

本文引用:肖小芹,舒圆月,邓桂明,葛金文,杨立平,陈镇,欧阳林旗,向彪.乌药水提液对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 Ghrelin、MTL、SP、Sec 水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(5):477-480.

乌药水提液对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 Ghrelin、MTL、SP、Sec 水平的影响

肖小芹¹,舒圆月¹,邓桂明^{1,2*},葛金文¹,杨立平³,陈镇²,欧阳林旗²,向彪²

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;
3.湖南省肿瘤医院,湖南长沙 410013)

[摘要] **目的** 探讨乌药水提液对腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)大鼠血清生长激素释放肽(Ghrelin)、胃动素(Motilin,MTL)、P物质(P substance,SP)、促胰液素(Secretin,Sec)水平的影响。**方法** 将60只大鼠随机分成6组,采用单只孤养1周+番泻叶煎剂灌胃2周+慢性束缚应激1周造模法建立IBS-D大鼠模型,分别给予乌药水提液低、中、高剂量,匹维溴铵灌胃干预。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠血清Ghrelin、MTL、SP、Sec含量。**结果** 与空白对照组比较,模型对照组SP、Ghrelin、MTL水平显著升高,Sec水平降低($P<0.01$),提示造模成功;与模型对照组比较,乌药水提液低、中、高剂量组以及阳性对照组血清SP、MTL水平均明显降低,Sec水平均显著升高($P<0.01$),乌药水提液低、中、高剂量组以及阳性对照组对Ghrelin影响无显著差异($P>0.05$)。**结论** 乌药水提液可能通过降低大鼠血清SP、MTL水平来改善IBS-D大鼠腹痛、腹泻症状。

[关键词] 腹泻型肠易激综合征;乌药;生长激素释放肽;胃动素;P物质;促胰液素

[中图分类号] R285.5;R574.4

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.05.004

Effect of Water Extract of *Lindera aggregata* on Ghrelin, MTL, SP and Sec Levels in Rats With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome

XIAO Xiaoqin¹, SHU Yuanyue¹, DENG Guiming^{1,2*}, GE Jinwen¹, YANG Liping³, CHEN Zhen²,
OUYANG Linqi², XIANG Biao²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Hunan Cancer Hospital, Changsha, Hunan 410013, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the water extracts of *Lindera aggregata* on Ghrelin, MTL, SP and Sec levels in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Methods** 60 rats were randomly divided into 6 groups. Using a single solitary 1 weeks, gavage of sennoside for 2 weeks and chronic restraint 1 weeks to establish the rat model of IBS-D. The model rats were administrated with low, medium, high dose of water extracts of *Lindera aggregata*, and pinaverium bromide. The levels of SP, MTL, Sec and Ghrelin in serum of rats were measured by using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the blank control group, SP, Ghrelin and MTL levels significantly increased in the model control group, Sec was lower than the control group ($P<0.01$). Compared with the model group, the plasma levels of SP, MTL in the low, medium, high dose water extracts groups and pinaverium bromide group decreased, the Sec levels significantly increased, with statistical significance ($P<0.01$), while Ghrelin in the above four groups had no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** The water extracts of *Lindera aggregata* could improve the abdominal pain and diarrhea of IBS-D model rats by

[收稿日期] 2016-11-02

[基金项目] 湖南省教育厅重点项目(14A107);湖南省中医药科研计划项目(201429、2013135);湖南省教育厅项目(15C1041);中国博士后基金项目(2016T90752、2014M550420)。

[作者简介] 肖小芹,男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合基础研究。

[通讯作者] *邓桂明,女,博士(后),副主任药师,E-mail:guimingd1004@163.com。

reducing the plasma levels of SP and MTL.

[**Keywords**] diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; *Lindera aggregata*; growth hormone releasing peptide; motilin; substance-p; secretin

