

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2015.10.024

温肾健脾方对腹泻型肠易激综合征大鼠 CCK、MOT 表达的影响

苏晓兰¹, 魏茹涵², 魏 玮¹, 张 静³, 白亦冰³, 郭 宇³

1. 中国中医科学院望京医院脾胃病科(北京 100102); 2. University of Toronto, Ontario M5S 1A1, Canada; 3. 北京市宣武中医医院脾胃病科(北京 100050)

【摘要】 目的 观察温肾健脾方对腹泻型肠易激综合征(IBS-D) 大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层胆囊收缩素(CCK)、胃动素(MOT) 表达的影响, 从实验角度探索该方对 IBS-D 的疗效及作用机制。方法 48 只大鼠随机分为正常组、模型组、温肾健脾方高剂量组、温肾健脾方中剂量组、温肾健脾方低剂量组和对照组等 6 组, 每组 8 只。参照 AL-Chaer 造模方法建立 IBS-D 大鼠模型。造模结束后, 治疗组分别予温肾健脾方煎剂高、中、低剂量灌胃治疗, 对照组予四神丸方煎剂灌胃, 模型组予等体积 0.9% NaCl 溶液灌胃, 给药 2 周。观察各组大鼠一般情况, 并采用免疫组化法检测结肠黏膜及回盲部黏膜层 CCK、MOT 表达情况。结果 治疗后各组大鼠一般情况均有不同程度的好转, 温肾健脾方高、中剂量组大鼠的改善情况优于温肾健脾方低剂量组和对照组。与正常组比较, 模型组大鼠结肠黏膜、回盲部黏膜层 CCK、MOT 表达升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后, 与模型组比较, 温肾健脾方高、中剂量组及对照组大鼠结肠黏膜、回盲部 CCK、MOT 表达降低, 温肾健脾方高、中剂量组结肠黏膜、回盲部 CCK、MOT 表达低于温肾健脾方低剂量组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 温肾健脾方高、中剂量组结肠黏膜、回盲部 CCK 表达低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 温肾健脾方对 IBS-D 大鼠有较好的治疗作用, 其治疗机制可能是通过调控结肠黏膜、回盲部黏膜层 CCK、MOT 的表达而起到调节胃肠道激素的作用。

【关键词】 腹泻型肠易激综合征; 中医药疗法; 温肾健脾法; 胆囊收缩素(CCK); 胃动素(MOT)

Warming Kidney and Tonifying Spleen Interventions' effects on the colonic mucosa and ileocecal CCK and MOT of IBS-D Rats

SU Xiao-lan¹, WEI Ru-han², WEI Wei¹, ZHANG Jing³, BAI Yi-bing³, GUO Yu¹

1. Department of gastroenterology, Wang Jing Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing; 2. University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A1, Canada; 3. Department of gastroenterology, Xuanwu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing

Abstract: Objective To observe the effects of Warming Kidney and Tonifying Spleen interventions on IBS-D rats' colonic mucosa, ileocecal CCK and MOT to probe into the underlying mechanism from the gastrointestinal hormone perspective. **Methods** 48 rats were randomly divided into normal group, model group, Warming Kidney and Tonifying Spleen high, middle and low dose groups, and control group, 8 in each group. Referencing AL-Chaer modeling, made a duplicate IBS-D rat model. After that, the treatment groups were treated with high dose, middle dose and low dose Decoction-free Warming Kidney and Tonifying Spleen formula decoction, while the control group was treated with Decoction-free "Sishen Pill", and the model group was treated with equal quantity of normal saline irrigation, 2 weeks for each group. The general situation of rats in each group was observed, and immunohistochemistry analysis was employed to observe the changes in their colonic mucosa, ileocecal CCK and MOT. **Results** After the treatment, the general situation of rats in each group became better to various degree, and the situation of rats in the Warming Kidney and Tonifying Spleen high and middle groups was better than that of the low dose and control groups. Compared with normal group, the expression of colonic mucosa, ileocecal CCK and MOT in the rats in model group increased, and there was significant statistic difference($P < 0.05$). Compared with model group after the treatment, the expression of colonic mucosa, ileocecal CCK and MOT in the rats in the Warming Kidney and Tonifying Spleen high, middle and control groups decreased. Compared with low dose group, the expression of colonic mucosa, ileocecal CCK and MOT in the rats in the Warming Kidney and Tonifying Spleen high, middle groups decreased, and there was significant statistic difference($P < 0.05$). **Conclusion** Warming Kidney and Tonifying Spleen interventions proved to be effective to reduce the quantity of colonic mucosa and the amount of released ileocecal CCK and MOT, which in turn reduces the intestinal sensitivity and also accelerate the degradation of CCK and MOT present in their body.

