

# 金荞麦片对脾虚湿热证腹泻型肠易激综合征大鼠免疫炎症和内脏高敏感性的影响

牛晓玲, 周英豪, 孙书焰, 庄 璘

牛晓玲, 上海市闵行区中医医院消化内科 上海市 201103  
周英豪, 孙书焰, 上海中医药大学附属龙华医院中医示范病区 上海市 200032  
庄璘, 上海市闵行区中医医院药剂科 上海市 201103  
牛晓玲, 主治医师, 主要从事消化内科临床工作和研究。  
上海市闵行区科委基金资助项目, No. 2011MHZ64  
作者贡献分布: 此课题由牛晓玲与周英豪设计; 动物模型制作、放射免疫、RT-PCR检测分析由孙书焰操作完成; 病理分析由庄璘完成; 论文写作由牛晓玲与周英豪完成。  
通讯作者: 周英豪, 副主任医师, 200032, 上海市闵行区合川路3071号, 上海中医药大学附属龙华医院中医示范病区。  
zhouyinghao@163.com  
电话: 021-64385700  
收稿日期: 2013-07-22 修回日期: 2013-09-17  
接受日期: 2013-10-17 在线出版日期: 2013-11-18

## Influence of Fagopyrum cymosum tablets on immune inflammation and visceral hypersensitivity in a rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

Xiao-Ling Niu, Ying-Hao Zhou, Shu-Yan Sun, Lin Zhuang

Xiao-Ling Niu, Department of Gastroenterology, Minhang District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201103, China  
Ying-Hao Zhou, Shu-Yan Sun, Chinese Medicine Demonstration Ward, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China  
Lin Zhuang, Department of Pharmacy, Minhang District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Minhang District, Shanghai 201103, China  
Supported by: the Science and Technology Foundation of Science and Technology Commission of Minhang District of Shanghai, No. 2011MHZ64  
Correspondence to: Ying-Hao Zhou, Associate Chief Physician, Chinese Medicine Demonstration Ward, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 3071 Hechuan Road, Minhang District, Shanghai 200032, China. zhouyinghao@163.com  
Received: 2013-07-22 Revised: 2013-09-07  
Accepted: 2013-10-17 Published online: 2013-11-18

### Abstract

**AIM:** To determine the influence of Fagopyrum cymosum tablets on immune inflammation and visceral hypersensitivity in a rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS).

**METHODS:** IBS was induced in neonatal rats by feeding a high lactose diet, chronic bandaged-stress and inserting the tail. Rats were randomly divided into six groups: a normal control group (group A), a model group (group B), high-, medium- and low-dose Fagopyrum cymosum groups (group C, D and E), and a Gushen Chang'an group (group F). Groups C, D and E received oral administration of 6, 3 and 1.5 g/(kg·d) of Fagopyrum cymosum tablets, respectively, once every day for four weeks; group F received oral administration of 2 g/(kg·d) of Gushen Chang'an; Groups A and B received oral administration of equal volume of normal saline. The colon motion, abdominal withdrawal reflex (AWR) of colorectal distention and abdominal electrical activity were observed. Radioimmunoassay was used to detect serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 17 (IL-17), IL-10, substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). Fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT), 5-hydroxytryptamine 3 receptor (5-HT<sub>3R</sub>), neurokinin receptor 1 (NK1R) and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNAs in the intestinal tissue.

**RESULTS:** Fagopyrum cymosum could decrease colon motion and visceral hypersensitivity in IBS rats ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). In the Fagopyrum cymosum treatment groups, serum levels of TNF- $\alpha$  ( $2.81 \text{ ng/L} \pm 0.67 \text{ ng/L}$ ,  $2.76 \text{ ng/L} \pm 0.31 \text{ ng/L}$ ,  $2.91 \text{ ng/L} \pm 0.77 \text{ ng/L}$  vs  $3.77 \text{ ng/L} \pm 0.44 \text{ ng/L}$ ), IL-17 ( $2.01 \text{ ng/L} \pm 0.76 \text{ ng/L}$ ,  $2.14 \text{ ng/L} \pm 0.29 \text{ ng/L}$ ,  $1.98 \text{ ng/L} \pm 0.11 \text{ ng/L}$  vs  $2.47 \text{ ng/L} \pm 0.33 \text{ ng/L}$ ) and SP ( $38.22 \text{ pg/mL} \pm 3.15 \text{ pg/mL}$ ,  $37.55 \text{ pg/mL} \pm 2.63 \text{ pg/mL}$ ,  $42.01 \text{ pg/mL} \pm 3.79 \text{ pg/mL}$  vs  $43.19 \text{ pg/mL} \pm 4.28 \text{ pg/mL}$ ) were significantly lower, and those of IL-10 ( $137.25 \text{ ng/L} \pm 6.2 \text{ ng/L}$ ,  $135.90 \text{ ng/L} \pm 4.4 \text{ ng/L}$ ,  $121.70 \text{ ng/L} \pm 5.11 \text{ ng/L}$  vs  $82.09 \text{ ng/L} \pm 5.33 \text{ ng/L}$ ) and CGRP ( $155.09 \text{ ng/L} \pm 4.38 \text{ ng/L}$ ,  $142.02 \text{ ng/L} \pm 2.44 \text{ ng/L}$ ,  $158.25 \text{ ng/L} \pm 4.02 \text{ ng/L}$  vs  $107.31 \text{ ng/L} \pm 3.96 \text{ ng/L}$ ) were significantly higher than those in the model group.

