

运脾柔肝方对便秘型肠易激综合征大鼠 5-HT、VIP 及 SP 影响的实验研究

孙建梅^{1,2}, 顾立梅^{1,3}, 李慧^{1,3}, 华秋雯¹, 田耀洲^{1,3*}

(1.南京中医药大学第三临床医学院,江苏 南京 210028;2.沧州市中心医院,河北 沧州 061000;3.江苏省中医药研究院,江苏 南京 210028)

摘要:目的 通过观察运脾柔肝方对便秘型肠易激综合征(C-IBS)模型大鼠血清、肠组织 5-羟色胺(5-HT)、血管活性肠肽(VIP)、P 物质(SP)的影响,探讨运脾柔肝方对 C-IBS 模型大鼠的可能作用机制。**方法** 将 42 只 Wistar 大鼠,随机选取 6 只作为正常组,剩余 36 只大鼠采用冰水灌胃法造模 14 d,评价模型,随机选取造模成功的 30 只大鼠,采用随机数字法分为运脾柔肝方中药低、中、高剂量组、莫沙必利组、模型对照组,每组 6 只。运脾柔肝方低、中、高剂量组分别以 12.2、24.4、48.8 g/(kg·d)的给药剂量灌胃,莫沙必利组以莫沙必利混悬液 1.35 mg/(kg·d)灌胃,模型对照组及空白组给予等量蒸馏水灌胃。14 d 后观察各组大鼠一般情况,并检测各组大鼠血清 5-HT、VIP、SP 水平和肠组织 5-HT、VIP 的含量。**结果** 与空白组相比,模型对照组血清、结肠组织免疫组显 5-HT、VIP 的表达水平较正常组显著升高($P<0.01$),而血清 SP 的表达水平则明显降低($P<0.05$),不同剂量运脾柔肝方均可显著降低 C-IBS 模型大鼠血清 5-HT、VIP 的表达水平($P<0.01$),明显升高大鼠血清 SP 水平($P<0.05$),免疫组化结果显示各组均能明显降低 5-HT 在肠组织中的表达($P<0.05$),显著降低 VIP 的表达($P<0.01$)。**结论** 运脾柔肝方可显著改善 C-IBS 模型大鼠便秘症状,可能是通过降低 5-HT、VIP 和升高 SP 的表达水平,从而调节肠道功能,发挥治疗 C-IBS 的作用。

关键词:运脾柔肝方;便秘型肠易激综合征;5-羟色胺;血管活性肠肽;P 物质
中图分类号:R285 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2017)05-0524-05
DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0524

Effects of Experimental Studies Yunpi Rougan Fang on 5-HT, VIP and SP in Constipation-predominant Irritable Bowel Syndrome Rats

SUN Jian-mei^{1,2}, GU Li-mei^{1,3}, LI Hui^{1,3}, HUA Qiu-wen¹, TIAN Yao-zhou^{1,3*}

(1. The Third Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210028, China; 2. Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, 061000, China; 3. Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210028, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of Yunpi Rougan Fang on serum and colon tissue serum serotonin(5-HT), vasoactive peptide(VIP) and substance P(SP) in constipation-predominant irritable bowel syndrome rats, to explore its possible mechanism and relevance. **METHODS** 42 SPF Wistar rats, Six rats were randomly selected as normal group, the remaining 36 rats were modeled by ice water for 14 d, evaluation model, 30 rats were randomly selected and randomly divided into Chinese medicine high, medium and low dose group, western medicine group, model control group, each group had 6 rats. The Chinese medicine low, middle and high dose groups were treated with 12.2, 24.4, 48.8 g/(kg·d), Mosapride group with moxapril suspension 1.35 mg/(kg·d) gavage, model control group and blank group were given equal amount of distilled water to fill the stomach. After 14 d, the levels of 5-HT, VIP and SP in the serum and the levels of 5-HT and VIP in the colon tissue were measured. **RESULTS** Compared with the blank group, the expression of 5-HT and VIP in serum and colon tissue immunization in the model control group was increased significantly($P<0.01$), the expression of SP in serum was decreased ($P<0.05$). Different doses can decrease the levels of serum 5-HT and VIP in C-IBS model rats ($P<0.01$), significantly increased the serum SP level ($P<0.05$). Immunohistochemical results showed that the expression of 5-HT in colon tissue was significantly decreased ($P<0.05$), and the expression of VIP was significantly decreased ($P<0.01$). Although the expression of

