

温肾健脾法对腹泻型肠易激综合征大鼠血清 T 细胞亚群表达的影响

苏晓兰¹ 魏茹涵² 魏 玮¹ 张 静³ 白亦冰³ 史海霞¹

摘要 目的 观察温肾健脾法对腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)大鼠血清 T 细胞亚群 CD45⁺%、CD3⁺% 及 CD4⁺/CD8⁺ 表达的影响。方法 参照 AL-Chaer 造模方法联合夹尾及番泻叶灌胃制备 IBS-D 大鼠模型,造模后 30 只 SD 大鼠按随机数字表法分为模型组、四神丸方组及温肾健脾方高、中、低剂量组,每组 6 只,同时设正常组 SD 大鼠 6 只。温肾健脾方高、中、低剂量组分别给予温肾健脾方免煎剂 3.100、1.550、0.775 g/(kg·d)灌胃治疗,四神丸方组给予四神丸方免煎剂 0.736 g/(kg·d)灌胃,同时正常组和模型组分别给予等体积生理盐水灌胃,持续灌胃 2 周。观察各组大鼠一般情况、血清 T 细胞亚群 CD45⁺%、CD3⁺% 及 CD4⁺/CD8⁺ 表达情况。结果 与正常组比较,模型组大鼠血清中 CD45⁺ 及 CD3⁺ 均升高,CD4⁺/CD8⁺ 值降低,差异均有统计学意义(P<0.05)。与模型组比较,温肾健脾方高、中、低剂量组及四神丸方组大鼠血清中 CD45⁺ 及 CD3⁺ 均降低,CD4⁺/CD8⁺ 值升高,差异均有统计学意义(P<0.05);与四神丸方组比较,除温肾健脾方低剂量组 CD45⁺ 外,其他各指标差异均有统计学意义(P<0.05);与温肾健脾方低剂量组比较,温肾健脾方高、中剂量组及四神丸方组大鼠血清中 CD3⁺ 均降低,四神丸方组及温肾健脾方高剂量组 CD4⁺/CD8⁺ 值升高,差异均有统计学意义(P<0.05)。结论 温肾健脾方对 IBS-D 大鼠有较好治疗作用,而温肾健脾法治疗 IBS-D 其机制可能是通过调控血清 T 细胞亚群 CD45⁺%、CD3⁺% 及 CD4⁺/CD8⁺ 比值而起到调节免疫的作用。

关键词 腹泻型肠易激综合征;中医药疗法;温肾健脾法;T 细胞亚群

Effect of Shen Warming Pi Strengthening Method on the Expression of Serum T Cell Subsets in IBS-D Rats SU Xiao-lan¹, WEI Ru-han², WEI Wei¹, ZHANG Jing³, Bai Yi-bing³, and SHI Hai-xia¹

1 Department of Gastroenterology, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100102), China; 2 University of Toronto, 27 King's College Circle, Toronto, Ontario M5S 1A1, Canada; 3 Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100050), China

ABSTRACT Objective To observe the effect of Shen warming Pi strengthening method on expressions of serum T cell subsets (CD45⁺%, CD3⁺%, and CD4⁺/CD8⁺) in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) rats. Methods An IBS-D rat model was established referring to AL-Chaer's modeling method combined with tail clamp and intragastric administration of sanna leaf. After modeling 30 SD rats were randomly divided into 6 groups according to random digit table, i. e., the model group, the high, middle, low dose Wenshen Jianpi Recipe (WJR) groups, and the Sishen Pill control group, 6 in each group. A normal control group consisting of 6 SD rats were also set up. Rats in high, middle, low dose WJR groups were administered by gastrogavage with boil-free WJR at the daily dose of 3.100, 1.550, 0.775 g/kg, respectively. Rats in the Sishen Pill control group were administered by gastrogavage with boil-free Sishen Pill at the daily dose of 0.736 g/kg. Equal volume of normal saline was given by gastrogavage to rats in the model group and the normal control group. All medica-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072800, No. 81273746);国家自然科学基金青年基金项目(No. 814033389)

作者单位:1. 中国中医科学院望京医院脾胃病科(北京 100102); 2. University of Toronto, Ontario M5S 1A1(Canada); 3. 北京市宣武中医医院脾胃病科(北京 100050)

