

温胃调肠颗粒对便秘型肠易激综合征模型大鼠的改善作用及机制研究

杨梅*,李玉先[#](重庆市中医院药剂科,重庆 400011)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4814-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.19

摘要 目的:观察温胃调肠颗粒对便秘型肠易激综合征(IBS-C)模型大鼠的改善作用,并探讨其可能的作用机制。方法:将60只SD大鼠随机分为正常组、模型组、莫沙必利组(阳性药物,50 mg/kg)和温胃调肠颗粒低、中、高剂量组(3、6、12 g/kg),每组10只。除正常组外,其余各组大鼠ig冰水混合物复制IBS-C模型。造模后,各给药组大鼠ig相应药物,正常组和模型组大鼠ig等体积生理盐水,每天1次,连续14 d。给药结束后,测定大鼠24 h排便粒数、粪便含水率;采用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中5-羟色胺(5-HT)和降钙素基因相关肽(CGRP)的含量;分别采用实时荧光定量聚合酶链式反应法和Western blot法测定大鼠结肠组织中5-羟色胺转运蛋白(SERT)、CGRP mRNA及其蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠24 h排便粒数、粪便含水率减少,血清中5-HT和CGRP含量增加,结肠组织中SERT和CGRP mRNA及其蛋白水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠上述指标均得到不同程度改善,除温胃调肠颗粒低剂量组大鼠结肠组织SERT mRNA降低不显著外,其余各组差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:温胃调肠颗粒可促进IBS-C模型大鼠的排便,改善便秘症状;其机制可能与降低血清和肠组织中5-HT、CGRP等神经递质的水平有关。

关键词 温胃调肠颗粒;便秘型肠易激综合征;排便;大鼠

Study on Improvement Effects of Wenwei Tiaochang Granule on Constipation-predominant Irritable Bowel Syndrome Model Rats and Its Mechanism

YANG Mei, LI Yuxian (Dept. of Pharmacy, Chongqing Hospital of TCM, Chongqing 400011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the improvement effects of Wenwei tiaochang granule on constipation-predominant irritable bowel syndrome (IBS-C) model rats, and to discuss its mechanism. METHODS: 60 SD rats were randomly divided into normal group, model group, mosapride group (positive drug, 50 mg/kg) and Wenwei tiaochang granule low-dose, medium-dose and high-dose groups (3, 6, 12 g/kg), with 10 rats in each group. Except for normal group, other groups were given ice water mixture intragastrically to induce IBS-C model. After modeling, treatment groups were given relevant medicine intragastrically, and normal group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 14 d. After medication, 24 h dejection amounts and water rate of manure were measured. The serum contents of 5-HT and CGRP were determined by ELISA. RT-PCR and Western blot assay were used to determine mRNA and protein expression of SERT and CGRP in colon tissue. RESULTS: Compared with normal group, 24 h dejection amounts and water rate of manure were decreased in model group, serum contents of 5-HT and CGRP were increased, and mRNA and protein expression of SERT and CGRP in colon tissue were also increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, above indexes of treatment groups were all improved to different extent, with statistical significance ($P<0.05$ or $P<0.01$), except the decrease of mRNA expression of SERT in colon tissue was not significant in Wenwei tiaochang granule low-dose group. CONCLUSIONS: Wenwei tiaochang granule can improve the dejection and symptoms of constipation in IBS-C model rats, which maybe associated with decreasing the levels of 5-HT, CGRP and other neurotransmitter in serum and intestinal tissue.

KEYWORDS Wenwei tiaochang granule; Constipation-predominant irritable bowel syndrome; Dejection; Rat

肠易激综合征(IBS)是指以腹痛或腹部不适并伴排便习惯改变和/或大便性状异常的功能性肠病^[1],发病率较高,任何年龄阶段均有可能发病,发病人群中以青、壮年居多,且女性的发病率高于男性^[2]。该病的生理、病理学基础包括肠道动力和肠道平滑肌功能障碍、内脏感觉异常、精神心理因素及全肠道感染、小肠细菌过度生长或小肠细菌移位等^[3]。就病因和发病机制而言,IBS是多因素疾病,且与胃肠动力、内脏感知、心理因素、社会因素等都有关系^[4]。虽有大量学者从不同方面对该病的病因和发病机制进行研究,但其发病机制至今尚未完全阐明。

