

痛泻要方对 D-IBS 大鼠结肠运动指数与收缩频率的影响

杨 成 张声生 熊 鹰 汪正芳

(首都医科大学附属北京中医医院消化中心, 北京, 100010)

摘要 目的: 观察痛泻要方对腹泻型肠易激综合征(D-IBS)实验大鼠结肠运动指数(每分钟收缩强度曲线下面积, MI)和收缩频率(每分钟收缩次数, CF)的影响。方法: 将 SPF 级新生 SD 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、中药痛泻要方组。除正常组以外, 其他 2 组均采用母婴分离加束缚应激的方法进行造模。第 60 天造模成功后, 于第 61 天开始, 正常组和模型组给予生理盐水, 中药组给予 4.92 g/100 g 痛泻要方煎剂。3 组均采用灌胃的方法给药, 给药体积均为 2 mL/(100 g · d), 连续 14 d。造模及给药过程中观察大鼠粪便 Bristol 分级评分及粪便含水量。采用离体张力测定灌流系统, 测量 3 组大鼠离体结肠纵型平滑肌肌条(CLSMs)运动指数(MI, mg/min)和收缩频率(CF, times/min)的变化。结果: 给药前, 中药组和模型组粪便 Bristol 评分、含水量均高于正常组($P < 0.05$); 给药后, 中药组粪便 Bristol 评分及含水量均低于模型组($P < 0.01$)。给药前, 中药组和模型组的运动指数(MI)、收缩频率(CF)结果近似, 且均高于正常组($P < 0.01$); 给药后, 中药组的 MI、CF 均呈下降趋势, 且低于模型组($P < 0.01$), 与正常组比较无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 痛泻要方可有效改善 D-IBS 大鼠的腹泻症状, 其作用机制可能是通过降低结肠平滑肌的运动指数及收缩频率实现的。

关键词 痛泻要方; 腹泻型肠易激综合征; 运动指数; 收缩频率

Effects of Tong-Xie-Yao-Fang Formula on Colonic Movement Index and Contraction Frequency of D-IBS Rats

Yang Cheng, Zhang Shengsheng, Xiong Ying, Wang Zhengfang

(Digestion Center, Beijing Hospital of TCM Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Tong-Xie-Yao-Fang (TXYF) formula on movement index (MI, area under the curve of contraction intensity/min) and contraction frequency (CF, number of contractions/min) of experimental rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS). **Methods:** The newborn Specific Pathogen Free (SPF) and Sprague-Dawley (SD) male pups were randomly divided into normal group, NMS + RS group and TXYF formula group. In addition to the normal group, D-IBS model with the method of neonatal maternal separation plus restraint stress (NMS + RS) were established in other two groups. On the 61st day, after the success of molding, normal group and NMS + RS group was given with saline, while TXYF formula group were given with 4.92 g/100 g TXYF formula. Three groups were dosed with the method of gavage with the drug delivery volume of 2 mL/100 g/d, for 14 consecutive days. The scores of Bristol classification and water content of the fecal pellets of rats were observed in the process of model building and dosing. The distinctions of movement index (MI, area under the curve of contraction intensity/min, mg/min) and contraction frequency (CF, number of contractions/min, times/min) of isolated colonic longitudinal smooth muscle strips (CLSMs) in three groups before and after treatment were observed with a Power Lab System. **Results:** Before treatment, scores of Bristol classification and water content of the fecal pellets in both TXYF formula group and NMS + RS group were all higher than that in normal group ($P < 0.05$); After treatment, the scores of Bristol classification and water content of the fecal pellets in TXYF formula group were lower than that in NMS + RS group ($P < 0.01$). Before treatment, the MI and CF of CLSMs in the NMS + RS and TXYF formula groups were similar and all higher than that in the normal group ($P < 0.01$, respectively). After treatment, the MI and CF in the TXYF formula group was lower than in the NMS + RS group ($P < 0.01$) and similar to the normal group ($P > 0.05$). **Conclusion:** TXYF formula can effectively improve symptoms of D-IBS rats. Its mechanism may be achieved through Lower colon movement index and contraction frequency.

