

# 基于脑 - 肠轴的疏肝健脾方对 IBS - D 大鼠结肠 - 下丘脑 - 垂体 CREB、NGF、BDNF 的影响

陈小芬<sup>1</sup> 张馨月<sup>2</sup> 张涛<sup>1\*</sup> 廖美华<sup>1</sup> 孙丽君<sup>2</sup> 杨武<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530000; 2. 广西中医药大学, 广西南宁 530000)

**摘要:** 目的 探讨疏肝健脾方基于脑肠轴及内脏高敏感性防治肠易激综合征( IBS )的可能机制及效应靶点。方法 将 48 只雄性清洁级 SD 大鼠按体重随机分为: 正常组、模型组、西药组、疏肝健脾方( 低、中、高剂量) 组。除正常组外, 剩余各组采用辣素灌胃 + 束缚应激法制备 IBS - D 大鼠模型。待模型成功后分组予不同浓度疏肝健脾方药及匹维溴铵干预 2 周。末次给药后处死动物, 截取结肠, 应用光镜观察结肠病理组织学; 电镜观察结肠组织微结构; RT - PCR 技术和 Western - blot 对比疏肝健脾方治疗前后大鼠结肠、下丘脑及垂体组织 CREB、NGF、BDNF 基因及蛋白表达水平。结果 光镜下结肠黏膜未见异常病理变化, 提示 IBS - D 模型制备成功。电镜下可见模型组较正常组 IECs 微绒毛排列杂乱、部分肿胀断裂、细胞间隙增宽, 中药低剂量组、中剂量组、高剂量组 IECs 微绒毛排列尚整齐、细胞间隙紧密。模型组结肠组织 CREB、NGF、BDNF 基因及蛋白水平较正常组增加(  $P < 0.05$  )。经疏肝健脾方中药治疗后各组 CREB、NGF、BDNF 基因及蛋白表达水平较模型组减少(  $P < 0.05$  ), 其中以中剂量组下调明显。模型组下丘脑 CREB 基因、NGF 基因及蛋白较正常组增加, BDNF 蛋白及基因较正常组减少, 中药低剂量组 NGF 蛋白较正常组减少(  $P < 0.05$  ), 中剂量组 NGF 基因较正常组减少(  $P < 0.05$  ), 高剂量组 CREB 蛋白较模型组增加、BDNF 蛋白较模型组减少、BDNF 基因较模型组增加(  $P < 0.05$  )。模型组垂体 CREB、NGF、BDNF 基因及蛋白较正常组增加, 中药中剂量组 CREB、NGF 基因及蛋白较模型组增加(  $P < 0.05$  ), 高剂量组 CREB 蛋白、BDNF 基因及蛋白较模型组增加(  $P < 0.05$  )。结论 病理刺激下的肠道稳态失衡可致 IBS - D 发病, 其中 HPA 轴失调是重要因素。疏肝健脾方上调下丘脑及垂体 NGF、CREB 水平, 下调 IBS - D 模型大鼠结肠黏膜 BDNF、NGF、CREB, 维持肠道稳态, 降低内脏敏感性, 发挥治疗 IBS - D 的效用。

**关键词:** 腹泻型肠易激综合征; 疏肝健脾方; 环磷腺苷效应元件结合蛋白; 神经生长因子; 脑源性神经营养因子  
DOI 标识: doi: 10. 3969/j. issn. 1008-0805. 2022. 02. 15

中图分类号: R285. 5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805( 2022) 02-0317-06

## Effects of Shugan Jianpi decoction on CREB , NGF and BDNF in colon hypothalamus pituitary of IBS - D rats based on brain - gut axis

CHEN Xiao-fen<sup>1</sup> , ZHANG Xin-yue<sup>2</sup> , ZHANG Tao<sup>1\*</sup> , LIAO Mei-hua<sup>1</sup> , SUN Li-jun<sup>2</sup> , YANG Wu<sup>1</sup>

( 1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine Nanning 530000 , China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine Nanning 530000 , China )

**Abstract: Objective** To observe the expression of CREB , NGF and BDNF in the colon - hypothalamus - pituitary of IBS - D rats before and after the intervention of Shugan Jianpi Decoction , and to explore the possible mechanism and effective target of this recipe in the prevention and treatment of IBS based on the brain - gut Axis and visceral hypersensitivity. **Methods** 48 male SD rats were randomly divided into normal group , model group , western medicine group and Shugan Jianpi Decoction ( low , medium and high dose ) groups. In addition to the normal group , the other groups were given different concentrations of Shugan Jianpi Recipe and pinaverium bromide for 2 wk. After the last administration , the animals were killed , and the colon was cut off. The histopathology of colon was observed by light microscope; the microstructure of colon was observed by electron microscope; the gene and protein expression levels of CREB , NGF and BDNF in colon , hypothalamus and pituitary were compared by RT - PCR and Western blot. **Results** There was no abnormal pathological change in colonic mucosa under light microscope , which indicated that IBS - D model was successfully established. Under the electron microscope , the microvilli of IECs in the model group were disorderly arranged , some of them were swollen and ruptured , and the intercellular space was widened , while the microvilli of IECs in the low - dose group , middle dose group and high - dose group were orderly arranged and the intercellular space was tight. The levels of CREB , NGF , BDNF gene and protein in model group were higher than those in normal group (  $P < 0.05$  ) , and the levels of CREB , NGF , BDNF gene and protein in model group were lower than those in model group (  $P < 0.05$  ) , in the

收稿日期: 2021-06-17; 修订日期: 2021-11-25

基金项目: 广西自然科学基金( 2020GXNSFAA259060)

作者简介: 陈小芬( 1993- ) , 女( 汉族) 福建厦门人, 广西中医药大学附属瑞康医院医师, 硕士学位, 主要从事中西医结合防治消化系统疾病的研究工作。

\* 通讯作者简介: 张涛( 1976- ) , 男( 汉族) 江西井冈山人, 广西中医药大学附属瑞康医院主任医师, 博士学位, 主要从事中医药防治消化系统疾病临床研究工作。

middle dose group, the decrease was obvious. The expression of CREB gene, NGF gene and protein in hypothalamus of model group were higher than that of normal group, and BDNF protein and gene were lower than that of normal group, NGF protein in low dose group was lower than that in normal group ( $P < 0.05$ ), NGF gene in middle dose group was lower than that in normal group ( $P < 0.05$ ), CREB protein in high dose group was higher than that in model group, BDNF protein was lower than that in model group, BDNF gene was higher than that in model group ( $P < 0.05$ ). CREB, NGF, BDNF gene and protein of pituitary in model group were higher than those in normal group, CREB, NGF gene and protein in middle dose group were higher than those in model group ( $P < 0.05$ ), and CREB gene and BDNF gene and protein in high dose group were higher than those in model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The imbalance of intestinal homeostasis under pathological stimulation can lead to IBS - D, and the imbalance of HPA axis is an important factor. Shugan Jianpi Decoction can up regulate the levels of NGF and CREB in hypothalamus and pituitary, down regulate the levels of bdnf, NGF and CREB in colonic mucosa of IBS - D model rats, maintain intestinal homeostasis, reduce visceral sensitivity, and play a role in the treatment of IBS - D.

