

· 基础研究 ·

芍药甘草汤对肠易激综合征大鼠内脏高敏感性的影响

周正华¹ 冀建斌^{1,2} 王智超^{2,Δ}

摘要 目的 研究芍药甘草汤对肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)大鼠内脏高敏感性和结肠黏膜肥大细胞(MCs)、血清 5-羟色胺(5-HT)的影响,探讨芍药甘草汤治疗 IBS 的可能作用机制。**方法** 将 33 只大鼠随机分为正常组、模型组和中药组,每组 11 只。采用直肠气囊扩张刺激+直肠内醋酸刺激复合方法制作 IBS 内脏高敏感性模型。造模后,正常组和模型组大鼠均给予 0.9% NaCl 注射液 10 mL/Kg 灌胃,中药组给予芍药甘草汤按生药量 6.25 g/Kg 灌胃,连续灌胃 14 天。评价大鼠腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR),观察回盲部组织 MCs 数量,检测血清 5-HT 含量。**结果** 与正常组比较,给药后模型组大鼠的 AWR 降低,回盲部组织中的 MCs 数量、血清 5-HT 含量均增加($P < 0.05$);与模型组比较,中药组大鼠 AWR、回盲部组织中的 MCs 数量、血清 5-HT 含量均有改善($P < 0.05$)。**结论** 采用直肠气囊扩张刺激+直肠内醋酸刺激复合慢性刺激法可以引起 IBS 大鼠内脏敏感性增高,芍药甘草汤的作用机制可能是通过减少结肠 MCs 数量、5-HT 含量从而降低 IBS 大鼠的内脏高敏感性。

关键词 肠易激综合征;内脏高敏感性;肥大细胞;5-羟色胺

Effects of Shaoyao Gancao Decoction on Visceral Hypersensitivity of Irritable Bowel Syndrome Rats ZHOU Zheng-hua¹, JI Jian-bin^{1,2}, and WANG Zhi-chao² 1 Department of Gastroenterology, First Teaching Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193); 2 Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Shaoyao Gancao Decoction (SGD) on visceral hypersensitivity, mast cells (MCs) of colonic mucosa, and serum 5-serotonin (5-HT) of irritable bowel syndrome (IBS) rats, and to study possible mechanism of SGD for treating IBS. **Methods** Totally 33 rats were randomly divided into the normal group, the model group, and the SGD group, 11 rats in each group. The visceral hypersensitivity model was prepared by rectal balloon dilation stimulation and rectal acetic acid stimulation in IBS rats. After modeling 0.9% NaCl (10 mL/kg) was administered to rats in the model group and the normal group by gastrogavage. Rats in the SGD group were administered with 6.25 g/kg crude SGD by gastrogavage. The medication lasted for 14 successive days. The value of abdominal withdrawal reflex (AWR) was assessed. The number of MCs in the ileocecal junction was observed. And the content of serum 5-HT was detected. **Results** Compared with the normal group, AWR decreased; the number of MCs in the ileocecal junction and the content of serum 5-HT increased in the model group after medication ($P < 0.05$). Compared with the model group, AWR, the number of MCs in the ileocecal junction, and the serum content of 5-HT were all improved in the SGD group after medication ($P < 0.05$). **Conclusions** The combination of rectal balloon dilation and rectal acetic acid stimulation could induce visceral hypersensitivity of IBS rats. SGD could reduce visceral hypersensitivity of IBS rats possibly by

基金项目:天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合科研课题资助项目(No. 2015095)

作者单位:1.天津中医药大学第一附属医院脾胃科(天津 300193);2.天津中医药大学研究生院(天津 300193)

通讯作者:周正华, Tel:022-27986658, E-mail: zzh375@eyou.com

^Δ现单位河北省邢台市中医院内二科(河北 054000)

DOI: 10.7661/j.cjim.20170315.043

reducing the number of MCs in the ileocecal junction and the serum content of 5-HT.

