

黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜VIP表达的影响

吴美玉, 胡团敏, 郑溪水

■背景资料

肠易激综合征(IBS)是一个多因性、多态性的以肠道功能紊乱、动力异常为主要表现的慢性消化系统疾病。近年来,有研究证实,脑-肠轴障碍及胃肠激素失调在IBS的发病中起重要作用。

吴美玉, 胡团敏, 郑溪水, 中国人民解放军第180医院消化内科 福建省泉州市 362000

吴美玉, 南昌大学医学院在读消化内科硕士, 主要从事胃肠动力障碍性疾病的研究。

泉州市科学基金资助项目, No. 2009Z8

作者贡献分布: 本课题由胡团敏与吴美玉设计; 研究过程由吴美玉、胡团敏及郑溪水操作完成; 病理分析由胡团敏、郑溪水及吴美玉完成; 数据分析和论文写作由胡团敏、郑溪水及吴美玉完成。

通讯作者: 胡团敏, 主任医师, 硕士生导师, 362000, 福建省泉州市, 中国人民解放军第180医院. yihu180@yahoo.com.cn

电话: 0595-28919151

收稿日期: 2010-07-05 修回日期: 2010-08-28

接受日期: 2010-09-07 在线出版日期: 2010-10-08

Huangshu Enema down-regulates VIP expression in the colonic mucosa of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

Mei-Yu Wu, Tuan-Min Hu, Xi-Shui Zheng

Mei-Yu Wu, Tuan-Min Hu, Xi-Shui Zheng, Department of Gastroenterology, the 180th Hospital of Chinese PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Supported by: the Science Foundation of Quanzhou, No. 2009Z8

Correspondence to: Tuan-Min Hu, Department of Gastroenterology, the 180th Hospital of Chinese PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. yihu180@yahoo.com.cn

Received: 2010-07-05 Revised: 2010-08-28

Accepted: 2010-09-07 Published online: 2010-10-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of Chinese medicine Huangshu Enema (HSE) on the expression of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the colonic mucosa of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS) and to explore possible mechanisms involved.

METHODS: Forty-eight female Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group, model group, HSE treatment group and dicetel treatment group ($n = 12$ for each group). D-IBS was induced in rats by intragastric administration of senna decoction and restraint stress. The expression of VIP in the colonic mucosa of rats was determined by immunohistochemistry.

RESULTS: The number of VIP-positive cells and VIP staining intensity in the colonic mucosa of rats were significantly higher in the model group than in the normal control group (21.06 ± 2.69 vs 6.25 ± 2.08 , $t = 17.4216$, $P < 0.01$; 2.43 ± 0.63 vs 0.63 ± 0.62 , $t = 6.5223$, $P < 0.01$), in the model group than in the two treatment groups ($t = 11.6697$ and 5.5119 ; $t = 6.0910$ and 2.1575 , respectively; both $P < 0.01$), and in the dicetel treatment group than in the HSE treatment group (10.62 ± 2.36 vs 15.31 ± 2.65 , $t = 5.2876$, $P < 0.01$; 1.25 ± 0.58 vs 1.93 ± 0.68 , $t = 2.9272$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: HSE can reduce the number of VIP-positive cells and VIP staining intensity in the colonic mucosa of D-IBS rats and thereby exerts therapeutic effects against D-IBS.

Key Words: Huangshu Enema; Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Vasoactive intestinal polypeptide

Wu MY, Hu TM, Zheng XS. Huangshu Enema down-regulates VIP expression in the colonic mucosa of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(28): 2966-2970

摘要

目的: 探讨中药自组方剂黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合征(D-IBS)大鼠结肠黏膜血管活性肠肽(VIP)表达的影响及其治疗D-IBS的可能机制。

方法: 将48只成年♀SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、黄术灌肠液治疗组、得舒特治疗组, 每组12只, 后3组采用灌服番泻叶加束缚应激法建立D-IBS模型。随机选取每组中的8只大鼠, 运用免疫组织化学染色法测定各组大鼠结肠黏膜VIP的表达。

