

# 小檗碱对甲亢性腹泻大鼠结肠及血浆中神经肽 Y 含量的影响

霍莹莹 李芸兰 成志锋<sup>△</sup> 李 波 王明丽

(哈尔滨医科大学附属第四医院内分泌科 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要** 目的 探讨小檗碱对甲状腺功能亢进(甲亢)性腹泻大鼠结肠及血浆中神经肽 Y 的影响,进而研究小檗碱治疗甲亢性腹泻的机制。方法 制备甲亢性腹泻大鼠模型。应用小檗碱对其干预,采用免疫组化方法测定甲亢性腹泻组、小檗碱治疗剂量组、健康组大鼠结肠神经肽 Y 的定位,采用酶联免疫方法检测各组大鼠血浆中神经肽 Y 含量的变化。结果 在结肠组织中,甲亢性腹泻组与健康对照组比较 NPY 表达明显增多,经小檗碱治疗后 NPY 表达较甲亢性腹泻组表达减少,接近健康对照组的表达。在血浆中, NPY 的表达在甲亢性腹泻组与健康对照组中增多,经小檗碱治疗后 NPY 表达较甲亢性腹泻组表达减少,接近健康对照组的表达。结论 甲亢性腹泻大鼠结肠及血浆中 NPY 的表达明显增多,小檗碱治疗后 NPY 的表达又减少,接近健康对照组。NPY 可能参与甲亢性腹泻的发生机制。

**关键词** 甲状腺功能亢进 腹泻 小檗碱 神经肽 Y

中图分类号:Q95-3, R581.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)24-4620-04

## Investigate the Effect of Berberine on Neuropeptide Y in Rats Colon Tissue and Plasma of Thyroid Hormone-Induced Diarrheic

HUO Ying-ying, LI Yun-lan, CHENG Zhi-feng<sup>△</sup>, LI Bo, WANG Ming-li

(Department of Endocrinology, The fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin Heilongjiang, 150001, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of berberine on Neuropeptide Y (NPY) in colon and plasma of thyroid hormone-induced diarrheic (hyperthyroid diarrhea, HD) rats and to study the mechanism of berberine in the treatment of hyperthyroidism.

**Methods:** The model of thyroid hormone-induced diarrheic rats were prepared and interfered by berberine. Immunohistochemistry was used to detect the location of the Neuropeptide Y in colon of hyperthyroid diarrhea group, dose group of berberine and healthy group. ELISA was used to detect the content of Neuropeptide Y in plasma of each group. **Results:** NPY expression in colon tissue, hyperthyroid diarrhea group increased compared with that in the healthy group. NPY expression in berberine treatment group decreased compared with that in the hyperthyroid diarrhea group, closed to the expression of the healthy control group. In plasma, NPY expression in the hyperthyroid group and diarrhea in healthy control group increased. NPY expression in berberine treatment group compared with that in hyperthyroid diarrhea group decreased, and which was close to the expression of the healthy control group. **Conclusion:** NPY expression increased significantly in rats colon tissue and plasma of thyroid hormone-induced diarrheic. NPY expression reduced by berberine treatment, closed to the healthy control group. NPY may be involved in the mechanism of diarrhea in hyperthyroidism.

**Key words:** Hyperthyroidism; Diarrhea; Berberine; Neuropeptide Y

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R581.1 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)24-4620-04

### 前言

甲亢性腹泻是甲状腺机能亢进的常见并发症,不仅严重影响甲亢患者的生活质量,而且还会对患者的身体造成伤害。甲亢性腹泻不但存在肠道动力增高、转运时间缩短,而且还存在消化不良以及分泌异常的因素。一般认为是自主神经受累的一种临床表现,造成这种自主神经病变的原因尚不十分清楚,因此给治疗带来了困难<sup>[1]</sup>。人们生活水平的提高和健康意识的增加,甲亢性腹泻作为一种功能性疾病备受关注。

对甲亢性腹泻目前还没有有效的治疗方法,一般多应用止泻剂、中药合剂,近期疗效不好,远期疗效差。因此探讨甲亢性腹泻的治疗,具有重要的临床意义。本文通过探讨甲亢性腹泻过程神经肽 Y(NPY)的变化,旨在为小檗碱治疗甲亢性腹泻提