KEYWORDS irritable bowel syndrome; visceral hypersensitivity; mast cell; 5-HT

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹部不适和排便习惯改变为特征的胃肠功能性疾病。其病因及发病机制尚不明确,可能与内脏高敏感性、胃肠动力学、脑肠轴的改变、肠道菌群失调和精神行为等异常有关^[1],内脏高敏感性是 IBS 的主要发病机制,且肥大细胞(mast cells, MCs)、5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)可能在这一病理生理机制中发挥重要作用。芍药甘草汤出自东汉张仲景的《伤寒论》,为柔肝敛阴、缓急止痛的经典名方。本研究通过观察芍药甘草汤对 IBS 大鼠内脏高敏感性、结肠黏膜 MCs、血清 5-HT 的影响,探讨其对 IBS 内脏高敏感性可能的影响机制及治疗 IBS 的作用机制。

材料与方法

1 动物 33 只 SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重(200±10)g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物研究中心提供,许可证号:SCXK-(军)2012-0004。本实验方案通过实验动物伦理委员会审核。

2 药物 芍药甘草汤煎剂(白芍、甘草组成),天津中医药大学第一附属医院精品药房提供,白芍批号:1311053,甘草批号:1311052。用量遵循张仲景原方 1:1 的比例,天津中医药大学第一附属医院制剂中心制备,生药浓度为:0.6 g/mL。

3 主要试剂及仪器 主要试剂:冰醋酸:天津市大茂化学试剂厂,批号:20140413;水合氯醛:天津市光复精细化工研究所,批号:20140217;甲苯胺蓝:天津鹏程昱康医疗器械有限公司,批号:20150325。5-HT ELISA 试剂盒,货号:CSB-E08364r,由武汉华美生物有限公司提供。主要仪器:一次性使用无菌双腔导尿管(8F):大连库利艾特医疗制品有限公司生产,批号:D1407-140;Olympus BX40 光学显微镜(日本);来卡石蜡切片机(德国 Leica 2245);Aerier 超低温保存箱(-80℃),型号:DW-86L628,青岛海尔特种电器有限公司生产;湘仪 TDZ5-WS 台式低速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司生产;Variation Flash 多功能微孔板检测仪(Theravada Fisher),连续的硬膜外导管(3F)。

4 动物分组及模型制备 33 只大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组和中药组,每组 11 只。大鼠平衡饲养 3 天后开始造模,参照 AL-Chaer ED

等^[2]和苏晓兰^[3]的造模方法。正常组正常喂食,自由饮水,不做任何处理,其余两组大鼠采用直肠气囊扩张刺激+直肠内醋酸刺激复合方法进行造模,制作 IBS 内脏高敏感性模型,每天上午直肠内气囊扩张,导管经肛门插入约 3~5 cm,直肠气囊扩张 1.5 mL,持续 1 min,1 次/天,放气退出导管,同时每天给予直肠内醋酸刺激。将石蜡油润滑后的连续硬膜外导管(直径 1 mm)经肛门插入 5 cm,注入 0.5%醋酸 5 mL/kg。正常组大鼠每天肛门内插入气囊导管,但不扩张,同时直肠内给予 0.9%生理盐水 5 mL/kg。连续造模 14 天,造模过程中无大鼠死亡,在实验造模结束后,每组随机选取 1 只大鼠,光镜下观察大鼠结肠黏膜组织形态学的变化,并结合腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评价造模是否成功^[4]。

5 干预方法 在造模成功后第 2 天进行药物干预,正常组和模型组大鼠均给予 0.9% NaCl 注射液 10 mL/kg 灌胃治疗,中药组给予芍药甘草汤按生药量 6.25 g/kg(相当于临床人用药量的 6.25 倍)灌胃治疗,连续灌胃 14 天。

6 检测指标及方法

6.1 大鼠结肠黏膜组织学变化 在实验造模结束后,每组随机选取 1 只大鼠,将其脱臼处死。剖腹分离末端结肠,并剪取同一部位约 0.5 cm 结肠末端组织,用生理盐水冲洗,置于 10%中性甲醛溶液中固定,石蜡包埋,切片厚 3 μm,HE 染色,光镜下观察大鼠结肠黏膜组织形态学的变化。组织学检查由专业病理学专家完成。