乌药为樟科山胡椒植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm 的膨大块根, 为传统常用的温胃理气止痛药, 具有温中散寒、理气止痛的功效。其主要化学成分是挥发油、异喹啉生物碱、倍半萜及其内酯类以及黄酮类, 最新提取化合物有: 乌药双查耳酮、球松素、赤芝酮、肉桂酸、黄酮素等^[1]。近年研究表明, 乌药具有胃肠道双向调节作用, 既可以促进胃肠蠕动, 又能缓解胃肠道平滑肌痉挛, 改善功能性胃肠病患者泛酸、嗝气、食欲不振、腹胀、腹痛、腹泻便秘等临床症状^[2], 临床上广泛应用于功能性胃肠病。腹泻性肠易激综合征 (diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 是一种以反复发作的腹痛、腹泻等为主要症状的功能性胃肠疾病。目前已知胃肠动力异常、内脏高敏性、脑肠肽异常以及精神心理压力等都与肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 发病有关, 其中胃肠动力异常和内脏高敏性被认为是 IBS 主要的病理生理学基础。脑肠肽是一种存在于中枢神经系统和胃肠道系统的小分子多肽, 在内脏感觉和胃肠动力的调节方面起着重要的作用。近年研究发现, 脑肠肽的分泌和表达的异常可导致内脏高敏和胃肠动力紊乱, 从而产生 IBS-D 腹痛、腹泻等症状^[3]。本文从生长激素释放肽 (Ghrelin)、胃动素 (Motilin, MTL)、P 物质 (P substance, SP)、促胰液素 (secretin, Sec) 四种脑肠肽入手, 研究乌药水提液对 IBS-D 大鼠血浆 Ghrelin、MTL、SP、Sec 水平变化的影响, 从而探讨乌药治疗功能性胃肠疾病的可能疗效机制与物质基础, 为乌药的进一步开发和应用提供理论基础。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠 60 只, SPF 级, 体质量 180~220 g, 雌性, 实验动物合格证号 NO.43004700022217。许可证号 SCXK(湘)2011-0003, 购买自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 药物及试剂

乌药: 批号 20150824; 番泻叶: 批号 2015112712, 湖南三湘中药饮片有限公司; 匹维溴铵片: 批号

639288, Abbott Products SAS 公司, 50 mg/片; SP、MTL、SEC、Ghrelin Elisa 试剂盒 (凯诺生物科技有限公司) 等。

1.3 仪器

AUE-210 分析天平 (长沙湘仪设备有限公司); 低温离心机 (湘仪实验设备有限公司); CYTATION3 多功能酶标仪 (美国 Biotek 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

选用 SD 雌性大鼠 60 只按体质量标号后随机分为 6 组, 每组 10 只, 一笼 5 只, 分别为空白组对照, 模型对照组, 乌药水提液低、中、高剂量组及阳性对照组。造模方法参考番泻叶灌胃+束缚应激进行改良后如下^[4-6]: 所有动物单只单笼饲养 1 周, 开始实验, 各组动物以番泻叶水煎剂 5 g/kg 灌胃, 每日 1 次, 持续 2 周。从第 2 周起, 用粗制棉绳束缚大鼠的双前肢, 影响其正常行动, 但不完全限制自由, 被束大鼠可以拖后腿缓慢爬行。束缚持续 1 周, 每天 30 min, 空白对照组不予任何处理。造模过程中观察并记录各组大鼠一般情况、大便含水量、腹壁撤退反射 (abdominal withdrawal reflex, AWR) 评分, 以各造模组大鼠粪便含水量高于空白对照组, 痛觉阈值低于正常组 ($P < 0.05$) 为造模成功的标准。

2.2 药物干预

造模成功后, 给药剂量按照实验动物研究“等效剂量”的计算方法, 即按 70 kg/200 g 大鼠转换系数 $r=0.018$ 计算等效剂量。对乌药低、中、高剂量组于每天进行束缚 30 min 后, 分别给予乌药水提液低剂量 0.94 g/kg、中剂量 1.88 g/kg、高剂量 3.76 g/kg 灌胃。阳性对照组给予匹维溴铵水溶液灌胃 1.5 g/kg。空白对照组和模型组束缚 30 min 后给予等量生理盐水灌胃, 持续灌胃 14 d, 每天 1 次。

2.3 模型评价方法

造模完成后, 参考 Al-Chaer ED 等^[7]具体评分标准: 0 分, 在进行扩张时大鼠无反应; 1 分, 大鼠头部短暂静止不动; 2 分, 大鼠腹部收缩, 但为抬离桌面; 3 分, 大鼠腹部收缩抬离桌面; 4 分, 大鼠身体呈

弓形,骨盆抬高。用 8F 双腔导尿管与装有生理盐水的注射器相连后从肛门插入约 5 cm,用棉线将鼠尾根部和导尿管绑在一起,固定导尿管。待其稳定后,缓慢推入生理盐水使导尿管顶端球囊扩张肠道,当引起大鼠腹部抬起(AWR 评分 3 分)时停止推水,记录注射器推进水量,作为痛觉阈值评价大鼠内脏敏感性。大便含水量测定方法:造模后,将各只大鼠放入代谢笼内正常喂养,收集各只大鼠大便,称取湿便质量,然后放入干燥箱内烘干 20 min 后再称取干便质量,湿便质量与干便质量之差除以湿质量即为大便含水量^[8]。

2.4 取材方法与指标测定

实验结束后,各组大鼠禁食不禁水 24 h,用 10%水合氯醛 350 mg/kg 腹腔注射麻醉,腹主动脉采血,每只取 5 mL;室温放置 2 h 后,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,放冰箱-20 ℃保存待测,采用 ELISA 检测血清 SP、Sec、MTL、Ghrelin 含量。

