

文章编号:1001-6880(2016)11-1802-04

小剂量辣椒素对慢性应激大鼠胃动力的影响及机制研究

王 娥,史孝敏,彭 燕*

西南医科大学附属医院消化内科,泸州 646000

摘要:通过检测不同小剂量辣椒素(Cap)对慢性应激大鼠模型(CUMS)胃排空率、胃窦和脑组织内辣椒素受体(TRPV1)、神经降压素(NT)的变化,探讨Cap对大鼠胃动力的作用及机制。建立CUMS大鼠诱导胃动力障碍模型,对造模大鼠给予三种不同剂量Cap 0.04、0.4、4 mg/kg 处理 2 w,采用胃酚红排空率检测各组大鼠胃动力的变化情况,并用ELISA法测定胃窦、脑组织中TRPV1、NT表达。结果显示模型组大鼠胃酚红排空率显著低于正常组,三种剂量Cap干预后CUMS大鼠胃酚红排空率均显著高于模型对照组($P < 0.05$),且随着Cap剂量的增加,胃酚红排空率反而降低。同时在Cap干预后胃窦及脑组织内TRPV1、NT的表达随着Cap剂量的增加而增加。可见3种小剂量的Cap可改善CUMS大鼠胃排空障碍,以0.04 mg/kg组效果最佳。实验结果表明小剂量Cap可改善CUMS大鼠胃排空障碍,其作用机制可能与胃及脑组织内TRPV1、NT的表达有关。

关键词:辣椒素;胃动力;TRPV1;NT

中图分类号:R573.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.021

Effect and Mechanism of Low Doses of Capsaicin on Gastric Motility of Rat with Chronic Stress

WANG Lv, SHI Xiao-min, PENG Yan*

The Affiliated Hospital of Southwest Medical University Gastroenterology, Luzhou 646000, China

Abstract: To study the effect of Capsaicin (Cap) with different low dosages on the gastric motility, transient receptor potential vanilloid1 (TRPV1) and neuropeptides (NT) in gastric antrum and brain tissue of rat with chronic stress (CUMS) and to explore its mechanism. The experimental rat model of gastric motility disorders was replicated by chronic unpredictable mild stress (CUMS). The CUMS model rats were treated with different low dosages of Cap 0.04 mg/kg, 0.4 mg/kg, 4 mg/kg within two weeks. The gastric emptying rate of phenol red was used to reflect the gastric motility. The TRPV1 and NT content in gastric antrum and brain were measured by ELISA. The results showed that the gastric emptying rate of phenol red of CUMS model group was significantly lower than that of normal group. And after treating with different dosages of Cap, the gastric emptying rate of phenol red of each group were higher than that of CUMS model group ($P < 0.05$). Moreover, with the increasing doses of Cap, the gastric emptying rate decreased. In addition, the increased expression of TRPV1 and NT were depended on the dosage of Cap. It can clearly be seen that the three doses of Cap showed an improve effect on the gastric motility disorders rats with CUMS, especially the 0.04 mg/kg dosage group. These results demonstrated that the low dosage of Cap might have an improve effect on the gastric motility disorders rats with CUMS, and one of the mechanisms was that Cap can regulate the expressions of TRPV1 and NT.

Key words: Capsaicin; gastric motility; TRPV1; NT

功能性消化不良(Functional dyspepsia, FD)的发病与社会应激、情绪、精神因素密切相关,其发病机制复杂,胃肠道动力障碍、内脏高敏感、脑-肠轴调节功能异常以及精神心理障碍等多因素参与其发病^[1]。研究发现辣椒素(Capsaicin, Cap)通过作用

于胃肠道辣椒素受体(transient receptor potential vanilloid1, TRPV1),影响胃肠道的运动及感觉^[2,3]。本研究引发慢性应激动物模型,通过给予不同剂量的Cap,观察其对大鼠胃排空功能的变化以及胃窦和脑组织TRPV1、神经降压素(Neurotensin, NT)表达的影响,探讨Cap对胃动力的影响及其作用机制,为Cap治疗消化不良的临床应用及开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量(250 ± 10)g, 由西南医科大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号: SYXK(川)2013-181]。

