

健脾化湿颗粒对D-IBS模型大鼠脑中5-HT及5-HTR3, 5-HTR4表达的影响

王迎寒, 赵素微, 陈光辉, 刘玉玲, 胡楠, 杜海燕, 靳继伟, 于海龙, 张晓峰

王迎寒, 赵素微, 陈光辉, 刘玉玲, 胡楠, 杜海燕, 靳继伟, 于海龙, 张晓峰, 河北省中药研究与开发重点实验室 承德医学院中药研究所 河北省承德市 067000

王迎寒, 讲师, 主要从事中药药理学(消化药理)研究。

河北省教育厅优秀青年基金资助项目, No. YQ2014002

作者贡献分布: 此课题由王迎寒负责; 张晓峰指导; 王迎寒进行文献检索及实验设计; 实验操作及数据采集由陈光辉、王迎寒、赵素微、刘玉玲、胡楠、杜海燕、靳继伟及于海龙共同完成; 数据分析及论文撰写由王迎寒与陈光辉完成; 实验指导及论文修改由张晓峰完成。

通讯作者: 张晓峰, 教授, 硕士生导师, 067000, 河北省承德市安远路, 河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院中药研究所. xiaofengzhang999@163.com
电话: 0314-2291142

收稿日期: 2015-10-16

修回日期: 2015-12-07

接受日期: 2015-12-15

在线出版日期: 2016-01-18

Influence of Jianpi Huashi granule on 5-HT, 5-HTR3, and 5-HTR4 expression in the brain of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

Ying-Han Wang, Su-Wei Zhao, Guang-Hui Chen, Yu-Ling Liu, Nan Hu, Hai-Yan Du, Ji-Wei Jin, Hai-Long Yu, Xiao-Feng Zhang

Ying-Han Wang, Su-Wei Zhao, Guang-Hui Chen, Yu-Ling Liu, Nan Hu, Hai-Yan Du, Ji-Wei Jin, Hai-Long Yu, Xiao-Feng Zhang, Key Laboratory for Research and Development of Chinese Traditional Medicine of Hebei Province; Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China

Supported by: Excellent Youth Foundation of Hebei Educational Committee, No. YQ2014002

Correspondence to: Xiao-Feng Zhang, Professor, Key Laboratory for Research and Development of Chinese Traditional Medicine of Hebei Province; Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical University, Anyuan Road, Chengde 067000, Hebei Province, China. xiaofengzhang999@163.com

Received: 2015-10-16

Revised: 2015-12-07

Accepted: 2015-12-15

Published online: 2016-01-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of Jianpi Huashi granule on 5-hydroxytryptamine (5-HT), 5-hydroxytryptamine receptor 3 (5-HTR3), and 5-HTR4 expression in the brain of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS) to evaluate their implications in the therapeutic effects of Jianpi Huashi granule in improving colonic motility and visceral sensitivity.

METHODS: A rat model of D-IBS was established by intragastric administration of Sennae decoction combined with restraint stress. Rats were divided into several groups. Jianpi Huashi granule was given to rats in Jianpi Huashi groups, Pinaverium bromide tablets to rats in the positive group and water to the other groups. ELISA was used to detect the content of 5-HT in the hippocampus. Immunohistochemistry assay was used to detect the expression of 5-HT, 5-HTR3, and 5-HTR4 in the prefrontal cortex, hippocampus, and hypothalamus. Reverse transcription-

■背景资料

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是临床常见病多发病, 多发于青壮年, 病因病机不明, 目前尚无专用药物, 临床治疗时多采用对症治疗, 可缓解症状, 但易复发, 严重影响患者生活质量, 且耗费大量医疗资源。如何阐明IBS的病因病机, 研制优质高效的专用药, 已成为科研工作亟待解决的关键问题。

■同行评议者

刘平, 教授, 上海高校中医内科学E-研究院

■ 研究前沿

IBS的病因及发病机制尚未完全阐明, 越来越多的研究表明, 脑-肠轴功能失调在其发病中起重要作用。其中5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)及其受体的研究是众多的研究热点之一, 然而在相关报道中以胃肠道内5-HT及其受体的表达较为多见, 高级中枢中的相关报道较少。

polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of 5-HTR3 and 5-HTR4 in the hippocampus.

