肠激安胶囊对 IBS-D 模型大鼠脑肠轴中 NPY mRNA 表达及 ACTH 含量的影响

房财富[1]　唐洪梅[2]　廖小红[2]　何嘉仑[2]　李得堂[2]　丘振文[2]

摘要　目的　探讨肠激安胶囊对腹泻型肠易激综合征(diarrhea predominant irritable bowel syndrome,IBS-D)大鼠下丘脑和结肠组织神经肽 Y(neuropeptide Y,NPY)mRNA 表达和血清促肾上腺皮质激素(adreno-cortico-tropic hormone,ACTH)含量的影响。**方法**　将 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,匹维溴铵组(0.018 g/kg),肠激安胶囊高(2.812 g/kg)、中(1.406 g/kg)、低(0.703 g/kg)剂量组,每组 8 只,模型组以及给药组采用母乳分离 + 醋酸刺激 + 四肢束缚法制备 IBS-D 大鼠模型,正常组和模型组给予生理盐水,给药组灌胃 14 天,采用 ELISA 法检测各组大鼠血清 ACTH 含量,采用 RT-PCR 法检测各组大鼠下丘脑及结肠组织 NPY mRNA 表达。**结果**　与正常组比较,模型对照组大鼠血 ACTH 明显升高(P < 0.01),下丘脑、结肠组织 NPY mRNA 表达明显降低(P <0.01);与模型组比较,肠激安胶囊高、中剂量组及匹维溴胺组大鼠血 ACTH 明显降低(P <0.01,P <0.05),匹维溴铵组和肠激安胶囊高、中、低剂量组下丘脑、结肠组织 NPY mRNA 表达上调(P <0.05)。**结论**　肠激安胶囊对 IBS-D 大鼠脑肠轴异常有调节作用,其作用机制可能是通过上调下丘脑和结肠组织 NPY mRNA 表达和下调 HPA 轴中 ACTH 含量。

关键词　肠激安胶囊;腹泻型肠易激综合征;神经肽 Y;促肾上腺皮质激素;脑肠轴

Effect of Changji′an Capsule on mRNA Expressions of NPY and ACTH Contents in Brain-Gut Axis of IBS-D Model Rats

FANG Cai-fu[1], TANG Hong-mei[2], LIAO Xiao-hong[2], HE Jia-lun[2], LI De-tang[2], and QIU Zhen-wen[2]　*1 First Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405), China; 2 Pharmaceutical College, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405), China*

ABSTRACT　Objective　To explore the effect of Changji′an Capsule (CA) on mRNA expressions of neuropeptide Y (NPY) in the hypothalamus and colon and serum levels of adreno-cortico-tropic hormone (ACTH) in rats of diarrhea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) model rats. Methods　Totally 48 SD rats were randomly divided into six groups, i.e., the normal control group, the model group, the Pinaverium Bromide group (PB, 0.018 g/kg), the high dose CA group (2.812 g/kg), the medium dose CA group (1.406 g/kg), and the low dose CA group (0.703 g/kg), 8 in each group. The IBS-D rat model was established by using separation of breast milk + stimulation of acetic acid + constraint of four limbs. Normal saline was given to rats in the normal control group and the model group. All medication lasted for 14 successive days by gastrogavage. The serum content of ACTH was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of NPY mRNA in the colon and the hypothalamus were detected using real-time fluorescence quantitative PCR. Results　Compared with the normal control group, the serum ACTH content significantly increased (P <0.01), the NPY mRNA expression in the colon and the hypothalamus obviously decreased (P < 0.01) in the model control group. Compared with the model group, the serum ACTH obviously decreased in the high dose CA group, the medium dose CA group, and the PB group (P <0.01, P <0.05). The NPY mRNA expression in the colon and the hypothalamus were obviously up-regulated in the high dose CA group, the medium dose CA group, the low dose CA group, and the PB group (P <0.05). Conclusions　CA could modulate the abnormity of brain-gut axis of IBS-D rats possibly by up-regulating NPY mRNA expressions in the hypothal-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81073160);广东省自然科学基金资助项目(No. 10151040701000041,No.S2012010010539)
作者单位:1.广州中医药大学第一临床医学院(广州 510405);2.广州中医药大学第一附属医院药学部(广州 510405)
通讯作者:唐洪梅,Tel:020 - 36588708,E-mail:tanghongmei2000@163.com
DOI: 10.7661/CJIM.2013.07.0948

