。本研究中,笔者发现 IBS 内脏敏感性增高与 PAR-2,SP 表达增加有关,而 Fag 下调 PAR-2 的机制可能与抑制 MC 脱颗粒,降低类胰蛋白酶释放直接相关。同时,与酮替芬相比,Fag 在改善 40 mmHg 球囊压力下 AWR 评分及远端结肠黏膜 SP 水平优于酮替芬,其原因可能与 Fag 镇痛的多靶点性有关。前期研究中^[9-11],课题组发现 Fag 可通过下调 DRG 辣椒素(CAP)受体亚型 1(TRPV1)表达,抑制神经递质 5-HT 产生和释放,下调 5-HT_{3A} 受体表达,上调 5-HT_{1A} 受体表达以及下调脊髓后角和海马 NMDA 受体 2B 亚基(NR2B)表达等途径,缓解内脏高敏感,达到镇痛目的,而目前尚未发现酮替芬对上述疼痛靶点的报道。

现代药理研究表明 Fag 的主要成分包括多酚类、甾体、萜类、有机酸等,其单体有原矢车菊素 B-2,原矢车菊素 C-1,木犀草素,槲皮素等^[25]。如槲皮素^[26-27]可抑制大鼠嗜碱性粒细胞白血病细胞脱颗粒,减少类胰蛋白酶释放,又可通过抑制 Ca^{2+} 内流,PKC θ 的磷酸化减少人类脐带血液培养的 MC 类胰蛋白酶,组胺,白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)释放。原矢车菊素 C-1^[28]可抑制 Fc ϵ RI 介导的 MC 活化,上述研究结果进一步提示了 Fag 对肥大细胞的作用机制,为后期课题组进一步研究上游靶点提供了方向。

[参考文献]

- [1] WANG S H, DONG L, LUO J Y, et al. Decreased expression of serotonin in the jejunum and increased numbers of mast cells in the terminal ileum in patients with irritable bowel syndrome [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(45): 6041-6047.
- [2] Guilarte M, Santos J, de Torres I, et al. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum [J]. *Gut*, 2007, 56(2): 203-209.
- [3] Park J H, Rhee P L, Kim H S, et al. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(1): 71-78.
- [4] 卢小芳,张声声.基于肥大细胞论肠易激综合征的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(14): 2239-2244.
- [5] BAO Y, HOU W, HUA B. Protease-activated receptor 2 signalling pathways; a role in pain processing [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(1): 15-27.
- [6] Klooker T K, Braak B, Koopman K E, et al. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome [J]. *Gut*, 2010, 59(9): 1213-1221.
- [7] 严晶,袁嘉嘉,刘丽娜,等.金荞麦药理作用及临床应用研究进展[J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(7): 621-624.
- [8] 田超,严晶,范方田,等.利用知识发现工具 Arrowsmith 探讨金荞麦及其有效成分与 IBS 的相关性[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(6): 190-193.
- [9] 刘丽娜,孙志广,张雪梅,等.金荞麦提取物对 IBS 大鼠脊髓镇痛的干预机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(15): 1290-1295.
- [10] 刘丽娜,严晶,陆玮婷,等.金荞麦提取物改善肠易激综合征大鼠内脏痛觉过敏的效果及其机制[J]. *华西药理学杂志*, 2016, 31(2): 135-138.
- [11] 刘丽娜,周梁,田超,等.金荞麦总黄酮下调 NR2B 表达改善 IBS 大鼠痛觉过敏[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(9): 1289-1293.
- [12] LIU L, CAI X, YAN J, et al. *In vivo* and *in vitro* antinociceptive effect of *Fagopyrum cymosum* (Trev.) meish extracts; a possible action by recovering intestinal barrier dysfunction [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, doi:10.1155/2012/983801.
- [13] 刘丽娜,严晶,孙志广,金荞麦提取物对 D_IBS 大鼠排便功能及离体结肠的作用和机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(12): 1469-1475
- [14] 李兆申,詹丽杏,邹多武,等.腹腔注射卵清白蛋白致大鼠内脏高敏感的实验研究[J]. *基础医学与临床*, 2003, 23(S1): 122-125.
- [15] REN T H, WU J, Yew D, et al. Effects of neonatal maternal separation on neurochemical and sensory response to colonic distension in a rat model of irritable bowel syndrome [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(3): G849-856.
- [16] Winston J, Shenoy M, Medley D, et al. The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(2): 615-627.
- [17] Al-Chaer E D, Kawasaki M, Pasricha P J. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [18] 卢小芳,张声声.基于肥大细胞论肠易激综合征的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(14): 2239-2244.
- [19] Barbara G, Stanghellini V, Giorgio R D, et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(3): 693-702.
- [20] Cenac N, Andrews C N, Holzhausen M, et al. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(3): 636-647.
- [21] Kayssi A, Amadesi S, Bautista F, et al. Mechanisms of protease-activated receptor 2-evoked hyperexcitability of nociceptive neurons innervating the mouse colon [J]. *J Physiol*, 2007, 580(3): 977-991.
- [22] Reed D E, Barajas-Lopez C, Cottrell G, et al. Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons [J]. *J Physiol*, 2003, 547(2): 531-542.
- [23] Nguyen C, Coelho A M, Grady E, et al. Colitis induced by proteinase-activated receptor-2 agonists is mediated by a neurogenic mechanism [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003, 81(9): 920-927.
- [24] 熊观瀛,林琳,赵志泉. P 物质与肠易激综合征 [J]. *国外医学:内科学分册*, 2003, 30(6): 245-248.
- [25] 盛华刚,朱立俏,林桂涛.金荞麦的化学成分与药理作用研究进展 [J]. *西北药理学杂志*, 2011, 26(2): 156-158.
- [26] Kempuraj D, Madhappan B, Christodoulou S, et al. Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 145(7): 934-944.
- [27] Shaik Y B, Castellani M L, Perrella A, et al. Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2006, 20(3/4): 47-52.
- [28] Nakano N, Nishiyama C, Tokura T, et al. Procyanidin C1 from apple extracts inhibits Fc epsilon RI-mediated mast cell activation [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008, 147(3): 213-221.

[责任编辑 邹晓翠]