2.5 统计方法

统计分析采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计处理,计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。符合正态性和方差齐性的资料,采用单因素方差分析;不符合正态性和方差齐性的资料,采用非参数检验。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

实验过程中观察模型组及各给药组模型大鼠体质量增长缓慢、神态倦怠、皮毛散乱、少动、易激惹、大便粒数增多且不成形等症状。与空白对照组比较,其余各组大便含水量均高于空白组,具有显著差异($P<0.01$);与空白对照组比较,模型组以及各给药组疼痛阈值降低($P<0.01$),提示造模成功。见表 1。

表 1 造模完成后各组大鼠大便含水量以及

组别	痛觉阈值对比 ($\bar{x}\pm s, n=10$)	
	大便含水量(g)	痛觉阈值(mmHg)
空白对照组	1.97±0.71	38.77±4.06
模型对照组	7.99±1.28*	26.45±1.88*
乌药低剂量组	8.16±0.70*	24.55±2.77*
乌药中剂量组	8.53±0.82*	28.89±5.05*
乌药高剂量组	8.52±0.79*	25.76±3.54*
阳性对照组	8.26±1.09*	27.28±5.36*
<i>F</i>	62.82	34.59
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$ 。

各组大鼠血清 SP、Sec、Ghrelin、MTL 水平的比较:(1)与空白对照组比较,模型对照组 SP 高于空白对照组($P<0.05$),Sec 低于空白对照组($P<0.01$),Ghrelin、MTL 均高于空白对照组($P<0.01$),提示模型成功;(2)与模型对照组比较,乌药水提液低、中、高剂量组及阳性对照组血清 SP 水平均降低,有显著性差异($P<0.01$),Sec 水平均显著升高($P<0.01$);乌药水提液低剂量组血清 MTL 降低($P<0.05$),中、高剂量组以及阳性对照组 MTL 水平降低($P<0.01$);(3)乌药水提液低、中、高剂量组以及阳性对照组 Ghrelin 差异无统计学意义($P>0.05$),与中剂量组 SP 水平无统计学意义($P>0.05$);(4)乌药低剂量组与乌药中剂量组、高剂量组、阳性对照组血清 Sec、MTL 水平比较差异均有统计学意义($P<0.01$);乌药中剂量组与与乌药高剂量组血清 SP 水平比较差异有统计学意义($P<0.05$),乌药中剂量组与乌药高剂量组、阳性对照组血清 Sec、MTL 水平比较差异均有统计学意义($P<0.01$);与阳性对照组比较,血清 Sec、MTL 差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清 SP、Sec、Ghrelin、MTL 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	剂量(g/kg)	SP	Sec	Ghrelin	MTL
空白对照组	-	84.6±3.31	190±4.88	1422±9.18	336±5.99
模型对照组	-	116±2.68*	149±6.76**	1964±25.5**	392±33.4**
乌药低剂量组	0.94	94.9±4.73 [▲]	164±3.54 [▲]	1981±37.9	354±1.52 ^{▲▲}
乌药中剂量组	1.88	90.5±2.83 [▲]	173±3.11 ^{▲△△}	1556±105.1	345±2.39 ^{▲△△}
乌药高剂量组	3.76	84.6±2.20 ^{▲△##}	184±5.02 ^{▲△△##}	1987±49.6	331±11.1 ^{▲△△##}
阳性对照组	3×10 ⁻³	85.9±7.97 [▲]	191±2.42 [▲]	1965±38.3	305±14.3 [▲]
<i>F</i>		50.58	79.40	87.63	19.34
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较 * $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型对照组比较[▲] $P<0.01$,^{▲▲} $P<0.05$;与乌药低剂量组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与乌药中剂量组比较,^{##} $P<0.01$ 。