**Key words:** IBS - D; Shugan Jianpi decoction; CAMP - response element binding protein; Nerve growth factor; Brain derived neurotrophic factor

据“肠易激综合征 (Irritable bowel Syndrome, IBS) 罗马 IV”标准, IBS 的“腹痛”是涉及脑 - 肠信号紊乱的复杂神经网络过程, IBS 发生可能与脑 - 肠互动多方面异常相关。“自下而上”还是“自上而下”, 看似由不同的传入通路介导, 但实际上其作用机制是一致的, 即外来伤害性刺激(炎症、神经损伤、电刺激、幼年不良事件以及食物因素等)引起躯体感觉神经系统可塑性变化, 神经元膜兴奋性和突触效力增加以及抑制作用减弱, 疼痛传递通路神经元和环路功能增强, 从而促进疼痛的中枢神经系统的一种过度兴奋状态, 即中枢敏化。脑肠肽类物质作为信使递质介导 IBS 痛觉中枢敏化及神经可塑性改变, HPA 轴是中枢敏化脑肠信号中转处理站。心理生理应激致 HPA 轴失调, 下丘脑室旁核释放脑促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH), 结肠 CRH 受体介导结肠神经生长因子 (BDNF) 表达, 感觉神经 NGF 与 TrkA 结合修饰局部神经元可塑性, 引发结肠黏膜肥大细胞增殖并活化, TRPV1 在感觉神经末梢上调等感觉神经对有害刺激超敏现象, 上述级联反应为中枢敏化奠定基础<sup>[1]</sup>。环磷酸腺苷 (cAMP) 反应元件结合蛋白 (CREB) 在中枢和外周神经元中起着分子开关的作用, NGF 磷酸化 CREB 丝氨酸 133 位点 (Ser133), 招募 CREB 结合蛋白 (CBP) 到 NGF 启动子区域激活 BDNF 转录<sup>[2]</sup>。HPA 轴介导 CREB - NGF - BDNF 通路活化在中枢敏化及内脏感觉神经可塑性改变中占据关键地位, 可能是导致 IBS 内脏敏感性增高、疼痛持续的重要补充机制。现报道如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 体重 (180 ± 20) g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK 桂 2014 - 0002。动物合格证号: No. 45000300000106, 饲养于广西中医药大学实验动物中心。

**1.2 实验药物** 疏肝健脾方 [炒白术 12g, 炒白芍 12g, 陈皮 12g, 防风 12g, 柴胡 (醋) 8g, 炮姜 6g, 炙甘草 6g] 购自广西中医药大学附属瑞康医院中心药房。疏肝健脾方药用蒸馏水配置成疏肝健脾方 (低剂量组 3100 mg/kg, 中剂量组 6200mg/kg, 高剂量组 12400 mg/kg, 过滤分装 4℃ 低温保存。匹维溴胺用蒸馏水溶解制成 1500mg/kg 的溶液置于 4℃ 保存备用。辣素购于东京化成工业株式会社, 批号: 206969 - 8。匹维溴胺购自 (法国苏威制药公司 201709223)。

**1.3 实验试剂** SYBR Premix EX Taq II Kit TaKaRa (RR820A)、Prime Script TMRT reagent Kit TaKaRa (RR047A)、丙烯酰胺、Tris、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸购于 BIOFROXX、1.5 mol/L Tris - HCl Ph8.8 (购于广州蓝吉生物)、1.0 mol/L Tris - HCl Ph6.8 (购于广州蓝吉生物)、Goat anti - rabbit IgG (H + L) HRP (Bioworld

BS13278)、Goat anti - mouse IgG (H + L) HRP (Bioworld BS13278)、抗体 BDNF (abcam Ab108319)、抗体 NGF (abcam Ab6199)、抗体 P - CREB (abcam Ab32096)、抗体 GAPDH (内参) (abcam Ab181602)。

**1.4 实验仪器** 透射电镜 (日本日立 H7650)、荧光定量 PCR 循环仪 (中国中山达安 DA7600)、核酸电泳仪 (中国北京六一 DYY - 6B)、Western 电泳仪 (美国 BIO - RAD, 164 - 5051)、荧光定量仪 (ABI 7300)、PCR 仪 (BIO - RAD C1000 Thermal cycler)、电泳、电转系统 (Bio - rad (美国伯乐) Mini 型蛋白电泳系统 (小型全套蛋白电泳系统)、数码凝胶图像分析系统 (杭州朗基科学仪器有限公司 LG2000)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及造模** 选取 48 只雄性 SD 大鼠进行称重, 随机分成 6 组, 每组 8 只, 分别得到如下 6 组数据: ①正常组; ②疏肝健脾方低剂量组; ③疏肝健脾方中剂量组; ④疏肝健脾方高剂量组; ⑤西药匹维溴胺组; ⑥IBS - D 模型组。适应性喂养 7 天后, 除正常组外, 其余各组均予辣椒水灌胃 + 束缚应激方式, 按体重 10ml/kg 予辣素灌胃 2 次/周, 予束缚应激每日早晚各 1 次, 连续 2 周, 制成 IBS - D 模型。第 2 周起, 造模大鼠采用束缚应激刺激连续 2 周 (上午 10 点分别予金属夹夹尾, 每次 30min, 连续刺激, 1 次/天; 下午 3 点予透明胶固定于自制盒子中限制运动, 每次 30min, 1 次/天, 连续 2 周)。辣素按体重 0.5mg/kg, 浓度 0.25%, 灌胃每天 1 次, 连续 1 周。期间观察各组大鼠毛发、体重、耗食及大便变化<sup>[8]</sup>。

