

胃康宁对功能性消化不良大鼠十二指肠黏膜神经递质变化的研究

常玉娟^{1,2} 曹敏敏³ 刘燕君² 李依洁^{1,2} Aimin 周⁴ 陈建德⁵ 魏茹涵⁴ 张平²
魏玮² 佟丽³

【摘要】 目的 通过观察胃康宁对功能性消化不良大鼠十二指肠嗜酸性粒细胞、肥大细胞、 Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP 酶以及相关神经递质的影响,初步探讨功能性消化不良发病与十二指肠的关系,以及胃康宁治疗 FD 的作用机制。方法 将雄性 10 日龄 Wistar 幼鼠 50 只,随机分为正常组 15 只、模型组 15 只、胃康宁组 10 只和阳性药物组 10 只。采用 0.1% IA 灌胃法辅以隔日喂养法诱导 FD 模型。采用免疫组化法检测十二指肠 P 物质(SP)、5-羟色胺(5-HT)及血管活性肠肽(VIP)的表达。HE 染色并计数嗜酸性粒细胞;甲苯胺蓝法染色观察肥大细胞浸润及脱颗粒情况。生物发光法检测 Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP 酶的活性。结果 与模型组比较,胃康宁方能够上调 FD 大鼠十二指肠 P 物质(SP)、5-羟色胺(5-HT)的表达($P < 0.05$),并可促进功能性消化不良大鼠十二指肠组织 Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP 酶活性升高($P < 0.05$),亦可使升高的嗜酸性粒细胞下调($P < 0.05$)。应用图像分析系统,于高倍视野下未观察到明显的肥大细胞浸润。结论 FD 的病理生理机制与十二指肠运动障碍及嗜酸性粒细胞浸润有关,胃康宁具有改善胃肠动力、降低胃肠感觉过敏的作用,可能与其调节十二指肠相关神经递质及免疫细胞表达有关。

【关键词】 功能性消化不良;胃康宁;P 物质(SP);5-羟色胺(5-HT);血管活性肠肽(VIP)

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A

Study of Weikangning on the Changes in Duodenal Mucous Neurotransmitters in the Rats of Functional Dyspepsia

CHANG Yu - juan^{1,2}, CAO Min - min³, LIU Yan - jun², LI Yi - jie¹, ZHOU Ai - min⁴, CHEN Jian - de⁵, WEI Ru - han⁴, ZHANG Ping², WEI Wei², TONG Li³

(1. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102; 3. School of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875; 4. Department of Chemistry, Cleveland State University, Cleveland, USA 44115; 5. Department of Gastroenterology, Medical School of Johns Hopkins University, Maryland, USA 21218)

【Abstract】 Objective To preliminarily explore the relationship between functional dyspepsia(FD) and duodenum through observing the impacts of weikangning on duodenal eosinophils, mast cells, Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP and the relevant neurotransmitters and discuss the function mechanisms of weikangning on FD. **Methods** Fifty Wistar rats of 10 days old were randomized into a normal group(15 rats), a model group(15 rats), a weikangning group(10 rats) and a positive medicine group(10 rats). The lavage method 0.1% IA and feeding once every two days were used together to induce FD model. IHC method was adopted to detect the expressions of SP, 5-HT and VIP. HE staining was applied to count eosinophils. Toluidine blue staining was used to observe the mast cell infiltration and degranulation. Bioluminescent method was used to detect the activity of Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP. **Results** Compared with the model group, weikangning up-regulated the expressions of SP and 5-HT in FD rats($P < 0.05$), promoted the increase of Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP activity

DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.160228

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273746)

作者单位: 1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 3. 北京师范大学生命科学院, 北京 100875; 4. 克利夫兰大学化学系, 美国 克利夫兰州 44115; 5. 约翰·霍普金斯大学医学院消化内科, 美国 马里兰州 21218

通讯作者: 魏玮, Email: sxxyy@sina.com

and down-regulated the increased eosinophils ($P < 0.05$). Using image analysis system and under high power field of vision it was observed that the mast cells were not apparently infiltrated. **Conclusion** The pathophysiological mechanism of FD is related to duodenal motor impairment and eosinophil infiltration. Weikangning improves gastrointestinal dynamics, reduces the gastrointestinal hyperesthesia, which is probably correlative with the duodenal-related neurotransmitters and immune cell expressions.

