

• 实验研究 •

儿泻康贴膜对功能性腹痛幼龄大鼠药效作用及机制研究

宋紫腾^{1,2,3,4}, 王甜⁵, 罗春⁶, 黄泽森⁵, 朱加华⁶, 侯淇允⁵, 余彩霞⁶, 张嘉慧⁵, 韩彦琪^{1,2,3,4}, 许浚^{1,2,3,4}, 赵专友^{1,2,3,4}, 刘昌孝^{1,3}, 张铁军^{1,2,3,4*}

1. 天津药物研究院 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300462
2. 天津药物研究院 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300462
3. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462
4. 和光中药科技(天津)有限公司, 天津 300462
5. 天津中医药大学, 天津 301617
6. 上海儿童营养中心, 上海 201403

摘要: **目的** 研究儿泻康贴膜对功能性腹痛幼龄大鼠的影响, 并探讨其疗效机制。**方法** 将出生 1 d 的 SD 大鼠随机分为对照组和模型组, 采用母婴分离联合冰水应激的方法建立功能性腹痛大鼠内脏高敏感模型。选取造模成功的大鼠随机分为模型组、丁桂儿脐贴组, 儿泻康贴膜 (1/24、1/12、1/6 贴) 组。各组大鼠腹部贴剂给药, 连续 7 d, 对照组、模型组腹部给予空白模拟贴。观察给药后大鼠粪便 Bristol 分级评分、粪便含水量及腹壁撤退反射 (AWR) 评分结果; 采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 法检测血清和结肠组织中 5-羟色胺 (5-HT)、P 物质 (SP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的含量; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 测定结肠组织中囊性纤维化跨膜转运调节体 (CFTR)、促肾上腺皮质激素释放因子 (CRF) mRNA 表达水平; Western blotting 法检测 CFTR、CRF 蛋白表达水平。**结果** 与模型组相比, 儿泻康贴膜各剂量组大鼠粪便 Bristol 评分明显降低, 粪便含水量显著减少, 不同注水体积下的 AWR 评分均显著降低, 血清和结肠组织中致痛致泻相关因子 5-HT、SP、TNF- α 的表达均得到显著抑制, 结肠组织中 CFTR 和 CRF mRNA 和蛋白的相对表达量均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。**结论** 儿泻康贴膜对功能性腹痛大鼠有显著的治疗效果, 其通过调节血清和结肠组织中腹痛腹泻相关因子的含量以及结肠组织中相关蛋白的表达以显著降低大鼠粪便 Bristol 评分和粪便含水量以及大鼠的内脏敏感性。

关键词: 儿泻康贴膜; 儿童功能性腹痛; 5-羟色胺; P 物质; 肿瘤坏死因子- α ; 囊性纤维化跨膜转运调节体; 促肾上腺皮质激素释放因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)07-1653-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.07.001

Efficacy and mechanism of Erxiekang Plaster on functional abdominal pain juvenile rats

SONG Ziteng^{1,2,3,4}, WANG Tian⁵, LUO Chun⁶, HUANG Zesen⁵, ZHU Jiahua⁶, HOU Qiyun⁵, YU Caixia⁶, ZHANG Jiahui⁵, HAN Yanqi^{1,2,3,4}, XU Jun^{1,2,3,4}, ZHAO Zhuanyou^{1,2,3,4}, LIU Changxiao^{1,3}, ZHANG Tiejun^{1,2,3,4}

1. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
2. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
3. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
4. Huguang Chinese Medicine Technology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300462, China

收稿日期: 2024-02-04

基金项目: 安徽省科技重大专项项目 (202303a0702007)

作者简介: 宋紫腾, 研究方向为中药药效物质基础及药理作用研究。E-mail: songziteng@tipr.com.cn

*通信作者: 张铁军, 研究方向为中药新药研发、中药质量控制以及中药大品种二次开发。E-mail: zhangtj@tipr.com.cn

5. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

6. Shanghai Children's Nutrition Center, Shanghai 201403, China

Abstract: Objective To observe effects of Erxiekang Plaster on functional abdominal pain juvenile rats, and explore its mechanism.

Methods The 1-day-old SD rats were randomly divided into control group and model group. The functional abdominal pain rat models with visceral hypersensitivity were established by the method of combination of maternal separation and ice water stress. The rats with successful modeling were randomly divided into model group, Dingguier Umbilical Paste group, and Erxiekang Plaster (1/24, 1/12, 1/6) group. Each group of rats was given abdominal patches for 7 consecutive days, while the control group and model group were given blank simulated patches on the abdomen. Scores of Bristol classification and water content of the fecal pellets and abdominal withdrawal reflex (AWR) of rats in all the groups were observed after treatment. ELISA was used to detect the changes of 5-HT, SP and TNF- α in serum and colon tissue. The mRNA expression levels of *CFTR* and *CRF* in colonic tissues were detected by RT-PCR. The protein expression levels of both were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the Bristol score and fecal water content of rats significantly decreased after treatment with Erxiekang Plaster, and the AWR score significantly decreased under different water injection volumes. The expression levels of 5-HT, SP, and TNF- α in serum and colon tissue were significantly decreased. The *CFTR* and *CRF* mRNA and protein expression significantly down-regulated. **Conclusion** Erxiekang Plaster has a significant therapeutic effect on functional abdominal pain in rats. It can significantly reduce the Bristol score and fecal water content, as well as visceral sensitivity of rats by regulating the content of abdominal pain and diarrhea related factors in serum and colon tissue, as well as the expression of related proteins in colon tissue.

