

· 经典名方 ·

大建中汤对肠易激综合征大鼠内脏痛的影响

武静¹, 杜娴¹, 杨莎莎^{2*}, 杨毅¹, 李尧锋¹, 王俊霞¹, 陈继婷¹

(1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025;

2. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:研究大建中汤对肠易激综合征(IBS)内脏痛大鼠P物质(SP),肥大细胞(MC),MC膜上Toll样受体2(TLR2),Toll样受体4(TLR4)和核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)影响,并探讨其对IBS内脏痛的作用机制。方法:将SD 3日龄新生大鼠48只,随机分为正常组,IBS模型组,酮替芬组($0.18\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),大建中汤低、中、高剂量组($2.16, 1.08, 0.54\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。每组8只,连续灌胃给药2周。采用母婴分离法制备IBS内脏痛大鼠模型,利用腹壁撤退反应(AWR)评估大鼠内脏敏感性;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织SP,NF- κ B p65蛋白;免疫荧光染色法检测MC膜上TLR2,TLR4蛋白;甲苯胺蓝染色法检测结肠组织MC脱颗粒率。结果:与正常组大鼠比较,模型大鼠中60,40,20 mmHg压力下AWR评分明显升高($P<0.05, P<0.01$),结肠组织中MC脱颗粒率,SP蛋白表达显著上升($P<0.01$),MC膜上TLR2,TLR4及核内NF- κ B p65蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组大鼠比较,大建中汤高剂量组(压力40,20 mmHg,1 mmHg $\approx 0.133\text{ kPa}$),大建中汤中剂量组(压力60,40,20 mmHg)的AWR评分,结肠MC脱颗粒率,SP,TLR2,TLR4和NF- κ B p65表达明显下降($P<0.05, P<0.01$)。结论:大建中汤能够降低IBS模型大鼠内脏痛,其下调SD大鼠结肠组织中SP,进而影响MC活性可能是机制之一。

[关键词] 肠易激综合征; 内脏痛; 肥大细胞; 大建中汤; SD大鼠

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)06-0001-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210203

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210125.0858.002.html>

[网络出版日期] 2021-1-25 10:56

Effect of Da Jianzhongtang on Visceral Pain in Rats with Irritable Bowel Syndrome

WU Jing¹, DU Xian¹, YANG Sha-sha^{2*}, YANG Yi¹, LI Yao-feng¹, WANG Jun-xia¹, CHEN Ji-ting¹

(1. *Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550025, China;*

2. *The First Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550002, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Da Jianzhongtang on substance P (SP), mast cells (MC), Toll like receptor 2 (TLR2), TLR4 on MC model and nuclear transcription factor (NF)- κ B p65 in visceral pain rats with irritable bowel syndrome (IBS), and explore its mechanism of action on IBS visceral pain. **Method:** Forty-eight 3-day-old SD rats were randomly divided into 6 groups: the control group (control), irritable bowel syndrome group (IBS), ketotifen group (Ketotifen, $0.18\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Da Jianzhongtang low, medium and high dose groups (DJZT-L, DJZT-M, DJZT-H, $2.16, 1.08, 0.54\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 8 rats in each group. Intra-gastric administration lasted for 2 weeks. Maternal separation method was used to establish the IBS visceral pain model in rats. The visceral sensitivity of rats was evaluated at 60, 40 and 20 mmHg (1 mmHg $\approx 0.133\text{ kPa}$) with Abdominal wall withdrawal response (AWR) scale. SP and NF- κ B p65 protein expression levels in colon

[收稿日期] 20201103(024)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81960821);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2017]170);贵州省中医药管理局项目(QZYY-2018-026);国家级大学生创新创业项目(贵中医大创合字(2017)32号)