中国中西医结合杂志

amus and the colon and down-regulating the ACTH content in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

KEYWORDS Changji'an Capsule; diarrhea predominant irritable bowel syndrome; neuropeptide Y; adreno-cortico-tropic hormone; brain-gut axis

腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome ,IBS-D)临床上常以腹痛、腹泻为主要症状,中医对于本病的认识多为肝郁脾虚、肝失疏泄、脾气渐虚的疾病范畴[1]。国内外大多研究表明,IBS-D 患者多伴有心烦、焦虑、抑郁等植物神经功能失调的症状, 发病易受精神等因素影响,这些症状和中医的肝郁脾虚学说有着重要的联系,有相关研究表明神经肽 Y(neuropeptide Y ,NPY)作为一种脑肠肽,在情感、焦虑、抑郁证模型中表达明显降低[2]。目前对于 IBS-D 的病理机制研究不断深入,脑肠轴异常机制成为该病的一个重要的研究方向。脑肠肽在脑肠轴中起着重要的传递作用,本课题组前期研究表明 NPY 作为一种神经递质,在 IBS-D 脑肠轴异常的发病机制中起着重要的作用[3]。

肠激安胶囊是在肠激安方的基础上成功开发的医院制剂,肠激安方是临床使用多年验方,由白芍、白术、延胡索、柴胡等中药组成,主要用于治疗 IBS-D,临床疗效确切。本课题组前期的药理药效实验也证实了肠激安方具有较好的治疗效果[4],但是肠激安胶囊治疗 IBS-D 的分子机制尚不明确,其作用机制是否与调节其脑肠轴异常功能相关? 同时 IBS-D 患者多有心烦、烦躁等应激症状,而有研究表明促肾上腺皮质激素(adreno-cortico-tropic-hormone,ACTH)在应激模型中表达量明显增高[5],ACTH 在 IBS-D 中发挥怎样的调节作用尚未见报道。为此,本研究从分子水平对肠激安胶囊作用于 IBS-D 模型大鼠下丘脑和结肠组织中 NPY 基因的表达进行研究,同时采用 ELISA 法研究肠激安胶囊治疗 IBS-D 的内分泌调节机制,以探讨肠激安胶囊影响 IBS-D 脑肠轴异常调节的机制。

材料与方法

1 实验动物 2 天龄 SPF 级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 9 ~ 11 g。由广东省医学实验动物中心提供,实验动物中心动物合格证号:0093643。

2 药物 肠激安胶囊(0.45 g/粒,每粒含生药 1.302 g,由白芍、延胡索、黄连、柴胡等组成,经提取、浓缩和干燥等工艺后制得,由广东省中医研究所提供,批号:100401)。匹维溴铵片(50 mg,苏威制药有限公司,批号:619865)。

3 试剂及仪器 Trizol Reagent(美国 Invitrogen 公司),Bio-Rad iQ™ 5 Multicolor Real-time PCR(美国 Bio-Rad 公司),Bio-Rad SmartSpec™ Plus Spectrophotometer(美国 Bio-Rad 公司),AlphaImager HP 凝胶成像系统(美国 ProteinSimple 公司),RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(美国 Fermentas 公司),Maxima™ SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix(美国 Fermentas 公司),ACTH 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号:1111221)。

4 IBS-D 模型制备 采用母乳分离 + 醋酸刺激 + 四肢束缚法制作 IBS-D 大鼠模型[6]。60 只乳鼠出生后第 2 ~ 14 天每天与母鼠隔离 3 h,第 15 ~ 27 天将石蜡油润滑后的输液导管经肝门插入 2 cm,注入 0.5% 醋酸 0.5 mL,注入 0.087 mol/L 醋酸 0.2 ~ 0.5 mL,醋酸量从出生 8 天为 0.2 mL 开始, 每隔 2 天增加0.1 mL,到出生 14 天开始维持 0.5 mL。本实验造模成功的大鼠为 48 只,其中 8 只乳鼠被母鼠所吃,4 只乳鼠在造模中死亡,造模成功率为 80%。

5 动物分组及干预方法 造模成功后,将模型大鼠随机分成模型组,匹维溴铵组,肠激安胶囊高、中、低剂量组,每组 8 只。另设正常组 8 只。各给药组按20 mL/kg灌胃给药,给药剂量为:匹维溴铵组(0.018 g/kg),肠激安胶囊高剂量组(2.812 g/kg,相当于临床人用药剂量 2 倍),肠激安胶囊中剂量组(1.406 g/kg),肠激安胶囊低剂量组(0.703 g/kg)。连续干预 14 天。正常组乳鼠每天直肠内给予生理盐水 0.2 ~0.5 mL。乳鼠离乳前与母鼠一起生活[7]。从 27 天后的 2 周内, 不进行任何操作,正常饲养。

