

· 药理 ·

## 肠安 I 号方含药血清对致敏肥大细胞活化脱颗粒的影响

马祥雪<sup>1</sup>, 吉海杰<sup>2,3</sup>, 吕林<sup>1</sup>, 吴皓萌<sup>3,4</sup>, 王风云<sup>1</sup>, 唐旭东<sup>3\*</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2. 山西省中医药研究院, 太原 030012;

3. 中国中医科学院, 北京 100700; 4. 广州中医药大学第二附属医院, 广州 510120)

**[摘要]** 目的:探讨肠安 I 号方含药血清对免疫球蛋白 E(IgE)介导的大鼠嗜碱性粒细胞(RBL-2H3)活化脱颗粒的影响及非受体酪氨酸蛋白激酶/脾酪氨酸蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶(Lyn/Syk/MAPK)信号通路的调节作用。方法:制备肠安 I 号方含药血清,将 SD 雄性大鼠随机分为肠安 I 号方高、中、低剂量组及空白组,每组 10 只,给药剂量:空白组给予 10 mL·kg<sup>-1</sup>蒸馏水灌胃,肠安 I 号方低、中、高剂量组分别予 1.15, 2.30, 4.60 g·kg<sup>-1</sup>药液灌胃,给药体积 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 1 次/d, 连续灌胃 7 d。细胞分组:空白组,予正常大鼠血清;模型组,予正常大鼠血清;酮替芬组,予正常大鼠血清+30 μmol·L<sup>-1</sup>酮替芬。肠安 I 号方低、中、高剂量组分别为予肠安 I 号方低、中、高剂量含药血清。建立 IgE 介导的 RBL-2H3 细胞活化、脱颗粒模型,采用甲苯胺蓝染色进行肥大细胞计数;采用比色法检测细胞脱颗粒 β-氨基己糖释放率;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞上清中肥大细胞类胰蛋白酶(MCT),肿瘤坏死因子-α(TNF-α),单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及组胺含量;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Lyn/Syk/MAPK 通路蛋白表达。结果:对于细胞活化脱颗粒,与空白组比较,模型组细胞 β-氨基己糖释放率显著升高(P<0.01),脱颗粒率明显升高(P<0.05);与模型组比较,肠安 I 号方含药血清各剂量组细胞 β-氨基己糖释放率显著下降(P<0.01),细胞脱颗粒率明显下降(P<0.05)。对于活性介质释放,与空白组比较,模型组细胞上清组胺, MCT, TNF-α 及 MCP-1 含量均显著增高(P<0.01);与模型组比较,肠安 I 号方各剂量组细胞上清组胺, MCT, TNF-α 及 MCP-1 含量均显著减低(P<0.01)。与正常组比较,模型组细胞 Lyn 和 Syk 及细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2), c-Jun 氨基末端激酶(JNK), p38 MAPK 磷酸化水平明显升高(P<0.05);与模型组比较,肠安 I 号方各剂量 Lyn, Syk 及 ERK1/2, JNK 及 p38 蛋白磷酸化水平明显降低(P<0.05)。结论:肠安 I 号方含药血清通过下调 RBL-2H3 细胞活化上游信号通路关键蛋白 Lyn, Syk 和下游 ERK1/2, JNK 及 p38 蛋白的磷酸化水平,抑制肥大细胞活化脱颗粒,减少组胺, MCT, TNF-α 及 MCP-1 等活性介质释放,这可能是其抑制肥大细胞活化,治疗腹泻型肠易激综合征( IBS-D)内脏高敏感的机制之一。

**[关键词]** 肠安 I 号方; 含药血清; 肥大细胞; 脱颗粒; 机制

**[中图分类号]** R2-0; R289; R57 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0048-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202136

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200825.1436.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-8-25 15:28

### Effect of Medicated Serum Prepared with Chang'an I Prescription on Sensitized Mast Cell Degranulation

MA Xiang-xue<sup>1</sup>, JI Hai-jie<sup>2,3</sup>, LYU Lin<sup>1</sup>, WU Hao-meng<sup>3,4</sup>, WANG Feng-yun<sup>1</sup>, TANG Xu-dong<sup>3\*</sup>

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

2. Shanxi Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China;

3. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

**[收稿日期]** 20200406(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81774303, 81804089, 81703992); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-003); 中国博士后科学基金项目(2018M640222); 北京市自然科学基金项目(7192184)