化学药多单一针对某一症状或某一靶点起效,治疗IBS的

* 主管中药师。研究方向:中药药理学。电话:023-62610641。
E-mail: 184003642@qq.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:中药药理学。电话:
023-63844465。E-mail: lyx531@163.com

效果不佳^[5],然而中药在治疗IBS方面有独特优势。温胃调肠颗粒为我院院内制剂,主要由柴胡、陈皮、炙甘草、芍药等药材组成。临床结果显示,该制剂对IBS具有一定疗效,且与治疗IBS的常用化学药相比,该药效果更为显著。在本研究中,笔者拟采用冰水诱导便秘型肠易激综合征(IBS-C)大鼠模型,探讨温胃调肠颗粒对IBS-C模型大鼠的改善作用,并探讨其可能的作用机制,为其临床上用于治疗IBS提供实验支持。

1 材料

1.1 仪器

BSA124S分析天平(塞多利斯科仪器有限公司);AFD9600实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(杭州安杰思生物科技有限公司);5300凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);Multiskan FC酶标仪、MicroCL 17R高速低温离心机(赛默飞世尔仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

温胃调肠颗粒(重庆市中医院自制,批号:20151009,规格:5 g/包);枸橼酸莫沙必利片(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:11080932,规格:5 mg/片);5-羟色胺(5-HT)、降钙素基因相关肽(CGRP)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20151119023、20151022760);RT-PCR试剂盒(大连宝生物科技有限公司,批号:A650t-1);实验所用抗体均购自 Santa Gruz Biotechnology 公司;5-羟色胺转运蛋白(SERT)、CGRP、GAPDH 引物由南京巴微得生物科技有限公司合成。

1.3 动物

SD大鼠60只,SPF级,♂,体质量(180±20)g,由昭衍(苏州)新药研究中心有限公司提供[许可证号:SCXK(苏)2013-0030]。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将60只SD大鼠随机分为6组,每组10只,分别为正常组、模型组、莫沙必利组(阳性药物,50 mg/kg,相当于人用量的10倍剂量)和温胃调肠颗粒低、中、高剂量组(3、6、12 g/kg,相当于人用量的5、10、20倍剂量)。除正常组外,其余各组大鼠每天上午8:30开始ig冰水混合物2 ml,连续14 d,复制IBS-C模型^[6]。造模期间大鼠正常喂水、喂食。造模结束后,各给药组大鼠均按1 ml/100 g(溶剂为羧甲基纤维素钠)ig相应药物,每天1次,连续14 d;正常组和模型组大鼠ig等体积生理盐水。

2.2 大鼠排便情况测定

给药14 d后,各组大鼠禁食12 h,正常组、模型组大鼠再次ig等体积生理盐水,各给药组大鼠按“2.1”项下方法再给药1次,记录每只大鼠的给药时间。大鼠均单笼饲养,正常饮水、进食。记录再次给药后每只大鼠24 h内的排便粒数。将各只大鼠的粪便收集至玻璃皿中,做好标记,称质量并记录。于105℃烘干粪便至恒质量,称质量并记录。计算粪便含水率[粪便含水率(%)=(1-烘干后质量/烘干前质量)×100%]。

2.3 血清中5-HT、CGRP含量测定

采用ELISA法检测血清中5-HT、CGRP含量。排便实验结束后,于各组大鼠眼眶取血,并做好标记。待血液凝固后,离心吸取血清,按照相应试剂盒说明书操作测定各组大鼠血清中5-HT、CGRP含量。

