

立 HP 体内感染模型, 验证了胃疡宁丸在体内也具有抑制幽门螺杆菌生长的作用。

参考文献:

- [1] 胡伏莲. 幽门螺杆菌感染的流行病学[J]. 中国医刊, 2007, 42(2): 17-18.
- [2] 张万岱, 胡伏莲, 萧树东, 等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15(5): 265-270.
- [3] 成虹, 胡伏莲, 谢勇, 等. 中国幽门螺杆菌耐药状况以及耐药对治疗的影响—全国多中心临床研究[J]. 胃肠病学, 2007, 12(9):

525-530.

- [4] Takeuchi H, Morimoto N, Suqiura T. Molecular-pathological analysis of Helicobacter pylori-associated disorders and clinical laboratory testing [J]. RinshoByori, 2014, 62(5): 440-449.
- [5] 姜成, 鄢春锦, 刘蔚雯, 等. 15 味中药抑制幽门螺杆菌的体外实验[J]. 福建中医学院学报, 2003, 13(6): 30-32.
- [6] 王建平, 傅旭春, 单海丽, 等. 姜百胃炎片各组方成分体外抗幽门螺杆菌作用的研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30 (12): 2756-2758.

(编辑: 宋威)

枳实总黄酮对肝郁脾虚型大鼠肠易激综合征的治疗作用

梁巧文¹, 陈家仪^{1,2}, 马 丽¹, 潘真真¹, 刘伟基¹, 黄校锋¹, 孙瑜梦¹, 贾 薇¹, 曾元儿¹ (1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广州市药品检验所, 广东 广州 510160)

摘要: **目的** 探讨枳实总黄酮对肝郁脾虚型肠易激综合征(IBS)的治疗作用。**方法** 取 SD 大鼠 32 只, 随机分为正常对照组、模型组、得舒特组(1.5 mg·kg⁻¹)和枳实总黄酮组(3 g·kg⁻¹), 每组 8 只, 采用乙酸灌肠刺激加慢性束缚夹尾的方法, 建立肝郁脾虚型 IBS 大鼠模型, 观察第 0, 7, 14, 21, 28 天不同阶段大鼠的体质量、排便数、敞箱运动、内脏敏感性、糖水消耗量水平变化以及血清一氧化氮(NO)水平和结、盲肠组织中肥大细胞(MC)数目的变化。**结果** 与正常对照组比较, 模型组和给药组大鼠行为学及内脏敏感性, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表现为应激 21 d, 体质量增长缓慢, 排便数逐渐增加, 模型组和治疗组大鼠于第 7, 14, 21, 28 d 排便数均高于相应阶段的正常对照组; 糖水吸收量在不同阶段有波动, 但模型复制 21 d 后, 模型组、得舒特组、枳实总黄酮组大鼠蔗糖偏嗜度均低于正常对照组; 内脏敏感性显著增加。给药治疗 1 周后, 枳实总黄酮组和得舒特组大鼠排便数减少、糖水消耗量增加、活动增加、内脏敏感性降低; 枳实总黄酮能提高模型大鼠血清 NO 的含量, 并且减少模型大鼠结盲肠组织 MC 的数目。**结论** 枳实总黄酮对肝郁脾虚型 IBS 大鼠具有治疗作用。

关键词: 枳实总黄酮; 肝郁脾虚; 肠易激综合征; 一氧化氮; 肥大细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0576-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.014

Pharmacodynamics Study of Total Flavonoids from Fructus Aurantii Immaturus for Treatment of Irritable Bowel Syndrome in Rats with Liver Stasis and Spleen Deficiency syndrome

LIANG Qiaowen¹, CHEN Jiayi^{1,2}, MA Li¹, PAN Zhenzhen¹, LIU Weiji¹, HUANG Xiaofeng¹, SUN Yumeng¹, JIA Wei¹, ZENG Yuan'er¹ (1. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of total flavonoids from Fructus Aurantii Immaturus (FAI-TF) for irritable bowel syndrome (IBS) in rats with liver stasis and spleen deficiency syndrome. **Methods**