4 讨论

脑肠肽可作为胃肠道肽能神经释放的调解递质或者神经递质作用于胃肠道,也可以直接作用于胃肠道感觉神经末梢或平滑肌细胞的相应受体而调解胃肠功能。目前已知 SP 与 IBS-D 的发病有着密切的联系,李宁宁等^[9]研究发现肠神经系统中的 P 物质对消化道平滑肌有强烈的刺激作用,可增加胃肠蠕动,刺激小肠和结肠分泌水和电解质,增加血管渗透性;脊髓背角释放的 SP 可激活血小板释放 5-HT,诱发 IBS,其中 SP3 能将肠道感觉信息传递给中枢神经系统,参与内脏疼痛敏感的发生^[10];Keszthelyi D 等^[11]研究发现在 IBS 患者肠黏膜中,SP 含量增多,与 IBS 患者疼痛症状相关。本实验结果提示乌药水提液对于改善 IBS-D 患者腹泻、腹痛等症状具有明显作用。促胰液素可增强缩胆囊素的作用和胰酶的分泌,抑制胃酸分泌以及胃肠道运动功能,本实验中乌药水提液低、中、高剂量以及阳性对照组均可以升高 IBS-D 大鼠血清 Sec 水平,具有统计学意义 ($P < 0.01$),提示乌药水提液可以有效抑制 IBS-D 大鼠胃肠运动。胃动素通过调节消化间期胃肠道移行复合运动并促进小肠分节运动促进胃肠运动及加速胃排空,大量研究发现胃排空与血清 MTL 水平密切相关,黄鹤飞等^[12]研究发现 MTL 能够作用于消化道平滑肌细胞上的受体,使细胞内 Ca^{2+} 浓度增高激发消化道的机械运动和电活动,从而调节胃肠、胆囊、食管运动,促进胃肠运动和胃肠道对水、电解质的运输。本实验结果得出,乌药水提液低、中、高剂量组以及阳性对照组均可抑制 IBS-D 大鼠血清 MTL 水平,提示乌药水提液对抑制 IBS-D 大鼠胃肠运动,延缓胃排空,缓解胃肠痉挛具有显著意义。Ghrelin 是生长激素促分泌激素受体(GHS-R)的内源性配体,具有保护胃肠黏膜、促进胃肠蠕动及胃酸分泌、改善胃肠动力障碍的作用。王燕等^[13]通过实验研究发现,Ghrelin 可剂量依赖性地促进大鼠小肠转运,其受体拮抗剂抑制小肠转运;静脉给予 Ghrelin 促进胃肠消化间期移行性复合肌电活动,此作用可能通过胆碱能通路起作用,与 NO 通路关系密切;Oka T 等^[14]研究发现一些传统中草药可以通过促进 Ghrelin 的分泌,改变胃肠动力异常。本实验中乌药水提液低、中、高剂量组以及阳性对照组对 IBS-D 大鼠血清 Ghrelin 水平影响差

异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论:乌药水提液可以降低 IBS-D 大鼠模型血清 SP、MTL 水平,升高血清 Sec 水平,对血清 Ghrelin 水平影响差异无显著统计学意义。提示乌药水提液可能通过降低大鼠血清 SP、MTL 水平,升高血清 Sec 水平,来抑制 IBS-D 大鼠胃肠运动,延缓胃排空,从而一定程度上改善 IBS-D 大鼠腹痛、腹泻症状。

参考文献:

- [1] 海萍,高原,李蓉涛,等.乌药的化学成分研究[J].中草药杂志,2016,47(6):872-875.
- [2] 聂子文,郭建生,陈君,等.乌药不同提取部位对小肠推进、胃排空的影响[J].中药药理与临床,2011,27(2):93-95.
- [3] 史瑞瑞,王晶.脑肠肽与肠易激综合征相关性研究进展[J].世界科学技术——中医药现代化专题讨论:临床常见病的动物模型建立及药物干预研究,2013,8(15):12-14.
- [4] 李延青,郭玉婷.肠易激综合征的动物模型研究[J].胃肠病学和肝病学杂志,2004,13(4):435-439.
- [5] 刘美荣,肖瑞飞,彭芝配,等.针刺“足三里”“太冲”穴对腹泻型肠易激综合征大鼠胃肠激素的影响[J].针刺研究,2012,37(5):363-368.
- [6] 邓桂球,张蓓,张喆,等.六味顺激胶囊对肝郁脾虚型肠易激综合征大鼠内脏敏感性及其五羟色胺水平的影响[J].中国中医药信息杂志,2014,21(8):46-48.
- [7] Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hyper-sensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroenterology, 2000, 119(5):1276-1285.
- [8] 许惠娟,刘慧慧,滕超,等.痛泻要方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠水通道蛋白 8 表达影响的机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):141-144.
- [9] 李宁宁,方秀才.脑-肠轴在肠易激综合征发病中的作用[J].胃肠病学和肝病学杂志,2013,22(2):163-166.
- [10] 王艳杰,关洪全,柴纪严,等.眼针对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠 P 物质表达的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(10):2268-2271.
- [11] Keszthelyi D, Troost FJ, Jonkers DM, et al. Alterations in mucosal neuropeptides in patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis in remission: A role in pain symptom generation[J]. Eur J Pain, 2013, 17(9):1299-1306.
- [12] 黄鹤飞,陈颖,朱晓新,等.中药干预肠易激综合征的脑肠肽调节研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(11):208-217.
- [13] 王燕,董蕾,赵平,等.Ghrelin 对大鼠小肠转运及消化间期移行性复合肌电活动的作用及机制[J].南方医科大学学报,2008,28(3):328-332.
- [14] Oka T, Okumi H, Nishida S, et al. Effects of Kampo on functional gastrointestinal disorders[J]. Biopsychosoc Med, 2014, 8(1):5.