**2.2 药物干预** 自第 3 周末起, 除正常组外, 其余各组分组给药: 模型组予等剂量生理盐水, 中药治疗组予不同剂量疏肝健脾方 (低剂量组 3100 mg/kg、中剂量组 6200mg/kg、高剂量组 12400 mg/kg, 即大鼠用量分别按 3、6、12 倍的成人用剂量给药), 西药治疗组予匹维溴胺 (1500mg/kg) 每天 1 次, 连续 2 周。同时观察各组大鼠毛发、体重、耗食耗水、大便及死亡情况。

**2.3 标本提取** 末次给药后禁食不禁水 1d, 腹腔麻醉处死后, 沿大鼠腹中线逐层剪开腹壁, 顺着直肠逆行向上分离, 截取回盲瓣至肛门全部结肠, 在生理盐水中迅速漂洗 2 遍以清洁肠管内残留粪便, 将所取结肠组织分成 3 个部分: 第一部分取约 1mm × 1mm × 1mm 大小组织在离体 1min 内放入已 4℃ 预冷 3% 戊二醛溶液中行电镜前固定, 4℃ 避光保存并送检, 用于透射电镜观察结肠组织超微结构; 第二部分取约 0.5mm × 1mm × 1mm 大小结肠组织在离体 5min 内放入冻存管并置于 -80℃ 冰箱保存, 用于 PCR 和 WB 检测结肠 CREB、NGF、BDNF 基因及蛋白表达; 剩余部分结肠组织在离体 10min 内置于 10% 甲醛溶液中固定过夜, 4℃ 保

存,主要用于 HE 染色观察结肠组织病理学。与此同时,迅速剪开颈背部皮肤,行“T”字形剪开暴露头部,沿颈后正中中心地将头骨剪开,向两边剥离头盖骨,将脑组织暴露后,用镊子从延髓底部轻轻挑断后取出,用小剪刀或者刀片将下丘脑沿周围菱形的曲线分离;SD 大鼠垂体位于垂体窝内,约米粒大小形似灰白色顿号,用眼科镊轻轻托出,将取下的垂体和下丘脑在生理盐水中迅速漂洗 2 遍防止血液等杂质代入影响实验结果,在离体 5min 内放入冻存管并置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 IBS 大鼠结肠组织病理学检测** 将已经的石蜡包埋结肠切片脱蜡-至水,应用 HE 染色检测大鼠结肠病理学变化,具体步骤严格按说明操作,在光镜下观察标本病理学改变并摄片。

**2.4.2 透射电镜观察 IBS-D 大鼠肠道超微结构变化** 采用 H-7560 透射电镜检测各组大鼠结肠上皮细胞绒毛排列、细胞连接变化,在广西医科大学电镜室完成。

**2.4.3 荧光定量 PCR (SYBR Green 法) 检测大鼠结肠、下丘脑及垂体 CREB、NGF、BDNF 基因的表达水平** 应用荧光定量 PCR (SYBR Green 法),以 R-GAPDH (扩增片段长度 110bp) 为内参基因,检测大鼠结肠、下丘脑及垂体样品中 CREB、NGF、BDNF 基因的表达水平。具体步骤:细胞总 RNA 的提取-总 RNA 纯度和完整性检测-Primer express 2.0 软件设计引物-逆转录为 cDNA-荧光定量 PCR 反应体系扩增-目的基因相对 mRNA 表达水平的计算分析。CREB、NGF、BDNF、GAPDH 引物序列见表 1。

表 1 CREB、NGF、BDNF、GAPDH 引物序列

引物	上游	下游	扩增片段 bp
CREB	5'-ACCAGCAGAGTGGAGATGCTG-3'	5'-TGGCATGGATACCTGGGCTA-3'	101
NGF	5'-AAGACCACAGCCACGGACAT-3'	5'-GCTCGGCACITGGTCTCAA-3'	107
BDNF	5'-GCTGCTGGATGAGACCAGA-3'	5'-CCAAAGGCACTTGACTGCTG-3'	101
GAPDH	5'-AGGGCTGCCTTCTTGTGA-3'	5'-AACTTGCCTGGGTAGACTCA-3'	110

**2.4.4 Western Blot 技术检测结肠、下丘脑及垂体中 P-CREB、NGF、BDNF 的蛋白表达水平** 根据所需抗体浓度,用 TBST 稀释 (目的蛋白所用浓度 P-CREB 用 1:5000; NGF 用 1:1000; BDNF 用 1:2000)。根据所需抗体浓度,用 TBST 稀释,室温孵育 2h 左右 (二抗所用浓度均为 1:40000)。

**2.5 统计学处理** 应用 SPSS 22.0 for windows 统计软件分析处理各组数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,不符合正态分布及方差齐性的采用秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 IBS-D 大鼠结肠组织病理学变化** 光镜下可观察到各组大鼠结肠黏膜完整,上皮绒毛排列整齐,未见黏膜下血管扩张及弥漫性炎症浸润改变,未见坏死、脱落,腺体结构、排列正常。说明各组大鼠结肠均不存在器质性病变,符合 IBS 模型表现(图 1)。

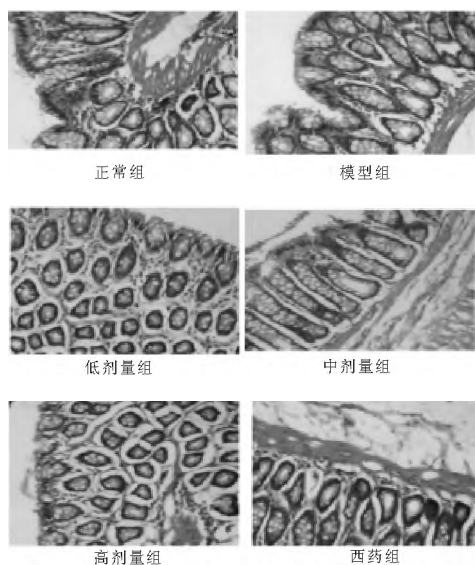
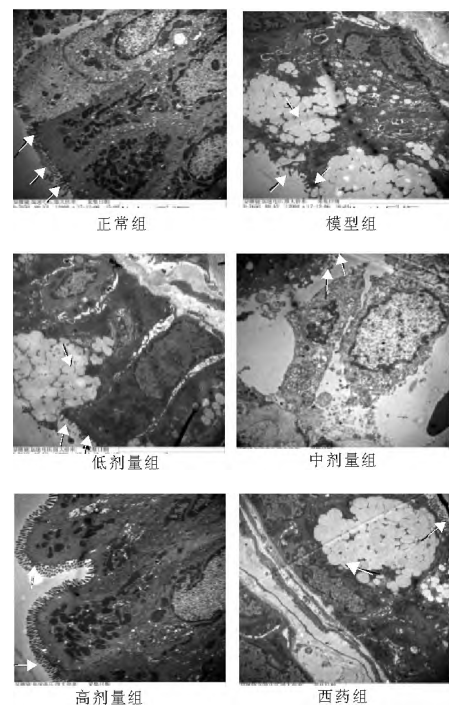


