

· 基础研究 ·

大剂量生白术配伍枳实对慢传输型便秘大鼠结肠 5-HT₃ R、5-HT₄ R 表达的影响贡钰霞¹ 王浩¹ 侯毅² 钱海华¹ 谷云飞³ 马健⁴

摘要 **目的** 研究大剂量生白术(70 g)配伍枳实(30 g)对慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)大鼠结肠组织中 5-HT₃R、5-HT₄R 表达的影响。**方法** 采用大黄酸灌胃法建立 STC 大鼠模型。将造模成功大鼠 27 只随机分为模型对照组、普芦卡必利组和枳术组,每组 9 只,另设 10 只为健康对照组。健康对照组、模型对照组予自然喂养,普芦卡必利组予 0.018 mg/100 g (1 mL/100 g) 普芦卡必利悬液灌胃,枳术组予 0.9 mL/100 g 枳术煎剂灌胃,连续给药 4 周。炭末推进率检测大鼠肠道传输功能,Real-time PCR 及免疫组化检测大鼠结肠组织中 5-HT₃R、5-HT₄R mRNA 及蛋白的表达。**结果** 与健康对照组比较,模型对照组大鼠活性炭推进率降低($P < 0.05$),5-HT₃R、5-HT₄R mRNA 及蛋白表达均降低($P < 0.05$);与模型对照组比较,普芦卡必利组和枳术组大鼠活性炭推进率增强($P < 0.05$),5-HT₃R、5-HT₄R mRNA 及蛋白表达均升高($P < 0.05$);普芦卡必利组和枳术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 大剂量生白术配伍枳实可以上调 STC 大鼠结肠组织中 5-HT₃R、5-HT₄R mRNA 及蛋白的表达,促进肠道动力。

关键词 慢传输型便秘; 生白术; 枳实; 5-HT₃受体; 5-HT₄受体

Effects of High-dose Raw *Rhizoma Atractylodis Macrocephala* Combined with *Fructus Aurantii Immaturus* on the Expression of 5-HT₃R and 5-HT₄R in Colon of Rats with Slow Transit Constipation
GONG Yu-xia¹, WANG Hao¹, HOU Yi², QIAN Hai-hua¹, GU Yun-fei³, and MA Jian⁴ 1 Department of Anorectal, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210000); 2 Department of Health Preserving Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 3 Department of First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210000); 4 Department of Basic Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210000)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of high-dose raw *Rhizoma atractylodis macrocephala* combined with *Fructus aurantii immaturus* on the expression of 5-HT₃ receptors and 5-HT₄ receptors in colon tissue of slow transit constipation (STC) rats. **Methods** The STC rat model was established by gavage with rheum officinale. Twenty-seven rats with successful model establishment were randomly divided into the model group, the Prucalopride group, and the *Rhizoma atractylodis macrocephala*-*Fructus aurantii immaturus* (Zhizhu) group, 9 in each group, and 10 SD rats were recruited as normal group. The normal group and the model group rats were given natural feeding. The Prucalopride group rats were intragastrically administered 0.018 mg/100 g (1 mL/100 g) Prucalopride suspension, and the Zhizhu group rats were given 0.9 mL/100 g of Zhizhu Decoction. Every group were continuously fed for 4 weeks. The intestinal transmission function of rats was detected by the promote rate of carbon powder. The expression of 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors mRNA and protein were detected by Real-time PCR and immunohistochemistry, respectively. **Results** Compared with the normal group, the pro-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81573979)

作者单位: 1. 南京中医药大学附属医院肛肠科(南京 210000); 2. 北京中医药大学中医养生实验室(北京 100029); 3. 南京中医药大学第一临床医学院(南京 210000); 4. 南京中医药大学基础医学院(南京 210000)

通讯作者: 马健, Tel: 13770688811, E-mail: 13770688811@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20181210.235

mote rate of carbon powder, the express of 5-HT₃ receptors and 5-HT₄ receptors mRNA and protein decreased in the model group (all $P < 0.05$). Compared with the model group, the promote rate of carbon powder was enhanced ($P < 0.05$), as well as the expression of 5-HT₃ receptors and 5-HT₄ receptors mRNA and protein increased in the Prucalopride group and the Zhizhu group ($P < 0.05$). There were no statistical difference between the Prucalopride group and the Zhizhu group ($P > 0.05$). Conclusion High-dose raw *Rhizoma atractylodis macrocephala* combined with *Fructus aurantii immaturus* could increase the expression of the 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors mRNA and protein in STC rat colon tissues, and promote the intestinal motility.

