

肠安 I 号方对肠易激综合征内脏高敏感大鼠 5-HT 信号系统及海马 BDNF mRNA 表达的影响

赵迎盼¹ 苏敏¹ 王凤云¹ 卞兆祥² 杨俭勤¹ 王微¹ 唐旭东¹

摘要 **目的** 探讨肠安 I 号方对肠易激综合征内脏高敏感大鼠 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)信号系统及海马脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA 表达的影响。**方法** 采用慢性束缚应激结合游泳致疲劳法建立肠易激综合征内脏高敏感大鼠模型,将造模成功的大鼠按体重区组随机分为模型组(9 只)、得舒特组(9 只,27 mg/kg)、氟西汀组(9 只,3.6 mg/kg)、肠安 I 号高剂量组(9 只,22.6 mg/kg)、中剂量组(9 只,11.3 mg/kg)、低剂量组(9 只,5.7 mg/kg),另设正常组(10 只)。各给药组给予相应药物灌服,模型组按照给药体积灌服生理盐水,1 次/日,共干预 14 日。通过腹部回缩反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分标准确定疼痛压力阈值,免疫组化方法检测结肠 5-HT 水平的变化,免疫荧光 RT-PCR 法检测大鼠海马组织 5-羟色胺 1A 受体(5-hydroxytryptamine 1A receptor, 5-HT1a)、BDNF mRNA 表达。**结果** 与正常组比较,用药前各组大鼠直肠扩张时的疼痛阈值明显降低($P < 0.01$)。与正常组比较,用药后模型组大鼠疼痛阈值明显下降,结肠 5-HT 水平及海马 5-HT1a、BDNF mRNA 表达明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,氟西汀组、肠安 I 号各剂量组疼痛阈值明显上升,得舒特组、肠安 I 号高、中剂量组结肠 5-HT 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),肠安 I 号各剂量组海马组织 5-HT1a、BDNF mRNA 表达明显降低($P < 0.01$),氟西汀组海马组织 BDNF mRNA 表达亦明显降低($P < 0.01$)。**结论** 肠安 I 号方的作用靶点部位涉及“脑-肠”两部分,可降低大鼠直肠扩张疼痛阈值,下调结肠黏膜 5-HT 水平,下调海马组织中 BDNF 和 5-HT1a mRNA 的表达。

关键词 肠安 I 号方;肠易激综合征;内脏高敏感;结肠 5-羟色胺;海马 5-羟色胺 1A 受体;海马脑源性神经营养因子

Effect of Chang'an No. I Recipe on 5-hydroxytryptamine Signal System and mRNA Expression Levels of Hippocampal Brain Derived Neurotrophic Factor in Visceral Hypersensitivity Rats with Irritable Bowel Syndrome ZHAO Ying-pan¹, SU Min¹, WANG Feng-yun¹, BIAN Zhao-xiang², YANG Jian-qin¹, WANG Wei¹, and TANG Xu-dong¹ 1 Department of Digestive Disease, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091); 2 School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Chang'an No. I Recipe (CA) on 5-hydroxytryptamine signal system and mRNA expression levels of hippocampal brain derived neurotrophic factor (BDNF) in visceral hypersensitivity model rats with irritable bowel syndrome (IBS). **Methods** IBS visceral hypersensitivity rat models were established by combined chronic restraint stress and forced swimming. Successfully modeled rats were randomly divided into the model group, the Dicetel group (27 mg/kg), the Fluoxetine group (3.6 mg/kg), the high dose CA group (22.6 mg/kg), the medium dose CA group (11.3 mg/kg), and the low dose CA group (5.7 mg/kg) according to body weight, 9 in each group. Besides, a normal control group with 10 rats was set up. Corresponding medication was administered to rats in each treatment group. Equal volume of physiological saline was administered to rats in the model

基金项目:国家重点基础研究发展计划资助项目(No. 2013CB531703);国家自然科学基金资助项目(No. 81173209)

作者单位:1. 中国中医科学院西苑医院脾胃病科(北京 100091);2. 香港浸会大学中医药学院(香港)

通讯作者:唐旭东, Tel: 010-62835001, E-mail: txdy@sina.com.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2015.10.1228

group by gastrogavage. All medication was performed once per day for a total of 14 days. Pain threshold was determined by abdominal withdrawal reflex (AWR). Changes of colon 5-HT levels were determined by immunohistochemical assay. mRNA expression levels of hippocampal 5-hydroxytryptamine 1A receptor (5-HT1a) and BDNF were detected by immunofluorescent RT-PCR. **Results** Compared with the normal control group before treatment, pain threshold was obviously lowered in proctectasia rats of each group ($P < 0.01$). Compared with the normal control group after treatment, pain threshold was obviously lowered in rats of the model group; colon 5-HT levels, mRNA expression levels of hippocampal 5-HT1a and BDNF were obviously elevated ($P < 0.01$). Compared with the model group, pain threshold was obviously elevated in the Fluoxetine group and all CA groups; colon 5-HT levels were obviously reduced in the Dicetel group, high and medium dose CA groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$); mRNA expression levels of hippocampal 5-HT1a and BDNF were obviously reduced in each CA group ($P < 0.01$); mRNA expression levels of hippocampal BDNF were obviously reduced in the Fluoxetine group ($P < 0.01$). **Conclusions** The target points of CA were involved in brain and gut. CA could reduce pain threshold of proctectasia rats, down-regulate colon mucosal 5-HT levels, and lower mRNA expression levels of BDNF and 5-HT1a in rat hippocampus.