**[第一作者]** 马祥雪, 博士, 主治医师, 从事功能性胃肠病中医药防治研究, Tel: 010-62835641, E-mail: maxiangxue@163.com

**[通信作者]** \* 唐旭东, 博士, 教授, 首席研究员, 主任医师, 从事中西医结合功能性胃肠病基础与临床研究, E-mail: txedly@sina.com

**[Abstract]** **Objective:** To observe the influence of Chang'an I prescription drug-containing serum on IgE-mediated RBL-2H3 cell degranulation model, and explore the mechanism of Chang'an I prescription in inhibiting RBL-2H3 activation degranulation and releasing inflammatory mediators with v-yes-1 Yanaguchi sarcoma viral related oncogene homolog (Lyn)/spleen tyrosine protein kinase (Syk)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathway. **Method:** Preparation for Chang'an I prescription serum. Animal group, SD male rats were randomly divided into Chang'an I prescription serum high, medium, low dose, and blank control groups with 10 rats in each group. Dosage: 10 mL·kg<sup>-1</sup> distilled water was given to blank control group, while Chang'an I prescription serum high, medium and low dose groups were respectively given to the Chang'an I prescription concentrated crude drug with concentration of 1.15, 2.30, 4.60 g·kg<sup>-1</sup>, respectively once a day for 7 days continuously and then blood was taken from aorta ventralis and centrifuged. Ketotifen as the positive control drug. Mast cells are counted with toluidine blue staining. Cellular release of  $\beta$ -aminohexose was detected by colorimetric method. Contents of MCT, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and histamine were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, Lyn/Syk/MAPK protein levels were detected by immunoblotting. **Result:** For cell activation and degranulation, compared with the blank control group, the model group had more cell degranulation ( $P<0.05$ ), compared with model group, the cell degranulation rate of each dose group of Chang'an I prescription decreased ( $P<0.05$ ). The release rate of  $\beta$ -hexosamine in each dose group of Chang'an I prescription decreased significantly ( $P<0.01$ ). For the release of active mediators, compared with the blank control group, the contents of histamine, MCT, TNF- $\alpha$  and MCP-1 all increased in the model group ( $P<0.01$ ), compared with the model group, the contents in each dose group of Chang'an I prescription all decreased significantly ( $P<0.01$ ). Compared with the normal group, the phosphorylation levels of Lyn and Syk, extracellular regulatory protein kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and mitogen-activated protein kinase p38 increased in the model group ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the Lyn, Syk and ERK1/2, JNK and p38 protein phosphorylation levels reduced in Chang'an I prescription group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Chang'an I prescription drug-containing serum down-regulates the phosphorylation levels of proteins Lyn, Syk, and ERK1/2, JNK, and p38, inhibits RBL-2H3 cell activation and degranulation, reduces the release of cytokines and chemokines, such as histamine, MCT, TNF- $\alpha$  and MCP-1, it may be one of its mechanisms for treating IBS-D visceral hypersensitivity.

**[Key words]** Chang'an I prescription; medicated serum; mast cells; degranulation; mechanism

腹泻型肠易激综合征( IBS-D)是临床常见的功能性肠病,以反复发作的腹痛、排便习惯改变,伴大便秘性状异常为主要临床特征,严重影响患者的生活质量,症状的范围、持续时间和严重程度可致患者从生活工作不便到丧失能力不等,造成重大的社会经济负担<sup>[1-2]</sup>。目前尚无一种药物可以完全有效的治疗 IBS-D,近年来临床常用的解痉剂、止泻药、肠道动力感觉调节剂、益生菌或抗抑郁药物仅能针对性改善症状,存在治疗上的局限性<sup>[3]</sup>。中药复方通过整体调节与辨证论治,在 IBS-D 治疗上具有一定的优势,可明显改善患者症状,提高其生活质量<sup>[4-7]</sup>。因此,深入研究 IBS-D 的发病机制、治疗方法及治疗药物具有重要意义。

IBS-D 属于中医“泄泻”“腹痛”范畴,是一组功能性的症状群,临床表现复杂多样。中国中医科学

院唐旭东教授认为 IBS-D 以脾虚为病机根本,肝郁脾虚为病机关键,临床上多因情志因素的影响,使得疾病反复发作,病程日久,出现脾阳虚,甚至脾肾阳虚的病机演变,致使病情加重,缠绵难愈。肠安 I 号方是中国中医科学院唐旭东教授在对 IBS-D 基本病机理解的基础上,结合长期的临床实践研制的复方中药制剂,具有疏肝健脾、温阳固涩之效<sup>[8]</sup>。前期多中心、随机、双盲、安慰剂对照临床试验结果表明肠安 I 号方有效缓解 IBS-D 患者腹痛、腹部不适的症状,提高患者生活质量<sup>[9]</sup>。实验研究显示肠安 I 号方改善 IBS-D 模型大鼠内脏高敏感,与减少肠黏膜肥大细胞活化,抑制肥大细胞类胰蛋白酶(MCT),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等活性介质释放有关,但机制尚不明确<sup>[10]</sup>。

