

基于EGC研究大建中汤对肠易激综合征内脏痛模型大鼠的改善作用^Δ

武静^{1*}, 王慧¹, 杨毅¹, 李尧锋¹, 王俊霞¹, 杨莎莎^{2#} (1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第一附属医院五官科, 贵阳 550002)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)16-1973-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.16.10

摘要 目的: 研究大建中汤对肠易激综合征(IBS)内脏痛模型大鼠的改善作用及其机制。方法: 将48只雄性未断乳大鼠随机分为正常对照组、模型组、匹维溴铵组(阳性对照, 45 mg/kg)和大建中汤高、中、低剂量组(2.16、1.08、0.54 g/kg, 以生药总量计), 每组8只。除正常对照组外, 其余各组大鼠经母子分离、乙酸灌肠、卵清白蛋白腹腔注射等复制IBS内脏痛模型, 造模共57 d。第58天, 给药组大鼠灌胃相应药物, 模型组和正常对照组大鼠灌胃等体积水, 每日1次, 连续14 d。观察各组大鼠一般情况; 采用腹壁撤退反应(AWR)评估各组大鼠在20、40、60、80 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)压力下的内脏敏感性; 采用苏木精-伊红染色方法观察各组大鼠结肠组织病理学特征; 采用Western blotting技术检测结肠组织中肠胶质细胞标志物纤维酸性蛋白(GFAP)和神经生长因子(NGF)及其受体酪氨酸蛋白激酶A(TrkA)蛋白的表达情况。结果: 正常对照组大鼠结肠组织未见明显病理学改变。模型组大鼠结肠组织黏膜不连续, 腺体水肿, 固有层内散在分布淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞; 大建中汤低剂量组大鼠结肠组织黏膜不完整, 部分腺体轻度水肿, 固有层内有少量淋巴细胞和中性粒细胞; 大建中汤中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠结肠黏膜上皮结构完整, 腺体排列规则, 未见变性坏死和炎症细胞浸润。与正常对照组比较, 模型组和大建中汤低剂量组大鼠20、40、60 mmHg压力下的AWR评分和结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白的相对表达量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 大建中汤中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠20、40 mmHg压力下的AWR评分, 大建中汤高剂量组和匹维溴铵组大鼠60 mmHg压力下的AWR评分, 大建中汤中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白的相对表达量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论: 大建中汤可能通过抑制肠胶质细胞活化、减少NGF和TrkA的表达, 进而改善IBS模型大鼠的内脏痛。

关键词 肠易激综合征; 内脏痛; 肠胶质细胞; 神经生长因子; 大建中汤; 大鼠

Study on the Improvement Effects of Dajianzhong Decoction on Irritable Bowel Syndrome Visceral Pain Model Rats Based on EGC

WU Jing¹, WANG Hui¹, YANG Yi¹, LI Yaofeng¹, WANG Junxia¹, YANG Shasha² (1. College of Basic Medicine, Guizhong University of TCM, Guiyang 550025, China; 2. Dept. of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effect and mechanism of Dajianzhong decoction on irritable bowel syndrome (IBS) visceral pain model rats. METHODS: Totally 48 male non-weaning rats were randomly divided into normal control group, model group, pinaverium bromide group (positive control, 45 mg/kg) and Dajianzhong decoction high-dose, medium-dose and low-dose groups (2.16, 1.08, 0.54 g/kg, by crude drug), with 8 rats in each group. Except for normal control group, IBS visceral pain model was established by mother and child separation, acetic acid enema, ovalbumin intraperitoneal

[21] 钱倩宇, 应娜, 杨贞, 等. 丹参酮Ⅱ_A通过激活PPAR α 减轻4-HNE诱导的肝细胞损伤的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1862-1868.

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81960821); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(No. 黔教合KY字[2017]170); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No. QZYY-2018-026); 贵阳中医学院时珍学院大学生创新创业训练计划项目(No. 贵中医时珍大创合字[2018]2号)

* 副教授, 硕士。研究方向: 中西医结合基础与临床。E-mail: wujingbay@163.com

通信作者: 副主任医师, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中西医结合基础与临床。电话: 0851-88233023。E-mail: yangyuansha88@163.com

[22] JIN W, XU W, CHEN J, et al. Remote limb preconditioning protects against ischemia induced neuronal death through ameliorating neuronal oxidative DNA damage and parthanatos[J]. *J Neurol Sci*, 2016. DOI: 10.1016/j.jns.2016.04.038.