KEYWORDS Chang'an No. I Recipe; irritable bowel syndrome; visceral hypersensitivity; colon 5-hydroxytryptamine; hippocampal 5-HT1A receptor; hippocampal brain derived neurotrophic factor

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的功能性肠病,症状复杂多样,易反复发作,严重影响患者的生活质量并带来经济负担。IBS发病机制非常复杂,尚未完全阐明。IBS是基于多种病理生理机制的复杂症状群^[1],内脏感觉异常是其特异性的病理生理机制。有一些设计严格的临床试验^[2]或系统评价^[3]证明中医药对IBS有一定疗效,但最新发表在JAMA上的关于IBS的综述中却并未确认补充替代医学的地位^[4],其原因一方面在于缺乏高级别的循证医学证据,另一方面在于其疗效机制未完全阐明。

肠安I号方为唐旭东教授在对IBS基本病机的理解上,结合长期的临床实践总结制定的经验方,由黄芪、炒白术、炒白芍、防风、陈皮、炮姜炭等11味药物组成,具有疏肝健脾、温中散寒止泻之效,前期研究表明该方可降低实验大鼠的内脏敏感性,改善患者的腹痛腹胀症状,而内脏敏感性增高与IBS腹痛及腹部不适症状密切相关^[5-9]。结合IBS症状复杂多样、脑-肠轴功能紊乱的发病机制和中医药的整体观及复方用药的多靶点性,笔者推测肠安I号方对IBS模型大鼠内脏敏感性的改变和患者临床症状的改善,作用部位涵盖脑和肠。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是脑-肠互动中重要的单胺类神经递质,5-HT信号系统在IBS内脏敏感性中有重要作用^[10];脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)在中枢可调节感觉,具有致痛及致敏感性作用,其在IBS内脏高敏感中的作用是目前研究的热点^[11]。本研究通过观察IBS内脏高敏感大鼠用药后5-HT系统信号分

子及BDNF基因表达的变化,探讨肠安I号方在IBS内脏高敏感大鼠脑-肠轴的作用机制。

材料与方

1 动物 雄性SD大鼠70只,体重180~200g, SPF级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证编号:SCXK(京)2009-2011。全部动物在中国中医科学院西苑医院SPF级实验动物中心饲养,2只/笼,昼夜节律12:12,温度、湿度及昼夜光线恒定,自由摄食、进水。动物购入后适应性饲养5天后进行实验。

2 药物及试剂 肠安I号方由黄芪9g 炒白术9g 炒白芍12g 防风4.5g 黄连3g 炮姜炭3g 肉豆蔻4.5g 清半夏4.5g 煨木香6g 陈皮4.5g 炙甘草3g组成,其煎剂由中国中医科学院西苑医院制剂室制备,最终制备肠安I号高、中、低剂量药物浓度分别为2.26g/mL、1.13g/mL、0.57g/mL,中剂量给药浓度与临床给药量一致。匹维溴铵片(得舒特,法国苏威制药,生产批号:622691),用蒸馏水配制成浓度为2.7mg/mL的混悬液;盐酸氟西汀分散片(百优解,礼来苏州制药有限公司,生产批号:L02271),用蒸馏水配制成浓度为0.36mg/mL的混悬液。4℃冰箱保存,备用。用药剂量按照实验动物研究中的“等效剂量”计算方法计算^[12],即大鼠(体重200g)1日给药量=人(体重50kg)1日给药量 $\times r$, r 为转换系数 $r=0.018$,计算匹维溴铵片、盐酸氟西汀分散片及肠安I号等效剂量。

医用纸胶布、乳胶医用指套(中号)、8号橡胶导尿管、血压计、三通管;二甲苯、无水乙醇、甲醇、过氧化氢、中性树胶、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾等购自北京医药集团有限责任公司。水合氯醛由中国中医科学院西苑医院实验室提供。10%福尔马林由中国中医科学院西苑医院病理科提供。抗体稀释液(Cat:40804-1)、DAB显色液(Cat:41207-1)、苏木素(Cat:41005-1)购自北京华肽先锋生物科技有限公司。Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(Jackson Code:111-065-003,1:200倍稀释)购自美国Jackson ImmunoResearch Laboratories公司。超纯RNA提取试剂盒(Cat DP431)、Quant cDNA第一链合成试剂盒(Cat KR103-3)、Real Master MIX(with Rox)(Cat FP202-01)购自天根生化科技(北京)有限公司。DNase 1(Cat H10301)购自普洛麦格(北京)技术有限公司。

