

金仁陈子方对 IBS 模型大鼠的治疗作用及机理研究

张 蓓¹, 袁凤娟², 洪煜鹏², 尹西拳¹, 吴依娜¹, 李震华¹, 刘小虹¹ (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广东东泰乳业有限公司, 广东 揭阳 515500)

摘要: **目的** 观察金仁陈子方对母子分离复合应激诱导的肠易激综合征(IRS)大鼠的治疗作用, 并探讨其作用机理。**方法** 采用新生大鼠母子分离与避水应激复合法复制内脏高敏感性 IRS 大鼠模型, 观察金仁陈子方对 IRS 大鼠内脏敏感性、避水应激排便粒数、血清一氧化氮(NO)含量、血清及结肠组织 5-羟色胺(5-HT)含量的影响。**结果** 与模型组比较, 金仁陈子方高、低剂量组大鼠内脏敏感性显著降低($P < 0.01$), 避水应激排便粒数显著减少($P < 0.01$), 血清 NO 含量显著升高($P < 0.01$), 血清及结肠组织 5-HT 含量均显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 金仁陈子方可通过调节大鼠体内 NO、5-HT 水平, 显著改善 IRS 模型大鼠肠道功能。

关键词: 金仁陈子方; 肠易激综合征; 母子分离; 一氧化氮; 5-羟色胺

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0149-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.009

Therapeutic Effect of Jinren Chenzi Formula on Irritable Bowel Syndrome Model Rat and Its Possible Mechanism

ZHANG Bei¹, YUAN Fengjuan², HONG Yupeng², YIN Xiquan¹, WU Yina¹, LI Zhenhua¹, LIU Xiaohong¹ (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangdong Dongtai Dairy Co., Ltd, Jieyang 515500 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the therapeutic effect of Jinren Chenzi formula on the model rats of irritable bowel syndrome induced by maternal separation combined with multiple stresses, and to investigate its possible mechanism.

Methods IRS rat model with visceral hypersensitivity was established by neonatal maternal separation and water-avoidance stress, in order to study the effect of Jinren Chenzi formula on rat visceral hypersensitivity, water stress-induced defecation grains, serum contents of NO and 5-HT, and colonic 5-HT content. **Results** Compared to the model group, high- and low-dose Jinren Chenzi formula could significantly decrease the visceral hypersensitivity of IRS rats ($P < 0.01$), obviously reduce the water stress-induced defecation grains ($P < 0.01$), significantly increase serum NO content ($P < 0.01$) and decrease the 5-HT content in serum and colon obviously ($P < 0.05$). **Conclusion** Jinren Chenzi formula can effectively improve gastrointestinal disorders of IRS rats, and its therapeutic mechanism may be related to regulating NO and 5-HT level.

Keywords: Jinren Chenzi formula; Irritable bowel syndrome; Neonatal maternal separation; NO; 5-HT

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IRS)是一组包括持续或间歇发作并以腹痛、腹胀、排便习惯改变和大便性状异常为临床表现的肠功能紊乱性疾病^[1], 尚无器质性疾病的证据^[2]。目前认为其发病机

制可能与肠道动力、内脏感觉过敏、激素水平变化等有关^[1]。金仁陈子方为周福生教授的经验方, 该方由鸡内金、火麻仁等中药组成, 具有消食化积、行气健脾的功效, 常用于治疗婴幼儿辅食添加初期容

收稿日期: 2013-12-18

作者简介: 张蓓, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药效物质基础研究。Email: 1489430680@qq.com。通讯作者: 刘小虹, 教授, 博导, 研究方向: 中医药防治慢性阻塞性肺疾病的临床与实验研究。Email: 8220202123@163.com。

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2011B090400167)。

易出现的腹泻、呕吐、便秘、不思饮食等症状。本研究采用母子分离加避水应激复合方法复制 IBS 大鼠模型,观察金仁陈子方对 IBS 大鼠内脏敏感性、避水应激排便粒数及大鼠体内一氧化氮(NO)、5-羟色胺(5-HT)水平的影响。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 鸡内金、火麻仁、陈皮、莱菔子购于广东省中医院;匹维溴铵片(得舒特),法国苏威制药,批号:627944;NO 试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:20130923;5-HT 酶联免疫吸附试剂盒,上海蓝基生物科技有限公司,批号:20130922。