6.2 AWR 实验评估 参照参考文献[4]。在造模及给药结束后,经肛门直肠扩张后,观察动物 AWR,评价动物的内脏敏感性。用带球囊的 8F 导尿管与 2.5 mL 注射器相连,在清醒状态下将石蜡油润滑后的 8F 导尿管经肛门插入直肠,用线将导尿管和大鼠尾巴根部绑在一起。稳定后,逐渐缓慢注入气体,扩张肠道,分别观察引起大鼠腹部抬起及背部拱起的最小阈值进行行为评估。同一只大鼠重复测量 3 次,数据取均值。

6.3 MCs 数目 参照参考文献[5]。在大鼠腹主动脉取血后,剖腹分离结肠,截取回盲端结肠约 2 cm,生理盐水冲洗,多聚甲醛固定,MCs 染色采用甲苯胺蓝改良染色法,每张染色的切片在 Olympus BX40 光学显微镜(目镜内装有正方形网格实验系统

C64)下观察,随机连续记数 400 倍的 6 个视野,取平均数,结果以个/高倍视野计算。

6.4 5-HT 水平检测 给药结束后,大鼠用 10% 水合氯醛麻醉,经腹主动脉取血 4 mL,离心后提取血清,放置于 -80 ℃ 冰箱中待测。采用 5-HT-ELISA 试剂盒检测血清 5-HT 浓度,按试剂盒说明书步骤进行操作。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用方差分析,两组间比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠结肠黏膜组织学变化(图 1) 正常组结肠黏膜结构规整,无炎症浸润,模型组和中药组仅有少量中性粒细胞浸润。

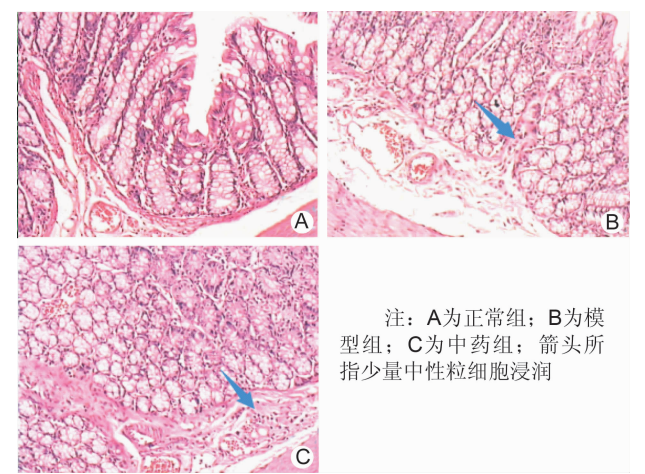


图 1 各组大鼠结肠黏膜组织学变化 (HE, ×100)

2 各组大鼠 AWR 比较(表 1) 与正常组比较,模型组大鼠抬腹、弓背阈值明显降低($P < 0.05$);经给药干预后,与模型组比较,中药组抬腹、弓背阈值升高($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 AWR 比较 (mL, $\bar{x} \pm s$)					
组别	n	抬腹阈值		弓背阈值	
		给药前	给药后	给药前	给药后
正常	10	0.89 ± 0.09	0.87 ± 0.10	1.08 ± 0.12	1.07 ± 0.12
模型	10	0.68 ± 0.12 *	0.63 ± 0.07 *	0.81 ± 0.11 *	0.76 ± 0.09 *
中药	10	0.67 ± 0.11	0.72 ± 0.09 Δ	0.82 ± 0.09	0.86 ± 0.08 Δ

注:与正常组同期比较, * $P < 0.05$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$

3 各组大鼠回盲部 MCs 计数比较(表 2,图 2) 在光学显微镜下,MCs 的胞浆被染成紫红色,胞核呈蓝色,成簇或散在分布于回盲部黏膜层及黏膜下层,细

表 2 各组大鼠回盲部 MCs 计数比较 (个/高倍镜, $\bar{x} \pm s$)		
组别	n	回盲部 MCs
正常	10	1.10 ± 0.32
模型	10	6.30 ± 2.41 *
中药	10	2.70 ± 0.82 Δ