图 1 各组大鼠结肠组织病理学变化(HE 染色,40 $\times$ )

**3.2 IBS-D 各组大鼠结肠超微结构变化** 正常组 IECs 微绒毛排列整齐,细胞间的紧密连接完整,清晰可见;模型组细胞间紧密连接没有明显增宽,有的紧密连接不甚清晰,肥大细胞脱颗粒后的空泡明显增多;疏肝健脾方中、高剂量组微绒毛排列尚整齐,疏

肝健脾方低剂量组、西药组细胞间紧密连接尚清晰(图 2)。



箭头指向与各组结果相对应

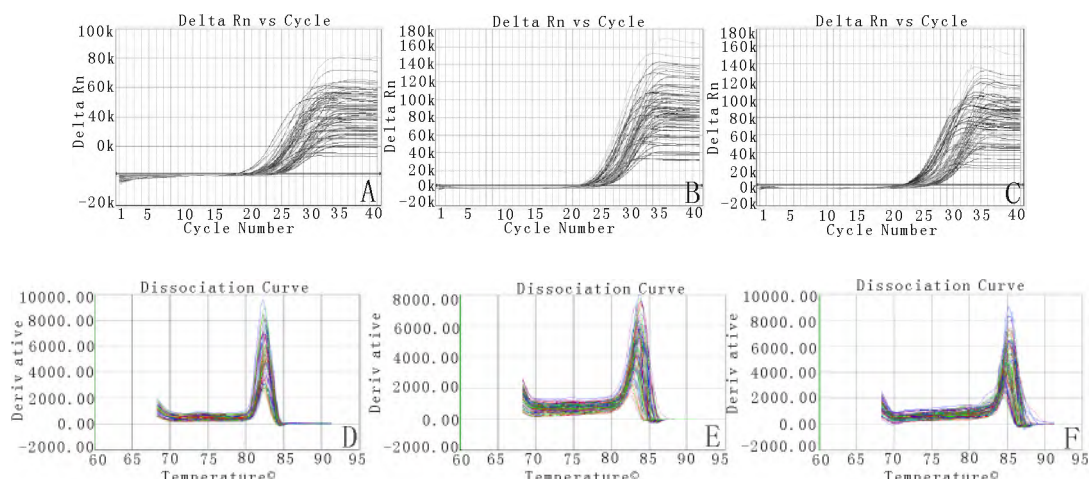
图 2 各组大鼠电镜下观察 IECs 微绒毛排列(12000 $\times$ )

**3.3 荧光定量 PCR (SYBR Green 法) 检测大鼠结肠、下丘脑及垂体 CREB、NGF、BDNF 基因表达水平** 结肠组织中,与正常组比较,模型组 NGF、BDNF 基因表达升高。药物干预后,疏肝健脾方低、中剂量组 NGF、BDNF 基因表达降低,高剂量组 CREB 基因表达降低,西药组 CREB、NGF、BDNF 基因表达均降低(图 3、图 4)。

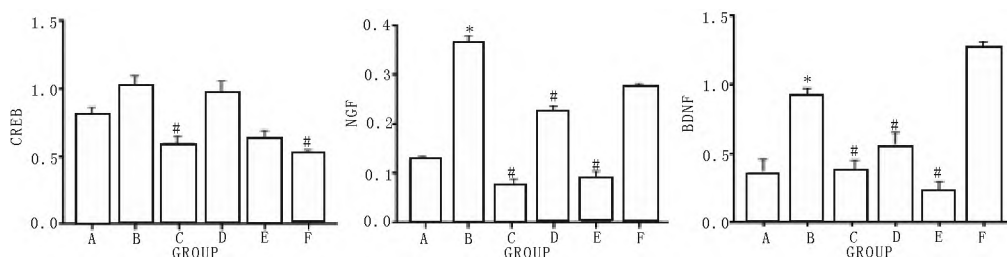
下丘脑组织中,与正常组比较,模型组 CREB、NGF 基因表达升高,BDNF 基因表达降低。药物干预后,疏肝健脾方低剂量组 CREB 基因表达升高,中剂量组 CREB、NGF 基因表达降低,高剂量组 CREB、NGF 基因表达降低,BDNF 基因表达升高,西药组 NGF 基因表达降低(图 3、图 5)。

垂体组织中,与正常组比较,模型组 BDNF 基因表达升高。药物干预后,疏肝健脾方低剂量组 NGF 基因表达升高,中剂量组

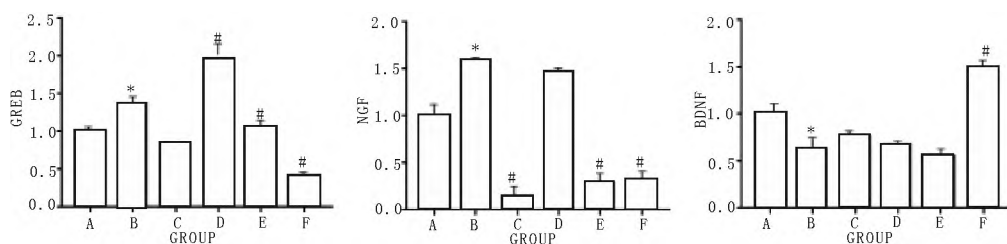
CREB、NGF 基因表达升高,高剂量组 BDNF 基因表达升高,西药组 BDNF 基因表达升高(图 3、图 6)。