[23] 王传杰, 吴毅, 陶峰, 等. 丰富环境对缺血性脑卒中小鼠海马区Bcl-2和Bax蛋白表达和认知功能的效果[J]. 中国康复理论与实践, 2020, 26(5): 539-543.

(收稿日期: 2020-03-26 修回日期: 2020-07-02)

(编辑: 邹丽娟)

injection in other groups for 57 d. On the 58th day, the rats in administration groups were given the corresponding drugs intragastrically, and model group and normal control group were given constant volume of purified water, once a day, for consecutive 14 d. The general condition of rats was observed; abdominal wall withdrawal reaction (AWR) was adopted to evaluate the visceral sensitivity of rats in each group under 20, 40, 60, and 80 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) pressure; HE staining method was used to observe the colon pathological features of rats in each group. Western blotting assay was used to detect the protein expression of intestinal glial cells markers fibrillary acidic protein (GFAP), nerve growth factor (NGF) and its receptor TrkA in colon tissue. RESULTS: The mucosal layer of colon tissue in rats of model group was discontinuous, gland edema was observed and lymphocytes, neutrophils and eosinophils were scattered in the lamina propria. In Dajianzhong decoction low-does group, the mucosal layer of colon tissue was incomplete, some glands were slightly edematous, and a few lymphocytes, neutrophils in the lamina propria. The colonic mucosa epithelial structure was intact, glands arranged regularly, and no degenerative necrosis and inflammatory cells were observed in Dajianzhong decoction medium- and high-dose groups and pinaverium bromide group. Compared with normal control group, AWR scores under 20, 40, and 60 mmHg pressure, relative protein expression of GFAR, NGF and TrkA were all increased significantly in model group and Dajianzhong decoction low-does groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, AWR scores under 20, and 40 mmHg pressure in Dajianzhong decoction medium- and high-dose groups and pinaverium bromide group, AWR scores under 60 mmHg pressure in Dajianzhong decoction high-dose group and pinaverium bromide group, relative protein expression of GFAP, NGF, TrkA in colon tissue in Dajianzhong decoction medium- and high-dose groups and pinaverium bromide group were all decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Dajianzhong decoction could improve the visceral pain of IBS model rats by inhibiting the activation of intestinal glial cells and reducing the expression of NGF and TrkA.

KEYWORDS Irritable bowel syndrome; Visceral pain; Intestinal glial cells; Nerve growth factor; Dajianzhong decoction; Rats

肠易激综合征(Irritable bowel syndrome, IBS)是最常见的功能性胃肠道疾病,其特征是反复出现腹痛或与排便习惯改变相关的不适^[1]。临床上西医治疗效果欠佳^[2],而中医经典方剂大建中汤对腹痛有很好的疗效^[3]。大建中汤出自《金要匱略》:“心胸中大寒痛,呕不能饮食,腹中寒上冲皮起,出见有头足,上下痛而不可触近,大建中汤主之”。该方由干姜、人参、蜀椒、饴糖组成,有健脾温中、散寒止痛之功。《肠易激综合征中医诊疗专家共识意见(2017)》指出,脾阳虚证是IBS的一个主要证型^[4],与大建中汤主治功能相吻合。有研究发现,肠黏膜中上调的神经生长因子(NGF)可以通过与肠内感觉神经纤维相互作用来介导内脏痛觉过敏^[5],但具体机制尚未确定。研究表明,肠胶质细胞(EGC)似乎是NGF的主要来源^[6],且EGC结构和功能的改变可能与IBS的发病相关^[7]。已有研究发现,大建中汤能够抑制腹痛大鼠脑内胶质细胞活化^[8]。鉴于中枢神经系统(CNS)胶质细胞与EGC形态和生理特征的相似性^[9],本研究拟初步探讨大建中汤是否可以通过抑制EGC活性进而改善IBS内脏痛,为中医药治疗该病提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

