

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.12.006

健脾化湿颗粒对 D-IBS 大鼠模型 CGRP 表达的影响*

付聪敏¹, 王 焯¹, 王迎寒², 刘玉玲², 张晓峰², 东岫岩³, 郭洪杰³(1. 承德护理职业学院涉外护理系; 2. 河北省重要研究与开发重点实验室;
3. 承德医学院附属肛肠医院中医内科, 河北承德 067000)

[摘要] 目的 探讨健脾化湿颗粒对腹泻型肠易激综合征(D-IBS)大鼠模型降钙素基因相关肽(CGRP)表达的影响。方法

将 60 只 Wistar 大鼠分成对照组($n=10$)和造模组($n=50$),再将造模组大鼠分为 5 组:模型组、阳性对照组及健脾化湿颗粒低、中、高剂量治疗组,每组 10 只。采用束缚应激刺激 2 周加灌服番泻叶煎剂的方法建立 D-IBS 大鼠模型,采用免疫组化法检测各组大鼠小肠黏膜 CGRP 的表达情况。结果 与对照组比较,模型组大鼠小肠黏膜 CGRP 阳性面积减少,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,各治疗组 CGRP 阳性面积增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与阳性对照组比较,健脾化湿颗粒中、低剂量治疗组 CGRP 阳性面积增加,差异有统计学意义($P<0.05$),而与健脾化湿颗粒高剂量治疗组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 健脾化湿颗粒可通过提高局部肠组织中 CGRP 水平而达到治疗目的。

[关键词] 肠易激综合征;健脾化湿颗粒;降钙素基因相关肽

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)12-1603-03

Effects of invigorating spleen and eliminating dampness granules on CGRP in rat D-IBS model*

Fu Congmin¹, Wang Ye¹, Wang Yinghan², Liu Yuling², Zhang Xiaofeng², Dong Youyan³, Guo Hongjie³

(1. Department of Concerning Foreign Affairs Nursing, Chengde Nursing Vocational College; 2. Hebei Provincial Key Laboratory of Research and Development of Chinese Herbs; 3. Department of Chinese Internal Medicine, Affiliated Anorectal Hospital, Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] Objective To observe the effects of Invigorating Spleen and Eliminating Dampness Granules on calcitonin gene related peptide(CGRP) in rat models of diarrhea predominant irritable bowel syndrome(D-IBS). Methods 60 Wistar rats were randomly divided into the control group($n=10$) and the constructing model group ($n=50$). Then, the constructing model group was randomly re-divided into the model group($n=10$), positive control group($n=10$), invigorating spleen and eliminating dampness Granules low, middle and high dose groups($n=10$ each). The D-IBS rat model was established by the restraint stress stimulation and gavage of folium sennae decoction for 2 weeks. The expression of CGRP in small intestinal mucosal membrane in each group was detected by the immunohistochemical method. Results In the model group, the CGRP positive area was decreased, which showed the statistical difference compared with the control group ($P<0.05$); the CGRP positive area in various treatment groups was increased, which showed the statistical difference compared with the model group ($P<0.05$); in the invigorating spleen and eliminating dampness granules middle and low dose groups, the CGRP positive area was increased with the statistical difference compared with the positive control group ($P<0.05$), while without the statistical difference compared with the invigorating spleen and eliminating dampness granules high dose group ($P>0.05$). Conclusion Invigorating spleen and eliminating dampness granules achieves the therapeutical effect by increasing the level of CGRP in local intestinal tissue.

[Key words] irritable bowel syndrome; invigorating spleen and eliminating dampness granules; calcitonin gene-related peptide

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛、腹部不适,并伴有排便习惯和(或)大便性状异常为主要临床表现的慢性肠功能紊乱性疾病,在中国以腹泻型 IBS(D-IBS)较多见。由于本病反复发作或慢性迁延,对患者学习、工作和生活产生严重影响,给患者带来了沉重的经济压力和思想负担。流行病学调查显示,IBS 患病率为 15%~22%,每年约有 500 万人因此病而就诊,年消耗医疗费 80 亿美元^[1]。国内学者调查显示,广州市居民 IBS 的患病率为 5.6%,普通内科门诊及消化专科门诊中 IBS 所占比例分别为 10.1%、34.3%^[2]。且国内患病率呈逐年上升趋势,已引起广泛重视。迄今为止,IBS 的病因及发病机制尚不完全清楚,多数学者认