2.4 结肠组织中SERT、CGRP mRNA水平测定

各组大鼠眼眶取血后,麻醉,仰卧位固定,解剖,取结肠组织,快速冻存于液氮中。各组随机抽取3只大鼠的结肠组织,采用Trizol法提取其总RNA,然后按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录。以逆转录后cDNA为模版,按照RT-PCR试剂盒说明书进行RT-PCR试验。引物序列:SERT上游引物序列为5'-CCATCAGCCCTCTGTTTCTC-3'、下游引物序列为5'-GGACGACATCCCTATGCAGT-3',产物大小为397 bp;CGRP上游引物序列为5'-CTCTAGTGTCAGTCCAGAA-3',下游引物序列为5'-CTTCAGAGCCACATTGGT-3',产物大小为131 bp;GAPDH上游引物序列为5'-ACAGCAACTCCCATTCTT-3',下游引物序列为5'-TCCAGGGTTTCTACTCC-3',产物大小为223 bp^[7-9]。反应体系:2x SYBR Green混合物10 μl、上下游引物各1 μl、逆转录后的cDNA 1 μl、去离子水7 μl,体系共20 μl。PCR热循环参数:95℃、5 min;然后两步反应,即95℃、30 s、60℃、30 s,进行40个循环。于每个循环的第2步(即60℃、30 s)收集荧光信号,以2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对定量。

2.5 结肠组织中5-HT、CGRP蛋白水平测定

采用Western blot法。各组随机抽取3只大鼠的结肠组

织,精密称取50 mg加入EP管中,加入适量的含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,电动匀浆器匀浆,加入上样缓冲液充分煮沸5 min。取样本行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,然后电转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,分别加入GAPDH(内参)、5-HT和CGRP一抗(1:1 000),室温孵育4 h。TBST缓冲液洗膜3次,加入第二抗体[小鼠抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体,1:1 000],室温孵育2 h,再次用TBST缓冲液洗PVDF膜3次,显影。使用Quantity One软件测定蛋白条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参GAPDH蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

2.6 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐时采用t检验,方差不齐时采用Dunnett'T3检验。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 温胃调肠颗粒对IBS-C模型大鼠排便的影响

与正常组比较,模型组大鼠24 h排便粒数显著减少(*P*<0.01),粪便湿质量、干质量以及含水率均显著降低(*P*<0.01),这说明IBS-C大鼠模型复制成功,出现了明显的便秘症状。与模型组比较,莫沙必利组和温胃调肠颗粒各剂量组大鼠24 h排便粒数显著增多(*P*<0.01),粪便湿质量、干质量以及含水率均显著升高(*P*<0.01),这说明温胃调肠颗粒对IBS-C模型大鼠的治疗作用显著,测定结果详见表1。

表1 各组大鼠24 h排便粒数和大便含水量测定结果($\bar{x} \pm s$, *n*=10)

Tab 1 The results of 24 h defecation amounts and water content of manure in rat of each group ($\bar{x} \pm s$, *n*=10)

组别	粪便粒数	粪便湿质量,g	粪便干质量,g	含水率,%
正常组	33.00±5.74	8.94±2.66	4.01±1.21	54.77±5.13
模型组	9.75±3.60**	3.23±1.42**	1.98±0.87**	37.52±9.52**
莫沙必利组	37.17±5.89 ^{##}	11.10±1.76 ^{##}	4.71±0.90 ^{##}	56.17±12.88 ^{##}
温胃调肠颗粒低剂量组	23.00±5.36 ^{##}	6.16±1.44 ^{##}	3.14±0.63 ^{##}	48.22±7.10 ^{##}
温胃调肠颗粒中剂量组	26.17±6.38 ^{##}	7.57±1.96 ^{##}	3.38±0.83 ^{##}	54.68±7.56 ^{##}
温胃调肠颗粒高剂量组	31.33±7.85 ^{##}	9.23±2.32 ^{##}	3.34±0.78 ^{##}	61.16±14.26 ^{##}

注:与正常组比较,***P*<0.01;与模型组比较,^{##}*P*<0.01

Note: vs. normal group, ***P*<0.01; vs. model group, ^{##}*P*<0.01

3.2 温胃调肠颗粒对IBS-C模型大鼠血清中5-HT、CGRP含量的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中5-HT、CGRP含量均显著增加(*P*<0.01)。与模型组比较,莫沙必利组和温胃调肠颗粒各剂量组大鼠血清中5-HT、CGRP含量均显著减少(*P*<0.01),测定结果详见表2。

表2 各组大鼠血清中5-HT、CGRP含量测定结果($\bar{x} \pm s$, *n*=10)

Tab 2 The results of serum 5-HT and CGRP level in rat of each group ($\bar{x} \pm s$, *n*=10)