RESULTS: In the D-IBS model group, the content of 5-HT in the hippocampus (327.30 ± 22.35 vs 265.33 ± 13.60) and the expression of 5-HT in the prefrontal cortex, hippocampus, hypothalamus (0.16 ± 0.02 vs 0.08 ± 0.01 , 0.19 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.01 , 0.17 ± 0.02 vs 0.08 ± 0.01 , $P < 0.01$ for all) were increased significantly compared to the normal group. The expression of 5-HTR3 (0.29 ± 0.02 vs 0.10 ± 0.01 , 0.23 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.01 , 0.22 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.02 , $P < 0.01$ for all) and 5-HTR4 (0.25 ± 0.02 vs 0.11 ± 0.01 , 0.28 ± 0.02 vs 0.10 ± 0.02 , 0.27 ± 0.02 vs 0.11 ± 0.02 , $P < 0.01$ for all) in the prefrontal cortex, hippocampus and hypothalamus, and the expression of 5-HTR3 and 5-HTR4 mRNAs (0.54 ± 0.01 vs 0.17 ± 0.05 , 0.73 ± 0.08 vs 0.10 ± 0.02 , $P < 0.01$ for all) in the hippocampus were significantly increased in the model group compared with the normal group. After treatment, the contents of 5-HT in the hippocampus in the positive control group, medium- and high-dose Jianpi Huashi granule groups were significantly decreased (298.92 ± 12.16 , 286.29 ± 24.43 , 279.86 ± 20.05 vs 327.30 ± 22.35 , $P < 0.05$, $P < 0.01$), the expression of 5-HT in the prefrontal cortex in medium- and high-dose Jianpi Huashi granule groups was significantly reduced (0.12 ± 0.01 , 0.11 ± 0.01 vs 0.16 ± 0.02 , $P < 0.01$ for both), and the expression of 5-HT in the hippocampus and hypothalamus in the positive control group, medium- and high-dose Jianpi Huashi granule groups was significantly decreased. The expression of 5-HTR3 mRNA in the hippocampus in all treatment groups was significantly reduced.

CONCLUSION: Jianpi Huashi granule regulates colonic motility and visceral sensitivity in rats with D-IBS possibly by modulating the expression of 5-HT, 5-HTR3, and 5-HTR4 in the brain.

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; 5-hydroxytryptamine; 5-hydroxytryptamine receptor 3; 5-hydroxytryptamine receptor 4; Jianpi Huashi granule

Wang YH, Zhao SW, Chen GH, Liu YL, Hu N, Du HY, Jin JW, Yu HL, Zhang XF. Influence of Jianpi

Huashi granule on 5-HT, 5-HTR3, and 5-HTR4 in the brain of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(2): 255-261 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/255.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i2.255>

摘要

目的: 从前额叶皮质、海马及下丘脑中5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)和5-羟色胺受体3(5-hydroxytryptamine receptor 3, 5-HTR3), 5-羟色胺受体4(5-HTR4)角度探讨健脾化湿颗粒改善腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)模型大鼠结肠运动和内脏敏感性的作用机制。

方法: 采用番泻叶灌胃结合束缚应激法建立D-IBS大鼠模型, 应用健脾化湿颗粒进行干预, 采用酶联免疫法(ELISA)检测大鼠海马中5-HT含量, 采用免疫组织化学法检测前额叶皮质、海马及下丘脑中5-HT、5-HTR3、5-HTR4阳性表达, 采用逆转录-聚合酶链反应法检测海马中5-HTR3 mRNA和5-HTR4 mRNA的表达水平。

结果: 与正常组相比, 模型组海马中5-HT含量(327.30 ± 22.35 vs 265.33 ± 13.60), 前额叶皮质、海马、下丘脑中5-HT阳性表达(0.16 ± 0.02 vs 0.08 ± 0.01 , 0.19 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.01 , 0.17 ± 0.02 vs 0.08 ± 0.01)明显升高($P < 0.01$); 前额叶皮质、海马、下丘脑中5-HTR3阳性表达(0.29 ± 0.02 vs 0.10 ± 0.01 , 0.23 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.01 , 0.22 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.02)及5-HTR4阳性表达(0.25 ± 0.02 vs 0.11 ± 0.01 , 0.28 ± 0.02 vs 0.10 ± 0.02 , 0.27 ± 0.02 vs 0.11 ± 0.02)明显升高($P < 0.01$); 海马中5-HTR3 mRNA和5-HTR4 mRNA的表达(0.54 ± 0.01 vs 0.17 ± 0.05 , 0.73 ± 0.08 vs 0.10 ± 0.02)显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比, 阳性对照组、中、高剂量组海马中5-HT含量(298.92 ± 12.16 、 286.29 ± 24.43 、 279.86 ± 20.05 vs 327.30 ± 22.35)显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), 中、高剂量组前额叶皮质中5-HT表达(0.12 ± 0.01 、 0.11 ± 0.01 vs 0.16 ± 0.02)显著下降($P < 0.01$), 阳性对照组、中、高剂量组海马、下丘脑中5-HT表达显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$); 各治疗组前额叶皮质、海马、下丘脑中5-HTR3表达及5-HTR4表达下降显著($P < 0.05$, $P < 0.01$); 各治疗组海马中5-HTR3 mRNA表达及5-HTR4 mRNA表达

显著降低($P<0.05$, $P<0.01$).