供客观理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品与试剂

甲状腺片由南京生物化学制剂厂生产,批号 980204,每片 40mg、上海实业联合集团长城药业有限公司生产,规格 40mg/片,批号 20061001。盐酸小檗碱片(黄连素片)由哈尔滨凯程制药有限公司生产,规格 0.1g/片,批号 070503。FT3、FT4 放射免疫试剂盒由北京东雅生物技术研究所提供。

兔抗鼠 NPY 多克隆抗体购自武汉博士德公司,二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。显微镜(Olympus-CH-CX21)、彩色病理图像分析软件(Motic, BA2000)等。NPY 酶联免疫试剂盒由武汉博士德公司提供。酶标仪(美国),恒温水槽。8 周龄雄性 SD 大鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。(清洁级,许可证编号 SCXK(沪)2007-0005,哈尔滨医科

<sup>△</sup>通讯作者 成志锋 E-mail: wgcgczf@vip.sina.com

(收稿日期 2012-03-21 接受日期 2012-04-18)

大学公共卫生学院实验动物中心饲养)。

1.2 实验动物与分组

成年雄性SD大鼠(体重200-220克)130只,按体重随机分为健康对照组(10只),甲亢性腹泻造模组(120只),健康对照组按每只大鼠1mL/d生理盐水灌胃;甲亢性腹泻模型组给予生理盐水配制成40mg/mL的甲状腺片混悬液,每只大鼠1mL/d灌胃给药。给药四周后,收集湿粪,尾静脉采血,分离血清,根据血清FT3、FT4及TSH水平、体重、湿粪总数<sup>[2]</sup>共获得42只甲亢性腹泻大鼠,造模成功率约35%,随机筛选出20只甲亢性腹泻大鼠,将甲亢性腹泻大鼠按体重随机分为甲亢性腹泻组和小檗碱治疗组,每组10只,共20只。甲亢性腹泻组:每只1mL/d甲状腺片混悬液灌胃,小檗碱治疗组:给予浓度0.06g/kg的小檗碱灌胃,健康对照组继续按每只大鼠1mL/d生理盐水灌胃。

1.3 甲亢性腹泻大鼠的湿粪测定方法

按参考文献方法,各组大鼠于末次给药后1h,每小时换吸水纸1次,7~24h作最后计数<sup>[3]</sup>。计算各组大鼠24h湿粪总数。

1.4 标本采集及处理

动物在灌胃第7d晚,禁食12h,次日摘眼球取血后,脱颈处死,迅速剖腹,离断胃肠道结肠,取大鼠结肠组织一段,约

3cm长,用生理盐水冲洗其腔内容物,矢状分两段,其一放于-80度的液氮中冷冻保存,另一段放入4%甲醛中固定。将静脉血注入试管中,4°(3500r/min)离心,取血浆放-70°保存备用。

1.5 试验方法

NPY的测定采用免疫组化方法测定健康组、甲亢腹泻组、小檗碱治疗组大鼠结肠NPY的定位,采用酶联免疫方法检测各组大鼠血浆中NPY的含量。

1.6 统计学分析

所有数据应用统计软件SPSS17.0分析,计量资料用均数±标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,各组间两两比较用t检验和SNK-q检验,组间统计学比较采用完全随机设计的方差分析,P<0.05为差异有显著性。

2 结果

2.1 甲亢性腹泻大鼠动物模型复制结果

复制出42只甲亢性腹泻大鼠(成功率约35%)。甲亢性腹泻大鼠与健康对照组比较,体重降低,进食、饮水增加,FT3、FT4升高,出现稀便,两组比较差异显著有统计学意义(P<0.01)。

表1 甲亢性腹泻大鼠动物模型复制情况(均数±标准差)  
Table 1 Duplication Condition of Animal Model of Hyperthyroid Diarrheic Rats( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Weight/g	FT3/pmol/L	FT4pmol/L	TSH/UIU/mL	Wet manure/g
Health group	388.40±13.92	6.37±0.95	16.19±2.57	392±0.74	10.51±1.48
Hyperthyroidism diarrhea group	291.70±22.65*	12.72±1.85*	34.30±5.93*	1.55±0.28*	16.47±1.49*

Note: \*Comparison of between healthy group and hyperthyroidism diarrhea group P<0.01.