### ■背景资料

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是肠功能紊乱性疾病, 患者多表现与排便或排便习惯改变相关的腹痛或不适, 伴有排便紊乱的特点, IBS 的发病率逐年增高, 已成为全球胃肠道功能性疾病, 本病反复发作, 严重影响患者的生活质量, 医药耗费巨大, 是仅次于上呼吸道感染第二常见病。

### ■同行评议者

马欣, 主任医师, 甘肃省人民医院消化科

## ■ 研究前沿

本研究在临床应用金荞麦治疗IBS取得良好疗效的基础上,拟探讨金荞麦片对实验动物肠功能、免疫炎症、肠黏膜通透性、内脏高敏感性和抗应激能力的影响,观察金荞麦片对脾虚湿热证肠易激综合征腹泄型(IRS-D)大鼠的免疫炎症反应和内脏高敏感性的影响,探讨金荞麦片治疗IBS的作用环节和靶点,为寻找具有我国知识产权治疗IBS的中药新制剂开辟新途径。

(all  $P < 0.05$  or  $0.01$ ). The mRNA expression of 5-HT ( $0.74 \pm 0.43$ ,  $0.97 \pm 0.91$ ,  $0.66 \pm 0.29$  vs  $1.27 \pm 0.45$ ), 5-HT<sub>3</sub>R ( $1.01 \pm 0.35$ ,  $1.14 \pm 0.76$ ,  $1.47 \pm 0.65$  vs  $1.61 \pm 0.03$ ), NK1R ( $1.07 \pm 0.58$ ,  $0.98 \pm 0.67$ ,  $0.88 \pm 0.79$  vs  $1.47 \pm 0.94$ ) and ICAM-1 ( $0.81 \pm 0.55$ ,  $0.96 \pm 0.19$ ,  $0.72 \pm 0.93$  vs  $1.33 \pm 0.26$ ) in the intestinal tissue was down-regulated after treatment with Fagopyrum cymosum tablets ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ), especially in the high-dose group.

**CONCLUSION:** Fagopyrum cymosum tablets can reduce visceral hypersensitivity and inhibit inflammatory immune response in IRS-D rats in a concentration-dependent manner.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

**Key Words:** Fagopyrum cymosum tablets; Irritable bowel syndrome; Immune inflammation; Visceral hypersensitivity

Niu XL, Zhou YH, Sun SY, Zhuang L. Influence of Fagopyrum cymosum tablets on immune inflammation and visceral hypersensitivity in a rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(32): 3543-3549 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3543.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i32.3543>

## 摘要

**目的:** 研究金荞麦片对脾虚湿热证肠易激综合征腹泄型(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IRS-D)大鼠免疫炎症和内脏高敏感性的影响。

**方法:** 选取SPF级新生SD大鼠,采用高乳糖饲料+慢性束缚+夹尾刺激诱导IRS-D大鼠模型。造模成功后,将实验动物随机分为正常对照组(A组)、模型对照组(B组)、金荞麦片高剂量组(C组)、中剂量组(D组)、低剂量组(E组)、谷参肠安组(F组),金荞麦片组分别给予高剂量[6 g/(kg·d)]、中剂量[3 g/(kg·d)]和低剂量[1.5 g/(kg·d)]中药灌胃,谷参肠安组给予谷参肠安2 g/(kg·d),正常组和模型组分别给予等容积生理盐水灌胃,1次/d。灌胃4 wk后,行直肠内球囊扩张实验(colorectal distention, CRD),观察腹肌收缩反射(abdominal withdrawal reflex, AWR),评估大鼠结肠转运和感觉功能,放射免疫法检测血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-17(interleukin 17, IL-17)、IL-10、P物质(substance P, SP)和降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)

含量,荧光定量PCR检测肠组织5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、5-羟色胺<sub>3</sub>受体(5-hydroxytryptamine 3 receptor, 5-HT<sub>3</sub>R)、神经激肽受体-1(neurokinin receptor 1, NK1R)和细胞间黏附分子(intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)mRNA表达水平。