Key words: Erxiekang Plaster; pediatric functional abdominal pain; 5-HT; SP; TNF- α ; *CFTR*; *CRF*

儿童功能性腹痛为儿科常见病,伴恶心、呕吐、腹胀、腹泻或便秘等症状,具有发作部位不固定、疼痛程度不一、易反复发作等特点。2016 年新的罗马 IV 标准将儿童功能性腹痛定义为脑肠互动紊乱,脑-肠轴是指胃肠道和大脑之间的双向信息交换,其病理生理机制包含了胃肠运动失常、内脏高敏感性、自主神经系统失调、肠道菌群改变等因素^[1]。脑肠肽是分布于脑-肠轴各组分中重要的小分子多肽类物质,能够参与调控脑肠互动的各个环节,包括 5-羟色胺 (5-HT)、P 物质 (SP)、促肾上腺皮质激素释放因子 (CRF) 等 10 余种。5-HT 分布在肠道,与肠嗜铬细胞和肠神经元细胞表面的 5-HT 受体结合,在调节胃肠动力和内脏敏感性方面起着重要作用^[2]; SP 是 11 个氨基酸组成的多肽,与痛觉传导有关,是一种兴奋性神经递质,能够促进胃肠蠕动,刺激肠黏膜分泌水和电解质,增加肠道的感觉敏感性^[3]; CRF 是介导应激反应的关键性调节因子,研究显示,应激状态下 CRF 可以通过与上皮肥大细胞上的 CRF 受体结合,激活肥大细胞并进一步诱导肠上皮细胞屏障功能障碍^[4]; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 作为机体重要的促炎细胞因子,在功能性胃肠道疾病中发挥重要作用,可通过影响内脏敏感性、破坏肠道黏膜屏障、改变胃肠动力以及加重精神心理异常等方面参与疾病的发生、发展^[5]。腹泻的发生发展与机体对离子的吸收、分布和排泄密切相关,

肠道组织中的囊性纤维化跨膜转运调节体 (CFTR) 是一种 Cl^- 通道蛋白,可以调节细胞膜的离子运输,在分泌性腹泻的发生中起着重要的调控作用^[6]。对于儿童功能性腹痛的治疗,西医主要以解痉止痛、助消化等对症治疗为主,复发率高且依从性差。中医药治疗该病注重辨证论治,无论施以中药内治,还是辅以拔罐、推拿以及穴位贴敷等外治法,均具有显著疗效,且不良反应少^[7]。

儿泻康贴膜是由丁香、白胡椒、吴茱萸、肉桂组成的中药复方制剂,是常见的婴幼儿用于透皮止泻的膜剂,敷于神阙穴,根据寒者热之、实者泻之的治疗原则,给予温中祛寒之法,具有温中散寒止泻的功效,临床用于治疗小儿腹泻、腹痛,疗效显著^[8-9]。方中丁香温中降逆,补肾助阳;白胡椒温中散寒;吴茱萸、肉桂散寒止痛,温脾止泻。四药合用,共奏温中健脾、散寒止泻之功效。本研究通过母婴分离联合冰水刺激建立功能性腹痛大鼠模型探讨其可能的作用机制,以期为儿泻康贴膜临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

刚出生 1 d 的 SD 幼鼠,SPF 级,70 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(质量合格证号 110011230105601788,许可证编号 SCXK(京)2021-0011),饲养在天津天诚新药评价有限公司实

验动物屏障系统[合格证 SYXK(津)2021-0008], 温度、湿度、换气次数由中央系统自动控制, 温度维持在 20~26 °C, 相对湿度维持在 40%~70%, 通风次数为 10~15 次/h 全新风, 光照为 12 h 明、12 h 暗。自由摄食饮水, 大鼠饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供, 饮水为纯净水(由北京凯弗隆北方水处理设备有限公司生产的 KFRO-400GPD 型纯水机制备)。实验经天津天诚新药评价有限公司实验动物伦理委员会批准(No.2023090801)。

1.2 试剂与仪器

儿泻康贴膜, 山西晋新双鹤药业有限责任公司, 规格 0.23 g/张, 批号 2201406; 丁桂儿脐贴, 亚宝药业集团股份有限公司, 规格 1.6 g/张(相当于饮片 1.34 g), 批号 2301516A。

一次性使用 8Fr 无菌导尿管(批号 20221216)购自湛江市事达实业有限公司; 液状石蜡油(批号 20230407)购自武邑炎威医疗科技有限公司; 5-HT 检测试剂盒(批号 2309271)、SP 检测试剂盒(批号 2310101)、TNF- α 检测试剂盒(批号 2309281)均购自上海西唐生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 2310007)购自北京索莱宝科技有限公司; TRNzol Universal 总 RNA 提取剂(批号 Y1913)购自天根生化科技(北京)有限公司; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(批号 69252721)、FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)(批号 72986700), 均购自瑞士 Roche 公司; 大鼠 CFTR 基因引物(批号 4|50173522002、4|50173522003)、大鼠 CRF 基因引物(批号 4|50173522006、4|50173522007)、大鼠 ACTB 内参引物(批号 I921KA6425)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; CFTR 抗体(批号 CC17222)购自美国 Bioworld 公司; CRF 抗体(批号 1007408-1)购自英国 Abcam 公司; β -actin 抗体(批号 19)、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody(批号 32)购自美国美国 Cell Signaling Technology 公司。

大鼠观察箱(18 cm×15 cm×8 cm), 上海玉研科学仪器有限公司; SpectraMaxM5 酶标仪, 德国 Berthold 公司; LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪, 瑞士 Roche 公司; BIO-RAD T100 伯乐 PCR 仪, 美国 Bio-Rad Laboratories 公司; Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PowerPac Basic 电泳仪, 美国 BIO-RAD Laboratories 公司; Tanon-5200Multi 化学成像发光系统, 上海天