结论: 健脾化湿颗粒可能通过下调脑中5-HT、5-HTR3、5-HTR4表达来改善D-IBS模型大鼠结肠运动和内脏敏感性.

© 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 腹泻型肠易激综合征; 5-羟色胺; 5-羟色胺3受体; 5-羟色胺4受体; 健脾化湿颗粒

核心提示: 通过灌服番泻叶联合束缚应激建立腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome)大鼠模型, 用健脾化湿颗粒进行干预, 检测各组大鼠不同脑区5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)和5-羟色胺受体3受体(5-hydroxytryptamine receptor 3, 5-HTR3)、5-羟色胺受体4(5-HTR4)的表达, 从而探讨健脾化湿颗粒改善模型大鼠结肠运动功能及降低内脏敏感性的作用机制与其调节中枢5-HT及5-HT3、5-HT4受体的表达有关.

王迎寒, 赵素微, 陈光辉, 刘玉玲, 胡楠, 杜海燕, 靳继伟, 于海龙, 张晓峰. 健脾化湿颗粒对D-IBS模型大鼠脑中5-HT及5-HTR3, 5-HTR4表达的影响. 世界华人消化杂志. 2016; 24(2): 255-261
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/255.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i2.255>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是临床常见的消化系统疾病, 其病位在结肠, 临床上根据其症状不同将其分为腹泻型、便秘型、腹泻-便秘两者混合或交替型^[1], 其中以腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)尤为多见, 临床以腹痛, 腹泻为主, 患者常伴有心烦、焦虑、抑郁等精神症状. 迄今为止, D-IBS病因及发病机制尚未完全阐明. 近年来随着神经胃肠病学的发展, 研究^[2]认为D-IBS与脑-肠轴功能紊乱有关, 并试图从脑-肠互动的角度揭示D-IBS的病因及发病机制. 脑-肠轴功能的实现依赖于各种脑-肠肽及其受体的正常表达, 如果表达异常, 则产生一系列临床症状. 目前关于脑-肠轴中枢部分的研究多以参与感觉、内脏活动的调节及情绪、行为、学习和记忆等关系密切的边缘系统为主, 包括: 前额叶、下丘脑、海马、扣带回等. 前期实验^[3-5]证实, 健脾化湿颗粒可

改善采用灌服番泻叶联合束缚应激方法建立的D-IBS模型大鼠结肠运动和内脏敏感性, 且对D-IBS模型大鼠中枢c-fos、促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin releasing factor, CRF)、CRF受体1(CRF receptor 1, CRFR1)、结肠5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、CRF和CRF受体1(CRF receptor 1, CRFR1)等表达有调节作用. 本实验继续从中枢5-HT、5-HT3受体1(5-hydroxytryptamine receptor 3, 5-HTR3)、5-HT4受体1(5-HTR4)角度来研究其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠72只, 体质量 250 ± 20 g, SPF级, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(京)2009-0004. 饲养于承德医学院屏障环境动物实验室, 实验前1 wk动物以适应实验环境. 番泻叶(安国市昌达中药材饮片有限公司, 批号: 1009002)捡择后置于沸水中浸泡25 min, 双层纱布过滤, 滤液减压浓缩成生药含量为0.3 g/mL. 健脾化湿颗粒(承德医学院中药研究所制备). 得舒特(法国苏威特公司, 批号: 627414). Excelsior™ ES自动组织脱水机(美国Thermo Scientific公司); Histocentre 3™组织包埋机(美国Thermo Scientific公司); RM2125型常规轮转石蜡切片机(德国Leica公司); TK-218型恒温摊片烤片机(湖北泰维医疗科技有限责任公司); BH-2型显微镜及摄像装置(日本Olympus公司); Multiskan MK 3酶标仪(Thermo Labsystems); DU800紫外可见分光光度计(美国CKMAN COULTER公司); SORVALL Biofuge fresco冷冻离心机(德国Kendro Labrotary公司); DYY-6B型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂); 美国Biorad icycler PCR仪(icycler); 5-HT酶联免疫分析试剂盒(上海索宝生物科技有限公司); 兔抗鼠5-HT抗体(北京博奥森生物技术有限公司); 兔抗鼠5-HTR3抗体(北京博奥森生物技术有限公司); 兔抗鼠5-HTR4抗体(北京博奥森生物技术有限公司); 兔Streptavidin-HRP试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司); TaKaRa RNA PCR Kit(大连宝生物工程有限公司), 5-HTR3、5-HTR4、 β -actin引物合成(上海英潍捷基贸易有限公司); DNA Marker(北京天根生化科技有限公司); 6×DNA电泳loading buffer(北京天根

■ 相关报道

孙刚等研究发现, 5-HT在脊髓水平表达异常可能与内脏敏感性变化有关, 但在腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)患者的高级中枢5-HT是否异常表达和如何参与调节内脏高敏感、腹痛和腹泻等症状的机制, 尚未阐明.

