

疏肝健脾方对腹泻型肠易激综合征大鼠 结肠黏膜 5-HT, CGRP 表达的影响

刘杰民¹, 李红灵², 胡浩², 韩斌²

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410007; 2. 贵州省人民医院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 研究疏肝健脾方对腹泻型肠易激综合征(D-IBS)大鼠血及结肠黏膜中 5-羟色胺(5-HT)、降钙素基因相关肽(CGRP)的影响, 探讨其疗效机制。方法: 60 只 Wistar 大鼠随机分为正常组, 模型组, 疏肝健脾方高、中、低剂量组和匹维溴胺组; 用寒冷-束缚刺激法复制 D-IBS 大鼠模型; 采用紫外分光光度法测各组大鼠血清 5-HT 含量, 放免法检测血浆 CGRP 水平, 免疫组织化学 SABC 法检测结肠黏膜组织 5-HT, CGRP 的表达情况。结果: 模型组大鼠血中 5-HT 含量及结肠黏膜中 5-HT 阳性纤维的平均吸光度(A)升高, CGRP 降低, 与正常组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 各用药组血中 5-HT 及其在肠黏膜的表达降低, CGRP 升高, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且以疏肝健脾高、中剂量组差异明显($P < 0.01$)。结论: 疏肝健脾方通过调节 D-IBS 大鼠 5-HT, CGRP 的变化, 是其发挥疗效的作用机制之一。

[关键词] 疏肝健脾方; 腹泻型肠易激综合征; 5-羟色胺; 降钙素基因相关肽; 结肠黏膜; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0179-03

Effects of Shugan Jianpi Recipe on 5-Hydroxytryptamine, Calcitonin Gene Related Peptide in Rats with Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome

LIU Jie-min¹, LI Hong-ling², HU Hao², HAN Bin²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. Guizhou Province People's Hospital, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shugan Jianpi Recipe on 5-hydroxytryptamine (5-HT), calcitonin gene related peptide (CGRP) in rats with diarrhea predominant irritable bowel syndrome (D-IBS). **Method:** Sixty Wistar rats were randomized into normal group, model group, low, middle and high-dose groups of Shugan Jianpi Recipe, and dicetel group. Cold-binding applications were given to establish similar model of D-IBS. Violet spectrophotometer was used for determining the levels of 5-HT in serum. RIA was used for measuring the levels of CGRP in serum. The expressions of 5-HT and CGRP in intestinal and colon mucosa and colon tissue were detected by immunohistochemical SABC method. **Result:** In the model group, the 5-HT level increased, CGRP decreased, compared with those in the normal group ($P < 0.05$). The Shugan Jianpi Recipe's middle, high-dose increased 5-HT and decreased CGRP significantly, compared with that in the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The therapeutic mechanism of Shugan Jianpi Recipe for D-IBS is probably related with adjustment of 5-HT and CGRP in serum and colon tissue.

[Key words] Shugan Jianpi Recipe; diarrhea predominant irritable bowel syndrome; 5-hydroxytryptamine; calcitonin gene related peptide; colonic mucosa; rats

腹泻型肠易激综合征 (D-IBS) 是一种以腹痛、腹部不适伴腹泻为特征的功能性胃肠病, 临床较为常见, 其发病机制复杂, 涉及精神、饮食、个体素质等多个因素。目前现代医学多以对症治疗为主, 单一药物作用局限, 难以满足临床需要。贵州省已故名老中医陈慈煦教授自拟疏肝健脾方治疗 D-IBS 取得了满意疗效^[1]。本研究通过探讨疏肝健脾方对 D-IBS 模型大鼠; 5-羟色胺 (5-HT), 降钙素基因相关肽 (CGRP) 的影响, 以期为其发挥中医方药多途径、多靶点的整体治疗及开发利用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠 60 只, 雄性, 体重 (200 ± 20)g, 由上海西普尔-必凯公司提供。动物合格证号 004535。

1.2 药物 疏肝健脾方 (由柴胡、党参、茯苓、木香等组成) 制成中剂量药液 (临床等效剂量) 含生药 0.42 g·mL⁻¹, 疏肝健脾高、低剂量分别含生药 0.84 g·mL⁻¹ 和 0.21 g·mL⁻¹, 水提剂 4 °C 低温保存。匹维溴胺由法国苏威制药公司生产, 用蒸馏水制成 0.75 g·L⁻¹ 的溶液。