能科技有限公司。

2 方法

2.1 分组

将出生 1 d 的 SD 幼鼠随机分为对照组、模型组、丁桂儿脐贴组、儿泻康贴膜(1/24、1/12、1/6 贴)组, 每组 10 只。给药剂量根据体表面积进行换算, 幼龄大鼠体质量按照 160 g 计, 儿童体质量按照 20 kg 计, 大鼠与儿童的体表面积比值=($0.09 \times 0.16^{2/3}$) / ($0.1 \times 20^{2/3}$) = 0.036, 大鼠给药量=1 贴×0.036≈1/24 贴, 儿泻康贴膜 1/24、1/12、1/6 贴, 丁桂儿脐贴设为 1/12 贴。

2.2 给药与造模

对照组不做任何干预; 模型组采用母婴分离联合冰水应激法进行造模^[10], 出生第 2 天将 SD 幼鼠与母鼠分开, 每天 9: 00~12: 00 时分离 3 h, 分离时幼鼠与母鼠处在同一房间不同笼中, 不能看到母鼠, 连续分离 20 d。幼鼠从第 22 天开始断奶与母鼠分笼, 正常饲养 1 周。从第 28 天开始每天将 SD 大鼠置于装有 4 °C 冰水的桶中 10 min, 连续 15 d。造模结束后通过粪便含水量和腹壁撤退实验进行模型评估, 挑选造模成功的大鼠随机分为模型组、丁桂儿脐贴组和儿泻康贴膜, 每组 10 只。给药组大鼠每天腹部贴剂给药处理, 模型组和对照组腹部外用其模拟贴, 连续给药 7 d。

2.3 一般情况观察

造模及给药期间每天观察幼鼠外观及活动情况, 如精神萎靡、蜷卧、扎堆、反应迟钝、皮毛枯槁散乱、肛周污浊、饮食减少, 消瘦等表现。

2.4 粪便 Bristol 分级评分及粪便含水量

给药最后 1 d, 进行大鼠粪便 Bristol 分级评分及粪便含水量测定。收集大鼠的 6 h(9: 00~15: 00)粪便, 并对其进行 Bristol 评分、称质量, 干燥后再次称质量, 计算出粪便含水量。粪便含水量=(大便湿质量-大便干燥后质量)/大便湿质量。Bristol 分级评分标准: 1 级, 分散的硬块, 似坚果; 2 级, 腊肠状, 但成块; 3 级, 腊肠状, 但表面有裂缝; 4 级, 似腊肠或蛇、光滑柔软; 5 级, 软团、边缘清楚; 6 级, 绒状物, 边缘不清、糊状便; 7 级, 水样、无固状物^[11]。

2.5 腹壁撤退反射(AWR)评分

给药结束后, 分别对各组大鼠进行结直肠扩张刺激下 AWR 评分测定大鼠内脏敏感程度。于实验前 18 h 禁食、不禁水, 并在测试前用棉棒反复挠触

肛门，以尽量完全排空肠道。用异氟烷将大鼠麻醉，将 8Fr 儿童导尿管的头端用石蜡油充分润滑，轻轻向肛门内插入，深度为进入直肠 5~8 cm，并将导尿管尾端用医用胶带固定在鼠尾根部以防其滑出。将大鼠放入狭窄的固定笼内，使其无法转身。待大鼠清醒并适应笼内环境后，用注射器抽取常温生理盐水经导尿管外口注入位于大鼠结直肠内的球囊内，最少注入 0.2 mL，逐步加量，每次加量 0.2 mL，直至最高 1 mL，此过程中球囊内压力也随之逐步升高，观察每个体积下大鼠腹部的反应并进行评分。为防止肠道缺血，每次持续 20 s 即可，重复测量 3 次，两次之间间隔 15 min。AWR 评分标准：0 分，结直肠扩张刺激时大鼠情绪基本稳定；1 分，给予刺激时开始出现不稳定，偶有扭动头部；2 分，刺激时腹背部肌肉轻微收缩但腹部不抬离地面；3 分，给予刺激时腹背部肌肉较强烈收缩并有腹部抬离地面情况；4 分，刺激时腹部肌肉强烈收缩，腹部呈弓形，腹部、会阴部抬离地面^[11]。

2.6 大鼠血清及结肠组织中 5-HT、SP 及 TNF-α 含量检测

AWR 实验结束后，ip 戊巴比妥钠将大鼠麻醉，腹主动脉取血于 EDTA 抗凝采血管，于 4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min，分离得到血清样品。截取结肠中距肛门 8 cm 处远端结肠组织，用预冷的生理盐水清洗干净肠内容物，匀浆后离心得到组织上清液，BCA 法检测上清液总蛋白浓度。根据相应 ELISA 试剂盒说明书分别进行血清和结肠组织上清液中 5-HT、SP 和 TNF-α 含量的测定。

2.7 结肠组织中 CFTR、CRF mRNA 表达水平

取冻存的结肠组织，按照总 RNA 提取试剂说明书提取结肠组织样本中总 RNA，采用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA 后，用荧光定量 PCR 进行 PCR 扩增。引物序列：CRF 上游引物：5'-TTCACAGCATCAAGCAGTCC-3'，下游引物：5'-CGTCAGTGAGCTTGCATCAT-3'；CFTR 上游引物：5'-ATGAATCCCTCCAGGCACTT-3'，下游引物：5'-CTTCTTCTCCGCTCCTCTTT-3'；β-actin 作为内参基因，上游引物：5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'，下游引物：5'-GGGGTGTGTAAGGTCTC AAA-3'，采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因相对表达量。