收稿日期: 2014-04-14

作者简介: 梁巧文, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药及其制剂质量标准研究。Email: 1185894445@qq.com。通讯作者: 曾元儿, 男, 教授, 研究方向: 中药及其制剂质量标准研究。Email: zengyuaner@163.com。

Thirty-two SD rats were randomized into four groups, normal control group, model group, Dicete group($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and FAI-TF group ($6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 8 rats in each group. IBS model was established by giving an enema of acetic acid and by chronic tail-clamping stress. On experimental day 0, 7, 14, 21, 28, rat body mass, the number of defecation grains, behaviors in the open field, abdominal withdrawal reflex, and sucrose intake were observed. Nitric oxide(NO) content in the serum and the number of mast cells (MC) of rat colon and ileum were simultaneously measured. **Results** Compared with the normal control group, rat behavior and visceral sensitivity in the model group and medication group were significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$), which expressed as slow growth of body mass during the modeling period of 21 days, and significant increase of rat defecation and visceral sensitivity on experimental day 7, 14, 21, 28. Sucrose intake volume fluctuated with 21 days, and then the volume was less in the model group and medication groups than that in the normal control group. After medication for one week, Dicete group and FAI-TF group had less defecation granules, larger sucrose intake volume, more active behaviors and lower visceral sensitivity than the model group. FAI-TF group had an effect on increasing the serum NO content and reducing MC count in the colon and ileum of model rat. **Conclusion** Total flavonoids from Fructus Aurantii Immaturus have certain therapeutic effect for IBS in rats with liver stasis and spleen deficiency syndrome.

Keywords: Total flavonoids from Fructus Aurantii Immaturus; Liver stasis and spleen deficiency; Irritable bowel syndrome; Nitric oxide; Mast cells

肠易激综合征(IBS)是临床上常见的一种胃肠道功能紊乱性疾病,主要表现为腹痛和腹部不适,排便后症状减轻或消失,严重影响患者的生活质量。西医认为本病可能与胃肠动力异常、内脏高敏感、脑-肠轴功能紊乱、免疫和内分泌系统紊乱、肠道微生态失衡等有关^[1]。中医认为本病主要的病机是肝脾不和、肝郁脾虚^[2]。目前,IBS 主要治疗药物包括氯离子通道,5-羟色胺抗抑郁药,阿片类依赖性药物,胃动素受体的配体,鸟苷酸环化酶,肠道免疫调节剂及神经受体配体等。但是,这些药物存在一定的副作用和安全隐患。临床研究^[3]和系统评价^[4]表明,中医药治疗 IBS 具有特色和优势,并且近年来对 IBS 的发病机制研究和治疗取得较为显著的成果。枳实为临床常用的理气药,味苦、辛、寒;归脾、肝经,主治积滞内停、痞满胀痛等症。常与白芍、白术、黄连、柴胡及厚朴等中药配伍治疗肠易激综合症、功能性消化不良、慢传输型便秘、溃疡性结肠炎等胃肠道疾病。枳实的有效成分中最能体现枳实特征的成分是黄酮类,本实验观察枳实总黄酮对肝郁脾虚型 IBS 大鼠的治疗作用,并初步探讨其药效作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠, SPF 级,雌雄各半,体质量(180 ± 220)g,广州中医药大学动物实验中心提供,

动物合格证号: SCXK(粤)2013-0020。动物饲养于昼夜光线变化明显、恒温、恒湿的动物房,自由饮食,适应性饲养 1 周后开始实验。

1.2 仪器 TGL-16R 冷冻高速离心机,珠海黑马有限公司;酶标仪,美国 Thermo labsystem Multiskan GO 全波长酶标仪); EG 1160 石蜡包埋机, RM 2255 病理切片机, 819 病理切片刀,均为德国 LEICA 公司产品; TEC-2500 展片烫片机,意大利 Histo-Line Laboratories。