KEYWORDS slow transit constipation; raw *Rhizoma atractylodis macrocephala*; *Fructus aurantii immaturus*; 5-HT₃ receptor; 5-HT₄ receptor

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)指由于结肠动力障碍,使肠内容物滞留在结肠及结肠运输缓慢所致的便秘,但具有正常的直肠肛管功能^[1],临床主要表现为排便次数减少、无便意或不由自主排便,多数伴有腹胀、纳呆等症状。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是参与调节胃肠道分泌和运动功能的重要神经递质和旁分泌信号分子。其中 5-HT₃受体(5-HT₃R)、5-HT₄受体(5-HT₄R)与胃肠道动力存在紧密联系,其分泌、转运异常都能引起胃肠道疾病。

白术、枳实配伍可治疗胃肠动力障碍性疾病,现代研究发现其具有促进肠道平滑肌运动的作用^[2,3]。本课题组应用大剂量生白术(70 g)配伍枳实(30 g)治疗 STC 患者疗效显著^[4],此比例和剂量由本课题组率先提出,已获得国家专利(专利号:ZL201510090036.8),但是具体治疗机理尚不明确。因此,本课题通过研究大剂量生白术配伍枳实对 STC 大鼠结肠 5-HT₃R、5-HT₄R表达的影响,探索其改善结肠动力的作用机制。

材料与方法

1 动物 40 只 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,周龄 7~8 周,体重(200±20)g,饲养于南京农业大学实验动物中心,按《实验动物管理条例》要求饲养。实验动物合格证号:2008001643378,实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2012-0047,所有实验操作均遵循实验动物伦理委员会指导规定进行。

2 药物 大黄酸混悬液:大黄酸 2 g,由南京泽郎医药科技有限公司提供,用 0.9%生理盐水 100 mL 配制成 2%的混悬液。琥珀酸普芦卡必利片混悬液:琥珀酸普芦卡必利片(2 mg/片,由西安杨森制药有限公司生产,批号:DCL7D00),临用时以蒸馏水配制成 1.8 mg/100 mL 的混悬液。生白术、枳实饮片,由江苏省中医院中药房提供,经鉴定,各项指标均符合规

定。以上二味,加水煎煮 2 次,第一次加 10 倍量水,第二次加 8 倍量水,每次煎煮 1 h,合并煎液,静置,滤过,滤液浓缩至 100 mL,分装,灭菌,置于 4℃冰箱中备用。

3 造模方法 参照张波大黄酸建立“泻剂结肠”^[5]的方法复制 STC 大鼠模型。以大黄酸液(20 mg/mL)灌胃。第 1 循环以 1.2 mL/100 g 大黄酸液隔日灌胃 1 次,直至 80%的大鼠稀便消失;第 2 循环灌 5 天停 2 天,每次用量及用法同前,直至 80%的大鼠稀便消失;第 3 循环灌 5 天停 2 天,加大剂量至每次 1.6 mL/100 g 灌胃,直至 80%大鼠稀便消失。第 3 循环结束 1 周后停止大黄酸灌胃,以普通干饲料喂养 1 周后待处理。

4 分组及给药 30 只大鼠用于造模,共有 27 只大鼠造模成功,予以编号,按随机数字表法随机分为模型对照组、普芦卡必利组和枳术组,每组 9 只。另设健康对照组大鼠 10 只。健康对照组和模型对照组予正常饮食饮水。普芦卡必利组予 0.018 mg/100 g (1 mL/100 g)普芦卡必利悬液灌胃,连续给药 4 周。枳术组予 0.9 mL/100 g 枳术煎剂灌胃,连续给药 4 周。各组给药量均参照人与动物之间体表面积比例(剂量换算用表)折算,相当于 70 kg 体重成人的正常用量^[6]。