2.8 结肠组织中 CFTR、CRF 蛋白表达水平

取大鼠结肠组织加 RIPA 裂解液，充分匀浆，12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，加入 4×蛋

白上样缓冲液，沸水浴 5 min 使蛋白变性，放入 -20 ℃冰箱保存备用。取等量蛋白样品以 10% SDS-PAGE 电泳分离，PVDF 转膜，封闭，剪下目的蛋白条带加入一抗，4 ℃孵育过夜，TBST 洗 6 次，每次 5 min，加入二抗，室温下孵育 1 h 后，TBST 摇床洗 6 次，每次 5 min，最后滴加 ECL 发光液于化学发光成像仪中进行曝光，保存条带，进一步用 Image J 进行定量分析。

2.9 统计方法

使用 Graphpad Prism7.00 软件，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。

3 结果

3.1 一般情况观察

对照组幼鼠皮毛洁白有光泽，精神状态良好，饮食活动正常。模型组幼鼠精神较萎靡，毛发发黄，饮食活动减少，肛周污浊且有不同程度的腹泻，身体消瘦。给药后，与模型组相比，丁桂儿脐贴组和儿泻康贴膜组大鼠精神均有所改善，肛周污浊减少，饮食活动有所增加。

3.2 各组大鼠粪便评分及含水量比较

与对照组相比，模型组粪便 Bristol 分级评分及含水量均显著升高（ $P < 0.001$ ）；腹部贴剂给药后，与模型组相比，丁桂儿脐贴组和儿泻康贴膜各剂量组均能显著降低大鼠粪便 Bristol 评分及粪便含水量（ $P < 0.01$ 、 0.001 ），见表 1。

表 1 各组大鼠粪便 Bristol 分级评分及含水量比较（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 10$ ）

Table 1 Comparison of Bristol grade score and water content in stool of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)			
组别	剂量	Bristol 分级评分	粪便含水量/%
对照	—	3.5 ± 0.53	50.95 ± 3.26
模型	—	5.1 ± 0.57***	67.59 ± 3.68***
丁桂儿脐贴	1/12 贴	3.8 ± 0.63###	55.31 ± 4.46###
儿泻康贴膜	1/24 贴	4.0 ± 0.82##	60.75 ± 2.63##
	1/12 贴	3.6 ± 0.70###	54.74 ± 4.19###
	1/6 贴	3.3 ± 0.53###	53.97 ± 3.67###

与对照组比较：*** $P < 0.001$ ；与模型组比较：## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

3.3 各组大鼠内脏敏感性比较

与对照组相比，模型组在不同注水体积下的 AWR 评分均显著增大（ $P < 0.001$ ）；与模型组相比，丁桂儿脐贴组在 5 个不同注水体积下的 AWR 评分均明显降低（ $P < 0.01$ 、 0.001 ），儿泻康贴膜 1/24 贴

组注水体积为 0.4、0.6、0.8 mL 时 AWR 评分明显降低 ($P<0.05$), 儿泻康贴膜 1/12、1/6 组在不同注水体积下 AWR 评分均显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001)。

其中儿泻康贴膜 1/12、1/6 组在注水体积为 0.6 和 0.8 mL 时与其他给药组相比对 AWR 评分的降低作用更明显, 见表 2。

表 2 各组大鼠不同注水体积下的 AWR 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Comparison of AWR scores of rats in different injection volumes ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	不同注水体积下的 AWR 评分				
		0.2 mL	0.4 mL	0.6 mL	0.8 mL	1.0 mL
对照	—	0.13±0.17	0.40±0.21	1.03±0.43	2.10±0.47	2.67±0.38
模型	—	0.83±0.32***	1.87±0.32***	2.80±0.36***	3.70±0.19***	3.93±0.14***
丁桂儿脐贴	1/12 贴	0.47±0.17###	1.43±0.23##	2.27±0.21##	2.97±0.25###	3.50±0.28##
儿泻康贴膜	1/24 贴	0.60±0.21	1.53±0.23#	2.37±0.25#	3.27±0.34#	3.77±0.22
	1/12 贴	0.43±0.23###	1.30±0.25###	2.03±0.25###	2.77±0.16###	3.33±0.27###
	1/6 贴	0.43±0.16###	1.23±0.16###	2.00±0.31###	2.73±0.21###	3.30±0.25###

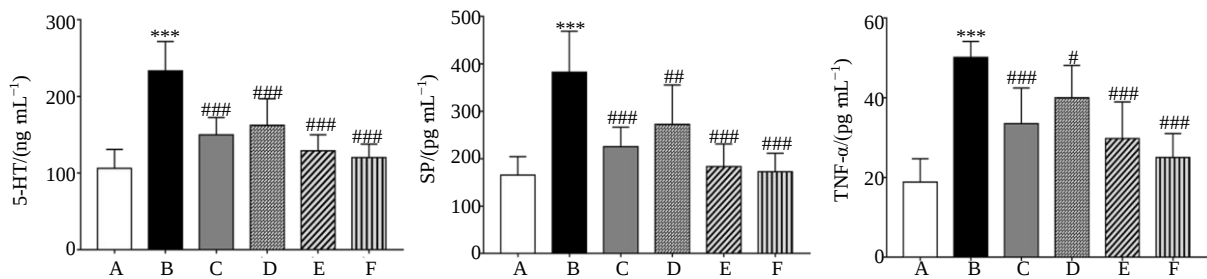
与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