本研究基于前期临床与实验研究,建立免疫球

蛋白(Ig)E致敏肥大细胞活化脱颗粒的细胞模型,开展肠安I号方含药血清的干预研究,以期探究肠安I号方含药血清影响肥大细胞活化、脱颗粒的作用及分子机制,以进一步阐明其通过影响肥大细胞活化,改善IBS-D内脏高敏感的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康SD雄性大鼠40只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0011,体质量180~220 g,用于制备含药血清。动物饲养于中国中医科学院西苑医院SPF级动物实验中心,动物房内温度22~25℃,相对湿度60%,食物及饮水供应充足。本实验通过中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会审查,符合相关伦理要求(伦理审查编号2019XLC001-2)。

**1.2 细胞株** 大鼠嗜碱性细胞白血病细胞株(RBL-2H3),购自中国科学院细胞库(目录号TCR7),传代至第12代进行实验。

**1.3 药物及试剂** 肠安I号方由生黄芪12 g,炒白术12 g,炒白芍15 g,防风6 g,黄连4 g,炮姜炭6 g,炙甘草6 g等组成,药物均购自河北百草康神药业有限公司,经中国中医科学院西苑医院制剂室郑蕊副主任药师鉴定均为正品,并制备为浸膏粉,每克干粉相当于3.86 g生药,4℃条件下保存。富马酸酮替芬,4-硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷,抗DNP-IgE单克隆抗体(美国Sigma公司,批号分别为34580-14-8, N9376, D8406);胎牛血清, MEM/EBSS培养基(美国Hyclone公司,批号分别为GYG0116, ABC2111911);0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号25200-056);DNP-has(美国Biosearch Technologies公司,批号D-5059-10);TNF-α,单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及组胺酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海森雄科技实业有限公司,批号分别为SXB007, SXM043, SX07003);大鼠类胰蛋白酶MCT ELISA试剂盒(江苏博深生物科技有限公司,批号BS-E11109R2);细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2),磷酸化(p-)ERK1/2, c-Jun氨基末端激酶(JNK), p-JNK, p38有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK), p-p38 MAPK, 脾酪氨酸蛋白激酶(Syk), p-Syk, 非受体酪氨酸蛋白激酶(Lyn), p-Lyn抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为4695, 4370, 9252, 4668, 9212, 9211, 12358, 2710, 2796, 2731)。

**1.4 仪器** SCT-13V-85V14型低温高速冷冻离心机(美国Thermo Forma公司);BECKMAN型全波长

多功能酶标仪,GS-15R型全波长多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);IX51型倒置生物显微镜(日本奥林巴斯公司),SDS-PAGE型垂直电泳槽与转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与给药** 动物分组:将SD雄性大鼠随机分为肠安I号方低、中、高剂量组以及空白组,每组10只。适应性饲养3 d后,空白组按剂量10 mL·kg<sup>-1</sup>给予蒸馏水灌胃。按照《药理实验方法学》<sup>[11]</sup>方法根据体质量换算给药剂量,分别以肠安I号方低、中、高剂量(1.15, 2.30, 4.60 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃,给药体积为10 mL·kg<sup>-1</sup>,1次/d,连续灌胃7 d。细胞分组:空白组,予正常大鼠血清;模型组,予正常大鼠血清;酮替芬组,予正常大鼠血清+30 μmol·L<sup>-1</sup>酮替芬。肠安I号方低、中、高剂量组分别给予对应的含药血清。

**2.2 肠安I号方含药血清制备** 末次给药前禁食12 h,灌胃2 h后,腹主动脉采血,室温静置2 h后,以3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,分离血清经56℃水浴灭活30 min,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,分装冻存,备用。

