

· 经典名方 ·

## 戊己丸不同配伍方治疗肠易激综合征的比较

王娅杰<sup>1</sup>, 崔羲和<sup>1</sup>, 陈颖<sup>1</sup>, 李玉洁<sup>1</sup>, 杨庆<sup>1</sup>, 翁小刚<sup>1</sup>, 董宇<sup>2</sup>, 蔡维艳<sup>1</sup>, 李琦<sup>1</sup>, 朱晓新<sup>1\*</sup>  
(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

**[摘要]** 目的:从神经-免疫-内分泌网络对优选的2种戊己丸配伍方干预肠易激综合征(IBS)的作用特点进行比较研究,为中医辨证论治提供一定的理论依据。方法:采用乳鼠结肠经皮冠状动脉腔内血管成形(PTCA)球囊刺激法建立IBS慢性高敏感动物模型,分为正常组、模型组、得舒特组、戊己丸1#和2#方高、中、低剂量组,其中1#方以 $0.67\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为中剂量,2#方以 $0.77\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为中剂量,加倍、减半分别为高、低剂量,得舒特给药剂量为 $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。采用腹部抬起及弓背抬高阈值评价戊己丸不同配伍方对IBS肠道敏感性的影响;采用改良后的甲苯胺蓝染色法检测大鼠结肠组织肥大细胞(MC)密度的影响;分别采用酶联免疫吸附测定(ELISA)和免疫组化法检测大鼠血液/结肠组织中5-羟色胺(5-HT),P物质(SP),生长抑素(SS)及血管活性肠肽(VIP)的浓度/阳性表达。结果:各组大鼠体重随时间差异无统计学意义;与正常组比较,模型组腹部抬起和弓背抬高阈值均显著降低( $P<0.01$ ),结肠组织中MC密度明显升高( $P<0.05$ ),血液以及结肠组织中的5-HT,SP,SS水平均明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),结肠组织中VIP表达明显提高( $P<0.05$ )。与模型组比较,戊己丸不同配伍方均可显著提高腹部抬起和弓背抬高阈值( $P<0.01$ ),明显减少结肠组织MC数量( $P<0.05$ )及5-HT,SP,SS和VIP的表达( $P<0.05$ )。分析戊己丸不同配伍方作用得出,戊己丸1#方在降低血液中5-HT,SP及SS方面不同程度地强于2#方,其中尤以对5-HT的影响的差别最为显著( $P<0.01$ );而2#方在降低结肠5-HT阳性表达上与1#方差别无明显统计学意义,在下调SP阳性表达上显著优于1#方;对于结肠SS阳性表达,其阳性表达的强度及范围显著小于1#方( $P<0.05$ )。结论:戊己丸不同配伍方均能调整IBS的胃肠激素紊乱,降低肠道敏感性;在整体作用上,1#方不同程度地强于2#方,而在肠道局部作用上,2#方显示出一定优势,而且1#方更长于对肠道动力学的影响,而2#方则对肠道感觉的影响更大一些。

**[关键词]** 戊己丸; 配伍; 肠易激综合征(IBS); 5-羟色胺(5-HT); 肥大细胞(MC); 脑肠肽

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)13-0001-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211301

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210510.1735.005.html>

**[网络出版日期]** 2021-5-11 10:09

### Therapeutic Efficacies of Wujiwan at Different Compatibilities in Treatment of Irritable Bowel Syndrome

WANG Ya-jie<sup>1</sup>, CUI Xi-he<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>1</sup>, LI Yu-jie<sup>1</sup>, YANG Qing<sup>1</sup>, WENG Xiao-gang<sup>1</sup>,  
DONG Yu<sup>2</sup>, CAI Wei-yan<sup>1</sup>, LI Qi<sup>1</sup>, ZHU Xiao-xin<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare the therapeutic efficacies of Wujiwan at two different compatibilities (No.1 and No.2) on irritable bowel syndrome (IBS) based on neuro-endocrine-immune network, and provide a theoretical basis for the treatment based on syndrome differentiation in traditional Chinese medicine (TCM). **Method:** The chronic animal model of IBS with visceral hypersensitivity was established by colon irritation via

**[收稿日期]** 20210305(011)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301012002);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZXKT20026)

**[第一作者]** 王娅杰,博士,副研究员,硕士生导师,从事中药药理学研究,E-mail:yjwang@icmm.ac.cn

**[通信作者]** \*朱晓新,研究员,博士生导师,从事中药药理学研究,E-mail:xxzhu@icmm.ac.cn

percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) in suckling rats. The animals were randomly divided into a control group, a model group, a dicetel group ( $0.01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), low- ( $0.335 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), medium- ( $0.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and high-dose ( $1.34 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) No. 1 Wujiwan groups, and low- ( $0.385 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), medium- ( $0.77 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and high-dose ( $1.54 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) No. 2 Wujiwan groups. The thresholds of abdominal elevation and bow back elevation were evaluated to detect the effect of Wujiwan on intestinal sensitivity of IBS. The density of mast cells (MC) in the colonic tissue of model rats was detected by the modified toluidine blue staining method. The concentrations/positive expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT), substance P (SP), somatostatin (SS), and vasoactive intestinal peptide (VIP) in the blood/colon tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry (IHC) assay. **Result:** There was no significant difference in body weight among different groups. Compared with the control group, the model group exhibited decreased thresholds of abdominal elevation and bow back elevation ( $P<0.01$ ), increased density of MCs in the colon tissue ( $P<0.05$ ), up-regulated levels of 5-HT, SP, and SS in the blood and colon tissue ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and elevated VIP level in the colon tissue ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, Wujiwan at different compatibilities could increase the thresholds of abdominal elevation and bow back elevation ( $P<0.01$ ), diminish the count of MC in the colon tissue ( $P<0.05$ ), and reduce the levels of 5-HT, SP, SS, and VIP ( $P<0.05$ ). As demonstrated by the comparison of No. 1 and No. 2 Wujiwan, No. 1 was superior to No. 2 in reducing the concentrations of 5-HT, SP, and SS in the blood, especially in 5-HT ( $P<0.01$ ). No significant difference between No. 1 and No. 2 in reducing 5-HT positive expression in the colon tissue was observed. Compared to the No. 1 Wujiwan, No. 2 significantly reduced SP expression, and the intensity and range of SS expression in the colon tissue in the No. 2 groups were smaller than those in the No. 1 groups ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Wujiwan at different compatibilities was capable of improving gastrointestinal hormone disorder of IBS to reduce intestinal sensitivity. In terms of systemic effect, No. 1 was superior to No. 2, while in terms of local effect, No. 2 was advantageous. No. 1 Wujiwan was superior to No. 2 in the effect on intestinal dynamics, while No. 2 had an advantageous effect on intestinal sensation over No. 1.

