

脾气虚大鼠空肠组织 P 物质表达及四君子丸的干预作用

宋君¹,王艳杰^{2*},张林²,冯晓帆²

¹辽宁中医药大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室;²辽宁中医药大学基础医学院,沈阳 110847

摘要: 本文通过观察脾气虚模型大鼠及经四君子丸治疗后空肠组织中 P 物质的含量及其 mRNA 表达水平和小肠推进率的变化,探讨脾气虚状态下空肠运动功能的变化与机制。实验把 SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只随机平均分为 3 组:对照组、模型组和治疗组。造模成功后取材,用碳末推进法测定大鼠小肠推进率,ELISA 测定大鼠空肠组织 P 物质含量的变化,RT-PCR 测定大鼠空肠组织 P 物质的 mRNA 表达变化。实验测得模型组大鼠体重、进食量显著减少,小肠推进率明显降低,P 物质的含量及 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$);而治疗组大鼠体重、进食量显著增加,小肠推进率显著增加,P 物质的含量及 mRNA 表达水平明显增加($P < 0.05$)。实验表明脾气虚模型大鼠空肠组织中 P 物质的含量和 mRNA 表达水平降低,四君子丸对其具有调节作用。

关键词: 脾气虚;四君子丸;P 物质;空肠;小肠推进率

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.8.022

Expression of Substance P in Jejunum and the Effect of Sijunzi Pill on it in Spleen-qi Deficiency Rats

SONG Jun¹, WANG Yan-jie^{2*}, ZHANG Lin², FENG Xiao-fan²

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; ²Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: To explore the effect of Sijunzi pill (SJZP) on the expression of substance P (SP) in jejunum, the level of mRNA and intestinal propulsive rate in spleen-qi deficiency rats, 24 male spleen-qi deficiency SD rats were induced and randomly divided into the model group, SJZP group and the control group (8 per group). Carbon propelling was applied to observe the intestinal propulsion rate. Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) was applied to observe the SP in jejunum and the expression of mRNA level with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). In the SJZP treatment group, the SP and mRNA of spleen-qi deficiency rats were both increasing significantly ($P < 0.05$). The small intestinal propulsion rate in SJZP group was higher than that of the control group. Compared with the control group, the body weight, diet and drinking amount in spleen-qi deficiency group increased greatly ($P < 0.05$). The decrease of SP and mRNA in the mesenteric plexus of jejunum of rat model had some relationship with the spleen-qi deficiency. The regulation on SP and mRNA were the mechanisms of SJZP for spleen-qi deficiency.

Key words: spleen-qi deficiency; Sijunzi pill; substance P; jejunum; small intestinal propulsion rate

P 物质(Substance P, SP)是发现最早的肽类激素之一^[1],由 11 个氨基酸残基组成的,广泛分布于全身各器官^[2],分布于肠神经系统和整个胃肠道,肠道的肠肌间神经丛和粘膜下神经丛有致密的 SP 纤维网^[3]。P 物质作为兴奋性神经递质,能促进胃肠平滑肌和括约肌收缩,促进胃肠蠕动,从而参与胃

肠动力调节^[4];还有松弛食管下段括约肌、舒张血管、促进腺体分泌、刺激小肠和结肠黏膜分泌水和电解质作用^[5],以及与内脏感觉均有密切关系^[6]。

中国古典医学认为“脾为后天之本,气血生化之源”,因此,脾气与运化水谷的功能密切相关,而水谷之精微的吸收与输布功能离不开肠道。脾气虚的主要表现之一是小肠运动的异常,而小肠推进率是评价小肠动力的常用指标。P 物质作为大鼠空肠组织中的兴奋性神经递质,可能在脾气虚证的发生与发展过程中起着一定作用。四君子丸是治疗脾气

收稿日期:2016-03-25 接受日期:2016-06-15

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2013CB531702);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(LN.LJQ2014100)

* 通讯作者 Tel:86-015940157054; E-mail:15940157054@qq.com

虚证效果确切的基础方剂之一,具有益气健脾的功效。本实验建立了脾气虚大鼠模型,并检测脾气虚组及四君子丸治疗组大鼠小肠推进率(Small intestinal propulsion rates, SIPR)及空肠中 P 物质含量,探讨脾气虚时 P 物质的表达变化及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

雄性 SPF 级 SD 大鼠 24 只,购于本溪实验动物中心[许可证号:SCXK(辽)-2010-0001],饲养于辽宁中医药大学实验动物中心[许可证号:SYXK(辽)-2013-000-9]。体质量为 220 ± 10 g,随机分为 3 组,每组 8 只:空白对照组、脾气虚模型组和四君子丸治疗组。环境条件为温度 23 ± 1 °C,湿度 40%~60%。