6 检测指标及方法 干预结束后 2 天,采用眼眶静脉丛采血 1 mL,迅速取出大鼠下丘脑组织和一段 2 cm的结肠组织,液氮冷冻后置于 -80 ℃冰箱保存。取血样用 ELISA 法检测,按照试剂盒说明书步骤进行。

6.1 ACTH 含量 按照 ELISA 试剂盒及所提供的方法进行操作,检测血清 ACTH 含量。

6.2 NPY mRNA 表达 采用 RT-PCR 法检测。总 RNA 提取和 cDNA 合成:取冻存组织,加液氮研磨后按每 100 mg 组织加入 1 mL TRIzol 试剂,总 RNA 的提取按 TRIzol 试剂说明书进行。用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,用紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和含量。按照反转录试剂盒要求,用

Oligo (dT)$_{18}$合成 cDNA, −20 ℃ 保存备用[8],引物由上海生工公司合成。引物序列如下,NPY:上游 5′-TTCAGCCACCCGAGAT-3′,下游 5′-GCTTATGACCCGCACTTA-3′。内参 18 S:上游 5′-CGACACTACATCAATC-3′,下游 5′-ATACAACGACAACAAG-3′。荧光定量 PCR 总反应体积 25 μL,反应体系为:12.5 μL SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix,前后引物各 1 μL,1 μL cDNA,9.5 μL ddH$_2$O。反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 50 s, 共 35 个循环;最后 72 ℃ 7 min 结束反应,反应产物通过熔解曲线进行特异性分析。

7　统计学方法　采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析,实验资料结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较方差齐用 *One-Way ANOVA* 法,两两比较方差齐用 *LSD* 法,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1　各组大鼠一般状态比较　正常组大鼠毛发有光泽,饮食正常,活动如常,反应机警;模型组大鼠精神较萎靡,毛发无光泽,饮食减少,活动量减弱,大便不成形,有不同程度的腹泻。匹维溴铵组和肠激胶囊安高、中、低剂量组大鼠毛发有光泽,饮食和活动量相对于模型组增加,腹泻症状改善明显。各组干预期间均无大鼠死亡。