HS.Z68.5型电热蒸馏水器(武汉格莱莫检测设备有限公司);JY-JX5L型垂直电泳槽、JY200E型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);TY-80A/TS型水平脱色摇床(江苏科析仪器有限公司);80i型光学显微镜(日本Nikon公司);5200型化学发光凝胶成像仪(上海天能科技有限公司);Multiskan FC型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);GL-21M型高速低温离心机(湖南湘仪集团有限公司)。

1.2 药品与试剂

大建中汤(贵州中医药大学第一附属医院药剂科提供,由蜀椒、干姜、人参、饴糖按质量比1:2:1:5制备的水浸液,每1 mL相当于生药总量1.5 g);匹维溴铵片(美国Abbott Laboratories Limited公司,批号:H20160396,规格:50 mg/片);液态铝佐剂(美国Pierce公司,批号:QD218415A);卵清白蛋白(OVA,美国Sigma公司,批号:052K1275);注射用戊巴比妥钠(美国SCRC公司,批号:WS20060401,规格:0.5 g);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0009);预染蛋白Marker(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:26617);ECL底物化学发光试剂盒(美国Affinity公司,批号:KF001);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国Hybond公司);聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)快速制备试剂盒(上海雅酶生物科技有限公司,批号:PG112);大鼠纤维酸性蛋白(GFAP)、NGF、酪氨酸蛋白激酶A(TrkA)多克隆抗体和生物素标记的山羊抗大鼠免疫球蛋白G(IgG)(H+L)二抗[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号:ab52918、ab76291、ab4648、ab6789];兔GAPDH多克隆抗体(上海研谨生物科技有限公司,批号:GXP199629);无水乙醇(江苏海兴化工有限公司,批号:GB678-90);磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2,北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZLI-9062);苏木精、伊红染液(武汉赛维尔生物技术有限公司,批号:G1005-1、G1001);生理盐水(天津药业焦作有限公司);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,雌鼠16只、雄性8只,体质量150~170 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,动物生产许

可证号:SCXK(川)2018-0015。自由饮食1周后,分别将2只雌鼠和1只雄鼠放在同一笼中,雌鼠怀孕后再分笼喂养。待乳鼠出生后,选择体质量为 (6.42 ± 0.57) g的雄性未断乳大鼠48只作为实验对象。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将48只雄性未断乳大鼠喂养3 d后,随机分为6组,即正常对照组、模型组、匹维溴铵组(阳性对照,根据参考文献方法^[10]设置剂量为45 mg/kg)和大建中汤高、中、低剂量组(2.16、1.08、0.54 g/kg,以生药总量计,分别根据人临床用量的14、7、3.5倍剂量换算而得),每组8只。参考并改良相关文献方法^[11]复制IBS内脏痛模型大鼠:正常对照组母子同笼,其余组从出生第4天起母子分离3 h/d(8:00—11:00),不予哺乳。第8~21天,用直径1 mm的硬膜外导管插入大鼠肛门1 cm并注入0.5%乙酸0.2 mL进行直肠内刺激,每日1次,每隔2 d增加0.1 mL,直至0.5 mL;正常对照组同法注入等体积生理盐水。第22~41天,正常饲养,并于第42和46天分别腹腔注射30 g/L的OVA溶液(30 mg OVA加入至10 g/L液态铝佐剂1 mL中)1 mL,正常对照组注射等体积PBS;第47~57天,正常饲养。第58天,各组大鼠均按0.1 mL/10 g灌胃相应药物(溶剂均为水),正常对照组和模型组大鼠灌胃等体积水,每日1次,连续14 d。

2.2 一般情况

观察各组大鼠造模、给药期间的一般情况,包括毛色、行动等。

2.3 腹壁撤退反射(AWR)评估

按照文献方法^[12]操作,末次给药后禁食不禁水12 h,腹腔注射戊巴比妥钠(0.4%, 10 mL/kg)进行麻醉,将刺激球囊导管插入大鼠肛门内1 cm处,并固定露出肛门外的部分以防止滑脱,导管另一端连接血压计。待大鼠清醒30 min后分别给予20、40、60、80 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)压力,观察结直肠扩张所产生的反应,并参照Al-Chaer标准进行评分,每次扩张时间为20 s,重复6次,每次间隔4 min,取平均值,评分标准:大鼠情绪稳定,计0分;偶有扭动头部,计1分;腹背部肌肉轻微收缩,计2分;腹背部肌肉收缩的基础上出现腹部抬高地面,计3分;腹部高离地面致使腹部呈弓状,计4分^[13]。