5 检测指标及方法

5.1 肠道传输功能测定 用药治疗结束后禁食 24 h,不禁水,灌服 10%活性炭悬液 2 mL/只,40 min 后脱臼处死大鼠,迅速打开腹腔,摘除从幽门到直肠末端的所有肠管,置于盘中,并轻轻将肠管拉直,在松弛状态下测量肠管全长和幽门至炭末前沿的距离,计算活性炭推进长度占肠管全长的百分比^[7]。活性炭悬液推进百分率(%)=[活性炭悬液前端与幽门的距离(cm)/幽门至直肠末端的总长度(cm)]×100%。

5.2 实验标本采集 末次给药后禁食 24 h, 脱臼处死大鼠, 迅速打开腹腔, 采集近端结肠组织(距盲肠约 2 cm)两块, 每块组织长约 1 cm。一块组织置于 10% 福尔马林溶液中固定, 待免疫组织化学法检测。另一块组织迅速投入 -180 ℃ 液氮罐中, 5 h 后转移到 -70 ℃ 冰箱冻存, 待 Real-time PCR 检测时取出。

5.3 免疫组化检测结肠组织中 5-HT₃R、5-HT₄R 表达 取各组大鼠近端结肠组织, 立即用生理盐水冲洗, 放置于 4% 多聚甲醛液中灌注固定, 取材并置于 20% 蔗糖溶液(4 ℃)中过夜。蜡块制作, 切片, 贴片。切片脱水, 灭活内源性过氧化物酶, 采用枸橼酸修复, 滴加一抗, 4 ℃ 过夜, 次日滴加二抗, 37 ℃ 温育 30 min; 滴加 DAB 显色液, 显微镜下控制显色程度, 终止显色, 苏木素衬染胞核, 脱水, 透明, 封片, 37 ℃ 干燥 48 h, 显微镜观察并照相。采用计算机图像分析系统进行半定量分析, 测定光密度值, 测定阳性区域面积及阳性比率, 计算阳性指数(光密度值 × 阳性比率 × 100%), 并计算平均值。

5.4 Real-time PCR 法检测结肠组织中 5-HT₃R、5-HT₄R mRNA 水平 取冻存于 -70℃ 冰箱中的组织, 研磨粉碎, 匀浆、离心等, 提取总 RNA。取 2 μL RNA 样本, 逆转录制备 cDNA。引物设计与合成, 5-HT₃R、5-HT₄R 基因引物由南京金丝瑞科技有限公司合成, 5-HT₃R 的扩增片段长 79 bp, 上游引物: TGCTCTCTGACCTTCACCAG, 下游引物: TCACT-TCTTCTGGTGTTCGC, 5-HT₄R 的扩增片段长 81 bp, 上游引物: CATGGTCAACAAGCCCTATG, 下游引物: TAATAGGCCAGCACCATGAG, 反应体系为 20 μL PCR, 将反应管置于荧光定量 PCR 循环仪中进行扩增。反应结束后, 自动计算定量结果。用相对双 Delta Ct 法(Comparative Delta-delta Ct 法)进行相对定量分析, 公式: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

6 统计学方法 统计学方法采用 SPSS 19.0 软件包进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行比较, 组间两两比较用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠肠道传输功能比较(表 1) 与健康对照组比较, 模型对照组大鼠活性炭推进率降低($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 普芦卡必利组、枳术组大鼠活性炭推进率均增强($P < 0.05$); 普芦卡必利组和枳术组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠活性炭悬液推进率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	n	活性炭推进率
健康对照	10	82.19 ± 1.93
模型对照	9	24.45 ± 1.19 *
普芦卡必利	9	80.60 ± 1.79 Δ
枳术	9	79.67 ± 1.73 Δ