1.3 药物及试剂 江西新干枳实,经广州中医药大学药用植物教研室张丹雁教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果,批号: 110220。枳实总黄酮提取液的制备:称取适量枳实粉末,放在圆底烧瓶中,采用 80 %乙醇溶液回流提取,溶媒比为 25 : 1,提取时间为 103 min,重复 2 次,合并 2 次提取液,经减压浓缩后,放入干燥至恒重的蒸发皿中,水浴挥干,最后放入 80 ℃ 的恒温烘箱中,干燥至恒重,得到枳实提取物。然后,利用聚酰胺树脂进行纯化,枳实总黄酮上样液浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 值为 6.0 ~ 7.0, 25 mL 上样液,吸附 1.5 h 后,用水洗脱多糖及杂质,用量 50 mL,再用 80 %乙醇洗脱总黄酮,用量 75 mL,收集洗脱液,减压浓缩回收乙醇、干燥即得枳实总黄酮干燥品。以柚皮苷计枳实总黄酮含量为 85.6 %;含柚皮苷 14.5 %、橙皮苷

4.9 %、新橙皮苷 21.7 %、橙皮素 0.04 %、柚皮素 0.09 %; 最终得膏率 50 %。枳实临床给药量 30 g/次^[5-6], 按照人单位体质量生药量转换为大鼠单位体质量生药量, 换算之后(按 2 倍人体剂量)每次给予大鼠枳实总黄酮干燥粉 3 g·kg⁻¹, 相当于枳实生药量 6 g·kg⁻¹, 用蒸馏水配制成 0.15 g·mL⁻¹ 的药液, 按 20 mL·kg⁻¹ 灌胃。匹维溴铵片(得舒特), Abbott Products SAS 公司, 批号: 624757, 按人体用量的 6 倍给药(1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 碾碎后用蒸馏水配制成 0.075 mg·mL⁻¹ 的药液, 按 20 mL·kg⁻¹ 灌胃。乙酸, 水合氯醛, 广州化学试剂厂。NO 试剂盒, 南京建成生物工程研究所, 批号: 20130824。

1.4 分组、模型复制及给药^[7-8] 取 SD 大鼠 32 只, 按体质量随机分为 4 组, 即正常对照组, 模型组, 得舒特组和枳实总黄酮组, 每组 8 只。除正常对照组外, 其余各组大鼠以 10 %水合氯醛麻醉后, 经肛门插入连接注射器的硅胶管, 深度为距离肛门 8 cm 左右, 向大鼠结肠内灌入 4 %的乙酸 1 mL, 然后, 轻轻拿出硅胶管, 迅速用手压迫大鼠肛门并将其尾巴提高 30 s, 用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 液 1 mL 冲洗结肠; 正常对照组大鼠每天用等量的 0.9 %生理盐水灌肠。灌肠后大鼠放回笼中自由活动进食水, 每天 1 次, 共 14 d。于第 7 天进行束缚夹尾应激, 将大鼠用纸带束缚前肩、前上肢、胸部后, 放入特制透明圆柱形筒束缚器内, 持续 1 h, 然后, 在大鼠尾部 1/3 处用裹有海绵的夹子夹住, 注意不能损伤皮肤, 使大鼠发怒, 挑衅笼里其他大鼠, 引起全笼大鼠战斗, 观察大鼠激怒、反应(互相对打、粗叫、相互撕咬等), 持续时间 0.5 h。束缚夹尾操作每天 1 次, 共 14 d。模型复制时间持续 3 周, 在造模的 3 周后开始治疗, 得舒特组及枳实总黄酮组分别予以 1.5 mg·kg⁻¹ 和 3 g·kg⁻¹ 剂量灌胃给药, 每天 1 次, 模型组和正常对照组给予等容量的生理盐水, 连续治疗 7 d。

1.5 观察指标 于模型复制后的第 0, 7, 14, 21, 28 天, 观察各组大鼠毛发、精神状态、活动、进食、饮水等情况, 称定体质量, 观察各组大鼠 3 h 内排便数目及形状, 采用稀便级描述大鼠腹泻的程度, 根据大鼠粪便污染滤纸所生成污迹的直径定级, 污迹直径(cm)为 0, 定为 0 级; 0~0.9, 为 1 级, 1.0~1.9, 为 2 级; 2.0~2.9, 为 3 级; 依次类推, 6.0~6.9, 为 7 级。