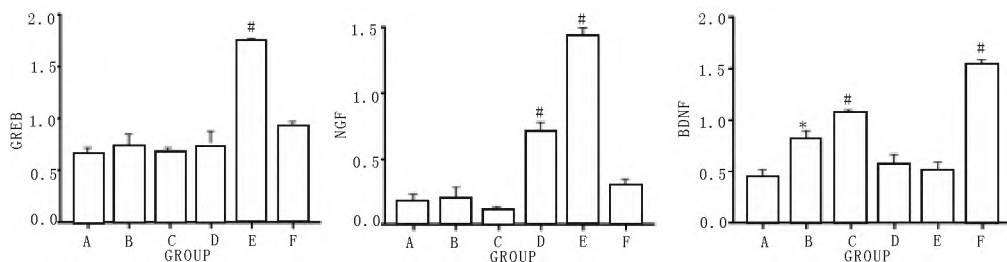
A: CREB 基因扩增曲线 B: NGF 基因扩增曲线 C: BDNF 基因扩增曲线 D: CREB 基因熔解曲线 E: NGF 基因熔解曲线 F: BDNF 基因熔解曲线  
图 3 大鼠结肠、下丘脑及垂体的 CREB、NGF、BDNF 基因样本扩增及熔解曲线图



A: 正常组 B: 模型组 C: 西药组 D: 低剂量组 E: 中剂量组 F: 高剂量组 与正常组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$   
图 4 大鼠结肠 CREB、NGF、BDNF 基因相对表达水平



A 正常组 B 模型组 C 西药组 D 低剂量组 E 中剂量组 F 高剂量组 与正常组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$   
图 5 大鼠下丘脑 CREB、NGF、BDNF 基因相对表达水平

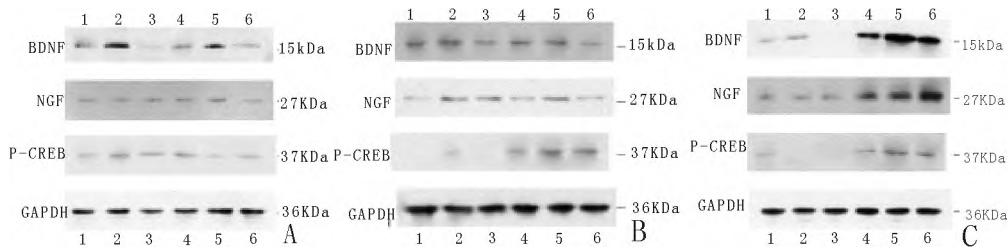


A: 正常组 B: 模型组 C: 西药组 D: 低剂量组 E: 中剂量组 F: 高剂量组与正常组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$   
图 6 大鼠垂体 CREB、NGF、BDNF 基因相对表达水平

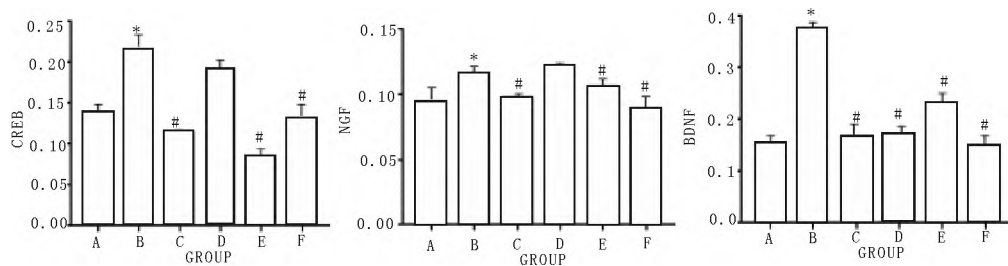
**3.4 WB 检测大鼠结肠、下丘脑及垂体 CREB、NGF、BDNF 蛋白** BDNF 蛋白表达降低,中剂量组、高剂量组及西药组 CREB、NGF、BDNF 蛋白表达均升高( $P < 0.05$ )。结肠组织中,与正常组比较,模型组大鼠 CREB、BDNF 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义(图 7A、7B)。下丘脑组织中,与正常组比较,模型组大鼠 CREB、BDNF 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义(图 7C、7D)。垂体组织中,与正常组比较,模型组大鼠 CREB、BDNF 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义(图 7E、7F)。药物干预后,低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠 CREB、NGF、BDNF 蛋白表达均升高( $P < 0.05$ )。结肠组织中,与正常组比较,模型组大鼠 CREB、BDNF 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义(图 8A、8B)。下丘脑组织中,与正常组比较,模型组大鼠 CREB、BDNF 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义(图 8C、8D)。垂体组织中,与正常组比较,模型组大鼠 CREB、BDNF 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义(图 8E、8F)。药物干预后,低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠 CREB、NGF、BDNF 蛋白表达均升高( $P < 0.05$ )。结肠组织中,与正常组比较,模型组大鼠 CREB、BDNF 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义(图 8A、8B)。

下丘脑组织中,与正常组比较,模型组大鼠 NGF 蛋白表达升高,药物干预后,低剂量组 NGF 蛋白表达降低,中剂量组 CREB 蛋白表达升高,高剂量组 CREB、BDNF 蛋白表达降低(图 7B、图 9)。

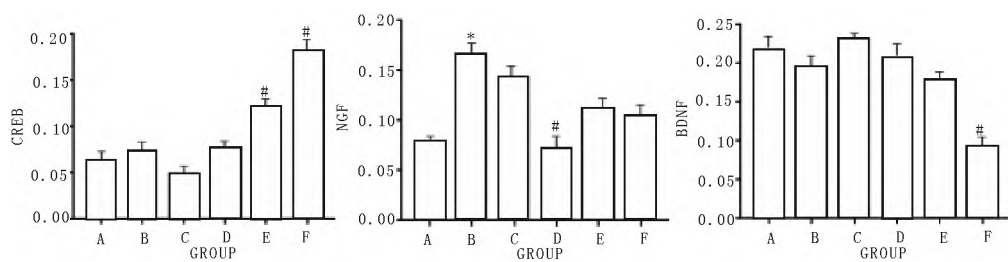
垂体组织中,与正常组比较,模型组大鼠 NGF、BDNF 蛋白表达升高,药物干预后,低剂量组 NGF 蛋白表达升高,中剂量组 NGF、BDNF 蛋白表达升高,高剂量组 CREB、NGF、BDNF 蛋白表达均升高,西药组 CREB、BDNF 蛋白表达升高(图 7C、图 10)。



