

四磨汤对慢性应激小鼠多巴胺受体 D1, D2 的影响

刘柏炎¹, 易健¹, 蔺晓源¹, 易跃能², 蔡光先^{1*}

(1. 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;

2. 湖南省消化道药物工程技术研究中心, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 研究四磨汤对慢性应激小鼠多巴胺受体 1, 2 (DR1, DR2) 的影响, 明确四磨汤治疗功能性胃肠病 (FGIDs) 的作用机制。方法: 动物随机分组, 采用饥饱失常、明暗颠倒以及束缚夹尾等多种方法造模, 分别给予蒸馏水、多潘立酮、四磨汤 (7.56 mL·kg⁻¹) 治疗, 免疫组织化学法观察小鼠脑内和肠道组织 DR1, DR2 的表达。结果: 模型组小鼠脑内和十二指肠组织中 DR1, DR2 的表达增加, 与正常组比较有统计学差异 ($P < 0.05$); 四磨汤组 DR1, DR2 的表达下降, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 四磨汤调节多巴胺受体 D1, D2 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; 慢性应激; 多巴胺 D1 受体; 多巴胺 D2 受体

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)04-0192-03

Effects of Simo Decoction on Expression of Dopamine Receptor 1, 2 in Brain and Duodenum Tissue in Chronic Stress Mice

LIU Bai-yan¹, YI Jian¹, LIN Xiao-yuan¹, YI Yue-neng², CAI Guang-xian^{1*}

(1. Key Laboratory of Internal Medicine Traditional Chinese Medicine University of Hunan,

Changsha 410007, China; 2. Hunan Engineering and Technology Research Center for Gastroenterological Drugs, Changsha 410013, China)

[Abstract] Objective: To study effects of Simo decoction on expression of dopamine receptor 1, 2 (DR1, DR2) in brain and duodenum tissue in chronic stress mice. **Method:** The mice were randomly divided into control group, stress only (model) group, mosapride group and Simo decoction oral liquid (7.56 mL·kg⁻¹) group. Chronic stress model was established by exerting the factors of irregular diet, reverse of day and night, binding and stimulating tails. And then treated with distilled water, domperidone and Simo decoction. The expressions of DR1 and DR2 were measured by immunohistochemistry. **Result:** Simo decoction significantly enhanced expressions of DR1 and DR2 in brain and duodenum tissue compared with the normal group ($P < 0.05$). and there was significantly difference with model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Simo decoction appears potential to regulate the expression of DR1 and DR2 in brain and duodenum tissue, which is one of possible mechanism to therapy FGIDs.

[Key words] Simo decoction; chronic stress; dopamine receptor 1; dopamine receptor 2

[收稿日期] 2010-12-15

[基金项目] 国家重点基础研究计划 (973) 课题 (2009CB523002); 湖南省中医药科技计划项目 (209004)

[第一作者] 刘柏炎, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药防治消化及心脑血管疾病研究, Tel: 13974884196

[通讯作者] * 蔡光先, 教授, 博士生导师, E-mail: lby1203@sina.com

功能性胃肠病 (FGIDs) 是胃肠道的运动与分泌功能失调、而在病理解剖方面无器质性病理改变的胃肠综合征的总称, 多有精神因素的背景, 外部环境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。心理应激机制在 FGIDs 的病因学意义已经开始受到研究者的关注。近年来随着神经生理学和消化生理学的进展, 对神经系统调控消化功能的认识在

不断加深,发现以多巴胺(dopamine, DA)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^[1]。四磨汤是治疗 FGIDs 的有效方剂,临床和实验研究证明具有促胃肠动力的作用^[2-3]。本实验通过观察四磨汤对慢性应激小鼠脑内和十二指肠多巴胺受体(dopamine receptor, DR)表达的影响,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,雌雄各半,体重(20 ±2) g,由湖南斯莱克景达实验动物公司提供合格证号 SCXK(湘) 2009-0004。

1.2 药物 四磨汤口服液(湖南汉森制药股份有限公司),批号 091002183,规格 10 mL/支;多潘立酮(西安杨森制药公司),批号 091130529,规格 10 mg/片,用蒸馏水配制成 0.5 g·L⁻¹ 的药液备用。

1.3 试剂 兔抗小鼠多巴胺受体 1 单抗(DR1)、兔抗小鼠多巴胺受体 2 单抗(DR2),由武汉博士德生物工程有限公司提供;SP-9000 免疫组化染色试剂盒(批号 724944A)和液体 AEC 酶底物试剂盒(批号 K96914D),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有限公司提供。

1.4 仪器 英国 Thermo 公司 E60 冰冻切片机;日本 Olympus 公司 BX-51 光学显微镜及 Image-Pro Plus 5.1(IPP5.1)图像分析系统;上海医疗器械七厂电热恒温水浴箱。

