

四磨汤对寒冷束缚应激小鼠脑肠肽促胰液素、P物质的影响

蔡莹¹, 蔺晓源², 蔡光先^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学省部共建中医内科学教育部重点实验室, 长沙 410007)

[摘要] **目的:**研究四磨汤对寒冷束缚应激小鼠脑肠肽促胰液素(Sec)和P物质(SP)的影响,揭示四磨汤调节胃肠功能紊乱的作用机制。**方法:**动物随机分组,采用寒冷束缚等多种刺激方法,制备胃肠功能紊乱小鼠模型,分别给予蒸馏水、得舒特(20.3 mg·kg⁻¹)、四磨汤治疗。四磨汤高、低剂量组按1.8,0.9 g·kg⁻¹ ig,1次/d,连续用药14 d。ELISA检测血清中Sec, SP的含量变化,免疫组织化学法观察小鼠脑内Sec, SP的阳性表达。**结果:**模型组小鼠血清中及脑内Sec的表达下降、SP表达增加,与正常组比较有统计学差异($P < 0.01$);四磨汤各剂量组Sec的表达增加、SP表达下降,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);四磨汤高、低剂量组比较有统计学差异($P < 0.05$)。**结论:**四磨汤通过调节血清Sec, SP的含量及其在脑内的表达,可能是其治疗功能性胃肠病的作用机制之一。

[关键词] 四磨汤; 寒冷束缚应激; 功能性胃肠病; 促胰液素; P物质

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0123-04

[doi] 10.11653/syjf2014010123

Effects of Simo Decoction on Secretin and Substance P in Cold-constraint Stressed Mice

CAI Ying¹, LIN Xiao-yuan², CAI Guang-xian^{2*}

(1. Traditional Chinese Medicine (TCM) University of Hunan, Changsha 410208, China;

2. Ministry of Education Key Laboratory of Internal Medicine Constructed by Ministries and Provincial Governments, TCM University of Hunan, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Simo decoction on expression of secretin (Sec) and substance P (SP) in cold-constraint stressed mice, and to explore the mechanism of Simo decoction (SD) on functional gastrointestinal disorders (FGIDs). **Method:** Gastrointestinal dysfunction model was established by exerting the factors of cold-constraint stimulation. And then randomly treated with distilled water, Dicetel (20.3 mg·kg⁻¹) and SD at dosage of 1.8, 0.9 g·kg⁻¹ were given, for continuous 14 days. The content change of Sec and SP in serum was tested by ELISA. The expressions of Sec and SP in brain tissue were measured by immunohistochemical staining. **Result:** The expressions of Sec in brain and serum of model group were decreased, and SP in model group was increased, compared with the normal group ($P < 0.01$). The SD could increase the expression of Sec in brain tissue and serum, and reduce the expression of SP, which also had significant differences compared with the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was remarkable difference between SD high and low-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Simo decoction can regulate the expression of Sec and SP in cold-constraint stressed mice, which is one of possible mechanism.

[Key words] Simo decoction; cold-constraint stress; functional gastrointestinal disorders; Sec; SP

[收稿日期] 20130729(006)

[基金项目] 国家重点基础研究计划(973计划)资助项目(2009CB523002)

[第一作者] 蔡莹, 博士, 讲师, 从事中医药防治消化系统疾病研究, Tel: 13786118476, E-mail: caiyingchaerin@126.com

[通讯作者] * 蔡光先, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药防治消化、心脑血管病研究, Tel: 0731-85369253, E-mail: lby1203@sina.com