3 分组、造模及给药方法 60只大鼠按体重行区组随机分为正常组、模型组、得舒特组、氟西汀组、肠安I号高剂量组、中剂量组、低剂量组7组,每组10只。除正常组外采用慢性束缚应激结合游泳致疲劳法^[13,14]建立IBS动物模型,并根据Williams CL等^[15]报道的急性应激方法进行改良,该方法近年来多用于造成IBS内脏高敏感大鼠^[16]。用医用纸胶布束缚大鼠上半身及前肢,不限制其后肢运动,每日束缚3h,连续14日,为消除生物节律的影响,束缚均于每日早8:00-11:00进行。束缚结束后,将模型组大鼠放入温度为(15±0.5)℃,水深为35cm的水槽中,让其自由游泳,当全组50%大鼠出现自然沉降时,全组动物停止游泳,连续14日。通过大鼠内脏敏感性的测量判断造模是否成功,共造模60只大鼠,成功54只,造模成功率为90%。正常组大鼠在造模期间禁食不禁水,不做其他处理,自然饲养。

造模成功后第2日开始给药。得舒特组、氟西汀组、肠安I号高、中、低剂量组分别给予相应药物灌胃,给药浓度分别为2.70 mg/mL、0.36 mg/mL、2.26 g/mL、1.13 g/mL、0.57 g/mL,给药体积为1 mL/100 g,每日1次,连续14日。模型组大鼠按照相同给药体积灌服生理盐水。给药期间每隔3日上午7:00测量大鼠体重,根据体重调整给药量。

4 标本采集、样本制备 给药结束时测量体重及内脏敏感性指标后进行取材。取材前1日,大鼠禁食不禁水,次日用10%水合氯醛腹腔注射麻醉(1 mL/100 g),待大鼠处于深昏迷状态后,迅速打开腹腔,取肛门5 cm以上、盲肠以下的结肠段,长约6 cm;在尽量不

损伤肠壁的情况下将系膜组织取净;结肠段取下后用剪刀纵向剖开,在生理盐水中冲净粪便;将纵向剖开的结肠段在滤纸上展平后放入10%福尔马林液中,石蜡包埋、切片,厚度为1~3 μm。断头后在冰皿上迅速剥离脑组织,分离海马组织,置入2 mL冻存管中,将冻存管迅速投入液氮。后移入-80℃冰箱保存备用。

5 检测指标及方法

5.1 大鼠内脏敏感性测量 用药前及用药结束后分别进行内脏敏感性评估,行直肠气囊扩张(colon rectal distension, CRD),根据腹部回缩反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分标准^[17]确定疼痛压力阈值。AWR评分标准如下:0级:大鼠在接受直肠扩张时无行为学反应;1级:身体静止不动,头部运动减少;2级:大鼠腹部肌肉轻微收缩,腹部不抬高平面;3级:腹肌强烈收缩,腹部抬高平面;4级:骨盆抬起,身体呈弓形(图1)。以大鼠出现3级表现时的压力为大鼠疼痛阈值。造模结束用药前的测量用以验证造模是否成功,用药结束后内脏敏感性的变化体现药物效应。具体方法为:进行结肠扩张前大鼠禁食12 h,不禁水。结肠扩张球囊为乳胶医用指套(中号),长7~8 cm,用直尺在4.5 cm及6 cm处划线标记,从6 cm处剪断,用4号手术丝线在4.5 cm标记处与8号橡胶导尿管扎紧,并经注气检测,扎口处及整个给气通路无漏气。血压计、血压计球囊及导尿管(与结肠扩张球囊相连)分别与三通管连接。由大鼠肛门插入球囊6 cm左右,将大鼠放入编号的大小约35 cm×20 cm×20 cm的透明塑料箱中,待大鼠适应5 min后经血压计的球囊注气,每只老鼠进行3次球囊扩张,每次持续20 s,间隔5 min,取3次压力的平均值。实验过程中采用了严格的质量控制方法。首先,为避免主观偏倚,整个实验过程由2人操作完成:一人负责球囊肛门插入及实验动物的安排,并记录动物编号及相应塑料箱编号;实验操作者负责球囊注气并观察大鼠的行为学反应,确定大鼠出现3级反应后记录压力值,实验操作者不知道动物编号及分组情况。其次,为避免生物节律影响,本次测量时间同前,