1.2 动物 1 日龄 SD 大鼠,6 窝,SPF 级,雌雄兼用,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(粤)2013-0020。

1.3 仪器 UV Blustar A 型紫外-可见分光光度仪,北京莱伯泰科仪器有限公司;RT-2100C 酶标仪,深圳雷杜公司;X102 血压计,上海医疗器械有限公司;医用导尿管(8 号),广东清远医疗器械厂。

1.4 方法

1.4.1 金仁陈子方水提液的制备 将鸡内金、火麻仁、陈皮、莱菔子药材饮片制成粗粉,加入 8 倍量水,煎煮 2 次,每次 1 h,合并滤液,减压浓缩,使水提液浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以生药计)。给药时将水提液用蒸馏水稀释成 $0.159, 0.309 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液。

1.4.2 IBS 大鼠模型的复制^[3-5] 取 1 日龄 SD 大鼠 6 窝,除 1 窝幼鼠作为正常对照组外,其余 5 窝为模型组。模型组幼鼠出生后的第 2~14 天,每天母子分离 180 min(幼鼠从母鼠笼中取出,放入 $5 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ 盒中,与母鼠分离后返回母鼠笼中),从第 15 天开始不进行任何操作。幼鼠在出生第 24 天后断奶,并从母鼠中分离出,正常饲养。

1.4.3 IBS 大鼠模型的评价 上述新生期大鼠在第 5 周和第 7 周,采用腹部回缩反射法(AWR)^[4-5]进行内脏敏感性评估。实验时将血压计、8F 导尿管与自制气囊用三通管连接,乙醚麻醉大鼠,气囊用石蜡油润滑后插入大鼠肛门约 5 cm,并用胶布把导尿管和大鼠尾巴根部绑在一起,以固定气囊。大鼠苏醒后,将其放在特制的透明塑料笼内,待大鼠适应环境,通过导尿管向气囊内缓缓打气,可以在血压计上读出气囊内压力,分别观察引起大鼠腹部抬起以及背部拱起的压力阈值。为了准确得到评估结果,每一阈值都重复进行 3 次,每次持续 30 s,间隔 5 min,数据取平均值。

1.4.4 金仁陈子方对 IBS 模型大鼠内脏敏感性的影响 模型组大鼠在模型复制成功后,随机分为模型组、匹维溴铵组($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、金仁陈子方高、低剂量组($3.09, 1.59 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。第 8 周开始灌胃给药治疗,每天 1 次,连续 2 周,正常对照组和模型组给予等体积的生理盐水。末次给药 1 h 后进行内脏敏感性评估。

1.4.5 金仁陈子方对避水应激复合诱导的 IBS 模型大鼠的影响^[5-6] 取自制长方形水槽($1.5 \text{ m} \times 3 \text{ m}$),盛水深 10 cm,中间放置柱状平台(平台高于水面 2 cm),实验时将大鼠放于该平台上,观察并记录大鼠站立 1 h 内的排便粒数,评价金仁陈子方对避水应激诱导的 IBS 模型大鼠结肠运动紊乱的影响。避水应激测试 1 h 后再次进行内脏敏感性评估,评价金仁陈子方对复合应激诱导的 IBS 大鼠内脏敏感性的影响。

1.4.6 样本的制备 (1)血清的制备:各组大鼠在末次给药 24 h 后,用 10%的水合氯醛麻醉($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),腹主动脉采血,4 °C $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,-20 °C 保存待检。(2)结肠组织匀浆的制备:腹主动脉采血后,在距肛门 7 cm 内取结肠段标本 3 cm,用冰冷的生理盐水漂洗,除去血液及内容物,滤纸拭干,称质量,放入 10 mL 的小试管中。用移液管量取 0.9%冷生理盐水(生理盐水的体积为结肠组织重量的 9 倍)于小试管中,组织匀浆机 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 研磨制成 10%组织匀浆,4 °C $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,-20 °C 保存待检。