收稿日期:2017-03-11;修稿日期:2017-07-22
基金项目:江苏省中医药局科技项目(ZD201507);江苏省科技项目(BK20151046)
作者简介:孙建梅(1990—),女,河北保定人,南京中医药大学 2014 级硕士研究生。* 通信作者: tianyaozhou1960@163.com

each treatment group no significant difference ($P > 0.05$), from the numerical changes, Yunpi Rougan Fang was superior to mosapride and showed dose-dependency. **CONCLUSION** Yunpi Rougan Fang can obviously improve the symptoms of constipation in C-IBS model rats, by reducing the expression of 5-HT and VIP, improving the expression of SP to regulate intestinal function, which plays a therapeutic role in C-IBS.

KEY WORDS: Yunpi Rougan Fang; constipation-predominant irritable bowel syndrome; 5-HT; VIP; SP

便秘型肠易激综合征 (Constipation-predominant irritable bowel syndrome, C-IBS) 是一种以反复发作的腹痛、腹部不适、大便排出困难或排便间隔时间延长为临床特征,且缺乏特异性生化或组织学异常的功能性胃肠病^[1-2]。目前普遍认为 C-IBS 的发生发展机制尚不完全清楚,且极具个体化特征,其治疗主要以改善症状及提高生活质量为主,至今尚缺乏理想的治愈药物,而中医药以其“辨证论治”的个体化治疗理念,为 C-IBS 的个体化治疗提供了新的有效途径^[3]。运脾柔肝方是南京中医药大学田耀洲教授在长期临床治疗 C-IBS 实践中总结出的有效方剂,临床治疗 C-IBS 疗效满意^[4]。为探讨运脾柔肝方对 C-IBS 疗效作用的可能机制,通过干预冰水灌胃法建立的 C-IBS 大鼠模型,观察其对 C-IBS 模型大鼠 5-羟色胺 (5-HT)、血管活性肠肽 (VIP)、P 物质 (SP) 的影响,并报告如下。

1 材料

1.1 实验动物

成年 SPF 级健康 Wistar 大鼠 42 只,雌雄各半,体质量 (180 ± 20) g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002,饲养于江苏省中医药研究院 SPF 级动物实验中心,空调下架式分笼饲养,每笼 6 只,共计 7 笼,环境温度 (23 ± 3) °C,湿度 (55 ± 5) %,标准颗粒饲料饲养。

1.2 实验药物

运脾柔肝方由白茯苓 10 g,生白术 30 g,当归 10 g,白芍 10 g,党参 10 g,黄芪 10 g,决明子 15 g,莱菔子 15 g,枳实 10 g,厚朴 10 g,生甘草 6 g 组成,药物由南京中医药大学附属中西医结合医院中药房提供。枸橼酸莫沙必利片,5 mg/片,苏州住友制药有限公司生产,批号:3059C。

1.3 实验试剂

甲苯胺蓝,南京群相生物科技有限公司;5-HT、VIP、SP ELISA 试剂盒,南京建成生物工程研究所;5-HT、VIP 免疫组化试剂盒,南京群相生物科技有限公司;苏木素染液、伊红染液,武汉博士德生物工程有限公司;二甲苯,杭州中国巨化集团公司试剂

厂;0.9% NaCl 注射液,四川科伦药业股份有限公司。

1.4 仪器与耗材

RV10 旋转蒸发仪,德国 IKA 集团;三用恒温水箱,美国 Cole-Parmer 公司;L-600 离心机,湖南湘仪集团;5417R 低温离心机,德国 eppendorf 公司;BSD-272WBCS 冰箱,青岛海尔股份有限公司;—86 °C 超低温冰箱,美国 Thermo Scientific 公司;Leica RM2245 石蜡切片机,北京科誉兴业科技发展有限公司;CB-8D 石蜡包埋机,湖北定源医用材料有限责任公司;CKX41 倒置生物显微镜,日本 Olympus 公司;全波长酶标仪,美国 Thermo 公司;31051111W 组织包埋盒,江苏世泰实验器材有限公司;10127105P 病理级显微镜载玻片,江苏世泰实验器材有限公司;高品质显微镜盖玻片,江苏世泰实验器材有限公司;促凝管,美国 BD 公司;EP 管,美国 BD 公司。