[第一作者] 武静, 硕士, 副教授, 从事中西医结合防治消化疾病基础与应用研究, E-mail: wujingbay@163.com

[通信作者] * 杨莎莎, 博士, 硕士生导师, 从事中西医结合防治耳鼻喉疾病基础与应用研究, E-mail: yangyuansha88@163.com

tissue were detected with Western blotting technique. TLR2 and TLR4 proteins on mast cell membrane were detected by immunofluorescence staining. The degranulation rate of mast cells in colon tissue was detected by toluidine blue staining. **Result:** Compared with normal rats, AWR scores of model rats significantly increased at 60, 40, and 20 mmHg pressure ($P<0.05$, $P<0.01$), the degranulation rate of mast cells in colon tissue and SP protein expression in colon tissue significantly increased ($P<0.01$), TLR2, TLR4, and nuclear NF- κ B p65 expression on mast cell membrane significantly increased ($P<0.01$). Compared with model rats, the AWR scores of DJZT-H group (pressure of 40, 20 mmHg) and DJZT-M group (pressure of 60, 40, 20 mmHg) significantly decreased. Meanwhile, the degranulation rate of colon mast cells, and the SP, TLR2, TLR4, and NF- κ B p65 expression also significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Da Jianzhongtang can affect mast cell activity and finally decrease visceral pain of IBS rats by down-regulating SP in colon tissue.

[Key words] irritable bowel syndrome; visceral pain; mast cell; Da Jianzhongtang; SD rats

肠易激综合征(IBS)是常见的消化系统疾病,临床上患者多以慢性内脏痛就诊。多种因素可诱发本病,其中作为肠道黏膜主要抗原感受器的肥大细胞(MC)在肠道系统的网络调控中有重要作用。有学者发现,IBS患者的腹痛程度与肠道MC数量及脱颗粒程度呈正相关^[1-2]。目前临床上使用MC膜稳定剂酮替芬治疗IBS导致的内脏痛,但仍存在不少不良反应^[3]。

随着人们对IBS内脏痛的认识的逐渐加深^[4],有学者提出了神经-免疫-内分泌网络失调机制^[5],但其发病机制仍未明确,也未有针对性特效药。中医学依据症状认为脾胃为其病位所在,感寒、气滞和血凝等为其病因,“脾胃受寒,气血运化不足”“气机受阻,气血运行不畅”为其病机。大建中汤出自《金匱要略》,是治疗腹痛的经典方剂,适用于脾胃受寒之腹痛证。现代临床上许多研究也证实针对多种急慢性腹痛,大建中汤有显著疗效^[6]。

目前,中药因其具有多效能、多靶点、多途径等诸多特点,在治疗疼痛疾病的过程中具有独特而不可替代的优势被广泛应用。大建中汤由干姜、人参和蜀椒组成,具有温中补虚,降逆止痛的作用,课题组前期研究发现其可以降低内脏高敏感,从而降低腹痛^[7-8]。本实验采用复合造模方法,通过观察MC上游Toll样受体2(TLR2),TLR4及下游核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)的表达情况,进而揭示大建中汤治疗IBS内脏痛的神经免疫调节机制,拓宽大建中汤临床适应证范围。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠,雌鼠16只,雄性8只,体质量150~170 g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,合格证号SCXK(渝)2017-0006。正常饮食1周,然后按雌雄鼠2:1的比例分笼喂养,雌鼠怀孕以后

再分开喂养,待生下乳鼠后,选取3日龄48只乳鼠用于实验。

1.2 试剂和仪器 佐剂液态铝(美国Pierce公司,批号QD218415A);卵清白蛋白(OVA,美国Sigma公司,批号052K1275);氢氧化铝粉末(成都市科龙化工试剂厂,批号061222);甲苯胺蓝(上海如吉生物科技发展有限公司,批号190118);兔抗大鼠TLR2单克隆抗体,兔抗大鼠TLR4单克隆抗体,兔抗大鼠SP单克隆抗体,兔抗大鼠NF- κ B p65单克隆抗体,生物素化山羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G抗体,兔多克隆抗体TLR4(英国Abcam公司,批号分别为批号ab10739, ab22048, ab14184, ab16502, ab0942, ab10815); β -肌动蛋白(β -actin)大鼠单克隆抗体(上海雅酶生物科技有限公司,批号GXP199629);浓缩型DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,批号K135925C)。

1.3 仪器 RM2135型石蜡切片机(德国Leica公司),J-HH-4A型恒温水浴锅(上海胜卫电子科技有限公司),SAF-680T型酶标仪(上海巴玖实业有限公司),ZDB-80型光学显微镜(上海正晞仪器设备有限公司),Image-Pro Plus 6.0图像分析系统(美国Media Cybernetics公司),BA400Digital型数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

1.4 药物 大建中汤(干姜、蜀椒、人参)由贵阳中医学院第一附属医院药剂科提供,经贵州中医药大学药学院汪毅教授鉴定均为正品。按比例[干姜-蜀椒-人参(2:1:1)]制成质量浓度为1.5 g·mL⁻¹的水浸液;酮替芬片(杭州苏泊尔南洋药业有限公司,国药准字H33020917,批号20180113-12)。

