

## 健脾化湿颗粒对 IBS-D 模型大鼠血清 P 物质及 ET 表达的影响\*

赵立波<sup>1</sup>,王迎寒<sup>2</sup>,刘玉玲<sup>2</sup>,张晓峰<sup>2</sup>,董岫岩<sup>3</sup>,郭洪杰<sup>3△</sup>

(1. 承德护理职业学院涉外护理系,河北承德 067000;2. 河北省中药研究与开发重点实验室,河北承德 067000;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 观察健脾化湿颗粒对腹泻型肠易激综合征( IBS-D)大鼠血清 P 物质(SP)及内皮素(ET)表达的影响,探讨其治疗机制。方法 取清洁级 Wistar 大鼠 60 只,平均分为对照组、模型组及健脾化湿颗粒低、中、高剂量组和阳性对照的匹维溴铵组。除对照组外各组大鼠束缚应激配合番泻叶煎剂溶液灌胃复制模型。造模成功后,予以相应药物治疗。实验过程中观察各组大鼠大便性状及大便次数。实验结束后酶联免疫吸附测定(ELISA)观察血清中 ET、SP 水平变化。结果 与模型组比较,各治疗组大鼠腹泻症状明显改善;健脾化湿高剂量组与匹维溴铵组大鼠症状改善更为明显,组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。高剂量组、中剂量组、匹维溴铵组与模型组比较,血清 SP 水平下降明显,差异有统计学意义( $P<0.05$ );高、中剂量组与匹维溴铵组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。高剂量组、中剂量组、匹维溴铵组与模型组比较,血清 ET 水平升高明显,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其中健脾化湿中、高剂量组组间比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),表明有一定剂量依赖关系。结论 健脾化湿颗粒可明显改善 IBS-D 模型大鼠胃肠功能,其作用机制可能与降低血清 SP 水平,提高血清 ET 水平有关。

**关键词:**肠易激综合征;腹泻;P 物质;内皮素;健脾化湿;中草药

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)10-1206-02

## Effect of Jianpihuashi Granules on expression of serum substance P and ET of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats\*

Zhao Libo<sup>1</sup>, Wang Yinghan<sup>2</sup>, Liu Yuling<sup>2</sup>, Zhang Xiaofeng<sup>2</sup>, Dong Youyan<sup>3</sup>, Guo Hongjie<sup>3△</sup>

(1. Department of Foreign-Related Nursing, Chengde Nursing Vocational College, Chengde, Hebei 067000, China;

2. Hebei Provincial Key Laboratory of Research and Development of Chinese Herbs, Chengde, Hebei 067000, China;

3. Department of Chinese Internal Medicine, Affiliated Anorectal Hospital, Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

**Abstract:** Objective To observe the effect of Jianpihuashi(JPHS) Granules on the expression of substance P(SP) and endothelin(ET) in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome( IBS-D) rats and to explore its therapeutic mechanism. **Methods** Sixty clean-level Wistar rats were randomly divided into the control group, model group, low-dose, middle-dose and high-dose JPHS Granules groups and the positive control group(Dicetel group). Except the control group, the other groups were performed the restraint stress combined with folium sennae decoction by gavage to establish D-IBS rat model. After the success of the model construction, the corresponding medication was given. The stool property and times were observed during the experiment. After the end of the experiment, ELISA was applied to detect the change of ET and SP levels. **Results** Compared with the model group, the diarrhea symptoms in the various medication groups were obviously improved; which in the high-dose JPHS Granules group and the Dicetel group were improved more significantly, but the difference between these two groups had no statistical significance. Compared with the model group, the serum SP level in the high-dose, middle-dose JPHS granules groups and the Dicetel group was obviously decreased, the difference showed the statistical significance( $P<0.05$ ). Compared with the model group, serum ET level in the high-dose, middle-dose JPHS Granules groups and the Dicetel group was obviously increased, the difference showing statistical significance( $P<0.05$ ), in which, the difference between the high-dose and the middle-dose JPHS Granules groups had statistical significance( $P<0.05$ ), which indicating that the certain dose-dependence relation existed between them. **Conclusion** JPHS Granules can obviously improve the gastrointestinal function of IBS-D model rats, its effect mechanism may be related with decreasing the serum SP level and increasing the serum ET level.