结果: 模型组大鼠结肠黏膜VIP免疫组织化学染色的阳性细胞数量和染色强度均明显高于正常对照组(21.06 ± 2.69 vs 6.25 ± 2.08 , $t = 17.4216$, $P < 0.01$; 2.43 ± 0.63 vs 0.63 ± 0.62 , $t = 6.5223$, $P < 0.01$); 经治疗后大鼠结肠黏膜VIP

■同行评议者

魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院中西医结合科

免疫组织化学染色的阳性细胞数和染色强度均明显低于模型组($t = 11.6697, t = 5.5119; t = 6.0910, t = 2.1575$; 均 $P < 0.01$), 且黄术灌肠液治疗组较得舒特治疗组降低更为明显(10.62 ± 2.36 vs $15.31 \pm 2.65, t = 5.2876, P < 0.01$; 1.25 ± 0.58 vs $1.93 \pm 0.68, t = 2.9272, P < 0.01$).

结论: 黄术灌肠液能够降低D-IBS大鼠结肠黏膜VIP免疫组织化学染色的阳性细胞数量和染色强度, 通过调整脑-肠轴功能异常, 改善D-IBS的症状, 达到治疗效果.

关键词: 黄术灌肠液; 腹泻型肠易激综合征; 血管活性肠肽

吴美玉, 胡团敏, 郑溪水. 黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜VIP表达的影响. 世界华人消化杂志. 2010; 18(28): 2966-2970

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2966.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一个多因性、多态性的以肠道功能紊乱、动力异常为主要表现的慢性消化系统疾病. 近年来, 有研究证实, 脑-肠轴障碍^[1]及胃肠激素失调^[2]在IBS的发病中起重要作用. 本实验运用免疫组织化学染色法研究腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)大鼠结肠黏膜血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)水平的变化, 探讨黄术灌肠液对D-IBS大鼠结肠黏膜VIP表达的影响及其治疗D-IBS的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 成年♀SD大鼠(体质量180-220 g)48只, 由江西中医学院动物中心提供(合格证号: JZDW2009-0361); 黄术灌肠液: 大黄、黄芪、黄芩、黄连、白术各15 g, 加水煎制成500 mL; 得舒特, 法国苏威制药(批号: H20040759); 兔抗人VIP多克隆抗体(批号: 01C01)购于博士德生物工程有限公司; DAB显色试剂盒(批号: 614846A)和兔SP检测试剂盒(批号: 572054A)由中杉金桥生物技术有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 分组和造模: 适应性饲养1 wk后, 随机将大鼠分为正常对照组、模型组、黄术灌肠液治疗组、得舒特治疗组, 每组12只. 造模方法参照相关文献^[3]报道, 实验前10 h禁食, 自由饮水. 于每日上午08:30, 给所有造模大鼠灌服浓度为0.3

g/mL番泻叶煎剂4 mL, 灌服完1 h后, 用漆包线束缚大鼠的四肢(持续2 h), 使之行动不便, 烦躁不安, 造成一定应激刺激, 之后释放归笼, 充分补液, 自由进食, 连续14 d.

1.2.2 给药: 造模成功后, 于每日上午08:30, 黄术灌肠液治疗组给予黄术灌肠液4 mL保留灌肠; 得舒特治疗组给予浓度为0.3%得舒特混悬液4 mL灌胃, 模型组及正常对照组以生理盐水4 mL灌胃, 连续14 d. 实验过程中, 死亡大鼠共6只, 其中模型组和正常对照组各2只, 黄术灌肠液治疗组和得舒特治疗组各1只, 死亡原因系环境及饲养因素, 而非实验因素, 存活大鼠均有观察意义.

1.2.3 模型及疗效观察: 分别观察造模与给药治疗期间各组大鼠一般状况及排便情况的变化.