2 方法

2.1 分组 将新生大鼠随机分为6组,分别是正常组,IBS模型组,酮替芬治疗组,大建中汤低、中、高

剂量治疗组,每组8只。酮替芬组(根据相关文献[9]设置剂量为 $0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和大建中汤组($2.16, 1.08, 0.54 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,以生药计,分别根据人每1 kg 体重质量临床用量的14, 7, 3.5倍剂量)分别给予灌胃,模型组和正常组别给予生理盐水灌胃,给药2周,并腹壁撤离反射(AWR)检测。

2.2 模型制备 根据相关文献[10],乳鼠在出生的第2天母婴分离 $3 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 不予哺乳,正常组同笼正常喂养;第8~21天增加0.5%乙酸直肠内刺激,1次/d,0.2 mL/次,正常组直肠给予生理盐水0.2 mL对照。第22~41天正常饲养;之后分别于第42和46天腹腔注射 $1 \text{ mL } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ OVA,正常组注射等量磷酸盐缓冲液(PBS);正常饲养至第57天,第58天通过AWR对各组大鼠内脏敏感性进行评价。

2.3 腹壁撤退反应检测 实验前禁食12 h,戊巴比妥钠($0.4\%, 10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉大鼠,将刺激球囊导管插入肛门内1 cm处,露出肛门外部分在大鼠尾根部固定以防止滑脱。导管另一端连接血压计。待大鼠清醒30 min后分别给予80, 60, 40, 20 mmHg ($1 \text{ mmHg} \approx 0.133 \text{ kPa}$,下同)压力,观察结直肠对各测试压力的反应程度,即结直肠扩张实验。扩张时间设定20 s/次,重复6次,每次间隔4 min,取6次均值。给与不同刺激时评分标准参照AL-CHAER等^[11]的文献,0分,大鼠情绪稳定;1分,偶有扭动头部;2分,腹背部肌肉轻微收缩;3分,腹背肌肉收缩的基础上出现腹部上提离开地面;4分,腹部高离地面致使腹部呈弓状。

2.4 取材 禁食12 h后采用0.4%戊巴比妥钠腹腔注射($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,迅速将大鼠开腹取3 cm结肠,分为3段 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.5 甲苯胺蓝染色法检测 取结肠组织固定于10%中性多聚甲醛固定液中,常规脱水包埋,切成厚度为 $4\sim 5 \text{ } \mu\text{m}$ 切片。3-氨基丙基(APES)(1:50丙酮溶液)浸泡切片后,将切片置于烤箱(1 h, $60 \text{ }^\circ\text{C}$)中使其黏附;脱蜡后放入浓度为1%的甲苯胺蓝水预热至 $50 \text{ }^\circ\text{C}$;蒸馏水洗后浸泡在70%乙醇中1 min;分化用95%乙醇后再脱水;按要求对切片进行透明、封固。最后,显微镜下观察3个视野进行计数,统计MC个数及脱颗粒个数,并计算MC脱颗粒率。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 分别将结肠组织裂解剪成碎片匀浆, $1 \text{ 万 } \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心10 min后提取组织蛋白;采用BCA法进行蛋白定量后,取煮沸变性后的蛋白量 $50 \text{ } \mu\text{g}$,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离、转膜、

染色,剪膜,脱色、封闭、洗膜后,将PVDF膜加入适量封闭液,放入一抗(稀释比例,SP 1:2 000, NF- κ B p65 1:5 000, GAPDH 1:5 000)溶液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴摇床上封闭2 h,摇床上洗膜3次,将洗好的PVDF膜放于配制好的生物素化山羊抗小鼠IgG二抗(1:2 000)溶液,摇床上孵育2 h再洗膜;采DAB法显色,并根据不同显影光强度调整曝光条件用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件进行扫描分析,以 β -actin与目的蛋白灰度值比值作为待测目的蛋白相对表达量。