【Key words】 Functional Dyspepsia; Weikangning; SP 5-HT; VIP

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 以持续或反复发作的上腹部疼痛、胀满、暖气、早饱等为主要临床症状, 但没有任何器质性改变, 是消化系统的常见病^[1-2]。对 FD 的发病机制目前研究众多, 但胃肠动力障碍、内脏敏感性异常、脑-肠轴功能障碍等均不能完全解释其发病的复杂性和多样性^[3], 目前倾向于 FD 可能是多方面因素综合作用的结果, 不同患者间存在一定个体性差异。众多研究提示, 十二指肠可能是 FD 发生的病理生理过程中的重要一环。嗜酸性粒细胞-肥大细胞轴可能在 FD 的发病中起重要作用。十二指肠神经系统递质失调进而影响十二指肠动力及敏感性, 可能是功能性消化不良发生的重要机制。

中药复方胃康宁以调理脾胃升降, 调节寒热为基本原则, 在改善消化道症状、中医证候及胃肠动力学多方面疗效显著。前期研究我们发现胃康宁^[4]可对功能性消化不良大鼠胃动力、胃壁肌电活动等产生影响, 并能调节胃窦黏膜 CGRP、SP 等脑肠肽的表达^[5], 但胃康宁对 FD 大鼠模型十二指肠神经递质的表达是否同样可产生影响, 尚未可知。目前, 对 FD 患者和 FD 大鼠模型神经递质变化的研究很充分, 但多锁定于胃组织的改变, 关于 FD 模型中十二指肠相关神经递质的变化及相关药物对其影响的研究却很少。本研究的目的在于了解 FD 大鼠十二指肠相关免疫细胞和神经递质的表达, 以及辛开苦降方胃康宁对其的调节作用, 为胃康宁治疗 FD 机制的研究提供新的理论依据和研究思路, 以更好地服务于临床。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 50 只健康 SPF 级雄性 10 日龄 Wistar 幼鼠, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号为 SCXK(京) 2012-0001。动物饲养于北京中医药大学屏障级动物实验中心, 动物饲养环境: 室温为 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度为 $(50 \pm 10)\%$, 正常更替光照 24 h 供应无菌饲料及饮用水。

1.1.2 试剂和仪器 试剂: (1) 一抗 Anti-vip antibody ab22736 abcam; (2) 一抗 Substance P sc-9758

SANTA CRUZ; (3) 一抗 Anti-Serotonin antibody ab10385 abcam; (4) 二抗 SV0002-兔 IgG 两步法试剂盒 SV0002 博士德生物; (5) DAB 显色试剂盒 AR1022 博士德生物。仪器设备: (1) 手提高压锅 YX-280 江阴滨江医疗设备厂; (2) 组织自动包埋机 TB-718 泰维科技; (3) 显微镜 BX43 OLYMPAS; (4) 石蜡切片机 LEICA RM2135 LEICA。