3.4 各组大鼠血清中 5-HT、SP 和 TNF- α 的水平比较

与对照组比较, 模型组血清 5-HT、SP 和 TNF- α 水平均显著升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, 丁

桂儿脐贴组和儿泻康贴膜各剂量组均可显著降低血清中 5-HT、SP 和 TNF- α 水平 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。其中儿泻康贴膜 1/6 组有更好的药效作用, 见图 1。



A-对照, B-模型, C-丁桂儿脐贴, D-儿泻康贴膜 1/24 贴, E-儿泻康贴膜 1/12 贴, F-儿泻康贴膜 1/6 贴; 与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

A-control, B-model, C-Dingui'er Umbilical Paste, D-Erxiekang Plaster 1/24 stick, E-Erxiekang Plaster 1/12 stick, F-Erxiekang Plaster 1/6 stick, *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图 1 各组大鼠血清中 5-HT、SP、TNF- α 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Effects on serum contents of 5-HT, SP and TNF- α of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.5 各组大鼠结肠组织中 5-HT、SP 和 TNF- α 的含量比较

与对照组相比, 模型组结肠组织中 5-HT、SP 和 TNF- α 含量均显著升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, 丁桂儿脐贴组和儿泻康贴膜各剂量组均可显著降低 5-HT、SP 和 TNF- α 含量 ($P<0.001$)。其中儿泻康贴膜 1/12、1/6 组对结肠组织中腹痛腹泻相关因子调节方面表现出更好的作用效果, 见图 2。

3.6 结肠组织中 CFTR、CRF mRNA 表达的比较

与对照组相比, 模型组 CFTR、CRF mRNA 相对表达水平显著升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, 经丁桂儿脐贴组及儿泻康贴膜各剂量组处理后大鼠结肠组织中 CFTR、CRF mRNA 相对表达水平均有不同程度的下降 ($P<0.001$)。其中儿泻康贴膜 1/12、

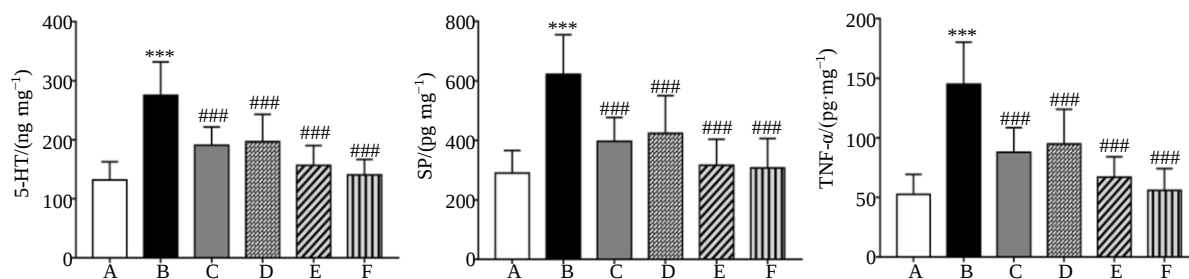
1/6 组对 CFTR、CRF mRNA 相对表达的抑制作用效果更好, 见图 3。

3.7 对结肠组织中 CFTR、CRF 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组 CFTR 和 CRF 蛋白相对表达量显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001); 与模型组相比, 经丁桂儿脐贴组及儿泻康贴膜各剂量组处理后大鼠结肠组织中 CFTR 和 CRF 蛋白相对表达量均有不同程度的下降 ($P<0.01$ 、 0.001)。其中儿泻康贴膜 1/6 组对 CFTR 和 CRF 表达的抑制作用效果更好, 见图 4。

4 讨论

儿童功能性腹痛以学龄前儿童为高发人群, 病情较为复杂, 传统西医针对该病多以对症药物治疗, 长期服用西药不良反应较多, 局限疗效, 受到临床

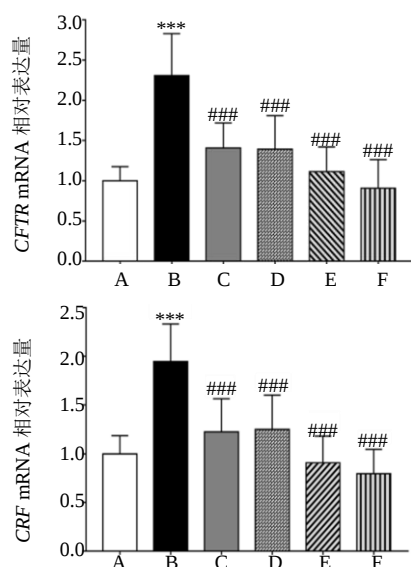


A-对照, B-模型, C-丁桂儿脐贴, D-儿泻康贴膜 1/24 贴, E-儿泻康贴膜 1/12 贴, F-儿泻康贴膜 1/6 贴; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。

A-control, B-model, C-Dingguier Umbilical Paste, D-Erxiakang Plaster 1/24 stick, E- Erxiakang Plaster 1/12 stick, F- Erxiakang Plaster 1/6 stick, *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 2 各组大鼠结肠组织中 5-HT、SP、TNF- α 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Content of 5-HT, SP and TNF- α in colon tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



A-对照, B-模型, C-丁桂儿脐贴, D-儿泻康贴膜 1/24 贴, E-儿泻康贴膜 1/12 贴, F-儿泻康贴膜 1/6 贴; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。

A-control, B-model, C-Dingguier Umbilical Paste, D-Erxiakang Plaster 1/24 stick, E- Erxiakang Plaster 1/12 stick, F- Erxiakang Plaster 1/6 stick, *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