**Key words:** irritable bowel syndrome; diarrhea; substance P; endothelin; invigorating spleen for eliminating dampness; chinese herbal medicine

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是常见的一种胃肠功能紊乱性疾病,是以腹痛、腹部不适、伴有大便性状改变和排便行为改变为特征的症候群<sup>[1]</sup>。临床分为腹泻型( IBS-D)、便秘型( IBS-C)、腹泻便秘交替型( IBS-A)和未定型( IBS-U)4个亚型,其中以 IBS-D 最为常见<sup>[2]</sup>。其发病机制尚不明确,目前公认为脑-肠轴障碍<sup>[3]</sup>及胃肠肽激素表达异常在 IBS-

D 的发生、发展中起着重要作用<sup>[4]</sup>。西医治疗本病主要采用对症治疗,以个体化为前提的综合治疗方法<sup>[5]</sup>。在合理饮食,避免生冷刺激等前提下配合药物治疗。虽见效迅速,便远期效果不佳,复发率高。而中医药治疗 IBS-D 已取得了良好效果,长期用药不良反应小,远期效果好<sup>[6]</sup>。本实验从实验大鼠血清胃肠肽激素 P 物质(SP)、内皮素(ET)水平的变化,探讨健脾化湿

颗粒治疗 IBS-D 可能的作用机制,现报道如下。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 清洁级 6 周龄 Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体重(170±20)g,合格证编号:Scxk(冀)2009-0004,由河北省实验动物中心提供;番泻叶加水浸泡煎煮浓缩至生药 0.6 g/mL 备用;健脾化湿颗粒:由炙黄芪、益智仁、炒白术、砂仁、防风、炒白芍、陈皮、炙甘草、茯苓、乌药组成,由承德医学院中药研究所分析室制备完成;匹维溴铵片(批号:624065),法国苏威制药公司生产,用蒸馏水配成 3 mg/mL 溶液。酶联免疫吸附测定(ELISA)ET、SP 试剂盒(批号:20120423),购自德国博士德生物工程有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组及造模** 适应性饲养 1 周后,平均分为对照组、模型组、健脾化湿颗粒低剂量组(低剂量组)、健脾化湿颗粒中剂量组(中剂量组)、健脾化湿颗粒高剂量组(高剂量组)和阳性对照(匹维溴铵组),每组各 10 只。IBS-D 动物模型采用乔氏法造模<sup>[7]</sup>。除对照组外,其余各组大鼠实验前 10 h 禁食,自由饮水。模型组、匹维溴铵组及低、中、高剂量组大鼠分别给予番泻叶煎剂(0.6 g/mL)灌胃(每只按 10 mL/kg),每日 1 次,在灌服完番泻叶煎剂 1 h 后即用粗制棉绳束缚大鼠的两后肢,使之行动不便,烦躁不安,造成一定的应激刺激,束缚 2 h,持续 2 周;而对照组全程只予以生理盐水灌胃(每只 10 mL/kg)。每天观察大鼠毛色、大便、饮食等情况。对照组大鼠便次少、大便成型、进食稳定、毛色光亮、活跃。而模型组大鼠皮毛松弛、无光泽、便质稀、便次多、进食量下降、饮水量增多、臭味明显。上述模型鼠变化情况与文献记载及临床 IBS-D 患者症状相一致,且上述症状持续存在,提示 IBS-D 动物模型成功。

**1.2.2 治疗方法** 健脾化湿颗粒低、中、高剂量组给药浓度分别为生药 1.5 g/mL、2.5 g/mL、4.0 g/mL,匹维溴铵组给药浓度为 3 mg/mL,均以每只 10 mL/kg 剂量灌胃给药。对照组和模型组给予等容量生理盐水。每天 1 次,连续 2 周。

