

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研究项目(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。

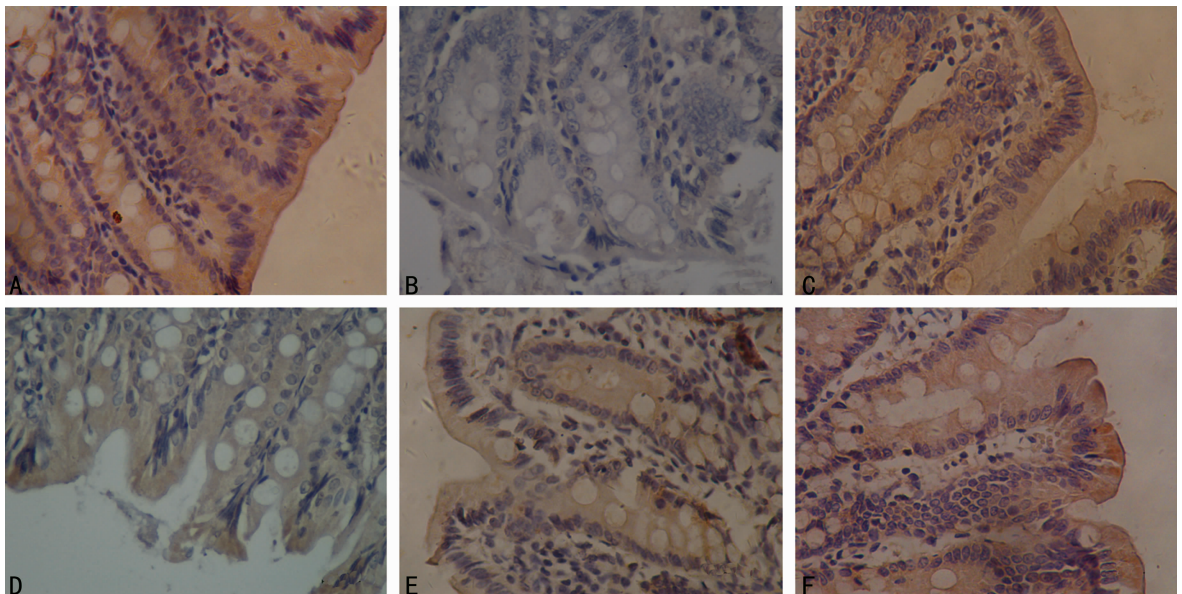
2 结果

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同教授经验方,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, O'Shaughnessy 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。