1.1.2 实验试剂及仪器

98.37% 辣椒素(成都曼斯特生物科技有限公司), 批号 MUST-15041710。吐温 80(成都市科龙化工试剂厂)。大鼠 TRPV1 Elisa 试剂盒、大鼠 NT Elisa 试剂盒(北京诚林生物科技有限公司)。兔抗大鼠 TRPV1 多克隆抗体、兔抗大鼠 NT 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、微量移液器(德国 Eppendorf 公司)、低温高速离心机(美国 Thermo 公司)、紫外分光光度仪(美国 Thermo 公司)、多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 Cap 溶液的配制

精确称取 98.37% 的 Cap 粉末 101.66 mg(含 Cap100 mg)、10.17 mg(含 Cap10 mg)、1.02 mg(含 Cap1 mg), 用 1 mL 75% 酒精完全溶解后, 分别加入含 1 mL 吐温 80 的生理盐水 98 mL 中混匀后, 配成浓度为 1、0.1、0.01 mg/mL 的 Cap 制剂。对照溶剂制剂: 1 mL 75% 酒精、1 mL 吐温 80 加入 98 mL 生理盐水中混匀配成溶剂。

1.2.2 分组及造模

所有大鼠适应性喂养 1 w, 随机抽取 10 只作为 A 组(正常组), 其余大鼠开始采用慢性应激(Chronic unpredictable mild stress, CUMS)^[4] 造模, 选取多种刺激因素对大鼠进行干预, 包括禁水 24 h、禁食 24 h、夹尾 1 h、水平摇晃 15 min、冰水游泳 5 min、热水游泳 5 min、转换昼夜节律、制动 30 min、潮湿垫料 24 h。每天随机安排 1 种刺激, 相邻 2 d 的刺激不重复, 每种刺激重复 2~3 次, 连续 21 d。采用检测胃酚红排空率的方法, 判断造模是否成功。造模成功后, 将 CUMS 组分为 B 组(空白对照组)、C 组(溶剂对照组)、D1 组(Cap 0.04 mg/kg)、D2 组(Cap 0.4 mg/kg)、D3 组(Cap 4 mg/kg), 每组 10 只。

1.2.3 Cap 干预方法

于每日晨 9 点开始给予各组大鼠不同溶液灌胃, A 组无处理, B 组给予蒸馏水, C 组给予对照溶

剂制剂, D1 组 Cap 0.04 mg/kg, D2 组 Cap 0.4 mg/kg、D3 组 Cap 4 mg/kg, 给药后所有大鼠常规喂养, 连续给药 2 w。

1.2.4 获取标本

给药 2 w 后, 所有大鼠禁食 24 h, 每只大鼠给予 50 mg/dL 酚红 2 mL 灌胃, 30 min 后给予 3% 戊巴比妥钠(1 mL/kg)腹腔注射, 打开腹腔, 结扎贲门和幽门, 取出整个鼠胃蒸馏水冲洗定容后, 取一半胃窦组织-20 ℃冻存, 进行 Elisa 检测 TRPV1、NT 的表达。各组随机选取 5 只大鼠直接断头取脑, 将脑组织置于-20 ℃冻存用于 Elisa 检测。

1.2.5 大鼠胃酚红排空的检测

以胃内酚红残余量来反映胃排空速率。取出整个胃后, 沿胃大弯切开, 以蒸馏水冲洗胃内容物, 定容 20 mL。加入 20 mL 0.5 mol/L NaOH 搅拌混匀, 静置 1 h。取 5 mL 上清液, 加入 0.5 mL 20% 的三氯乙酸, 3500 rpm 离心 10 min。取上清液, 用分光光度计测在 560 nm 波长下待测液的吸光度值, 为实测酚红吸光度。另取 2 mL 酚红溶液, 加入 18 mL 蒸馏水、20 mL 0.5 mol/L 的 NaOH、4 mL 20% 的三氯乙酸搅拌混匀, 在 560 nm 波长下测标准液的吸光度值, 为标准酚红吸光度。大鼠的胃酚红排空率 = (1 - 实测酚红吸光度 / 标准酚红吸光度) × 100%。