组别	5-HT, μg/ml	CGRP, ng/L
正常组	25.95±3.11	47.36±4.11
模型组	40.40±4.86**	109.95±6.08**
莫沙必利组	32.35±4.11 ^{##}	89.73±15.02 ^{##}
温胃调肠颗粒低剂量组	34.95±2.64 ^{##}	101.29±5.46 ^{##}
温胃调肠颗粒中剂量组	34.01±2.36 ^{##}	90.71±3.70 ^{##}
温胃调肠颗粒高剂量组	30.71±3.98 ^{##}	83.40±4.86 ^{##}

注:与正常组比较,***P*<0.01;与模型组比较,^{##}*P*<0.01

Note: vs. normal group, ***P*<0.01; vs. model group, ^{##}*P*<0.01

3.3 温胃调肠颗粒对IBS-C模型大鼠结肠组织中SERT、CGRP mRNA及其蛋白水平的影响

与正常组比较,模型大鼠结肠组织中SERT、CGRP mRNA及其蛋白水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,除温胃调肠颗粒低剂量组大鼠结肠组织中SERT mRNA水平降低不显著外,其余各组大鼠上述指标均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),测定结果详见表3、图1。

表3 各组大鼠结肠组织中SERT、CGRP mRNA及蛋白水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 mRNA and protein expression of SERT and CGRP in colon tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	SERT		CGRP	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3.67±2.00*	2.63±0.55**	7.87±4.90*	2.10±0.23**
莫沙必利组	0.75±0.40*	1.37±0.10*	1.20±1.17*	1.13±0.10**
温胃调肠颗粒低剂量组	0.78±0.32	1.31±0.24*	1.90±1.65*	1.27±0.33*
温胃调肠颗粒中剂量组	0.61±0.47*	1.30±0.21*	1.54±0.83*	1.20±0.39*
温胃调肠颗粒高剂量组	0.46±0.31*	1.29±0.23*	1.15±1.04*	1.26±0.22*

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

Note: vs. normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

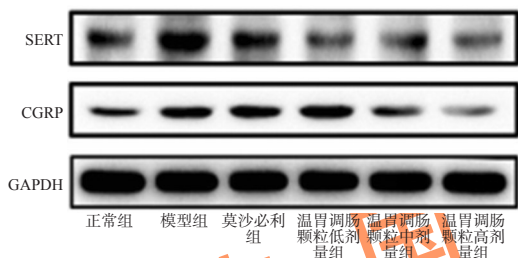


图1 各组大鼠结肠组织中SERT、CGRP蛋白表达电泳图
Fig 1 Electrophoretogram for protein expression of SERT and CGRP in colon tissue of rats in each group

4 讨论

IBS症状的突发性、发病机制的复杂性以及影响因素的多样性给动物模型的选择和构建带来了很大困难。针对IBS模型大鼠内脏高敏感性、胃肠动力及内分泌改变等主要特点,采用多种动物模型对药物进行研究是较为可靠的。笔者在前期研究了温胃调肠颗粒对多种不同胃肠不适模型动物的治疗作用,包括阿托品负荷小鼠、新斯的明负荷小鼠、番泻叶腹泻小鼠、甲状腺素便秘小鼠等。IBS是一种多症状疾病,为了体现中药治疗该类疾病的优势,笔者再次复制了冰水致IBS-C大鼠模型。IBS都会有肠道运动功能紊乱的症状,冰水致IBS-C大鼠模型后,大鼠粪便粒数和含水量均有减少,且肠道黏膜不出现病理性表现;通过直肠内球囊扩张刺激评价肠道敏感性发现,肠道动力及敏感性发生了改变^[10]。研究显示,高、中、低剂量温胃调肠颗粒均可促进模型大鼠的排便作用,且使干燥粪便的含水率升高。

5-HT是一种在体内分布广泛的神经递质,参与了消化道功能的调节,几乎参与了所有类型IBS的病理、生理过程。5-HT水平的升高会提高内脏神经系统的敏感性,并激活多种神经活性物质,使参与脑-肠调节的某些化学信号异常表达。此外,当5-HT与其各种受体结合时,会作用于IBS患者的肠道运动、感知及分泌系统,进而产生各种临床症状^[7-9]。莫沙必利是治疗IBS-C的常用药物,为选择性5-HT受体激动药,可以兴奋胃肠道胆碱能中间神经元及肌间神经丛的5-HT受体,促进乙酰胆碱的释放,促进胃肠运动,增强消化系统排空能力^[9],其