2.2 大鼠结肠黏膜免疫组化结果

免疫组化结果显示,各组大鼠结肠黏膜均有NPY的表

达,结果见附图1。健康组、甲亢腹泻组、与治疗剂量组比较差异均有统计学意义(P<0.05),结果见附表2。

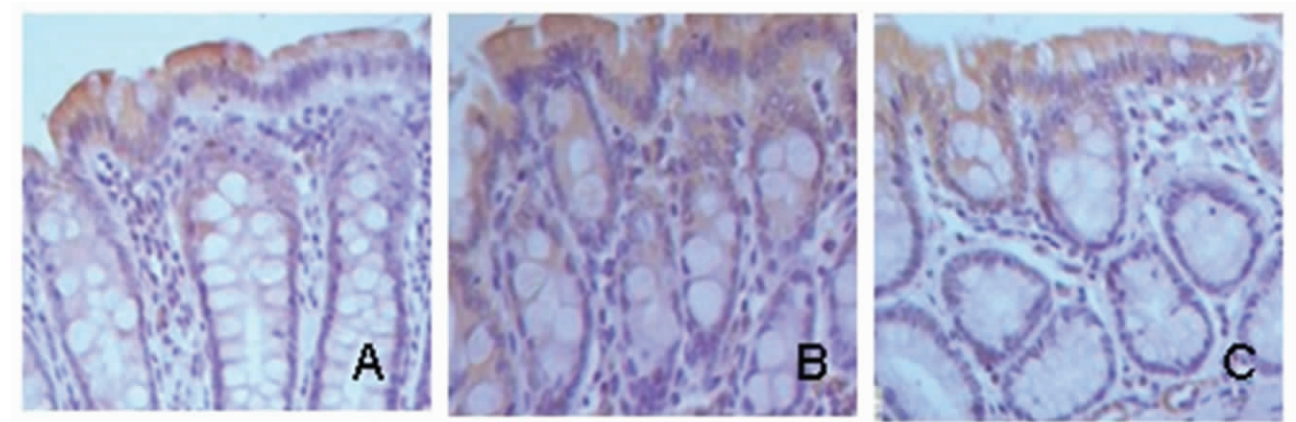


图1 结肠NPY健康对照组;B:甲亢性腹泻组;C:小檗碱治疗组的表达(免疫组化×400)  
Fig.1 Health group;B: hyperthyroidism diarrhea group;C:treatment group (DAB×400)

2.3 结肠各组间NPY阳性表达的比较

结肠组织中甲亢性腹泻组NPY阳性表达较健康对照组增

多,经小檗碱治疗后NPY阳性表达较甲亢性腹泻组减少,有统计学差异(表3)。

表 2 三组大鼠结肠中 NPY 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison of NPY in three colon groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Position group		Classification of colon cells with positive rate				Total	P
		+	++	+++	++++		
Colon	Health group	6	1	3	0	10	0.0429*
	Hyperthyroidism diarrhea group	1	4	2	3	10	0.0219**
	Treatment group	6	2	1	1	10	0.0559***
	Total	13	7	6	4	30	

Note : \*three groups Kruskal-Wallis test P; \*\*Comparison of between Hyperthyroidism diarrhea group and health group Wilcoxon test P;

\*\*\*Comparison of between Hyperthyroidism diarrhea group and Treatment group Wilcoxon test P.