**2.3 比色法检测β-氨基己糖苷酶(β-HEX)释放率**  
致敏RBL-2H3细胞活化:将对数生长期的RBL-2H3细胞接种于24孔培养板中,密度2.5×10<sup>5</sup>个/mL,5%CO<sub>2</sub>,37℃培养箱中培养至细胞贴壁。每孔加入抗DNP-IgE单抗(终质量浓度为100 μg·L<sup>-1</sup>)致敏过夜。用台氏液清洗细胞3次。分为空白组,模型组,肠安I号方含药血清低、中、高剂量组,酮替芬组,每组设4个复孔,孵育细胞24 h。精密加入台氏液200 μL(含100 μg·L<sup>-1</sup> DNP-has),空白组用等量台氏液替代,37℃孵育1 h,刺激细胞β-HEX的释放。

检测β-HEX释放率:冰浴10 min终止反应,收集上清液,每孔取50 μL加入到96孔培养板中,加入底物4-硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷50 μL,37℃孵育1 h,加入Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>缓冲液200 μL终止反应,于405 nm处检测吸光度A。根据A计算β-HEX释放率,计算公式为β-HEX释放率=(样品上清A-正常组上清A)/(总酶孔A-正常组上清A)×100%。

**2.4 甲苯胺蓝染色法检测RBL-2H3细胞颗粒率**  
致敏RBL-2H3细胞,冰浴10 min终止反应。吸取细胞培养上清后,用PBS冲洗2次,4%多聚甲醛溶液固定10 min。吸去固定液,加入甲苯胺蓝染色液5 min,吸弃染液,PBS冲洗3次,倒置显微镜下计数

各组细胞脱颗粒百分率。

**2.5 ELISA 检测细胞上清 MCT, TNF- $\alpha$ , MCP-1 及组胺含量** 致敏 RBL-2H3 细胞, 收集细胞上清采用 ELISA 检测各组上清中 MCT, TNF- $\alpha$ , MCP-1, 组胺的含量, 检测步骤均按照试剂盒说明书操作。

**2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Lyn/Syk/ MAPK 蛋白及其磷酸化表达水平** 致敏 RBL-2H3 细胞后, 刮下细胞, 4  $^{\circ}\text{C}$  PBS 缓冲液洗涤 2 次, 移入离心管。加入预冷的蛋白裂解液, 超声粉碎后冰浴 20 min; 4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速离心 10 min, 收集各组上清; 采用 BCA 法进行蛋白定量, 调整蛋白浓度至 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。加入上样缓冲液混匀后 100  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min, 2 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min。根据目的蛋白分子量, 配置分离胶及浓缩胶, 插梳, 上样, 电泳, 转膜, 室温封闭 30 min, 抗体浓度分别为 p-JNK (1: 500), JNK (1: 1 000), p-ERK (1: 1 000), ERK (1: 4 000), p-p38 (1: 500), p38 (1: 4 000), Lyn (1: 5 000), p-Lyn (1: 1 000), p-Syk (1: 1 000), Syk (1: 2 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min。用 5% 脱脂奶粉-TBST 稀释二抗 (1: 5 000), 室温轻摇 1 h, TBST 洗膜加入 ECL 显色, 曝光。使用 Image J 软件分析实验结果。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件, 数据用  $\bar{x}\pm s$  表示, 数据满足正态分布, 方差齐性, 用单因素方差分析, 两两比较用最小显著性差异法 (LSD), 数据不满足正态分布和方差齐性则采用非参数检验中多个独立样本 Kruskal-Wallis H 检验, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对  $\beta$ -HEX 释放率的影响** 与空白组比较, 致敏各组细胞  $\beta$ -HEX 释放率显著升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 肠安 I 号方含药血清各剂量组及酮替芬组  $\beta$ -HEX 释放率显著降低 ( $P<0.01$ )。见表 1。

**3.2 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒率的影响** 甲苯胺蓝染色后结果显示, 空白组细胞生长良好, 呈梭形或多形性, 细胞核清晰可见, 细胞质饱满, 染成深蓝紫色; 模型组细胞梭形消失或变圆, 细胞质明显淡染, 甚至消失, 有的细胞呈空泡状。与空白组比较, 模型组细胞脱颗粒数目明显增多 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 肠安 I 号方各剂量组以及酮替芬组细胞脱颗粒率明显下降 ( $P<0.05$ )。见表 1, 图 1。