2 方法

2.1 模型制备 参考文献方法[4]并加改进制备不可预知的慢性应激模型,选取多种刺激因素对大鼠进行干预:食物剥夺(24 h);饮水剥夺合并空瓶刺激(12 h);明暗颠倒(24 h);湿笼饲养(24 h);强迫游泳(45 min, 5 min);倒悬(30 min);行为束缚(30 min);超声刺激(2 h);夹尾(1 h)。每天随机选取 1 种,相邻 2 d 的刺激不重复,连续刺激 21 d。各种刺激方法平均使用 2~3 次,应激处理在每日上午 08:30 开始更换。

2.2 动物分组与给药 所有小鼠适应性喂养 3 d 后,随机抽取 10 只作为正常组,其余动物开始造模,造模成功后,将模型动物随机分为模型组、多潘立酮组和四磨汤组,每组 10 只。四磨汤组给予四磨汤口服液 7.56 mL·kg⁻¹·d⁻¹(临床等效剂量),多潘立酮组给予多潘立酮溶液 3.78 mg·kg⁻¹·d⁻¹(临床等效剂量),模型组给予蒸馏水,连续 7 d,正常组按常规

喂养。

2.3 小鼠 DR1, DR2 表达检测 小鼠以 10% 水合氯醛(4.0 mL·kg⁻¹)麻醉后,取脑和十二指肠组织,4% 多聚甲醛后固定 1 h,依次放入 15%, 20%, 30% 蔗糖沉底 24 h。OTC 包埋,冰冻切片机冠状连续切片,10 μm 厚。免疫组化采用 SABC 法, AEC 显色,其中 DR1, DR2 浓度为 1:100,阳性细胞和纤维呈紫红色。同时用正常山羊血清和 PBS 代替一抗作空白对照以检查免疫反应的特异性。每张脑片置于 400 倍镜下随机选取阳性表达细胞不重复的 5 个视野,用 IPP5.1 图像分析系统自动计数免疫阳性细胞数,计算其平均值。每张肠片随机选取 5 个视野,求得免疫阳性反应产物的平均吸光度(A)。A 值越大,表示其神经递质含量越多。

2.4 统计学分析 用 SPSS16.0 软件统计包对各组数据进行统计分析,所有资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。

3 结果

3.1 四磨汤对慢性应激小鼠脑组织 DR1 的影响 DR1 在正常脑组织有一定量的表达,阳性细胞呈现红褐色,在脑内表达广泛,脑皮层、Calleja 岛、下丘脑和杏仁核均有表达,主要分布于脑皮层,以星状、条索状多见。慢性应激后,模型小鼠 DR1 阳性细胞染色较深,数量较多,与正常组比较差异有显著性差异($P < 0.05$);四磨汤组 DR1 表达下降,与模型组比较有统计学差异($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 四磨汤对慢性应激小鼠脑内 DR1,

DR2 阳性细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) 个/mm²

组别	剂量	DR1	DR2
正常	-	21.87 ±3.100	20.38 ±2.67 ²⁾
模型	-	25.06 ±2.71	24.58 ±2.54
多潘立酮	3.78 mg·kg ⁻¹	21.98 ±2.79 ¹⁾	21.40 ±2.52 ¹⁾
四磨汤	7.56 mL·kg ⁻¹	22.20 ±3.03 ¹⁾	21.74 ±2.70 ¹⁾

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

3.2 四磨汤对慢性应激小鼠脑组织 DR2 表达的影响 DR2 在正常脑组织的阳性表达呈胞质红褐色染色,不同部位的 DR2 表达形态多样,以大脑皮层的梭形、多角形多见。模型组 DR2 阳性细胞染色深,数量增多,与正常组比较差异显著($P < 0.01$);四磨汤组 DR2 表达下降,与模型组比较有统计学差异($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 四磨汤对慢性应激小鼠十二指肠 DR1 表达的影响 DR1 在正常十二指肠组织有一定量的表达,

阳性纤维呈现红褐色,较弥散地分布于整个黏膜层,而在固有层顶部绒毛间质内呈集中趋势,腺体与腺体、上皮细胞与上皮细胞之间亦有。模型小鼠 DR1 阳性纤维染色较深,分布较广,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);四磨汤组 DR1 表达下降,与模型组比较有显著差异($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 四磨汤对慢性应激小鼠十二指肠 DR1, DR2 表达的影响(柳±s, n=10)