1.2 药品、试剂与仪器

四君子组采用四君子丸(湖北广仁药业有限公司 国药准字 Z42021149);Trizol 试剂盒、RT-PCR 试剂盒、引物、琼脂糖、RNAisoTM Plus[宝生物工程(大连)有限公司];氯仿、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);EB、上样缓冲液(北京鼎国生物技术有限公司);电泳缓冲液、100bp DNA Ladder Marker(天泽基因工程有限公司);WD-9413B 凝胶成像分析仪(北京市六一仪器厂);Mycycler Thermal Cycler 梯度 PCR(Bio-Rad,美国);美国 BIO-RAD iMark 酶标仪(Bio-Rad,美国)。

1.3 脾气虚模型建立与评价

16 只大鼠随机分成 2 组,每组 8 只,分别脾气虚模型组和四君子丸治疗组。采用饮食不节与过度劳倦的方法建立脾气虚模型^[7]共 14 d,然后通过测定体重、饮食量、饮水量进行模型评价;在单日时可以自由摄食和饮水,双日时仅喂食白菜;每日强迫其在 35~37 °C 的温水中游泳,使其过度疲劳。脾气虚评价标准是:①消瘦:体重显著下降;②食欲不振:在代谢笼中观察到大鼠摄食和饮水的显著减少;③精神疲倦:将大鼠置于旷野地带 5 min,通过开放活动检测系统检测到其运动距离和站立次数显著减少;④缺乏力量:通过鼠类握力器检测到其前肢力量强度明显变弱。

1.4 药物制备及给药方法

四君子丸研磨成粉末,按照 1:1.5(W:V)采用蒸馏水配制悬浊液,备用。四君子组根据体表面积进行换算,采用四君子丸悬浊液按照 0.648 g/100 g

进行灌胃治疗;对照组和脾气虚组采用等量蒸馏水进行灌胃,灌胃治疗 14 d。

1.5 碳末推进法测定大鼠小肠推进率

测定前大鼠禁食禁水 24 h,用 10% 碳粉末悬浮液(5% 活性炭和 10% 阿拉伯胶)对大鼠进行灌胃处理(1 mL/100 g),30 min 后用 10% 水合氯醛(0.35 mL/100 g)进行麻醉。小心取出从幽门至回盲部的小肠,按照公式计算, $SIPR = \text{碳末推进距离} / \text{小肠长度} \times 100\%$ 。

1.6 ELISA 法测定大鼠空肠组织中 P 物质含量的变化

取 2 cm 空肠组织,用预冷生理盐水清洗后滤纸吸干,按照组织:生理盐水 = 1:9 的比例加入生理盐水制备组织匀浆,离心取上清,按照试剂盒说明书进行 ELISA 实验,用全自动酶标仪以 450 nm 波长测定各孔的光密度值,采用 CurveExpert1.3 进行标准曲线的绘制,并计算出对应的浓度值。

1.7 RT-PCR 法测定大鼠空肠组织中 P 物质的 mRNA 表达^[8]

按说明书要求提取总 RNA,微量紫外分光光度计检测 A260、A280 的数值,取 A260/A280 在 1.8~2.0 的样品进行后续实验,并计算总 RNA 浓度。引物序列:P 物质上游引物序列:5'-ATG AAA ATC CTC GTG GCG GT-3',下游引物序列:5'-CAG CAT CCC GTT TGC CCA TT-3',产物大小 219bp,退火温度 65 °C; β -actin 上游引物序列:5'-ACACGAAAG-CAATGCTATCACCTC-3',下游引物序列:5'-TGA-CAGCAGTCGTTGGAGCGA-3',产物大小 592 bp,退火温度 65 °C,30 个循环。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶分离检测,用凝胶成像分析仪拍照,利用 Gel-pro 32 软件,测量 P 物质和 β -actin 条带的平均光密度,并计算两者的比值,此比值能够反应出 P 物质在空肠中的 mRNA 表达水平。

1.8 统计方法

实验数据运用 SPSS13.0 处理,以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示结果,进行多组数据的方差分析,组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 实验结果

2.1 各组大鼠体重和小肠推进率的变化

与对照组比较,模型组大鼠体质量显著下降,小肠推进率显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组大鼠体质量显著增加,小肠推进率显著增加($P <$

0.01), 见表 1。

表 1 各组大鼠体重和小肠推进率的变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 The body weight and SIPR in different groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组 Group	体重 Weight (g)	小肠推进率 SIPR (%)
对照组 Control	317.01 ± 14.69	69.58 ± 2.54
模型组 Model	180.21 ± 9.90 **	43.50 ± 4.07 **
治疗组 SJZP	251.46 ± 7.25 ^{##}	55.96 ± 1.03 ^{##}

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

Notes: compared with the control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$.