1.3 试剂 大鼠血清 CGRP 放免试剂盒, 北京北方生物技术研究所提供 (批号 S10940100)。小鼠抗大鼠 5-HT 多克隆抗体、小鼠抗大鼠 CGRP 多克隆抗体 (批号 BA0204) 均由武汉博士德生物工程有限公司提供; SABC 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。

1.4 仪器 FMJ-182 型放射免疫 γ 计数器 (上海原子核研究所日环仪器厂), MDF-435 型低温冰箱 (日本 SANYO 公司), GL20A 型高速冷冻离心机 (湖南仪器仪表总厂), E60 冰冻切片机 (英国 Thermo 公司), BX-51 光学显微镜及 Image-Pro Plus 5.1 (IPP5.1) 图像分析系统 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物模型建立 参考文献 [2] 以寒冷-束缚刺激法制备 D-IBS 大鼠模型。每天用大鼠固定器固定, 使其躯干不能动, 头可以活动, 放入 5 °C 的冰箱中寒冷刺激, 每天 2.5 h, 共刺激 7 d。

2.2 动物分组及给药方法 大鼠适应性喂养 3 d 后, 按体重随机分成正常组、模型组、疏肝健脾方高、中、低剂量组及匹维溴胺组, 每组 10 只。造模成功后, 各组分别 ig 相应的药物, 给药容量 20 mL·kg⁻¹,

模型组和正常组给予等容量的蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 7 d。

2.3 血中 5-HT, CGRP 水平测定 大鼠末次给药后 1 h, 10% 水合氯醛 ip (4 mL·kg⁻¹) 麻醉, 于颈总动脉取血 4 mL, 其中 2 mL 置于含有 EDTA + 抑肽酶抗凝管中, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后提取上清液低温保存待测 CGRP; 余 2 mL 血置于普通试管不抗凝, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 分离血清低温保存待测 5-HT。血清 5-HT 测定用荧光分光光度计法; 血浆 CGRP 严格按放免试剂盒操作说明书进行。

2.4 结肠黏膜 5-HT, CGRP 的表达 取血后, 剪取小段乙状结肠组织, 4% 多聚甲醛固定 1 h, 依次放入 15%, 20%, 30% 蔗糖沉底 24 h。OTC 包埋, 冰冻切片 (15 μ m)。采用免疫组织化学 SABC 法检测乙状结肠组织中 5-HT 及 CGRP 表达情况, 应用 IPP 5.1 图像分析系统测定肠组织 5-HT 及 CGRP 吸光度 (A)。每张切片随机选取 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, A 值越大, 表示 5-HT, CGRP 含量越多。

2.5 统计学分析 用 SPSS 16.0 软件统计包对各组数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间采用 *t* 检验, 多组间采用方差分析。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 疏肝健脾方对大鼠血中 5-HT, CGRP 含量的影响 模型组血中 5-HT 升高, CGRP 降低, 与正常组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 疏肝健脾各剂量组和匹维溴胺组大鼠 ig 给药后, 均能降低血中 5-HT, 升高 CGRP, 与模型组比较差异均有统计学意义 (P < 0.05), 而以疏肝健脾高、中剂量组差异明显 (P < 0.01)。见表 1。

表 1 疏肝健脾方对各组大鼠血中 5-HT, CGRP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5-HT/ μ g·L ⁻¹	CGRP/ng·L ⁻¹
正常	-	125.23 ± 3.31 ¹⁾	162.15 ± 3.24 ¹⁾
模型	-	246.05 ± 4.59	100.21 ± 4.38
疏肝健脾	16.8	133.21 ± 3.18 ²⁾	151.32 ± 4.52 ²⁾
	8.4	152.53 ± 4.52 ²⁾	141.53 ± 4.22 ²⁾
	4.2	181.23 ± 5.41 ¹⁾	135.81 ± 2.15 ¹⁾
匹维溴胺	15.0	145.31 ± 6.29 ²⁾	155.41 ± 3.69 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01 (表 2 同)。

3.2 疏肝健脾方对大鼠结肠黏膜组织 5-HT, CGRP

表达的影响 5-HT 阳性纤维表达可见于黏膜上皮、黏膜下层血管内皮,同时在黏膜表面及肌层也可见阳性产物;CGRP 表达主要见于黏膜和黏膜下层血管内皮,在黏膜下层和肌间尚可见少量 CGRP 阳性表达。D-IBS 大鼠结肠黏膜中 5-HT, CGRP 阳性纤维平均 A 统计结果显示,模型组与正常组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);疏肝健脾各剂量组和匹维溴胺组大鼠经灌胃给药后,均能降低结肠黏膜中 5-HT,升高 CGRP,与模型组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),而以疏肝健脾高、中剂量组差异明显 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 疏肝健脾方对各组大鼠肠黏膜 5-HT, CGRP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)^A