Keywords: diarrhea-predominant irritable bowel syndrome/IBS-D; TCM therapy; Warming Kidney and Tonifying Spleen Interventions; cholecystokinin/CCK; motilin/MOT

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072800); 国家自然科学基金青年基金资助项目(81403389); 中国中医科学院公益性科研院所基本科研业务费专项优秀青年项目(ZZ0908026)

[作者简介] 苏晓兰, 女, 博士, 主治医师, 主要从事脾胃病的中医药防治研究工作

[通讯作者] 魏玮, 教授, 主任医师, 博士生导师。

E-mail: sxxtty@sina.com

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS) 是指与排便相关的腹痛或腹部不适, 或伴有排便习惯改变及排便紊乱, 同时无形态学、生化学异常改变和其他明显原因可以解释症状的产生^[1]。本病主要分为 IBS 便秘型(IBS-C)、IBS 腹泻型(IBS-D)、IBS 不定型(IBS-U) 和 IBS 混合型(IBS-M), 其中 IBS-D 较为常见。目前西

医以对症治疗为主,魏玮教授临证采用温肾健脾法治疗 IBS-D 临床收效甚佳^[2]。有研究提出,IBS 患者回盲部与其临床表现有特殊关系,胃肠激素作为一种调节肽对胃肠运动具有重要的调节作用^[3]。本实验通过观察温肾健脾法对 IBS-D 大鼠一般情况及结肠黏膜、回盲部黏膜层胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)、胃动素(motilin, MOT)表达的影响,从调节胃肠道激素的角度探索其对 IBS-D 的疗效和作用机制,旨在为临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4 周龄健康雄性 SD 大鼠 48 只,清洁级,体质量(70±10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。动物合格证号:SCXK(京)2006-0009。

1.1.2 药物与试剂 温肾健脾方:肉豆蔻 15 g,补骨脂 30 g,五味子 9 g,吴茱萸 9 g,党参 30 g,白术 15 g,郁金 18 g,生姜 2 g,大枣 2 g。四神丸方:肉豆蔻 15 g,补骨脂 30 g,五味子 9 g,吴茱萸 9 g,生姜 2 g,大枣 2 g。以上药物均采用广州一方药业有限公司生产的免煎剂 4℃ 储备,用前摇匀。

CCK 抗体(anti-cholecystokinin antibody)、MOT 抗体(rabbit anti-MLN/Motilin),Abcam 公司;三羟甲基氨基甲烷(trihydroxymethyl aminomethane, Tris 碱),Sigma 公司产品分装。

1.1.3 仪器 儿童型导尿管(8F,双腔,带囊直径为 2.7 mm),Bardex 公司;烤片机(HI1220)、脱水机(EG1150H),Leica 公司;显微镜(U-TVO. 5XC. 24H01726),Olympus 公司;电子天平(YP402N),上海菁海仪器有限公司;万能照相机(AHB-2-LB),Olympus 公司。

1.2 分组、造模及给药 48 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为 6 组,分别为正常组、模型组、温肾健脾方高剂量组、温肾健脾方中剂量组、温肾健脾方低剂量组及对照组(四神丸方组),每组 8 只。

除正常组外,其余大鼠参照 AL-Chaer ED^[3]的造模方法,联合番泻叶灌胃及夹尾刺激,复制内脏高敏感 IBS-D 大鼠模型。

造模成功后给药。按照《药理实验方法学》^[4]选择按体质量计算方法计算给药剂量。换算公式: $dB = dA \times KB/KA$ (dB 为大鼠每天每千克灌药量, dA 为成人每天每千克用药量, KB=0.71, KA=0.11 为常数)。温肾健脾方各用药组分别以高剂量(3.10 g·kg⁻¹·d⁻¹)、中剂量(1.55 g·kg⁻¹·d⁻¹)、低剂量(0.775 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃给药;对照组予四神丸方(0.736 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,药液量调整至每只 2 ml/次。模型组予等体积 0.9% NaCl 溶液灌胃。每天 2 次,用药 14 天。