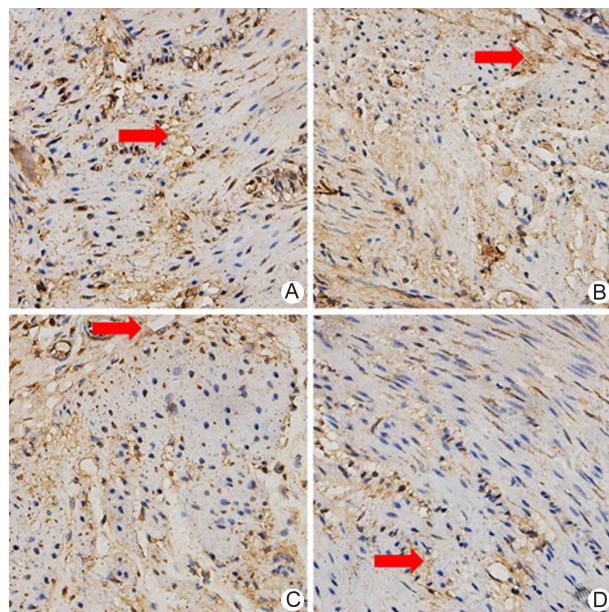
注: 与健康对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$

2 各组大鼠结肠组织中 5-HT₃R、5-HT₄R 蛋白表达比较(表 2, 图 1、2) 5-HT₃R、5-HT₄R 在各组结肠组织中均广泛染色, 黄染部分即为阳性表达。与健康对照组比较, 模型对照组大鼠 5-HT₃R、5-HT₄R 蛋白表达降低($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 普芦卡必利组、枳术组大鼠均升高($P < 0.05$); 普芦卡必利组和枳术组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠结肠组织中 5-HT₃R、5-HT₄R 蛋白表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HT ₃ R	5-HT ₄ R
健康对照	10	126.89 ± 31.22	108.22 ± 29.19
模型对照	9	32.75 ± 25.01 *	55.44 ± 31.82 *
普芦卡必利	9	92.97 ± 24.98 Δ	72.48 ± 7.76 Δ
枳术	9	90.47 ± 16.27 Δ	69.26 ± 7.46 Δ

注: 与健康对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$



注: A 为健康对照组; B 为普芦卡必利组; C 为枳术组; D 为模型对照组; 箭头所指为阳性表达处; 下图同

图 1 各组结肠组织的 5-HT₃R 蛋白阳性染色 ($\times 200$)

3 各组大鼠结肠组织中 5-HT₃R、5-HT₄R mRNA 表达比较(表 3) 与健康对照组比较, 模型对照组大鼠 5-HT₃R、5-HT₄R mRNA 表达降低($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 普芦卡必利组、枳术组大鼠

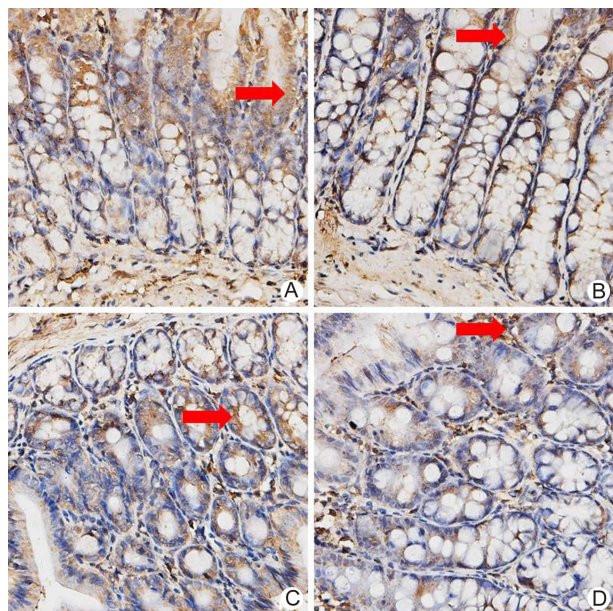


图 2 各组结肠组织的 5-HT₄R 蛋白阳性染色 (×200)

均升高($P < 0.05$);普芦卡必利组和枳术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠结肠组织中 5-HT₃R、5-HT₄R mRNA 表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HT ₃ R mRNA	5-HT ₄ R mRNA
健康对照	10	1.01 ± 0.09	1.01 ± 0.06
模型对照	9	0.23 ± 0.03 *	0.33 ± 0.02 *
普芦卡必利	9	0.83 ± 0.05 Δ	0.90 ± 0.03 Δ
枳术	9	0.80 ± 0.04 Δ	0.88 ± 0.04 Δ