**[Key words]** Wujiwan; compatibility; irritable bowel syndrome (IBS); 5-hydroxytryptamine (5-HT); mast cell (MC); brain-gut peptides

肠易激综合征( IBS)是一种以腹部不适和排便习惯改变为特征的胃肠功能性疾病,属于胃肠功能紊乱性疾病,是指一组包括腹痛、腹胀、排便习惯和大便性状异常,持续存在或反复发作而未见形态学和生化异常改变的症候群<sup>[1]</sup>。IBS患病率为7%~25%,而在慢性疲劳综合征群体中可达92%,且常见于女性<sup>[2]</sup>。随着神经-免疫-内分泌网络的提出,人们逐渐认识到免疫系统和神经系统之间存在着直接的双向交流<sup>[3-5]</sup>,许多研究显示IBS患者结肠肥大细胞(MC)增多<sup>[6-7]</sup>,MC在内脏敏感过程中有重要作用<sup>[8]</sup>,而且电镜下MC与结肠感觉神经纤维有密切联系<sup>[9]</sup>,且此种联系与IBS患者的腹痛密切相关<sup>[10]</sup>,而且这些感觉纤维往往都含有P物质(SP)<sup>[11]</sup>,血管活性肠肽(VIP)<sup>[12]</sup>,5-羟色胺(5-HT)<sup>[13]</sup>等神经递质以调节肠道功能。

本课题采用载于2020年版《中华人民共和国药典》的戊己丸原方,由黄连、制吴茱萸和炒白芍按

6:1:6的配伍比例组成,具有泻肝和胃,降逆止呕功效,主要用于肝火犯胃、肝脾不和所致的腹痛、泄泻、呕吐吞酸、胃脘灼热疼痛、口苦嘈杂等证,临床上常用于治疗IBS,消化性溃疡等消化系统疾病<sup>[14]</sup>。本实验所选用的戊己丸两种配伍比例是在前期基于正交设计药效配伍比例筛选出的优选方,分别为黄连-制吴茱萸-炒白芍12:2:3;黄连-制吴茱萸-炒白芍12:1:12;对于这2种配伍本身而言,其共同点是黄连的量或比例均是最大的,这与以往文献报道黄连对胃肠道类疾病疗效的结果一致,其差别在于吴茱萸和白芍在方剂组成中的比例,本实验拟选用这2种配伍方,基于神经-免疫-内分泌网络,从肠道动力和感觉的角度探讨二方对IBS药效及作用机制,分析对比两种配伍的作用特点,以期阐明中医药辨证论治的科学内涵提供一定借鉴。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级,SD雌性乳大鼠,5日龄,体质量

10~12 g, 90只, 购自中国科学院遗传与发育生物学研究所动物中心, 合格证号 SCXK(京)2002-0006, 每10只与母鼠一起喂养, 食水自取, 自然光照, 所有动物实验均符合中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会要求。

**1.2 材料** 动脉成形术(PTCA)球囊, CorDis, 球囊规格(3.0 cm×20 cm), 8F导尿管(北京万东库利艾特医用制品有限公司); 大鼠5-HT酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国Biosource公司进口分装, 批号0509265); SP, 生长抑素(SS)放射免疫试剂盒(海军放免技术中心提供, 批号分别为051015, 05101); 大鼠5-HT抗体, SS抗体, VIP抗体(武汉博士德生物工程技术有限公司, 批号分别为ZP3049, BM4981, BA1407); SP抗体(英国Abcam公司, 批号ab14184); DAB显色剂, SP免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为ZL19018, SP9002); 甲苯胺蓝[国药集团化学有限公司(进口分装), 批号WC20050120]; 苏木素染液(武汉市皮诺飞生物科技有限公司, 批号PN0016)。

**1.3 仪器** ST-21型台式高速冷冻离心机(德国索福公司); SN695B型 $\gamma$ 测量仪(上海日环光电仪器有限公司); MK-3型全自动多功能酶标仪(Labsystems Dragon Wellscan公司); MIS-2000SP型彩色分析图像仪(3Y-International公司); H8-202 AN型显微镜(日本Nikon公司); Ver.4.0型3Y图像分析软件(美国Pixel Pro公司); DC100型图像分析仪及配套软件Qwin(美国Leica公司)。

**1.4 药物** 戊己丸提取物由黄连醇提取物、吴茱萸醇提取物、白芍水提取物组成, 由中日友好医院剂型室按照优选工艺分别进行提取, 真空干燥固体粉末, 得率分别为19.3%, 17.7%, 9.37%。将单味药按 $L_9(3_4)$ 正交表黄连、吴茱萸、白芍各有3个剂量水平交互配比成戊己丸9个不同配伍方, 通过前期药效筛选得到的以戊己丸方中黄连、吴茱萸及白芍比例分别为12:2:3, 12:1:12为受试的1#方和2#方。阳性药得舒特(法国苏威制药厂, 批号0018)。