**结果:** 与模型组比较,金荞麦片各剂量组大鼠结肠转运功能及内脏高敏感性明显降低( $P < 0.05$ 或 $0.01$ ),大鼠血清TNF- $\alpha$ ( $2.81$  ng/L  $\pm$   $0.67$  ng/L,  $2.76$  ng/L  $\pm$   $0.31$  ng/L,  $2.91$  ng/L  $\pm$   $0.77$  ng/L vs  $3.77$  ng/L  $\pm$   $0.44$  ng/L)、IL-17( $2.01$  ng/L  $\pm$   $0.76$  ng/L,  $2.14$  ng/L  $\pm$   $0.29$  ng/L,  $1.98$  ng/L  $\pm$   $0.11$  ng/L vs  $2.47$  ng/L  $\pm$   $0.33$  ng/L)及SP( $38.22$  pg/mL  $\pm$   $3.15$  pg/mL,  $37.55$  pg/mL  $\pm$   $2.63$  pg/mL,  $42.01$  pg/mL  $\pm$   $3.79$  pg/mL vs  $43.19$  pg/mL  $\pm$   $4.28$  pg/mL)含量均较模型组降低。IL-10( $137.25$  ng/L  $\pm$   $6.2$  ng/L,  $135.90$  ng/L  $\pm$   $4.4$  ng/L,  $121.70$  ng/L  $\pm$   $5.11$  ng/L vs  $82.09$  ng/L  $\pm$   $5.33$  ng/L)和CGRP( $155.09$  ng/L  $\pm$   $4.38$  ng/L,  $142.02$  ng/L  $\pm$   $2.44$  ng/L,  $158.25$  ng/L  $\pm$   $4.02$  ng/L vs  $107.31$  ng/L  $\pm$   $3.96$  ng/L)明显升高( $P < 0.05$ 或 $0.01$ )。肠组织5-HT( $0.74 \pm 0.43$ ,  $0.97 \pm 0.91$ ,  $0.66 \pm 0.29$  vs  $1.27 \pm 0.45$ )、5-HT<sub>3</sub>R( $1.01 \pm 0.35$ ,  $1.14 \pm 0.76$ ,  $1.47 \pm 0.65$  vs  $1.61 \pm 0.03$ )、NK1R( $1.07 \pm 0.58$ ,  $0.98 \pm 0.67$ ,  $0.88 \pm 0.79$  vs  $1.47 \pm 0.94$ )和ICAM-1( $0.81 \pm 0.55$ ,  $0.96 \pm 0.19$ ,  $0.72 \pm 0.93$  vs  $1.33 \pm 0.26$ ) mRNA表达水平下调( $P < 0.05$ 或 $0.01$ ),尤以金荞麦片高剂量组为优。

**结论:** 金荞麦片可降低IRS-D大鼠内脏高敏感性,有效抑制免疫炎症反应,多靶点、多层次地参与调节胃肠动力。金荞麦片对实验性IRS-D具有量效依赖作用。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 金荞麦片; 肠易激综合征; 免疫炎症; 内脏高敏感性

**核心提示:** 金荞麦片能够通过调节血浆肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )、白介素-17(interleukin 17, IL-17)、IL-10、P物质(substance P)和降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide)含量以及5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、5-羟色胺<sub>3</sub>受体(5-hydroxytryptamine 3 receptor, 5-HT<sub>3</sub>R)、神经激肽受体-1(neurokinin receptor 1)和细胞间黏附分子(intracellular adhesion molecule-1)mRNA表达水平,进而对肠易激综合征腹泄型(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome)大鼠的免疫炎症反应和内脏高敏感性

起到一定的抑制作用, 这可能是金荞麦片治疗IBS的作用环节和靶点之一。

牛晓玲, 周英豪, 孙书焰, 庄璘. 金荞麦片对脾虚湿热证腹泻型肠易激综合征大鼠免疫炎症和内脏高敏感性的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(32): 3543-3549 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3543.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i32.3543>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是复杂的胃肠功能紊乱性疾病, 患者多表现与排便或排便习惯改变相关的腹痛或不适, 伴有排便紊乱的特点. IBS的发病率逐年增高, 已成为全球胃肠功能性疾病, 是仅次于上呼吸道感染的第二大常见病. 肠易激综合征腹泻型(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)占到IBS的1/3, 全球五大洲约12%的人口受到IBS-D的困扰. 虽然已有各种针对IBS的药物和非药物治疗方法, 但仍有大量患者的症状未得到缓解, 严重影响了患者的生活质量, 且社会和经济成本高<sup>[1-3]</sup>. 本研究观察了金荞麦片对脾虚湿热证IBS-D大鼠的免疫炎症反应和内脏高敏感性的影响, 探讨金荞麦片治疗IBS的作用环节和靶点, 为寻找具有我国知识产权治疗IBS的中药新制剂开辟新途径.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 出生2 wk的SPF级SD大鼠112只, 雌雄不限, 体质量6-8 g, 由上海医科大学实验动物中心提供. 金荞麦片(1.5 g生药/片, 南通精华制药有限公司, 批号: 121103), 研成细粉, 溶于生理盐水中灌胃给药; 谷参肠安胶囊(地奥集团成都药业股份有限公司, 批号: 121018), 取胶囊内容物, 溶于生理盐水中灌胃给药; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )放射免疫试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司); 白介素-7(interleukin 17, IL-17)放射免疫试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司); IL-10放射免疫试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司); P物质(substance P, SP)放射免疫试剂盒(南京建成生物工程研究所); 降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)放射免疫试剂盒(南京建成生物工程研究所); GC-911 $\gamma$ 放射免疫计数器(科大创新股份有限公司); 冰乙酸(分析纯, 上海圣亚化工有限公司); RT-PCR两步法试剂盒、TakaRa ExTaq DNA聚合酶, PCR扩增用引物(上海生工生物工

程公司); 8 F导尿管, 导管直径2 mm, 球囊最大容量3 mL, 最大直径2 cm, 用作直肠内球囊扩张导管, 由浙江康康医疗器械有限公司生产.