1.1.3 药物 胃康宁方: 党参 15 g, 黄芩 9 g, 白芍 15 g, 姜半夏 10 g, 厚朴 10 g, 砂仁 8 g, 炙甘草 9 g, 郁金 18 g 等, 药物均由中国中医科学院望京医院药剂科提供。依据体表面积公式计算得出大鼠等效剂量为 $3.6 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 胃康宁中药溶液生药含量为 $1.2 \text{ g}/\text{ml}$ 。多潘立酮片用灭菌蒸馏水配制成 $0.3 \text{ mg}/\text{ml}$ 浓度溶液。以上药液均储存于 4°C 冰箱中, 大鼠灌胃前预热到常温再行使用 (避免药液寒凉对大鼠胃肠产生刺激, 影响结果)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备和给药 将雄性 10 日龄 Wistar 幼鼠 50 只, 随机数字法分为正常组 15 只、模型组 15 只、中药胃康宁组 10 只和阳性药物组 10 只。正常组幼鼠给予 2% 蔗糖溶液 0.2 ml 灌胃, 1 次/d; 其他 3 组幼鼠予 0.1% IA 和 2% 蔗糖混合液 0.2 ml 灌胃, 1 次/d, 造模持续 6 d。模型组、中药胃康宁组和阳性药物组大鼠 6 周龄时开始施行隔日进食, 正常空白组大鼠正常饮食。待大鼠 8 周龄进行模型评定后, 分别按照分组施行药物干预。胃康宁组给予生药含量 $1.2 \text{ g}/\text{ml}$ 的中药煎剂灌胃, 阳性药物组给予 $0.3 \text{ mg}/\text{ml}$ 多潘立酮溶液灌胃, 模型组和正常组均予以 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 各组灌胃剂量均为 $1 \text{ ml}/100 \text{ g}$, 1 次/d, 连续灌胃 7 d。

1.2.2 十二指肠组织 5-HT、SP、VIP 免疫组织化学染色 异氟烷麻醉吸入式麻醉后, 在胃窦及十二指肠处各取组织 1 块, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片厚度为 $4 \mu\text{m}$ 。采用免疫组织化学方法检测, 按试剂盒说明书进行, 行去除内源酶和抗原修复等步骤后, 分别用 5-HT、VIP 及 SP 进行染色, PBS 稀释一抗 5-HT、VIP 及 SP 抗体稀释比例分别为 1:200, 1:400, 1:50, 以 HRP 标记二抗。DAB 显色 6 min, 镜检, 水洗终止。以 Image-Pro Plus 图像处理软件进行分析处理,

表 1 各组嗜酸性粒细胞计数、ATP 酶活性、5-HT、SP 及 VIP 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	嗜酸粒细胞(个/HP)	5-HT	SP	VIP	ATP(U/mgprot)
正常组	6	4.87 ± 0.16	5.82 ± 2.19	3.52 ± 0.44	9.15 ± 1.18	0.56 ± 0.11
模型组	6	7.40 ± 0.25 ^a	2.56 ± 1.05 ^a	1.61 ± 0.57 ^a	10.69 ± 2.01	0.42 ± 0.08 ^a
阳性药物组	6	6.43 ± 0.31 ^b	5.04 ± 0.63 ^b	3.36 ± 1.23 ^b	9.02 ± 1.71	0.48 ± 0.15
胃康宁组	6	5.67 ± 0.18 ^b	5.79 ± 0.82 ^b	3.62 ± 1.18 ^b	8.87 ± 1.42	0.69 ± 0.18 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

观察各组大鼠十二指肠黏膜组织中 5-HT、VIP 及 SP 表达的改变。

1.2.3 十二指肠嗜酸性粒细胞计数 应用图像分析系统,于高倍视野下($\times 400$)选择染色良好清晰的区域,每例检体选择 5 个视野,以双核,包浆含大量鲜红颗粒为特征计数。求取平均值作为每例检体嗜酸性粒细胞个数,计数结果以个数/视野表示。

1.2.4 十二指肠组织中 ATP 酶的检测 十二指肠组织匀浆,1000 ~ 1500 r/min 离心 10 min,取上清 0.2 ml 加 0.8 ml 生理盐水稀释成 2% 的匀浆,测定 Ca^{2+} Mg^{2+} ATP 酶活性。

1.3 统计学处理

用 SPSS19.0 软件进行统计学处理,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与正常组相比,模型组十二指肠 5-HT、SP 免疫反应阳性产物降低,嗜酸性粒细胞计数明显增多, Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP 酶活性降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,胃康宁可有效升高十二指肠 5-HT、SP 含量(结果见表 1,图 1,图 2),嗜酸性粒细胞计数明显减少(结果见表 1,图 4),ATP 酶活性上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。胃康宁组 VIP 含量与模型组比较表达下调,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(结果见表 1,图 3)。未观察到明显的肥大细胞浸润。