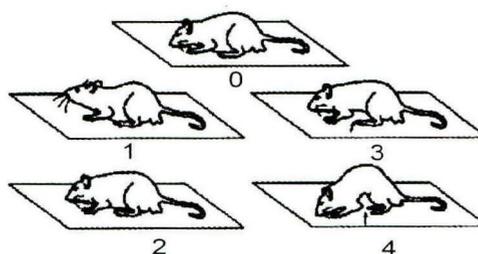


图1 大鼠AWR评分标准

均在下午 1:00—5:00 点之间,且实验安排人员采用一组一只的轮流实验方法。多次测量人员及分工不变。

5.2 结肠 5-HT 水平检测 采用免疫组化方法测定结肠 5-HT 水平。石蜡切片常规脱蜡和水化,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,DAB 显色,中性树脂封片等严格按照试剂盒说明书完成。棕黄色着色部位为阳性表达。应用 Image Pro Plus 专业图像分析系统,选取下列测量参数进行半定量分析。(1)积分光密度(integrated optical density, IOD):指所有阳性物质的光密度的叠加,IOD 值越大,表明阳性物质的总体表达程度就越强,是反映阳性物质数量和染色强度的综合指标。(2)IOD 组织比:IOD 值与该视野的组织面积之比。每组分析 6 个标本。每张切片在 100 倍镜下分析 3 个视野,最后取平均值。本研究数据统计过程中进行了一定的数据处理,特说明如下:(1)研究采用整个结肠切片面积作为观察视野,IOD 值受到不同切片所包含的组织量的影响,故不对 IOD 值进行直接分析,而对 IOD 与组织面积的比值即积分光密度组织比作为直接分析的变量;(2)在数据统计中发现,IOD 组织比值较小,多在小数点后 3、4 位才有非零数字出现,故对所有的 IOD 组织比等倍扩大($\times 10\ 000$),不影响统计结果。

5.3 海马组织 5-羟色胺 1A 受体 (5-hydroxytryptamine 1A receptor, 5-HT1a)、BDNF mRNA 表达检测 采用免疫荧光 RT-PCR 法测定大鼠海马组织 5-HT1a、BDNF mRNA 含量。实验流程:提取总 RNA:TRLzol 提取海马组织 DNA,测定含量并计算浓度。逆转录合成 cDNA:采用 Quant cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,将 RNA 逆转录为 cDNA。5-HT1a、BDNF 上下游引物与内参 β -actin 上下游引物均使用 primer 3 软件设计,由北京华肽先锋生物科技有限公司合成(表 1)。

表 1 RT-PCR 引物序列表

引物名称	引物序列	扩增产物长度(bp)
5-HT1a	上游:5'-TCCACTTTTCGGCGCTTTCTA-3'	178
	下游:5'-GCTGTCCGTTACAGGCTCTTC-3'	
BDNF	上游:5'-ACTTGTACACTTCCCGGGTGAT-3'	100
	下游:5'-TTTGCGGCATCCAGGTAATT-3'	
GAPDH	上游:5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	150
	下游:5'-GACTCATCGTACTCCTGCTGTG-3'	

反应体系:Real Master MIX(with Rox) 10 μ L, 上、下游引物各 0.4 μ L, DNA 模板 2 μ L, 加入灭菌蒸

馏水至 20 μ L。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 10 min, (95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s) $\times 40$ 个循环。60~95 $^{\circ}$ C 进行溶解曲线分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据的相对定量分析,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示待测基因与对照组待测基因表达量的倍数,即 $Folds = 2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{对照组}$ 。Ct 值指的是每个 PCR 反应管内的荧光信号到达设定的阈值(t, threshold)时所经历的循环数(C, cycle)。

6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行处理与分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据做正态性检验和组间方差齐性检验;两项符合,采用参数统计的单因素方差分析进行统计处理,组间比较采用 Dunnett-t、SNK 法;若有一项不符合,则采用非参数统计中的多个独立样本 Kruskal-Wallis H 检验进行统计处理,组间比较采用 Nemenyi 法, Nemenyi 过程由 SPSS 编程完成。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 实验完成情况 除正常组外,其他各组均在造模过程中出现大鼠死亡情况,每组 1 只。死亡原因主要为造模束缚过程中大鼠反应激烈,过度挣扎引起的窒息,故在实验结束取样及检测时,除正常组仍为 10 只外,其他各组均为 9 只。

2 各组大鼠内脏敏感性结果比较(表 2) 用药前与正常组比较,各组大鼠直肠扩张时的疼痛阈值明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明造模成功。用药结束后,与正常组比较,模型组大鼠疼痛阈值明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,氟西汀组、肠安 I 号高、中、低剂量组疼痛阈值明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。肠安 I 号用药各组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠疼痛阈值 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	用药前	用药后
正常	10	35.20 \pm 2.33	36.33 \pm 1.34
模型	9	24.30 \pm 1.60 *	27.63 \pm 1.83 *
氟西汀	9	24.22 \pm 1.15 *	34.15 \pm 2.42 Δ
得舒特	9	23.93 \pm 1.65 *	32.44 \pm 3.28
肠安 I 号高剂量	9	23.78 \pm 1.53 *	35.04 \pm 2.45 $\Delta\Delta$
中剂量	9	23.04 \pm 2.36 *	35.19 \pm 1.04 $\Delta\Delta$
低剂量	9	23.63 \pm 1.34 *	35.11 \pm 1.80 $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠结肠 5-HT 水平结果比较(图 1, 表 3) 与正常组比较,模型组大鼠结肠 5-HT 水平明