### 1.2 方法

**1.2.1 模型制备:** 将出生2 wk的SPF级SD大鼠112只随机分为对照组(32只)和模型组(80只), 模型组乳大鼠每5只与哺乳鼠一同饲养, 每日与母鼠分离180 min, 直至出生后第14天, 第3周将与母鼠分离的幼鼠每5只一笼, 以高脂高糖饲料喂养(普通饲料混入12%猪油、8%蜂蜜), 灌服大黄水煎液2.0 mL/(kg·d), 1次/d; 对照组以普通混合饲料喂养, 灌服等量生理盐水, 1次/d, 持续1 wk停; 第4周模型组每天上午9:00以直肠内气囊扩张, 导管经肛门插入约2 cm, 注入气体1.0 mL, 持续2 min, 1次/d, 放气退出导管, 置入温度32  $\pm$  2  $^{\circ}$ C、相对湿度90%-95%的湿热环境中, 1 h/次, 2次/d; 对照组肛门内插入气囊导管, 但不扩张, 2 min后拔出导管, 1次/d; 仍在温度20  $^{\circ}$ C-28  $^{\circ}$ C, 相对湿度50%-70%的正常环境中, 持续1 wk停; 第5周每天上午9:00模型组大鼠夹尾刺激10 min(用尖端包裹纱布的止血钳夹住大鼠尾巴), 然后用30%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉, 用宽纸带束缚其肩部、前肢及胸部, 限制大鼠用前肢搔抓头面部, 但不限制其活动, 自大鼠清醒后开始计时, 束缚时间为1 h, 30 min后给直结肠内醋酸刺激, 将经甘油润滑的连续硬膜外导管(直径约1 mm)经肛门插入约2 cm, 注入0.5%醋酸0.5 mL, 30 s后注入0.9%生理盐水1.0 mL冲洗; 对照组大鼠每天直结肠内注入0.9%生理盐水0.5 mL, 连续2 wk. 造模同时观察大鼠的一般情况(饮食、二便、体质量、形态、皮毛和精神状态等)并做记录, 第7周停止造模. 第6周末检测大鼠的结肠转运和感觉功能.

**1.2.2 动物分组及给药:** 将造模成功大鼠随机分为正常对照组(A组)、模型对照组(B组)、金荞麦片高、中、低剂量组(C、D、E组)、谷参肠安组(F组), 每组12只, 共6组. 谷参肠安组给药浓度为2 g/kg, 金荞麦片低、中、高剂量组给药浓度分别为1.5、3.0、6.0 g生药/kg, 均以10 mL/kg体质量灌胃给药. 正常对照组和模型对照组给予等容积生理盐水. 均1次/d, 每日上午8:00开始, 共4 wk.

**1.2.3 结肠转运功能测定:** 大鼠实验前24 h禁食, 予30%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉, 取直径为3 mm的玻璃小球沿肛门放入距肛门3 cm的直肠内. 大鼠苏醒后迅速移至笼内喂食饮水, 笼内垫清洁滤纸. 观察束缚2 h内大鼠排便的粪点

### ■ 相关报道

有研究报道, 肠吉泰能通过降低肠道组织神经生长因子含量来降低内脏敏感性.



## ■创新盘点

金荞麦片治疗IBS的主要药效学实验。拟阐明其对IBS是否具有调节免疫炎症反应、降低内脏高敏感性和维持肠黏膜结构完整性的作用。

表 1 高乳糖饲料+慢性束缚+夹尾刺激对大鼠结肠转运功能的影响 (mean ± SD)

	第14天			第28天		
	<i>n</i>	大鼠粪点数	玻璃小球排出时间(min)	<i>n</i>	大鼠粪点数	玻璃小球排出时(min)
正常组	32	3.24 ± 1.75	23.09 ± 1.52	32	4.01 ± 0.25	23.18 ± 1.22
模型组	80	4.97 ± 2.08 <sup>b</sup>	15.30 ± 3.75 <sup>b</sup>	80	4.89 ± 0.37 <sup>b</sup>	17.30 ± 1.98 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 正常组。

数和直肠内玻璃小球排出时间并进行比较。实验第14天、第28天、给药结束后第2天分别检测以验证模型有效性及观察金荞麦片的干预作用。

1.2.4 内脏敏感性评估: 于造模结束及给药结束后第2天分别评估球囊结直肠扩张引起腹部收缩反射(abdominal withdrawal reffer, AWR)的最小容量阈值以反映其内脏敏感性。大鼠水合氯醛麻醉下, 将石蜡油润滑后的导尿管经肛门插入, 球囊末端距离肛门1 cm, 用胶布把导管和大鼠尾巴根部缠在一起, 固定气囊。大鼠苏醒后, 放在特制的透明塑料笼(18 cm×5 cm×7cm)中, 大鼠在笼中只能前后运动, 不能转身。30 min适应期后经导尿管外口向球囊内注入26 °C-28 °C生理盐水扩张肠道, 记录引起大鼠腹部收缩反射的最小注水量, 即最小容量阈值。重复扩张3次, 每次扩张间隔30 min, 数据取均值。