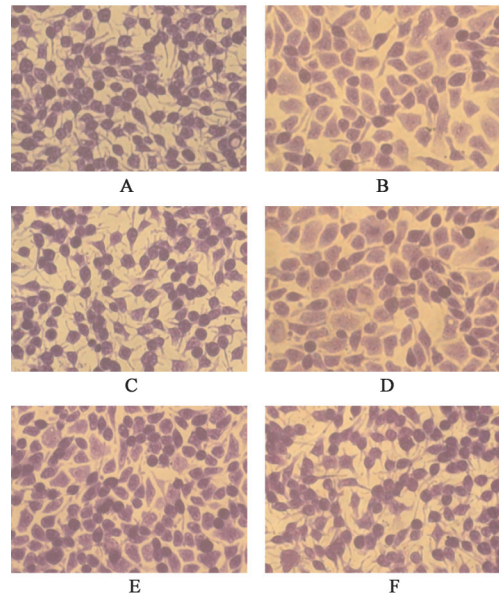
**3.3 对细胞上清 MCT, TNF- $\alpha$ , MCP-1 及组胺含量的影响** 与空白组比较, 模型组细胞上清中 MCT, TNF- $\alpha$ , MCP-1, 组胺含量显著升高 ( $P<0.01$ ); 与模

表 1 肠安 I 号方含药血清对  $\beta$ -HEX 释放率及细胞脱颗粒率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Chang'an I prescription containing serum on  $\beta$ -HEX release rate and degranulation rate ( $\bar{x}\pm s, n=10$ ) %

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\beta$ -HEX 释放率	脱颗粒率
空白	-	8.15 $\pm$ 0.76	11.09 $\pm$ 5.35
模型	-	59.70 $\pm$ 0.43 <sup>2)</sup>	68.29 $\pm$ 4.39 <sup>1)</sup>
酮替芬	-	20.20 $\pm$ 0.12 <sup>4)</sup>	34.29 $\pm$ 3.20 <sup>3)</sup>
肠安 I 号	1.15	34.40 $\pm$ 0.22 <sup>4,6)</sup>	48.87 $\pm$ 4.71 <sup>3,5)</sup>
	2.3	33.18 $\pm$ 0.13 <sup>4,6)</sup>	43.11 $\pm$ 3.63 <sup>3,5)</sup>
	4.6	32.10 $\pm$ 0.017 <sup>4,6)</sup>	39.84 $\pm$ 3.90 <sup>3)</sup>

注: 与正常组比较 <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较 <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.05$ ; 与酮替芬组比较 <sup>5)</sup> $P<0.05$ , <sup>6)</sup> $P<0.01$  (表 2~4 同)。



A. 空白组; B. 模型组; C. 酮替芬组; D. 肠安 I 号方低剂量组; E. 肠安 I 号方中剂量组; F. 肠安 I 号方高剂量组 (图 2~3 同)

图 1 肠安 I 号方含药血清对 RBL-2H3 细胞脱颗粒率的影响 (甲苯胺蓝,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Chang'an I prescription containing serum on degranulation rate of RBL-2H3 cells (toluidine blue,  $\times 400$ )

型组比较, 肠安 I 号方含药血清低、中、高剂量均明显降低细胞上清中 MCT, TNF- $\alpha$ , MCP-1, 组胺含量 ( $P<0.01$ ); 肠安 I 号方高剂量含药血清抑制 MCT, TNF- $\alpha$ , MCP-1, 组胺释放, 优于低、中剂量组 ( $P<0.05$ ), 与酮替芬比较差异无统计学意义。见表 2。

**3.4 对 Lyn, Syk 蛋白及其磷酸化水平的影响** 与空白组比较, 模型组细胞 p-Lyn 和 p-Syk 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 肠安 I 号方含药血清各剂量组及酮替芬组 p-Lyn, p-Syk 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$ )。见图 2, 表 3。

表2 肠安I号方含药血清对细胞上清MCT, TNF- $\alpha$ , MCP-1, 组胺含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 2 Effect of Chang'an I prescription containing serum on contents of MCT, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and histamine in cell supernatant( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MCT /μg·L <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$ /μg·L <sup>-1</sup>	MCP-1 /ng·L <sup>-1</sup>	组胺 /μg·L <sup>-1</sup>
空白	-	24.2±2.2	185.8±5.7	1 583.0±120.4	24.8±2.3
模型	-	38.8±1.4 <sup>2)</sup>	385.8±8.0 <sup>2)</sup>	1 921.0±164.1 <sup>2)</sup>	42.0±4.0 <sup>2)</sup>
酮替芬	-	23.8±2.2 <sup>4)</sup>	255.1±15.3 <sup>4)</sup>	1 221.0±152.3 <sup>4)</sup>	22.7±0.9 <sup>4)</sup>
肠安I号	1.15	32.7±1.6 <sup>4,6)</sup>	299.4±17.4 <sup>4,5)</sup>	1 716.0±134.3 <sup>4,5)</sup>	35.5±1.8 <sup>4,6)</sup>
	2.3	24.4±2.9 <sup>4)</sup>	279.5±22.5 <sup>4,5)</sup>	1 710.0±109.6 <sup>4,5)</sup>	27.4±3.6 <sup>4,6)</sup>
	4.6	23.8±0.6 <sup>4)</sup>	268.1±5.3 <sup>4)</sup>	1 371.0±130.3 <sup>4,5)</sup>	23.3±1.8 <sup>4)</sup>