2 方法

2.1 分组法与造模方法

随机选取 6 只大鼠作为正常组,标准颗粒饲料饲养,正常饮水。根据文献造模方法^[5],将剩余的 36 只大鼠采用冰水灌胃法造模,为消除生物节律的影响,每天上午 8:20 予 0~4 °C 生理盐水灌胃,每日 1 次,2 mL/只,共 14 d。通过计算粪便颗粒计数和粪便含水量等对模型进行评价,造模成功后,随机选取 30 只模型成功大鼠,采用随机数字法分为模型组、莫沙必利组、运脾柔肝方低剂量组、中剂量组和高剂量组,并对各组大鼠体质量采用 SPSS19.0 以单因素方差分析法得出 $P > 0.05$,各组大鼠体质量间差异没有统计学意义,具有可比性。

2.2 干预方法

根据徐淑云人与动物间按体表面积折算的等效剂量换算法^[6],大鼠等效剂量换算系数为 0.018,运脾柔肝方低、中、高剂量组分别以 12.2、24.4、48.8 g/(kg·d) 的给药剂量灌胃,莫沙必利组以莫沙必利混悬液 1.35 mg/(kg·d) 灌胃,空白组和模型对照组给予等容积的蒸馏水灌胃,每天上午 8:20 灌胃 1

次,连续灌胃给药 2 周。记录大鼠灌胃后 24 h 的粪便粒数和含水量。

2.3 标本制备与采集

大鼠灌胃治疗 14 d 后,禁食 24 h,不限水,以 10%水合氯醛予腹腔注射麻醉,开腹,腹主动脉取血后,迅速取出各组大鼠距肛门 6 cm 的结肠 2.0 cm,10%甲醛液固定约 24 h。取血后于抗凝管储存,用离心机离心 5 min(3 500 r/min),取出上清液储存于 -80 °C 冰箱保存备用。

2.4 观察指标与检测方法

2.4.1 大鼠的一般情况观察 精神、毛色、活动度、粪便数量及含水量。

2.4.2 血清 5-HT、VIP、SP 的测定 将储存在 -80 °C 的大鼠上清液取出,室温解冻,ELISA 法检测灌胃结束后各组大鼠血清中 5-HT、VIP、SP 的含量。操作严格按照说明书进行。

2.4.3 HE 染色观察大鼠结肠组织 大鼠结肠组织采用苏木素-伊红(HE)染色,将石蜡标本切成厚度约 2 μm 的连续切片,每例每部位均留 3 张,染色后应用光学显微镜,观察大鼠结肠组织的结构和形态。

表 1 运脾柔肝方对大鼠血清 5-HT、VIP、SP 含量影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	5-HT	VIP	SP
空白组	6	249.71±28.91	81.81±25.79	52.08±8.10
模型组	6	326.30±49.23*	132.26±15.31*	35.24±5.60*
莫沙必利组	6	210.10±20.59##	70.77±23.58##	76.89±16.41#
低剂量组	6	212.36±18.17##	86.22±12.31##	77.00±17.96#
中剂量组	6	221.86±25.65##	79.37±13.06##	66.73±15.92#
高剂量组	6	202.87±26.67##	74.96±14.26##	80.39±18.72#

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,与模型对照组比较,## $P < 0.05$,# $P < 0.01$ 。

3.3 HE 染色结肠组织观察

肉眼观察:各组大鼠结肠组织管壁结构完整,与周围组织无黏连,肠壁光滑,未见溃疡及肿物形成,无明显肠道黏膜充血、水肿及点片状糜烂形成。

光镜观察:大鼠黏膜病理显示黏膜层腺体排列整齐,结构完整,黏膜未见明显充血、水肿,无点片状糜烂及溃疡,无明显炎性细胞浸润,镜下表现与空白组接近;模型组大鼠黏膜病理显示黏膜腺体排列欠整齐,且肌层有断裂,黏膜层可见少量炎症细胞浸润,固有层可见轻度血管充血、水肿,与空白组差异较大。见图 1。