2.7 免疫荧光染色检测TLR2, TLR4表达 4%多聚甲醛溶液固定结肠组织后切片,厚 $5 \text{ } \mu\text{m}$,每只动物随机选取6张,水化;在室温下用1%胎牛血清[溶于磷酸盐缓冲液(PBS), 0.3% Triton X-100]封闭切片1 h。然后与针对TLR2(1:100)和TLR4(1:200)的抗体在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 的湿盒中孵育过夜。用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS冲洗3次后,将切片与荧光素二抗结合的抗体(1:2 000)在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育60 min(避光),然后与DAPI一起在室温下染色30 min。用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS洗涤3次后封片。TLR2显示绿光,TLR4显示红光,DAPI染核显示蓝色。最后,免疫荧光双标TLR2, TLR4区域积分吸光度IA应用图像分析系统计算。

2.8 统计学方法 采用SPSS 20.0统计分析软件对数据进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数间两两比较,采用最小显著性差异法(LSD), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠整体情况 正常组大鼠进食正常,毛发润泽,行动灵活;造模大鼠毛发失去光泽、行动迟缓并喜好扎堆、收腹和舔舐腹部等现象;灌服大建中汤和酮替芬后,大鼠进食和毛发恢复正常,舔舐腹部现象消失。

3.2 对IBS大鼠模型内脏痛的影响 与正常大鼠比较,模型组大鼠在60, 40, 20 mmHg压力下AWR评分显著增加,肠道疼痛感觉明显上升($P < 0.05, P < 0.01$),证明成功造模;与模型组大鼠比较,在40, 20 mmHg压力下酮替芬组、大建中汤高、中剂量组AWR评分明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),降低模型大鼠肠道疼痛感觉。见表1。

3.3 对IBS内脏痛大鼠结肠MC的影响 显微镜下观察到MC多集中在结肠黏膜固有层及黏膜下层。正常MC胞质清晰,形态结构完整,脱颗粒后细胞膜不同程度受到破裂,出现多种不规则形态。与正常

表1 大建中汤对IBS内脏痛大鼠模型直肠内压力AWR评分的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
正常		0.39±0.61	1.19±0.51	2.19±0.70	3.18±0.38
模型		1.59±0.68 ¹⁾	2.59±0.90 ²⁾	3.39±0.47 ²⁾	3.59±0.49
酮替芬	1.8×10 ⁻⁴	0.76±0.51 ⁴⁾	1.71±0.70 ⁴⁾	2.79±0.38 ³⁾	3.49±0.46
大建中汤	0.54	1.55±0.64	2.41±0.47	3.16±0.51	3.63±0.46
	1.08	0.94±0.52 ³⁾	2.38±0.90 ³⁾	2.97±0.74	3.46±0.65
	2.16	0.68±0.51 ⁴⁾	1.68±0.52 ⁴⁾	2.49±0.52 ⁴⁾	3.28±0.50

注: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(表2~4同)。

组大鼠比较,IBS内脏痛大鼠MC个数和颗粒现象显著升高(P<0.01);与IBS内脏痛大鼠比较,酮替芬组和大建中汤各剂量组明显降低MC个数和脱颗粒现象(P<0.05,P<0.01)。见表2,图1。

表2 大建中汤对IBS内脏痛大鼠模型结肠黏膜MC个数、脱颗粒的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Da Jianzhongtang on number and degranulation of colonic mucosa of IBS visceral pain rat model ($\bar{x}\pm s, n=8$)

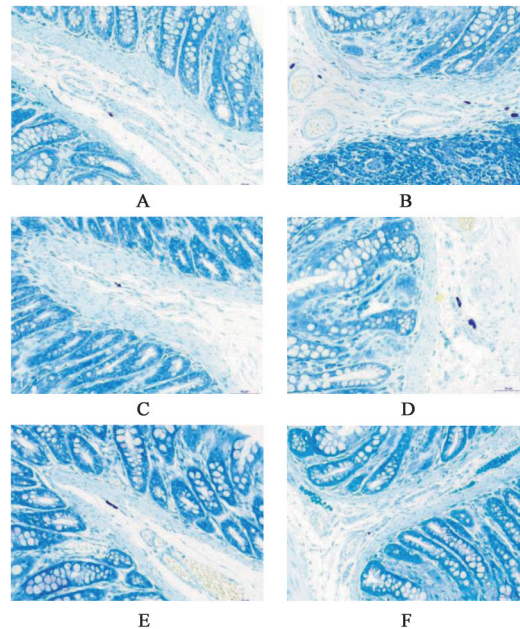
组别	剂量/g·kg ⁻¹	MC/个	MC活化脱颗粒/%
正常		4.11±0.24	17.12±12.01
模型		9.20±0.97 ²⁾	56.57±4.58 ²⁾
酮替芬	1.8×10 ⁻⁴	4.42±0.71 ⁴⁾	17.52±5.26 ⁴⁾
大建中汤	0.54	8.60±0.55	52.86±7.24
	1.08	5.90±1.22	27.47±5.01 ³⁾
	2.16	4.30±0.67 ³⁾	17.25±10.36 ⁴⁾