2.4 样品采集

AWR评估完成后,腹腔注射戊巴比妥钠(0.4%, 10 mL/kg)进行麻醉,切开大鼠腹腔,在距离其肛门7 cm处取结肠3 cm,分为3段,于-80℃保存。

2.5 结肠病理学观察

取各组大鼠结肠组织,固定,脱水,包埋,切片脱蜡至水,苏木精染色10~20 min;水冲洗1~3 min,用盐酸乙醇混合液(30%盐酸1 mL+75%乙醇99 mL)分化5~10 s;水冲洗1~3 min,置于50℃水中返蓝,直到出现蓝

色为止;水冲洗1~3 min,置于85%乙醇中静置3~5 min,以伊红染色3~5 min;水冲洗3~5 s,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明后,以中性树胶封片后进行图像采集,每张切片先于40倍下观察大体病变,再于100倍下观察具体病变。

2.6 结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白表达检测

采用Western blotting法检测各组大鼠结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白表达水平。将各组大鼠结肠组织裂解后剪成碎片,匀浆,于4℃下以12 000 r/min离心10 min,取上清液;采用BCA法进行蛋白定量后,取煮沸变性后的蛋白50 μg,经PAGE分离、转膜、染色、剪膜、脱色、封闭、洗膜后,将PVDF膜放入一抗(稀释比例:GFAP 1:500, NGF 1:1 000, TrkA 1:5 000, GAPDH 1:5 000)中,摇床上轻摇,4℃孵育过夜;用TBST溶液洗膜3次,每次5 min;将PVDF膜放入二抗(稀释比例:1:5 000)中,摇床上轻摇,室温孵育2~3 h;用TBST膜3次,每次10 min。将PVDF膜平铺到保鲜膜上,以ECL试剂显色后,于化学发光凝胶成像仪上成像,并使用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件处理,结果以目标蛋白相对表达量表示:目标蛋白相对表达量=目标蛋白的积分光密度值(IOD)/内参GAPDH的IOD。

2.7 统计学方法

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用One-way ANOVA检验,两两比较采用LSD检验(方差齐)或Tamhane's T2检验(方差不齐)。P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况

实验期间,正常对照组大鼠进食正常,毛发光泽,行动灵活。模型组大鼠毛发失去光泽,行动迟缓且好扎堆,同时出现收腹、舔舐腹部等现象。大建中汤中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠给药14 d后,进食和毛发逐渐恢复正常,舔舐腹部现象消失;大建中汤低剂量组大鼠给药14 d后较模型组有改善,但没有中、高剂量组明显。

3.2 AWR评分变化

与正常对照组比较,模型组和大建中汤低剂量组大鼠在20、40、60 mmHg压力下的AWR评分均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,大建中汤中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠在20、40 mmHg压力下的AWR评分以及大建中汤高剂量组和匹维溴铵组大鼠在60 mmHg压力下的AWR评分均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);同时,在40 mmHg压力下,大建中汤高剂量组大鼠AWR评分显著低于匹维溴铵组($P<0.05$)。各组大鼠不同压力下的AWR评分见表1。

3.3 结肠病理学变化

正常对照组大鼠结肠上皮组织完整,黏膜连续,淋巴细胞散在,无水肿和溃疡,未见明显病理改变。模型

表1 各组大鼠不同压力下的AWR评分($\bar{x} \pm s, n=8$,分)

Tab 1 AWR scores under different pressures of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$, score)

组别	AWR评分			
	20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
正常对照组	0.40±0.52	1.20±0.42	2.20±0.63	3.20±0.42
模型组	1.60±0.70*	2.60±0.84**	3.40±0.52**	3.60±0.52
大建中汤低剂量组	1.60±0.53*	2.40±0.52**	3.20±0.42**	3.60±0.52
大建中汤中剂量组	1.00±0.47*	2.40±0.84*	3.00±0.67	3.50±0.53
大建中汤高剂量组	0.70±0.48**	1.70±0.48** ^Δ	2.50±0.53**	3.30±0.48
匹维溴铵组	0.80±0.42**	2.00±0.67**	2.80±0.42*	3.50±0.53