1.2.6 胃窦、脑组织 Elisa 法测定 TRPV1、NT 含量

取出冻存的组织, 制备成匀浆, 取上清液, 依照各指标 Elisa 试剂盒说明进行。

1.3 统计学处理

用 SPSS 17.0 软件统计资料, 以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 模型验证

2.1.1 一般情况

造模时间为 21 d, 造模完成后, 与正常组相比, 模型组大鼠精神状态较差, 消瘦萎靡, 倦怠懒动, 毛发污浊, 进食进水量减少, 大便干结量少。

2.1.2 大鼠胃酚红排空率

正常组、模型组大鼠胃酚红排空率分别为: 80.36% ± 3.27%, 65.83% ± 3.90%, 模型组胃酚红排空率显著低于正常组($P < 0.05$), 造模成功。

2.2 Cap 干预后

2.2.1 一般情况

造模完成后,与 A 组相比,B、C 组大鼠精神状态较差,消瘦萎靡,倦怠懒动,毛发污浊,进食进水量减少,大便干结量少。给予不同剂量的 Cap 灌胃处理后,大鼠上述情况有所好转。

2.2.2 不同剂量 Cap 对胃酚红排空率的影响

以胃内酚红残余量来反映胃排空速率,A 组 $78.61\% \pm 4.04\%$,B 组 $67.14\% \pm 3.44\%$,C 组 $66.95\% \pm 3.93\%$,D1 组 $92.68\% \pm 2.31\%$,D2 组 $86.24\% \pm 2.75\%$,D3 组 $79.53\% \pm 2.24\%$ 。采用单因素方差分析 LSD 法进行两两比较显示,B、C 组胃酚红排空率显著低于 A 组($P < 0.05$),说明造模成功,而 D 组的胃酚红排空率明显高于 BC 组($P < 0.05$),D1 组胃酚红排空率明显高于 D2 组($P < 0.05$),D2 组胃酚红排空率明显高于 D3 组($P <$

0.05),且 D1、D2 组胃酚红排空率显著高于 A 组,而 D3 组与 A 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

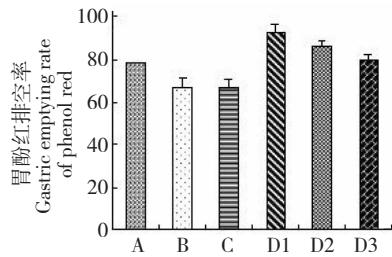


图 1 不同剂量 Cap 对胃酚红排空率的影响

Fig. 1 Effects of different doses of Cap on gastric emptying rate of phenol red

2.2.3 胃窦组织及脑组织 TRPV1、NT 的表达情况

Elisa 法检测胃窦及脑组织内 TRPV1、NT 的含量,结果见表 1。

表 1 ELISA 法检测胃窦、下丘脑组织内 TRPV1、NT 表达的含量($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The content of TRPV1, NT expression within gastric antrum, hypothalamus by ELISA ($\bar{x} \pm s$)

分组 Group		TRPV1 (pg/mL)		NT (pg/mL)	
		胃窦 Gastric antrum (n = 10)	下丘脑 Hypothalamus (n = 5)	胃窦 Gastric antrum (n = 10)	下丘脑 Hypothalamus (n = 5)
正常组 Normal	A	59.42 ± 7.05^a	64.20 ± 6.14^a	82.08 ± 8.09^a	91.09 ± 6.28^a
空白对照组 Blank control	B	273.06 ± 13.98^b	284.50 ± 5.45^b	243.80 ± 6.44^b	262.89 ± 6.37^b
溶剂对照组 Solvent control	C	271.57 ± 11.59^b	285.71 ± 8.48^b	251.41 ± 7.33^b	264.68 ± 7.38^b
Cap 0.04 mg/kg	D1	73.89 ± 6.53^c	78.52 ± 6.31^c	107.93 ± 8.43^c	111.38 ± 2.94^c
Cap 0.4 mg/kg	D2	99.50 ± 5.94^d	108.21 ± 4.27^d	136.13 ± 7.73^d	146.48 ± 4.19^d
Cap 4 mg/kg	D3	130.44 ± 7.63^e	132.26 ± 4.19^e	174.40 ± 7.04^e	190.67 ± 3.75^e