3.4 对IBS内脏痛大鼠模型结肠SP,NF-κB p65的影响 与正常组比较,模型组大鼠SP和NF-κB p65蛋白水平显著增加(P<0.01);与模型组大鼠比较,酮替芬组,大建中汤高、中剂量组SP和NF-κB p65蛋白水平显著降低(P<0.01)。见表3,图2。

3.5 对IBS内脏痛大鼠模型结肠免疫荧光双染TLR2,TLR4表达分析 实验显示,红色为TLR4,绿色为TLR2,蓝色为DAPI染核。与正常组比较,IBS内脏痛组大鼠结肠黏膜TLR2和TLR4的IA均显著升高(P<0.01);与模型组比较,大建中汤高剂量组和酮替芬组显著降低大鼠TLR2,TLR4的IA(P<0.01)。见表4,图3。

4 讨论

IBS是常见的消化系统慢性疾病,近年来患病率不断攀升,严重影响患者的生活质量。本次实验结果显示,造模大鼠逐渐出现精神不振、行动迟缓、收腹、舔舐腹部和便溏等现象,其符合IBS内脏痛症



A. 正常组;B. 模型组;C. 酮替芬组;D. 大建中汤低剂量组;E. 大建中汤中剂量组;F. 大建中汤高剂量组(图2,3同)

图1 大建中汤对IBS内脏超敏模型大鼠结肠远端MC数量和脱颗粒的影响(甲苯胺蓝,×400)

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

表3 大建中汤对IBS模型大鼠结肠远端黏膜SP和NF-κB p65蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Da Jianzhongtang on SP and NF-κB p65 protein in distal colonic mucosa of IBS model rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SP/β-actin	NF-κB p65/β-actin
正常		0.38±0.08	0.41±0.02
模型		1.63±0.07 ²⁾	1.75±0.03 ²⁾
酮替芬	1.8×10 ⁻⁴	0.40±0.01 ⁴⁾	0.42±0.02 ⁴⁾
大建中汤	0.54	0.84±0.05	0.95±0.06
	1.08	0.46±0.02 ⁴⁾	0.51±0.01 ⁴⁾
	2.16	0.39±0.04 ⁴⁾	0.43±0.03 ⁴⁾

状。IBS内脏痛大鼠肠道在60,40,20 mmHg压力下AWR评分均升高,表明IBS慢性内脏痛是在大鼠

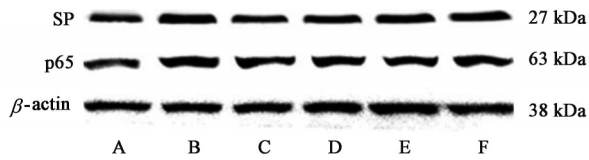


图2 各组大鼠结肠远端黏膜SP和NF-κB p65蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of SP and NF-κB p65 protein in distal colonic mucosa of rats in each group

表4 大建中汤对IBS模型大鼠结肠远端黏膜TLR2和TLR4表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Da Jianzhongtang on expression of TLR2 and TLR4 in distal colonic mucosa of IBS model rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR2	TLR4
正常		0.32±0.09	1.51±0.14
模型		1.21±0.13 ²⁾	4.12±0.51 ²⁾
酮替芬	1.8×10 ⁻⁴	0.38±0.12 ⁴⁾	1.42±0.26 ⁴⁾
大建中汤	0.54	1.00±0.09	3.01±0.45
	1.08	0.42±0.12 ⁴⁾	1.69±0.51 ⁴⁾
	2.16	0.36±0.11 ⁴⁾	1.55±0.29 ⁴⁾