## 2.4 大鼠血浆酶联免疫方法检测

酶联免疫方法显示 :各组大鼠血浆中均有 NPY 的表达 ,甲

亢性腹泻组 NPY 较健康对照组明显增多 ,经小檗碱治疗后

NPY 含量较甲亢性腹泻组减少 ,有统计学差异。

表 3 各组大鼠血浆中 NPY 含量的比较(ng/l)  
Table 3 Comparison of NPY in plasma of rats of groups (ng/l)

Case	n	NPY in plasma of rats
Health group	10	23.431± 1.774
Hyperthyroidism diarrhea group	10	42.602± 3.212
Treatment group	10	27.685± 1.503

## 3 讨论

### 3.1 甲状腺功能亢进性腹泻的原因

甲状腺功能亢进性腹泻的原因有以下几个因素<sup>[3-5]</sup>:(1) 由于甲状腺激素分泌过度 ,作为促动力激素 ,产生的高代谢症候群 ,使肠蠕动加速 ,影响食物的消化与吸收 ,而发生腹泻。(2) 小肠的基础电节律和慢波活动增减 ,说明小肠收缩活动增加 ,甲状腺激素可刺激肠道细胞产生 cAMP ,使肠道分泌类似霍乱样物质及血管活性肠肽。(3) 小肠对脂肪吸收障碍 ,粪便中有时含大量黏液 ,肠内滞留物排泄加速 ,影响脂肪的吸收 ,可出现脂肪泻。(4) 甲状腺素和儿茶酚胺具有协同作用 ,高甲状腺素使儿茶酚胺作用增强。

甲亢性腹泻一般具有以下几个特点<sup>[5]</sup> :①无腹痛的反复腹泻 ,无夜间泻 ,无里急后重 ,伴有消瘦、心悸、多食、焦躁等症状。②肠道检查无器质性病变但肠蠕动加快。③抗生素无效而止泻药敏感。

甲状腺激素的一个重要作用就是增加静息时间的代谢率 ,并对产热有允许作用<sup>[6]</sup>。甲状腺激素可以是基础代谢率紊乱和产热增加 ,体内消耗增加 ,从而使中枢神经系统神经肽 Y 增加 ,以增加进食<sup>[7]</sup>。甲状腺激素的分泌受自主神经系统的调节和影响<sup>[8,9]</sup> ,脑肠轴甲状腺激素的活动严格而规律 ,在生理功能和中枢神经系统的发生发展中起到重要的作用<sup>[10]</sup>。另有研究显示甲状腺功能亢进可诱导不同的肽类激素改变<sup>[11]</sup>。

### 3.2 脑肠肽的研究

脑肠肽是具有神经递质和激素双重功能的小分子多肽 ,在调节内脏感觉、分泌和运动中起着重要作用。目前认为甲亢性腹泻的发病是多种因素综合作用的结果 ,脑肠肽对部分病人起

重要作用<sup>[12]</sup>。脑肠肽既可作为肠道肽能神经释放的神经递质或调节介质起调节作用 ,也可直接作用于胃肠道感觉神经末梢或平滑肌细胞的相应受体而调节肠道的感觉和运动 ,同时亦参与中枢神经系统调节胃肠道的功能。内脏感觉的高敏感性可能与神经调节和传递介质释放失调或感觉神经末梢对这些介质的敏感性增加有关 ,可引起神经末梢  $K^+$  和  $Ca^{2+}$  通道改变。已证实有多种小分子肽类 ,如血管活性肠肽、神经肽 Y、神经降压素、P 物质、钙基因相关肽等作为神经传递和调节介质 ,在调节内脏感觉和运动中起重要作用 ,同时这些小分子肽类也由胃肠道的内分泌细胞分泌 ,在胃肠道的分泌和运动中起极其重要的调节作用<sup>[13]</sup>。

3.2.1 神经肽 Y 的发现及结构 已有研究表明在回肠 Karolinska 学院 Taremoto 从猪脑组织中纯化出的由 36 个氨基酸组成的多肽 ,它属于胰多肽家族 ,分子量 4.215.000 ,其 N 端和 C 端各有一个酪氨酸残基和酪氨酸酰胺残基 ,C 端的酰基化对 NPY 的活性至关重要 ,N 端的酪氨酸残基与稳定 NPY 的三级结构和结合 NPY 受体密切相关。从分子结构上看 ,人、大鼠、豚鼠 ,NPY 的氨基酸顺序完全相同。X 射线晶体结构图像提示 ,NPY 的空间三维结构有两个相互平行的螺旋区 ,一个富含脯氨酸的螺旋和一个螺旋 ,两个螺旋区都有两性电离的特点 ,两个螺旋之间借疏水键维持稳定。据报道 ,目前已克隆出 6 型 Y(1),Y(2),Y(3),Y(4),Y(5),Y(6),它们均是 G 蛋白偶联受体<sup>[14]</sup>。