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与匹维溴铵组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; vs. pinaverium bromide group, ^Δ $P<0.05$

组大鼠结肠组织黏膜不连续,腺体轻度水肿,固有层内散在分布淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞等。大建中汤低剂量组大鼠结肠组织黏膜不完整,部分腺体轻度水肿,固有层内有分布少量淋巴细胞、中性粒细胞。匹维溴铵组和大建中汤中、高剂量组大鼠结肠黏膜上皮结构较完整,腺体排列规则,固有层及黏膜肌层结构清晰,固有层内有大量大肠腺分布,杯状细胞正常,肌层和浆膜层未见明显变性坏死和炎症细胞浸润。各组大鼠结肠组织病理学特征见图1。

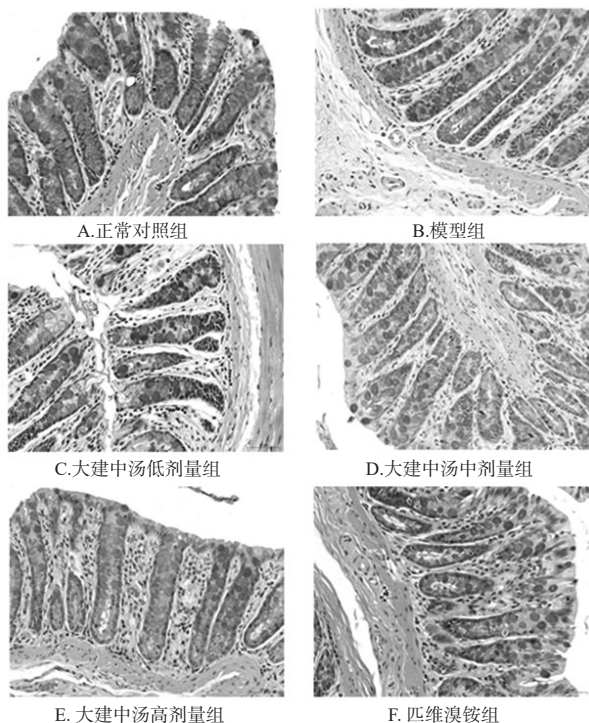


图1 各组大鼠结肠组织病理学特征(HE染色,×100)
Fig 1 Histopathological features of colon tissue of rats in each group (HE staining,×100)

3.4 结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白表达变化

与正常对照组比较,模型组和大建中汤低剂量组大鼠结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白的相对表达量均

显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,大建中汤中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白的相对表达量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白表达的电泳图见图2,检测结果见表2。

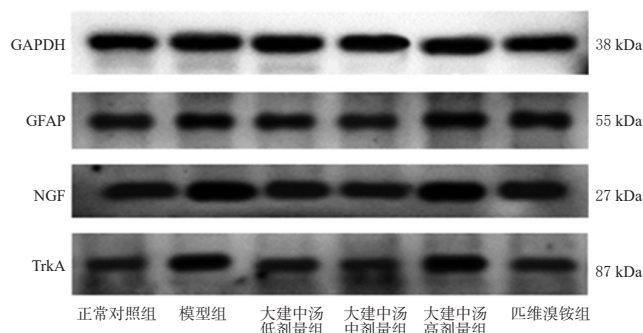


图2 各组大鼠结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of protein expression of GFAP, NGF and TrkA in colon tissue of rats in each group

表2 各组大鼠结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白表达的检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Determination results of protein expression of GFAP, NGF and TrkA in colon tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	GFAP/GAPDH	NGF/GAPDH	TrkA/GAPDH
正常对照组	1.242 6±0.475 0	1.066 3±0.078 5	0.931 2±0.091 5
模型组	2.679 5±0.500 6**	2.562 1±0.116 7**	2.121 9±0.657 6*
大建中汤低剂量组	1.985 7±0.473 2*	2.295 6±0.274 8**	1.895 1±0.314 7*
大建中汤中剂量组	1.378 9±0.426 8**	1.432 1±0.213 4**	1.302 6±0.198 3*
大建中汤高剂量组	1.232 4±0.302 3**	1.300 1±0.187 4**	1.196 7±0.238 2*
匹维溴铵组	1.233 5±0.401 0**	1.298 6±0.201 1**	1.201 3±0.300 2*