■ 创新亮点

本文通过用健脾化湿颗粒干预D-IBS模型大鼠, 检测不同脑区5-HT及5-羟色胺受体3受体(5-HTR3)、5-羟色胺受体4(5-HTR4)表达, 初步揭示健脾化湿颗粒改善结肠运动及内脏敏感性的作用机制可能与其调节5-HT及5-HTR3、5-HTR4受体有关。

生化科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组: 大鼠随机分成六组, 每组12只, 分别为正常组、模型组、阳性对照组、健脾化湿颗粒低、中、高剂量组。

1.2.2 动物模型的制备与处理: 参照文献[6]的方法, 实验前禁食不禁水, 除正常组其余各组大鼠前14 d均予以番泻叶煎剂(0.3 g生药/mL)灌胃; 后14 d在灌服完番泻叶煎剂后用透明胶带束缚大鼠前上肢, 胸部及肩部持续2 h, 1次/d。束缚2 h后模型组予以生理盐水灌胃; 健脾化湿颗粒(低、中、高)剂量组予以健脾化湿颗粒(0.25、0.50、1.00 g/mL)剂量灌胃; 阳性对照组予以得舒特(3 mg/mL)灌胃; 正常组全程只予以生理盐水灌胃, 1次/d。且各溶液灌胃量均为10 mL/kg。

1.2.3 标本采集与预处理: 药物干预14 d后, 各组大鼠均以腹腔注射10%水合氯醛麻醉处死, 迅速取脑组织, 置于冰冷的生理盐水中, 冲洗干净黏附的血液, 分离出前额叶皮质、海马、下丘脑, 用滤纸吸干水后, 部分用多聚甲醛固定用于免疫组织化学检测; 部分置于-80 °C冰箱里冷冻保存, 用于酶联免疫检测; 其余部分装入用DEPC水处理过的冻存管中即刻投入液氮中保存, 用作采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测。

1.2.4 指标检测: (1)结肠中5-HT含量检测: 取储存于-80 °C冰箱的海马组织约60 mg, 加PBS[9 mL/(g·组织)], 研磨后离心, 取上清, 用ELISA试剂盒检测结肠中5-HT水平; (2)前额叶皮质、海马及下丘脑中5-HT、5-HTR3、5-HTR4表达的检测: 取经多聚甲醛固定的脑组织, 石蜡包埋后切片进行免疫组织化学法染色。操作步骤严格按照P物质(substance P, SP)免疫组织化学试剂盒说明书进行, DAB显色, 其中PBS作为阴性对照。以胞浆中出现棕黄色反应物为阳性反应, 棕黄色越深, 说明阳性反应越强, 阴性对照无棕黄色的反应物。采用Image-pro plus(IPP)图像分析软件对5-HT、5-HTR3、5-HTR4的表达进行半定量分析。每例以随机选取6个不相互重叠的400×视野的平均光密度值(OD/Area)值作为该例的测量值; (3)RT-PCR法检测5-HTR3 mRNA、5-HTR4 mRNA表达: 称取80-100 mg