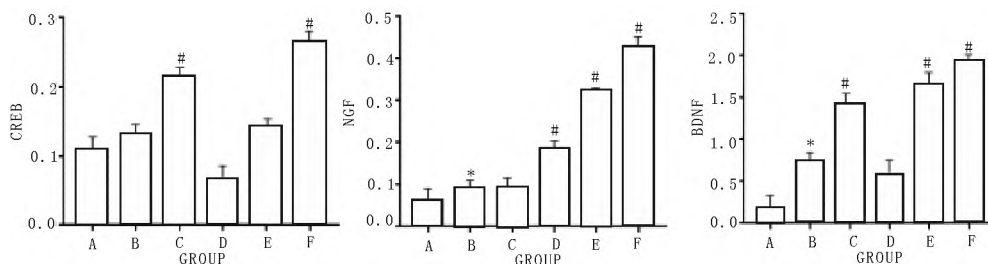
A: 大鼠结肠组织 CREB、NGF、BDNF 蛋白电泳图 B: 大鼠下丘脑 CREB、NGF、BDNF 蛋白电泳图 C: 大鼠垂体 CREB、NGF、BDNF 蛋白电泳图  
1. 正常组 2. 模型组 3. 西药组 4. 低剂量组 5. 中剂量组 6. 高剂量组  
图 7 大鼠结肠组织、下丘脑及垂体 CREB、NGF、BDNF 蛋白电泳图



A: 正常组 B: 模型组 C: 西药组 D: 低剂量组 E: 中剂量组 F: 高剂量组 与正常组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$   
图 8 大鼠回盲部组织 CREB、NGF、BDNF 相对表达量



A 正常组 B 模型组 C 西药组 D 低剂量组 E 中剂量组 F 高剂量组 与正常组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$   
图 9 大鼠下丘脑组织 CREB、NGF、BDNF 相对表达量



A: 正常组 B: 模型组 C: 西药组 D: 低剂量组 E: 中剂量组 F: 高剂量组 与正常组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$   
图 10 大鼠垂体组织 CREB、NGF、BDNF 相对表达量

#### 4 讨论

前期课题组在国家自然科学基金项目(81460724)、广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118212)资助下,证实外来伤害刺激通过 PKA 依赖 cAMP 通路,介导 TRPV1 磷酸化,促进非选择性阳离子

通道 TRPV1 开放后,刺激下游靶器官增加释放脑肽类物质 SP 及 CGRP,导致内脏敏感性增高是 IBS 的重要发病机制;疏肝健脾方可能通过正向调控 Capsaicin 激动的 TRPV1 电流,下调 P-TRPV1 表达,减少 SP 及 CGRP 释放,发挥防治 IBS 效用<sup>[3-6]</sup>。项目

组同时发现伤害性刺激→离子型和代谢型受体激活→Ca<sup>2+</sup>通道开放→细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度增加↑↑→激活 CaMK II 并 CaMKII 自磷酸化→作用于兴奋性谷氨酸受体→激活 cAMP 应答元件结合蛋白(CREB) / c-fos 信号通路→调节靶基因神经生长因子(NGF)及脑源性神经营养因子(BDNF)转录↑↑, BDNF 通过下调海马神经元及海马突触中的蛋白酶体活性, 维持突触内蛋白质平衡, 最终调节中枢神经系统突触递质的释放及突触可塑性, 导致痛觉的持续状态及痛觉过敏<sup>[7,8]</sup>。这一特点与 IBS 主要症状吻合, 也更好地诠释 IBS 患者为什么总是伴有精神神经症状, 但缺乏器质性改变, 因而归属于一种功能性胃肠疾病。

脑肠轴的作用是将大脑的情感中心(如大脑皮质和海马)与外周的肠道功能(如肠道运动和肠内分泌信号传导)联系起来, 实时动态监测肠道功能。精神心理应激与 IBS 发病密切相关。肠道运动和肠内分泌信号传导——脑肠肽, 由胃肠道细胞分泌, 起神经递质和激素双重作用。脑肠肽通过中枢神经系统(CNS)、肠神经系统(ENS)以及胃肠道效应细胞来维持中枢与肠道的动态平衡, 当平衡遭到破坏时, 则可诱发 IBS。Mondal AC 认为心理应激患者(自杀、抑郁和早期不良生活事件)海马和大脑前额叶皮层 BDNF 低表达<sup>[9]</sup>, Tural U 认为 PTSD(创伤应激综合征)患者海马 BDNF 高表达<sup>[10]</sup>。本研究应用辣素灌胃联合束缚应激构建肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠模型, 发现模型组大鼠下丘脑 BDNF 蛋白及基因较正常组减少, 差异无统计学意义; 模型组大鼠垂体组织 BDNF 蛋白较正常组增加( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。BDNF 在 IBS-D 模型大鼠各脑区含量不一致, 在脑肠互动的 2 条双向调节机制中, 疏肝健脾方作用机制可能更倾向于 HPA 轴。侧室注射 BDNF 或静脉注射 NGF 可增加 HPA 轴活性。外源性 BDNF 给药影响 CRH mRNA, 且与血浆 ACTH 和 CORT 浓度密切相关<sup>[11]</sup>。Wang R 在此基础上找出 BDNF, HPA 轴相互作用机制。外源性 BDNF 注射可增加下丘脑 NPW 和 CRH 的表达。神经肽 W(NPW) 是下丘脑的应激介质, NPW 作用于下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)激活 HPA 轴。更加有趣的是, NGF(而非 BDNF)诱导 PC12 细胞 NPW 的表达, 而 BDNF(而非 NGF)刺激下丘脑神经元 NPW 的 mRNA 表达。PC12 细胞只表达 NGF 受体 TrkA, 而不表达 BDNF 受体 TrkB; 而培养的下丘脑神经元表达 TrkB, 而缺乏 TrkA。神经营养因子(BDNF, NGF)通过 PI3K/Akt 途径调节神经细胞 NPW 的表达, 提示 BDNF, NGF 可能参与 HPA 轴的功能<sup>[12]</sup>。BDNF, NGF 各司其职基于 HPA 轴共同调节下丘脑神经肽的合成, 维持神经回路功能正常运行。基因敲除 TrkA 和 NGF 小鼠无法存活, 与基因敲除 BDNF 小鼠结果相似。目前 NGF 与 IBS-D 相关性临床证据非常有限, 但 NGF 可能在 IBS-D 病理生理过程中发挥潜在作用, 特别是在 VH(内脏高敏感性)和肠屏障功能障碍<sup>[12-14]</sup>。环磷酸腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(CREB)在神经元中起着分子开关的作用, 各种信号级联在丝氨酸 133(Ser133)磷酸化 CREB, 包括 CaMK II 和 IV、PI3K/Akt、PKA、PKC 和 ERK<sup>[15]</sup>。据报道 NGF 诱导 ERK 磷酸化, 触发 CREB 丝氨酸 133(Ser133)磷酸化, 将 CREB 结合蛋白(CBP)招募到 NGF 启动子区域激活 BDNF 转录<sup>[2]</sup>。CREB 基因敲除小鼠因严重发育缺陷无法存活。重度抑郁症和自杀患者海马 CREB 水平降低, 通信盒(CB)应激大鼠海马、前额叶皮质、杏仁中央核、伏隔核、中脑导水管周围灰质和腹侧被盖区等脑组织 BDNF 和 CREB 的 mRNA 水平显著降低<sup>[16]</sup>。越橘丸干预抑郁模型小鼠海马 BDNF 与 CREB 上调和 CREB 磷酸化在时间上是一致的, 阻断 PKA/CREB 信号可逆转 BDNF 表达和越橘丸的抗抑郁作用<sup>[17,18]</sup>。