1.4.7 血清 NO、5-HT 和结肠组织 5-HT 含量测定 采用硝酸还原酶法测定 NO 含量,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 5-HT 含量,具体操作根据试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,各组数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析法(one-way ANOVA),组间两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 IBS 大鼠内脏敏感性的影响 见表 1。采用母子分离法复制 IBS 大鼠模型,模型组大鼠抬腹和拱背的压力阈值较正常对照组均显著降低($P < 0.01$),说明模型组大鼠内脏敏感性显著升高,提示模型复制成功;经不同剂量金仁陈子方治疗 2 周后,金仁陈子方高、低剂量组大鼠抬腹和拱背的压力阈值较模型组均显著升高($P < 0.01$),提示金仁陈子方对 IBS 模型大鼠内脏高敏感性有明显的改善作用。

表 1 各组大鼠治疗前后腹部回缩反射评估($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Abdominal withdrawal reflex assessment in rats of different groups before and after medication

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	第 7 周(治疗前)		第 9 周(治疗后)	
		抬腹/mmHg	拱背/mmHg	抬腹/mmHg	拱背/mmHg
正常对照组	-	59.49 ± 8.09	85.67 ± 9.53	59.09 ± 5.67	83.50 ± 5.91
模型组	-	43.68 ± 1.98**	67.66 ± 7.11**	45.84 ± 8.26**	65.94 ± 6.02**
匹维溴铵组	0.02	43.30 ± 0.88	72.60 ± 1.27	58.67 ± 3.09 [#]	82.34 ± 4.86 [#]
金仁陈子方高剂量组	3.09	44.06 ± 1.88	68.00 ± 4.44	55.21 ± 1.46 [#]	78.02 ± 4.10 [#]
金仁陈子方低剂量组	1.59	48.57 ± 3.53	70.61 ± 3.49	52.78 ± 2.83 [#]	76.73 ± 6.47 [#]

注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.01$ 。

2.2 对复合应激诱导的 IBS 大鼠内脏敏感性的影响

见表 2。与正常对照组比较，模型组大鼠避水应激排便粒数显著增加 ($P < 0.01$)；与模型组比较，金仁陈子方高、低剂量组大鼠避水应激排便粒数显著减少 ($P < 0.01$)。与正常对照组比较，模型组大鼠抬腹和拱背的压力阈值显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，金仁陈子方高、低剂量组大鼠抬腹和拱背的压力阈值有显著增加 ($P < 0.01$)。

表 2 金仁陈子方对避水应激诱导的大鼠排便粒数及复合应激诱导的大鼠内脏敏感性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of Jinren Chenzi formula on water stress-induced defecation grains and mutiple stress-induced visceral sensitivity in rats

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	排便粒数/h	复合应激后	
			抬腹/mmHg	拱背/mmHg
正常对照组	-	4.00 ± 1.05	58.35 ± 3.39	85.11 ± 7.02
模型组	-	9.10 ± 2.77**	43.72 ± 7.94**	65.12 ± 5.70**
匹维溴铵组	0.02	4.80 ± 1.87 [#]	58.82 ± 3.55 [#]	82.86 ± 4.41 [#]
金仁陈子方高剂量组	3.09	5.40 ± 2.37 [#]	55.21 ± 1.46 [#]	79.02 ± 5.42 [#]
金仁陈子方低剂量组	1.59	5.90 ± 2.28 [#]	53.09 ± 2.74 [#]	76.86 ± 6.43 [#]

注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.01$ 。

2.3 对 IBS 大鼠血清 NO 含量的影响 见表 3。与正常对照组比较，模型组 NO 含量显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，金仁陈子方高、低剂量组 NO 含量显著升高 ($P < 0.01$)。

2.4 对 IBS 大鼠血清 5-HT 含量的影响 见表 4。与正常对照组比较，模型组大鼠血清 5-HT 含量显著升高 ($P < 0.01$)，说明模型复制方法可行；与模型组比较，金仁陈子方高、低剂量组大鼠血清 5-HT 含量显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)，说明高、低剂量金仁陈子方对 IBS 模型大鼠血清 5-HT 水平有下调作用。