Key Words TXYF formula; Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; MI; CF

中图分类号: R574 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2015.05.010

基金项目: 北京市医院管理局临床医学发展专项经费资助(编号: ZY201411); 国家自然科学基金面上项目(编号: 81473644); 国家自然科学基金青年项目(编号: 81302949); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(编号: 2011-2-13)

作者简介: 杨成, 博士, 研究方向: 中西医结合治疗消化系统疾病的临床与基础研究

通信作者: 张声生(1964. 11—), 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 首都医科大学附属北京中医医院首席专家, 地址: 北京市东城区美术馆后街 23 号, Tel: (010) 52176634, E-mail: zhss2000@163.com

腹泻型肠易激综合征(Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome, D-IBS)是一种慢性功能性肠道疾病。其临床特点是腹泻、腹部疼痛或不适并缺乏相应的病理变化。根据流行病学资料显示,D-IBS主要发生在20~40岁之间的年轻人,并且严重影响到他们的生活质量^[1-2]。目前,由于D-IBS发病机制尚未完全阐明,现代医学主要采取对症对因治疗,效果不是十分确切,且患者反复就诊,这在一定程度上增加了医疗卫生资源的使用^[3-4]。传统中医药(Traditional Chinese Medicine, TCM)可以显著改善患者的症状和生活质量,越来越多的患者开始寻求中医中药治疗^[5]。许多临床研究表明,痛泻要方可以显著改善D-IBS患者的临床症状,提高他们的生活质量^[6-7]。但是其具体的作用机制尚不明确,我们在传统中医药理论的指导下,通过观察痛泻要方对D-IBS实验大鼠结肠运动指数(MI)和收缩频率(CF)的影响,进一步探讨其治疗D-IBS的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及造模方法 刚出生1 d的SPF级SD幼鼠购自维通利华公司(质量合格证号:11400700014948),饲养在北京中医药大学东直门医院动物中心(许可证编号:SYXK(京)2009.0028)。饲养条件为II级,光照周期为白/夜:12 h/12 h,维持室温在23~26℃,相对湿度在45%~60%,自由进食、饮水。将SD幼鼠随机分为正常组、模型组、中药痛泻要方组,每组各20只。除正常组外,其他各组均采用母婴分离加束缚应激的方法进行造模。具体造模方法^[8-9]:将新出生2 d的SD幼鼠与母鼠分开,180 min/d(08:00-11:00),连续20 d,在第50天时,将SD大鼠置于自制的笼子中(限长18 cm,宽4 cm,高4 cm),使其只能前后移动,不能回头及左右转向,3 h/d,持续10 d。各组大鼠均在第22天开始断奶,并剔除雌鼠,保留雄鼠。

1.2 实验药物及给药 痛泻要方组成:炒白术93.75 g,白芍62.5 g,炒陈皮46.875 g,防风31.25 g,由首都医科大学附属北京中医医院制剂室制备。痛泻要方组每毫升生药含量为4.92 g。第60天造模成功后,于第61天开始,正常组和模型组给予生理盐水,中药组给予4.92 g/100 g痛泻要方煎剂。各组均采用灌胃的方法给药,给药体积均为2 mL/(100 g·d),给药时间为连续14 d。

1.3 试剂与仪器 Krebs溶液由以下成分组成(mmol/L):117 NaCl,4.7 KCl,1.2 MgCl₂,24.8 NaHCO₃,1.2 KH₂PO₄,2.56 CaCl₂和11.1 glucose。同时

通以95% O₂和5% CO₂,并维持溶液温度在37℃,pH值在7.4左右。MLO146/25-220型张力换能器:澳大利亚ADInstruments公司;PowerLab/4SP数据处理与分析系统:澳大利亚ADInstruments公司。涡旋振荡仪,型号:QL-902,厂家:海门市其林贝尔仪器制造有限公司;离心机,型号:Centrifuge 5415D,厂家:Eppendorf。

1.4 粪便Bristol分级评分及粪便含水量 第60天,分别收集3组大鼠的24 h粪便,并对其进行Bristol分级评分^[10]、称重,干燥后再次称重,计算出粪便含水量。粪便含水量=(大便湿重-干燥后重量)/大便湿重×100%。Bristol分级评分标准:1级,分散的硬块,似坚果;2级,腊肠状,但成块;3级,腊肠状,但表面有裂缝;4级,似腊肠或蛇、光滑柔软;5级,软团、边缘清楚;6级,绒状物,边缘不清、糊状便;7级,水样、无固状物。