注:同列数据肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Values with different small letter in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

由于人们生活中各方面竞争压力的增加,致使心理和环境两大应激因素成为 FGIDS 的主要病因。而胃动力障碍动物模型的造模方法较多,如糖尿病胃轻瘫模型、肢体缺血再灌注损伤法、硫酸阿托品腹腔注射法、左旋精氨酸腹腔注射法,这些均属于侵袭性方法,造模过程中容易造成动物死亡。同时不能较好模拟心理因素在胃肠动力障碍形成中的作用。而 CUMS 模型采用各种不同的刺激因素使大鼠长时间处于应激状态,能较好模拟环境、心理因素在胃肠动力障碍形成中的作用,而广泛用于国内外关于功能性胃肠病的各项研究之中^[5,6]。

Cap 对胃肠道动力的影响一直存在争议,部分学者认为其能促进胃肠动力,Zittel 等报道 Cap 可以

增加术后胃肠动力,减少肠梗阻的发生,提高术后治愈率^[7];Debreceni 等检测健康人的胃排空时间时发现 0.4 mg 的 Cap 一次口服可显著增加胃排空^[8];Holzer 等报道 Cap 在 500 nM 时可诱导大鼠胃体收缩^[9]。部分学者认为,其对胃肠动力产生抑制作用,有研究显示经十二指肠分别灌注不同剂量的 Cap(1 ~ 10 mg)能够抑制狗胃的移行肌电复合波^[10],经回肠灌注 Cap 5 ~ 10 mg,亦能抑制狗的餐后胃肠收缩^[11]。然而,还有部分学者认为 Cap 对胃肠动力具有双重作用,小剂量 Cap 对胃动力产生促进作用,而大剂量的 Cap 则产生抑制,其产生作用的不同可能与 Cap 干预的时间、剂量等有关。本研究采用三种不同小剂量 Cap 对胃动力障碍模型——CUMS 大鼠进行干预,结果显示,三种小剂量的 Cap 均能明显改善 CUMS 大鼠胃动力障碍,其中以最小

剂量 Cap 0.04 mg/kg 效果最好,且随着 Cap 剂量的增加,其改善胃酚红排空率的作用减弱,而 Cap 4 mg/kg 干预后测得的胃酚红排空率显著高于胃动力障碍的 CUMS 大鼠,且接近于正常喂养大鼠。

然而 Cap 影响胃肠动力的机制复杂,至今尚不完全清楚,体液因素以及神经网络调节系统可能共同参与 Cap 对胃肠动力的调节。有研究显示 Cap 激活胃肠道的 TRPV1 后钙离子通道开放,引起神经元及其纤维释放神经递质如 P 物质 (Substance-P, SP)、胆囊收缩素、神经激肽 A、降钙素基因相关肽 (Calcitonin gene related peptide, CGRP)、血管活性肠肽 (Vasoactive intestinal peptide, VIP) 和兴奋性氨基酸(如天门冬氨酸)等,从而调节胃肠动力^[12]。脑肠肽是一类具有激素和神经递质双重功能的小分子多肽,其中 NT 是广泛分布于脑和胃肠道中的脑肠肽。其在中枢神经系统主要分布于下丘脑和基底前脑,在丘脑和大脑皮质分布较少^[13]。而在胃肠道中,其主要分布于空回肠,其次为胃、十二指肠,主要参与抑制胃肠道的机械运动以及胃酸分泌,同时还能通过促进前列腺素的合成发挥保护胃肠道黏膜的作用。本研究检测 TRPV1、NT 的表达,结果显示 Cap 干预后胃窦及脑组织内的 TRPV1、NT 的表达均显著低于模型组,但显著高于 A 组。且随着 Cap 剂量的增加,TRPV1、NT 的表达以剂量依赖性的方式增加。据此我们推论,模型组胃排空率的降低,可能与慢性应激影响胃、及下丘脑内 TRPV1 及 NT 的表达有关,而 Cap 可能对 TRPV1、NT 的表达有一定的影响。