功能性胃肠病 (FGIDs) 是胃肠道感觉和运动功能紊乱, 而缺乏器质性病理改变的胃肠综合征的总称^[1]。近年来随着肠道神经系统研究的深入, 有人把这类疾病称之为“神经胃肠病”。其临床以肠易激综合征 (IBS)、功能性消化不良 (FD) 为多见。心理应激和功能性胃肠病, 特别是 IBS 关系密切, 已被广泛认同。多种外部刺激作用于中枢神经系统引起不同的情绪体验, 并通过脑肠轴引起不同的脑肠肽反应而改变胃肠活动。研究者发现促胰液素 (Sec) 和 P 物质 (SP) 为介质的脑肠轴在调节胃肠功能的过程中起着重要的作用^[2-3]。四磨汤是治疗 FGIDs 的有效方剂^[4]。本实验通过观察四磨汤对寒冷束缚应激小鼠脑肠肽 Sec, SP 的影响, 探讨其调节胃肠动力的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级昆明种小鼠 40 只, 雄性, 体重 18 ~ 22 g, 由湖南斯莱克景达实验动物公司提供, 合格证号 (004615)。

1.2 药物 四磨汤口服液 (湖南汉森制药股份有限公司提供, 国药准字 Z20025044, 由木香、枳壳、槟榔、乌药各 37.5 g 制成 1 000 mL 药液, 含生药 0.15 g·mL⁻¹), 批号 091002183, 规格 10 mL/支; 得舒特 (法国苏威制药), 批号 H20110220, 规格 50 mg/片, 用蒸馏水配制成 0.5 g·L⁻¹ 的药液备用。

1.3 试剂 Sec 和 SP ELISA 试剂盒 (上海森雄生物公司), 兔抗小鼠 Sec, SP 单抗 (武汉博士德生物工程公司), SP-9000 免疫组化染色试剂盒 (批号 724944A), 液体 AEC 酶底物试剂盒 (批号 K96914D), 均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供; 水溶性封片剂 (武汉博士德生物工程公司提供)。

1.4 仪器 E60 型冰冻切片仪 (英国 Thermo 公司), BX-51 型光学显微镜及 Image-Pro Plus5.1 (IPP5.1) 图像分析系统 (日本 Olympus 公司), 电热恒温水浴箱 (上海医疗器械七厂); MK3 型酶标仪 (芬兰 LABSYSTEMS 集团)。

2 方法

2.1 动物造模 小鼠适应性喂养 1 周后, 参考相关文献方法^[5], 略有改进: ①束缚敷冰法: 用细棉线绑住小鼠的四肢, 并固定于小铁笼盖上 1h, 将棒棒冰置于小鼠腹部, 待接触的棒棒冰有融化时, 移至未融化的另一端。②冰水灌胃法: 取出冰箱中冷冻的蒸馏水, 待其融化至冰水混合物时, 每只小鼠按 10 mL·kg⁻¹ 的剂量灌胃。③冰水游泳法: 把小鼠关进

灌有 5 cm 高度 4 ℃ 水温的小笼子中, 盖上笼盖, 以防小鼠疲倦淹死。④孤养法: 造模小鼠单笼喂养。⑤饥饱失常法: 逢单日给食, 双日禁食, 均正常饮水。以上 5 种方法, 4 d 为 1 轮, 除饥饱失常法和孤养法每天使用外, 其余均与束缚敷冰法交替使用。即第 1 天束缚敷冰, 给食; 第 2 天冰水灌胃, 禁食; 第 3 天束缚敷冰, 给食; 第 4 天冰水游泳, 禁食。刺激共计 4 轮。

2.2 分组与给药 随机抽取 8 只小鼠作为正常组后。对其余成功造模的 32 只小鼠随机分为四磨汤高剂量组、四磨汤等剂量组、对照组和模型组, 每组 8 只。四磨汤高剂量组按成人每日用药等效剂量的 2 倍 (1.8 g·kg⁻¹) 灌胃, 四磨汤等剂量组按成人每日用药等效剂量 (0.9 g·kg⁻¹) 灌胃, 对照组给予得舒特溶液 20.3 mg·kg⁻¹ (临床等效剂量), 模型组给予等容量的蒸馏水 (4.06 mL·kg⁻¹), 1 次/d。连续用药 14 d, 正常组常规喂养。