1.2.5 TNF-α、IL-17、IL-10、SP及CGRP含量测定: 给药结束后第2天, 各组大鼠10%水合氯醛腹腔麻醉后取静脉血5 mL, 分离血清, 置-20 °C保存待检。TNF-α、IL-17、IL-10、SP及CGRP均采用放射免疫法检测。操作均按试剂盒说明进行。

1.2.6 小肠运动功能评估: 脱颈椎处死后, 取小肠检测小肠运动功能。各组随机取5只大鼠, 以50%墨汁灌胃(2 mL/只), 10 min后处死大鼠, 剖取大鼠小肠, 分别测量小肠墨汁推进百分率。推进率(%) = 幽门至墨汁前沿的距离/幽门至回盲部的距离×100%。

1.2.7 肠组织5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、5-羟色胺3受体(5-hydroxytryptamine 3 receptor, 5-HT3R)、神经激肽受体-1(neurokinin receptor 1, NK1R)和细胞间黏附分子(intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)mRNA表达水平测定: 大鼠处死后, 取出大肠组织, 采用液氮快速冷冻并置-70 °C冰箱中保存待测。RT-PCR检测5-HT、5-HT3R、NK1R及ICAM-1 mRNA的表达: 从GenBank查取5-HT、5-HT3R、NK1R及ICAM-1基因序列, 以Primer5软件设计引

物各一对, 5-HT: 上游: 5'-AGACCCTATCAG-GTGGACGTT-3', 下游: 5'-GGAGGTATACG-CAGATGCT-3', 片段大小172 bp; 5-HT3R: 上游: 5'-GCAGACATACGCTTTCCC-3', 下游: 5'-ATAGCCCACCAGCACATT-3', 片段大小340 bp; NK1R: 上游: 5'-ACCAACACCTCT-GAGTCTAA-3', 下游: 5'-TGGTCACTGTCCT-CATTCT-3', 片段大小174 bp。内参GAPDH: 上游: 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3', 下游: 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3', 片段大小252 bp; ICAM-1: 上游: 5'-TCGGAGGATCA-CAAACGAAGC-3', 下游: 5'-AACATAAGAG-GCTGCCATCACG-3', 片段大小462 bp。上述引物均由上海生工生物技术有限公司合成。采用TRIzol法提取肠组织总RNA。按两步法RT-PCR试剂盒操作说明逆转录cDNA, 并进行荧光定量PCR扩增。

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件进行处理, 计量数据以mean±SD表示, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 组间差异的比较采用单因素方差分析, 显著性水准为 $\alpha = 0.05$ 。*P* < 0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠结肠转运功能比较 高乳糖饲料+慢性束缚+夹尾刺激可使模型组大鼠结肠转运功能增强, 较正常组排便量明显增多, 直肠内玻璃小球排出时间明显缩短(表1)。给药后, 各治疗组结肠转运功能较模型组均有显著性差异(表2)。

2.2 大鼠内脏敏感性比较 造模结束后检测大鼠内脏敏感性, 模型组大鼠球囊结直肠扩张引起腹部收缩反射的最小容量阈值(0.34 mL±0.21 mL)较正常组(0.72 mL±0.19 mL)明显降低, 差异有显著性(*P* < 0.01), 证明内脏高敏感模型复制成功。而给药结束后检测, 模型组大鼠球囊结直肠扩张引起腹部收缩反射的最小容量阈值(0.38 mL±0.21 mL)较正常组(0.69 mL±0.05 mL)明显降低, 差异有显著性(*P* < 0.01), 各治疗组引起腹部

表 2 各组大鼠结肠转运功能比较 ( $n = 12$ , mean  $\pm$  SD)

分组	大鼠粪点数	玻璃小球排出时(min)
A组	3.45 $\pm$ 2.93	23.71 $\pm$ 2.06
B组	4.52 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>	16.33 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>
C组	3.58 $\pm$ 0.54 <sup>d</sup>	21.06 $\pm$ 1.87 <sup>c</sup>
D组	3.87 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>	19.42 $\pm$ 2.44 <sup>c</sup>
E组	4.03 $\pm$ 0.66 <sup>c</sup>	18.21 $\pm$ 3.15
F组	3.69 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	20.09 $\pm$ 3.27 <sup>c</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs A组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs B组. A组: 正常对照组; B组: 模型对照组; C组: 金荞麦片高; D组: 中剂量组; E组: 低剂量组; F组: 谷参肠安组.

收缩反射的最小容量阈值(C组: 0.55 mL  $\pm$  0.07 mL, D组: 0.53 mL  $\pm$  0.11 mL, E组: 0.46 mL  $\pm$  0.05 mL, F组: 0.49 mL  $\pm$  0.09 mL)均较模型组(0.38 mL  $\pm$  0.21 mL)升高( $P < 0.05$ ), 说明各治疗组肠道高敏感性显著降低.