超低温冷冻的组织样品, 用TRIzol一步法提取总RNA并测定浓度, 取总量为2 μg的RNA进行反转录, 体系为20 μL, 反转录条件如下: 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min。在PCR仪中进行扩增, 反应体系为20 μL, 反应条件如下: 94 °C预变性2 min, 94 °C变性30 s, β-actin 56 °C(5-HTR3 59.4 °C, 5-HTR4 58 °C)退火30 s, 72 °C延伸45 s, 共30循环。5-HTR3引物: 上游引物: 5'-ATCAATGAGTTTGTGGACGTGG-3', 下游引物: 5'-GCGGATGACCACGTAGAAGT-3' (扩增长度354 bp); 5-HTR4引物: 上游引物: 5'-CCCTGGATAGGTATTATGCCATC-3', 下游引物: 5'-GTCTTGGCTGCTTTGGTCTC-3' (扩增长度436 bp); β-actin引物: 上游引物: 5'-GAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3', 下游引物: 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3' (扩增长度452 bp), 实验重复3次, 以β-actin作为内参。取5 μL PCR反应产物于2%琼脂糖凝胶上进行电泳, 电压120 V, 用紫外透射仪观察并摄取图像。用Quantity One 4.6.2凝胶定量分析软件进行半定量分析, 测定图像光密度值。各目的基因的光密度与β-actin条带光密度的比值作为mRNA表达水平参数。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行数据分析, 计量资料以mean±SD表示, 各组间差异均采用单因素方差分析中两两比较。若方差齐则采用LSD检验, 若方差不齐采用Dunnett's T3检验, 以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马中5-HT含量及前额叶皮质、海马及下丘脑中5-HT表达的变化 与正常组相比, 模型组海马中的5-HT含量显著增加(P<0.01); 与模型组相比, 除低剂量组外, 其他各治疗组海马中的5-HT含量均显著降低(P<0.05, P<0.01); 与阳性药组相比, 高剂量组海马中5-HT的含量明显降低(P<0.05)(表1)。

与正常组相比, 模型组前额叶皮质、海马、下丘脑中5-HT的阳性表达均显著增加(P<0.01); 与模型组相比, 各治疗组5-HT的阳性表达均有不同程度的降低, 中、高剂量组各脑区5-HT的阳性表达均显著降低(P<0.01); 与阳性药组比较, 中、高剂量组各脑区5-HT的阳性

表 1 各组大鼠海马中5-HT含量及前额叶皮质、海马及下丘脑中5-HT表达的变化 (mean ± SD)

分组	剂量 (g/kg)	海马中5-HT含量 (pg/mL)	5-HT表达		
			前额叶皮质	海马	下丘脑
正常组	—	265.33 ± 13.60	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
模型组	—	327.30 ± 22.35 ^b	0.16 ± 0.02 ^b	0.19 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.02 ^b
阳性药组	0.03	298.92 ± 12.16 ^c	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01 ^c	0.14 ± 0.01 ^c
低剂量组	2.50	311.46 ± 25.92	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.02
中剂量组	5.00	286.29 ± 24.43 ^d	0.12 ± 0.01 ^{de}	0.14 ± 0.01 ^{de}	0.12 ± 0.01 ^{df}
高剂量组	10.00	279.86 ± 20.05 ^{de}	0.11 ± 0.01 ^{de}	0.12 ± 0.02 ^{df}	0.11 ± 0.01 ^{df}

^b*P*<0.01 vs 正常组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 模型组; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs 阳性药组。5-HT: 5-羟色胺。

表 2 各组大鼠前额叶皮质、海马及下丘脑中5-HTR3、5-HTR4的表达 (mean ± SD)

分组	剂量 (g/kg)	5-HTR3			5-HTR4		
		前额叶皮质	海马	下丘脑	前额叶皮质	海马	下丘脑
正常组	—	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.02
模型组	—	0.29 ± 0.02 ^b	0.23 ± 0.02 ^b	0.22 ± 0.02 ^b	0.25 ± 0.02 ^b	0.28 ± 0.02 ^b	0.27 ± 0.02 ^b
阳性药组	0.03	0.20 ± 0.02 ^d	0.17 ± 0.02 ^d	0.15 ± 0.01 ^d	0.18 ± 0.01 ^d	0.21 ± 0.01 ^d	0.20 ± 0.01 ^d
低剂量组	2.50	0.24 ± 0.01 ^d	0.19 ± 0.02 ^c	0.18 ± 0.02 ^c	0.21 ± 0.02 ^c	0.25 ± 0.01 ^c	0.24 ± 0.02
中剂量组	5.00	0.19 ± 0.01 ^{de}	0.16 ± 0.02 ^d	0.14 ± 0.02 ^{de}	0.17 ± 0.01 ^d	0.19 ± 0.01 ^{de}	0.18 ± 0.02 ^d
高剂量组	10.00	0.15 ± 0.02 ^{df}	0.13 ± 0.01 ^{df}	0.12 ± 0.01 ^{df}	0.14 ± 0.01 ^{df}	0.16 ± 0.02 ^{df}	0.13 ± 0.02 ^{df}

^b*P*<0.01 vs 正常组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 模型组; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs 阳性药组。5-HTR3: 5-羟色胺受体3受体; 5-HTR4: 5-羟色胺受体4。