痛泻要方介导 CRH-R2 调节肠上皮细胞的自噬参与维

持肠屏障完整性<sup>[19]</sup>。下丘脑室旁核接收来自胃肠伤害性信号, 释放脑促肾上腺皮质激素释放激素(脑 CRH), 脑 CRH 受体上调下丘脑垂体 BDNF、NGF、CREB 表达维持内脏内环境稳态。结肠粘膜 CRH 受体接收位于自主神经传导通路脑 CRH 介导结肠神经生长因子表达, 下调结肠粘膜 BDNF、NGF、CREB。反之, 结肠伤害性信号通过交感传入纤维向背根神经节发送信息, 结肠粘膜 CRH 受体介导结肠神经生长因子表达, 神经生长因子(BDNF、NGF、CREB)通过电压门控钠通道改变背根神经节电生理特性, 背根神经节在脊髓背角的板层形成突触, 向丘脑发送投射物, 丘脑依次投射到脑岛、前扣带回皮质、杏仁核、海马和下丘脑。下丘脑接收伤害性信号, 上调下丘脑神经生长因子(NGF、CREB)表达, 处理后将结果反馈给垂体。垂体接收下丘脑指示, 上调神经生长因子(BDNF、NGF、CREB), 胃肠道神经系统—微型脑, 通过自主神经系统接收来自中枢反馈信号, 肠道神经生长因子(BDNF、NGF、CREB)水平下调。

总的来说, 疏肝健脾方可能通过上调 IBS-D 大鼠下丘脑及垂体 NGF、CREB 水平, 下调结肠粘膜 BDNF、NGF、CREB 水平, 维持肠道稳态, 降低内脏敏感性, 从而发挥治疗 IBS-D 的效用。

## 参考文献:

- [1] Wiley JW, Higgins GA, Athey BD. Stress and glucocorticoid receptor transcriptional programming in time and space: Implications for the brain-gut axis[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2016, 28(1): 12.
- [2] Triaca V, Fico E, Sposato V, et al. hNGF Peptides Elicit the NGF-TrkA Signalling Pathway in Cholinergic Neurons and Retain Full Neurotrophic Activity in the DRG Assay [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 216.
- [3] 张涛, 方健松, 潘锋, 等. PKA/PKC 介导 TRPV1 敏化在肠易激综合征中的作用[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(2): 319.
- [4] 马媛萍, 黄晓燕, 陈远能, 等. PKA 依赖 cAMP 信号介导 SP 调节内脏敏感性及疏肝健脾方防治肠易激综合征研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(1): 180.
- [5] 方健松, 马媛萍, 刘畅, 等. PKA 调控 TRPV1 敏化介导 CGRP 表达探讨疏肝健脾方防治肠易激综合征研究[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(3): 601.
- [6] 张涛, 邱燕婷, 徐卓妮, 等. 疏肝健脾方对小鼠脊髓背根神经元 TRPV1 电流通道及 p-TRPV1、SP、CGRP 受体表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(2): 72.
- [7] Castro J, Harrington AM, Garcia-Caraballo S, et al.  $\alpha$ -Conotoxin Vc1.1 inhibits human dorsal root ganglion neuroexcitability and mouse colonic nociception via GABAB receptors [J]. *Gut*, 2017, 66(6): 1083.
- [8] Duzhyy DE, Viatchenko-Karpinski VY, Khomula EV, et al. Upregulation of T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels in Long-Term Diabetes Determines Increased Excitability of a Specific Type of Capsaicin-Insensitive DRG Neurons [J]. *Mol Pain*, 2015, 11: 29.
- [9] Mondal AC, Fatima M. Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: role of antidepressants treatment [J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(3): 283.
- [10] Tural U, Aker AT, Onder E, et al. Neurotrophic factors and hippocampal activity in PTSD [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197889.
- [11] Seki S, Sekiguchi M. Association Between Neurotrophic Factor Expression and Pain-Related Behavior Induced by Nucleus Pulposus Applied to Rat Nerve Root [J]. *Spine*, 2018, 43(1): E7.
- [12] Wang R, Yan F, Liao R, et al. Role of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in the regulation of Neuropeptide W in