## 2 方法

**2.1 IBS动物模型制作**<sup>[15]</sup> 待SD雌性乳鼠生长至8日龄, 90只, 分为正常组(10只)和模型组(80只), 以乳鼠结肠PTCA球囊刺激法制作慢性高敏感性IBS动物模型, 每天2次, 每次持续1 min, 2次之间间隔30 min, 每次压力均为60 mmHg(1 mmHg≈0.133 kPa), 持续2周, 每周测量体质量, 饲养至第21天后脱离母乳, 以后每5只1笼饲养。造模完成后

正常饲养大鼠待其生长至第7周时, 造模组再随机分为模型组, 得舒特组, 1#方高、中、低剂量组, 2#方高、中、低剂量组, 分别进行药物干预。

**2.2 给药方法** 按照2020年版《中华人民共和国药典》中规定戊己丸原方临床2倍量为中剂量, 依据提取物得率最终折算成大鼠剂量, 即1#方以 $0.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ( $2.824 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 按饮片量折算)为中剂量, 2#方以 $0.77 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ( $4.152 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 按饮片量折算)为中剂量, 加倍、减半分别为高、低剂量, 得舒特临床用量折算, 以 $0.01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药, 各药物均以蒸馏水配置,  $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 模型组与正常组给与等量蒸馏水。灌胃每天早上8:00开始, 持续8 d。

**2.3 行为学检测** 采取成年大鼠结肠扩张法, 先禁食18 h以上, 之后将成年大鼠固定于有机玻璃定做的大鼠固定器(20 cm×6 cm×9 cm)中, 以涂有液体石蜡的导尿管自肛门插入, 直至球囊末端距肛门2 cm, 用医用胶布将导尿管固定于大鼠尾巴根部, 球囊另一端与充有温生理盐水( $37\pm 0.5$ )℃的注射器相连, 待大鼠适应环境30 min后, 向导尿管注入生理盐水, 观察其腹部抬起(腹部距水平面0.2 cm)及弓背抬高(腹部距水平面1 cm)阈值。每只大鼠均测量3次, 每次持续10 s, 每次之间间隔30 min, 结果以均值计。

**2.4 取材及苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理变化** 第8周末, 结肠扩张结束1 h后, 腹腔注射乌拉坦 $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 麻醉, 取距肛门2 cm处结肠组织一块, 迅速置于4%多聚甲醛溶液中, 常规石蜡包埋, 病理切片, 片厚 $5 \mu\text{m}$ , 以APES处理后的防脱片捞片后, 于 $37^\circ\text{C}$ 烤箱中过夜, 行结肠HE染色。

**2.5 MC染色观察** 以甲苯胺兰染色法行结肠组织MC染色, 计算每张切片的MC密度时, 镜下随机选取结肠黏膜下层6个视野进行计数, 结果以均值计, 以个/高倍视野进行计数。

**2.6 血浆SP, SS含量及血清5-HT含量测定** 至第8周末, 各组大鼠麻醉后, 行腹主动脉取血, 分别按照大鼠5-HT ELISA试剂盒和SP, SS放射免疫试剂盒说明书要求完成测定。

**2.7 免疫组化检测结肠5-HT, SP, SS, VIP的表达** 对所得结肠组织进行常规免疫组化染色, 并应用计算机图像分析系统, 于染色后的结肠组织肌层随机选取3~5个视野, 以计算机相连的摄像系统拍照后, 用3Y图像分析软件测定阳性产物平均积分吸光度IA(代表阳性表达强度), 平均面积(代表阳性染色的分布及数量)及聚合IA值(IA值×平均面积),

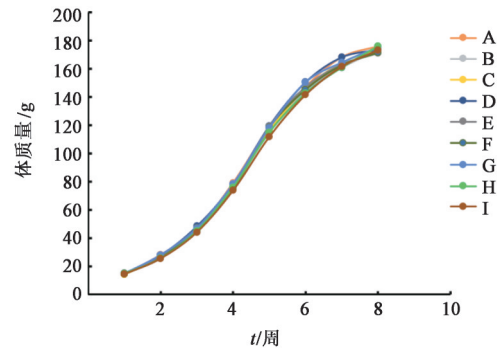
对结肠免疫反应阳性表达进行半定量分析。

**2.8 统计学方法** 采用SPSS 11.5软件统计数据,实验结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,以上结果均经过单因素方差处理后,行方差齐性检验,方差齐者以最小复极差LSD法作各组间比较,方差不齐者用Dunett's T3法统计, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 两组方对大鼠体质量和结肠的影响** 各组大鼠在各观察时间点体质量差异无统计学意义。见图1。各组切片均有轻度中性粒细胞浸润,未见明显水肿。见图2。

**3.2 两组方对大鼠腹部抬起及弓背抬高阈值影响** 与正常组比较,模型组大鼠腹部抬起及弓背抬高刺激阈值显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,1#,2#方各剂量组均可显著提高腹部抬起和弓背抬