3 讨论

FD 与中医学中“痞满”“胃脘痛”等概念相对应。外感六淫、内伤七情、饮食劳倦、精神紧张等因素导致脾胃升降失司,气机阻滞中焦,因而出现上腹部疼痛不适、胀满等一系列症状。本病临床多见寒热错杂之证。治疗寒热错杂证,当以辛开苦降,平调寒热为主,中医经典名方半夏泻心汤是治疗包括脾胃病在内的多种疾病的有效方剂,胃康宁方在此基础上加入郁金、枳壳、杏仁等在调节脾胃功能的

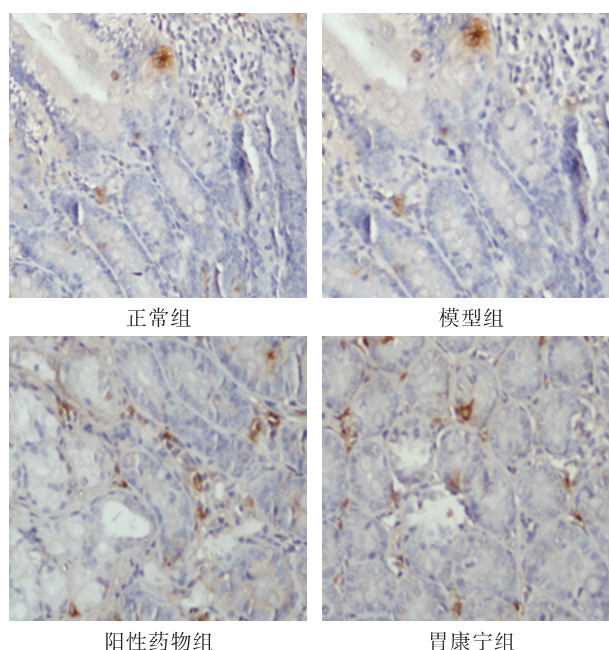


图 1 5-HT 免疫组化染色

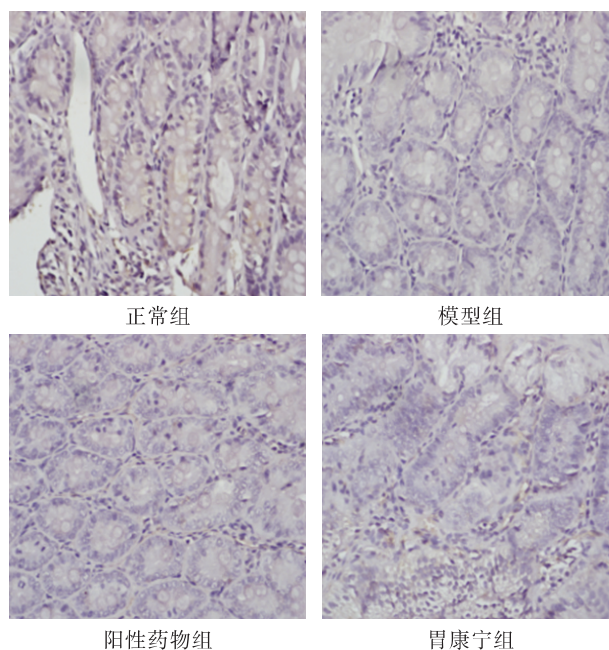


图 2 SP 免疫组化染色

同时,重视人体气机与情志的疏导,以提高临床疗效。

本课题组前期研究中,无论是建立 FD 大鼠模型,还是以 FD 患者为研究对象的临床研究,均证实

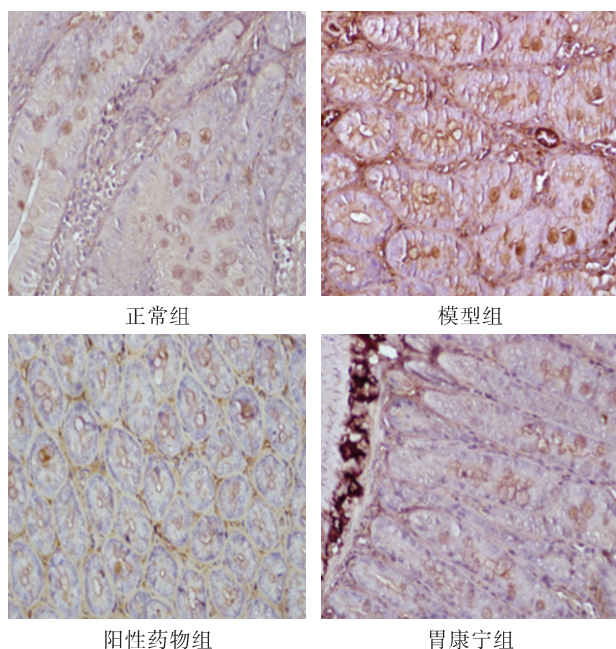


图3 VIP免疫组化染色

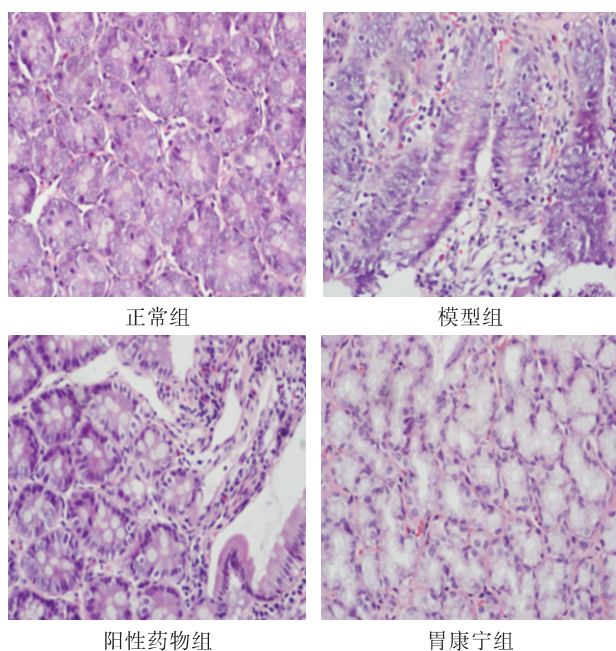


图4 十二指肠HE染色