注:与正常组对比较, * $P < 0.05$;与模型组对比较, $\Delta P < 0.05$

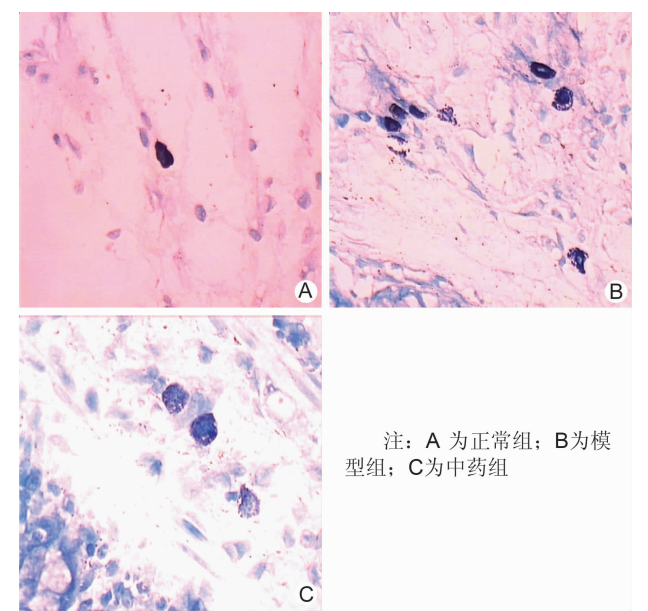


图 2 各组大鼠回盲部 MCs 计数变化 (甲苯胺蓝染色, ×400)

胞呈椭圆形、梭形或不规则形。与正常组比较,模型组 MCs 计数明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,中药组 MCs 计数明显下降($P < 0.05$)。

4 各组大鼠血清 5-HT 含量比较(表 3) 与正常组比较,模型组大鼠血清 5-HT 含量明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,中药组大鼠血清 5-HT 含量明显下降($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠血清 5-HT 含量比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)		
组别	n	5-HT
正常	10	7.89 ± 3.62
模型	10	17.90 ± 4.70 *
中药	10	9.48 ± 7.71 Δ

注:与正常组对比较, * $P < 0.05$;与模型组对比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

现代研究证明^[6],内脏高敏感性是 IBS 特征性的病理生理基础,IBS 内脏高敏感性既可存在于外周,又可存在于脊髓及中枢神经系统,但 IBS 内脏高敏感性确切的神经生物学机制尚不清楚。肠道的敏感性与脑-肠轴的各个层面不同的神经介质有着密切关系,如 5-HT、MCs、P 物质等,其中 MCs 与 5-HT 对 IBS

内脏高敏感性的形成发挥着重要作用。

5-HT 是一种广泛存在于中枢神经系统和胃肠道的神经递质,在中枢 5-HT 则广泛分布在与精神情感关系密切的区域,参与人体情绪、痛觉感受等;在外周主要是产生致痛觉作用。IBS 的首要症状是腹痛,而 5-HT 能神经元是痛觉反应体系的重要组成成分,可使内脏痛觉敏感,痛阈降低^[7]。因此,5-HT 增高可能跟内脏痛觉过敏有直接的关系,是内脏痛觉过敏发病机制的重要环节。现代医学认为,肠黏膜的 MCs 在 IBS 的发病中起到重要作用,是胃肠道功能失调的关键细胞。肠道激活状态的 MCs 可能在 IBS 中所表现的以动力改变、感觉异常为特征的内脏高敏感性的病理生理过程中起到关键性作用^[8]。来自 MCs 的 5-HT、前列腺素、细胞因子和白三烯等活性物质有激活内脏传入神经的潜能,可能通过作用于肠神经系统,产生胃肠道不适症状和高敏感性^[9]。总之,激活的 MCs 和 5-HT 对 IBS 起着重要的调节作用。