注:与健康对照组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

随着人类饮食结构改变、生活节奏加快和社会心理因素的影响,STC 的发病率逐年上升,约占慢性便秘的 45.5%^[8]。其可发生于不同年龄人群,并随着年龄的增长而增加,是临床常见的慢性胃肠病,严重影响人类的身心健康。近年来,促胃肠动力药在治疗 STC 中的运用逐渐增加,通过不同环节调节胃肠道平滑肌的运动,恢复胃肠正常蠕动,改善胃肠道症状而起治疗作用。但是临床可应用的促胃肠动力西药种类较少,且多有其自身局限性,目前临床应用较广的是高选择性 5-HT₄R 激动剂普芦卡必利。

研究发现,胃肠道 5-HT 信号系统异常与多种胃肠道疾病的发病机制相关^[9-11]。人体中约 95% 的 5-HT 来源于消化道,其产生的效应是通过多种 5-HT 受体介导的。5-HT 受体主要有 7 大类型:5-HT₁—5-HT₇,共 15 个亚型,其中 5-HT₁、2、3、4、7 受体主要位于胃肠道,调节胃肠道功能。而 5-HT₃R、

5-HT₄R 与胃肠运动功能最为密切,是胃肠功能障碍治疗的主要靶点^[12-14]。5-HT₃R 属于配体门控阳离子通道受体,主要分布于肠黏膜下神经丛和肌间神经丛的神经元上^[13],其在功能性胃肠疾病中的作用机制主要集中在肠易激综合征的研究上,在便秘中的研究相对较少。但是 5-HT₃R 在 STC 发病机制中的作用是客观存在的,其可以通过影响细胞外 Ca²⁺ 的浓度增加间质细胞的活性,从而提高胃肠道的运动能力^[15]。多篇文献报道 5-HT₃R 拮抗剂能抑制结肠蠕动,减少消化液分泌,导致便秘发生^[16-18]。5-HT₄R 属于 G 蛋白偶联受体,主要分布于肠神经元、肠平滑肌细胞、肠上皮细胞上,激活后能增强肠道平滑肌收缩,增加肠道分泌,在 STC 发病机制中占有重要作用。高亲和力的 5-HT₄R 激动剂普芦卡必利,可明显改善 STC 患者的自发排便次数和便秘相关症状^[19]。因此,STC 患者结肠 5-HT₃R、5-HT₄R 表达下降,从而影响肠蠕动、分泌反射的正常进行,可能是 STC 发病的重要机制。

中医学早在《内经》中就有“太阴司天,湿淫所胜,大便难”的论述,明确指出:便秘的病位在脾。脾主运化,关连大肠之传导。因此,STC 病机多为脾虚气弱、肠运失司,故治以健脾益气,助运通便。白术、枳实配伍是健脾理气的经典药对,最早见于《金匱要略》枳术汤,方中枳实、白术用量比为 2:1,以消为主,主治“心下坚大如盘,边如旋盘,水饮所作”,至今是治疗功能性消化不良的良方^[7]。生白术,性甘、温,归脾、胃经,本品健脾助运,补而不滞,大量生用为君药,重在运脾。枳实,性苦、辛,归脾、胃、大肠经,本品辛行苦降,善破气除痞、消积导滞,为臣药。两药配伍,一升一降,旋转中焦之气,可使补而不滞,消而不伤,相得益彰。我们前期临床进行开放、随机研究,用大剂量生白术配伍枳实治疗 STC 患者 62 例 2 个疗程,14 天为 1 个疗程,1 个疗程、2 个疗程及停药 2 周后患者 CCS 及 PAC-QOL 评分均较治疗前明显降低,证实枳术方治疗 STC 临床疗效确切,能显著改善患者的临床症状,提高生活质量^[4]。同时,笔者用不同剂量生白术、枳实配伍治疗 STC 患者,发现大剂量枳术配伍对 STC 患者的临床疗效明显优于低剂量组^[20],进一步证实了大剂量生白术配伍枳实治疗 STC 的有效性。