1.6 糖水消耗实验^[9] 分别在模型复制的第 0, 7,

14, 21, 28 天进行。实验前, 先把大鼠放在安静的房间内, 培养大鼠习惯喝含糖的自来水, 在第 1 个 24 h, 把两瓶装有等体积 1 %蔗糖溶液的饮水瓶放进同一个笼子里, 每笼大鼠同样操作, 随后的 24 h, 一瓶装纯水, 一瓶装 1 %蔗糖溶液, 随机摆放两个瓶子的位置。禁水禁食 24 h 后, 把分别装有已称质量的纯水和 1 %蔗糖溶液的饮水瓶同时并随机放进同一个笼子里, 每笼大鼠同样操作。中间 12 h 交换瓶子位置 1 次, 24 h 后取出两瓶水再次称质量。记录大鼠的自来水消耗量、糖水消耗量。动物对糖水的偏嗜度就是糖水消耗百分比。

糖水偏嗜度 = 1 %蔗糖溶液消耗量 / (1 %蔗糖溶液消耗量 + 自来水消耗量) × 100 %。

1.7 敞箱实验^[10] 敞箱实验箱 50 cm × 80 cm × 80 cm, 周围的墙壁和底面全是黑色, 用黄线将黑箱底部平均分为 25 块面积相等的小格, 靠近墙壁格子称为外周格, 剩下的为中央格。实验员握住大鼠尾巴 1/3 处轻轻放进黑箱正中格, 用 DV 机记录大鼠 3 min 内的活动情况。水平得分: 大鼠穿越底部黑方格数为水平活动得分(大鼠前后爪均进入同一方格才可记数为水平运动得 1 分); 垂直得分: 直立次数为垂直活动得分(大鼠两前爪攀附墙壁至放下或者腾空, 记垂直运动得 1 分)。行为评定使用盲法, 3 位观察员观察视频评分, 最后取 3 者的平均分。大鼠气味会干扰实验结果, 所以每次考察完一只大鼠后会彻底打扫敞箱, 采用 75 %乙醇液进行消毒除味, 用热风筒吹干后再进行下一个实验。实验中特别轻柔地抓取动物, 尽量避免人为的刺激干扰到实验结果。分别于模型复制第 0, 7, 14, 21, 28 天进行测量。

1.8 大鼠腹部回缩反射(abdominal withdraw reflex, AWR)评分^[11] 结直肠扩张(CRD)应激下的疼痛反应: 于末次给药后 60 min, 将扩张球囊在大鼠麻醉状态下通过肛门插入结直肠 5 cm, 在肛门外 1 cm 处将其用胶布固定在大鼠尾巴根部, 大鼠稳定后将其放在一个特制的透明塑料束缚器内, 只能前后移动, 不能翻身, 待大鼠 30 min 完全适应环境后, 采用三通管将台式血压计、扩张球囊及注射器接通, 分别给予 20, 40, 60, 80 mmHg 共 4 个不同的压力, 进行结直肠扩张刺激, 让大鼠腹部形成不同级别的疼痛感。每次 CRD 刺激 30 s, 中间相隔 5 min 后进行下一轮腹部扩张应激, 每个级别压力扩张应激进行 3 次。以 AWR 评分方法^[12]作为参照标准, 具体如下:

对 CRD 刺激无行为反应, 评为 0 分; 头部运动减少, 结肠扩张时身体静止不动, 为 1 分; 结肠扩张时腹部肌肉收缩, 但腹肌未抬离桌面, 为 2 分; 结肠扩张时腹肌收缩并抬离桌面, 为 3 分; 结肠扩张时骨盆抬起, 身体呈弓形, 为 4 分。

1.9 血清一氧化氮(NO)的测定 大鼠最后 1 次给药 1 h 后, 以 10 %水合氯醛麻醉, 腹主动脉采血 2 mL 置于普通试管不抗凝, 4000 r·min⁻¹ 离心 20 min 分离血清, 低温保存待测 NO。