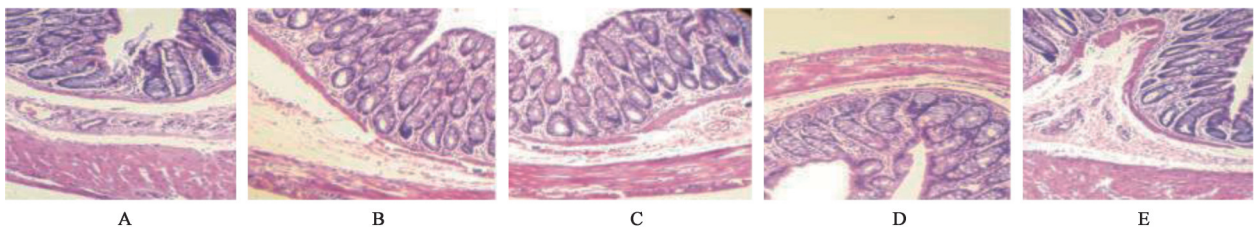


A. 正常组;B. 模型组;C. 得舒特组;D. 1#方高剂量组;E. 1#方中剂量组;F. 1#方低剂量组;G. 2#方高剂量组;H. 2#方中剂量组;I. 2#方低剂量组

图1 两组方对大鼠体质量随时间变化趋势的影响

Fig. 1 Effect of two prescriptions on change of body weight over time in rat

高刺激阈值( $P<0.01$ );两组方比较,1#方高剂量及低剂量组效果好于2#方同剂量组( $P<0.05$ )。见表1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 1#方高剂量组;D. 2#方高剂量组;E. 得舒特组(图3~4同)

图2 各组大鼠结肠HE染色(HE,  $\times 100$ )

Fig. 2 Colon HE staining results of rats in each group (HE,  $\times 100$ )

表1 两组方对大鼠腹部抬起及弓背抬高阈值的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	腹部抬起	弓背抬高
正常		$0.66\pm 0.02$	$0.85\pm 0.03$
模型		$0.41\pm 0.07^{1)}$	$0.60\pm 0.05^{1)}$
得舒特	0.01	$0.67\pm 0.02^{2)}$	$0.88\pm 0.05^{2)}$
1#方	1.33	$0.64\pm 0.06^{2,3,4)}$	$0.83\pm 0.03^{2,3,4)}$
	0.67	$0.55\pm 0.03^{2,3)}$	$0.74\pm 0.06^{2,3)}$
	0.33	$0.44\pm 0.05^{2,3,4)}$	$0.64\pm 0.08^{2,3,4)}$
2#方	1.53	$0.63\pm 0.06^{2,3)}$	$0.81\pm 0.03^{2,3)}$
	0.77	$0.54\pm 0.03^{2,3)}$	$0.74\pm 0.04^{2,3)}$
	0.38	$0.42\pm 0.08^{2,3)}$	$0.62\pm 0.02^{2,3)}$

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与得舒特组比较<sup>3)</sup> $P<0.01$ ;与2#同剂量比较<sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

**3.3 两组方对大鼠结肠组织MC密度的影响** 光镜下,MC被染成紫红色,胞核呈蓝色,散布于黏膜固有层、黏膜下层结缔组织内,或聚集成群,排列成行,细胞呈圆形梭形或形状不规则形。与正常组比较,模型组结肠中MC密度明显增加( $P<0.05$ );与模型组比较,1#,2#方高剂量组MC密度明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );两组方相比,1#方和2#方各剂量组均

差异无统计学意义。见图3,表2。

**3.4 两组方对血液中5-HT, SP, SS浓度的影响** 与正常组比较,模型组5-HT, SP, SS浓度明显上调( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,1#方高、中剂量组均可明显降低血清5-HT,血浆SP, SS浓度( $P<0.05, P<0.01$ ),低剂量组血清5-HT,血浆SP与模型组有明显差异性( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,2#方

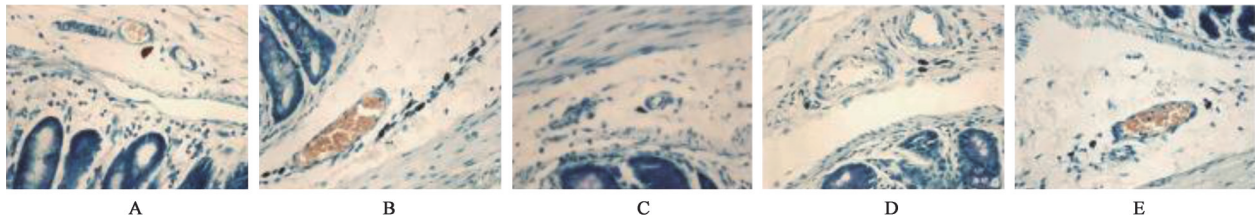


图3 两组方对结肠组织5-HT,SP,SS,VIP阳性表达参数的影响(MC,×200)

Fig. 3 Effect of two prescriptions on 5-HT, SP, SS, VIP positive expression parameters in colonic muscle layer of rats in each group (MC, ×200)

表2 两组方对各组大鼠MC密度值的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of two prescriptions on MC density in each group of rat ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MC密度值/个/高倍视野
正常		1.02±0.46
模型		3.42±0.97 <sup>1)</sup>
得舒特	0.01	0.92±0.24 <sup>3)</sup>
1#方	1.33	2.48±0.41 <sup>2,4)</sup>
	0.67	3.26±1.55 <sup>4)</sup>
	0.33	3.85±0.92 <sup>4)</sup>
2#方	1.53	2.10±0.49 <sup>3,4)</sup>
	0.77	2.71±0.60 <sup>4)</sup>
	0.38	3.79±1.25 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01;与得舒特比较<sup>4)</sup>P<0.01。