2.5 对 IBS 大鼠结肠组织 5-HT 含量的影响 见表 5。与正常对照组比较，模型组大鼠结肠组织 5-HT 含量

表 3 金仁陈子方对 IBS 大鼠血清 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Jinren Chenzi formula on NO level in serum of each group

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	10	-	32.40 ± 9.38
模型组	10	-	16.64 ± 3.91**
匹维溴铵组	10	0.02	29.07 ± 6.63 [#]
金仁陈子方高剂量组	10	3.09	27.63 ± 7.53 [#]
金仁陈子方低剂量组	10	1.59	26.91 ± 7.71 [#]

注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.01$ 。

表 4 金仁陈子方对 IBS 大鼠血清 5-HT 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of Jinren Chenzi formula on 5-HT level in serum of each group

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	5-HT/ng·L ⁻¹
正常对照组	10	-	44.33 ± 4.83
模型组	10	-	53.18 ± 5.11**
匹维溴铵组	10	0.02	43.68 ± 9.64 [#]
金仁陈子方高剂量组	10	3.09	44.31 ± 7.72 [#]
金仁陈子方低剂量组	10	1.59	46.49 ± 8.03 [#]

注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$ 。

显著升高 ($P < 0.05$)，说明模型复制方法可行；与模型组比较，金仁陈子方高、低剂量组大鼠结肠组织 5-HT 含量显著降低 ($P < 0.01$)，说明高、低剂量金仁陈子方对 IBS 模型大鼠结肠组织 5-HT 水平有下调作用。

表 5 金仁陈子方对 IBS 大鼠结肠组织 5-HT 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of Jinren chenzi formula on 5-HT level in colon of each group

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	5-HT/ng·L ⁻¹
正常对照组	10	-	52.51 ± 9.72
模型组	10	-	62.70 ± 9.65*
匹维溴铵组	10	0.02	54.50 ± 8.91 [#]
金仁陈子方高剂量组	10	3.09	47.39 ± 7.69 [#]
金仁陈子方低剂量组	10	1.59	49.67 ± 6.38 [#]

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$ 。

3 讨论

IBS 在小儿中发病率高，约占小儿胃肠门诊的 20 % ~ 50 %，且病情缠绵难愈，影响小儿食物消化吸收，导致营养不良、贫血等病，严重影响小儿生长发育。金仁陈子方具有行气健脾的功效，可改善婴幼儿在辅食添加初期容易出现的腹泻、呕吐、便秘、不思饮食等症状。本研究通过母子分离及避水应激复合法复制 IBS 大鼠模型，结果发现大鼠内脏敏

感性显著升高($P < 0.01$), 避水应激排便粒数显著增多($P < 0.01$), 造成与人类 IBS 极为相似的肠道功能紊乱症状, 说明母子分离及避水应激复合诱导可成功复制 IBS 模型; 高、低剂量金仁陈子方均可显著降低大鼠内脏敏感性($P < 0.01$), 显著减少排便次数($P < 0.01$), 说明该方对母子分离及避水复合应激诱导的肠道功能紊乱 IBS 大鼠模型有一定的改善作用。

NO 是抑制性神经(NANC)的传递和调节递质, 当 NANC 能神经受刺激时, 其直接产生的 NO 扩散到平滑肌中, 引起平滑肌松弛^[7]。NO 是介导平滑肌松弛的重要抑制性神经递质, 其对胃肠运动发挥抑制作用, 当 NO 含量减少时, 胃肠运动加快; 反之, 胃肠运动减慢^[8]。另外, NO 还参与调节内脏感觉的敏感性, 其在外周、脊髓和中枢 3 个水平对内脏感觉的传导和感知均有抑制作用^[9], 当胃肠道内 NO 含量减少时, 痛阈值降低, 内脏敏感性升高。本研究结果显示 IBS 模型组大鼠血清 NO 含量较正常对照组显著降低($P < 0.01$), 可能是由于 IBS 大鼠胃肠道内 NO 含量的减少直接导致对平滑肌的抑制性作用减弱, 胃肠运动加快, 内脏感觉敏感性升高。金仁陈子方高、低剂量组大鼠血清 NO 含量较模型组显著升高($P < 0.01$), 说明金仁陈子方可通过调节肠道内 NO 水平, 从而降低 IBS 模型大鼠内脏敏感性。