了辛开苦降方胃康宁可改善胃肠动力,并可调节胃组织 5-HT、SP 等表达。目前有研究支持十二指肠功能异常可能是 FD 发生的关键机制之一。在本研究中,我们关注了胃康宁方对 FD 大鼠模型十二指肠相关作用机制的影响。 Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP 酶在维持胃肠组织能量代谢和离子平衡,保护胃肠细胞形态和功能方面具有重要作用。实验结果显示,胃康宁可以促进 FD 大鼠十二指肠组织中 ATP 酶活性,与课题组前期体外实验中胃康宁可提高胃上皮

细胞中 ATP 含量的结果具有一致性。由此我们推测,胃康宁对 ATP 的产生有一定的促进作用,对细胞能量代谢的平衡有一定的保护作用,这一作用机制或许是其治疗功能性消化不良的分子基础之一。

嗜酸性粒细胞和肥大细胞对机体胃肠功能具有重要的调节作用,能够对 FD 患者的症状产生影响。炎症可以作为心理和生理功能之间的中介,有很多应激性事件可以引发炎症反应,以及后续的肥大细胞和嗜酸性粒细胞的浸润和激活。这些诱发因素包括内部诱因如压力和焦虑,以及外部诱因如微生物和过敏源等。抗炎和针对肥大细胞和嗜酸性粒细胞的药物可在一定程度上改善患者的症状。