高剂量组血清5-HT,血浆SP,SS浓度显著降低(P<0.01),中剂量组明显降低血清5-HT,血浆SP,SS浓度(P<0.05,P<0.01)。见表3。

### 3.5 两组方对结肠组织5-HT,SP,SS,VIP各阳性

表达参数的影响 免疫组化阳性部位均在肌间神经丛胞浆,呈深棕黄色,与正常组比较,模型组结肠SS,SP,5-HT阳性表达IA值,阳性表达面积及聚合IA值,VIP阳性表达面积及聚合IA值显著升高(P<0.01);与模型组比较,1#方高剂量组明显降低结肠肌层5-HT,SS阳性表达IA值,5-HT,SS,VIP阳性表达面积及聚合IA值(P<0.05,P<0.01);中剂量组明显降低结肠肌层5-HT,SS,VIP阳性表达面积及聚合IA值;低剂量组结肠肌层5-HT,VIP阳性表达面积,5-HT,SS阳性表达聚合IA值(P<0.05,P<0.01)。与模型组比较,2#方高剂量组明显降低结肠肌层5-HT,SP阳性表达IA值(P<0.05,P<0.01),显著降低5-HT,SS阳性表达面积、聚合IA值,VIP阳性表达面积(P<0.01);中剂量组显著降低结肠肌层SP阳性表达IA值(P<0.01),明显降低结肠肌层5-HT,SS阳性表达面积、聚合IA值及VIP阳性表达参数面积(P<0.05);低剂量组明显降低结肠肌层5-HT阳性表达面积、聚合IA值,SS阳性表达面积(P<0.05)。见图4,表4~7。

表3 两组方对各组大鼠血清5-HT浓度及血浆SP,SS浓度的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of two prescriptions on serum 5-HT concentration and plasma SP, SS concentration in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ ) ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	5-HT	SP	SS
正常		31.34±2.48	218.32±73.71	101.33±65.60
模型		38.85±2.57 <sup>2)</sup>	341.48±133.90 <sup>1)</sup>	229.50±92.13 <sup>2)</sup>
得舒特	0.01	28.62±5.73 <sup>4)</sup>	547.45±141.27	125.23±35.66 <sup>4)</sup>
1#方	1.33	16.86±1.19 <sup>4,5,7)</sup>	175.83±84.47 <sup>4,6)</sup>	114.18±34.02 <sup>4)</sup>
	0.67	26.17±1.53 <sup>4,7)</sup>	198.18±44.38 <sup>4,6)</sup>	142.30±55.57 <sup>3)</sup>
	0.33	30.02±1.85 <sup>4,7)</sup>	207.32±61.02 <sup>3,6)</sup>	160.56±79.85
2#方	1.53	32.72±1.78 <sup>4,5)</sup>	192.36±37.42 <sup>4,6)</sup>	116.35±59.78 <sup>4)</sup>
	0.77	34.16±1.33 <sup>4,5)</sup>	225.93±98.67 <sup>3,6)</sup>	152.88±82.79 <sup>3)</sup>
	0.38	38.77±1.43 <sup>2,5)</sup>	249.08±163.56 <sup>6)</sup>	160.95±71.97

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<0.01;与得舒特组比较<sup>5)</sup>P<0.05,<sup>6)</sup>P<0.01;与2#同剂量组比较<sup>7)</sup>P<0.01。