表达均显著降低(*P*<0.05, *P*<0.01); 与低剂量组相比, 中、高剂量组各脑区5-HT的阳性表达显著降低(*P*<0.01)。

2.2 各组大鼠前额叶皮质、海马及下丘脑中5-HTR3、5-HTR4表达的变化 与正常组相比, 模型组大鼠各脑区5-HTR3阳性表达显著升高(*P*<0.01); 与模型组相比, 治疗组大鼠各脑区5-HTR3阳性表达显著降低(*P*<0.05, *P*<0.01); 与阳性药组相比, 中剂量组大鼠前额叶皮质、下丘脑中5-HTR3阳性表达显著降低(*P*<0.05), 高剂量组大鼠各脑区5-HTR3阳性表达显著降低(*P*<0.01)(表2)。

与正常组相比, 模型组大鼠各脑区5-HTR4阳性表达显著升高(*P*<0.01); 与模型组相比, 除低剂量组大鼠下丘脑外, 其他治疗组各脑区5-HTR4阳性表达显著降低(*P*<0.05, *P*<0.01); 与阳性药组相比, 中剂量组大鼠海马中5-HTR4阳性表达显著降低(*P*<0.05), 高剂量组大鼠各脑区5-HTR4阳性表达显著降低(*P*<0.01)。

2.3 各组大鼠海马中5-HTR3 mRNA、5-HTR4 mRNA表达水平的变化 与正常组相比, 模型组

大鼠海马中5-HTR3 mRNA、5-HTR4 mRNA表达显著增高(*P*<0.01); 与模型组相比, 各治疗组大鼠5-HTR3 mRNA、5-HTR4 mRNA表达显著降低(*P*<0.05, *P*<0.01); 与阳性药组相比, 高剂量组5-HTR3 mRNA表达显著下降(*P*<0.01), 中、高剂量组5-HTR4 mRNA表达显著降低(*P*<0.05, *P*<0.01)(表3, 图1)。

3 讨论

IBS是临床常见的消化系统疾病, 西医多采用对症治疗, 能迅速起效, 缓解某些症状, 但远期效果欠佳, 停药后易复发。中医学无IBS之病名, 往往根据其不同的临床表现, 将其归属于“腹泻”、“腹痛”、“郁证”等范畴, 认为该病的发生与肝、脾、肾关系密切, 治疗时以不同病机为据, 标本兼治, 临床效果良好, 且不良反应小。健脾化湿颗粒源于临床验方, 具有理气健脾, 化湿止泻之效, 主要用来治疗D-IBS, 疗效确切。

5-HT是一种广泛分布在中枢神经系统和胃肠道的单胺类神经递质, 约有95%的5-HT来

应用要点

健脾化湿颗粒来源于临床验方, 具有理气健脾, 祛湿止泻的作用, 适用于D-IBS, 本文为该方更好的临床治疗D-IBS提供理论依据。

■ 名词解释

5-羟色胺(5-HT): 最早是从血清中发现的, 又名血清素, 广泛存在于哺乳动物组织中, 特别在大脑皮层及神经突触内含量很高, 他也是一种抑制性神经递质。在外周组织, 5-羟色胺是一种强血管收缩剂和平滑肌收缩刺激剂。

表 3 各组大鼠海马中5-HTR3 mRNA, 5-HTR4 mRNA的表达 (mean ± SD)

分组	剂量(g/kg)	5-HTR3 mRNA	5-HTR4 mRNA
正常组	—	0.17 ± 0.05	0.10 ± 0.02
模型组	—	0.54 ± 0.01 ^b	0.73 ± 0.08 ^b
阳性药组	0.03	0.40 ± 0.03 ^d	0.38 ± 0.05 ^d
低剂量组	2.50	0.45 ± 0.03 ^c	0.55 ± 0.03 ^{df}
中剂量组	5.00	0.33 ± 0.06 ^d	0.44 ± 0.06 ^{de}
高剂量组	10.00	0.27 ± 0.06 ^{df}	0.26 ± 0.04 ^{df}

^b*P*<0.01 vs 正常组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 模型组; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs 阳性药组。5-HTR3: 5-羟色胺受体3受体; 5-HTR4: 5-羟色胺受体4。

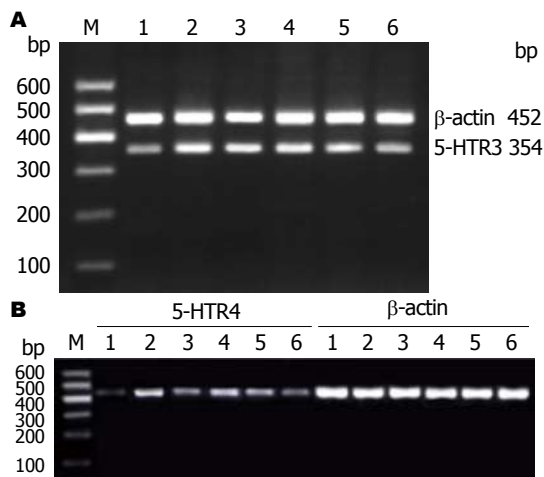


图 1 5-HTR3 mRNA、5-HTR4 mRNA的表达。A: 5-HTR3 mRNA的表达; B: 5-HTR4 mRNA的表达。1: 正常组; 2: 模型组; 3: 阳性对照组; 4: 低剂量组; 5: 中剂量组; 6: 高剂量组。5-HTR3: 5-羟色胺受体3; 5-HTR4: 5-羟色胺受体4。