**1.2.3 一般情况观察** 每天观察各组大鼠饮食、饮水、排泄、活动、精神状态、毛色等情况。

**1.2.4 血清中 SP、ET 水平测定方法** 实验结束后,各组大鼠乙醚麻醉,自腹主动脉取血 5 mL,采血时不加抗凝剂,室温,静置 1~2 h,1 000×g 离心 15 min,取上清液-20℃冰箱中分装保存备用。ELISA 检测血清中 SP、ET 水平,操作步骤严格按照试剂盒说明进行。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析,所有测定结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间计量数据的差异比较采用单因素方差分析。取  $\alpha=0.05$  为检验标准,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

本结果显示,IBS-D 模型大鼠血清 SP 水平显著高于对照组( $P<0.01$ ),匹维溴铵组、高剂量组、中剂量组、低剂量组与模型组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。高、中剂量组与匹维溴铵组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。提示健脾化湿颗粒可明显改善 IBS-D 模型大鼠血清 SP 水平,且有一定的剂量依赖关系。IBS-D 模型大鼠血清 ET 水平较对照组明显降低( $P<0.01$ ),各治疗组大鼠血清 ET 水平较模型组均增高,其中中、高剂量组差异有统计学意义( $P<0.01$ )。与匹维溴铵组比较,中、高剂量组效果明显,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。而低剂量组效果较差( $P<0.01$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠胃肠肽激素 SP、ET 表达比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	n	SP	ET
对照组	10	46.56±9.67 <sup>c</sup>	258.63±15.01 <sup>c</sup>
模型组	10	78.62±8.98 <sup>a</sup>	212.67±15.38 <sup>a</sup>
匹维溴铵组	10	58.88±7.34 <sup>nd</sup>	251.92±16.87 <sup>c</sup>
低剂量组	10	67.71±7.29 <sup>a</sup>	228.58±16.51 <sup>a</sup>
中剂量组	10	60.91±10.21 <sup>nd</sup>	242.58±16.31 <sup>bd</sup>
高剂量组	10	54.59±7.05 <sup>c</sup>	247.72±15.54 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与对照组比较;<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,<sup>d</sup>: $P<0.05$ ,与模型组比较。

## 3 讨论

近年来大量实验研究表明,IBS-D 的发病与胃肠肽激素水平异常密切相关<sup>[8]</sup>。胃肠肽种类繁多,其与神经系统一起调节消化器官的运动、分泌和吸收功能<sup>[9]</sup>。SP、ET 是两种重要的胃肠肽。SP 是第 1 个被确认的、双重分布的由 11 个氨基酸组成的多肽<sup>[10]</sup>,在肠道主要分布于近端小肠和结肠,它既可以激素的形式,亦可以神经递质形式参与胃肠道运动的调控。可促进胃肠平滑肌和括约肌收缩、胃肠蠕动,参与内脏痛觉反射及扩张内脏血管等功能。谢建群等<sup>[11]</sup>实验研究发现,IBS-D 模型大鼠血浆 SP 水平明显升高,治疗后血清 SP 水平明显下降;而有的学者临床研究发现 IBS 患者血浆 SP 未发现显著变化<sup>[12]</sup>。ET 是由 21 个氨基酸组成的活性多肽<sup>[13]</sup>,是一种神经递质和调节肽,在胃、空肠、回肠和结肠均有 ET 和 ET 的受体存在,其可使平滑肌收缩,参与胃肠节律运动调节。王丽华等<sup>[14]</sup>研究结果显示,脾气虚 IBS 组患者较对照组血清 ET 明显降低( $P<0.01$ ),致胃肠运动失调。但也有学者研究发现,IBS-D(湿热证)患者血清 ET 明显高于对照组,治疗后血清 ET 水平明显低于治疗前。

本实验研究发现,IBS-D 模型大鼠胃肠功能紊乱,便次多、便质稀同时血清 SP、ET 水平均有明显改变。其中 IBS-D 模型大鼠血清中 SP 水平明显升高,与对照组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。治疗后,健脾化湿各剂量组、匹维溴铵组大鼠血清中 SP 水平显著低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。IBS-D 模型大鼠血清中 ET 水平较对照组明显降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。各组治疗后血清 ET 水平较模型组均有增高。其中、高剂量组与匹维溴铵组 ET 水平升高最为明显。提示 IBS-D 模型大鼠发病机制可能与血清 SP、ET 水平表达异常有关。