1.3 取材及指标检测

1.3.1 大鼠一般情况观察 分别观察大鼠的精神状态、体质量、活动情况、毛发光泽度、食欲、大便性状等。

1.3.2 大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层 CCK、MOT 表达 给药 14 天后取材,取结肠组织及回盲部组织进行石蜡包埋。免疫组化法检测大鼠结肠及回盲部黏膜 CCK、MOT 表达。具体方法和操作步骤严格按试剂盒说明进行。

免疫组化步骤如下:①切片脱蜡至水;②PBS 5 min 3 遍;③抗原修复,直接高压抗原修复法;④PBS 5 min 3 遍;⑤3% H₂O₂ 10 min;⑥PBS 5 min 3 遍;⑦一抗孵育 2 h,37℃;⑧PBS 5 min 3 遍;⑨二抗孵育 1 h,37℃;⑩PBS 5 min 3 遍;⑪DAB 显色镜下控制;⑫苏木素复染 5 min 水洗,盐酸酒精分色,水洗,饱和碳酸锂反蓝水洗,镜检;⑬上行脱水透明封固。

免疫组化阳性结果判定:利用 MIAS 医学图像分析管理系统,选择光镜高倍视野(×400)下 CCK 及 MOT 的阳性表达细胞。CCK 及 MOT 阳性表达均表现为细胞核和胞质呈棕黄色,以胞核为主。血管内皮细胞、黏膜上皮细胞和单核细胞,最多见于黏膜和黏膜下层。

CCK 及 MOT 阳性表达判定标准:取光学显微镜(×400)下每平方毫米视野中的阳性表达,每张切片随机选择 3 个高倍视野,以阳性表达结果中的平均灰度作为计量标准,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.4 统计学方法 采用 SAS 9.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间样本均数比较采用完全随机设计的单因素方差分析,两组间比较采用两样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义的判定标准。

2 结果

2.1 一般情况 实验期间,无大鼠死亡。正常组大鼠反应灵敏,精神状态佳,粪便呈颗粒状,毛发光泽、整齐。造模开始 3~5 天后,大鼠精神略显萎靡,体质量略下降,活动减少,倦怠喜蜷卧,拱背,毛色偏黄少光泽,可见腹泻、稀便和(或)肛周体毛被稀便沾染。温肾健脾方高、中剂量组及对照组大鼠从灌胃第 3 天起即腹泻减轻,部分大鼠腹泻于 3~5 天内迅速缓解,粪便由不成形至半成形后转为颗粒状,粪便颜色逐渐转为正常黑色,大鼠精神状态回升,活动增加,皮毛逐渐恢复光泽。7~10 天左右,大鼠腹泻基本消失。温肾健脾方低剂量组大鼠从灌胃第 3~5 天起,腹泻逐渐减轻,精神状态逐渐改善,活动增加,皮毛较整齐但欠光泽。实验结束时,仍有小部分大鼠粪便性状略稀。

2.2 大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层 CCK、MOT 表达情况 与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层中 CCK 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

与模型组比较 温肾健脾方高、中剂量组及对照组大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层中 CCK 表达降低 ($P < 0.05$)。温肾健脾方高、中剂量组大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层中 CCK 表达低于温肾健脾方低剂量组 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。温肾健脾方高、中剂量组大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层中 CCK 表达低于对照组 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

与正常组比较 模型组大鼠结肠黏膜及回盲部黏

膜层中 MOT 表达升高 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较 温肾健脾方高、中剂量组及对照组结肠黏膜及回盲部黏膜层中 MOT 表达均降低 ($P < 0.05$)。温肾健脾方高、中剂量组及对照组大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层中 MOT 表达均低于温肾健脾方低剂量组 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较 温肾健脾方高、中剂量组 MOT 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1、图 1~4。

表 1 各组大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层中 CCK、MOT 平均灰度比较 ($n = 8 \bar{x} \pm s$)