2.3 大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-10、SP及CGRP含量比较 模型组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-17及SP含量较正常组明显增高( $P < 0.01$ ), IL-10和CGRP明显降低( $P < 0.01$ ), 而各治疗组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-17及SP含量均较模型组降低, IL-10和CGRP明显升高( $P < 0.05$ 或 $0.01$ )(表3).

2.4 大鼠小肠运动功能比较 模型组大鼠小肠墨汁推进百分率(89.34%  $\pm$  6.67%)较正常组(72.08%  $\pm$  4.49%)显著升高( $P < 0.01$ ), 给药后, 各治疗组小肠墨汁推进百分率(C组: 75.21%  $\pm$  4.21%, D组: 80.12%  $\pm$  5.19%, E组: 82.05%  $\pm$  3.27%, F组: 77.33%  $\pm$  6.01%)均较模型组(89.34%  $\pm$  6.67%)降低( $P < 0.05$ 或 $0.01$ ), 且以金荞麦片高剂量组差异最为明显( $P < 0.01$ ).

2.5 肠组织5-HT、5-HT3R、NK1R及ICAM-1 mRNA比较 模型组大鼠血清5-HT、5-HT3R、NK1R及ICAM-1 mRNA表达水平较正常组明显上调( $P < 0.01$ ), 而各治疗组大鼠血清5-HT、5-HT3R、NK1R及ICAM-1 mRNA均较模型组下调( $P < 0.05$ )(表4).

### 3 讨论

IBS是由腹部疼痛不适同时伴有排便习惯改变为特征的一组肠功能紊乱综合征, 缺乏明显的器质性改变. 依据粪便性状可分为便秘型、腹泻型、混合型和不定型, 其致病因素和发病机制尚未完全明确<sup>[4-6]</sup>. 目前认为多个因素参与其发病, 如遗传因素、生活方式、精神心理因素、肠道运行和感觉功能, 这些都与“脑-肠”

轴功能密切相关<sup>[7]</sup>. 神经-免疫-内分泌网络失调是目前对IBS发病机制较全面的认识<sup>[8]</sup>. IBS的病理生理学改变主要表现为胃肠道动力异常、内脏高敏感性和神经内分泌调节紊乱<sup>[9]</sup>. 近年来, 已有报道, 肠道黏膜低度炎症和免疫激活是IBS新的病理生理学特征, 特别是随着感染后肠易激综合征发病机制的研究, 越来越多的证据表明, 黏膜免疫激活是IBS发病的重要机制. 感染、精神心理应激及肠道菌群紊乱是导致黏膜免疫活化的重要原因, 寻找可能的与免疫相关的生物学靶点是提高对IBS诊断和治疗水平的潜在方向<sup>[10-12]</sup>. 多种细胞因子和多肽类分子, 如TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-10、ICAM-1、SP及CGRP等作为炎症因子和神经传递、调节介质, 是免疫炎症反应网络中的重要成分, 可通过参与炎症反应和调节免疫功能、调节细胞生长分化、诱导炎症反应发生, 参与多种生理病理过程, 他们在胃肠道及脑中的改变影响了神经-免疫-内分泌网络的调节功能, 使“脑-肠”轴紊乱, 从而导致胃肠动力异常, 内脏高敏感性等改变. 同时, 这些细胞因子也对胃肠道的分泌和运动起极其重要的调节作用<sup>[13-19]</sup>. IBS患者肠动力反应过强、感觉阈值降低以及心理障碍或精神异常表现与5-HT浓度较高有关. 5-HT作用于不同的受体会有不同的表现, 其中与IBS发病机制关系最为密切的是5-HT3受体和5-HT4受体. 5-HT广泛分布于整个胃肠道, 与胃肠道功能紊乱密切相关. 激活5-HT3受体增加钠的通透性, 直接兴奋I级感觉神经元, 其活化可致乙酰胆碱和P物质的释放, 后者能促进胃肠道收缩. 5-HT是一种广泛存在于中枢神经系统和胃肠道的神经递质, 也是一种免疫调节因子, 是神经内分泌免疫网络中的重要一员<sup>[20]</sup>. SP诱导炎症主要是通过NK1R所调节的, NK1R主要存在于结肠和回肠的肌间神经丛及黏膜下神经丛, 胃较少. 无论是体内还是体外, 免疫及非免疫细胞上NK1R被激活后都有一种广泛的前炎症反应<sup>[21]</sup>.

本研究采用高乳糖饲料+慢性束缚+夹尾刺激诱导IBS-D大鼠模型, 并在造模成功后采用金荞麦片进行治疗, 后行直肠内球囊扩张实验(colorectal distention, CRD), 观察腹肌收缩反射, 评估了大鼠结肠转运和感觉功能, 放射免疫法检测了血清TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-10、SP和CGRP含量, 荧光定量PCR检测了肠组织5-HT、5-HT3R、NK1R和ICAM-1 mRNA表达水平. 结果显示, 与正常对照组相比, 模型组大鼠结肠

### ■名词解释

直肠内球囊扩张实验(colorectal distention, CRD): 是对直肠排便功能的一项辅助检查, 临床多用于鉴别出口处阻塞和排便失禁, 对判断盆底肌、外括约肌反常收缩及直肠感觉功能下降有重要意义.