源于肠道, 其中90%合成、分布、储存在肠嗜铬细胞(enterochromaffin cell, EC)中, 10%存在于ENS中, 参与胃肠感觉、运动和分泌功能的调节。其余5%存在于中枢5-HT能神经元, 参与心血管、精神情感、痛觉、觉醒-睡眠周期、神经内分泌等活动的调节。研究表明, 在正常状态下EC细胞能够向肠道固有层及肠腔自发的释放一定量的5-HT, 但当肠道受到刺激时, EC细胞释放大量的5-HT, 而5-HT能够增强CNS与胃肠道之间神经投射的敏感性, 降低内脏敏感的阈值, 从而产生内脏高敏感。有研究^[7]表明, 5-HT能使IBS患者的肠道运动加快、内脏敏感性增加及对体液的吸收减少, 调控胃肠道的感觉、运动、分泌等功能, 故与IBS患者腹泻、腹痛及内脏感觉异常等症状密切相关。夏頔等^[8]研究发现, D-IBS和C-IBS患者回盲部黏膜中5-HT的表达明显高于正常组, 推测5-HT的改变可能与肠动力改变、内分泌异

常和内脏敏感性增高有关。邹百仓等^[9]研究发现, D-IBS和C-IBS模型大鼠的下丘脑和海马中5-HT阳性表达均明显增加, 在消化系中D-IBS模型大鼠5-HT阳性表达明显增加, 且在小肠和空肠处多于C-IBS组, 可能是由于IBS不同亚型消化系或中枢中的5-HT受体表达和分布不同, 原因有待进一步研究。孙刚等^[10]研究发现, 5-HT在脊髓水平表达异常可能与内脏敏感性变化有关, 但在IBS患者的高级中枢5-HT是否异常表达和如何参与调节内脏高敏感、腹痛和腹泻等症状的机制, 尚未阐明。

5-HT生理或病理作用的发挥需要有相应的受体介导, 目前已发现14种5-HT受体亚型, 其中5-HTR3、5-HTR4与IBS关系最为密切。5-HTR3是一种配体门控阳离子通道, 为突触后受体, 激活后可产生一系列效应, 包括细胞膜的去极化和增加细胞内Ca²⁺浓度, 兴奋中枢和外周神经元, 调节神经递质的释放。通过释放于局部的5-HT作用于5-HTR3, 可调控肠肌间神经元的快速内向电流, 其激活可以导致Na⁺、Ca²⁺内流、K⁺外流, 从而使突触后神经元去极化, 促进兴奋或抑制神经递质的释放, 进而导致平滑肌收缩或者舒张。研究^[11]显示D-IBS患者结肠黏膜中5-HT及5-HTR3含量均高于健康对照者。在D-IBS患者中5-HT主要通过5-HTR3结合, 从而导致内脏高敏感和腹部不适等肠道功能异常^[12]。石君杰等^[13]的研究发现IBS模型大鼠结肠黏膜中5-HTR3含量明显高于空白组。

5-HTR4是一种G蛋白偶联受体, 可激活腺苷酸环化酶, 促进环磷酸腺苷cAMP的产生, 进一步激活cAMP依赖性蛋白激酶A, 引起K⁺通道的关闭, 使膜去极化, 开放电压敏感性Ca²⁺通道, 随着钙离子内流的增加, 进一步激

发其他在胃肠道运动和感觉方面起重要作用的神经递质的释放, 如降钙素基因相关肽、SP等, 影响胃肠道动力及内脏敏感性^[14]。研究^[15]显示, D-IBS模型大鼠结肠黏膜肌层5-HTR4阳性表达量明显低于空白组; 但亦有研究^[16]结果显示与对照组相比, IBS模型组大鼠结肠内5-HTR4 mRNA及其蛋白的相对表达量都减少, 其可能的原因是由于模型大鼠的5-HT分泌增多, 进而导致5-HTR4发生类似于脱敏或超敏反应。