IBS-D 属中医“泄泻”“痛泄”“久泄”等的范畴<sup>[15]</sup>。本病病位在肠,基本病机为肝郁脾虚、脾虚湿盛。健脾化湿颗粒在经验方健脾化湿汤基础上,通过现代工艺手段改变剂型,既保存了原有的疗效,又适应现代社会的用药理念。方中重用炙黄芪、益智仁,辅以炒白术、砂仁补气健脾和芳香化湿;防风辛能散肝,香能舒脾,风能胜湿止泻,为理脾引经之要药;陈皮、茯苓行气健脾,燥湿和胃;白芍养血敛阴,柔肝缓急,白芍配伍甘草又可缓急止痛。乌药行气止痛,全方紧紧抓住脾虚湿盛和肝气郁结环节,诸药配合紧密,健脾化湿,疏肝解郁,从而使肝气条达,脾胃升降功能恢复正常而腹痛、便溏症状消除。

综上所述,在改善 IBS-D 模型大鼠腹痛、便次增多等方面,健脾化湿颗粒对 IBS-D 大鼠具有很好的治疗效果,其作用机制可能是通过降低血清中 SP 水平,提高血清中 ET 水平,减弱神经介导的胃肠道运动与分泌,提高内脏痛阈,消除肠道过敏症状,改善腹痛或腹部不适、排便异常等症状而完成。(下转第 1210 页)

现 CD34 及 SCF 在 HB 组织中的表达明显高于正常肝组织,这可能与肿瘤新生血管、恶性程度有关,与 NSC 的关系有待进一步研究。CD56 是神经细胞黏附分子的一种糖蛋白,位于中枢和外周神经细胞及纤维膜表面,在神经系统的生长发育发挥重要作用。本实验发现 CD56 均表达于 HB 以及正常肝脏组织中成簇的神经纤维组织,二者在数量、分布未见明显差异。

HB 是儿童最常见的肝脏原发恶性肿瘤,其最基本的治疗方法是手术切除或通过化疗增加可切除的 HB 病例数<sup>[16]</sup>。但部分病例因原发性、继发性或多药耐药性而对化疗不敏感,预后极差。NSC 理论在一定程度上为治疗提供了新的视角,鉴定和筛选 HB 中 NSC 并了解表面标记组合的相关调控机制和信号通路,对发现潜在的药物靶点,进而为临床治疗、提高治愈率和长期存活率都具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Jiang W, Peng J, Yue Zhang Y, et al. The implications of cancer stem cells for cancer therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12):16636-16657.
- [2] Horton JD, Lee S, Brown SR, et al. Survival trends in children with hepato-blastoma[J]. *Pediatr Surg Int*, 2009, 25(5):407-441.
- [3] 张伟令, 张谊, 黄东生, 等. 儿童晚期肝母细胞瘤综合治疗的疗效观察[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2013, 28(7):521-524.
- [4] 张法标, 王义, 丛文铭, 等. 儿童期及青春期肝细胞癌临床病理特点及影响术后生存率的多因素分析[J]. *中华小儿外科杂志*, 2006, 27(1):1-5.
- [5] 付文广, 梁天成, 雷正, 等. 肝卵圆细胞与原发肝癌的相关性研究[J]. *泸州医学院学报*, 2012, 35(1):23-26.
- [6] Fiegel HC, Gluer S, Gluer B, et al. Stem-like cells in human hepatoblastoma[J]. *Histochem Cytochem*, 2004, 52(11):1495-1501.
- [7] 张守华, 廖彩仙, 张春兴, 等. 肝纤维化小鼠骨髓源性肝干细胞动员及确定实验研究[J]. *广东医学*, 2007, 28(10):1577-1579.
- [8] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2):153-166.
- [9] Kikuchi H, Miyazaki S, Setoguchi T, et al. Rapid relapse after resection of a sunitinib-resistant gastrointestinal stromal tumor harboring a secondary mutation in exon 13 of the c-KIT gene[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(9):4105-4109.
- [10] Agarwal S, Kazi JU, Rönnstrand L. Phosphorylation of the activation loop tyrosine 823 in c-kit is crucial for cell [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(31):22460-22468.
- [11] Gao J, Dang Y, Sun N, et al. C-KIT mutations were closely associated with the response to imatinib in Chinese advanced gastrointestinal stromal tumor patients[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5):3039-3045.
- [12] Sun J, Pedersen M, Ronnstrand L, et al. The D816V mutation of c-kit circumvents a requirement for Src family kinases in c-kit signal transduction[J]. *J Biol Chem*, 2009, 28(17):11039-11047.
- [13] Du Z, Cai H, Ye Z, et al. Optimization of SCF feeding regimen for ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem cells[J]. *J Biotechnol*, 2012, 164(2):211-219.
- [14] Tajima F, Tsuchiya H, Nishikawa K, et al. Hepatocyte growth factor mobilizes and recruits hematopoietic progenitor cells into liver through a stem cell factor-mediated mechanism[J]. *Hepatol Res*, 2010, 40(7):711-719.
- [15] Jiang JT, Zhang LF, Zhou B, et al. Relationships of uPA and VEGF expression in esophageal cancer and microvascular density with tumorous invasion and metastasis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(7):3379-3383.
- [16] 李长春, 金先庆. 儿童肝母细胞瘤诊治进展[J]. *重庆医学*, 2007, 36(15):1481-1482.