组别	结肠黏膜		盲部黏膜层	
	CCK	MOT	CCK	MOT
正常组	137.52 ± 6.39	115.88 ± 11.36	105.08 ± 10.25	104.88 ± 9.81
模型组	162.65 ± 10.49*	135.70 ± 5.38*	127.27 ± 12.32*	126.42 ± 4.71*
对照组	145.17 ± 9.05	121.40 ± 8.63 ^{#△}	116.11 ± 9.27	109.95 ± 8.26 [△]
温肾健脾方高剂量组	139.01 ± 8.40 ^{#△▽}	120.07 ± 12.50 ^{#△}	111.36 ± 8.84 ^{#△▽}	107.35 ± 8.99 ^{#△}
温肾健脾方中剂量组	140.98 ± 6.11 ^{#△▽}	118.52 ± 7.49 ^{#△}	109.42 ± 8.93 ^{#△▽}	106.21 ± 9.06 ^{#△}
温肾健脾方低剂量组	152.41 ± 7.61	131.76 ± 8.60	122.27 ± 11.94	118.70 ± 8.70

注: 与正常组比较 * $P < 0.05$; 与模型组比较 # $P < 0.05$; 与温肾健脾方低剂量组比较 [△] $P < 0.05$; 与对照组比较 [▽] $P < 0.05$

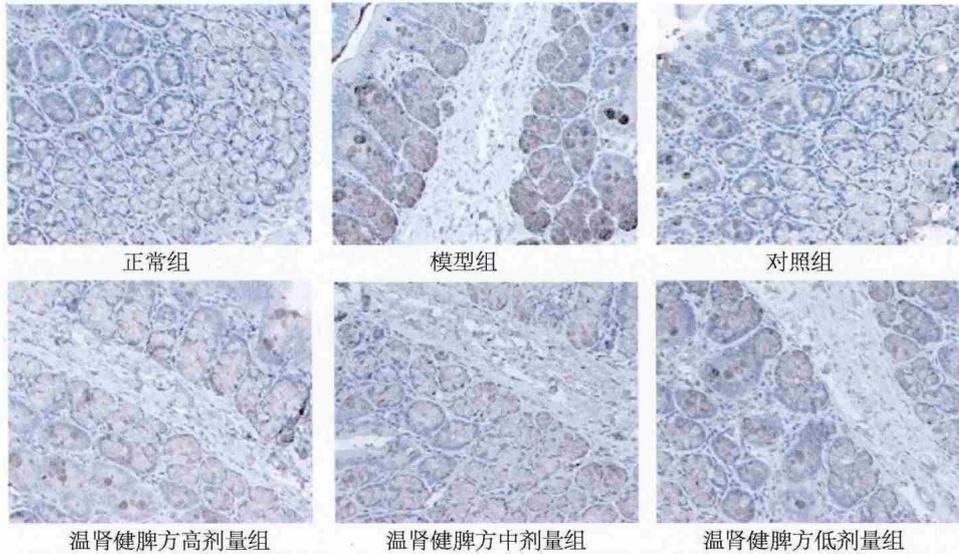


图 1 各组大鼠结肠黏膜 CCK 免疫组化观察 (HE, ×400)