本课题组前期药效学实验^[3-5]结果显示, 健脾化湿颗粒可以降低D-IBS大鼠结肠运动及内脏敏感性, 其作用机制可能与降低结肠、前额叶皮质、海马、下丘脑中CRF、CRFR1 mRNA及中枢c-fos的表达有关。在本实验结果中, 模型组大鼠模型组大鼠边缘系统中5-HT、5-HTR3、5-HTR4及其mRNA表达均异常升高, 健脾化湿颗粒能使其显著降低, 从而改善D-IBS大鼠腹泻症状和内脏敏感性, 提示健脾化湿颗粒可能通过调节各个脑肠肽及其受体的表达水平, 从而升高内脏痛阈水平, 减慢结肠运动, 消除肠道反应。由于D-IBS发病机制的复杂性, 健脾化湿颗粒改善IBS症状的作用机制也并不单一, 在以后的研究中还需要扩展思路, 从多个角度进一步探讨其治疗D-IBS的作用机制。

4 参考文献

- 1 Moore NA, Sargent BJ, Manning DD, Guzzo PR. Partial agonism of 5-HT₃ receptors: a novel approach to the symptomatic treatment of IBS-D. *ACS Chem Neurosci* 2013; 4: 43-47 [PMID: 23342199 DOI: 10.1021/cn300166c]
- 2 Fang CF, Tang HM, Liao XH, He JL, Li DT, Qiu ZW. [Effect of changji'an capsule on mRNA expressions of NPY and ACTH contents in brain-

- gut axis of IBS-D model rats]. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2013; 33: 948-952 [PMID: 24063219]
- 3 杜海燕, 王迎寒, 张晓峰, 靳继伟, 郭洪杰. 健脾化湿颗粒对D-IBS模型大鼠内脏敏感性和脑中CRF及其受体的影响. *实验动物科学* 2013; 30: 15-19
- 4 陈光辉, 刘玉玲, 杜海燕, 张晓峰, 赵素微, 胡楠, 靳继伟, 于海龙, 王迎寒. 健脾化湿颗粒对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠运动及中枢c-fos的影响. *世界华人消化杂志* 2015; 23: 1943-1948
- 5 王迎寒, 刘玉玲, 杜海燕, 靳继伟, 胡楠, 于海龙, 陈光辉, 赵素微, 张晓峰. 健脾化湿颗粒对D-IBS模型大鼠脑-肠轴中CRF和CRFR1的影响. *世界华人消化杂志* 2015; 23: 4075-4083
- 6 徐海珍, 谢建群, 施斌, 张涛. 腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜炎性细胞因子的表达及温中健脾方对其影响的研究. *上海中医药杂志* 2007; 14: 69-72
- 7 何侠垠, 戴宁. 5-羟色胺与肠易激综合征关系的研究进展. *国际消化病杂志* 2010; 30: 1-3
- 8 夏岷, 刘希双, 鞠辉. 肠易激综合征患者肠黏膜SP、SPR和5-HT的变化. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3169-3173
- 9 邹百仓, 董蕾, 曹铭波, 王燕, 王深浩. 肠易激综合征模型大鼠的大脑和消化道中5-HT的表达和病理作用. *西安交通大学学报* 2008; 9: 42-46
- 10 孙刚, 杨云生, 彭丽华, 王巍峰. 肠易激综合征大鼠内脏敏感性和脊髓背角5-HT和c-fos的表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2718-2722
- 11 林震群. 痛泻要方对腹泻型肠易激综合征患者的疗效及对结肠黏膜5-HT含量和5-HT₃受体mRNA表达的影响. 福州: 福建医科大学, 2012
- 12 Braun T, Volland P, Kunz L, Prinz C, Gratzl M. Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants. *Gastroenterology* 2007; 132: 1890-1901 [PMID: 17484882]
- 13 石君杰, 徐发莹, 宋李亚, 梅诗雪, 陶丹萍, 王海云. 逍遥散对肠易激综合征大鼠结肠5-HT受体的干预作用. *浙江中西医结合杂志* 2012; 22: 172-174
- 14 Mawe GM, Coates MD, Moses PL. Review article: intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1067-1076 [PMID: 16611266 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.02858.x]
- 15 汪正芳, 郭前坤, 张声生, 赵鲁卿, 杨成, 李晓玲, 吴震宇. 疏肝健脾方对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜5-羟色胺及其受体的影响. *北京中医药* 2013; 32: 406-409
- 16 宋士一, 王德山, 王艳杰, 韩晓伟. 眼针疗法对肠易激综合征模型大鼠结肠组织5-羟色胺4受体表达的影响. *中国中医药信息杂志* 2010; 17: 41-43

同行评价

本文选题恰当, 实验方法、技术合理, 研究结果具有较好的科学价值。

编辑: 于明茜 电编: 闫晋利