2.3 小鼠血清 Sec, SP 含量检测 麻醉小鼠, 心脏采血, 以 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血清, 取上层血清置 -20 ℃ 冰箱保存待测。严格按照试剂盒操作步骤进行 Sec, SP 的 ELISA 检测。

2.4 小鼠脑内 Sec, SP 表达检测 小鼠以 10% 水合氯醛 (4.0 mL·kg⁻¹) 麻醉后取脑组织, 4% 多聚甲醛后固定。免疫组化采用 SABC 法, AEC 显色, 其中 Sec, SP 浓度为 1:100。应用 IPP5.1 图像分析系统测定脑组织 Sec, SP 阳性表达的吸光度 (A)。每张切片置于 400 倍镜下随机选取阳性表达不重复的 5 个视野, 求得免疫阳性反应产物的平均 A。A 与脑肠肽类含量正相关。

2.5 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 13.0 软件统计包进行统计。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组计量资料方差齐性的采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对寒冷束缚小鼠血清 Sec, SP 含量的影响 寒冷束缚应激可致模型小鼠 Sec 水平降低, SP 水平升高, 与正常组比较差异有统计学意义 (P < 0.01)。给药后, 四磨汤各剂量组血清中 Sec 水平升高, SP 水平降低, 与模型组比较有统计学差异 (P < 0.05 或 P < 0.01)。四磨汤高、低剂量组比较有统计学差异 (P < 0.05)。见表 1。

3.2 对寒冷束缚小鼠脑组织 Sec, SP 受体表达的影响 Sec, SP 在正常脑组织有一定量的表达, 阳性染色呈红褐色, 以梭形、多角形态多见。寒冷束

表1 四磨汤对寒冷束缚应激小鼠血清

Sec,SP的影响($\bar{x} \pm s, n=8$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Sec	SP
正常	-	6.46 ± 1.01	5.06 ± 0.85
模型	-	4.89 ± 0.83 ¹⁾	7.64 ± 0.67 ¹⁾
得舒特	20.3 × 10 ⁻³	6.24 ± 0.76 ³⁾	5.95 ± 0.73 ³⁾
四磨汤	1.8	6.31 ± 0.42 ²⁾	5.72 ± 0.36 ³⁾
	0.9	5.93 ± 0.82 ^{2,4)}	6.16 ± 0.65 ^{3,4)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与四磨汤 1.8 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表2同)。

束缚刺激后,模型小鼠 Sec 阳性染色数量减少,SP 阳性染色数量增多,与正常组比较差异有统计学意义

($P < 0.01$);经治疗后,四磨汤各剂量组 Sec 表达上升,SP 表达下降,与模型组比较有统计学差异($P < 0.01$)。四磨汤高、低剂量组比较有统计学差异($P < 0.05$)。见表2,图1。

表2 四磨汤对寒冷束缚小鼠脑组织 Sec, SP 阳性表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	Sec	SP
正常	-	25.91 ± 2.77	16.93 ± 2.83
模型	-	15.63 ± 2.50 ¹⁾	24.08 ± 3.24 ¹⁾
得舒特	20.3 × 10 ⁻³	20.61 ± 2.62 ³⁾	17.58 ± 2.31 ³⁾
四磨汤	1.8	22.31 ± 1.92 ³⁾	17.66 ± 2.11 ³⁾
	0.9	19.55 ± 2.86 ^{3,4)}	19.71 ± 2.21 ^{3,4)}