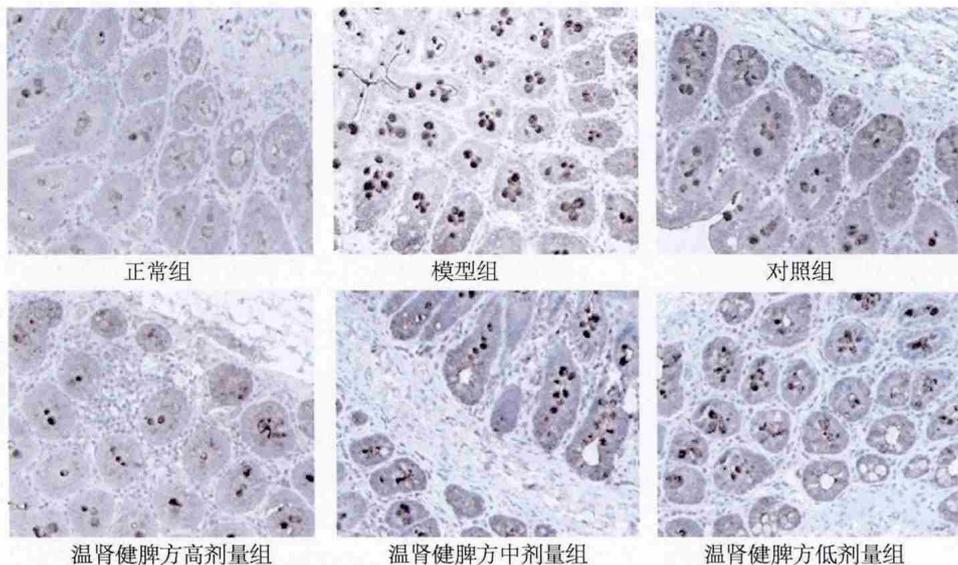


图 2 各组大鼠回盲部黏膜层 CCK 免疫组化观察 (HE, ×400)

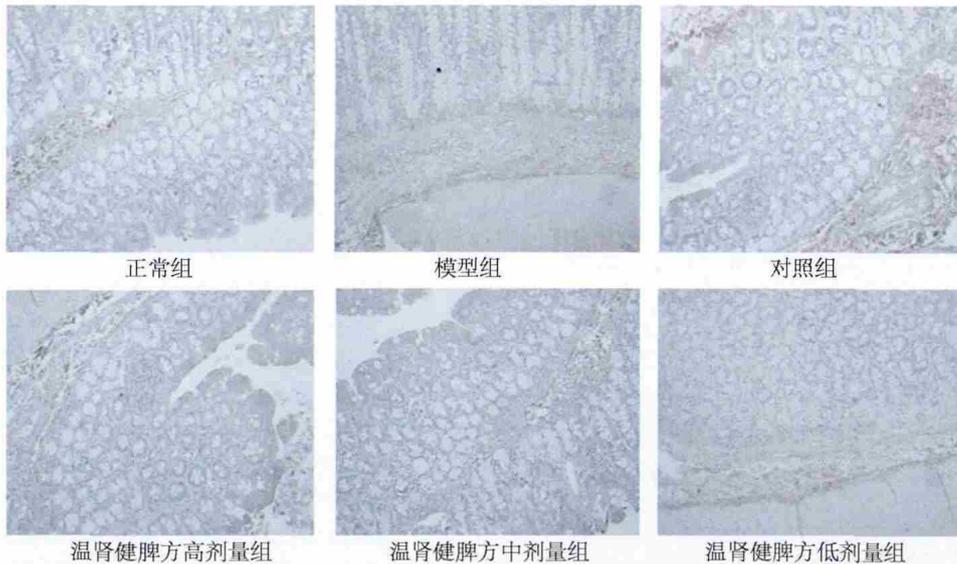


图 3 各组大鼠结肠黏膜中 MOT 免疫组化观察(HE ,×400)

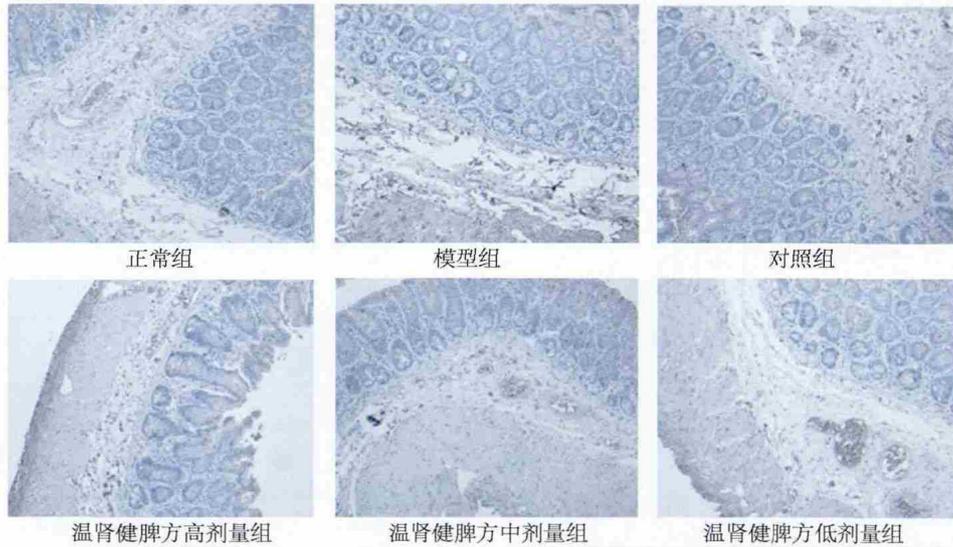


图 4 各组大鼠回盲部黏膜层 MOT 免疫组化观察(HE ,×400)