2.2 各组大鼠空肠中 P 物质含量的变化

与对照组比较, 模型组大鼠空肠组织中 P 物质的含量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 治疗组大鼠空肠组织中 P 物质的含量显著增加 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 各组大鼠空肠组织中 P 物质含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 The expression of SP in different groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组 Group	空肠组织中 P 物质的含量 Content of SP in jejunum (ng/mL)
对照组 Control	3.61 ± 0.12
模型组 Model	2.53 ± 0.20 **
治疗组 SJZP	3.20 ± 0.04 ^{##}

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

Notes: compared with the control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$.

2.3 各组大鼠空肠组织中 P 物质的 mRNA 表达情况

与对照组比较, 模型组大鼠空肠组织中 P 物质的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 治疗组大鼠空肠组织中 P 物质的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 见图 1、2, 表 3。

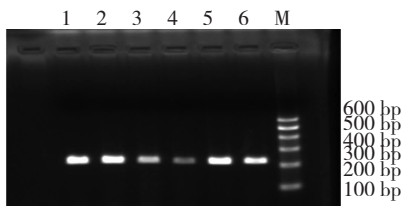


图 1 各组大鼠空肠中 P 物质扩增产物凝胶电泳图

Fig. 1 The expression of SP in the jejunum of the amplification product in gel electrophoresis

注:1-2:对照组;3-4:模型组;5-6:治疗组;M:100bp DNA Ladder Marker

Notes:1-2:control group;3-4:model group;5-6:SJZP group

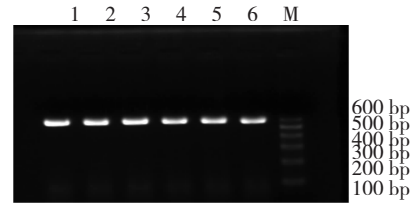


图 2 β -actin 扩增产物凝胶电泳图

Fig. 2 β -actin amplification product in gel electrophoresis

注:1-2:对照组;3-4:模型组;5-6:治疗组;M:100bp DNA Ladder Marker

Note:1-2:control group;3-4:model group;5-6:SJZP group

表 3 各组大鼠空肠组织中 P 物质的 mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 The expression of mRNA for SP in different groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组 Group	P 物质/(-actin) SP/(-actin)
对照组 Control	1.65 ± 0.05
模型组 Model	0.66 ± 0.05 **
治疗组 SJZP	1.10 ± 0.12 ^{##}

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

Notes: compared with the control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$.

3 讨论与结论

中医认为,脾的主要功能是运化,指脾将饮食水谷转化为水谷之精微并吸收,输布到全身各脏腑器官。汉代张仲景有言:“四季脾旺不受邪”。脾胃气虚,百病始生。“脾气虚”出自《内经》,是指脾气不足,失其健运所表现的证候,多因劳累过度,饮食不节,久病等原因耗伤脾气所致。脾气虚弱,则运化水谷、转输精微的功能减退,导致气血生化乏源;而脾的功能是否正常,又与肠道对水谷之精微能否正常吸收密切相关。

P 物质在消化道中主要存在于肠神经系统,是非肾上腺素能非胆碱能第三类神经——肽能神经的递质。研究证实循环中的 P 物质主要来源于小肠^[9],其中以空肠中含量较高^[10]。空肠属于小肠的一部分,始于十二指肠空肠曲,位于左上侧腹腔,因血管分布较多而微带红色,占小肠全长的 2/5,是食物消化吸收的主要场所。

如张忠兵等采用放免法测定 30 例脾虚泄泻患者的横结肠、回肠末端和乙状结肠组织中的 P 物质,发现脾虚泄泻组回肠末端 P 物质的含量较非泄

泻组和非脾虚泄泻组明显增加,提示 P 物质可能与脾虚泄泻的腹泻症状有关^[11]。林琳等用放射免疫法分别测定肠易激综合征患者组和对照组乙状结肠粘膜和血浆中 P 物质的含量,结果发现结肠黏膜中 P 物质的含量肠易激综合征患者组明显高于对照组,因此认为 P 物质含量的增加可兴奋平滑肌,加强结肠的推动作用,导致患者排便次数增加^[12]。这些都是对腹泻患者的 P 物质含量的研究,表明胃肠道中的 P 物质含量的增加会增强胃肠蠕动功能。