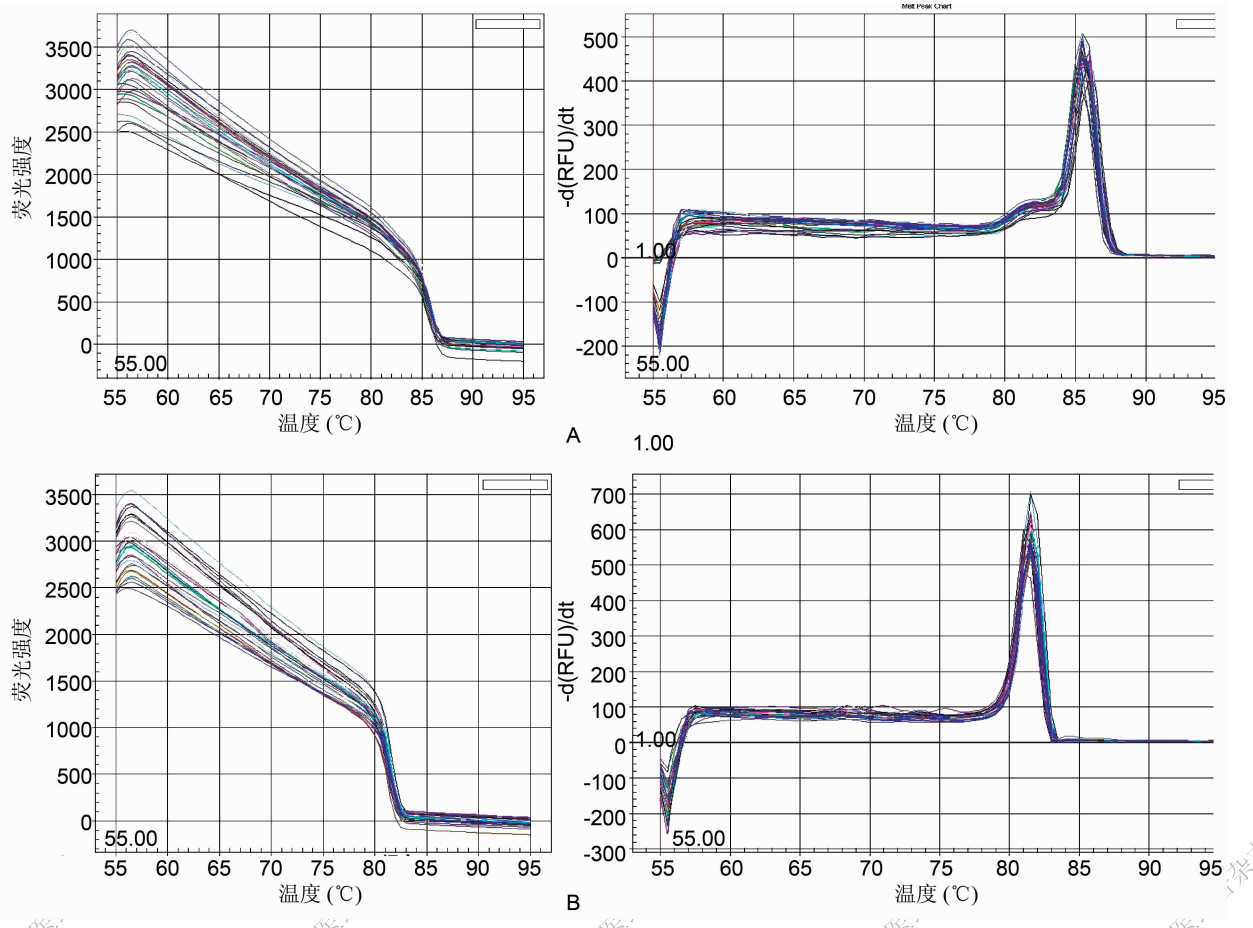
2　各组血清 ACTH 含量比较(表 1)　与正常组比较,模型组大鼠血 ACTH 升高($P<0.01$);与模型组比较,肠激安胶囊高、中剂量组及匹维溴胺组大鼠血 ACTH 降低($P<0.01$)。肠激安胶囊低剂量组与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1　各组血清 ACTH 含量比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	ACTH(pg/mL)
正常	8	—	9.2±0.4*
模型	8	—	12.3±0.8
匹维溴胺	8	0.018	10.1±1.1*
肠激安胶囊高剂量	8	2.812	9.9±0.8*
中剂量	8	1.406	10.9±1.1*
低剂量	8	0.703	11.5±0.9

注:与模型组比较,*$P<0.01$

3　RT-PCR 产物特异性分析(图 1)　NPY 目的



注:A 为 18S 基因熔解曲线;B 为 NPY 基因溶解曲线

图 1　RT-PCR 产物特异性分析

中国中西医结合杂志

基因和 18S 内参基因 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳证实为单一目的条带。熔解曲线分析显示 NPY 和18 S 的基因 PCR 产物的熔解曲线峰值分别为 81.5、86.0 ℃,熔解曲线为单一锐利主峰,说明产物中无非特异性扩增及引物二聚体。

4 各组下丘脑、结肠组织 NPY mRNA 水平比较(表 2) 与正常组比较,模型组下丘脑、结肠组织 NPY mRNA 表达明显降低($P<0.01$);与模型组比较,匹维溴铵组和肠激安胶囊高、中、低剂量组下丘脑、结肠组织组织 NPY mRNA 表达上调($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 2 各组下丘脑、结肠组织 NPY mRNA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量 (g/kg)	下丘脑 NPY mRNA	结肠 NPY mRNA
正常	8	—	1.05 ±0.06 **	1.01 ±0.06 **
模型	8	—	0.38 ±0.04	0.46 ±0.07
匹维溴胺	8	0.018	0.83 ±0.06 **	0.75 ±0.05 **
肠激安胶囊高剂量	8	2.812	0.62 ±0.08 **	0.68 ±0.08 **
中剂量	8	1.406	0.65 ±0.09 **	0.59 ±0.10 *
低剂量	8	0.703	0.51 ±0.10 *	0.51 ±0.07 *