3.2.2 神经肽 Y 的分布及功能 神经肽 Y 广泛分布于中枢神经系统和肠道交感神经丛中。Magni 研究认为 NPY 通过 G 蛋白结合受体(NPY-Rs) 与配体结合而发挥其作用 ,可能是甲亢腹泻的机制之一<sup>[15]</sup>。在胃肠道中神经肽 Y 主要由结肠 L 细胞分泌 ,对胃肠运动和分泌是抑制作用<sup>[16]</sup>。结肠的主要功能是重吸收



水分和少量的无机盐,使从小肠排入的食物残渣转为粪便,并使其成形。结肠水分吸收是体内水液吸收的终末环节,尤其远端结肠对水分的吸收与粪便含水量及便质关系密切。目前研究发现 NPY 与腹泻型肠易激综合症、糖尿病结肠功能紊乱、炎症性肠病等的发病有关。肠神经丛中 NPY 可与肠粘膜下神经节中的周围性胆碱乙酰转移酶(pChAT)相结合,发挥其效能<sup>[17]</sup>,或在中枢 NPY 通过作用于海马和下丘脑而发挥拮抗应激、稳定情绪的作用<sup>[18]</sup>,NPY 还具有抑制胰腺分泌水、碳酸氢盐和蛋白质,还具有收缩血管和控制结肠自律的功能<sup>[19]</sup>。

3.2.3 神经肽 Y 与甲亢之间的关系 已经有研究证明,NPY 是体内个刺激食欲,增加营养物质吸收重要物质,可产生对碳水化合物选择性的多食,长期给预 NPY 可导致肥胖症。甲亢腹泻大鼠多表现易激惹,多食,消瘦等<sup>[20]</sup>。也有研究表明,甲亢患者 NPY 水平升高,而甲亢患者 NPY 水平减低,这说明 NPY 与甲状腺激素之间存在一定的关系。甲亢患者 NPY 升高,这可能是甲状腺激素可以是基础代谢率紊乱和产热增加,体内消耗增加,从而使中枢神经系统 NPY 增加,以增加进食。

3.2.4 神经肽 Y 与腹泻的关系 研究显示甲亢性腹泻是由于甲状腺激素分泌过度所引起的,它造成胃肠功能兴奋,刺激胃肠激素分泌,使胃肠蠕动加快、消化不良,从而导致腹泻。神经肽 Y 可能与胃肠道蠕动加快有关,肠神经丛中的 NPY 可与肠粘膜下神经节中周围性胆碱乙酰转移酶(pChAT)相结合而发挥其效能<sup>[21]</sup>,或在中枢通过作用于海马和下丘脑而发挥其拮抗应激、稳定情绪的作用<sup>[22]</sup>。

本实验研究发现甲亢腹泻体内存在 NPY 升高的病理状态,与国内外研究基本一致,推测 NPY 升高可导致大鼠应激能力增强,胃肠道蠕动加快,肠道运动时间缩短肠道水分分泌增多,从而产生腹泻的症状。甲亢腹泻大鼠血浆及结肠组织 NPY 水平均显著高于正常对照组,因此在中枢拮抗应激和稳定情绪的作用较差,导致大鼠腹泻症状,同时,甲亢腹泻大鼠血浆及结肠组织 NPY 水平升高可能与胃肠道蠕动加快、肠道转运时间减慢有关。