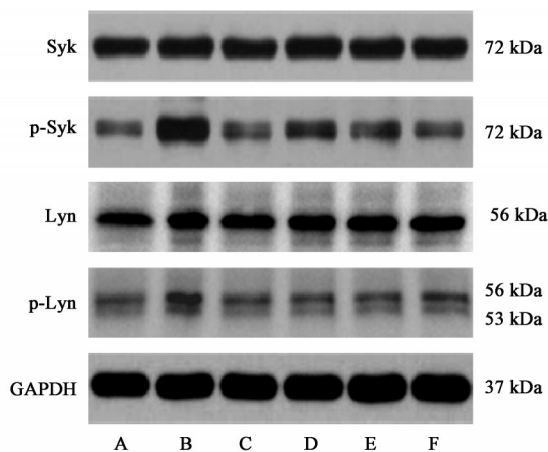


图2 RBL-2H3细胞p-Lyn, Lyn, p-Syk, Syk蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression levels of p-Lyn, Lyn, p-Syk and Syk in RBL-2H3 cell

3.5 对MAPK家族蛋白其磷酸化水平的影响 与空白组比较,模型组p-ERK1/2, JNK, p-JNK, p38及p-p38蛋白表达水平升高( $P<0.05$ );与模型组比较,肠安I号方含药血清相应剂量及酮替芬可以显著下调p-ERK1/2, JNK, p-JNK, p38及p-p38蛋白表达水平( $P<0.05$ )。见表4,图3。

#### 4 讨论

IBS-D发病机制复杂,内脏高敏感是其核心病理生理机制<sup>[12]</sup>,肠道局部的低度炎症和免疫紊乱在发病环节中起关键作用<sup>[13]</sup>。肥大细胞是广泛分布于肠道黏膜的免疫细胞,胞质中含有大量的内分泌颗粒,包括组胺, MCT, 细胞因子等,释放后激活内脏传入神经系统引起胃肠道不适症状和高敏感性<sup>[14]</sup>,导致肠道动力紊乱,黏膜屏障受损,感觉异常

表3 肠安I号方含药血清对p-Lyn, Lyn, p-Syk, Syk蛋白表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table3 Effect of Chang'an I prescription containing serum on p-Lyn, Lyn, p-Syk and Syk protein expression levels( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Syk/GAPDH	p-Syk/GAPDH	Lyn/GAPDH	p-Lyn/GAPDH
空白	-	0.76±0.05	0.39±0.01	0.76±0.21	0.37±0.04
模型	-	0.84±0.01	1.08±0.02 <sup>1)</sup>	0.80±0.12	1.64±0.12 <sup>1)</sup>
酮替芬	-	0.76±0.13	0.46±0.01 <sup>3)</sup>	0.76±0.12	0.36±0.01 <sup>3)</sup>
肠安I号	1.15	0.83±0.09	0.60±0.06 <sup>3)</sup>	0.83±0.25	0.59±0.09 <sup>3)</sup>
	2.3	0.73±0.07	0.52±0.06 <sup>3)</sup>	0.73±0.17	0.53±0.01 <sup>3)</sup>
	4.6	0.71±0.11	0.41±0.09 <sup>3)</sup>	0.71±0.12	0.65±0.02 <sup>3)</sup>