注:与模型组比较, *$P<0.05$, **$P<0.01$

讨 论

目前对 IBS-D 的病理机制尚不明确,脑肠轴异常可能是导致 IBS-D 患者对各种应激的运动反应增强和内脏敏感性增加的主要因素,是 IBS-D 病理生理机制的共同通路[9,10]。脑—肠之间的联系可能是通过分泌一些神经递质,在中枢神经系统(central nervous system,CNS)与肠神经系统(enteric nervous system,ENS)以及胃肠道效应细胞间传递而实现,这些神经递质不但存在于 ENS 也存在于 CNS,称为脑肠肽。脑肠肽具有神经递质和胃肠激素双重功能,在调节内脏感觉、分泌和运动中起着重要作用。NPY 是由 36 个氨基酸残基组成的多肽,广泛分布于哺乳动物 ENS 和 CNS,可引起血管收缩,其含量与应激反应强度有关。本研究表明,NPY 基因在 IBS-D 模型大鼠下丘脑和结肠组织中表达相对于对照组明显降低,说明 NPY 作为一种重要的脑肠肽,在本病西医"脑肠轴异常"学说中起着重要的传递作用,同时 NPY 也在一定程度上反映了中医的肝郁[11],在本病肝郁脾虚的病机中起着重要的作用,因此本病中医肝郁脾虚的病机与西医脑肠轴异常学说之间存在着密切的相关性,NPY 基因可能是中医和西医对于本病认识共同和客观的物质基础。国内学者霍清萍[12]也提出,在 IBS 发病及病因学、病变机制的本质认识上,中西医学表现出惊人的吻合和统一,这一吻合和统一将重新诠释中医学肝郁脾虚的病理机制。

匹维溴铵是胃肠道具有高度选择性解痉作用的钙通道拮抗剂,能直接作用于肠道平滑肌细胞的钙通道,从而缓解肠道痉挛,恢复肠道正常功能。国内外许多临床研究表明匹维溴铵可显著减轻 IBS 患者的腹痛,腹泻等症状[13-15]。肠激安胶囊作为本院成功开发的医院制剂,临床用于治疗 IBS-D 效果明显[16,17]。主要由白芍、白术、延胡索、黄连、柴胡等药物组成。李瑜等[18]研究发现芍药苷可通过降低肠道敏感性,改善结肠电生理活动来治疗内脏高敏感性 IBS 模型大鼠。白术内酯可降低大鼠离体回肠自发运动的收缩力,还可降低回肠的发放频率,对乙酰胆碱(Ach)所致的大鼠回肠的痉挛有明显的抑制作用[19]。白术芍药散能降低内脏敏感性,增加 IBS 模型大鼠血浆及结肠组织 NPY 的含量,减弱脊髓背角神经元兴奋性,能够提高 IBS 模型大鼠血浆及结肠黏膜 CGRP 水平[20]。

本研究表明,在下丘脑组织中,肠激安胶囊高、中、低剂量均能明显提高 NPY 基因的表达,在结肠组织中,肠激安胶囊高、中剂量能明显提高 NPY mRNA 表达,低剂量组有提高趋势,但差异无统计学意义。说明中医学疏肝健脾止泻法治疗 IBS-D 的作用机制与调节 NPY mRNA 表达有着一定的关联。其作用机制可能是通过肠神经丛中 NPY 与肠黏膜下神经节中的周围性胆碱乙酰转移酶(Choline acetyltransferase, ChAT)相结合而发挥作用,或在中枢通过作用于海马和下丘脑发挥拮抗应激、稳定情绪的作用[21-22]。

IBS-D 患者在应激等刺激下容易发病和加重病情,而在应激反应中下丘脑—垂体—肾上腺(HPA)轴起到了关键性的作用。ACTH 作为 HPA 轴的产物,由垂体前叶细胞分泌,其合成和分泌受下丘脑 CRH、肾上腺皮质激素以及加压素的调节,它在学习、记忆、应激反应、保持内稳态的稳定和调控疼痛中发挥重要作用[23]。本研究表明,IBS-D 模型组 ACTH 显著升高,肠激安胶囊高、中剂量能够降低血清 ACTH 含量,肠激安胶囊治疗 IBS-D 的机制可能与下调 HPA 轴 ACTH 含量有关。本研究主要研究了肠激安胶囊作用于 IBS-D 模型脑肠轴的影响,但该药对 IBS-D 下丘脑和结肠组织的有关蛋白作用机制还尚不明确,本课题下一步将开展 IBS-D 模型组和肠激安胶囊组下丘脑组织和结肠组织的差异蛋白研究,从而进一步明确肠激安胶囊作用于 IBS-D 的分子机制。

参 考 文 献

[1] 汪红兵,张声生.肠易激综合征中医证候学特点的认知

和探索[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(21): 2210 -2215.