- vitro and in vivo[J]. Mol Cell Endocrinol 2017 447: 71.
- [13] López - Pérez AE, Nurgali K, Abalo R. Painful neurotrophins and their role in visceral pain[J]. Behav Pharmacol 2018 29:120.
- [14] Coelho A, Oliveira R, Antunes - Lopes T, et al. Partners in Crime: NGF and BDNF in Visceral Dysfunction [J]. Curr Neuropharmacol, 2019 ,17( 11) : 1021.
- [15] Yan X, Liu J, Ye Z, et al. CaMKII - Mediated CREB Phosphorylation Is Involved in Ca<sup>2+</sup> - Induced BDNF mRNA Transcription and Neurite Outgrowth Promoted by Electrical Stimulation [J]. PloS One 2016 ,11 ( 9) : e0162784.
- [16] Li G, Wang Y, Yan M, et al. Time - dependent co - relation of BDNF and CREB mRNAs in adult rat brains following acute psychological stress in the communication box paradigm [J]. Neurosci Lett, 2016, 624: 34.
- [17] Zou Z, Chen Y, Shen Q, et al. Neural Plasticity Associated with Hippocampal PKA - CREB and NMDA Signaling Is Involved in the Antidepressant Effect of Repeated Low Dose of Yueju Pill on Chronic Mouse Model of Learned Helplessness [J]. Neural Plast, 2017, 2017: 9160515.
- [18] Xue W, Wang W, Gong T, et al. PKA - CREB - BDNF signaling regulated long lasting antidepressant activities of Yueju but not ketamine [J]. Sci Rep 2016 6: 26331.
- [19] Gong SS, Fan YH, Wang SY, et al. Mucosa repair mechanisms of Tong - Xie - Yao - Fang mediated by CRH - R2 in murine, dextran sulfate sodium - induced colitis [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24 ( 16) : 1766.

## 除湿通痹颗粒对尿酸钠诱导大鼠急性痛风性关节炎活性的影响研究

金文彬<sup>1,2</sup> 唐晓霞<sup>3</sup> 杨 唯<sup>1</sup> 管宴梅<sup>1</sup> 赵仁肖<sup>1</sup> 闫鸿丽<sup>1,2</sup>,  
柯 瑾<sup>1,2</sup> 侯安国<sup>1,2</sup> 陈凌云<sup>1,2</sup> 王 涛<sup>3\*</sup> 罗 文<sup>3\*</sup>

( 1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500;

2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 云南 昆明 650500;

3. 昆明市中医医院, 云南 昆明 650500)

**摘要:** 目的 研究除湿通痹颗粒对以尿酸钠(MSU)为诱导因素的急性痛风性关节炎模型大鼠右后足踝关节肿胀指数、炎症指数、关节功能障碍、炎症细胞因子以及踝关节滑膜组织切片的影响,探讨除湿通痹颗粒治疗急性痛风性关节炎的部分作用机制。方法 选用 Wistar 雄性大鼠 48 只,随机分成 3 组,包括生理盐水组(A)、模型组(B)、秋水仙碱组(C)、除湿通痹颗粒低(D)、中(E)、高(F)剂量组。各组给予相应药物灌胃 2 次/d,第 3 天灌胃 1.5h 后于大鼠右后足内踝的胫跗关节注射 MSU 晶体形成大鼠急性痛风性关节炎模型,并于 10 24,72h 分别观察测量大鼠右后足踝关节肿胀指数、炎症指数、关节功能障碍等;注射 MSU 3 天后,ELISA 法检测腹主动脉血清中大鼠白介素-4(IL-4)和白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )浓度,HE 染色法观察右后足踝关节滑膜组织切片的病理变化。结果 对比 A 组,B 组造模后 4,10 24,72 h 关节肿胀指数明显增加( $P < 0.05$ )。对比 B 组,C、E、F 组各时段关节肿胀指数显著减轻( $P < 0.05$ ),且 E、F 组较 D 组关节肿胀指数有降低趋势。与 B 组比较,C、D、E、F 组关节炎指数和功能障碍明显减轻。对比 B 组,C、D、E、F 组的 IL-1 $\beta$  的浓度明显减低。HE 染色显示模型组(B)大鼠踝关节滑膜具有明显的炎症症状,滑膜细胞具有一定的增生,伴炎细胞、小血管具有明显的浸润与增生,而 C、D、E、F 组上述病理改变减轻。结论 除湿通痹颗粒可明显缓解 MSU 导致的大鼠后足踝关节肿胀、红肿及功能障碍,降低 IL-1 $\beta$  的表达,缓解滑膜组织炎症病理组织切片变化。

**关键词:** 除湿通痹颗粒; 急性痛风性关节炎; 关节症状; 滑膜炎; 白细胞介素

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2022.02.16

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2022)02-0323-04

痛风性关节炎(acute gout arthritis,AGA)通常指尿酸钠结晶(MSU)在关节内沉淀引起的非特异性关节炎<sup>[1]</sup>,导致肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )<sup>[2]</sup>、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )<sup>[3]</sup>等炎症因

子水平显著升高,造成白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等快速增长,临床上病理表现为红肿、热痛等炎症反应<sup>[4]</sup>。大量研究证实多种细胞信号转导途径参与痛风性关节炎的发生与发展,包括 Toll 受体信号通路<sup>[5]</sup>、NLRP3 炎性体信号通路<sup>[6]</sup>、NLRP6 炎性体信号通路等<sup>[7]</sup>。通常采用 MSU 诱导 AGA 动物模型模拟人类 AGA 的发病机制<sup>[8]</sup>。除湿通痹方由牛膝、王不留行、延胡索、首乌藤、川芎、萆薢和地龙等中药组成,牛膝为本方君药,其主要成分为牛膝总皂苷,具有抗炎镇痛作用。研究显示,牛膝总皂苷可缓解痛风性关节炎急性期的症状,通过抑制 NALP3 炎性体及 caspase-1 的活化为其机制,从而减少炎症因子的活化,可一定程度上治疗大鼠急性痛风性关节炎<sup>[9]</sup>。萆薢总皂苷为萆薢的主要成分,其通过降低血清 IL-18、TNF- $\alpha$  和 L-1 $\beta$  等炎症因子水平为其机制,从而抑制 NALP3 炎性体的装配与活化,起到防治

收稿日期: 2021-08-25; 修订日期: 2022-02-01

基金项目: 云南省应用基础研究计划项目(201601CH00206);

云南省科技厅基础研究专项(202001AU070133);

云南省教育厅科学研究基金资助项目(2019J1057)

作者简介: 金文彬(1988-),男(汉族),湖南邵东人,云南中医药大学讲师,博士学位,主要从事新药设计与制剂研究工作。

\* 通讯作者简介: 王 涛(1984-),男(汉族),云南昆明人,昆明市中医医院主治医师,硕士学位,主要从事中西医结合骨伤科学研究工作。

\* 通讯作者简介: 罗 文(1987-),男(汉族),云南昆明人,昆明市中医医院医师,硕士学位,主要从事中西医结合胸外科学研究工作。