通讯作者:魏 玮, Tel: 010-84739761, E-mail: sxxy@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.04.0457

tion lasted for 2 successive weeks. Rats' general state, expressions of T cell subsets (CD45⁺%, CD3⁺%, and CD4⁺/CD8⁺) changes were observed. Results Compared with the normal control group, expressions of CD45⁺% and CD3⁺% increased, but CD4⁺/CD8⁺ decreased with statistical difference (P < 0.05). Compared with the model group, expressions of CD45⁺% and CD3⁺% decreased, but CD4⁺/CD8⁺ increased with statistical difference in high, middle, low dose WJR groups, and the Sishen Pill control group (P < 0.05). Compared with the Sishen Pill control group, there was statistical difference in all indices except CD45⁺ value in the low dose SWPSM group (P < 0.05). Compared with the low dose WJR group, the expression of CD3⁺% decreased in high and middle dose WJR groups, and the Sishen Pill control group; CD4⁺/CD8⁺ increased in the Sishen Pill control group and the high dose SWPSM group (all P < 0.05). Conclusions WJR showed better treatment effect. The mechanism of Shen warming Pi strengthening method might be achieved by regulating expressions of CD45⁺% and CD3⁺%, and CD4⁺/CD8⁺ ratios.

KEYWORDS diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Chinese medical therapy; Shen warming Pi strengthening method; T cell subset

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是指与排便相关的腹痛或腹部不适,或伴有排便习惯改变及排便紊乱,同时无形态学、生化学异常改变和其他明显原因可以解释症状的产生^[1]。主要分为 IBS 腹泻型(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)、IBS 便秘型、IBS 不定型和 IBS 混合型,其中 IBS-D 较为常见。目前西医以对症治疗为主,魏玮教授临证采用温肾健脾法治疗 IBS-D 患者临床收效甚佳^[2],但尚缺乏客观依据加以证实。本实验通过观察温肾健脾法对 IBS-D 大鼠血清 T 细胞亚群 CD45⁺、CD3⁺及 CD4⁺/CD8⁺表达的影响,从免疫角度探索温肾健脾法对 IBS-D 的疗效和作用机理,旨在为临床应用提供实验依据。

材料与方法

1 动物 36 只 4 周龄健康雄性 SD 大鼠,清洁级,体重(70 ± 10)g。普通饲料适应性喂养 1 周,示正常生长后入选。实验动物购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号为 SCXK(京)2006-0009。

2 药物 温肾健脾方由肉豆蔻 15 g 补骨脂 30 g 五味子 9 g 吴茱萸 9 g 党参 30 g 白术 15 g 郁金 18 g 生姜 2 g 大枣 2 g 组成。四神丸方由肉豆蔻 15 g 补骨脂 30 g 五味子 9 g 吴茱萸 9 g 生姜 2 g 大枣 2 g 组成。药物均采用广州一方药业有限公司生产的免煎剂 4℃ 储备,用前摇匀。

3 主要试剂及仪器 PE Mouse Anti-Rat CD3 (BD 公司,批号:550353)、FITC Mouse Anti-Rat CD8a (BD 公司,批号:561965)、APC Mouse Anti-Rat CD4 (BD 公司,批号:550057)、PE-CyTM 5 Mouse Anti-Rat CD45 (BD 公司,批号:559135)、流式检测管(BD 公

司);8F,双腔,带囊直径为 2.7 mm 儿童型导尿管(Bardex 公司),FACS101 流式细胞仪(BD 公司),流式检测管(BD 公司),Cell Quest 软件(BD 公司),U-TVO.5XC.24H01726 显微镜(Olympus 公司),YP402N 电子天平(上海菁海仪器有限公司),AHB-2-LB 万能照相机(Olympus 公司)。

4 动物模型的制备 参照 AL-Chaer ED^[3]的造模方法为基础,同时予番泻叶灌胃联合夹尾刺激,即采用物理化学刺激共同作用的方法成功复制内脏高敏感 IBS-D 大鼠模型^[4]。取 30 只 SD 大鼠,具体操作方法为:首先将液体石蜡润滑后的连续硬膜外导管(直径 1 mm)经肛门插入距肛缘 3~5 cm 处,注入 0.5% 冰醋酸,将大鼠倒置,按住肛门约 1 min,以防冰醋酸漏出,首次剂量从 0.2 mL 开始,每 2 天增加 0.1 mL,增加至 0.5 mL 时不变,持续 2 周;然后将一次性儿童型导尿管球囊端液体石蜡润滑后插入大鼠距肛缘 2~3 cm 处,另一端连接 5 mL 注射器,每次注射器充气 1.5~2.0 mL/次,进行球囊直肠刺激,间断持续 3~5 min,每天 2 次,同时联合夹尾刺激,间断持续 3~5 min,每天 2 次,也持续 2 周。在结肠注射冰醋酸、直肠扩张联合夹尾刺激的同时予 0.3~0.5 g/mL (20 mL/kg) 番泻叶浓缩剂灌胃,每只 2~2.5 mL/次,每天 1 次,持续灌胃 4 周。造模结束后大鼠归笼,常规饲养,自由饮食。大鼠造模过程中无死亡情况出现。前期通过对模型组大鼠腹部撤回反射评分、粪便性状及频率改变等的评价成功复制内脏高敏感 IBS-D 大鼠模型,造模成功率 100%^[4]。