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

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

3 讨论

中医学将IBS归纳为“腹痛”“泄泻”等范畴,虽病位在肠,但其本在脾,故证候类型多归纳为脾虚证或脾阳虚证^[14]。《黄帝内经》认为其病位在脾胃,病因有气滞、感寒、血凝、虫积等,病机多为脾胃虚寒、运化乏力、气血不足及气机阻滞,气血经脉运行不畅。《金匱要略》记载的大建中汤是治疗腹痛的经典方剂,针对腹痛病位在脾胃,脾胃虚寒之证,具有健脾止痛、温中散寒之功。临床研究也表明,大建中汤能够治疗多种急慢性内脏痛且疗效确切^[15]。临床上,IBS主要表现为腹痛或伴腹泻的肠功能紊乱综合征。本课题组采用母子分离、乙酸灌肠、OVA腹腔注射的复合造模方法复制IBS内脏痛模型,造模后,大鼠出现行动迟缓,收腹、舔舐腹部等现象,符合IBS内脏痛的症状^[16]。本研究结果表明,模型组大鼠在

20、40、60 mmHg 压力下的 AWR 评分均有明显增加,表明模型大鼠肠道在长期的伤害性刺激下形成了 IBS 慢性内脏痛。这是由于中枢以及外周的双重疼痛敏化,大鼠痛阈降低,故疼痛行为表现明显^[17]。与模型组比较,经中、高剂量大建中汤治疗后,大鼠在 20、40、60 mmHg 压力下的 AWR 评分均明显降低,表明中、高剂量大建中汤能够使 IBS 内脏痛模型大鼠痛阈升高、疼痛缓解。这提示大建中汤对 IBS 内脏痛模型大鼠有明显的镇痛作用。已有研究表明,大建中汤可通过抑制神经递质 5-羟色胺(5-HT)产生和释放,下调神经递质 5-羟色氨酸(5-HTP)、5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)含量,从而达到镇痛作用^[18],有待后续研究予以验证。

有研究提示,IBS 内脏痛与胃肠动力失常、内脏高敏感性、免疫异常、精神心理等因素有关^[19],其中内脏敏感性(可用 AWR 评分评估)增强作为 IBS 的特征被学者广泛接受。内脏感觉主要由 CNS 和外周肠神经系统(ENS)共同传递^[20],后者由大量的多种类型的神经元和 EGC 共同组成^[21]。此前,EGC 被认为仅支持和营养肠道神经元,而近年来越来越多的证据表明其在肠道稳态中发挥了至关重要的作用。例如,EGC 可表达多种受体,能感知肠道环境中的各种刺激并随之发生系列反应,主要表现为细胞增生、形态改变等^[8];IBS 患者肠道内 EGC 增多^[22],提示其可能与 IBS 有关。本研究通过 Western blotting 技术检测发现,IBS 内脏痛模型大鼠结肠组织中 EGC 标志物 GFAP 蛋白的相对表达量显著高于正常对照组,中、高剂量大建中汤能够使模型大鼠结肠组织中 GFAP 蛋白的相对表达量显著降低。基于上述结果,本课题组推测 EGC 可能是 IBS 内脏痛发生的关键靶点,且大建中汤能够通过抑制该靶点而发挥对 IBS 内脏痛的改善作用。