3.6 两组方比较 1#方各剂量组血清5-HT浓度显著低于2#方同剂量组(P<0.01);血浆SP,SS浓度均差异无统计学意义;对于5-HT阳性表达各参数值,

与2#方比较,1#方各剂量组均差异无统计学意义;对于SP阳性表达IA值,1#方高、中剂量组均明显高于与2#方同剂量组(P<0.05),对于面积与聚合IA

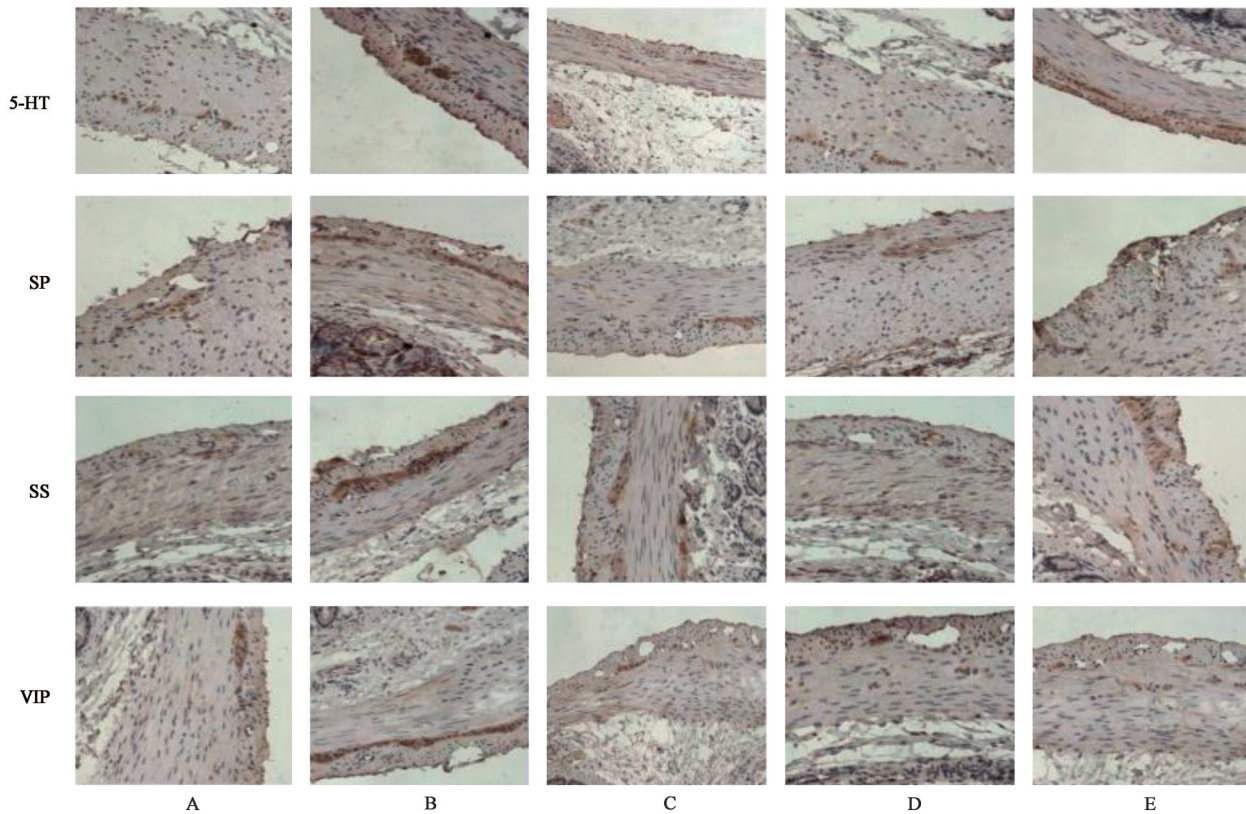


图4 两组方对结肠组织5-HT,SP,SS,VIP阳性表达参数的影响(免疫组化,×200)

Fig. 4 Effect of two prescriptions on 5-HT, SP, SS, VIP positive expression parameters in colonic muscle layer of rats in each group (IHC, ×200)

表4 两组方对各组大鼠结肠肌层5-HT阳性表达参数的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of two prescriptions on 5-HT positive expression parameters in colonic muscle layer of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IA	面积/×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>	聚合IA/×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>
正常		0.12±0.03	42.76±10.96	5.25±2.21
模型		0.16±0.04 <sup>2)</sup>	66.29±27.13 <sup>2)</sup>	10.06±3.27 <sup>2)</sup>
得舒特	0.01	0.13±0.03 <sup>3)</sup>	42.33±16.8 <sup>4)</sup>	5.22±0.40 <sup>4)</sup>
1#方	1.33	0.12±0.02 <sup>3)</sup>	31.07±4.86 <sup>4)</sup>	3.89±0.90 <sup>4)</sup>
	0.67	0.15±0.05 <sup>5)</sup>	32.16±24.73 <sup>4)</sup>	4.64±3.03 <sup>4)</sup>
	0.33	0.16±0.02 <sup>5)</sup>	42.37±20.74 <sup>4)</sup>	5.71±2.88 <sup>4)</sup>
2#方	1.53	0.13±0.01 <sup>3)</sup>	42.44±17.46 <sup>4)</sup>	5.49±0.09 <sup>4)</sup>
	0.77	0.15±0.02	45.72±11.76 <sup>3)</sup>	6.69±1.87 <sup>4)</sup>
	0.38	0.15±0.01 <sup>5)</sup>	47.70±8.30 <sup>3)</sup>	7.25±1.33 <sup>4)</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<0.01;与得舒特组比较<sup>5)</sup>P<0.05;与2#方同剂量组比较<sup>6)</sup>P<0.05,<sup>7)</sup>P<0.01(表5~7同)。

值,两配伍比例各剂量组均差异无统计学意义;对于SS阳性表达IA值,1#方低剂量组明显低于2#方低剂量组(P<0.05);对于面积,1#中剂量组明显高于2#中剂量组(P<0.05);而对于聚合IA值,两配伍方各剂量均差异无统计学意义;对于结肠肌层VIP阳性表达IA值,1#方各剂量组与2#方同剂量组差异无统计学意义,就VIP阳性表达面积与聚合IA值而言,1#方

小剂量组均明显低于2#方低剂量组(P<0.05)。

#### 4 讨论

IBS作为一种以肠道运动功能改变和内脏敏感性增高为特征的功能性肠病(FBD),应激是其重要的发病因素<sup>[16-17]</sup>。MC与肠道分泌和通透性、神经免疫相互作用、内脏感觉和肠道蠕动等密切相关,许多研究已经证实了肠易激综合征中肠MC发育、

表 5 两组方对各组大鼠结肠肌层 SP 阳性表达参数的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of two prescriptions on SP positive expression parameters in colonic muscle layer of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IA	面积/×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>	聚合 IA/×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>
正常		0.17±0.01	23.44±10.53	4.22±2.04
模型		0.20±0.01 <sup>2)</sup>	49.74±21.37 <sup>2)</sup>	10.19±5.36 <sup>2)</sup>
得舒特	0.01	0.19±0.01	30.60±12.69 <sup>3)</sup>	5.61±2.49 <sup>3)</sup>
1#方	1.33	0.19±0.01 <sup>6)</sup>	38.43±14.36	7.05±2.72
	0.67	0.20±0.02 <sup>7)</sup>	43.05±17.70	8.92±4.07
	0.33	0.22±0.04 <sup>5)</sup>	44.95±19.53	9.56±5.07 <sup>5)</sup>
2#方	1.53	0.17±0.02 <sup>4)</sup>	41.19±8.14	6.77±1.18
	0.77	0.17±0.01 <sup>4)</sup>	41.26±11.61	7.13±2.54
	0.38	0.20±0.02	41.88±6.33	8.67±2.34