5 动物分组及给药方法 取 6 只 SD 大鼠为正常组,同时将造模成功的 30 只大鼠,按随机数字表法分为模型组、温肾健脾方高剂量组、温肾健脾方中剂量

组、温肾健脾方低剂量组及四神丸方组,每组 6 只,共 6 组。按照《药理实验方法学》^[5],选择按体重计算方法计算给药剂量。以成人 60 kg、大鼠 120 g 计算,动物给药量的换算公式: $dB = dA \times KB/KA$ (dB 为大鼠每天每千克灌药量, dA 为成人每天每千克用药量, $KB = 0.71$, $KA = 0.11$ 为常数)。温肾健脾方高、中、低各剂量组分别给予 3.10、1.55、0.775 g/(kg·d),分别相当于成人用量的 2 倍、1 倍、1/2 倍;对照组四神丸方 0.736 g/(kg·d) 灌胃,药液量调整至每只每次 2 mL。同时正常组及模型组予等体积生理盐水灌胃,1 次 2 mL。各组灌胃均为每天 2 次,各组均灌胃持续 2 周。

6 标本处理 给药 14 天后,将大鼠禁食不禁水 24 h,分别称重记录,给予 10% 水合氯醛腹腔麻醉 (0.3 mL/100 g),抓牢大鼠后,固定头部,采用摘眼球方法收集外周血约 1.5 mL 于肝素抗凝管中,放置冰浴上备用 T 细胞亚群的流式细胞学检测。

7 观察指标及检测方法

7.1 一般情况 分别观察大鼠的精神状态、体重、活动情况、毛发光泽度、食欲及大便性状等。

7.2 血清中 T 细胞亚群 CD45⁺、CD3⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 测定 蛋白标记:取 1 mL 抗凝血,按照说明书依次加入所需标记的抗体,室温孵育 30 min,1 000 r/min,离心 5 min;红细胞裂解:加入溶血素,室温暗处孵育 10 min,离心 500 g,5 min,弃上清;上机检测:加入 500 μL PBS 上机检测,Cell Quest 软件检测及分析。具体方法和操作步骤严格按试剂盒说明进行。

8 统计学方法 采用 SAS 9.0 统计处理软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布且方差齐的组间比较采用单因素方差分析,检验总体均数差异性,有差异者再进行 q 检验两两比较;不符合正态分布组间比较采用非参数秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠一般情况 实验期间,无大鼠死亡。正常组大鼠反应灵敏,精神状态佳,活动性良好,粪便性状呈颗粒状,毛发整齐有光泽。造模后大鼠第 3~5 天后出现精神略显萎靡,活动减少,倦怠蜷卧,拱背,被毛较松散,毛色偏黄少光泽,可见腹泻,稀便和(或)肛周体毛被稀便沾染,持续至造模结束。给药后温肾健脾方高、中剂量组及四神丸组大鼠从灌胃第 3 天起即出现腹泻减轻,部分大鼠腹泻于第 3~5 天内迅速缓解,粪便性状由不成形至半成形最后转为颗粒状,粪便颜色逐渐转为正

常黑色,大鼠精神状态回升,活动增加,皮毛逐渐恢复光泽。第 7~10 天左右,大鼠腹泻基本消失。中药低剂量组大鼠从灌胃第 3~5 天起,大鼠腹泻逐渐减轻,大鼠精神状态逐渐回升,活动增加,皮毛较整齐但欠光泽。实验结束时,仍有小部分大鼠粪便性状略稀。