## ■ 同行评价

本文的研究结果对临床工作具有较为重要的指导作用。

表 3 各组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-10、SP及CGRP含量比较 ( $n = 12$ , mean  $\pm$  SD)

分组	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-17(ng/L)	IL-10(ng/L)	SP(pg/mL)	CGRP(ng/L)
A组	2.45 $\pm$ 0.51	1.93 $\pm$ 0.14	155.96 $\pm$ 7.12	36.57 $\pm$ 3.01	160.33 $\pm$ 4.18
B组	3.77 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	2.47 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	82.09 $\pm$ 5.33 <sup>b</sup>	43.19 $\pm$ 4.28 <sup>b</sup>	107.31 $\pm$ 3.96 <sup>b</sup>
C组	2.76 $\pm$ 0.31 <sup>d</sup>	2.01 $\pm$ 0.76	137.25 $\pm$ 6.2 <sup>d</sup>	38.22 $\pm$ 3.15 <sup>d</sup>	155.09 $\pm$ 4.38 <sup>d</sup>
D组	2.85 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup>	2.14 $\pm$ 0.29	128.55 $\pm$ 6.3 <sup>c</sup>	40.61 $\pm$ 2.71 <sup>d</sup>	142.02 $\pm$ 2.44 <sup>d</sup>
E组	2.91 $\pm$ 0.77 <sup>c</sup>	2.30 $\pm$ 0.77	121.70 $\pm$ 5.11 <sup>c</sup>	42.01 $\pm$ 3.79 <sup>d</sup>	136.21 $\pm$ 4.55 <sup>c</sup>
F组	2.81 $\pm$ 0.67 <sup>c</sup>	1.98 $\pm$ 0.11	135.90 $\pm$ 4.4 <sup>d</sup>	37.55 $\pm$ 2.63 <sup>d</sup>	158.25 $\pm$ 4.02 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs A组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs B组. A组: 正常对照组; B组: 模型对照组; C组: 金荞麦片高; D组: 中剂量组; E组: 低剂量组; F组: 谷参肠安组. TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; IL: 白介素; SP: P物质; CGRP: 降钙素基因相关肽.

表 4 各组大鼠5-HT、5-HT3R、NK1R及ICAM-1 mRNA比较 (mean  $\pm$  SD)

分组	5-HT	5-HT3R	NK1R	ICAM-1
A组	0.41 $\pm$ 0.05	0.89 $\pm$ 0.07	0.60 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.04
B组	1.27 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	1.61 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.47 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>	1.33 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
C组	0.74 $\pm$ 0.43 <sup>d</sup>	1.01 $\pm$ 0.35	0.88 $\pm$ 0.79 <sup>d</sup>	0.81 $\pm$ 0.55 <sup>d</sup>
D组	0.97 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	1.19 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>	1.07 $\pm$ 0.58 <sup>c</sup>	0.96 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>
E组	1.01 $\pm$ 0.83	1.47 $\pm$ 0.65	1.20 $\pm$ 0.31	1.05 $\pm$ 0.69 <sup>c</sup>
F组	0.66 $\pm$ 0.29 <sup>d</sup>	1.14 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>	0.98 $\pm$ 0.67 <sup>d</sup>	0.72 $\pm$ 0.93 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs A组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs B组. A组: 正常对照组; B组: 模型对照组; C组: 金荞麦片高; D组: 中剂量组; E组: 低剂量组; F组: 谷参肠安组. 5-HT: 肠组织5-羟色胺; 5-HT3R: 5-羟色胺3受体; NK1R: 神经激肽受体-1; ICAM-1: 细胞间黏附分子-1.

转运功能增强, 较正常组排便量明显增多, 直肠内玻璃小球排出时间明显缩短, 而经过治疗后, 这些变化都得到一定程度的逆转. 模型组大鼠球囊结直肠扩张引起腹部收缩反射的最小容量阈值较正常组明显降低, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 而各治疗组引起腹部收缩反射的最小容量阈值均较模型组升高 ( $P < 0.05$ ). 模型组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-17及SP含量较正常组明显增高 ( $P < 0.01$ ), IL-10和CGRP明显降低 ( $P < 0.01$ ), 而各治疗组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-17及SP含量均较模型组降低, IL-10和CGRP明显升高 ( $P < 0.05$  或 0.01). 荧光定量PCR结果显示, 模型组大鼠血清5-HT、5-HT3R、NK1R及ICAM-1 mRNA表达水平较正常组明显上调 ( $P < 0.01$ ), 而各治疗组大鼠血清5-HT、5-HT3R、NK1R及ICAM-1 mRNA均较模型组下调 ( $P < 0.05$ ).