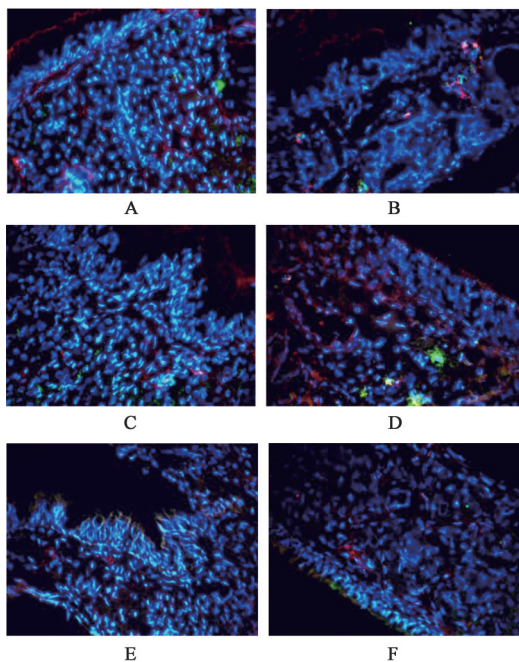


图3 大建中汤对IBS模型大鼠结肠远端黏膜TLR2和TLR4表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 3 Effect of Da Jianzhongtang on expression of TLR2 and TLR4 in distal colonic mucosa of IBS model rats (IF, ×200)

肠道长时间的受到明显刺激下形成的,此时无论外周还是中枢均已痛觉敏化而导致痛阈降低,最终模型大鼠出现痛行为明显的现象。与模型组比较,通过大建中汤治疗,大鼠60, 40, 20 mmHg压力下AWR评分均趋于正常。表明模型大鼠经大建中汤治疗后,其痛阈升高,并明显改善模型大鼠痛行为,

提示大建中汤对内脏痛大鼠有明显的镇痛作用。

MC广泛存在于胃肠道,当受到刺激时能以胞吐的形式释放大量颗粒内物质^[12]。研究发现,在IBS患者结肠黏膜内MC数量及脱颗粒现象显著增加^[13],这种变化受到精神因素,或胃肠道感染等原因影响,进而释放炎症因子和5-羟色胺(5-HT)等多种介质,最终降低IBS患者内脏痛域^[14],这可能与中医脾胃虚寒慢性疼痛的病机有关。本研究中,采用母鼠与新生鼠分离、乙酸灌肠和OVA腹腔注射等复合造模方法,复制了IBS内脏痛大鼠模型。与正常组比较,模型组结肠MC细胞个量及脱颗粒现象均明显增加,进一步证实了MC与IBS的发病密切相关,大建中汤通过抑制MC数量及脱颗粒,降低内脏痛觉。存在于肠神经系统中的SP作为一种促炎症性感觉神经肽,能将肠道痛觉信号通过神经末梢传递至中枢,降低肠道敏感性^[15]。本研究发现SP过表达与IBS内脏痛大鼠痛域降低呈正相关,而大建中汤抑制MC脱颗粒可能与其下调SP机制有关。

IBS内脏痛的发生是一个非常复杂的过程,神经-免疫-内分泌网络系统发挥了重要作用^[16]。有学者应用电镜发现神经细胞与MC之间的距离非常接近,仅隔20 nm^[17];另有研究证实,SP诱发MC释放组胺的结构基础是MC的神经联合点^[18]。以上说明神经肽与MC在形态和功能上均存在密切联系。有学者认为MC被SP激活的神经机制是其特异性受体(NK-1R)和高亲和力受体(FcεRI)介导免疫性和非免疫性两条路径的结果^[19]。在非免疫途径中,激活MC的物质有SP, TLR等^[20-21]。

TLR2和TLR4是TLR家族中非常重要的两个模式识别受,他们与脂多糖结合后激活MyD88通路,进而激活NF-κB^[22]。本次实验观察了SP对MC上游传导通路以及下游传导通路的干预作用,进而阐明大建中汤治疗IBS内脏痛的神经免疫调节机制。从本次实验统计结果得出,与模型组比较,大建中汤组与酮替芬组下调大鼠结肠组织SP的含量,且MC膜表面上TLR2, TLR4及其胞内的NF-κB p65下降水平与SP的变化高度一致。另外,通过对各组大鼠结肠MC上TLR2, TLR4双染以及NF-κB p65的表达结果分析,发现大建中汤对SP/TLR2/NF-κB p65信号通路干预明显,而酮替芬对SP/TLR4/NF-κB p65信号通路作用显著。这为探寻IBS内脏痛发病的分子机制打下了基础。

综上所述,本课题组证实了大建中汤通过抑制MC上游TLR2, TLR4以及下游NF-κB p65等关键

分子,降低内脏痛觉高敏状态。但是MC膜上TLR受体阳性表达是否会影响Fcε受体I(FcεR I)的表达,进而影响MC的分化,参与IBS内脏痛的调控,这些问题还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] LOBO B, RAMOS L, MARTÍNEZ C, et al. Downregulation of mucosal mast cell activation and immune response in diarrhoea-irritable bowel syndrome by oral disodium cromoglycate: a pilot study [J]. *United European Gastroenterol J*, 2017, 5(6): 887-897.