2 各组大鼠血清中 T 细胞亚群水平比较 (表 1,图 1) 与正常组比较,模型组大鼠血清中 CD45⁺、CD3⁺ 均升高,CD4⁺/CD8⁺ 值降低,差异均有统计学意义(P < 0.05)。与模型组比较,温肾健脾方高、中、低剂量组及四神丸组大鼠血清中 CD45⁺ 及 CD3⁺ 均降低,CD4⁺/CD8⁺ 值升高,差异均有统计学意义(P < 0.05);与四神丸组比较,除温肾健脾方低剂量组 CD45⁺ 外,其他各指标差异均有统计学意义(P < 0.05);与温肾健脾方低剂量组比较,温肾健脾方高、中剂量组及四神丸组大鼠血清中 CD3⁺ 均降低,四神丸组及温肾健脾方高剂量组 CD4⁺/CD8⁺ 值升高,差异均有统计学意义(P < 0.05)。

表 1 各组大鼠血清中 T 细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

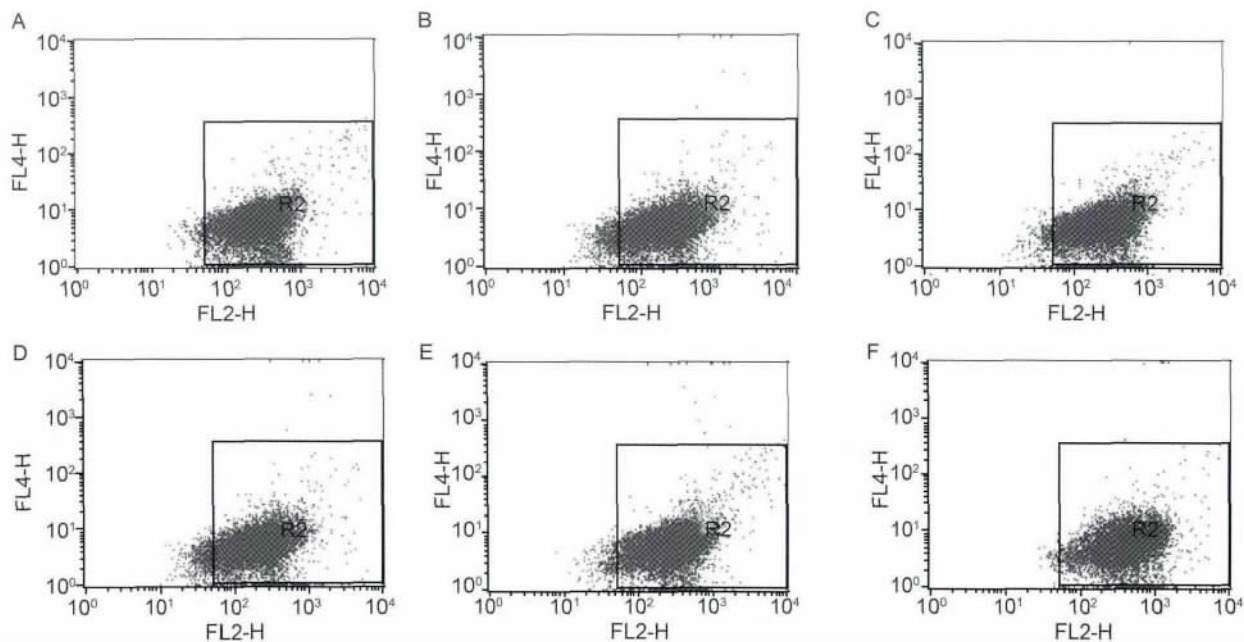
组别	n	T 细胞亚群		
		CD45 ⁺ (%)	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	6	44.77 ± 3.67	14.93 ± 1.72	2.03 ± 0.18
模型	6	57.35 ± 6.34*	19.73 ± 1.77*	1.43 ± 0.13*
四神丸方	6	51.30 ± 6.37 [△]	17.58 ± 1.47 ^{△○}	1.61 ± 0.13 ^{△○}
温肾健脾方高剂量	6	46.45 ± 7.54 ^{△▲}	17.58 ± 1.19 ^{△▲○}	1.79 ± 0.14 ^{△▲○}
中剂量	6	46.45 ± 4.86 ^{△▲}	16.76 ± 2.17 ^{△▲○}	1.74 ± 0.04 ^{△▲}
低剂量	6	49.45 ± 4.24 [△]	18.67 ± 1.32 ^{△▲}	1.45 ± 0.18 ^{△▲}

注:与正常组比较,*P < 0.05;与模型组比较,[△]P < 0.05;与四神丸组比较,[▲]P < 0.05;与温肾健脾方低剂量组比较,[○]P < 0.05