十二指肠活检发现,部分 FD 患者十二指肠可见形态独特的嗜酸性粒细胞簇^[6],呈高度激活状态,能够释放具有杀菌作用的递质,维持肠道屏障功能。未成年 FD 患者中存在同样改变,并且这一比例在一项研究中达到 71%,和患儿临床证候也密切相关,给予组胺受体拮抗剂治疗后行活检复查,腹痛亦随嗜酸性粒细胞减少而减轻或消失^[7]。不过另有研究发现,FD 患儿肠道通透性与健康儿童相比,通透性并没有增加,并且与肥大细胞和嗜酸性粒细胞密度无关^[8]。还有研究发现,FD 患儿胃电节律异常者的肥大细胞密度显著升高,肥大细胞平均密度异常的患儿餐前正常慢波百分比降低,并且二者呈负相关。MC 细胞膜稳定剂可明显改善功能性胃肠病患者腹痛等症状,提高患者生活质量,但不能影响组胺和胰蛋白酶等肥大细胞常见炎症介质的释放^[9]。推测介导 FD 发生发展的可能除组胺和胰蛋白酶等常见介质之外,尚有一些并不适合用肥大细胞脱颗粒指数来评价的特异性介质参与。本实验以甲苯胺蓝法染色,于高倍视野下并未观察到 FD 模型大鼠存在明显的肥大细胞浸润。推测与大鼠生理结构和选择的 FD 造模方法有关,大鼠模型并不能完全复制 FD 患者病理情况,尚需要高质量的临床研究进一步验证。与正常大鼠相比,FD 大鼠十二指肠黏膜嗜酸性粒细胞明显增多,而胃康宁则能减少嗜酸性粒细胞的浸润。十二指肠嗜酸性粒细胞的特征性改变是否能成为新的诊断 FD 的生物标志物,作为 FD 新的效应细胞,为诊断和治疗提供帮助^[10]。中药辛开苦降方胃康宁治疗嗜酸性粒细胞相关胃肠道疾病,虽然临床疗效显著,但其作用机制还有待于更广泛和深入的研究。

5-羟色胺又名血清素,是重要的脑肠轴神经递质,通过与其高亲和性的 5-羟色胺受体结合发挥

调节胃肠道的运动功能,从而参与对胃肠道动力和内脏感觉的调控。另外,5-HT 是嗜酸性粒细胞有力的化学诱导物之一,同时也能够诱导肥大细胞黏附和迁移,并通过一系列反应,导致感觉运动功能障碍^[11]。还有研究显示,FD 患者十二指肠组织中 5-HT₃ 受体的表达明显增加^[12]。胃康宁方对 FD 大鼠具有加快胃肠排空,降低胃肠感觉过敏的作用,其机制可能与调节十二指肠 5-HT 表达有关。P 物质(SP) 是胃肠道运动调节中主要的兴奋性神经递质^[13-14],能够增强胃肠平滑肌的收缩;同时 SP 能够介导内脏敏感性的改变,在调节内脏感觉中也发挥重要作用。另外,P 物质(SP) 通过作用于 NK1R、NK2R 和 NK3R 能够刺激各种细胞因子分泌以及肥大细胞脱颗粒和组胺释放^[15]。胃康宁方调节十二指肠 SP 的表达从而影响 FD 患者胃肠道相关症状,可能是其治疗 FD 的主要机制。其传出的重要作用血管活性肠肽(Vasoactive Intestinal Peptide, VIP) 是胃肠运动重要的抑制性介质之一^[16],能够促使胃肠平滑肌及括约肌舒张^[17],并能调节摄食,影响肠道黏膜免疫功能和肠道菌群^[18]。辛开苦降方胃康宁能够解除 VIP 对十二指肠的过度抑制作用,调节 VIP 含量恢复到正常水平,从而使 VIP 参与调节的十二指肠蠕动反射正常进行。在以豚鼠为研究对象的动物实验研究中,显示 5-HT 能够对胃肠道 P 物质水平产生影响^[18]。但 5-HT 对其他胃肠激素水平影响的具体机制还未明确。推测辛开苦降方胃康宁对胃肠道相关神经递质的改变是一复杂过程,有药物对相关神经递质的直接影响,也有不同神经递质之间相互作用,从而发挥间接调节作用。但此结论需要更为深入和严密的实验来进一步支撑,并且动物模型不能完全复制人体疾病状态,FD 发病机制与十二指肠的关系有待于进一步研究和证实。