[2] GRABAUSKAS G, WU X, GAO J, et al. Prostaglandin E₂, produced by mast cells in colon tissues from patients with irritable bowel syndrome, contributes to visceral hypersensitivity in mice [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(8): 2195-2207.

[3] 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.

[4] SONG Y F, PEI L X, CHEN L, et al. Electroacupuncture relieves irritable bowel syndrome by regulating IL-18 and gut microbial dysbiosis in a trinitrobenzene sulfonic acid-induced post-inflammatory animal model [J]. *Am J Medicine*, 2020, 48(1): 77-90.

[5] BUCKLEY M M, O'MAHONY S M, O'MALLEY D. Convergence of neuro-endocrine-immune pathways in the pathophysiology of irritable bowel syndrome [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(27): 8846-8858.

[6] 牛艺璇,孙波,白埔,等. 大建中汤的临床应用及现代研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(9): 715-716.

[7] 武静,王慧,王俊霞,等. 大建中汤对慢性炎性内脏痛模型大鼠血清IL-6、TNF-α含量及结肠黏膜IRAK-4 mRNA表达的影响 [J]. *中医杂志*, 2018, 59(18): 1592-1596.

[8] 武静,王慧. 大建中汤对脾阳虚腹痛大鼠大脑皮质三磷酸腺苷含量和三磷酸腺苷酶活性的影响 [J]. *解剖学杂志*, 2017, 40(2): 168-170.

[9] 严晶,刘丽娜,陆茵,等. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2): 92-97.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 江玉翠,叶凡,杜莹,等. 肥大细胞激活相关受体及其功能研究进展 [J]. *生理学报*, 2019, 71(4): 645-656.

[13] 包永欣,邵丽春,吕冠华,等. 健脾调肝温肾方对腹泻型肠易激综合征患者肠黏膜5-羟色胺及其受体的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2016, 23(1): 6-8.

[14] 覃颖,郭孟玮,蓝莹,等. 电针不同穴位对肠易激综合征大鼠肠道动力和敏感性的影响 [J]. *针刺研究*, 2020, 45(4): 293-298.

[15] 石亮,杨健,徐丹. 补中益气汤对便秘型肠易激综合征血液学及肠敏感度的影响 [J]. *世界中医药*, 2018, 13(9): 2196-2199.

[16] 李志元,黄燕,杨延婷,等. 隔药灸对慢性炎性内脏痛大鼠下丘脑SP、5-HT及c-Fos的影响 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2016, 18(3): 395-401.

[17] ITO A, OONUMA J. Direct interaction between nerves and mast cells mediated by the SgIGSF/SynCAM adhesion molecule [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 102(1): 1-5.

[18] 康婧青,郭义,张赛,等. P物质与经络穴位相关性研究进展 [J]. *上海针灸杂志*, 2015, 34(4): 374-375.

[19] SUMPTER T L, HO C H, PLEET A R, et al. Autocrine hemokinin-1 functions as an endogenous adjuvant for IgE-mediated mast cell inflammatory responses [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(4): 1019-1030.

[20] WINNALL W R, MUIR J A, HEDGER M P. Differential responses of epithelial Sertoli cells of the rat testis to Toll-like receptor 2 and 4 ligands: Implications for studies of testicular inflammation using bacterial lipopolysaccharides [J]. *Innate Immun*, 2011, 17(2): 123-136.

[21] JADKAUSKAITE L, BAHRI R, FARJO N, et al. Nrf2 pathway modulates substance P-induced human mast cell activation and degranulation in the hair follicle [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(4): 1331-1333.

[22] PALOVÁ -JELÍNKOVÁ L, DÁŇOVÁ K, DRAŠAROVÁ H, et al. Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1β via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF-κB signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62426.

[责任编辑 周冰冰]