讨 论

肠黏膜上皮不仅是营养物质的消化吸收场所,也是体内最大的淋巴器官。肠道免疫系统由肠黏膜上皮和 Peyer 集合淋巴结组成,肠黏膜上皮含有上皮间淋巴细胞(IELs)。IELs 主要是 T 淋巴细胞,分为 CD4 和 CD8 两种亚型。5%~15% 的 IELs 表达 CD4(辅助/诱导型;Th/Ti),大部分细胞表达 CD8(细胞毒/抑制型;Tc/Ts)。T 淋巴细胞亚群是提示机体细胞免疫功能的重要指标,外周血 T 细胞亚群在数量上的协调比例,特别是 CD4⁺/CD8⁺ 比值更有助于反映机体免疫反应的调节能力,无论 T 淋巴细胞如何应答,它可能都在决定持续性黏膜免疫反应中起重要作用^[6,7]。

中医学根据主要表现将其归属“腹痛”、“泄泻”、“郁证”等范畴,病位在肠,主要涉及脾、肾、心、肝等,其发病与感受外邪、饮食不节、情志失调及脏腑虚弱等有关。魏玮教授认为脾肾阳虚是其主病机,治以温肾



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为四神丸组; D 为温肾健脾方高剂量组; E 为温肾健脾方中剂量组; F 为温肾健脾方低剂量组

图 1 各组 T 淋巴细胞亚群的流式细胞仪检测结果图

健脾法,方选四神丸加减化裁而成的温肾健脾方。方中补骨脂辛苦性热而补命门,为壮火益土之要药;肉豆蔻温补脾胃而涩肠止泻;吴茱萸暖脾胃而散寒除湿;五味子性温而不热不燥,温肾固涩;党参甘温补中,补气升阳,长于止泻;白术甘温性缓、阳中之阴,可升可降,长于补脾益气、燥湿利水;郁金入心治血、体清气窜,其气先上行而微下达,长于行气解郁、祛瘀止痛。生姜散寒行水、大枣滋养脾胃,共为佐药。诸药相合,则肾温脾暖,郁解心清,大肠固而运化复,泻止而愈。

温肾健脾方是魏玮教授在经方四神丸的基础上,结合 27 年临床用药经验和实践的经验方,是在四神丸基础上加入党参、白术、郁金,具有温肾健脾、疏肝理气、清心解郁等多重作用,诸药合用,则肾温脾暖,郁解心清,大肠固而运化复,泻止而愈。本课题组前期临床研究表明温肾健脾方可以有效治疗 IBS-D 并能较好控制此病的反复^[2];前期实验研究结果表明温肾健脾法对 IBS-D 大鼠在降低粪便性状、频率及内脏高敏感方面均有治疗作用^[5]。本实验研究结果显示:与正常组比较,模型组大鼠血清中 CD45⁺ 和 CD3⁺ 升高、CD4⁺/CD8⁺ 降低,提示 T 细胞亚群在 IBS-D 的发生和发展中占有重要地位;治疗后,温肾健脾方高、中剂量组血清中 CD45⁺ 和 CD3⁺ 降低、CD4⁺/CD8⁺ 升高,提示温肾健脾方能通过降低 IBS-D 大鼠血清中 CD45⁺ 和 CD3⁺,升高 CD4⁺/CD8⁺ 的作用进一步调控 T 细胞亚群的免疫调节作用。这一作用不仅是对该药疗效的进一步验证,也可能是温肾健脾方治疗 IBS-D 的作用机理之一。

参 考 文 献

[1] Chang L. From Rome to Los Angeles – The Rome III criteria for the functional GI disorders [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(5): 1480 – 1491.

[2] Su XL, Tang YP, Wei W, et al. Curative effect of Wenshen Jianpi Recipe on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(5): 615 – 619.

[3] Al Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276 – 1285.

[4] 苏晓兰,唐艳萍,张静,等. 温肾健脾法干预腹泻型肠易激综合征大鼠的实验研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(2): 197 – 202.

[5] 徐叔云,卞如濂,陈修主编. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202 – 203.

[6] 贾勇,王巧民,戴海明. 肠易激综合征 T 淋巴细胞亚群变化及其意义 [J]. *临床消化病杂志*, 2002, 14(2): 60 – 61.

[7] Saito YA, Larson JJ, Atkinson EJ. The role of 5-HTT LPR and GNβ3 825C > T polymorphisms and gene-environment interactions in irritable bowel syndrome (IBS) [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(10): 2650 – 2657.

(收稿: 2014 - 07 - 03 修回: 2014 - 12 - 24)