1.5 标本制备与动力测定 参照文献方法^[11-12],用7%的水合氯醛(35 mg/100 g)将大鼠麻醉后,沿着腹中线打开腹腔,在距离肛门约3~8 cm处剪切一段结肠,放入盛有4℃ Krebs液、底部铺有硅胶的培养皿中,并持续通以95%氧气和5%二氧化碳的混合气体。用眼科剪小心的去除肠管上的附带组织后,沿肠系膜一侧剪开洗净,黏膜层朝上用大头针固定在培养皿底部,用精细镊子将黏膜层及黏膜下层组织剥除,得到完整的平滑肌片,然后沿纵行肌纤维走向剪成2 mm×8 mm的结肠纵型平滑肌条标本(Colonic Longitudinal Smooth Muscle Strips, CLSMs),并在肌条两端分别用5-0号医用丝线扎牢,每只大鼠制作一个标本。将制备好的标本移入含有37℃ Krebs液并持续通以95%氧气和5%二氧化碳混合气体的恒温槽中,浴槽内溶液体积固定为20 mL。标本一端固定在浴槽底部,另一端通过张力换能器与生理记录仪相连。标本的初始负荷为2.0 g,每15 min换一次新鲜的Krebs液,平衡60 min后开始试验。为了确保实验的效果,一个平滑肌肌条标本的测试时间一般为2~3 h。

1.6 数据统计 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。数据均以“均数±标准误”(means±SE)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痛泻要方对D-IBS大鼠腹泻症状的改善情况 给药前,中药组和模型组的粪便Bristol分级评分及粪便含水量近似,均分别高于正常组($P<$

表 1 各组大鼠的粪便 Bristol 分级评分和粪便含水量 (%) 比较 (means $\pm$ SE)

时间	正常组	给药前 模型组	中药组	正常组	给药后 模型组	中药组
粪便 Bristol 分级评分	4.6 $\pm$ 0.7	6.3 $\pm$ 0.67 ^{##}	6.4 $\pm$ 0.52 ^{##}	4.6 $\pm$ 0.52	6.3 $\pm$ 0.48 ^{$\Delta\Delta$}	4.9 $\pm$ 0.57 ^{**}
粪便含水量 (%)	51.01 $\pm$ 1.68	69.03 $\pm$ 1.77 ^{##}	67.23 $\pm$ 1.5 ^{##}	50.93 $\pm$ 1.89	68.23 $\pm$ 3.54 ^{$\Delta\Delta$}	58.58 $\pm$ 1.09 ^{**}

注:同组给药前后比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;给药前与正常组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;给药后与模型组相比, ^{Δ} $P < 0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$;各组 $n = 10$ 。

0.01,表 1,表 2)。经中药痛泻要方干预后,中药组大鼠的粪便 Bristol 分级评分及粪便含水量均明显低于治疗之前($P < 0.01$),且低于模型组(4.9 ± 0.57 vs 6.3 ± 0.48 ; $58.58 \pm 1.09\%$ vs $68.23 \pm 3.54\%$; $P < 0.05$,见表 1);提示痛泻要方可以通过降低 D-IBS 大鼠的粪便 Bristol 分级评分及粪便含水量改善其腹泻症状。