为其病因主要与遗传因素、食物、炎症及精神心理因素有关,其发病机制主要与内脏高敏感、肠道动力异常、脑-肠轴、脑-肠肽等有关。治疗方面,目前尚无特效疗法,主要采用对症治疗^[3-5],但易反复,远期效果不理想。近年来,中医药在 D-IBS 的治疗上积累了丰富的经验。本实验通过探讨健脾化湿颗粒对 D-IBS 大鼠模型降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)表达的影响,为该药物的临床应用提供理论及实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物:Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,6 周龄,体质量(170±20)g,动物合格证编号:SCXK(冀)2014-0004,由

* 基金项目:河北省教育厅自然科学基金项目(Z2014012)。 作者简介:付聪敏(1978—),讲师,硕士研究生,主要从事中医治疗脾胃病的研究。

河北省实验动物中心提供。60 只大鼠分成 6 笼,雌雄分笼,常规饲养。适应性喂养 7 d 后进入实验阶段。实验药物:(1)造模用药,番泻叶(批号为 20140420)购自安国市京兴药业有限责任公司,浓煎成生药 0.6 g/mL 的药液。(2)治疗用药,阳性对照组用匹维溴铵片(得舒特),50 mg,法国苏威制药有限公司生产,产品批号为 624065,碾碎后用蒸馏水配制成 3.0 mg/mL 的药液。(3)健脾化湿颗粒,由黄芪、茯苓、砂仁、益智仁、炒白芍等 10 味组成,按比例采用现代制剂工艺制成。实验试剂:CGRP 免疫组化试剂盒(规格为 0.1 mL,批号为 20140716),购自德国博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及建模 将 60 只大鼠分成对照组($n=10$)和造模组($n=50$),再将造模组大鼠分为 5 组:模型组、阳性对照组及健脾化湿颗粒低、中、高剂量组(低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组),每组 10 只。每组大鼠雌雄各半,雌雄分笼。建立 D-IBS 大鼠模型:采用乔氏造模法建立 D-IBS 大鼠模型^[6]。实验前 10 h 禁食,自由饮水。造模组大鼠于上午 8:00 分别给予番泻叶煎剂(生药 0.6 g/mL)灌胃,灌胃剂量按 10 mL/kg 计算,在灌服完番泻叶煎剂后 1 h,用粗制棉绳束缚大鼠的后两肢,使之行动不便,烦躁不安,造成一定的应激刺激,每次持续 2 h,每日 1 次,连续 2 周。对照组大鼠全程只给予生理盐水灌胃(10 mL/kg)。以稀便级判断造模是否成功。

1.2.2 给药方法 对照组大鼠不施加任何处理因素;其他各组于每天上午 8:00 用药,每天 1 次,连续 2 周。模型组大鼠给予生理盐水灌胃,阳性对照组大鼠给予得舒特溶液(3.0 mg/mL)灌胃,高、中、低剂量治疗组大鼠分别给予健脾化湿颗粒药液 4.0、2.5、1.5 g/mL 灌胃,灌胃剂量均按 10 mL/kg 计算。

1.2.3 标本采集和处理 治疗 2 周后停止用药,用代谢笼测每组大鼠稀便级。禁食、禁水 12 h 后,各组大鼠均以 4% 水合氯醛麻醉(0.5 mL/100 g),沿腹腔矢状线切开后,沿肠系膜剪开,留取小肠组织 1 段(长度为 1.0 cm),以生理盐水冲洗肠内容物后,将标本放于 10% 中性甲醛的小瓶内固定 24 h,常规脱

水,石蜡包埋。

1.2.4 观察指标 稀便级:Ⅰ级为粪便滤纸范围直径小于 1.0 cm;Ⅱ级为粪便滤纸范围直径 1.0~<2.0 cm;Ⅲ级为粪便滤纸范围直径 2.0~3.0 cm;Ⅳ级为粪便滤纸范围直径大于 3.0 cm。粪便滤纸范围为椭圆形者,按其长径计算。

1.2.5 采用免疫组化法检测 CGRP 水平 严格按试剂盒说明进行检测。使用医学图像定量分析软件分析小肠黏膜中 CGRP 阳性面积,每组大鼠随机选取 6 张切片,每张切片随机分析 5 个视野。于 400 倍视野下摄取切片图像,随机选定摄取图像的黏膜层、黏膜下层,全视野测量,得出免疫组化图像中 CGRP 阳性面积。光镜下见细胞质染成棕黄色者即为 CGRP 阳性细胞。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