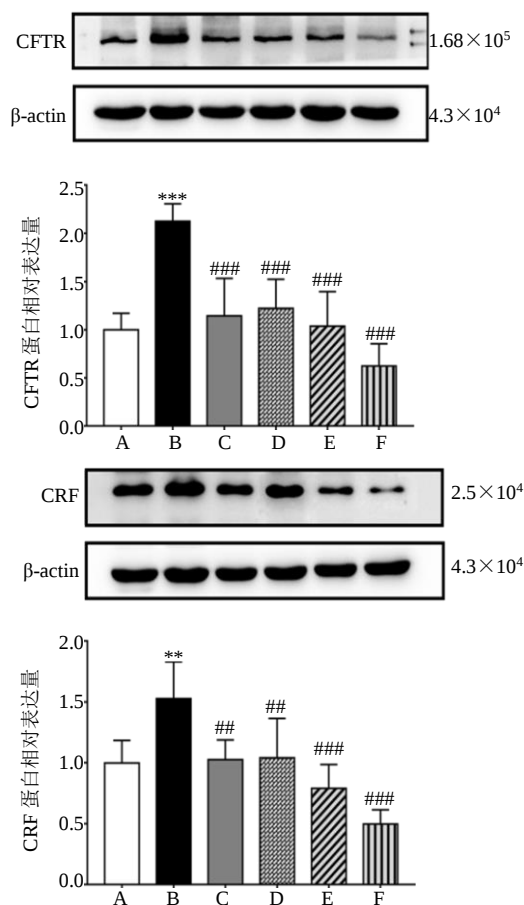
图 3 各组大鼠结肠组织中 CFTR、CRF mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Relative expression levels of CFTR and CRF mRNA in colon tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

学者高度关注^[12]。中医强调“整体观念”，对本病具有独特治疗优势，根据临床表现，儿童功能性腹痛归属于“腹痛病”或“小儿腹痛”等中医疾病范畴，病机不外虚实两端，不通则痛或不荣则痛，病位主要在脾，常涉及肝、肾、胃、肠等脏腑。临床多从脾论治，实证治以温中散寒、运脾调气、消食导滞等，虚证施以健脾温中、温补脾肾等，通过基于辨

证论治的个体化治疗，能够改善腹痛症状，疗效显著^[13-14]。儿童功能性腹痛发病机制复杂，目前认为与脑-肠轴功能失调引起的内脏高敏感、胃肠动力异常、心理因素及食物不耐受具有高度相关性^[15]。

内脏高敏感性表现为肠道对压力、温度等刺激感受性增强，在儿童功能性腹痛的发病中发挥了重要作用^[16]。多项实验表明，在内脏敏感性增高过程中，有多种神经介质参与，在不同传输水平上接收到刺激信息，对其进行放大再传输，最后到达大脑皮层感觉区^[17]。5-HT 属于胃肠初级感觉神经递质，主要来源于肥大细胞，参与调节脑-肠轴的互动过程，5-HT 与 5-HT₄R 结合后，可开放电压敏感性钙通道，促进乙酰胆碱等神经递质释放，可通过影响内脏敏感性、肠道免疫、肠道动力、精神心理等引起肠平滑肌运动紊乱和水代谢紊乱，从而引起腹痛、腹泻等临床症状的发生和排便习惯的改变^[18]。研究显示，腹泻型肠易激综合征模型大鼠血清中 5-HT 水平增加且结肠组织中 5-HT 阳性表达显著升高^[19]。SP 是连接中枢神经系统和消化系统的重要传导分子，其分泌异常在腹痛中发挥着关键作用^[20]。SP 作为重要的痛觉兴奋性传导递质之一，主要通过向上传递至中枢神经系统，也可逆向释放入损伤局部组织中，启动神经源性双向可逆炎症反应，调节多种细胞产生细胞因子。研究证实 SP 可促进肥大细胞释放炎症介质，刺激单核-巨噬细胞系统产生 TNF- α ^[21]。TNF- α 等炎症因子可影响肠上皮细胞间紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin) 的表达，引起紧密连接功能障碍，从而导致肠上皮屏障功能障碍，加剧腹痛相关疾病的发生发展^[22]。本研究结果表明，儿泻康贴膜可通过抑制功能性腹痛大鼠血清和结肠组织



A-对照, B-模型, C-丁香儿脐贴, D-儿泻康贴膜 1/24 贴, E-儿泻康贴膜 1/12 贴, F-儿泻康贴膜 1/6 贴; 与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-control, B-model, C-Dingguier Umbilical Paste, D-Erxiekang Plaster 1/24 stick, E- Erxiekang Plaster 1/12 stick, F- Erxiekang Plaster 1/6 stick, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 4 各组大鼠结肠组织中 CFTR、CRF 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 4 Relative expression levels of CFTR and CRF proteins in colon tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

中腹痛腹泻相关因子 5-HT、SP、TNF- α 的释放来缓解腹泻及内脏高敏感症状。

脑肠互动异常是功能性胃肠病中相对公认的病理机制之一,多种脑肠肽在其中发挥了十分重要的作用^[23]。CRF 作为下丘脑释放肽,不仅可以调节情绪心理等应激反应还可以协调应激过程中内分泌、免疫以及行为等反应。CRF 和 CRF 相关肽可自由通过血脑屏障,其生物学作用是通过与受体 (CRF-R) 结合发挥,其受体广泛存在于中枢系统和外周组织中^[24]。通过研究已经证明机体注射 CRF 受体拮抗剂后,可对应激后导致的胃肠运动进行抑制^[25]。