5-HT 是广泛存在于中枢神经系统、胃肠道及外周血液中的一种单胺类神经递质。在组织中通过直接兴奋平滑肌细胞表面的特异受体结构而使平滑肌收缩, 尤其对消化道平滑肌很敏感^[10]。5-HT 含量的异常升高会导致肠道动力异常和内脏敏感性升高, 同时也可以引起腹泻^[11]。有不少研究者发现, IBS 患者血液中 5-HT 含量较正常对照组升高^[12-14], 结肠回盲部黏膜 5-HT 含量增高^[15-16]。本研究发现, IBS 大鼠血清及结肠组织中 5-HT 含量较正常组均显著升高($P < 0.05$), 与文献中报道一致。金仁陈子方高、低剂量组大鼠血清及结肠组织中 5-HT 含量较模型组均显著降低($P < 0.05$), 说明金仁陈子方可以有效调节 IBS 模型大鼠体内 5-HT 的代谢, 使血清、结肠组织中 5-HT 水平明显降低, 从而达到治疗作用。

本研究将金仁陈子方按 3.09 和 1.59 g·kg⁻¹ 剂量干预治疗 IBS 大鼠, 结果表明, 该方对 IBS 大鼠肠道功能紊乱有显著的改善作用, 其可能通过调节体内

5-HT、NO 水平达到治疗作用。

参考文献:

- [1] 徐俊荣, 罗金燕. 肠易激综合征动物模型研究进展[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(8): 902-904.
- [2] 韩明华, 陈吉, 白晓茹, 等. 肠易激综合征病因与发病机制的新进展[J]. 疾病监测与控制, 2010, 4(10): 581-582.
- [3] Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(2): 307-316.
- [4] 李延青, 郭玉婷. 肠易激综合征动物模型研究[J]. 胃肠病与肝病杂志, 2004, 13(4): 435-439.
- [5] 陈冠林, 周福生, 王汝俊, 等. 康泰胶囊对肠易激综合征大鼠及腹泻小鼠模型的作用观察[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(2): 180-182.
- [6] 谢建群, 郑昱, 吴大正, 等. 疏肝饮对腹泻型肠易激综合征大鼠血管活性肠肽和 P 物质的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2004, 18(3): 36-39.
- [7] 张川, 李定国, 王彝康, 等. 肠易激综合征患者一氧化氮和 5-羟色胺含量的改变[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(7): 640-641.
- [8] De Winter BY, Boeckxstaens GE, De Man JG, et al. Effect of adrenergic and nitrergic blockade on experimental ileus in rats[J]. Br J Pharmacol, 1997, 120(3): 464-468.
- [9] 穆标, 王邦茂, 刘之武, 等. 一氧化氮能神经调节异常在腹泻型肠易激综合征患者中的作用[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(2): 88-91.
- [10] 李国霞, 谢建群, 陆雄, 等. 疏肝健脾法对肠易激综合征患者血清 5-HT 的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2001, 28(2): 99.
- [11] Sanger GJ. 5-HT and Functional Bowel Disorders[J]. Neurogastroenterol Motil, 1996, 8(10): 319-331.
- [12] Bearcroft CP, Perrett D, Farthing MJ. Postprandial plasma 5-hydroxytryptamine in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: a pilot study[J]. Gut, 1998, 42(1): 42-46.
- [13] 张川, 李定国, 王彝康, 等. 肠易激综合征患者 5-羟色胺含量的变化[J]. 上海第二医科大学学报, 2001, 21(1): 66-68.
- [14] 詹丽杏, 许国铭, 李兆申, 等. 肠易激综合征患者活动期和缓解期血浆 5-HT、5-HIAA 的变化[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(2): 152-154.
- [15] 李兆申, 詹丽杏, 邹多武, 等. 肠易激综合征患者分泌 5-羟色胺的肠嗜铬细胞形态及功能的改变[J]. 中华消化杂志, 2004, 24(2): 94-97.
- [16] 宋士一, 王德山, 王艳杰, 等. 眼针对 IBS 模型大鼠结肠组织 5-HT 含量及转化率的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(11): 2222-2224.

(编辑: 邓响潮)