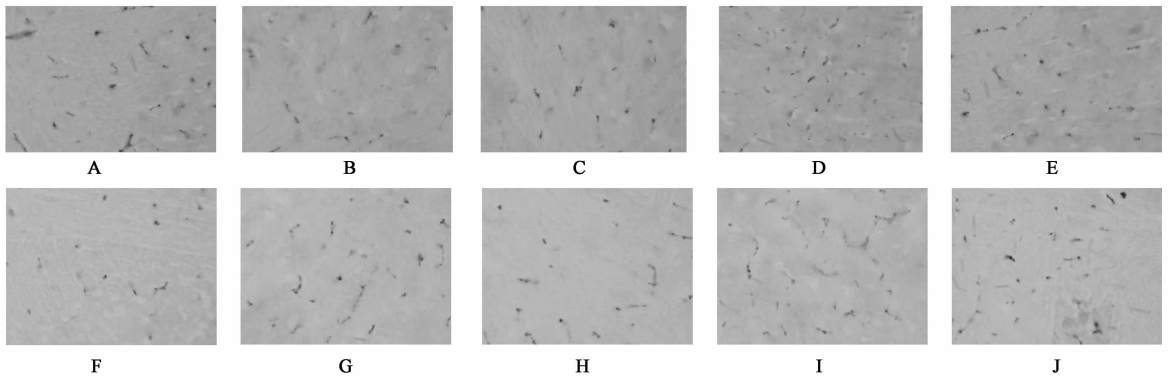
A, F. 正常组;B, G. 模型组;C, H. 得舒特 20.3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D, I. 四磨汤 1.8 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E, J. 四磨汤 0.9 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;

图1 四磨汤对寒冷束缚小鼠脑内 Sec(A-E),SP(F-J)阳性表达的影响(SABC法, ×400)

4 讨论

精神心理、感染、饮食等多种应激因子作用大脑应激反应系统,通过脑肠轴的双向调节作用于胃肠道靶器官,使胃肠道运动、感觉、分泌和免疫功能发生变化,相互影响而表现为 FGIDs^[6]。研究发现^[7]精神刺激可以改变肠道的消化间期动力。用置于肠内的遥测装置监控胃肠动力,观察到精神刺激对 IBS 患者比正常人更易引起肠动力紊乱。在 FGIDs 的发生中,脑肠肽参与了其各个环节^[8]。Sec 能促进胃肠、胰腺、肝胆管的水及电解质分泌,增强缩胆囊素的作用和胰酶的分泌,使胰腺外分泌细胞增生肥大,使细胞内的 DNA 和蛋白质含量增加,增强营养胰外分泌部的效应,Sec 可通过增强 5-HT 的传入效应来改变 Sec 的生物效应,如促进胰液分泌,抑制胃酸分泌等^[9]。SP 主要分布于胃肠及脑组织,具有促进胃肠平滑肌收缩作用,是促进胃肠运动的神经递质,但在中枢却对胃肠运动起抑制作用。研究报道,肝郁脾虚型肠易激综合征大鼠血浆 SP 含量升高,其与胃肠动力及内脏敏感性密切相关^[10]。

四磨汤口服液出自明代《痘疹金镜录》,由枳壳、槟榔、木香、乌药组成,有理气消胀,运脾调肠之功,临床用于调节胃肠功能障碍疗效显著。寒冷束缚应激小鼠血清中 Sec 含量明显低于正常组,且脑组织中 Sec 的阳性表达降低,表明模型组小鼠胃肠运动功能亢进与 Sec 增加有关,即 Sec 可抑制胃肠道的运动功能。四磨汤各剂量组小鼠血清中 Sec 的含量及其受体在脑组织中的表达高于模型组,表明四磨汤通过升高 Sec 而起到了拮抗胃肠动力的作用。此外,模型组小鼠脑组织及血清 SP 含量升高,经治疗后,四磨汤各剂量组 SP 含量下降,低于模型组,提示 SP 为促进型脑肠肽,四磨汤可通过降低 SP 起到拮抗胃肠动力的作用。而上述指标的改善高剂量组明显优于等剂量组。以上结果表明,通过调节 Sec,SP 的水平变化可能是四磨汤治疗 FGIDs 的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 张琴,彭燕. 功能性胃肠病的治疗进展[J]. 西南军医,2008,10(5):105.