(收稿日期:2013-09-18 修回日期:2013-11-25)

(上接第 1207 页)

#### 参考文献:

- [1] 中华医学会消化病学分会. 肠易激综合症的共识意见[J]. *中华内科杂志*, 2003, 42(9):669-670.
- [2] 中华医学会. 第一届全国肠易激综合症学术会议纪录[J]. *中华消化杂志*, 2003, 23(7):428-428.
- [3] 胡敏, 刘诗. 肠易激综合症[J]. *临床消化病杂志*, 2012, 24(2):103-104.
- [4] 胡俊, 胡团敏, 何文钦. 黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合症大鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-10 表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(21):2188-2191.
- [5] 毛丽娟, 韩树堂. 肠易激综合症中西医诊疗进展[J]. *中西医结合研究*, 2011, 3(1):28-30.
- [6] 李熠萌, 蔡滢. 腹泻型肠易激综合症的中医研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2009, 11(4):541-544.
- [7] 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.
- [8] Spinelli A. Irritable bowel syndrome[J]. *Clin Drug Investig*, 2007, 27(1):15-33.
- [9] 吕妍, 李丹, 唐方. 藿香单品对腹泻型肠易激综合症大鼠胃肠激素的影响[J]. *中医杂志*, 2010, 51(5):237-239.
- [10] 熊观瀛, 林琳. P 物质与肠易激综合症[J]. *国外医学内科学分册*, 2003, 30(6):245-247.
- [11] 谢建群, 郑昱, 吴大正, 等. 疏肝饮对腹泻型肠易激综合症大鼠血管活性肠肽和 P 物质的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2004, 18(3):291-293.
- [12] 杨云生, 张万岱. 肠易激综合症血浆及乙状结肠黏膜中 CCK 及 SP 的含量[J]. *新消化病学杂志*, 1997, 5(7):437-438.
- [13] 石君杰, 戴玉英, 徐发莹. 逍遥散对肠易激综合症大鼠作用的实验研究[J]. *福建中医药*, 2007, 38(6):54-56.
- [14] 王丽华, 董宏生, 李颖辰, 等. 肠易激综合症中医证型血中胃肠激素水平初探[J]. *中医药学刊*, 2005, 23(9):1618-1619.
- [15] 田力男. 浅论腹泻型肠易激综合症的中医治疗[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2011, 9(10):139-140.

(收稿日期:2013-10-10 修回日期:2013-12-07)