2.4.4 结肠组织 5-HT、VIP 的测定 将结肠组织从 10%中性甲醛液内取出,常规脱水、石蜡包埋、切片。用免疫组化法进行结肠组织 5-HT、VIP 含量的测定(具体按照免疫组化说明书步骤进行)。应用 Image-ProPlus6.0 专业图像分析系统,选取阳性细胞表达的积分光密度、平均光密度等项指标对图片进行半定量分析^[7]。

2.5 统计学方法

采用统计软件 SPSS 19.0 进行统计分析。计数资料 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 一般情况观察

给药结束后,各治疗组大鼠背毛光泽,精神活跃,进食量多,大便量多、含水量多、粪质软,组间差异不明显,与空白组接近;模型组大鼠背毛无光泽,精神状态差,倦卧萎靡,进食少,大便量少、含水量少、粪质干硬。

3.2 大鼠血清 5-HT、VIP、SP 含量变化

结果见表 1。

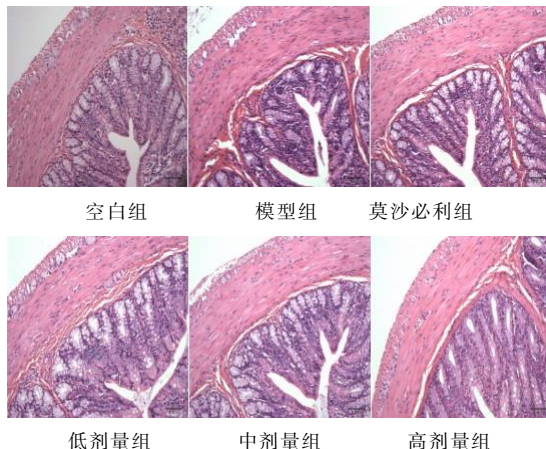


图 1 大鼠结肠组织黏膜 HE 染色($\times 200$)

3.4 肠组织 5-HT、VIP 含量测定

光镜下观察结肠组织中 5-HT、VIP 阳性细胞主要集中于肌层神经丛,黏膜上皮层、腺体,黏膜层阳

性细胞排列呈腺管样,肠肌间神经阳性细胞呈梭状、团状,沿肌束分布,胞浆呈淡黄色、棕黄色至褐色着色。中药组、莫沙必利组 5-HT、VIP 阳性细胞胞浆多着色呈淡黄色、棕黄色,与空白组接近,模型组 5-HT、VIP 阳性细胞胞浆呈较深的着色,胞浆多呈棕黄色、褐色染色,各组阳性细胞分布未见明显差异,如图 2~3,表 2 所示。

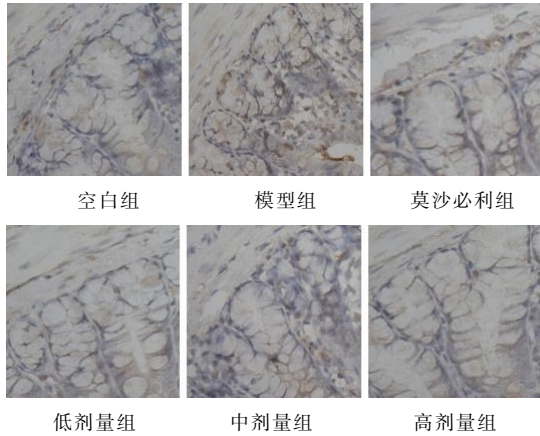


图 2 大鼠肠组织黏膜 5-HT 免疫组化的表达(×400)

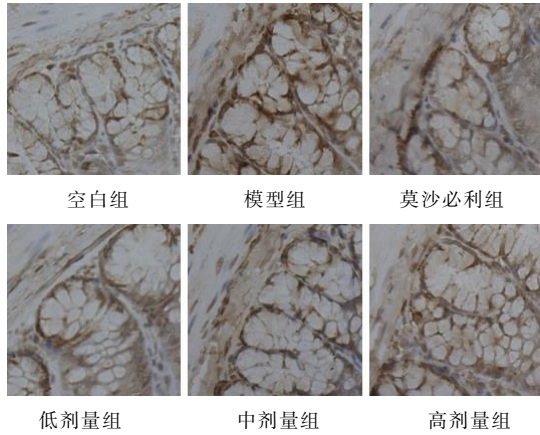


图 3 大鼠肠组织黏膜 VIP 免疫组化的表达(×400)