1.10 回肠与结肠黏膜病理学观察 上述实验结束后, 将各组大鼠麻醉, 每组 8 只, 解剖取出乙状结肠和回盲部各 0.5 cm, 洗净, 用 10 %甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察回肠和结肠黏膜病理组织的情况。

1.11 组织中肥大细胞(MC)计数测定 取各组大鼠局部回盲部, 乙状结肠 0.5 cm, 生理盐水冲洗, 10 %中性甲醛固定, 常规石蜡包埋切片。使用改良甲苯胺蓝染色法^[13-14], 常规脱蜡方法脱蜡, 然后放置于温水里; 切片放入 0.5 %甲苯胺蓝液 4 min, 自来水冲洗至肉眼看不见染料附着; 90 %乙醇分色, 光学显微镜下观察分色程度, 直到看见清晰的紫红色颗粒, 约 20~40 s, 用蒸馏水冲洗 1 min 终止分色; 常规透明、封片。每例切片随机选择 5 个视野, 在 400 倍光学显微镜下观察, 进行 MC 计数, 取均值, 结果以个/高倍视野计算。

1.12 统计学处理方法 采用 SPSS 20.0 软件统计, 进行单因素方差分析, 数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况和体质量变化 模型复制期间, 正常对照组大鼠精神状态良好、背毛有光泽、形体丰满, 其余各组大鼠精神状态倦怠蜷卧, 有点萎靡, 体形消瘦, 毛色光泽度减少, 并且进食和饮水量均比正常对照组少。模型组动物体质量增长缓慢, 7 d 后, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 枳实总黄酮可明显改善由乙酸引起的动物腹泻症状, 增加大鼠体质量, 但与模型组比较, 无统计学意义($P>0.05$); 得舒特组与枳实总黄酮组比较, 无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

2.2 枳实总黄酮对大鼠排便的影响 大鼠给予应激刺激后, 模型组大鼠排便数量出现明显增加, 其中, 应激后 14, 21, 28 d 时, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$); 大鼠给予枳实总黄

表 1 大鼠体质量变化情况($\bar{x}\pm s$, $n=8$, g)

Table 1 Changes of weight among all rat groups						
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	-	182.3±9.3	209.6±9.4	222.4±8.1	236.1±7.7	252.1±13.5
模型组	-	188.8±12.4	182.6±13.7**	203.9±12.4*	212.6±18.5*	228.3±14.8*
得舒特组	1.5	185.8±10.8	172.1±15.1	199.1±12.9	212.8±8.8	227.8±11.6
枳实总黄酮组	3000	182.0±8.8	166.1±19.8	190.4±18.5	210.1±16.33	234.6±15.0

注: 与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

酮和得舒特治疗后, 排便数均减少, 与模型组比较, 28 d 时得舒特组差异有统计学意义($P<0.05$); 大鼠在乙酸灌肠应激期间出现 1~4 级稀便, 灌肠刺激结束后 7 d, 大鼠粪便形态恢复正常, 见表 2。

表 2 枳实总黄酮对大鼠排便的影响, 排便量/粒(污迹直径/cm)($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 2 Statistics of rat defecation status among all groups						
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	-	3.0±2.3(0)	0.7±1.1(0)	0.4±0.7(0)	0.1±0.4(0)	1.1±2.1(0)
模型组	-	3.7±2.6(0)	2.1±1.7(2.1)	3.5±2.5*(0.5)	3.8±1.9**(0)	4.1±2.7*(0)
得舒特组	1.5	5.7±2.4(0)	2.6±1.5(3.1)	3.4±2.9(0.8)	2.5±2.3(0)	1.4±1.9*(0)
枳实总黄酮组	3000	5.6±3.2(0)	2.4±1.5(2.3)	3.7±2.5(0.7)	1.8±1.8(0)	2.4±2.2(0)

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

2.3 枳实总黄酮对大鼠蔗糖水偏嗜度的作用 与正常对照组比较, 模型组大鼠 28 d 时, 蔗糖水偏嗜度明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与模型组比较, 枳实总黄酮和得舒特组大鼠各时点蔗糖水偏嗜度均无统计学意义($P>0.05$), 见表 3。