3 讨论

CCK 主要由十二指肠和空肠黏膜的 I 细胞合成,以多种形式存在于人体,CCK-33 形式为主,其中 98% 的 CCK 分布于小肠和结肠的黏膜层^[5]。CCK 具有广泛的生物作用,可以促进胰腺分泌和胆囊收缩,舒张 Oddi 括约肌,减慢胃排空,促进小肠及结肠的运动并缩短通过时间^[6]。推测其可能降低 IBS 患者内脏痛觉阈或拮抗内源性阿片样的镇痛作用,使 IBS 患者出现腹痛,而胃肠运动增强是加重胃肠过敏性和中枢调节系统改变的结果^[7]。国内学者对 CCK 的具体作用机制研究不多,国外有报道称 IBS 患者空腹时血浆中 CCK 水平明显高于正常人,而局部结肠组织中含量几乎为零^[8]。费晓燕等^[9-10]研究发现,中药复方疏肝饮煎剂能通过降低肠道释放 CCK 的敏感性,减少 CCK 的释放量,以及加快已存在的 CCK 降解,从而缓解 IBS-D 腹痛、腹泻等症状。

MOT 是肠嗜铬样细胞的一个亚群,又称为 Mo 细胞,广泛存在于消化系统及神经系统,包括大脑、外周神经和肠壁内神经中。MOT 是一个含有 22 个氨基酸的活性直链多肽,属孤立多肽类胃肠激素,最早于 1966 年由 Brown 等发现。MOT 作为内分泌细胞分泌的一种胃肠激素,呈周期性释放,参与消化间期胃肠活动,诱发胃强烈收缩和小肠明显的分节运动^[11],其主要生理功能是增加移行性复合运动(migrating motor complex, MMC)。MOT 通过作用于消化系平滑肌上的胃动素受体,导致平滑肌收缩加强,加速胃排空,促进胃肠运动,刺激胃蛋白酶的分泌;MOT 通过作用于肠道神经系统中的 MOT 神经元,触发胃肠道消化间期 MMC III 相的发生,引起胃强烈收缩和小肠明显的分节运动,可将胃肠内残渣、脱落的细胞碎片和细菌等清除干净,起着“清道夫”的作用^[12];此外,MOT 还具有可促进胰多肽(pancreatic polypeptide, PP)和生长抑素(somatostatin,

SS) 的释放等作用^[13]。MOT 已被证实是用于评价胃肠功能实用而可靠的指标^[14]。

IBS-D 属中医学“腹痛”“泄泻”“郁证”等范畴,其发病与感受外邪、饮食不节、情志失调及脏腑虚弱等有关。魏师认为,IBS-D 病位在肠,主要涉及脾、肾、心、肝等,脾肾阳虚是 IBS-D 的主要病机,故以温肾健脾为法,以四神丸加减而成温肾健脾方(肉豆蔻、补骨脂、吴茱萸、五味子、白术、党参、郁金、生姜、大枣)。方中补骨脂苦辛性热而补命门,为壮火益土之要药;肉豆蔻温脾肾而涩肠止泻;吴茱萸暖脾胃而散寒除湿;五味子性温而平和,温肾固涩;党参甘温补中,益气升阳,长于止泻;白术甘温性缓,补脾益气、燥湿利水;郁金入心治血、体清气窜,行气解郁、祛瘀止痛;生姜、大枣固护中焦。诸药相合,则肾温脾暖,郁解心清,大肠固而运化复,泻止而病愈。