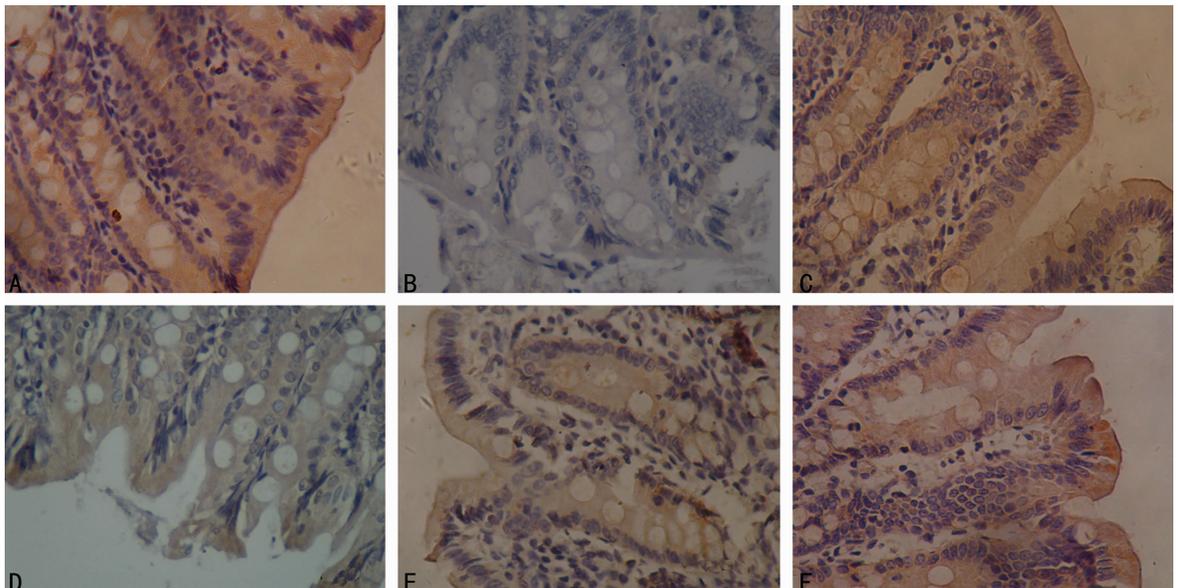
2 结果

2.1 各组大鼠稀便级比较 药物治疗前 1 d:造模组大鼠稀便级数明显增加,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 D-IBS 造模成功。药物治疗 2 周后:各治疗组大鼠稀便级数明显下降,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠治疗前后稀便级比较($\bar{x}\pm s, n=10, \text{cm}$)

组别	治疗前 1 d	治疗 2 周后
对照组	0.11±0.09	0.14±0.11
模型组	3.47±0.12 ^a	4.41±0.20 ^a
阳性对照组	3.61±0.21 ^a	2.82±0.18 ^{ab}
低剂量治疗组	3.51±0.19 ^a	3.42±0.16 ^{ab}
中剂量治疗组	3.37±0.20 ^a	2.78±0.14 ^{ab}
高剂量治疗组	3.36±0.18 ^a	1.81±0.15 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较。



A:正常组;B:模型组;C:阳性对照组;D:低剂量治疗组;E:中剂量治疗组;F:高剂量治疗组。

图 1 各组大鼠小肠黏膜 CGRP 阳性表达情况($\times 400$)

2.2 各组大鼠小肠黏膜 CGRP 表达比较 与对照组大鼠小肠黏膜 CGRP 阳性面积($0.043\ 17 \pm 0.002\ 78$)比较,模型组降低($0.019\ 17 \pm 0.003\ 63$, $P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组 CGRP 阳性面积增高($P < 0.05$);与阳性对照组($0.038\ 52 \pm 0.002\ 37$)比较,健脾化湿颗粒低、中剂量治疗组 CGRP 阳性面积降低($0.0231\ 67 \pm 0.002\ 86$ 、 $0.033\ 33 \pm 0.002\ 80$, $P < 0.05$),而与健脾化湿颗粒高剂量治疗组($0.037\ 18 \pm 0.001\ 41$)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

3 讨 论

健脾化湿颗粒源于上海市名中医马贵国教授经验方,该药以前采用中药传统剂型-汤剂,临床应用多年,对 D-IBS 患者有很好的疗效。现经水低温动态提取、冰冻浓缩和干法制粒等方法制成颗粒剂,是古方与现代提取工艺、制剂工艺和药理研究方法相结合的产物^[7]。经实验研究发现,低温动态提取、冰冻浓缩的过程对中药药效的影响不大,与健脾化湿汤无差异^[8]。且在治疗 D-IBS 的实验研究上取得了一定的成果^[9]。