表4 肠安I号方含药血清对MAPK家族蛋白表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table4 Effect of Chang'an I prescription containing serum on pMAPKs protein expression levels( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ERK1/2 /GAPDH	p-ERK1/2 /GAPDH	JNK/GAPDH	p-JNK/GAPDH	p38/GAPDH	p-p38/GAPDH
空白	-	1.45±0.18	0.13±0.11	0.64±0.09	0.26±0.03	0.87±0.12	0.35±0.09
模型	-	1.68±0.25	0.65±0.31 <sup>1)</sup>	1.16±0.12 <sup>1)</sup>	1.00±0.20 <sup>1)</sup>	1.47±0.14 <sup>1)</sup>	1.25±0.05 <sup>1)</sup>
酮替芬	-	1.32±0.26	0.25±0.19 <sup>3)</sup>	0.61±0.08 <sup>3)</sup>	0.51±0.05 <sup>3)</sup>	0.91±0.05 <sup>3)</sup>	0.38±0.03 <sup>3)</sup>
肠安I号	1.15	1.28±0.14	0.58±0.05 <sup>3)</sup>	0.91±0.15 <sup>3)</sup>	1.05±0.10	1.11±0.06 <sup>3)</sup>	0.50±0.07 <sup>3)</sup>
	2.3	1.31±0.16	0.33±0.02 <sup>3)</sup>	0.87±0.05 <sup>3)</sup>	0.66±0.15 <sup>3)</sup>	1.01±0.02 <sup>3)</sup>	0.17±0.03 <sup>3)</sup>
	4.6	1.26±0.25	0.30±0.09 <sup>3)</sup>	1.01±0.16 <sup>3)</sup>	0.60±0.09 <sup>3)</sup>	0.93±0.01 <sup>3)</sup>	0.16±0.06 <sup>3)</sup>

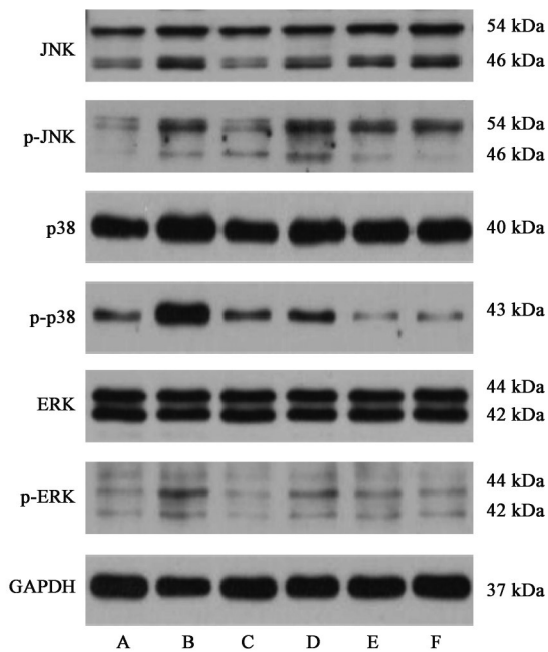


图3 RBL-2H3细胞MAPK家族蛋白表达电泳  
Fig. 3 Electrophoresis of MAPKs protein expression levels

以及低度炎症持续存在<sup>[15]</sup>。免疫性激活是肥大细胞激活的经典途径,即由抗原抗体依赖的IgE及其受体FcεRI结合桥联后在蛋白酪氨酸激酶Syk, Lyn的参与下,引起MAPKs途径激活<sup>[16]</sup>。MAPKs主要分为p38, ERK, JNK等亚族。激活后的p38直接参与应激状态下细胞免疫调节、炎症反应和细胞凋亡;ERK与细胞增殖、转化和分化相关;JNK增强转录因子AP-1活性,导致MCs活化脱颗粒,释放多种炎症介质和细胞因子,引起局部免疫紊乱和低度炎症状态<sup>[17]</sup>。因此,抑制肥大细胞活化脱颗粒,是改善IBS-D内脏高敏感,缓解腹痛、腹泻症状的关键环节。肠安I号方由黄芪、炒白术、炒白芍、防风、炮姜炭、黄连、炙甘草等药物组成,方中以炒白芍柔肝缓急止痛为君药;黄芪健脾益气、益卫固表止汗,炒白术健脾益气、燥湿止泻,辅助君药,起到温中健脾化湿的作用,共为臣药;炮姜炭温中止泻,防风气味辛散,条达肝气,兼能胜湿,合用为佐助药;黄连性偏寒凉,用以佐制上述诸药的温热之性,同时兼有燥湿的作用,为反佐药;炙甘草补脾益气,缓急止痛,调和诸药,为使药,诸药合用,共奏疏肝健脾、温中止泻之功。课题组前期研究证实<sup>[10,18]</sup>,肠安I号方可提高应激所致IBS-D模型大鼠的腹痛阈值,改善模型大鼠内脏高敏感,减少大鼠回盲部肠黏膜肥大细胞数目,降低大鼠肠黏膜组胺及MCT的含量。