#### 参考文献 (References)

- [1] Kotaro Y, Masaya H. The spontaneously diabetic Torii rat with gastroenteropathy [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 27(2):127-134
- [2] Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation[J]. Pharmacol Rev, 2004, 56: 249-290
- [3] 戴为信. 腹泻与内分泌疾病[J]. 中国实用内科杂志, 2003, 23 (10) : 586-587  
Dai Wei-xin. Diarrhea and endocrinous diseases [J]. Chinese journal of practical internal medicine, 2003, 23(10):586-587
- [4] 窦敬芳. 甲亢性腹泻误诊为结肠炎 18 例分析[J]. 中国误诊学杂志, 2006, 6(6):11-12  
Dou Jing-fang. Analysis of 18 cases of misdiagnosed hyperthyroidism diarrhea as colitis [J]. Chinese Journal of misdiagnostics, 2006, 6(6): 11-12
- [5] 宋烈. 甲状腺功能亢进性腹泻 82 例临床分析[J]. 临床医学, 2008, 28 (6) : 82-83  
Song Lie. Analysis of 82 cases of hyperthyroidism diarrhea [J]. Clinical Medicine, 2008, 28(6):82-83
- [6] Koppw. Blum levels predict amenorrhea in underweight and eating disordered females [J]. Mol psychiatry, 1997, 2:335-3395
- [7] Koopman, pi-sunyer Fx. Large changes in food intake in diabetic rats fed high-fat and Low-fat diets[J]. Brain Res Bull, 1986, 17:816
- [8] Lechan RM, Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism [J]. Prog Brain Res, 2006, 15(3):209-235
- [9] Kohno I, Iwasaki H, Okutani M, et al. The influence of hyperthyroidism on autonomic nervous system and circadian blood pressure profile[J]. American Journal of Hypertension, 1996, 9(4):48
- [10] Ahmed OM, El-Gareib AW, El-Bakry AM, et al. Thyroid hormones states and brain development interactions [J]. Int J Dev Neurosci, 2008, 26(2):147-209
- [11] Buhl T, Nilsson C, Ekblad E, et al. Expression of prepro-VIP derived peptides in the gastrointestinal tract of normal, hypothyroid and hyperthyroid rats[J]. Neuropeptides, 1996, 30(3): 237-247
- [12] Casey KL, Minoshima S, Berger KL, et al. Positron emission tomographic analysis of cerebral structures activated specifically by repetitive noxious heat stimuli [J]. J Neurophysiol, 1994, 71:802-807
- [13] Derbyshire SW, Jones AK, Devani P, et al. Cerebral responses to pain in patients with atypical facial pain measured by positron emission tomography [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1994, 57:1166-1172
- [14] Bettio A, Beck SAG. Biophysical methods to study ligand-receptor interactions of neuropeptide Y [J]. Biopolymers, 2011, 60(6):420-437
- [15] Magni P. Hormonal control of the neuropeptide Y system [J]. Curr Protein Pept Sci, 2003, 4(1):45-57
- [16] Flint JS, Ballantyne GH, Goldenring JR, et al. Neuropeptide Y inhibition of VIP stimulated transport in the rabbit distal colon[J]. Arch Surg, 1990, 125: 1561-1563
- [17] Chiochetti R, Poole DP, Kimura H, et al. Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons[J]. Cell Tissue Res, 2003, 311:11-22
- [18] Husum H, Van Kammen D, Termeeer E, et al. Topiramate normalizes hippocampal NPY-LI in flinders sensitive line 'depressed' rats and up-regulates NPY, galanin, and CRH-LI in the hypothalamus: implications for mood-stabilizing and weight loss-inducing effects[J]. Neuropsychopharmacology, 2003, 28: 1292-1299
- [19] 林从敏. 胰多肽: 药理作用和生理功能浅释 [J]. 生理科学进展, 1983, 14:92-96  
Lin Cong-min. Simple explanation of pharmacological and physiological functions of pancreatic polypeptide [J]. Progress in Physiological Sciences, 1983, 14:92-96
- [20] Koopman, pi-sunyer Fx. Large changes in food intake in diabetic rats fed high-fat and Low-fat diets[J]. Brain Res Bull, 1986, 17:816-821
- [21] Chiochetti R, Poole DP, Kimura H, et al. Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons[J]. Cell Tissue Res, 2003, 311:11-22
- [22] Husum H, Van Kammen D, Termeeer E, et al. Topiramate normalizes hippocampal NPY-LI in flinders sensitive line 'depressed' rats and up-regulates NPY, galanin, and CRH-LI in the hypothalamus: implications for mood-stabilizing and weight loss-inducing effects [J]. Neuropsychopharmacology, 2003, 28: 1292-1299