功效和温胃调肠颗粒比较相似,因此本研究选其作为阳性对照药。

SERT广泛存在于肠道、脑等器官的多种细胞(包括肠黏膜上皮细胞、肠嗜铬细胞、神经元和肥大细胞等)膜上的一种跨膜转运蛋白,对5-HT有高度亲和力。SERT基因转录水平的改变会影响SERT的数量及5-HT的重摄取,进而产生相应的临床症状。本研究结果显示,温胃调肠颗粒可以显著降低冰水致IBS-C大鼠血清中5-HT含量和结肠组织中SERT mRNA及其蛋白表达水平,这说明受试药物通过下调结肠组织中SERT基因及蛋白的表达,进而调节神经递质5-HT的水平,发挥了治疗IBS-C的作用。CGRP是一种主要的炎症促进型的神经肽,全身分布同样广泛,在结肠固有膜血管壁表达尤其丰富,且在肠壁各层均有分布,具有调节胃肠运动、血流及分泌的功能^[11]。作为调节介质和神经递质的CGRP有促炎作用,能直接产生伤害作用,还参与内脏伤害性递质的传递^[12-13]。本研究显示,温胃调肠颗粒可以显著降低冰水致IBS-C模型大鼠血清中CGRP含量以及结肠组织中mRNA及其蛋白的表达水平,这说明受试药物也通过调节内脏敏感性从而发挥对IBS-C大鼠的治疗作用。

综上所述,温胃调肠颗粒可显著调节冰水致IBS-C大鼠排便,改善便秘症状,其机制可能与降低血清和肠组织中5-HT、CGRP等神经递质的水平有关。本研究为该制剂的临床应用提供了一定的实验基础。

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.
- [2] 何宛蓉.肠易激综合征流行病学研究现状与进展[J].胃肠病学和肝病学杂志,2012,21(1):83.
- [3] 张梵宇,宋亚璐,石仲歌,等.中药对肠易激综合征脑肠肽影响的药理研究进展[J].中南药学,2016,14(4):410.
- [4] 刘亮.肠易激综合征的可能相关致病因素和机制[J].胃肠病学和肝病学杂志,2013,22(10):1055.
- [5] 薛丽君,杨怡玲,唐剑,等.肠易激综合征的药物治疗进展[J].医学综述,2016,22(1):118.
- [6] 严博,邓莉,陈建明.肠易激综合征相关动物模型研究进展[J].药学与临床研究,2013,21(5):557.
- [7] 李静.5-羟色胺转运体基因mRNA转录水平与肠易激综合征[D].天津:天津医科大学,2010.
- [8] 孙程程,迟雁,王化虹,等.内脏高敏感大鼠结肠5-羟色胺转运体蛋白的表达[J].世界华人消化杂志,2010,18(14):1428.
- [9] 秦丽扬,张秀峰,蒋挽澜.莫沙必利治疗便秘型肠易激综合征的研究[J].中国伤残医学,2011,19(2):63.
- [10] 安荣,韩佩玉,徐秋颖,等.肠易激综合征动物模型的建立及评价[J].新乡医学院学报,2016,33(5):434.
- [11] 赵锟,陈英,范勤,等.+Gz暴露对实验性胃溃疡大鼠胃黏膜CGRP mRNA表达和血清NO、ET的影响[J].胃肠病学和肝病学杂志,2015,24(8):961.
- [12] 陈磊.电针不同穴位对肠易激综合征模型大鼠肠道微循环、脑肠相关神经肽影响的研究[D].北京:北京中医药大学,2013.
- [13] 房财富,唐洪梅,廖小红,等.肠激安胶囊对腹泻性肠易激综合征模型大鼠腹痛的影响及分子机制研究[J].中国药房,2015,26(19):2614.

(收稿日期:2016-05-31 修回日期:2016-08-22)

(编辑:林静)