本研究从肥大细胞脱颗粒数目,β-氨基己糖释放率及其释放MCT及组胺等活性介质的含量3个

方面,观察肠安I号方含药血清对经由IgE/FcεRI交联所致RBL-2H3活化脱颗粒的药效作用。研究发现,肠安I号方含药血清具有抑制RBL-2H3细胞脱颗粒,降低β-HEX释放率,减少MCT, TNF-α, 组胺及MCP-1等活性介质的释放的作用。但量效关系方面,还需采用大鼠最高给药剂量灌胃后梯度稀释血清的方法以进一步明确。机制方面, IgE/FcεRI交联介导的RBL-2H3细胞脱颗粒过程中Lyn, Syk及MAPK家族蛋白磷酸化水平升高,肠安I号方含药血清下调RBL-2H3细胞活化上游信号通路关键蛋白Lyn, Syk和下游ERK1/2, JNK及p38蛋白的磷酸化水平,这可能是其能够抑制肥大细胞活化脱颗粒,减少MCT, TNF-α, 组胺及MCP-1等生物活性介质释放的分子机制。但这种作用机制,还需加入该通路阻断剂以进一步验证。希望本文能为肠安I号方在IBS-D内脏高敏感方面的应用提供参考。

[参考文献]

- [1] PIMENTEL M. Evidence-based management of irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Am J Manag Care, 2018, 24(3/1): S35-S46.
- [2] SPERBER A D, BANGDIWALA S I, DROSSMAN D A, et al. Worldwide prevalence and burden of functional gastrointestinal disorders, results of rome foundation global study[J]. Gastroenterology, 2020, 16(20): 30487.
- [3] SCHOENFELD P S. Advances in IBS 2016: a review of current and emerging data [J]. Gastroenterol Hepatol, 2016, 12(8/3): 1-11.
- [4] BI Z, ZHENG Y, YUAN J, et al. The efficacy and potential mechanisms of Chinese herbal medicine on irritable bowel syndrome[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(34): 5163-5172.
- [5] LIU J P, YANG M, LIU Y X, et al. Herbal medicines for treatment of irritable bowel syndrome. Cochrane Db Syst Rev [J]. 2006, doi: 10.1002/14651858.CD004116. pub2.
- [6] 张伟,孙建华,裴丽霞,等. 中医药治疗肠易激综合征的系统评价/Meta分析的再评价[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(12): 1747-1755.
- [7] 刘慧,刘力,王捷虹. 中医疏肝健脾法治疗腹泻型肠易激综合征的Meta分析[J]. 现代中医药, 2019, 39(4): 81-84, 95.
- [8] 唐旭东. 一种治疗肠易激综合征的中药组合物及其制备方法:中国, CN103845702A[P]. 2014-06-11.
- [9] TANG X D, LV B, LI Z H, et al. Therapeutic effect of Chang'an I recipe (I) on irritable bowel syndrome with

- diarrhea: a multicenter randomized double-blind placebo-controlled clinical trial[J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(9):645-652.
- [10] 马祥雪. 肥大细胞活化在IBS-D内脏高敏感中的作用及肠安I号方的干预研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:202-203.
- [12] CATANZARO R, OCCHIPINTI S, CALABRESE F, et al. Irritable bowel syndrome: new findings in pathophysiological and therapeutic field[J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2014, 60(2):151-163.
- [13] ZHANG L, SONG J, HOU X. Mast cells and irritable bowel syndrome: from the bench to the bedside[J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2016, 22(2):181-192.
- [14] WOUTERS M M, VICARIO M, SANTOS J. The role of mast cells in functional GI disorders[J]. *Gut*, 2016, 65(1):155-168.
- [15] LEE H, PARK J H, PARK D I, et al. Mucosal mast cell count is associated with intestinal permeability in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2013, 19(2):244-250.
- [16] MATSUDA H, NAKAMURA S, YOSHIKAWA M. Degranulation Inhibitors from medicinal plants in antigen-stimulated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells [J]. *Chem Pharm Bull*, 2016, 64(2):96-103.
- [17] WERNERSSON S, PEJLER G. Mast cell secretory granules: armed for battle[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(7):478-494.
- [18] 赵迎盼, 苏敏, 王凤云, 等. 肠安I号方对肠易激综合征内脏高敏感大鼠5-HT信号系统及海马BDNF mRNA表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(10):1228-1235.

[责任编辑 孙丛丛]