1.2.4 VIP表达的检测: 给药结束后, 每组随机选取8只大鼠, 取距肛门4-5 cm处的结肠组织0.5 cm, 用4%甲醛溶液固定24 h后, 按试剂盒说明书操作步骤行免疫组织化学染色.

1.2.5 染色结果分析: 光镜下阳性细胞计数: 在200倍光镜下连续观察肠腺腔100个细胞, 并计数其中VIP免疫组织化学染色阳性细胞数, 每张切片随机计数5个视野, 取平均值; 染色强度分析: 在400倍光镜下记录其中VIP免疫组织化学染色阳性纤维染色强度, 取平均值, 未染色0分, 淡棕黄色1分, 棕黄色2分, 深棕黄色3分.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件分析, 实验数据用mean±SD表示, 组间变量比较用 t 检验、两因素方差分析, 设 $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 模型观察 造模后, 大鼠精神状态略显萎靡且情绪焦躁易激怒, 倦怠蜷卧, 毛色光泽度降低, 体型逐渐消瘦; 大便稀糊且夹有黏液, 但并非持续腹泻状态. 低倍光镜下见大鼠结肠黏膜结构完整, 偶可见上皮细胞排列不整, 黏膜下轻度水肿, 并可见少许炎性细胞浸润, 主要为肥大细胞及淋巴细胞. 但未见明显急慢性炎症、糜烂、溃疡形成及器质性改变.

2.2 疗效观察 经黄术灌肠液及得舒特治疗后, 大鼠精神状态逐渐恢复, 毛色日渐光滑, 体型趋于正常, 大便渐成形且黏液明显减少. 低倍光镜下见结肠黏膜炎性细胞明显减少, 未见上皮细胞排列不整.

2.3 VIP免疫组织化学染色结果 模型组结肠黏膜VIP免疫组织化学阳性细胞数量和VIP免疫组织化学染色强度明显高于正常组($t = 17.4216, t =$

■研究前沿

VIP作为一种重要的脑肠肽, 是目前研究的热点之一, 其与胃肠道疾病关系密切. 自组中药方剂黄术灌肠液能显著降低D-IBS大鼠结肠黏膜VIP的表达水平, 调整脑-肠轴功能, 达到治疗D-IBS的效果. 黄术灌肠液是否还有影响其他能引起D-IBS发病因素的作用, 有待进一步细深入致的研究.

■相关报道

康美清研究了调肝理脾方治疗腹泻型肠易激综合征及对患者血浆血管活性肠肽、神经肽水平的影响. 结果表明, 治疗前IBS患者血浆VIP高于正常对照组, 经调肝理脾方治疗后VIP趋于正常, 两者比较有差异($P < 0.05$). 调肝理脾方对D-IBS有较好的近期治疗效果.

■创新盘点

自拟中药方剂黄术灌肠液具有调节肠管舒缩功能、改善局部的血液循环及调节肠道紊乱功能等作用。本研究用黄术灌肠液对D-IBS模型大鼠进行灌肠治疗,取得了较好的治疗效果。且中药以其整体治疗的优势,可能更适合于IBS的治疗。