表 3 大鼠蔗糖水偏嗜度的考察($\bar{x}\pm s$, $n=8$, %)

Table 3 Comparison of sucrose intake among all rat groups						
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	-	83.2±16.5	53.6±17.2	91.2±7.3	96.8±1.9	79.8±10.4
模型组	-	75.2±20.0	57.2±23.9	62.2±27.2	92.2±4.4	45.8±21.5*
得舒特组	1.5	83.9±23.8	53.1±17.0	85.1±12.2	84.9±11.1	52.8±31.1
枳实总黄酮组	3000	88.8±11.6	56.6±17.9	89.7±6.5	81.1±14.2	64.2±14.4

注: 与正常对照组比较, * $P<0.05$ 。

2.4 敞箱实验结果 21 d 时, 与正常对照组比较, 模型组大鼠的垂直运动和水平运动得分均显著降低, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。治疗 7 d 后, 枳实总黄酮组大鼠水平运动得分有提高; 然而, 得舒特组大鼠水平运动得分降低, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 但以上两组与模型组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 治疗 7 d 和 28 d 时, 枳实总黄酮组水平运动得分与得舒特组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 4 和表 5。

表 4 敞箱水平运动得分情况($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 4 Comparison of horizontal scores in open-field test among all groups

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	-	18.1±9.3	37.4±20.8	28.5±7.7	38.5±14.6	28.6±20.4
模型组	-	18.4±16.0	20.0±18.0	17.3±6.7*	11.9±11.5**	13.0±8.4*
得舒特组	1.5	15.3±15.7	11.1±9.0*	14.5±10.3*	14.2±10.9*	11.2±7.9*
枳实总黄酮组	3000	11.8±10.8	25.3±16.4	19.5±9.7	13.5±12.1*	22.1±18.4*

注：与正常对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与得舒特组比较，* $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠 AWR 评分比较 乙酸灌肠、慢性束缚及夹尾刺激后大鼠在直肠不同扩张容量下，模型组大鼠 AWR 评分均较正常对照组显著增加，差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)，提示模型组大鼠内脏敏感性增加，痛觉过敏，符合 IBS 临床特点。在此基础上，给予枳实总黄酮和得舒特药物治疗后，枳

表 5 敞箱垂直运动得分情况($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 5 Comparison of vertical scores in open-field test among all groups

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	-	3.6±2.4	4.7±2.8	7.7±2.9	6.0±4.4	4.8±3.8
模型组	-	5.1±1.6	3.8±3.1	6.4±2.2	2.3±1.8*	2.1±1.7
得舒特组	1.5	3.1±3.2	2.5±1.6	4.3±5.3	2.5±1.4*	1.8±1.6*
枳实总黄酮组	3000	2.6±1.3	5.3±3.8	6.8±2.7	3.3±3.8	3.5±3.3

注：与正常对照组比较，* $P<0.05$ 。

实总黄酮及得舒特对 IBS 大鼠有较明显疗效，能降低模型大鼠不同扩张的 AWR 评分，其中，在 40 mmHg 压力下扩张刺激，枳实总黄酮效果最显著，与模型组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)，治疗后很好地减少了模型大鼠的内脏敏感性。在 4 个不同的压力下，枳实总黄酮组与得舒特组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)，见表 6。

表 6 枳实总黄酮对大鼠内脏敏感性的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 6 Effect of total flavonoids from Fructus Aurantii Immaturus on visceral sensitivity of rats

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	20 mmHg		40 mmHg		60 mmHg		80 mmHg	
		造模后	治疗后	造模后	治疗后	造模后	治疗后	造模后	治疗后
正常对照组	-	0.04±0.1	0.08±0.2	0.2±0.3	0.3±0.4	0.8±0.5	0.9±0.8	1.3±0.9	1.1±0.8
模型组	-	0.5±0.4*	0.4±0.5	1.4±0.7*	1.1±0.9*	2.5±1.1**	1.8±0.9*	2.5±1.1	1.6±0.7
得舒特组	1.5	0.4±0.6*	0.3±0.3	0.7±0.8	0.8±0.6	1.5±0.7	1.3±0.7	2.1±1.3	1.5±0.8
枳实总黄酮组	3000	0.6±0.6*	0.4±0.5	1.3±0.5**	0.5±0.5*	2.9±0.7**	1.3±0.7	3.5±0.5**	1.5±1.1