显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,得舒特组、肠安 I 号高、中剂量组结肠 5-HT 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与肠安 I 号低剂量组比较,肠安 I 号高、中剂量组结肠 5-HT 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。肠安 I 号高、中剂量组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠结肠黏膜 5-HT 水平 (IOD 组织比, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HT
正常	6	0.539 7 ± 1.060 0
模型	6	1.415 6 ± 1.716 5*
氟西汀	6	0.962 0 ± 1.340 3
得舒特	6	0.811 8 ± 0.840 3 [△]
肠安 I 号高剂量	6	0.798 9 ± 0.846 2 ^{△△}
中剂量	6	0.786 7 ± 0.807 3 ^{△△△}
低剂量	6	1.025 5 ± 0.581 5

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$;与肠安 I 号低剂量组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

4 各组大鼠海马组织 5-HT1a、BDNF mRNA 表达水平比较(表 4) 与正常组比较,模型组海马组织 5-HT1a、BDNF mRNA 表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,肠安 I 号各剂量组海马组织 5-HT1a、BDNF mRNA 表达明显降低(均 $P < 0.01$),氟西汀组海马组织 BDNF mRNA 表达亦明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

讨 论

内脏高敏感(visceral hypersensitivity)是指引起内脏疼痛或不适感觉的刺激阈值降低、内脏对生理

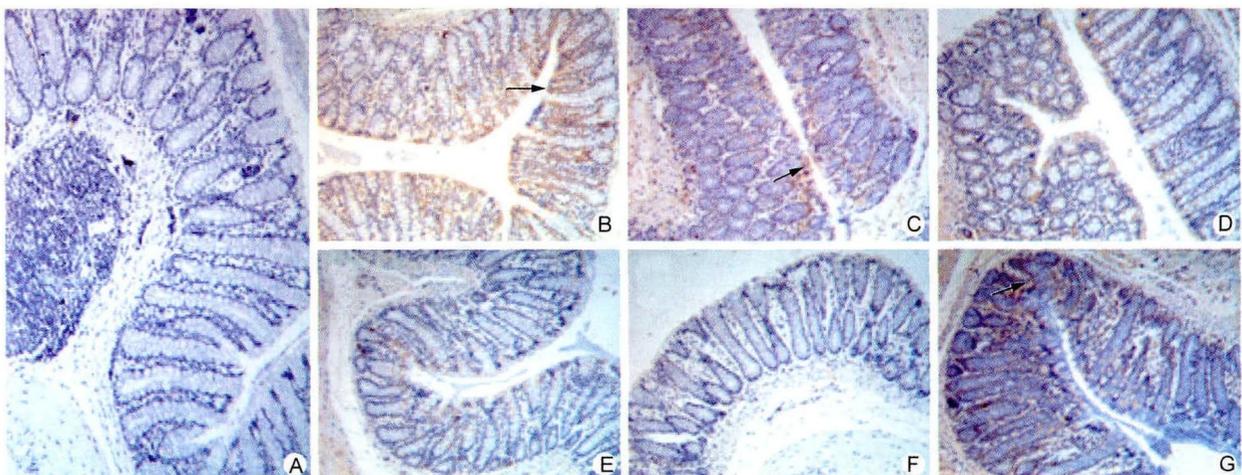
表 4 各组大鼠海马组织 5-HT1a、BDNF mRNA

表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HT1a	BDNF
正常	10	1.017 6 ± 0.288 5	0.836 9 ± 0.304 7
模型	9	5.093 5 ± 0.250 7*	4.358 6 ± 0.417 7*
氟西汀	9	3.365 4 ± 0.401 7	1.304 2 ± 0.123 6 [△]
得舒特	9	3.344 3 ± 0.421 0	2.034 0 ± 0.421 3
肠安 I 号高剂量	9	2.716 2 ± 0.460 0 [△]	1.347 1 ± 0.055 2 [△]
中剂量	9	1.940 2 ± 0.183 7 [△]	1.351 5 ± 0.048 3 [△]
低剂量	9	2.556 8 ± 0.428 1 [△]	1.339 6 ± 0.135 8 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

性刺激产生不适感或对伤害性刺激反应强烈的现象^[18],是公认的功能性胃肠疾病的重要病理生理基础之一。本研究发现,用药结束后,与模型组大鼠比较,氟西汀组、肠安 I 号用药组大鼠的疼痛阈值均显著升高,表明氟西汀和肠安 I 号方可降低 IBS 模型大鼠的内脏敏感性。同以往的研究结果类似^[5-8]。与既往的研究不同的是:(1)得舒特组并未表现出治疗效应,氟西汀组则表现出治疗效果。推测可能的原因在于两个研究间造模方法的差别,其确切机制尚需进一步的深入研究。(2)从肠安 I 号方组间比较来看,本研究并未表现出明确的量效关系,这同以前的研究也略有差别。推测可能同内脏敏感性评估的具体方法不同有关。既往的研究采用的不同压力下 CRD 时的 AWR 评分,结果体现在低压力(20 mmHg)情况下,肠安 I 号组间量效关系不明确;在高压力情况下(>40 mmHg),组间比较量效关系比较明显^[5]。本研究采用了直肠扩张时的疼痛阈值作为评价内脏敏感性的指标,其压力值多在 40 mmHg 以下。今后可以采取更全面的评价方法。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为氟西汀组;D 为得舒特组;E 为肠安 I 号高剂量组;F 为肠安 I 号中剂量组;G 为肠安 I 号低剂量组;箭头所指为阳性表达