NGF 是神经营养素家族中最早被发现的调节因子,主要通过结合位于细胞表面的 NGF 受体 TrkA 来发挥作用,具有营养神经元及促进神经突起生长的双重作用^[23]。NGF 在肠道中分布广泛,除肠上皮细胞外,其在 EGC 中也有表达^[24]。在正常生理状态下,NGF 可维持神经元的生存及分化;然而在 NGF 表达异常的情况下,其可成为导致疼痛发生的重要原因之一。有研究发现,IBS 患者肠道中 NGF 的表达较健康人有明显增多,提示 NGF 可能参与内脏痛的发生^[9]。本研究结果显示,IBS 内脏痛模型大鼠结肠组织中 NGF、TrkA 蛋白相对表达量均显著高于正常对照组,而大建中汤高、中剂量组大鼠结肠组织中 NGF、TrkA 蛋白相对表达量均显著低于模型组。根据肠道内 EGC 能够表达 NGF 的报道,本研究证实活化的 EGC 可能通过分泌 NGF 作用于 TrkA,从而在 IBS 内脏痛中发挥作用,且大建中汤能够阻止此过程。但本研究只采用 Western blotting 技术检测结肠内 GFAP、NGF、TrkA 蛋白的表达,初步证实了上述蛋白与

IBS 内脏痛的关系,后续将采取免疫荧光双标技术分析 GFAP 和 NGF、TrkA 的关系,进一步揭示 EGC 内的分子变化。

本课题组从胶质细胞信号通路关键因子角度初步揭示了 IBS 的发病机制以及大建中汤的作用机制和科学内涵,有助于寻找中医药治疗 IBS 内脏痛的作用靶标,可为加快研发治疗 IBS 内脏痛的有效中医复方制剂提供科学依据。

参考文献

- [1] TALLEY NJ, IRANI M, KEELY S. Bacterial therapy for irritable bowel syndrome[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(7): 627-629.
- [2] 蔡林坤, 彭卓睿, 黄适, 等. 米氮平联合选择性钙通道拮抗剂治疗肠易激综合征有效性与安全性的 Meta 分析[J]. *中国药房*, 2019, 30(18): 2563-2570.
- [3] 沈桢巍, 雷撼, 高鹏飞. 日本汉方大建中汤在消化道外科领域的基础与临床研究进展[J]. *世界中西医结合杂志*, 2011, 6(3): 261-264.
- [4] 张声生, 魏玮, 杨俭勤. 肠易激综合征中医诊疗专家共识意见: 2017[J]. *中医杂志*, 2017, 58(18): 1614-1620.
- [5] DOTHEL G, BARBARO MARIA R, BOUDIN H, et al. Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(5): 1002-1011.
- [6] LONG X, LI M, LI L X, et al. Butyrate promotes visceral hypersensitivity in an IBS-like model via enteric glial cell-derived nerve growth factor[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2018. DOI: 10.1111/nmo.13227.
- [7] 王慧, 武静, 陈继婷. 脾阳虚大鼠下丘脑星形胶质细胞 GFAP 和小胶质细胞 OX42 的表达及大建中汤的干预作用[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(2): 304-305.
- [8] WANG P, DU C, CHEN FX, et al. BDNF contributes to IBS-like colonic hypersensitivity via activating the enteroglia-nerve unit[J]. *Sci Rep*, 2016. DOI: 10.1038/srep20320.
- [9] GULBRANSEN BD, SHARKY KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(11): 625-632.
- [10] 杜建民, 桑杲, 陈明显, 陈宇. 泻宁口服液对大鼠内脏高敏感性腹泻的干预作用及机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(1): 211-214.
- [11] WINSTON J, SHENOY M, MEDLEY, et al. The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(2): 615-627.
- [12] 刘丽娜, 孙志广, 张雪梅, 等. 金荞麦提取物对 IBS 大鼠脊髓镇痛的干预机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(15): 1290-1295.
- [13] AL-CHAER ED, KAWASAKI M, PASRICHA PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats in-

基于凋亡和自噬途径的石榴皮多酚对人前列腺癌PC3细胞的抑制作用机制研究[△]

冯甜^{1*}, 刘盟^{2#a}, 程路峰³, 高晓黎³, 杨晓君^{1#b} (1.新疆农业大学食品科学与药学学院, 乌鲁木齐 830052; 2.新疆医科大学附属肿瘤医院药理学部, 乌鲁木齐 830000; 3.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)16-1978-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.16.11