表 6 两组方对各组大鼠结肠肌层 SS 阳性表达参数影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 6 Effect of two prescriptions on VIP positive expression parameters in colonic muscle layer of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IA	面积/×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>	聚合 IA/×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>
正常		0.05±0.01	4.08±1.57	4.29±2.03
模型		0.07±0.02 <sup>2)</sup>	10.48±3.60 <sup>2)</sup>	10.19±5.36 <sup>2)</sup>
得舒特	0.01	0.07±0.03	4.93±0.72 <sup>4)</sup>	5.61±2.49 <sup>4)</sup>
1#方	1.33	0.05±0.01 <sup>4)</sup>	5.33±2.07 <sup>4)</sup>	0.28±0.16 <sup>4)</sup>
	0.67	0.07±0.02	8.24±1.03 <sup>3,5,6)</sup>	0.55±0.16 <sup>3)</sup>
	0.33	0.07±0.02 <sup>6)</sup>	8.53±1.26 <sup>5)</sup>	0.56±0.01 <sup>3,5)</sup>
2#方	1.53	0.06±0.01	5.63±2.38 <sup>4)</sup>	0.35±0.18 <sup>4)</sup>
	0.77	0.08±0.02	6.09±0.87 <sup>4)</sup>	0.50±0.20 <sup>4)</sup>
	0.38	0.09±0.03	6.97±1.04 <sup>4)</sup>	0.64±0.26 <sup>5)</sup>

表 7 两组方对各组大鼠结肠肌层 VIP 阳性表达参数影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 7 Effect of two prescriptions on VIP positive expression parameters in colonic muscle layer of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IA	面积/×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>	聚合 IA/×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>
正常		0.06±0.02	4.08±1.57	0.34±0.17
模型		0.08±0.01	10.48±3.60 <sup>2)</sup>	0.80±0.20 <sup>2)</sup>
得舒特	0.01	0.08±0.03	4.93±0.72 <sup>3)</sup>	0.59±0.20
1#方	1.33	0.06±0.02	6.14±1.60 <sup>4)</sup>	0.34±0.07 <sup>4,5)</sup>
	0.67	0.07±0.02	6.28±1.27 <sup>4)</sup>	0.43±0.12 <sup>4)</sup>
	0.33	0.09±0.04	6.74±1.50 <sup>4,6)</sup>	0.60±0.20 <sup>6)</sup>
2#方	1.53	0.08±0.03	6.43±0.48 <sup>4)</sup>	0.54±0.21
	0.77	0.09±0.03	6.96±2.50 <sup>4)</sup>	0.61±0.32
	0.38	0.10±0.03	9.33±1.46	0.90±0.20 <sup>5)</sup>

浸润、活化和脱颗粒的机制,及其在黏膜屏障破坏、黏膜免疫失调、内脏过敏、运动障碍以及局部和中枢应激过程中的作用,MC的激活和介质释放有助于IBS主要症状的发展,如腹痛、便秘和腹泻等<sup>[18]</sup>;5-HT是脑肠轴的重要递质,其信号的改变可通过外周及中枢途径调节肠道的运动、分泌和感觉,导致

便秘、腹泻、或内脏敏感性的变化等,与IBS患者肠道内外的症状变化有很大关系<sup>[19]</sup>;SP是一个广泛分布于中枢及周围神经系统中的脑肠肽,它一方面参与痛觉信息的传递,另一方面通过与其高亲和力受体结合对靶细胞发挥生物效应,调节胃肠道动力、腺体的分泌、血管渗透性、疼痛刺激的敏感性等与

IBS发生和发展关系密切的因素<sup>[20]</sup>;SS是一种抑制多种激素释放的调节肽,对胃的运动以及胃、肠、胆、胰内、外分泌功能具有明显的抑制作用,其分泌、释放异常可能与IBS的发生有某种内在的联系<sup>[21]</sup>;VIP是一种具有强烈的扩张周围及内脏血管的作用的胃肠神经肽,其在肠道同时起胃肠激素和神经递质的作用,可使胃肠舒张及胃肠括约肌舒张,刺激胰液和肠液分泌等,VIP浓度的异常变化可能与IBS的产生和发展关系密切<sup>[22]</sup>。因此,IBS的发病是一个复杂的过程,涉及多种靶点和调节通路的改变。戊己丸在中医辨证施治思想指导下组方,能够通过调节整体来改善局部病态,发挥疏肝解郁、和中止泻的功效,本实验采用提取物代替散剂进行研究,其药效作用物质基础相对更为明确一些,而且根据前期药效学实验发现,戊己丸提取物基本保持了原方戊己丸散剂的功效,可以替代使用。综合各实验指标,戊己丸提取物可降低血清中5-HT,血浆SP,SS浓度,调整IBS紊乱的胃肠激素;通过钙离子拮抗作用,稳定MC细胞膜,通过对降低血浆SP及结肠SP阳性表达减少其活化及脱颗粒现象,从而使其活性物质释放减少,使肠组织中MC密度显著降低;通过对IBS紊乱的神经-内分泌-免疫网络进行整体的调节,使机体从“非平衡状态”回归到“平衡状态”,而这一点恰好与IBS的发病机制相一致,可使IBS患者紊乱的神经-内分泌-免疫网络恢复正常,与得舒特比较,充分体现了中医药的作用特点与优势。

在前期的离体肠管实验中,本课题组分别观察了戊己丸提取物对乙酰胆碱(ACh)和肾上腺素所致不同状态离体肠管运动的作用,发现戊己丸能显著抑制ACh所致的肠管运动亢进,两配伍随剂量不同,还可在一定程度上兴奋抑制的肠管<sup>[23]</sup>,而在整体实验中显示,戊己丸提取物可使IBS动物模型结肠痛阈提高,降低内脏高敏感性,结肠肌层5-HT,SS,VIP阳性表达显著下调,2#方还可使结肠SP表达明显下调,说明在对肠道的局部作用中,戊己丸对肠道交感和副交感神经有一定的调整作用,可使肠道局部的紊乱的神经-免疫-内分泌网络趋于平衡,而且由此推测,戊己丸提取物可能就是通过对胃肠激素的整合作用,直接或间接地减少ACh的释放,同时对M受体有一定阻断作用,从而发挥其抑制肠运动亢进的作用。