图 1 各组大鼠结肠黏膜 5-HT 表达 (免疫组化, ×100)

本研究发现,模型组大鼠结肠黏膜 5-HT 水平升高,药物或其他治疗可使 5-HT 水平恢复,这同很多研究结果类似^[19,20]。早期也已有多项研究证明肠易激综合征患者结肠黏膜和血清中 5-HT 水平异常增加并与内脏敏感性异常相关^[21-24]。Coates MD 等^[25]报道,IBS-C 与 IBS-D 患者其 5-HT 在直肠黏膜上的含量明显低于正常对照组,Kerckhoffs AP 等^[26]研究表明 IBS-C 患者十二指肠黏膜 5-HT 的含量比健康对照组明显增加。研究发现,肠安 I 号方的治疗靶点包括肠道,可降低结肠局部 5-HT 水平,且存在一定的量效关系。分析得舒特而非氟西汀表现出治疗效应的原因在于:(1) 氟西汀可高度选择性抑制中枢神经突触前膜对 5-羟色胺(5-HT)的再摄取,5-HT 很难透过血脑屏障,中枢神经系统和胃肠道黏膜的 5-HT 分属两个系统,故氟西汀的作用不能改变外周的 5-HT 水平;(2) 得舒特对结肠平滑肌具有高度选择作用,通过阻断钙离子流入肠壁平滑肌细胞,防止肌肉过度收缩而达到解痉作用,可在一定程度上影响 5-HT 与受体的结合,从而间接影响结肠黏膜内 5-HT 水平。

人类 5-HT 受体存在多种类型,其中以 5-HT_{1a} 的研究最为广泛和深入。Coelho AM 等^[27]研究发现,5-HT 对于内脏感觉和周围神经末梢的致敏,主要通过 5-HT₁ 受体发挥作用,5-HT_{1a} 受体与感觉、运动、情感和植物神经功能等有密切关系。本研究发现,模型组大鼠 5-HT_{1a} mRNA 表达升高,肠安 I 号方可降低 IBS 模型大鼠海马组织中 5-HT_{1a} mRNA 的表达,说明肠安 I 号的作用靶点涵盖到“脑”,对中枢神经系统的信号传导通路具有一定的影响。5-HT_{1a} 受体既与情绪相关,也与内脏高敏相关,但目前的研究结果尚不足以判定肠安 I 号方对模型大鼠 5-HT_{1a} mRNA 表达的影响的具体机制。BDNF 为神经营养物质家族中的一员。BDNF 在中枢有镇痛及致敏性作用,近年来首先在炎症疼痛中的作用机制被广泛研究^[28,29]。有研究发现,适量的内源性 BDNF 可维持感觉神经及其神经通路的正常功能,但其异常升高则可导致慢性疼痛、炎症性疼痛和内脏疼痛及高敏感等多种与疼痛相关的异常感觉的产生^[30]。Rage F 等^[31]对新生期大鼠行母鼠分离应激,结果发现大鼠海马和下丘脑 BDNF mRNA 表达均增强。本研究发现,模型组大鼠海马 BDNF 水平明显升高,肠安 I 号可下调模型大鼠海马中的 BDNF 水平。已知 BDNF 可由环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)表达水平或磷酸化水平的升高而介导分泌^[32],CREB 是 ERK 信号通路中的一个重要环

节,而针对肠安 I 号复方中药成分之一的芍药苷的止痛作用的机制研究表明,白芍苷的止痛效应与抑制细胞外信号调节的 ERK 途径中的腺苷 A₁ 受体表达有关^[33]。推测肠安 I 号方降低大鼠内脏高敏感和缓解患者腹痛腹胀程度的作用可能与复方中的白芍可调节 BDNF 的表达作用有关,但仍需要研究进行证实。

IBS 属于功能性胃肠病的一种,属于中医学“痞证”、“腹满”、“便秘”、“泄泻”等范畴,一般认为,情志不遂、忧思恼怒、肝气郁结、肝失疏泄、脾失运化、胃失和降是其基本病机,有研究统计涉及 IBS 辨证分型的文献,发现肝郁脾虚证所占比例最大,达 40% 之多,说明精神心理因素(即中医情志因素)在 IBS 发病过程中的重要作用,说明肝主疏泄功能、调畅情志的功能失常是 IBS 发病的核心和关键因素^[34]。国内有学者认为,中医学中肝主疏泄、调畅情志理论与脑-肠轴理论相互关联,可能是通过调节脑-肠轴上多种神经递质、激素、免疫因子的变化而实现的^[35]。肠安 I 号方是建立在对 IBS 基本病机的理解上,结合长期的临床实践总结制定的经验方,由黄芪、炒白术、炒白芍、防风、陈皮、炮姜炭等 11 味药物组成,具有疏肝健脾、温中散寒止泻之效,主要用于 IBS-D 的治疗。中医学对 IBS-D 的发生机理可溯源到《医方考》,其云:“泻责之脾,痛责之肝。肝责之实,脾责之虚,脾虚肝实,故令痛泻。”肠安 I 号方正是针对此基本病机而设的,故而从总体上,其治法主要包括疏肝与温中健脾两大部分,疏肝理气可改善 IBS 腹痛及腹部不适,IBS 的腹痛及腹部不适主要是由内脏高敏感所致,而健脾温中止泻可治疗 IBS-D 患者的腹泻。本研究主要针对肠安 I 号方对 IBS 内脏高敏感性的作用机制即“疏肝理气”作用进行探讨。研究发现,肠安 I 号方对 IBS 模型大鼠内脏高敏感的改善作用是通过调节“脑”、“肠”中的 5-HT 信号系统功能实现的,其止痛作用可能与白芍苷涉及的 ERK 信号通路的变化有关,但其具体机制需要进一步的研究。