表 2 运脾柔肝方对结肠组织 5-HT、VIP 的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	5-HT	VIP
空白组	6	0.28±0.03	0.34±0.03
模型组	6	0.34±0.02*	0.40±0.01*
莫沙必利组	6	0.31±0.02#	0.34±0.02##
低剂量组	6	0.30±0.02#	0.34±0.03##
中剂量组	6	0.31±0.02#	0.33±0.03##
高剂量组	6	0.28±0.02#	0.34±0.03##

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

4 讨论

C-IBS 的病因和发病机制尚未完全阐明,目前普遍认为其发生发展是一个多因素参与的复杂过程。近年来,随着对 C-IBS 研究的不断深入和神经胃肠

病学概念的提出及应用,有研究显示本病可能与神经内分泌调节和传递介质及炎性介质释放失调或感觉神经末梢对这些介质的敏感性等异常导致肠神经系统紊乱而影响胃肠运动功能和敏感性有关,并提出“脑-肠轴”的概念,而这些神经-内分泌递质在 C-IBS 的发生发展中起着重要的桥梁和调控功能的作用。5-HT 是胃肠道的关键神经递质之一,在肠道的分泌、蠕动和感知中起着重要作用^[8]。研究显示,5-HT 的增加,既可以作用其相应受体,引起了患者的肠道感知、运动及分泌的改变,引发临床症状;也可导致内脏、肠神经系统的高敏感,激活多种神经活性物质,参与脑-肠调节的化学信号异常表达^[9-10]。而 VIP 作为抑制性神经递质,可抑制胃肠分泌,使胃肠血管舒张,平滑肌松弛,降低内脏抵抗,抑制胃肠蠕动,有研究发现 VIP 在便秘型大鼠的慢性肌间神经丛中表达明显多于健康大鼠^[11]。SP 与 VIP 相对应,使结肠推进性运动加强,促进胃肠道平滑肌收缩强烈,刺激肠黏膜分泌水和电解质,二者的平衡失调亦参与 C-IBS 的发病^[12],这些神经递质被认为在 C-IBS 的发生发展中起着重要的作用。

中医学中并无 C-IBS 相关概念的载述,根据其临床表现可归属于便秘、肠郁等范畴。虽病位在肠道,但与肝、脾密切相关。田教授认为 C-IBS 病因病机复杂,临床主要为肝郁气滞,耗血伤津,肠道失润,肝气乘脾,脾失健运而成便秘,在临床实践积累的基础上组创运脾柔肝方治疗 C-IBS 疗效颇佳。方以生白术、白蒺藜为君药,健脾阳、助运化、解肝郁,行气血;白芍、当归、党参、黄芪共为臣药,益气健脾、养血柔肝,使通便而不伤阴;枳实、厚朴、莱菔子、决明子为佐药,破气消积导滞,行气润肠通便;甘草为使药,调和诸药。诸药共奏运脾柔肝之效,缓解便秘症状^[4]。

本研究旨在观察运脾柔肝方对 C-IBS 的治疗作用,并以 5-HT、VIP、SP 为切入点阐明其可能机制。实验结果显示,运脾柔肝方能显著改善 C-IBS 模型大鼠便秘症状,并能明显改善其精神状态、进食量、粪便颗粒数及含水量,且与莫沙必利作用相似,亦可明显改善其病理状态,减少炎症细胞浸润,减轻结肠黏膜的充血、水肿。结果表明,模型组血清 5-HT、VIP 的表达水平较正常组显著升高($P < 0.01$),而 SP 的表达水平则明显降低($P < 0.05$),结肠组织免疫组化结果显示 5-HT、VIP 的表达水平亦较正常组明显升高($P < 0.05$),说明 5-HT、VIP、SP 与 C-IBS