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	5-HT	CGRP
正常	-	0.37 ± 0.15 ¹⁾	0.43 ± 0.16 ¹⁾
模型	-	0.87 ± 0.19	0.21 ± 0.14
疏肝健脾	16.8	0.46 ± 0.12 ²⁾	0.39 ± 0.21 ²⁾
	8.4	0.63 ± 0.17 ²⁾	0.32 ± 0.19 ²⁾
	4.2	0.77 ± 0.20 ¹⁾	0.29 ± 0.15 ¹⁾
匹维溴胺	15.0	0.52 ± 0.15 ²⁾	0.40 ± 0.12 ²⁾

4 讨论

D-IBS 发病机制与中枢神经系统和肠神经丛功能失调密切相关,而导致内脏高敏感性和胃肠道运动功能紊乱^[3]。5-HT 是一种广泛存在于中枢神经系统和胃肠道的神经递质,D-IBS 的首要症状是腹痛,而 5-HT 能神经元是痛觉反应体系的重要组成部分,是调节背角神经元兴奋性下行通路的化学物质之一,在内脏伤害性刺激的疼痛感知、痛阈调节及中枢镇痛中均有重要作用^[4]。CGRP 主要分布于内脏感觉神经,50% 含 CGRP 的感觉神经元同时含有神经激肽,通过调节脊髓初级传入神经元 NK1 表达,增加内脏敏感性;另外作为神经介质,调节脊髓节前、节后神经纤维的速激肽,调节肠道疼痛传入中枢,还可能作用于辣椒素敏感的感觉神经末梢,加速脊髓后角 SP 的释放^[5]。

D-IBS 属中医“泄泻”“痛泄”“久泄”等的范畴。其病因病机主要是由于情志失调、劳累过度、饮食不节、复感外邪等所致的肝脾功能失调,肝气郁结,疏泄不畅,脾失健运;脾胃虚弱,运化无权,水谷不化,清浊不分,水谷并走肠间而成腹痛泄泻。本病病位

在肠,基本病机为肝郁脾虚。疏肝健脾方具有疏肝理气,健脾益气,缓急止痛之功,方中柴胡疏肝解郁、调畅气机;党参、茯苓、白术健脾益气;陈皮行气燥湿和胃;广木香、佛手、川楝子辛散理气、调和肝脾;元胡、丹参行气活血、缓急止痛;白芍养血敛阴,柔肝缓急,与柴胡相配,一散一敛,相反相成,使肝不横逆,疏泄条达;白芍与甘草相配,又可缓急止痛;诸药配合,疏中有补,补而不腻,散中有收,收而不滞。

本研究结果显示,模型组大鼠血及结肠黏膜中 5-HT 升高,CGRP 降低,与正常组比较差异有显著性 ($P < 0.05$),与李佃贵等^[6]研究结果一致。因此可以认为 D-IBS 大鼠 5-HT,CGRP 变化,可能与内脏痛觉过敏有直接的关系,是内脏痛觉过敏发病机制的重要环节。此外,研究发现疏肝健脾方各剂量组大鼠经灌胃给药后,均能降低结肠黏膜中 5-HT,升高 CGRP,与模型组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),而以疏肝健脾高、中剂量组差异明显 ($P < 0.01$),表明与剂量成正相关关系,提示疏肝健脾方治疗腹泻型肠易激综合征可能是通过调节 5-HT,CGRP 的变化发挥疗效。

[参考文献]

- [1] 刘杰民. 腹安汤治疗腹泻型肠易激综合征 40 例疗效观察及机制探讨[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(9):1736.
- [2] 杨银芳,楚更五,张建英,等. 痛泻要方对寒冷-束缚肠易激综合征模型大鼠作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(9):1986.
- [3] Casey K L, Minoshima S, Berger K L, et al. Positron emission tomographic analysis of cerebral structures activated specifically by repetitive noxious heat stimuli [J]. J Neurosurg,1994,71(2):802.
- [4] Chan C L, Facer P, Davis J B, et al. Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency [J]. Lancet, 2003,361(9355):385.
- [5] Simren M, Stotzer P O, Sjiövall H, et al. Abnormal levels of neuropeptide Y and peptide YY in the colon in irritable bowel syndrome [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2003,15(1):55.
- [6] 李佃贵,赵玉斌. 痛泻要方对肠易激综合征作用机制的实验研究[J]. 中草药,2006,37(11):1861.

[责任编辑 聂淑琴]