本研究的不足之处在于:(1) 慢性束缚及强迫游泳的联合造模方法可能使大鼠处于“抑郁”和 IBS 内脏高敏的双重状态,基于主要研究目的,未对大鼠是否存在“抑郁”状态进行行为学评价,因此对判定 5-HT_{1a} 水平对大鼠内脏高敏感的影响是由于直接作用还是基于对情绪影响的一种间接作用存在困难;(2) 研究仅涉及 5-HT 信号通路中的少数的分子,对于肠安 I 号方的作用机制的阐述还不够深入,需要以此为基础进行进一步的深入研究。今后可在基于肠安 I 号方的临床疗效的基础上,设计更为系统科学的研究,对

肠安 I 号方的止痛、止泻机制进行深入研究,以期阐明其疗效机制。

参 考 文 献

- [1] Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, et al. Functional bowel disorders[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(5): 1480 - 1491.
- [2] Bensoussan A, Talley NJ, Hing M, et al. Treatment of irritable bowel syndrome with Chinese herbal medicine - a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 1998, 280(18): 1585 - 1589.
- [3] Liu JP, Yang M, Liu YX, et al. Herbal medicines for treatment of irritable bowel syndrome[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006, (1): CD004116.
- [4] Chey WD, Kurlander J, Eswaran S. Irritable bowel syndrome: a clinical review[J]. *JAMA*, 2015, 313(9): 949 - 958.
- [5] 林媚,唐旭东,王凤云,等. 含有低浓度肠安 I 号制作的安慰剂对腹泻型 IBS 大鼠内脏高敏感性的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2010, 44(5): 88 - 90.
- [6] 林媚,唐旭东,王凤云. 肠安 I 号及低浓度原药对照安慰剂的实验药效学研究[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2009, 19(5): 273 - 278.
- [7] 林媚,唐旭东,王凤云. 肠安 I 号对实验性腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜 NF- κ B 的影响[J]. *中华中医药杂志(原中国医药学报)*, 2010, 25(12): 2339 - 2341.
- [8] 林媚,唐旭东. 肠安 I 号及安慰剂对腹泻型肠易激综合征大鼠免疫功能的影响[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2009, 19(6): 333 - 335.
- [9] 卞立群. 肠安 I 号方治疗 IBS-D 的临床疗效评价暨临床疗效评价指标的比较研究[D]. 北京:中国中医科学院研究生院, 2011.
- [10] Crowell MD, Wessinger SB. 5-HT and the brain-gut axis: opportunities for pharmacologic intervention[J]. *Exp Opin Investig Drugs*, 2007, 16(6): 761 - 765.
- [11] Yu YB, Zuo XL, Zhao QJ, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to abdominal pain in irritable bowel syndrome [J]. *Gut*, 2012, 61(5): 685 - 694.
- [12] 袁盛榕主编. 药理学实习教程[M]. 北京:世界图书出版公司, 1994:13.
- [13] 严茂祥,占宏伟,陈芝芸,等. 游泳致疲劳对大鼠血和结肠组织中胃肠激素的影响[J]. *浙江中医学院学报*, 2000, 24(4): 44 - 45, 82.
- [14] Erckenbrecht JF, Butsch BH, Enck P. Physical stress increases, mental stress decreases the gastrocolonic response to eating [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96: A141.
- [15] Williams CL, Villar GR, Peterson JM, et al. Stress-induced changes in intestinal transit in the rats: a model for irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1988, 94(3): 611 - 621.
- [16] Eutamene H, Bradesi S, Larauche M, et al. Guanylatecyclase C-mediated antinociceptive effects of linaclotide in rodent models of visceral pain[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22(3): 312 - e84.
- [17] AL-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ, et al. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during post-natal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276 - 1285.
- [18] Grundy D. What activates visceral afferents [J]. *Gut*, 2004, 53(Suppl 2): ii5 - 8.
- [19] 唐洪梅,黄樱华,李得堂,等. 肠激安方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 T 淋巴细胞和 5 - 羟色胺的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2009, 26(2): 164 - 168, 200.
- [20] 丛军,蔡淦,张正利,等. 肠吉泰对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠肥大细胞变化和 5 - 羟色胺表达的影响 [J]. *安徽中医学院学报*, 2010, 29(6): 47 - 51.
- [21] 迟雁,刘新光,李江. 5 - 羟色胺 4 受体在调节应激大鼠内脏敏感性中的作用 [J]. *中华消化杂志*, 2004, 24(9): 533 - 536.
- [22] 李运红,朱晓荫,徐肇敏. 腹泻型肠易激综合征患者结肠黏膜 5 - 羟色胺和 5 - 羟色胺 3 受体的研究 [J]. *胃肠病学*, 2006, 11(8): 477 - 480.
- [23] 祝淑贞,周福生. 5-HT 与肠易激综合征发病的内在相关性 [J]. *临床消化病杂志*, 2004, 16: 229 - 230.
- [24] 陈文科,邹益友,李富军,等. 肠易激综合征精神心理因素、肠黏膜肥大细胞及 5 - 羟色胺的变化 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(1): 46 - 50.
- [25] Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(7): 1657 - 1664.
- [26] Kerckhoffs AP, TerLinde JJ, Akkermans LM, et al. Serotonin transporter transcript levels and serotonin content are increased in small intestine of irritable bowel syndrome patients [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2008, 20(8): 900 - 907.
- [27] Coelho AM, Jacob L, Fioamramont J, et al. Rectal antinociceptive properties of alverine citrate are linked to antagonism at the 5-HT1a receptor