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

2.6 血清 NO 的含量测定 与正常对照组比较，模型组血清 NO 含量显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)；枳实总黄酮组能升高大鼠血清中 NO 的含量，与模型组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；枳实总黄酮组与得舒特组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)，说明枳实总黄酮升高大鼠血清中 NO 含量更为显著，见表 7。

表 7 枳实总黄酮对大鼠血清中 NO 的调节作用($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 7 Comparison of NO concentrations in serum

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹
正常对照组	-	39.1±9.9
模型组	-	23.8±7.5*
得舒特组	1.5	34.6±14.6
枳实总黄酮组	3000	59.3±16.6*

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

2.7 大鼠回肠与结肠病理组织学情况 模型组乙状结肠和回盲肠黏膜除了个别动物炎细胞浸润稍微明显、间质轻微充血外，其余无特殊病理改变。各组结肠

黏膜结构基本完好，未见明显的充血水肿，提示本方法复制大鼠 IBS 模型对回肠与结肠黏膜造成的损伤可忽略，见图 1。

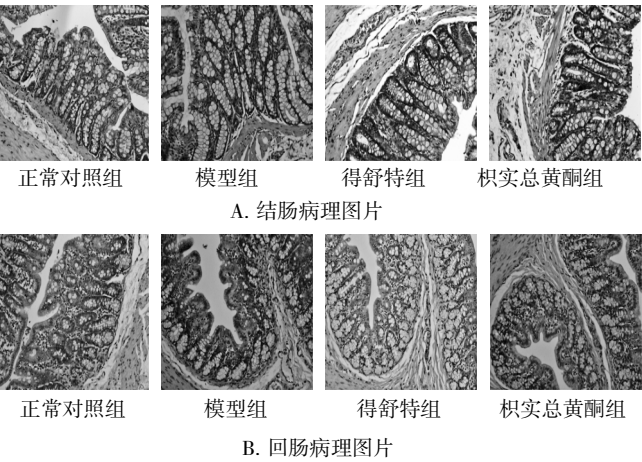


图 1 光学显微镜下观察大鼠回肠与结肠黏膜病理组织(HE, 40×)
Figure 1 Ileum and colon mucosa pathology observed in rats under optical microscope

2.8 光镜下观察大鼠 MC 计数情况 光镜下观察 MC 胞核被甲苯胺蓝染成蓝色,胞质呈紫红色,散在黏膜固有层和黏膜下层,且多见于血管管径周围。模型组 MC 边界模糊,呈桑椹状,部分 MC 呈脱颗粒状态,在细胞周围的细胞间质中可见 MC 颗粒。模型组乙状结肠 MC 与正常对照组比较,明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$),回肠 MC 差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗后,枳实总黄酮组结肠 MC 明显减少,与模型组和得舒特组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),显示枳实总黄酮能降低 IBS 大鼠结肠 MC 的数目,而对回盲部 MC 的影响较少,见表 8。

表 8 大鼠结肠和回盲肠组织中 MC 数目情况($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 8 Comparison of MC in rat colon and ileum among all groups

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	结肠 MC	回肠 MC
正常对照组	—	0.9 ± 0.8	0.6 ± 1.2
模型组	—	4.8 ± 0.5 [*]	0.8 ± 1.0
得舒特组	1.5	5.2 ± 0.5 [*]	0.6 ± 1.2
枳实总黄酮组	3000	1.4 ± 0.5 [▲]	1.3 ± 1.3

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[▲] $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究采用乙酸灌肠刺激加束缚夹尾的方法建立大鼠肝郁脾虚型 IBS 动物模型。模型复制结束后 IBS 大鼠与正常对照组比较体质量增长缓慢,排便数显著增加,糖水吸收量明显减少,内脏敏感性显著增加,提示肝郁脾虚型腹泻、腹痛、抑郁等中医证候模型复制成功。研究表明,枳实既能兴奋胃肠,使胃肠平滑肌收缩节律增强,蠕动加快,又能降低肠平滑肌张力而起到解痉作用^[15],对胃肠道疾病有较好的治疗效果。