温肾健脾方是魏师在四神丸的基础上,结合 30 余年临床用药实践的经验方。四神丸具有温肾暖脾、涩肠止泻之功,温肾健脾方是在四神丸基础上加入党参、白术、郁金,使其具有温肾健脾、疏肝理气、清心解郁、涩肠止泻等多重作用。正如《医方集解》所述“大补下焦元阳,使火旺土强,则能制水而不复妄行矣。”我们前期临床研究表明,温肾健脾方可以有效治疗 IBS-D,并能较好控制疾病的反复^[2];前期实验研究结果表明,温肾健脾法可改善 IBS-D 大鼠粪便性状、频率及内脏高敏感,其疗效优于四神丸^[15]。

本实验研究结果显示:①与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜、回盲部黏膜层 CCK、MOT 表达升高 ($P < 0.05$),提示 CCK、MOT 在 IBS-D 的发生和发展中占有重要地位;②治疗后,温肾健脾方高、中剂量组结肠黏膜、回盲部黏膜层 CCK、MOT 表达降低,且低于模型组 ($P < 0.05$),提示温肾健脾方可能是通过降低 IBS-D 大鼠结肠黏膜及回盲部黏膜层释放 CCK、MOT 的敏感性,从而降低肠道敏感性,减少 CCK、MOT 的释放量,以及加快已存在的 CCK、MOT 的降解从而缓解 IBS-D 的临床症状。这一作用不仅是对该药疗效的进一步验证,也可能是温肾健脾方在调节胃肠激素方面治疗 IBS-D 的作用机制之一。

参考文献:

[1] Longstreth GF ,Thompson WG ,Chey WD ,et al. Functional bowel disorders [J]. Gastroenterology ,2006 ,130(5) : 1480-1491.

[2] Su X ,Tang Y ,Zhang J ,et al. Curative effect of warming kidney and fortifying spleen recipe on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. J Tradit Chin Med 2013 ,33(5) : 615-619.

[3] Al Chaer ED ,Kawasaki M ,Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. Gastroenterology 2000 ,119(5) : 1276-1285.

[4] 徐叔云 ,卞如濂 ,陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社 2002: 202-203.

[5] 颜淑红 ,伊冬梅 ,马效霞. 胃肠神经肽与肠易激综合征研究综述 [J]. 中外医疗 2010 ,31(25) : 186-187.

[6] 常东 ,樊亚巍 ,陶永胜 ,等. 肠易激综合征中医证型与胃肠激素水平变化的相关性研究 [J]. 中国中医药信息杂志 2009 ,16(5) : 19-20 #7.

[7] Thomson IR ,Fettman MJ ,Jonsson J ,et al. Alimentary tract and pancreas responses to cholecystokin in octapeptide in patients with functional abdominal pain syndromes [J]. Gastroenterol Hepatol , 1992 ,7(3) : 293-297.

[8] Niederau C ,Faber S ,Karas M. Cholecystokin's role in regulation of colonic motility in health and in irritable bowel syndrome [J]. Gastroenterology ,1992 ,102(6) : 1889-1898.

[9] 费晓燕 ,谢建群 ,郑昱 ,等. 疏肝饮对腹泻型肠易激综合征模型大鼠胃动素和胆囊收缩素的影响 [J]. 上海中医药杂志 2008 ,42(4) : 63-65.

[10] 李振强. 肠易激综合征中医证型与胃肠激素关系研究探讨 [J]. 当代医学 2012 ,18(12) : 158-159.

[11] Konturek JW ,Thor P ,Maczka M ,et al. Role of cholecystokin in the control of gastric emptying and secretory response to a fatty meal in normal subjects and duodenal ulcer patients [J]. Scand J Gastroenterol ,1994 ,29(7) : 583-590.

[12] Williams RL. Textbook of Endocrinology [M]. Holland: Elsevier Medicine ,1981.

[13] 谭康联 ,陈志强. 胃动素用于胃肠功能评价的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志 2011 ,19(2) : 156-160.

[14] 刘未艾 ,刘密 ,何亚敏 ,等. 功能性胃肠病肠肽的研究进展 [J]. 中国中医急症 2012 ,21(6) : 951-953.

[15] 苏晓兰 ,魏玮 ,张静 ,等. 温肾健脾法干预腹泻型肠易激综合征大鼠的疗效评价 [J]. 中国中西医结合杂志 2014 ,34(2) : 199-205.

编辑: 季春来
收稿日期: 2015-05-15