摘要 目的:基于自噬和凋亡途径研究石榴皮多酚(PPP)对人前列腺癌PC3细胞增殖的抑制作用机制。方法:采用CCK-8法考察不同质量浓度PPP(25~300 μg/mL)作用24、48、72 h对PC3细胞活性的影响,筛选给药浓度和作用时间。将PC3细胞分为对照组(完全培养基)和PPP低、中、高质量浓度组,培养48 h后,采用流式细胞术和Annexin V-FITC/PI染色法分别检测细胞周期分布和凋亡情况,采用Western blotting法检测细胞中凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2和自噬相关蛋白LC3、Beclin-1、p62、Atg12、Atg16的表达水平。结果:选择48 h为培养时间,PPP的半数抑制浓度为110 μg/mL,选择50、100、200 μg/mL为低、中、高质量浓度。与对照组比较,PPP低、中质量浓度组G₀/G₁期细胞百分比均显著降低而S期细胞百分比均显著升高,PPP高质量浓度组G₀/G₁期细胞百分比显著升高,PPP中、高质量浓度组G₂/M期细胞百分比均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);PPP各质量浓度组细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组比较,PPP各质量浓度组的抗凋亡蛋白Bcl-2和自噬相关蛋白p62表达水平均有不同程度的下降,促凋亡蛋白Bax表达水平和自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I比值和Beclin-1、Atg5、Atg12和Atg16的表达水平均有不同程度的上升,且PPP高质量浓度组上述指标以及低、中质量浓度组上述部分指标组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:PPP能抑制人前列腺癌PC3细胞增殖,其机制可能与诱导细胞发生自噬从而促进细胞凋亡有关。

关键词 石榴皮多酚;前列腺癌;PC3细胞;凋亡;自噬;机制

- duced by colon irritation during postnatal development[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5):1276-1285.
- [14] 吕林,唐旭东,王凤云,等.肠易激综合征从脾论治理论探讨[J].*中华中医药杂志*, 2017, 32(3):943-946
- [15] 牛艺璇,孙波,白埔,等.大建中汤的临床应用及现代研究进展[J].*中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(9):715-716.
- [16] FAN F, TANG Y, DAI HF, et al. Blockade of BDNF signalling attenuates chronic visceral hypersensitivity in an IBS-like rat model[J]. *Eur J Pain*, 2020, 24(4):839-850.
- [17] LEE IS, CHEOH S, PARK JY. Central and peripheral mechanism of acupuncture analgesia on visceral pain: a systematic review[J]. *Evid-based Compl Alt*, 2019. DOI: 10.1155/2019/1304152.
- [18] 陈继婷,郭维,杨毅.大建中汤对脾阳虚大鼠血清神经递质影响的实验研究[J].*浙江中医杂志*, 2007, 42(5):300-301.
- [19] ZHOU QQ, VERNE GN. New insights into visceral hypersensitivity-clinical implications in IBS[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(6):349-355.
- [20] HORVATHOVA L, TILLINGER A, PADOVA A, et al. Changes in gene expression in brain structures related to visceral sensation, autonomic functions, food intake, and cognition in melanoma-bearing mice[J]. *Eur J Neurosci*, 2020, 51(12):2376-2393.
- [21] JULIANA DE MATTOS COELHO-AGUIAR, ANA CARINA BON-FRAUCHES, ANA LÚCIA TAVARES GOMES, et al. The enteric glia: identity and functions[J]. *Glia*, 2015, 63(6):921-935.
- [22] MOKHA JS, HVAMS JS. Irritable bowel syndrome[J]. *Clin Evid*, 2017, 341(8844):556-563.
- [23] DELIVANOGLU N, BOZIKI M, THEOTOKIS P, et al. Spatio-temporal expression profile of NGF and the two-receptor system, TrkA and p75NTR, in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):41-53.
- [24] CIRILLO C, SARNELLI G, TURCO F, et al. Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 23(9):e372-e382.
- (收稿日期:2020-03-26 修回日期:2020-07-02)
(编辑:邹丽娟)

△ 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(No.2017-D01C373)

* 硕士研究生。研究方向:天然产物活性。E-mail:1577610413@qq.com

#a 通信作者:副主任药师,博士。研究方向:肿瘤药理学。E-mail:67848101@qq.com

#b 通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:天然产物活性。E-mail:1049520138@qq.com