另有研究表明 P 物质作对胃肠道的兴奋作用主要表现为对胃肠环行肌和纵行肌具有双重收缩效应,包括直接的短时作用和长时作用。应激组小鼠小肠推进率与小肠组织 P 物质含量呈显著正相关,提示小肠组织中 P 物质含量下降可能是应激小鼠小肠推进运动延缓的因素之一^[13]。任平等对脾气虚证患者胃肠运动的研究表明,脾气虚证患者的小肠运动功能减退^[14]。所以,P 物质作为大鼠空肠组织中能够促进胃肠蠕动的兴奋性神经递质,也在脾气虚证的肠蠕动异常中起着一定作用。

四君子丸的主要成分为党参、白术、茯苓、炙甘草,它具有益气健脾的功效,能够调节胃肠运动功能,它既能抑制胃肠推进运动,减轻腹泻;又能使运动降低的小肠恢复正常。

本实验在成功复制了以饮食失节加劳倦为主要表现的脾气虚大鼠模型的基础上,测定大鼠空肠组织中 P 物质的含量及其 mRNA 表达变化。与对照组比较,模型组大鼠 P 物质的含量及 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组大鼠 P 物质的含量及 mRNA 表达水平明显增加($P < 0.01$),提示脾气虚模型大鼠空肠组织中 P 物质的含量和 mRNA 表达水平降低,四君子丸能使大鼠小肠推进率显著增加($P < 0.01$),同时 P 物质的含量和 mRNA 表达水平也相应增加。实验证明了脾气虚大鼠空肠 P 物质含量降低,是小肠运动功能降低的原因之一,中药方剂四君子丸可能通过增加体内 P 物质的含量及 mRNA 的表达来改善小肠运动功能。

脾气虚证的胃肠道功能障碍,与胃肠道的多种胃肠激素分泌障碍及神经肌肉调控系统异常有关系^[15],已经有研究表明脾气虚证小肠运动减弱与 M2、M3 型胆碱能受体表达异常有关^[16]。所以,对于脾气虚证的小肠运动功能减弱的原因还需要进一步的探索及研究。

参考文献

- 1 Liu HH(刘慧慧). 眼针介导中枢 5-HT, VIP 递质途径对肝郁脾虚型 IBS 大鼠结肠 AQP8 表达的影响. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine(辽宁中医药大学), PhD. 2013.
- 2 Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev*, 1983, 35: 85-141.
- 3 Baker DE. Rationale for using serotonergic agents to treat irritable bowel syndrome. *Am J Health Syst Pharm*, 2005, 62: 700-711.
- 4 Wang WF(王巍峰), Yang YS(杨云生), Sun G(孙刚), et al. Change of substance P containing neural pathway in rat model of irritable bowe-syndrome. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志), 2005, 13: 214-218.
- 5 Mantyh PW. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *Clin Psychiatry*, 2002, 63(1): 6-10.
- 6 Peng YJ(彭延娟), Peng C(彭成). 肝郁脾虚证动物模型的研究进展. *Labor Animal Sci Manage* (实验动物科学与管理), 2004, 21(1): 32-34.
- 7 Liu DX(刘旭东), Liu WJ(刘文俊), Sun DY(孙大宇), et al. Objective evaluation study of physical and metal fatigue in rats with spleen qi deficiency syndrome. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2015, 30: 699-701.
- 8 Yu TM(于挺敏), Yao G(姚刚). Development of real-time PCR assay for detection and quantitation of substance P mRNA in rats using SYBR green I. *J Jilin Univ, Med Ed* (吉林大学学报,医学版), 2008, 34: 1086-1088.
- 9 Li G(李刚). Relationship: spleen-asthenia syndrome with the function of hypothalamus-pituitary-thyroid-thymus axis. Xi'an: The Fourth Military Medical University(第四军医大学), MSc. 2001.
- 10 Maake C, Kloas W, Szendefi M, et al. Neurohormonal peptides, serotonin, and nitric oxide synthase in the enteric nervous system and endocrine cells of the gastrointestinal tract of neonatal and thyroid hormone-treated axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cell Tissue Res*, 1999, 297: 91-101.
- 11 Zhang ZB(张忠兵), Xia T(夏天), Deng JL(邓敬兰), et al. A preliminary study on SP and VIP contents in intestinal mucosa of chronic diarrhea with splenic weakness. *Chin J Integr Tradit West Med* (中西医结合杂志), 1991, 11: 144-146.
- 12 lin L(林琳), Zhao ZQ(赵志泉), Yan Y(阎彦), et al. Research on the correlation between irritable bowel syndrome and polypeptide hormones of stomach and intestine. *Chin J Digest* (中华消化杂志), 2003, 23: 501-502.