此外,应激反应能促进下丘脑及相关区域的 CRF 释放增加,经脊髓背角传递痛觉信号,引起肥大细胞 (MC) 活化脱颗粒释放 SP 等感觉神经递质,出现腹痛、腹泻等内脏高敏感症状^[26-27]。胃肠道水、电解质分泌和吸收功能的紊乱会导致腹泻的发生发展,其中肠道异常的离子转运与腹泻的发生密切相关。研究表明,存在于肠道组织中的 CFTR 是一个 cAMP/PKA/ATP 调节的 Cl^- 通道,主要生理功能是转运 Cl^- ,但在肠道环境改变、病菌、毒素等的作用下,上皮细胞内 cAMP 浓度升高,从而造成 CFTR 的高表达,导致 Cl^- 被过量分泌到细胞外, Na^+ 、 Cl^- 吸收发生障碍,肠腔内容物增加,大量的水分被排入肠腔中而引发腹泻^[28]。实验结果表明,儿泻康贴膜可显著抑制功能性腹痛大鼠结肠组织中 CRF 和 CFTR mRNA 及蛋白的表达,进而调节相关因子的分泌来减轻腹痛腹泻症状。

透皮贴剂,通常也称为透皮给药系统或透皮治疗系统,是指药物通过皮肤吸收进入人体血液循环并达到有效血药浓度,实现疾病预防或治疗的一种给药途径。被认为是继口服给药、注射给药之后的第 3 大给药系统。儿泻康贴膜是从中药丁香、白胡椒、吴茱萸、肉桂中提取有效成分,运用透皮缓释技术,集药、穴疗及内病外治于一体的新型贴剂,敷于神阙穴,起到温中散寒、行气止痛的作用。丁香温中降逆,补肾助阳。用于脾胃虚寒,呃逆呕吐,食少吐泻,心腹冷痛,肾虚阳痿。其主要化学成分为挥发油,具有起效迅速,脂溶性强的特点,不仅自身易透过血脑屏障,还可促进其他药效物质的吸收^[29]。在医疗方面已广泛应用于牙科,以治疗牙齿感染和牙龈疼痛^[30];胡椒温中散寒,下气,消痰。用于胃寒呕吐,腹痛泄泻,食欲不振,癫痫痰多。胡椒碱是胡椒中含量最高、活性最广的一种酰胺类生物碱成分^[31],具有一定的镇痛作用,在非压缩性腰椎间盘突出模型大鼠中,可通过升高 miR-520a、白细胞介素 (IL)-10、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的表达,抑制 p65、IL-1 β 、TNF- α 的表达,发挥抗炎镇痛作用^[32];吴茱萸散寒止痛,降逆止呕,助阳止泻。用于厥阴头痛,寒疝腹痛,寒湿脚气,经行腹痛,脘腹胀痛,呕吐吞酸,五更泄泻。主要含有生物碱、萜类、黄酮、挥发油等化合物。有研究表明^[33],吴茱萸碱和吴茱萸次碱均可通过介导 TRPV1 的作用,缓解神经损伤和炎症性小鼠模型的外周超敏反应。吴茱萸碱还具有治疗溃疡性结肠炎及缓解

肠易激综合征的作用^[34]；肉桂补火助阳，引火归元，散寒止痛，温通经脉。用于阳痿宫冷，腰膝冷痛，肾虚作喘，虚阳上浮，眩晕目赤，心腹冷痛，虚寒吐泻，寒疝腹痛，痛经经闭。富含桂皮醇、肉桂油，具有镇痛、抗炎、免疫调节等作用^[35]。表明儿泻康贴膜可通过发挥多种药理作用治疗功能性腹痛。