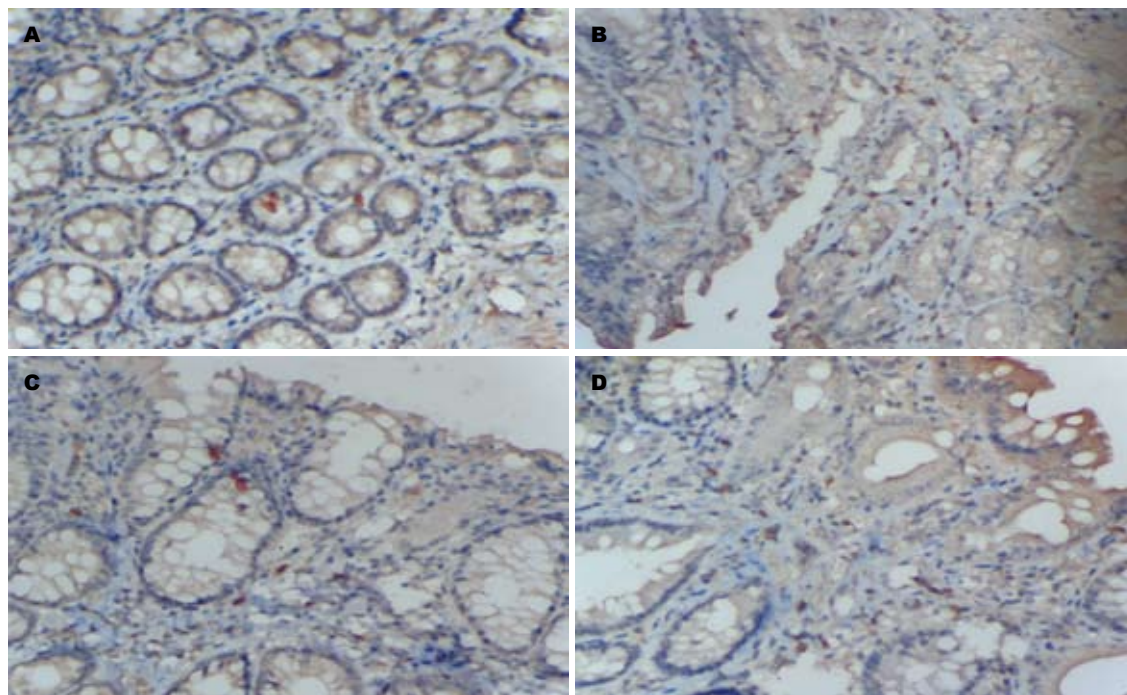


图1 免疫组织化学染色示各组大鼠结肠黏膜VIP阳性细胞($\times 200$)。A: 正常对照组; B: 模型组; C: 黄术灌肠液治疗组; D: 得舒特治疗组。

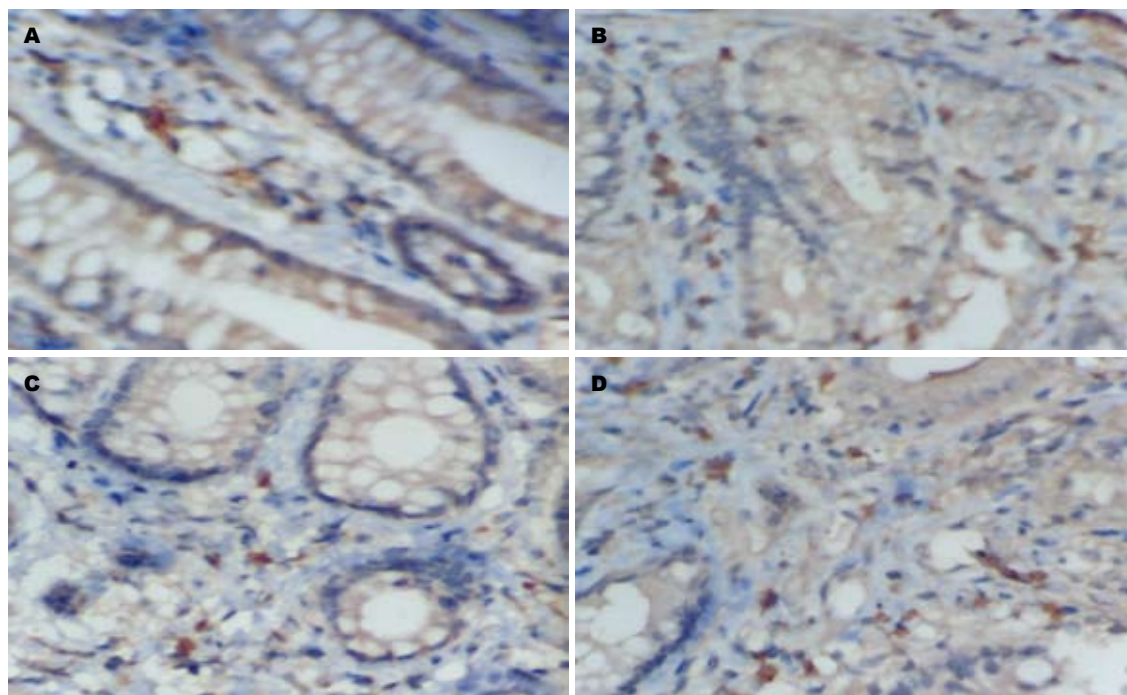


图2 免疫组织化学染色示各组大鼠结肠黏膜VIP阳性纤维($\times 400$)。A: 正常对照组; B: 模型组; C: 黄术灌肠液治疗组; D: 得舒特治疗组。

6.5223; 均 $P<0.01$); 经治疗后大鼠结肠黏膜VIP免疫组织化学染色阳性细胞数和VIP免疫组织化学染色强度明显低于模型组($t = 11.6697$, $t = 5.5119$; $t = 6.0910$, $t = 2.1575$; 均 $P<0.01$); 且黄术灌肠液治疗组较得舒特治疗组降低更为明显($t = 5.2876$, $t = 2.9272$; 均 $P<0.01$, 图1, 2, 表1)。