八角中莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞增殖 及 NF- κ B 蛋白表达的影响

朱开梅, 顾生玫*, 顾小文, 骆彩珍
(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的:探讨八角中莽草酸对人肝癌细胞 HepG-2 细胞增殖及其核因子- κ B(NF- κ B)p65 蛋白表达的影响。方法:用不同浓度的莽草酸处理 HepG-2 细胞,MTT 法测定莽草酸对 HepG-2 细胞的生长抑制率;倒置显微镜下观察莽草酸作用 HepG-2 细胞后的形态学变化;采用 hoechst33342 荧光染色观察莽草酸作用于人肝癌 HepG-2 细胞 48 h 后细胞凋亡形态变化。Western blot 试验观察莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞 NF- κ B(p65)蛋白表达的影响。结果:MTT 实验结果表明,莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞的生长抑制作用呈现时间依赖性和剂量依赖性;倒置显微镜下观察细胞形态可以发现,经莽草酸处理 48 h 后的各组细胞中,可观察到随着药物浓度的增加,细胞凋亡形态变化越来越明显,细胞数量逐渐变少。荧光染色观察随着药物浓度增加,凋亡细胞增多且明显,当莽草酸质量浓度达 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,出现较多的凋亡小体。NF- κ B(p65)蛋白的表达随莽草酸浓度升高而显著下降。结论:莽草酸对人肝癌细胞 HepG-2 有较显著的生长抑制作用,莽草酸对人肝癌 HepG-2 细胞表达 NF- κ B(p65)明显减弱,其诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡作用机制可能下调 NF- κ B 表达水平有关。

[关键词] 莽草酸; 人肝癌 HepG-2; 细胞增殖; 核因子- κ B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0126-04

[doi] 10.11653/syfj2014010126

Influence of Shikimic Acid on Proliferation and Expression of Nuclear Factor- κ B in Human Hepatoma HepG2 Cells

ZHU Kai-mei, GU Sheng-jiu*, GU Xiao-wen, LUO Cai-zhen
(Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[收稿日期] 20130507(007)

[基金项目] 广西科技攻关项目(129825-21);广西教育厅项目(201202ZD065);桂林市科技攻关项目(20110106-5,20120105-5,20120105-16,20120105-8)

[第一作者] 朱开梅,硕士,教授,硕士生导师,从事天然药物分析的研究工作,Tel:0773-5899602,E-mail:glzkm@163.com

[通讯作者] *顾生玫,博士,教授,硕士生导师,从事心血管病理学及药物防治研究工作,Tel:0773-2295148,E-mail:gushengjiu@163.com

- [2] 石欣,宿士智,高乃荣.急性坏死性胰腺炎时 P 物质在肠壁的表达及与肠黏膜通透性之间的关系[J].中国危重病急救医学,2007,19(8):452.
- [3] 张庆光,张雷,李贤珍.兔创伤应激与胆汁流量及胆囊收缩素、胃泌素、促胰液素分泌的关系[J].中华急诊医学杂志,2006,15(5):419.
- [4] 蔡光先,卜献春.四磨汤治疗功能性消化不良肝脾不和证的疗效及对血浆 P 物质、胃动素的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(6):856.
- [5] 蔺晓源,蔡莹,谢勇,等.四磨汤口服液对束缚-寒冷应激小鼠胃肠功能和胃泌素的影响[J].湖南中医药大学学报,2009,29(6):19.
- [6] 孟宪镛.功能性胃肠病和胃肠动力病的诊治新概念[J].胃肠病学,2004,9(1):60.
- [7] 王伯军,丁勇,马微波,等.胃肠专科门诊病人情绪障碍的研究[J].中国医师进修杂志,2006,29(1):34.
- [8] 王艳.浅谈胃肠道激素[J].生物学通报,2007,42(3):23.
- [9] 隋红,陈卫,陆杰.5-羟色胺对大鼠膈下迷走神经传入放电的影响及机制[J].第三军医大学学报,2007,29(17):1706.
- [10] 钱锋,卜平.痛泻要方干预大鼠肠易激综合征肝郁脾虚证的作用及机制[J].苏州大学学报:医学版,2010,30(6):1179.

[责任编辑 聂淑琴]