综上，儿泻康贴膜与丁桂儿脐贴均对母婴分离联合冰水应激致大鼠功能性腹痛模型有显著的治疗作用，其中儿泻康贴膜 1/12、1/6 组在降低大鼠内脏敏感性及腹痛腹泻相关因子和蛋白上有更好的药效作用。其作用机制可能为通过调节与内脏高敏感及肠液分泌相关因子 5-HT、SP、TNF- α 等的释放以及 CFTR、CRF mRNA 及蛋白的相对表达量以显著降低功能性腹痛大鼠粪便 Bristol 评分以及粪便含水量，同时降低大鼠内脏高敏感性。本研究为儿泻康贴膜临床治疗腹痛、腹泻相关疾病的提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 付锦锦, 王君, 段宇航, 等. 儿童功能性腹痛的研究进展 [J]. 儿科药学杂志, 2023, 29(7): 63-66.
- [2] 李正阳, 孙咏红, 华倩, 等. 5-HT_{2B} 受体表达与腹泻型肠易激综合征患者腹痛的相关性分析 [J]. 江苏医药, 2023, 49(12): 1203-1206.
- [3] 杜光信, 冯群虎, 胡建文, 等. 半夏泻心汤加减治疗肠易激综合征患者腹痛的疗效及对血清 5-HT、VIP、SP 水平的影响 [J]. 中国肛肠病杂志, 2022, 42(8): 44-47.
- [4] 朱春洋. 基于 CRF 通路探讨四逆散治疗功能性消化不良的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [5] Kumar S, Singh P, Kumar A. Targeted therapy of irritable bowel syndrome with anti-inflammatory cytokines [J]. *Clin J Gastroenterol*, 2022, 15(1): 1-10.
- [6] Yu B, Zhu X J, Yang X Y, et al. Plumbagin prevents secretory diarrhea by inhibiting CaCC and CFTR channel activities [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1181.
- [7] 张宇鹏, 肖紫琪, 吴丽萍. 近 5 年中医药治疗小儿功能性腹痛研究进展 [J]. 中医儿科杂志, 2023, 19(5): 102-106.
- [8] 朱荣欣, 胡思源, 丛培荣, 等. 儿泻康贴膜敷脐治疗小儿寒性泄泻的多中心随机对照临床研究 [J]. 中医儿科杂志, 2023, 19(6): 45-49.
- [9] 聂晓伟, 乔金梅. 儿泻康贴膜联合蒙脱石散治疗小儿非感染性腹泻的临床观察 [J]. 济宁医学院学报, 2020, 43(5): 339-341.
- [10] 王一程, 穆芳园, 王曼宇, 等. 母婴分离联合 3 种应激致腹泻型肠易激综合征大鼠模型的建立和评价 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2314-2317.
- [11] Fan X Y, Shi J C, Liu Y, et al. Cannabidiol-decorated berberine-loaded microemulsions improve IBS-D therapy through ketogenic diet-induced cannabidiol receptors overexpression [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 2839-2853.
- [12] 张剑, 谢美燕, 陈鹤. 神曲消食口服液联合穴位贴敷治疗儿童功能性腹痛的有效性及其安全性系统评价 [J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(13): 2451-2454.
- [13] 张旭, 李梅芳, 胡思源, 等. 中医名方从脾论治儿童功能性腹痛的临床应用 [J]. 中医儿科杂志, 2023, 19(2): 4-6.
- [14] 王超, 唐晓阳. 神曲消食口服液联合穴位贴敷治疗儿童功能性腹痛的效果 [J]. 内蒙古中医药, 2022, 41(7): 84-85.
- [15] 胡思源. 儿童功能性腹痛中药临床试验设计与评价技术指导 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(3): 396-401.
- [16] Devanarayana N M, Rajindrajith S, Rathnamalala N, et al. Delayed gastric emptying rates and impaired antral motility in children fulfilling rome III criteria for functional abdominal pain [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(5): 420-425.
- [17] 刘启华, 章浩军. 章浩军从“虚实”论治上腹痛综合征经验 [J]. 中医药通报, 2016, 15(4): 17-19.
- [18] Liu Y L, Liu J S. Irritable bowel syndrome in China: A review on the epidemiology, diagnosis, and management [J]. *Chin Med J*, 2021, 134(12): 1396-1401.
- [19] 魏星旭, 易梦妮, 邓娜, 等. 四神丸对腹泻型肠易激综合征大鼠 5-HT 信号通路表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2024, 33(2): 215-218.
- [20] 武静, 王慧, 李尧锋, 等. 基于“肠脑互动”探讨大建中汤治疗 IBS 大鼠内脏痛的作用机制 [J/OL]. 中华中医药学刊: 1-12. (2023-10-20) [2024-05-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20231019.1720.009.html>.
- [21] Taracanova A, Alevizos M, Karagkouni A, et al. SP and IL-33 together markedly enhance TNF synthesis and secretion from human mast cells mediated by the interaction of their receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(20): E4002-E4009.
- [22] Awad K, Barmeyer C, Bojarski C, et al. Epithelial barrier dysfunction in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) via downregulation of Claudin-1 [J]. *Cells*, 2023, 12(24): 2846.
- [23] Govindarajan A, Rao B S S, Nair D, et al. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(35): 13208-13213.
- [24] 廖路敏, 邹玲, 李奎武, 等. 基于下丘脑-脊髓-结肠轴探讨艾灸改善腹泻型肠易激综合征大鼠内脏高敏感的

- 作用机制 [J]. 针刺研究, 2024, 49(1): 47-56.
- [25] Itomi Y, Tanaka T, Matsushita K, *et al.* Pharmacological evaluation of a novel corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist T-3047928 in stress-induced animal models in a comparison with alosetron [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2020, 32(5): e13795.
- [26] 裴丽霞, 张伟, 宋亚芳, 等. 电针“天枢”穴对感染后肠易激综合征内脏高敏感模型大鼠结肠肥大细胞活化和 P 物质的影响 [J]. 针刺研究, 2018, 43(7): 419-423.
- [27] 胡静, 杨华元. 艾灸刺激物理信号的传导途径及其作用 [J]. 中国针灸, 2021, 41(5): 577-581.
- [28] 解倩倩. 腹泻小鼠肠道 CFTR 基因的表达及离子转运作用研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
- [29] 王萍, 汪镇朝, 刘英孟, 等. 丁香挥发油的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(3): 871-878.
- [30] 杨维奇. 清热止痛中药联合丁香油治疗可复性急性牙髓炎临床观察 [J]. 光明中医, 2019, 34(4): 524-526.
- [31] 林思, 秦慧真, 邓玲玉, 等. 胡椒碱的药理作用及机制研究进展 [J]. 中国药房, 2022, 33(13): 1653-1659.
- [32] Yu W J, Li S, Bao L D, *et al.* Piperine treating sciatica through regulating inflammation and MiR-520a/P65 pathway [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(6): 412-421.
- [33] 张文动. 吴茱萸碱和吴茱萸次碱对慢性痛模型小鼠的镇痛作用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- [34] 倪晓婷, 李兆星, 陈晨, 等. 吴茱萸的化学成分与生物活性研究进展 [J]. 中南药学, 2022, 20(3): 657-667.
- [35] 吴存恩, 王瑞平, 滕钰浩. 肉桂活性成分及抗肿瘤作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(8): 1985-1987.

[责任编辑 高源]