3 讨论

目前认为, IBS是多种发病机制共同作用的结果, 包括胃肠动力障碍、内脏敏感性异常、低度炎症、脑-肠轴功能异常等。脑-肠轴功能异常与IBS的研究日益受到重视。近期研究发现, 肠管运动功能的神经调节很大部分是依赖肠神经系

表 1 各组大鼠结肠黏膜VIP的阳性细胞数和染色强度 (mean ± SD)

分组	阳性细胞数(肠腺腔 每100个细胞)	染色强度(分)
正常对照组	6.25 ± 2.08	0.63 ± 0.62
D-IBS模型组	21.06 ± 2.69 ^a	2.43 ± 0.63 ^b
黄术灌肠液治疗组	10.62 ± 2.36 ^{bd}	1.25 ± 0.58 ^{bd}
得舒特治疗组	15.31 ± 2.65 ^b	1.93 ± 0.68 ^b

^a*P* < 0.01 vs 正常对照组; ^b*P* < 0.01 vs 得舒特治疗组。

统(enteric nervous system, ENS). ENS可能通过各种神经递质(脑肠肽)的释放和传递把内脏和中枢神经系统(central nervous system, CNS)联系起来^[4]. CNS对肠道传入信号的处理及对ENS的调节失常,可引起肠道运动功能紊乱,从而引发IBS的诸多症状. 中枢与胃肠道由脑-肠轴密切相联,表现在内脏刺激的信息通过上行神经传递至中枢进行加工整理,进而再通过传出神经系统影响胃肠道功能^[5]. 脑-肠轴异常导致IBS患者肠道对各种应激的反应增强和内脏敏感性增加,可能是IBS病理生理机制的共同通路^[6]. 作为脑-肠轴中的重要递质, VIP是目前研究最多的脑肠肽之一.

VIP与临床多种疾病相关,尤其与胃肠道疾病关系密切,可同时存在于CNS、ENS及胃肠道黏膜组织中,在消化系统中,结肠的含量最高. VIP在生物体内既是胃肠激素,又是神经肽,被认为是一种脑肠肽,在调节内脏感觉、分泌和运动中起重要作用. VIP既可能刺激胃肠和括约肌的松弛,也可能刺激胰液和肠液的分泌和吸收,保护肠黏膜,调节胃肠吸收^[7]. VIP在胃肠运动调节中主要起抑制效应^[8],通过干扰胃肠道的动力与分泌吸收功能而对IBS产生了一定的影响. VIP与IBS患者的腹泻和腹痛等症状关系密切^[9],且能增加疼痛的敏感性^[10]. VIP含量增加,能使乙状结肠平滑肌松弛,使粪便在乙状结肠中停留时间短,水分不能完全吸收,刺激肠液、水、电解质的分泌,引起腹泻. 有报道, VIP在刺激引起的疾病或者疾病复发过程中起着重要的作用,刺激可改变实验动物的胃肠动力,导致模型大鼠结肠局部VIP含量增加.

目前治疗IBS有效的药物非常有限^[11],尤其是在影响肠道黏膜VIP水平及调整脑-肠轴功能异常方面,目前尚少见相关报道. 中药以其整体治疗的优势,可能成为IBS治疗的一种新手段^[12],可能更适合于IBS的治疗. 自组中药

方剂黄术灌肠液由大黄、黄芩、黄芩、黄连、白术组成,现代医学研究表明,大黄有调节肠管舒缩运动、提高免疫力等作用;黄芩有镇静作用;黄芩能清除体内氧自由基、改善微循环功能;黄连有抗腹泻作用;白术对胃肠运动及胃肠功能紊乱有调节作用;我们前期的临床研究研究表明,本组方剂配伍合理,具有明显协同作用,具有调节肠管舒缩功能、改善局部的血液循环及调节肠道紊乱功能等作用^[13],且通过灌肠给药,药物可直接作用于直肠黏膜,充分发挥治疗作用,局部用药效果显著;我们前期动物实验研究结果表明, D-IBS大鼠血清IL-1 β 升高及IL-10水平降低,提示了D-IBS大鼠存在低度炎症反应,黄术灌肠液能显著降低D-IBS大鼠血清IL-1 β 及升高IL-10水平,通过纠正抗炎/促炎因子失衡,降低大鼠结肠黏膜低度炎症反应,达到对IBS的治疗效果^[14];本实验研究表明D-IBS大鼠结肠黏膜VIP的表达水平明显升高,与Simrén等^[15]研究结果相一致,且VIP表达水平的高低与大鼠排棕褐色不规则状稀便次数呈正相关,提示脑-肠轴功能异常可能是D-IBS发生发展的另一个重要因素. 经黄术灌肠液灌肠治疗后, D-IBS大鼠结肠黏膜VIP的表达水平显著降低,且效果明显优于得舒特治疗组,由此表明黄术灌肠液可影响D-IBS大鼠结肠黏膜VIP的高表达.