近年来研究发现,脑-肠互动在 D-IBS 发病机制中的作用日益被认识^[10]。CGRP 是一种含有 37 个氨基酸残基的脑肠肽,广泛分布于中枢和外周神经系统,特别是感觉神经元胞体和末梢以及胃肠道壁内神经丛,具有调节胃肠血流、胃肠分泌及运动功能。有动物实验研究发现,IBS 模型大鼠血浆及结肠黏膜 CGRP 水平下降,提示 CGRP 与 IBS 发病有关^[11]。由于 CGRP 水平下降,导致胃肠道平滑肌收缩作用增强,血管舒张抑制,进而肠道血流量减少,温煦肠壁作用下降,这可能是 IBS 模型大鼠腹痛、腹泻的主要原因之一。牛庆慧等^[12]研究发现,D-IBS 患者回盲部和乙状结肠部位的肠黏膜 CGRP 阳性神经纤维强度较对照组高,而 IBS 其他分型与对照组无明显差异。有研究发现,CGRP 与神经类物质共同作用致老鼠肠道敏感性增高^[13],提示 CGRP 可能参与了 IBS 的病理生理过程。Kaur 等^[14]发现 CGRP 在生理情况下并不发挥作用,只在受到刺激或疾病状态下释放增多。吴皓萌等^[15]发现 CGRP 与 D-IBS 的肝郁脾虚证、脾胃虚弱证呈正相关。CGRP 是促炎症性感觉性神经肽,可引起结肠动脉的舒张,加快结肠的蠕动,导致腹痛、肠鸣、腹泻。本实验研究发现,模型组大鼠小肠黏膜 CGRP 水平显著下降,而各治疗组大鼠血清 CGRP 明显升高,其中以健脾化湿颗粒高剂量组最明显,提示 CGRP 参与了 D-IBS 的病理生理过程。

健脾化湿颗粒对 D-IBS 有很好的治疗作用,高剂量组优于中、低剂量组,其作用机制可能是通过提高局部肠组织中 CGRP 水平而达到治疗目的。

参考文献

[1] Longstreth GF, Drossman DA. Severe irritable bowel and

functional abdominal pain syndromes: managing the patient and health care costs[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005, 3(4):397-400.

- [2] 熊理守,陈旻湖,陈惠新,等.广东省社区人群肠易激综合征的流行病学研究[J].中华医学杂志,2004,84(4):18-21.
- [3] 崔立红,杨云生.功能性胃肠疾病研究现状与展望[J].山东医药,2009,49(28):109-110.
- [4] 汤莉,孙一芬.奥美溴安联合四联活菌治疗腹泻型肠易激综合征的临床观察[J].中国实用内科杂志,2007,27(12):54-57.
- [5] 李宇,史维.肠易激综合征研究现状[J].四川医学,2006,27(8):785-787.
- [6] 乔明崎.肝气逆、肝气郁两证客观指标实验研究[J].山东中医学院学报,1992,22(3):23-26.
- [7] 王迎寒.健脾化湿颗粒治疗脾虚型肠易激综合征的机制研究[D].承德:承德医学院中药研究所,2007.
- [8] 王迎寒,张晓峰.健脾化湿水提液干粉冰冻液及汤剂的药效学比较[J].辽宁中医杂志,2009,36(4):603-604.
- [9] 王迎寒,陈光晖,刘玉玲.健脾化湿颗粒对 IBS 模型大鼠结肠 NO 和 NOS 的影响[J].承德医学院学报,2010,27(2):129-131.
- [10] 王伟岸,钱家鸣,潘国宗.肠易激综合征的发病机制[J].胃肠病学和肝病学杂志,2001,10(2):99-102.
- [11] 王垂杰,赵文娟,玉锋.痛泻要方对肠易激综合征大鼠血浆及肠黏膜 CGRP 影响的实验研究[J].生命科学仪器,2009,10(7):24-26.
- [12] 牛庆慧,张翠萍,鞠辉.肠道黏膜肥大细胞和降钙素基因相关肽在肠易激综合征中的表达[J].世界华人消化杂志,2009,17(2):213-217.
- [13] Delafroy L, Gelot A, Ardid D. Interactive involvement of brain derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and calcitonin gene related peptide in colonic hypersensitivity in the rat[J]. Gut, 2006, 55(7):940-945.
- [14] Kaur R, OShaughnessy CT, Jarvie EM, et al. Characterization of a calcitonin gene-related peptide release ∞ say in rat isolated distal colon[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(12):1775-178.
- [15] 吴皓萌,徐志伟,敖海清等.腹泻型肠易激综合征中医证候与血清脑肠肽水平变化的相关性研究[J].中华中医药杂志,2014,29(5):1429-1433.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-01-26)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号:ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。