本研究观察不同阶段大鼠的体质量、排便数、敞箱运动、内脏敏感性、糖水消耗量、血清中 NO 水平和结、盲肠组织中 MC 数目变化,初步探讨枳实总黄酮的药效作用机制。糖水消耗量实验和敞箱运动实验是典型的行为学实验,能客观评价动物的情绪水平^[9-10]。IBS 模型组给予枳实总黄酮治疗后,排便数减少,内脏敏感性降低,可能与枳实总黄酮松弛肠平滑肌,使肠道痉挛得到缓解,肠道蠕动受到抑制,而发挥止泻、止痛的作用有关。实验中,IBS 大鼠灌服枳实总黄酮后,糖水消耗量及水平和垂直运动均增加,分析可能是与其抑郁症状得到改善有关。NO 为非肾上腺素能非胆碱能抑制性神经递质,主要引

起胃肠平滑肌的松弛作用。MC 在胃肠道有广泛分布,并在免疫-神经-内分泌网络中起到架桥的作用,本实验结果显示,模型组 NO 水平下降,MC 数目增多;枳实总黄酮可上调 NO 水平及减少肥大细胞数目。由此推测,枳实总黄酮止泻、止痛作用与其调节 NO 水平,从而调节胃肠道运动有关;也有可能

与减少 MC 数目,进而减少内脏敏感性相关。

参考文献:

[1] 贾方圆,李学良. 肠易激综合征发病机制的研究进展[J]. 胃肠学, 2011, 16(11): 686-688.

[2] 窦志芳,张俊龙,阎川慧,等. 肠易激综合征与肝脾相关性探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(12): 91-92.

[3] 杨静,张声生. 疏肝健脾化湿法治疗腹泻型肠易激综合征临床观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2009, 17(1): 29-31.

[4] 苏冬梅,张声生,刘建平. 中医药治疗腹泻型肠易激综合征的系统评价研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(4): 468-471.

[5] 闫韶花,陈欣燕,焦拥政,等. 大承气汤治疗肠梗阻临床用量研究[J]. 中医杂志, 2013, 54(22): 1953-1955.

[6] 黄兆胜. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009: 240-241.

[7] Sun XN, Lan C. Study on the expression of Runx3 and TGF-β1 protein in the colonic tissue from rats with irritable bowel syndrome[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2011, 4: 88-91.

[8] 唐洪梅,廖小红,房财富,等. 肝郁脾虚型大鼠肠易激综合征模型的建立及评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 138-140.

[9] Harro J, Haidkind R, Harro M, et al. Chronic mild unpredictable stress after noradrenergic denervation: attenuation of behavioural and biochemical effects of DSP-4 treatment[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 1999, 10(1): 5-16.

[10] 赵志宇,王卫星,郭洪祝,等. 甘草苷对抑郁模型大鼠体重及行为学的影响[J]. 中国心理卫生杂志, 2006, 20(12): 787-790.

[11] Zou N, Lv H, Li J, et al. Changes in brain G proteins and colonic sympathetic neural signaling in chronic-acute combined stress rat model of irritable bowel syndrome (IBS)[J]. Translational Research, 2008, 8: 283-289.

[12] Ness TJ, Gebhart GF. Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudoreflexes in the rat[J]. Brain Res, 1988, 45: 153-169.

[13] 马薇,彭芝配,滕久祥,等. 九香止泻片对湿热泄泻型肠易激综合征大鼠肠道组织肥大细胞与五羟色胺表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(4): 36-44.

[14] 龚志锦. 肥大细胞染色方法的选用. 见:病理组织制片和染色技术[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1994: 267-272.

[15] 王丽娜. 四逆散、枳实芍药散、芍药甘草散干预实验性溃疡性结肠炎药效机制初步研究[J]. 中南药学, 2010, 8(8): 565-568.

(编辑:宋威)