总之, D-IBS大鼠结肠黏膜存在VIP高表达的状态,脑-肠轴功能异常是D-IBS另一重要发病因素,黄术灌肠液能显著降低D-IBS大鼠结肠黏膜VIP的表达水平,调整脑-肠轴功能,改善胃肠道的运动及其分泌功能,达到治疗D-IBS的效果. 黄术灌肠液是否还有影响其他能引起D-IBS发病因素的作用,有待进一步细致深入的研究.

4 参考文献

- Mayer EA, Collins SM. Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2002; 122: 2032-2048
- Spinelli A. Irritable bowel syndrome. *Clin Drug Investig* 2007; 27: 15-33
- 刘清华. 肠易激综合征动物模型复制思路和方法. 国外医学·消化系疾病分册 2002; 22: 154-156
- Wood JD, Grundy D. Little brain--big brain V. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 377-385
- 王伟岸, 胡品津. 肠易激综合征的病因和病理生理. 胃肠病学 2002; 7: 33-35
- Drossman DA, Whitehead WE, Toner BB, Diamant N, Hu YJ, Bangdiwala SI, Jia H. What determines severity among patients with painful functional bowel disorders? *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 974-980
- 赵智强, 项小人, 汪受传, 范乃兵, 陆跃鸣, 朱苗花, 孙心亮. 儿宝颗粒对厌食症大鼠模型血中5-HT, NO及空

■应用要点

VIP在D-IBS模型大鼠结肠黏膜呈高度表达状态,降低VIP在模型大鼠结肠黏膜的表达,可以改善IBS的症状并达到治疗的效果,这可能成为治疗IBS的有效途径,为治疗IBS在调节脑-肠轴功能紊乱方面提供了有用的参考价值.

■同行评价

本文选题能结合临床难题,学术价值和实用价值较好.

- 肠段SP、VIP、SS表达的影响. 中国中西医结合消化杂志 2006; 14: 96-98
- 8 De Man JG, Chatterjee S, De Winter BY, Vrolix G, Van Marck EA, Herman AG, Pelckmans PA. Effect of somatostatin on gastrointestinal contractility in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Int J Parasitol* 2002; 32: 1309-1320
 - 9 Morise K, Furusawa A, Yamamoto H, Saito H. [Role of gut hormones in irritable bowel syndrome] *Nippon Rinsho* 1992; 50: 2697-2702
 - 10 Dickinson T, Fleetwood-Walker SM. VIP and PACAP: very important in pain? *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 324-329
 - 11 Lesbros-Pantoflickova D, Michetti P, Fried M, Beglinger C, Blum AL. Meta-analysis: The treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1253-1269
 - 12 Tan S, Tillisch K, Bolus SR, Olivas TI, Spiegel BM, Naliboff B, Chang L, Mayer EA. Traditional Chinese medicine based subgrouping of irritable bowel syndrome patients. *Am J Chin Med* 2005; 33: 365-379
 - 13 胡团敏, 黄永德, 张丽婷. 结肠易激综合征128例中药灌肠治疗探讨. 中国现代医生 2008; 46: 29-30
 - 14 胡俊, 胡团敏, 何文钦, 黄永德. 黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合征大鼠IL-1 β 、IL-10表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2188-2191
 - 15 Simrén M, Stotzer PO, Sjövall H, Abrahamsson H, Björnsson ES. Abnormal levels of neuropeptide Y and peptide YY in the colon in irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 55-62

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*, *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.