鉴于以往学者们的研究,本实验也观察了戊己丸不同配伍在作用机制上的异同,结果显示,对于

整体实验,戊己丸提取物1#方,在降低血清5-HT,血浆SP,SS方面不同程度地强于2#方,其中尤以对5-HT的影响的差别最为显著;而2#方在降低结肠5-HT阳性表达上与1#方无明显差别;在下调SP阳性表达上显著优于1#方;对于结肠SS阳性表达,其阳性表达的数量及范围小与1#方,综上所述可以看出,虽然在对于的全身作用上,1#方不同程度地强于2#方,但是在肠道局部作用上,2#方显示出一定优势,而且在1#方更长于对肠道动力学的影响,而2#方则对肠道感觉的影响更大一些,以上这些都是由于两方配伍不同所致。在本实验,戊己丸1#方中黄连-吴茱萸-白芍为12:2:3,2#方为12:1:12,其中的差别就在于吴茱萸和白芍的用量上,从配伍比例上看,吴茱萸1#较2#为大,白芍2#方较1#方为大,结合课题组药代动力学研究结果,可能在戊己丸提取物中吴茱萸提取物吸收入血较多,中枢镇痛作用及整体作用相对较强,故中医学吴茱萸可用于寒凝湿滞诸疼痛;相比之下,白芍可能肠道局部作用更为突出,中医学上具有缓中止痛,主治泻痢腹痛、胸胁疼痛,可见配伍比例的不同使得同一方剂在同一动物模型上体现“整体有效”上的“偏重性”。

本实验对戊己丸治疗IBS的药效作用及机制进行了探索,而且对中药配伍的科学性研究做了一些有益的尝试,试图为中药配伍乃至中药现代化的研究提供一些有意义的线索和依据,但其中的实验结论和作用机制的推想仍需要更加深入的具体的工作加以补充和阐释。中药有效组分的作用依然具有多组分、多靶点、多环节的特点,这恰是其对于病症整体调节的物质基础,而且由于配伍比例的不同,在总体有效的基础上显示出药效作用的偏重性,这是符合中医配伍理论的,更是中医辨证论治又一良好佐证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 张鸣鸣,姜敏. 肠易激综合征发病机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(24):2484-2490.
- [2] 董星,黄适,李赟,等. 肠易激综合征研究进展[J]. 西南国防医药,2020,30(1):75-77.
- [3] 徐翰南,蔡征真,王云,等. 肠道菌群对肠道神经-内分泌-免疫系统的影响及其病理生理意义[J]. 生理学报,2020,72(3):347-360.
- [4] 陈家旭,杨维益. 神经-内分泌-免疫网络研究概况及其与中医肝脏关系的探讨[J]. 北京中医药大学学报,1995,18(4):7-11.

- [ 5 ] WANG H X, WANG Y P. Gut Microbiota-brain axis [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129(19):2373-2380.
- [ 6 ] KRAMMER L, SOWA A S, LORENTZ A. Mast cells in irritable bowel syndrome: a systematic review [J]. *J Gastrointestin Liver Dis*, 2019, 28(4):463-472.
- [ 7 ] BASHASHATI M, MOOSSAVI S, CREMON C, et al. Colonic immune cells in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2018, doi: 10.1111/nmo.13192.
- [ 8 ] YU D, ZHU J, ZHU M, et al. Inhibition of mast cell degranulation relieves visceral hypersensitivity induced by pancreatic carcinoma in mice [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 69(2):235-245.
- [ 9 ] DOTHEL G, BARBARO M R, BOUDIN H, et al. Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(5):1002-1011.
- [ 10 ] ROLLAND-FOURCADE C, DENADAI-SOUZA A, CIRILLO C, et al. Epithelial expression and function of trypsin-3 in irritable bowel syndrome [J]. *Gut*, 2017, 66(10):1767-1778.
- [ 11 ] 董孝国. P物质研究进展 [J]. *商丘师范学院学报*, 2012, 28(6):86-89.
- [ 12 ] 李林, 茹立强. P物质、血管活性肠肽和乙酰胆碱能神经在大鼠肠道内的分布及其关系 [J]. *神经解剖学杂志*, 2009, 25(6):663-666.
- [ 13 ] 李锋. 5-羟色胺在功能性胃肠病内脏高敏感中的作用 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(25):3267-3269.
- [ 14 ] 张建锋, 刘文, 侯晓杰, 等. 戊己丸的现代研究进展 [J]. *中医学报*, 2017, 32(1):96-98.
- [ 15 ] AL-CHEAR 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
- [ 16 ] ZHU S, MIN L, GUO Q, et al. Transcriptome and methylome profiling in a rat model of irritable bowel syndrome induced by stress [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5):2641-2649.
- [ 17 ] ENCK P, AZIZ Q, BARBARA G, et al. Irritable bowel syndrome [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, doi: 10.1007/BF01395503.
- [ 18 ] LEE K N, LEE O Y. The role of mast cells in irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, doi:10.1155/2016/2031480.
- [ 19 ] YU Y C, LI J, ZHANG M, et al. Resveratrol improves brain-gut axis by regulation of 5-HT-dependent signaling in the rat model of irritable bowel syndrome [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13:30.
- [ 20 ] SOHN W, LEE O Y, LEE S P, et al. Mast cell number, substance P and vasoactive intestinal peptide in irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(1):43-51.
- [ 21 ] GONKOWSKI S, RYTEL L. Somatostatin as an active substance in the mammalian enteric nervous system [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4461.
- [ 22 ] SOHN W, LEE O Y, LEE S P, et al. Mast cell number, substance P and vasoactive intestinal peptide in irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(1):43-51.
- [ 23 ] 王娅杰, 董宇, 朱晓新. 戊己丸提取物不同配伍方对豚鼠离体结肠运动影响的实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(20):2161-2165.

[责任编辑 周冰冰]