中医学中无“肠易激综合征”记载,属“腹痛”、“泄泻”、“便秘”的范畴。在现代医学中 IBS 属于功能性疾病范畴,故中医药对于 IBS 治疗具有特色优势。芍药甘草汤其又名甲乙化土汤,方中芍药酸寒,养血敛阴,柔肝止痛;甘草甘温,健脾益气,缓急止痛。二药相伍,酸甘化阴,调和肝脾,具有养血滋阴、平肝抑木、缓急止痛之功效,临床疗效确切,为后世医家所推崇,故本实验主要用其探究对 IBS 内脏高敏感性的影响。其用法用量遵循张仲景《伤寒论·太阳篇》记载:“芍药、甘草各四两,上两味以水三升,煮取一升五合,去渣,分温再服。”另外,现代药理研究证明,芍药甘草汤具有舒缓平滑肌,解痉镇痛的作用,而其中发挥作用的有效成分主要是芍药苷和甘草酸^[10]。芍药苷具有抗炎、镇痛和神经保护的作用^[11];甘草酸通过影响脊髓背角水平来改善痛觉的过敏^[12]。白芍与甘草配伍直接影响回肠平滑肌频率及张力变化率,使肠蠕动变慢,解痉作用加强,进而增强缓急止痛效果^[13]。可见从中医学理论及现代中药药理,芍药甘草汤可以提高痛阈值,改善 IBS 内脏高敏感性。

本实验研究表明,芍药甘草汤能提高内脏高敏感性 IBS 大鼠的抬腹、弓背阈值、并能降低结肠组织 MCs 数量以及血清 5-HT 的含量。说明芍药甘草汤的作用机制可能是通过减少 MCs 数量、5-HT 含量从而降低 IBS 大鼠的内脏高敏感性。但是芍药甘草汤如何影响肠道神经系统以及芍药与甘草不同比例下,对 IBS 内脏高敏感性及其肠道运动功能产生何种影响,有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 卢璐,袁建业,费晓燕,等. 肠易激综合征发病机制研究及治疗进展[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 23(09): 661-665.
- [2] 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.
- [3] 苏晓兰,唐艳萍,张静,等. 温肾健脾法干预腹泻型肠易激综合征大鼠的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(2): 197-202.
- [4] 朱力阳,彭成,谢晓芳,等. 化学刺激引起的两种大鼠内脏高敏感性模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(2): 267-270.
- [5] 旺建伟,叶虹玉,殷越,等. 腹泻要方对肠易激综合征内脏高敏感性大鼠结肠组织肥大细胞活化、P 物质表达及相关性的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6): 1982-1986.
- [6] Clarkel G, Quigley EM, Cryan JF, et al. Irritable bowel syndrome: towards biomarker identification [J]. Trends Mol Med, 2009, 15(10): 478.
- [7] Monies H, Cuter J, Kong M, et al. Deferential abduction c-Fos expression in brain nuclei by noxious and non-noxious Nicola distension: Role of afferent C-fibers and 5-HT₃ receptors [J]. Brain Res, 2003, 966(2): 253-264.
- [8] 霍涛,胡团敏. 肥大细胞与肠易激综合征关系的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(5): 494-497.
- [9] 罗和生,赵运志,张法灿,等. 肥大细胞在肠易激综合征发病机制中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(19): 1747-1751.
- [10] 朱广伟,张贵君,汪萌,等. 中药芍药甘草汤基原及药效组分和药理作用研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8): 2865-2869.
- [11] 金英善,陈曼丽,陶俊. 芍药化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(4): 745-750.
- [12] 李瑜,彭成,朱力阳,等. 甘草酸治疗内脏敏感性肠易激综合征的研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 169-171.
- [13] 杨艳,李东华,王洋,等. 大剂量使用芍药与甘草配伍解痉作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 347-349.

(收稿:2015-08-22 修回:2017-02-17)

责任编辑:白霞

英文责编:张晶晶