组别	剂量	DR1	DR2
正常	-	0.37 ±0.05 ²⁾	0.39 ±0.05 ²⁾
模型	-	0.45 ±0.05	0.46 ±0.076
多潘立酮	3.78 mg·kg ⁻¹	0.38 ±0.04 ²⁾	0.41 ±0.04 ¹⁾
四磨汤	7.56 mL·kg ⁻¹	0.39 ±0.05 ²⁾	0.41 ±0.04 ¹⁾

3.4 四磨汤对慢性应激小鼠十二指肠 DR2 表达的影响 DR2 在正常十二指肠组织的阳性表达呈胞质红褐色染色,以固有膜靠近黏膜肌层为主,不同部位的 DR2 表达形态多样。模型组 DR2 阳性纤维染色深,数量增多,与正常组比较差异显著($P < 0.01$);四磨汤组 DR2 表达下降,与模型组比较有统计学差异($P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

目前研究认为,各种环境应激因子作用于大脑的应激反应系统,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^[5]。脑肠肽兼有神经递质和激素的双重作用,同时存在于中枢神经系统中。脑肠肽相互之间、脑肠肽与胃肠各种细胞、组织、器官之间相互协调才能维持生理功能。一旦这种平衡被打破,就有可能导致一些症状综合征,已有研究证明,各种形式的应激可引起体内脑肠肽含量和功能的变化,它们通过中枢和局部作用改变胃肠道的血流、分泌、动力等而改变胃肠道的功能。而应激使兴奋和抑制胃肠运动的两类脑肠肽分泌紊乱,是 FGIDs 发病的一个重要因素^[6]。

多巴胺(DA)与胃肠道 DR 结合发挥广泛的生理功能,在实验性的胃、十二指肠溃疡形成、消化液分泌、胃肠运动及胃肠黏膜下血流调节中发挥一定作用。DA 是胃肠运动的抑制性调节递质,有学者^[7]实验证实 DA 能抑制胃体、胃窦运动,且呈剂量依赖性。进一步研究表明 DA 不仅能减少张力性和位相性胃运动,还能阻断胃窦和十二指肠的协调运动,增强进食后十二指肠运动^[8]。DA 能增强正常人结肠能动性 and 敏感性,使之处于高敏状态,从而增加其运

动次数和幅度,产生类似于肠易激综合征的结肠运动形式。DA2 受体阻断剂多潘立酮能拮抗多巴胺的抑制作用。目前外周 DR 拮抗剂多潘立酮作为胃动力药广泛用于治疗各种胃动力低下患者。

FGIDs 属中医“胃脘痛”、“痞满”、“纳呆”等范畴,其基本病机为情志所伤而致肝失疏泄,则胃失和降、气机不舒,脾主运化受制,故治疗应疏肝理气,降逆消积。四磨汤源于宋代严用和的《重订严氏济生方》卷二,全方由木香、枳壳、乌药、槟榔组成,木香醒脾开胃,疏肝理气,消积导滞;枳壳泻胃开坚,行滞调气,破坚消胀,通便;乌药通理上下诸气,顺气降逆,宽中快膈,疏散凝滞,散寒止痛;槟榔破坚宣壅,消食通肠。诸药合用,有顺气降逆,消积止痛之功。临床上广泛用于治疗功能性消化不良、便秘型肠易激综合征及非胃术后胃肠排空障碍等 FGIDs 疗效显著。

本研究结果显示,慢性应激模型小鼠脑、肠组织 DR1 和 DR2 的表达明显增强,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。经四磨汤治疗后 DR1 和 DR2 的表达降低,与模型组比较 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,与正常组和多潘立酮组无统计学差异。表明调节 DR1, DR2 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] 陈新,张国亮,栾建革,等.多巴胺受体的分子生物学及相关胃肠疾病研究[J].河北医学,2008,30(3):364.
- [2] 梁汝坚,梁若玲,张继平.四磨汤口服液治疗功能性消化不良 45 例[J].实用医学杂志,2008,24(6):1051.
- [3] 易健,刘杰民,蔺晓源,等.四磨汤对腹部非胃肠手术后大鼠胃肠运动的影响[J].中南药学,2010,8(2):84.
- [4] 金光亮,南睿,郭霞珍.慢性应激肝郁证大鼠模型的建立[J].北京中医药大学学报,2003,26(2):18.
- [5] 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.
- [6] 孙燕,侯晓华.应激对胃肠道感觉-动力功能的影响[J].继续医学教育,2006,20(3):13.
- [7] Mezey E, Eisenhofer G, Hansson S, et al. Non-neuronal dopamine in the gastrointestinal system[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl, 1999, 26: 14.
- [8] Miyazawa T, Matstimoto M, Kato S, et al. Dopamine-induced protection against indomethacin-evoked intestinal lesions in rats-role of anti-intestinal motility mediated by D2 receptors[J]. Med Sci Monit, 2003, 9: 71.

[责任编辑 何伟]