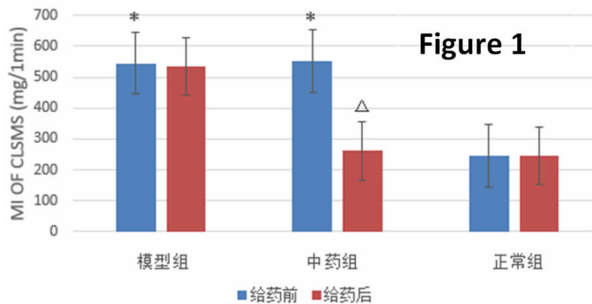


图 1 痛泻要方对大鼠结肠纵行平滑肌运动指数 (MI) 的影响

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, ^{Δ} $P < 0.01$ 。

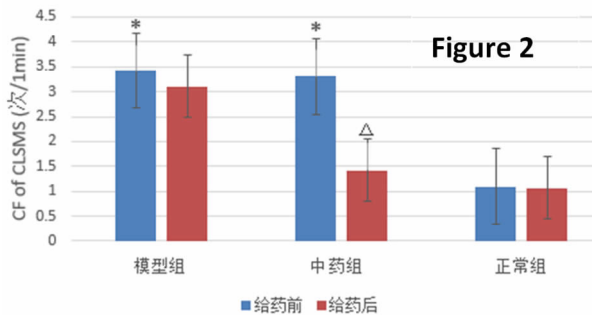


图 2 痛泻要方对大鼠结肠纵行平滑肌收缩频数 (CF) 的影响

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, ^{Δ} $P < 0.01$ 。

2.2 痛泻要方对结肠动力的影响

2.2.1 痛泻要方对结肠平滑肌 MI 的影响 给药之前,D-IBS 大鼠的结肠平滑肌运动指数 (MI) 在模型组和中药组结果近似,均要高于正常组 (545.49 ± 73.66 mg/min、 551.09 ± 54.29 mg/min vs 245.76 ± 34.44 mg/min, $n = 10$, $P < 0.01$,图 1)。给药之后,中药组的 MI 要低于模型组 (261.39 ± 38.59 mg/min vs 533.9 ± 61.63 mg/min, $n = 10$, $P < 0.01$,图 1),且接近于正常组 (261.39 ± 38.59 mg/min vs

244.78 ± 32.15 mg/min, $n = 10$, $P = 0.365$,图 1)。

2.2.2 痛泻要方对结肠平滑肌 CF 的影响 给药之前,D-IBS 大鼠的结肠平滑肌收缩频数 (CF) 在模型组和中药组结果近似,均要高于正常组 (3.42 ± 0.25 次/min、 3.31 ± 0.21 次/min vs 1.1 ± 0.17 次/min, $n = 10$, $P < 0.01$,Figure 2)。给药之后,中药组的 CF 远低于模型组 (1.42 ± 0.87 次/min vs 3.11 ± 0.82 次/min, $n = 10$, $P < 0.01$,图 2),且与正常组结果近似。

3 讨论

腹泻、腹部疼痛或不适是 D-IBS 患者的主要临床症状,D-IBS 的病因和发病机制较为复杂,其病理生理变化主要包括胃肠动力障碍和内脏感觉异常敏感。中医学中没有与 D-IBS 完全相符的病症名称,一般根据患者的临床症状将其归属于“腹痛”“泄泻”“肠郁”等范畴。本病病位在肠,主要涉及到肝、脾、肾三脏,多由土虚木乘,肝脾不和,脾失健运所致。治疗当以补脾柔肝,祛湿止泻为主。正如《医方考》中所说:“泻责之脾,痛责之肝;肝则之实,脾则之虚,脾虚肝实,故令痛泻”。其特点是泻必腹痛。其病因病机在中医古文中亦早有详细阐述,其认为 D-IBS 的发生多由久病伤脾,或素体脾虚,或饮食不节,损伤脾胃;情志不舒,肝气郁结,久则横逆犯脾;水湿内阻,损伤脾肾等所致^[13]。

痛泻要方是源自《景岳全书》的名方,其作为治疗 D-IBS 的常用方剂,有着数百年的临床实践,具有调和肝脾,补脾柔肝,祛湿止泻之功效。痛泻要方主要由白术,白芍,陈皮以及防风组成。方中白术苦温,补脾燥湿,为君药。白芍酸寒,柔肝缓急止痛,与白术配伍,为臣药。陈皮辛苦而温,理气燥湿,醒脾和胃,为佐药。防风湿以助止泻,为脾经引经药,故为佐使药。本方用于脾虚肝旺之泄泻。

本研究采用母婴分离结合约束应激的方法建立 D-IBS 动物模型^[9],能够最大可能的模拟 D-IBS 患者的主要症状,包括腹泻和内脏高敏感性。这与 D-IBS 临床患者的症状是一致的,因此可以使用这个模型来探索痛泻要方对 D-IBS 潜在的治疗机制。本

实验在前期研究结果的基础上^[14],通过观察痛泻要方对大鼠结肠离体纵型平滑肌肌条的作用,结果显示,在给药之前,模型组和中药组的 D-IBS 大鼠结肠平滑肌运动指数和收缩频率结果近似,均要高于正常组;经中药痛泻要方干预后,其运动指数及收缩频率均呈下降趋势,并低于模型组,且接近于正常组。提示痛泻要方可以明显降低腹泻型肠易激综合征大鼠的运动指数,抑制其收缩频率,这在一定程度上可以减轻 D-IBS 大鼠的腹泻症状。

参考文献

- [1] Ian M. Carroll, Tamar Ringel-Kulka, Temitope O. Keku, et al. Molecular analysis is of the luminal and mucosal associated intestinal microbiota in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol*, 2011, 301: G799 – G807.
- [2] 张声生, 周滔, 汪红兵. 肠易激综合征中医药诊疗现状与挑战 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(21): 2216 – 2220.
- [3] Zhang SS, Zhou T, Wang HB. The status quo and challenges in traditional Chinese medicine diagnosis and treatment of Irritable bowel syndrome [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, 18: 2216 – 2220.
- [4] Lacy B E, O'Shana T. Clinical pearls for irritable bowel syndrome; management of the diarrhea-predominant subtype [J]. *Gastroenterol Nurs*, 2014, 37: 392 – 405.
- [5] 张声生, 汪红兵, 李振华. 中医药辨证治疗腹泻型肠易激综合征多中心随机对照研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(1): 9 – 12.