肠易激综合征属于祖国医学的“泄泻”、“便秘”范畴, 与“大肠泄”、“气秘”、“痛泄”关系最为密切, 与“郁证”也有一定联系. 金荞麦片由天然植物药金荞麦提取而成. 金荞麦性平, 味微苦, 归肺、胃、脾经, 现代药理研究发现其有效成分为双聚原矢车菊苷元,

对炎症组织修复确切, 对免疫系统作用部位具体, 故有提高人体免疫力的作用. 研究表明, TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-10、ICAM-1等炎症细胞因子以及5-HT、SP、CGRP及其相关受体均作为炎症因子、神经传递和调节介质, 参与了IBS的生理病理过程, 而金荞麦片能够通过调节血浆TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-10、SP和CGRP含量以及5-HT、5-HT3R、NK1R和ICAM-1 mRNA表达水平, 进而对IBS-D大鼠的免疫炎症反应和内脏高敏感性起到一定的抑制作用, 这可能是金荞麦片治疗IBS的作用环节和靶点之一.

## 4 参考文献

- 1 Camilleri M. Current and future pharmacological treatments for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Expert Opin Pharmacother* 2013; 14: 1151-1160 [PMID: 23621801 DOI: 10.1517/14656566.2013.794223]
- 2 Pajak R, Lackner J, Kamboj SK. A systematic review of minimal-contact psychological treatments for symptom management in irritable bowel syndrome. *J Psychosom Res* 2013; 75: 103-112 [PMID: 23915765 DOI: 10.1016/j.jpsychores.2013.05.007]
- 3 Halland M, Talley NJ. New treatments for IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 13-23 [PMID: 23147658 DOI: 10.1038/nrgastro.2012.207]

- 4 Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000; 47: 804-811 [PMID: 11076879 DOI: 10.1136/gut.47.6.804]
- 5 Quigley EM. Probiotics in irritable bowel syndrome: an immunomodulatory strategy? *J Am Coll Nutr* 2007; 26: 684S-690S [PMID: 18187434 DOI: 10.1080/07315724.2007.10719648]
- 6 De Ponti F. Drug development for the irritable bowel syndrome: current challenges and future perspectives. *Front Pharmacol* 2013; 4: 7 [PMID: 23378837 DOI: 10.3389/fphar.2013.00007]
- 7 Atay O. Update in adolescent gastroenterology. *Adolesc Med State Art Rev* 2013; 24: 264-272, xiv-xv [PMID: 23705529]
- 8 Dang J, Ardila-Hani A, Amichai MM, Chua K, Pimentel M. Systematic review of diagnostic criteria for IBS demonstrates poor validity and utilization of Rome III. *Neurogastroenterol Motil* 2012; 24: 853-e397 [PMID: 22632582 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2012.01943.x]
- 9 Surdea-Blaga T, Băban A, Dumitrascu DL. Psychosocial determinants of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 616-626 [PMID: 22363132 DOI: 10.3748/wjg.v18.i7.616]
- 10 Jovani M, Fiorino G, Danese S. Commentary: associations between immune activation, intestinal permeability and irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 277-278 [PMID: 23252779 DOI: 10.1111/apt.12136]
- 11 Ishihara S, Tada Y, Fukuba N, Oka A, Kusunoki R, Mishima Y, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kinoshita Y. Pathogenesis of irritable bowel syndrome--review regarding associated infection and immune activation. *Digestion* 2013; 87: 204-211 [PMID: 23712295 DOI: 10.1159/000350054]
- 12 Fukudo S, Kuwano H, Miwa H. Management and pathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *Digestion* 2012; 85: 85-89 [PMID: 22269284 DOI: 10.1159/000334652]
- 13 Bashashati M, Rezaei N, Bashashati H, Shafieyoun A, Daryani NE, Sharkey KA, Storr M. Cytokine gene polymorphisms are associated with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil* 2012; 24: 1102-e566 [PMID: 22897390 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2012.01990.x]
- 14 Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 163-173 [PMID: 20101257 DOI: 10.1038/nrgastro.2010.4]
- 15 El-Salhy M. Irritable bowel syndrome: diagnosis and pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 5151-5163 [PMID: 23066308]
- 16 Elsenbruch S. Abdominal pain in Irritable Bowel Syndrome: a review of putative psychological, neural and neuro-immune mechanisms. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 386-394 [PMID: 21094682 DOI: 10.1016/j.bbi.2010.11.010]
- 17 Matricon J, Meleine M, Gelot A, Piche T, Dapoigny M, Muller E, Ardid D. Review article: Associations between immune activation, intestinal permeability and the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 1009-1031 [PMID: 23066886 DOI: 10.1111/apt.12080]
- 18 Ford AC, Talley NJ. Mucosal inflammation as a potential etiological factor in irritable bowel syndrome: a systematic review. *J Gastroenterol* 2011; 46: 421-431 [PMID: 21331765 DOI: 10.1007/s00535-011-0379-9]
- 19 Spiller R, Lam C. An Update on Post-infectious Irritable Bowel Syndrome: Role of Genetics, Immune Activation, Serotonin and Altered Microbiome. *J Neurogastroenterol Motil* 2012; 18: 258-268 [PMID: 22837873 DOI: 10.5056/jnm.2012.18.3.258]
- 20 康明祥, 贾红. 肠易激综合征内脏高敏感性机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2004; 16: 1554-1558
- 21 Anastasi JK, Capili B, Chang M. Managing irritable bowel syndrome. *Am J Nurs* 2013; 113: 42-52; quiz 54, 53 [PMID: 23764698]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利