本实验中大剂量生白术配伍枳实能显著改善 STC 大鼠的便秘症状,肠道传输功能与普芦卡必利疗效相当。在促进大鼠结肠 5-HT₃R、5-HT₄R mRNA 及蛋白表达方面,枳术组明显优于模型对照组,与普芦卡必利组疗效相当,表明大剂量生白术配伍枳实能通过上调大鼠结肠 5-HT₃R、5-HT₄R 的表达而促进肠道

动力,发挥治疗 STC 的作用。因此,深入研究大剂量生白术配伍枳实治疗 STC 的作用机制,有利于发现治疗 STC 的新靶点,开发新的促肠动力中药制剂。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组,中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组. 中国慢性便秘诊治指南(2013, 武汉)[J]. 胃肠病学, 2013, 18(10): 605-612.
- [2] 吴慧, 赵文龙, 单国顺, 等. 生、熟白术之枳术丸对脾虚食积模型鼠作用的比较研究[J]. 中成药, 2013, 35(10): 2093-2097.
- [3] 冯雯, 范一宏, 吕宾. 枳术通便汤治疗慢传输型便秘的临床研究[J]. 江西中医药, 2013, 2(2): 18-21.
- [4] 贡钰霞, 钱海华, 谷云飞. 大剂量生白术配伍枳实治疗慢传输型便秘 62 例[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(10): 56-59.
- [5] 张波, 丁义江. 大黄酸建立“泻剂结肠”大鼠模型的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1815-1816.
- [6] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. 江西医学院学报, 1997, 4: 41.
- [7] 贡钰霞, 侯毅, 谷云飞, 等. 枳实与生白术配伍对慢传输型便秘大鼠肠道传输功能的影响[J]. 中医学报, 2016, 31(12): 1936-1938.
- [8] Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process[J]. Gastroenterol, 2006, 130(5): 1377-1390.
- [9] Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorder[J]. Gastroenterol, 2007, 132(1): 397-414.
- [10] 郝晓冬, 段志军. 5-羟色胺信号系统与胃肠道疾病的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(19): 1697-1704.
- [11] 李倩, 张媛媛, 刘欢, 等. 抑郁症的胃肠道症状与 5-HT 系统关系研究进展[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(12): 157-159.
- [12] 俞媛洁, 陈继红. 5-羟色胺与胃肠动力障碍的关系[J]. 医学综述, 2016, 22(4): 636-639.
- [13] Sikander A, Rana SV, Prasad KK. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome[J]. Clin Chim Acta, 2009, 403(12): 47-55.
- [14] Yu Y, Chen JH, Li H, et al. Involvement of 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in colonic motor patterns in rats[J]. Neurogastroenterol Motil, 2015, 27(7): 914-928.
- [15] Sveshnikov DS, Torshin VI, Smirnov VM, et al. The significance of different 5-HT-receptors in regulation of gastrointestinal motility[J]. Patol Fiziol Eksp Ter, 2014, (3): 45-51.
- [16] Liu HN, Ohya S, Nishizawa Y, et al. Serotonin augments gut pace-maker activity via 5-HT₃ receptors[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24928.
- [17] 冷启宁, 盛军章, 任志兵. 5-HT₃受体拮抗剂所致便秘中医诊治思路与方法[J]. 中医临床研究, 2013, 5(4): 113-114.
- [18] 汪小莉, 赵春妮. 5-HT₃受体拮抗剂相关便秘的研究进展[J]. 天津药学, 2016, 28(3): 54-57.
- [19] Ke M, Tack J, Quigley EM, et al. Effect of prucalopride in the treatment of chronic constipation in Asian and non-asian women: A pooled analysis of 4 randomized, placebo-controlled studies[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2014, 20(4): 458-468.
- [20] 贡钰霞, 王浩, 钱海华, 等. 不同剂量枳实、白术配伍治疗慢传输型便秘的量效分析[J]. 河南中医, 2018, 38(7): 94-97.

(收稿: 2017-08-17 在线: 2019-01-22)

责任编辑: 白 霞