- [6] 赖兰静, 韩亚翠, 张慧, 等. 痛泻要方对腹泻型肠易激综合征患者临床症状改善的时效性 [J]. *实用中西医结合临床*, 2013, 13(2): 27 – 28.
- [7] 涂云. 痛泻要方加减治疗腹泻型肠易激综合征随机平行对照研究 [J]. *实用中医内科杂志*, 2013, 27(1): 41 – 42.
- [8] Xue H, Tian YM, Yan M, et al. Appearance of Segmental Discrepancy of Anion Transport in Rat Distal Colon [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(8): 1407 – 1411.
- [9] 赵迎盼, 唐旭东, 卞兆祥, 等. IBS-D 肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的建立与评价的初步研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(11): 1507 – 1514.
- [10] Garsed K, Chernova J, Hastings M, et al. A randomised trial of ondansetron for the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhoea [J]. *Gut*, 2014, 63(10): 1617 – 1625.
- [11] 袁建业, 谢建群, 吴大正, 等. 痛泻要方抑制大鼠离体结肠平滑肌收缩的钙动员机制 [J]. *中西医结合学报*, 2009, 7(10): 958 – 962.
- [12] 段东晓, 刘素芳, 赵文超, 等. 长期应用川芎嗪对大鼠结肠黏膜阴离子分泌的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(3): 290 – 293.
- [13] 张伟, 孙建华, 裴丽霞, 等. 中医药治疗肠易激综合征的系统评价/Meta 分析的再评价 [J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(12): 1747 – 1755.
- [14] Cheng Yang, Sheng-Sheng Zhang, Xiao-Ling Li, et al. Inhibitory effect of TongXie-YaoFang formula on colonic contraction in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(10): 2912 – 2917.

(2015-01-23 收稿 责任编辑: 王明)

(上接第 674 页)

- [31] 李传杰. 补中益气汤随症加味治疗反流性食管炎 57 例 [J]. *安徽中医临床杂志*, 2001, 13(3): 183.
- [32] 汶明琦, 刘争辉, 李毅. 胃食管反流病当重脾虚 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2012, 14(1): 1256 – 1258.
- [33] 李春婷, 沈水杰, 杜斌, 等. 健脾疏肝方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及 PCNA 的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(7): 733 – 736.
- [34] 李春婷, 滑永志, 杜斌, 等. 健脾疏肝行气降逆法对大鼠实验性反流性食管炎 p53 表达的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2007, 34(7): 1008 – 1009.
- [35] Jason R, Kovac, Harold G, et al. Functional and molecular analysis of L-type calcium channels in human esophagus and lower esophageal sphincter smooth muscle [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 289: G998.
- [36] 王宏伟, 马淑颖, 朱生樑. 疏肝和胃中药对家兔 LES 钙通道调控机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(5): 1071 – 1073.
- [37] 张秀莲, 程艳梅, 孙永顺, 等. 疏肝和胃方对非糜烂性胃食管反

流病发病中枢机制的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2012, 26(4): 67 – 70.

- [38] 冯云霞, 时昭红, 张介眉, 等. 调中颗粒对反流性食管炎大鼠食管黏膜脑肠肽和一氧化氮合成酶的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(15): 154 – 157.
- [39] 唐旭东, 吴红梅, 王志斌, 等. 通降颗粒对大鼠实验性反流性食管炎的疗效评价研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(9): 818 – 821.
- [40] 唐旭东, 吴红梅, 王志斌, 等. 通降颗粒对大鼠实验性反流性食管炎的作用机制的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(2): 136 – 138.
- [41] 唐旭东, 吴红梅, 邵燕, 等. 通降颗粒对实验动物胃排空功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(5): 24 – 26.
- [42] 张超, 童昌珍. 加味四逆散联合雷贝拉唑治疗肝胃不和型非糜烂性胃食管反流病的临床观察 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.

(2015-01-23 收稿 责任编辑: 王明)