综上所述,本实验研究发现 CUMS 大鼠在摄入三种小剂量 Cap 2 周后可改善其胃动力障碍,这可能与 Cap 调节 TRPV1、NT 的表达有关,为临床胃动力障碍的治疗提供方向,但其干预的剂量、时间以及 Cap 改善胃动力的机制尚不确切,仍有待进一步研究。

参考文献

- Song ZQ(宋志强),Ke MY(柯美云),Wang ZF(王智凤),et al. Relationship between overlapping symptoms and psycho-mental factors in patients with functional dyspepsia. *Chin J Digest* (中华消化杂志),2008,28:468-471.
- Mozsik G. Capsaicin as new orally applicable gastroprotective and therapeutic drug alone or in combination with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in healthy human subjects and in patients. *Prog Drug Res*,2014,68:209-258.
- Mozsik G,Szolesanyi J,Domotor A. Capsaicin research as a new tool to approach of the human gastrointestinal physiology, pathology and pharmacology. *Inflammopharmacology*,2007,15:232-245.
- Jin GL(金光亮),Nan R(南睿),Guo XZ(郭霞珍),et al. Establishment of the Rat Model of Liver-Depression Syndrome by Chronic Stress. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报),2003,26:18-21.
- Nassar NN,Schaalan MF,Zaki HF,et al. Octreotide ameliorates gastric lesions in chronically mild stressed rats. *World J Gastroenterol*,2011,17:1135-1142.
- Deng X(邓雪),Ren L(任路),Li J(李静),et al. Effect of electroacupuncture stimulation of "Ganshu" (BL 18) on locomotor,gastric mucosal and hypothalamic SP immunoactivity and hippocampal 5-HT content in rats with depression and gastric ulcer. *Acupuncture Res* (针刺研究),2014,39:124-129.
- Zittel TT,Meile T,Huge A,et al. Preoperative intraluminal application of Capsaicin increases postoperative gastric and colonic motility in rats. *J Gastrointest Surg*,2001,5:503-513.
- Debrezeni A,Abdel-Salam OM,Figler M,et al. Capsaicin increase gastric emptying rate in healthy human subjects measured by ¹³C-labeled octanoic acid breath test. *J Physiol Paris*,1999,93:455-460.
- Holzer-Petsche U,Seitz H,Lembeck F. Effect of capsaicin on gastric corpus smooth muscle of the rat *in vitro*. *Eur J Pharmacol*,1989,162:29-36.
- Shibata C,Naito H,Ueno T,et al. Intraduodenal Capsaicin inhibits gastric migrating motor complex via an extrinsic neural reflex in conscious dogs. *Neurogastroenterol Motil*,2002,14:543-551.
- Shibata C,Jin XL,Naito H,et al. Intraileal Capsaicin inhibits gastrointestinal contractions via a neural reflex in conscious dogs. *Gastroenterology*,2002,123:1904-1911.
- Holzer P,Painsipp E,Schuligoi R. Differential effects of intragastric acid and capsaicin on gastric emptying and afferent input to the rat spinal cord and brainstem. *BMC Neurosci*,2005,6:60.
- Geisler S,Berod A,Zahm DS,et al. Brain neuropeptides, psychostimulants, and stress--emphasis on neuroanatomical substrates. *Peptides*,2006,27:2364-2384.