[2] 常东,樊亚巍,陶永胜,等.肠易激综合征的中医虚实证型与血浆脑肠肽水平变化的相关性研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2008, 16(5): 299 -301.

[3] 唐洪梅,房财富,廖小红,等.神经肽 Y 和 5 - 羟色胺在腹泻型肠易激综合征模型大鼠中表达的研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(7): 916 -920.

[4] 唐洪梅,何嘉仑,廖小红,等.肠激安提取物对小肠吸收功能及推进运动的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 134 -136.

[5] 谢婷婷,孙艳,王东晓,等.远志 YZ-50 对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及血清 CRH、ACTH 和 COR 的影响[J]. 解放军药学学报, 2008, 24(2): 95 -98.

[6] 唐洪梅,何嘉仑,闫雪,等.醋酸刺激加母婴分离致大鼠肠易激综合征模型的建立及评价[J]. 中医研究, 2010, 23(10): 19 -21.

[7] 唐洪梅,李得堂,黄樱华,等.腹泻型肠易激综合征大鼠模型的建立及敏感性评估的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(5): 693 -694.

[8] 肖白玉,党华, 甘嘉裕,等.实时荧光定量 PCR 检测鼻咽癌组织中 PTCH-1 和 SMO 基因的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(10): 955 -957.

[9] Mertz H, Naliboff B, Munakata J. et al. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome[J]. Gastroenterology, 1995,109(1): 40 -52.

[10] Kellow JE, Phillips SF, Miller LJ, et al. Dysmotility of the small intestine in irritable bowel syndrome[J]. Gut, 2009, 29(9): 1236 -1243.

[11] 刘耀文.脑神经肽 Y 系统:治疗焦虑症、抑郁症及酒精依赖的候选靶标[J]. 国外医学药学分册, 2004, 31(6): 348 -351.

[12] 霍清萍.从肠易激综合征脑肠轴学说谈肝郁脾虚病理机制[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2005, 13(5): 318 -320.

[13] Schmulson MJ, Troche JM, Vargas J, et al. S1332 expected frequency of stool patterns according to the Bristol scale after 4 weeks of treatment with pinaverium bromide + simethicone for IBS ROME Ⅲ patients. A report from the Mexican IBS working group[J]. Gastroenterology, 2010, 138(Suppl 1): 230 -231.

[14] 詹丽杏,李兆申,邹多武,等.匹维溴铵治疗肠易激综合征的临床疗效及改变肛门直肠动力和内脏敏感性研究[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(8): 477 -480.

[15] 张竹,李文兵,徐梦军.匹维溴铵治疗肠易激综合征的疗效分析与评价[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(10): 43 -46.

[16] 唐洪梅,黄樱华,李得堂,等.肠激安方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 T 淋巴细胞和 5 - 羟色胺的影响[J]. 广州中医药大学, 2009, 26(2): 164 -167.

[17] 唐洪梅,何嘉仑,廖小红,等.肠激安提取物对小肠吸收功能及推进运动的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 134 -136.

[18] 李瑜,彭成,朱力阳,等.芍药苷治疗内脏敏感性肠易激综合征的研究[J]. 中药与临床, 2011, 2(6): 38 -41.

[19] 张奕强,许实波,林永成.白术内酯系列物的胃肠抑制作用[J]. 中药材,1999, 22(12): 636.

[20] 郑礼娟,秦昆明,姚仲青,等.白术芍药散治疗肠易激综合征的作用机制研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(4): 815 -819.

[21] Husum H, Van Kammen D, Termeer E, et al. Topiramate normalizes hippocampal NPY-LI in flinders sensitive line 'depressed' rats and up-regulates NPY, galanin, and CRH-LI in the hypothalamus: implications for mood-stabilizing and weight loss-inducing effects[J]. Neuropsychopharmacology, 2008, 28(7): 1292 -1299.

[22] Seybold VS, McCarson KE, Mermelstein PG, et al. Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin receptors by rat spinal neurons[J]. J Neurosci, 2008, 23(5): 1816 -1824.

[23] Servatius RJ, Beck KD, Moldow RL, et al. A stress-induced anxious state in male rats: corticotropin-releasing hormone induces persistent changes in associative learning and startle reactivity[J]. Biol Psychiatry, 2005, 57(8): 865 -872.

(收稿:2012 -10 -10　修回:2013 -03 -04)

中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志