subtype[J]. J Pharm Pharmacol, 2001, 53(10): 1419-1426.

[28] Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, et al. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2008, 28(44): 11263-11268.

[29] Groth R, Aanonsen L. Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or TrkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia[J]. Pain, 2002, 100(1-2): 171-181.

[30] Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain[J]. Neurosci Res, 2006, 55(1): 1-10.

[31] Rage F, Givalois L, Marmigère F, et al. Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats[J]. Neuroscience, 2002, 112(2): 309-318.

[32] 于琦, 金光亮. 三种复方对慢性应激模型大鼠海马 CREB、BDNF 基因表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(3): 591-594.

[33] Zhang XJ, Chen HL, Li Z, et al. Analgesic effect of paeoniflorin in rats with neonatal maternal separation-induced visceral hyperalgesia is mediated through adenosine A(1) receptor by inhibiting the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2009, 94(1): 88-97.

[34] 周福生, 吴文江, 张庆宏. 胃肠功能性疾病证型分布的统计分析[J]. 中华国际医学杂志, 2002, 2(5): 438-442.

[35] 李晓红, 陈家旭. 肝主疏泄与脑-肠轴的相关性探讨[J]. 中医杂志, 2010, 51(10): 872-874.

(收稿:2015-06-16 修回:2015-08-07)

《中国中西医结合杂志》第八届编委会名单

总编辑 陈可冀

副总编辑 王文健 史大卓 吕爱平 肖培根 吴伟康 沈自尹 雷燕

顾问 王永炎 邓铁涛 吴咸中 辛育龄 张伯礼 陈香美 陈凯先 陈维养 侯灿
唐由之 曹洪欣

编辑委员

于德泉 马必生 王一涛 王卫霞 王宁生 王伟 王阶 王拥军(上海) 王拥军(北京)
 王昌恩 王学美 王硕仁 王舒 车镇涛 卞兆祥 方邦江 尹光耀 邓跃毅 叶文才 史载祥
 白彦萍 吕志平 吕维柏 朱元杰 朱兵 朱明军 危北海 庄曾渊 刘干中 刘平 刘良
 刘建平 刘建勋 刘保延 刘鲁明 齐清会 阮新民 孙汉董 孙燕 苏励 杨任民 杨宇飞
 杨秀伟 李乃卿 李大金 李玉光 李廷谦 李军祥 李连达 李国栋 李国勤 李顺成 李恩
 李涛 李焕荣 连方 吴大嵘 吴万垠 吴泰相 吴根诚 吴烈 时毓民 邱峰 张大钊
 张永贤 张永祥 张荣华 张亭栋 张家庆 张敏州 张敏建 陆付耳 陈士奎 陈小野 陈冬燕
 范吉平 范维琥 林志彬 林求诚 林瑞超 郁仁存 果德安 季光 周俊 周霭祥 郑国庆
 赵一鸣 赵伟康 赵健雄 胡义扬 胡镜清 侯凡凡 饶向荣 洪传岳 顾振纶 栗原博(日本)
 徐凤芹 徐治鸿 徐浩 殷惠军 郭军 郭赛珊 唐旭东 凌昌全 黄光英 黄晓愚 黄熙
 黄璐琦 梅之南 曹小定 崔红 麻柔 梁晓春 梁繁荣 葛秦生 董竞成 董福慧 韩济生
 谢竹藩 谢明村 谢恬 蔡定芳 裴正学 廖福龙 衡先培 戴瑞鸿 Yung-chi CHENG(美国)
 Sheng-xing MA(美国) Qun-hao ZHANG(美国)

(以上名单按姓氏笔画为序)