的发生密切相关,与文献报道相符。不同剂量运脾柔肝方均可显著降低 C-IBS 模型大鼠血清 5-HT、VIP 的表达水平($P < 0.01$),虽组间比较及不同剂量组与莫沙必利组比较未显示出统计学差异,但低、中、高剂量组从数值变化上表现出对 5-HT、VIP 的表达水平持续降低的趋势,并以高剂量组为优,且数值上优于莫沙必利组,说明随着给药剂量的增加,运脾柔肝方对 C-IBS 的治疗作用更优于莫沙必利。不同剂量运脾柔肝方和莫沙必利可明显升高 C-IBS 模型大鼠血清 SP 水平($P < 0.05$),且不同剂量运脾柔肝方与莫沙必利之间差异未表现出统计学差异,表明运脾柔肝方与莫沙必利对血清 SP 表达水平具有相似影响,从数值变化看,中剂量组 SP 水平低于低剂量组和高剂量组。从免疫组化结果来看,各组均能明显降低 5-HT 和 VIP 在肠组织中的表达($P < 0.05 \sim 0.01$),且运脾柔肝方数值变化趋势均优于莫沙必利。

综上所述,运脾柔肝方是针对 C-IBS 的病因病机处方立法而成,且对 C-IBS 的疗效确切,与莫沙必利作用相似,并从数值变化趋势来看,随着给药剂量的增加,疗效可优于莫沙必利,其作用机制可能是通过抑制 5-HT、VIP 并增强 SP 表达,从而降低内脏的高敏感性和调节胃肠分泌,加强胃肠道的排空,加速肠道的蠕动,改善便秘症状,其深入的疗效机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] FOXX-ORENSTEIN AE. New and emerging therapies for the treatment of irritable bowel syndrome: an update for gastroenterologists[J]. Therp Adv Gastroenterol, 2016, 9(3): 354-375.

[2] FUKUDO S, KANEKO H, AKIHO H, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for irritable bowel syndrome[J]. J Gastroenterol, 2015, 50(1): 11-30.

[3] 李上云,吴耀南.中医药治疗便秘型肠易激综合征研究进展[J].中医药通报,2014, 13(6):64-66.

LI SY, WU YN. Research progress of traditional Chinese medi-

cine in treating constipated irritable bowel syndrome[J]. Tradit Chin Med J, 2014, 13(6): 64-66.

[4] 孙建梅,田耀洲.田耀洲教授治疗便秘型肠易激综合征[J].吉林中医药,2017, 37(2):122-124.

SUN JM, TIAN YZ. Professor TIAN Yaozhou in the treatment of constipation-predominant irritable bowel syndrome[J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2017, 37(2): 122-124.

[5] 彭丽华,杨云生,孙刚,等.便秘型肠易激综合征新概念模型的建立[J].世界华人消化杂志,2004, 12(1):112-116.

PENG LH, YANG YS, SUN G, et al. A new model of constipation-predominant irritable bowel syndrome in rats[J]. World Chin J Dig, 2004, 12(1): 112-116.

[6] 徐淑云,卞如濂,陈修.药理实验方法[M].第 3 版.北京:人民卫生出版社,2002.

XU SY, BIAN RL, CHEN X. Pharmacological Testing Method [M]. 3rd edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.

[7] 王石红,郭喜军,王红霞.加味二至方对便秘型肠易激综合征大鼠 5-HT 的影响[J].河南中医,2010, 30(1):42-43.

WANG DH, GUO XJ, WANG HX. Effect of modified erzhi prescription on 5-hydroxytryptamine in rats with irritable bowel syndrome of constipation[J]. Henan Tradit Chin Med, 2010, 30(1): 42-43.

[8] CENAC N, ALTIER C, MOTTA JP, et al. Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity[J]. Gut, 2010, 59(4): 481-488.

[9] THIJSEN AY, MUJAGIC Z, JONKERS DM, et al. Alterations in serotonin metabolism in the irritable bowel syndrome[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2016, 43(2): 272-282.

[10] GERSHON MD, TACK J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders[J]. Gastroenterology, 2007, 132(1): 397-414.

[11] LU ZZ, YIN XJ, TENG WJ, et al. Comparative effect of electroacupuncture and moxibustion on the expression of substance P and vasoactive intestinal peptide in patients with irritable bowel syndrome[J]. J Tradit Chin Med, 2015, 35(4): 402-410.

[12] MARGOLIS KG, GERSHON MD. Neuropeptides and inflammatory bowel disease[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(6): 503-511.

(编辑:董宇)