本研究结果显示,十二指肠的动力异常或敏感性增高可能是 FD 发生的病理生理机制之一,十二指肠中嗜酸性粒细胞增多可能为 FD 的特征性变化。胃康宁能够调节 FD 模型大鼠十二指肠 5-HT 和 SP 的含量,影响 ATP 酶活性,同时改变十二指肠嗜酸性粒细胞浸润异常增多状态。据此推测,胃康宁治疗 FD 机制可能与其调节 5-HT、SP 以及免疫细胞水平,进而参与调整胃肠动力,降低内脏高敏感性有关。

参 考 文 献

[1] Carbone F, Tack J. Gastrointestinal mechanisms underlying functional

gastric disorders[J]. Dig Dis 2014, 32(3): 222-229.

[2] 陈灏珠, 林果为, 王吉耀. 实用内科学[M]. 14 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 1938.

[3] Yarrandiss Christie. Functional Dyspepsia in Review: Pathophysiology and Challenges in the Diagnosis and Management due to Coexisting Gastroesophageal Reflux Disease and Irritable Bowel Syndrome[J]. Gastroenterology Research and Practice 2013: 351086.

[4] 魏玮, 郝建军, 田俊. 辛开苦降法对功能性消化不良大鼠胃壁肌电活动和自主神经功能的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(9): 837-839.

[5] 魏玮, 郝建军, 田俊, 等. 辛开苦降法对功能性消化不良大鼠胃窦黏膜 CGRP 和 SP 影响的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(3): 137-138.

[6] Rothenberg ME, Cohen MB. An eosinophil hypothesis for functional dyspepsia[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, 5(10): 1147-1148.

[7] Talley NJ, Walker MM, Aro P, et al. Non-ulcer dyspepsia and duodenal eosinophilia: an adult endoscopic population-based case-control study[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, 5(10): 1175-1183.

[8] Neilan NA, Garg UC, Schurman JV, et al. Intestinal permeability in children/adolescents with functional dyspepsia[J]. BMC Res Notes 2014, 7(7): 275.

[9] Friesen CA, Schurman JV, Colombo JM, et al. Eosinophils and mast cells as therapeutic targets in pediatric functional dyspepsia[J]. World J Gastrointest Pharmacol Ther 2013, 4(4): 86-96.

[10] Park YM, Bochner BS. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2010, 2(2): 87-101.

[11] 钟晓琴, 赵卫东. 胃肠道嗜酸粒细胞与功能性消化不良发生机制关系的研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2014, 22(2): 3-5.

[12] Witte AB, D'Amato M, Poulsen SS, et al. Duodenal epithelial transport in function dyspepsia; Role of serotonin[J]. World J Gastrointest Pathophysiol 2013, 4(2): 28-36.

[13] Li C, Micci MA, Murthy KS, et al. Substance P is essential for maintaining gut muscle contractility: a novel role for coneurotransmission revealed by botulinum toxin[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2014, 306(10): G839-848.

[14] Raap M, Rüdrieh U, Ständer S, et al. Substance P activates human eosinophils[J]. Exp Dermatol 2015, 24(7): 557-559.

[15] Weinstock JV. Substance P and the regulation of inflammation in infections and inflammatory bowel disease[J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 213(2): 453-61.

[16] Vu JP, Larauche M, Flores M, et al. Regulation of Appetite, Body Composition and Metabolic Hormones by Vasoactive Intestinal Polypeptide(VIP)[J]. J Mol Neurosci 2015, 56(2): 377-387.

[17] Mahavadi S, Bhattacharya S, Kim J, et al. Caveolae-dependent internalization and homologous desensitization of VIP/PACAP receptor, VPAC, in gastrointestinal smooth muscle[J]. Peptides, 2013, 43(1): 137-45.

[18] Xu C, Wang Y, Sun R, et al. Modulatory effects of vasoactive intestinal peptide on intestinal mucosal immunity and microbial community of weaned piglets challenged by an enterotoxigenic Escherichia coli(K88)[J]. PLoS One 2014, 9(8): e104183.

(收稿日期: 2015-12-27)