

· 基础研究 ·

附子-肉桂配伍对阳虚型慢传输型便秘大鼠
肠动力及SCF、c-Kit表达的影响张远哲¹ 董文然² 赵罗娜¹ 杨元凤³ 黎豫川³

摘要 **目的** 研究附子-肉桂配伍对阳虚型慢传输型便秘(STC)大鼠肠神经递质、干细胞因子(SCF)及酪氨酸激酶(c-Kit)表达的影响,并探讨其改善肠动力的作用机制。**方法** 将90只SD大鼠随机分为空白组(15只)和模型组(75只),采用盐酸洛哌丁胺结合0℃冰水复合灌胃法建立阳虚型STC大鼠模型。造模成功后70只模型大鼠随机分为模型对照组、附子-肉桂(2:1)组、附子-肉桂(1:2)组、附子-肉桂(1:1)组、附子组、肉桂组、普芦卡必利组,每组10只,同时取空白组为10只。各中药组分别给予相应水煎液灌胃,普芦卡必利组给予0.18 mg/kg普芦卡必利混悬液灌胃,空白组和模型对照组给予10 mL/kg体积蒸馏水灌胃,每天1次,各组均连续灌胃14天。观察大鼠一般情况、粪便含水率、肠道推进率,ELISA法检测结肠5-羟色胺(5-HT)、血管活性肠多肽(VIP)、P物质(SP)含量;免疫组化法观察结肠5-HT、VIP、SP、SCF、c-Kit表达情况;Western Blot法测定SCF、c-Kit蛋白水平,RT-PCR法检测c-Kit、SCF mRNA表达水平。**结果** 与空白组比较,模型对照组粪便含水率、肠道推进率、结肠5-HT、SP表达、SCF、c-Kit蛋白和mRNA表达均下降($P<0.01$),结肠VIP表达增加($P<0.01$)。与模型对照组比较,附子-肉桂(2:1)组、普芦卡必利组粪便含水率、肠道推进率、结肠5-HT、SP表达、SCF、c-Kit蛋白和mRNA表达水平增高($P<0.01$),结肠VIP表达降低($P<0.01$)。与附子-肉桂(2:1)组和普芦卡必利组比较,附子组、肉桂组c-Kit、SCF蛋白和mRNA表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 附子-肉桂(2:1)配伍可有效改善阳虚型STC肠道动力障碍,其促进肠动力的作用与下调VIP表达、上调结肠5-HT、SP、SCF、c-Kit表达水平有关。

关键词 慢传输型便秘;附子-肉桂;肠道动力;神经递质;SCF、c-Kit信号通路;中药

Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata Combined with Cinnamomi Cortex on Intestinal Motility and Expression of SCF and c-Kit in Slow Transit Constipation Rats with Yang Deficiency Syndrome ZHANG Yuan-zhe¹, DONG Wen-ran², ZHAO Luo-na¹, YANG Yuan-feng³, and LI Yu-chuan³
1 Basic Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang (550025); 2 Pharmacy College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 3 Preparation Department, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang (550025)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of the Aconiti lateralis Radix Praeparata-Cinnamomi Cortex (ALRP-CC) compound on the expression of intestinal neurotransmitters and stem cell factor (SCF), c-kit proto-oncogene protein (c-Kit) in slow transit constipation (STC) rats with Yang deficiency syndrome, and to explore its mechanism of action for improving intestinal motility. **Methods** Totally 90 SD rats were randomly divided into the blank group ($n=15$) and model group ($n=75$). STC rats with Yang deficiency syndrome were established by loperamide hydrochloride in ice water at 0℃ intragastrically. After successful modeling, 70 rats were randomly divided into the

基金项目:贵州省自然科学基金资助项目(No.黔科合基础[2020]1Y362, No.黔科合基础-ZK[2022]一般510);贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项课题项目(No. QZYY-2021-016)

作者单位:1. 贵州中医药大学基础医学院(贵阳 550025); 2. 北京中医药大学药学院(北京 100029); 3. 贵州中医药大学第二附属医院药学部(贵阳 550025)

通讯作者:黎豫川, Tel: 0851-88233090, E-mail: 531533319@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230828.058

model control group, ALRP-CC (2:1) group, ALRP-CC (1:2) group, ALRP-CC (1:1) group, ALRP group, CC group, and prucalopride group, 10 in each group, and the blank group including 10 rats. Rats in each Chinese medicine group were given the corresponding water decoction intragastrically; rats in the prucalopride group were given prucalopride suspension $0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ intragastrically. Meanwhile, rats in the blank group and model control group were given distilled water $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ intragastrically, once daily for 14 consecutive days. Rats' general condition, water content in feces, and intestinal transit rate were observed. The 5-hydroxy-tryptamine (5-HT), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), and substance P (SP) in the colon were detected using ELISA. The expression of 5-HT, VIP, SP, SCF and c-Kit in the colon were observed by immunohistochemistry. The expression of SCF and c-Kit proteins and mRNA were detected by Western Blot and RT-PCR, respectively. **Results** Compared with the blank group, the water content in feces, intestinal transit rate, 5-HT and SP expression as well as SCF and c-Kit protein and mRNA expression in the colon decreased (all $P < 0.01$), and VIP expression in the colon decreased ($P < 0.01$) in the model control group. Compared with the model control group, the water content in feces, intestinal transit rate, and 5-HT and SP expression, as well as SCF and c-Kit protein and mRNA expression in the colon increased ($P < 0.01$), and VIP expression in the colon decreased ($P < 0.01$) in the ALRP-CC (2:1) group and prucalopride group. Compared with the ALRP-CC (2:1) group and prucalopride group, expression of c-Kit and SCF protein and mRNA decreased in ALRP group and CC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** ALRP-CC (2:1) could effectively improved intestinal motility disorder. And its mechanism might related to down-regulated VIP expression and up-regulated 5-HT, SP, SCF and c-Kit expression in the colon.

KEYWORDS slow transit constipation; *Aconiti lateralis Radix Praeparata* compined with *Cinnamomi Cortex*; intestinal motility; neurotransmitter; SCF and c-Kit signaling pathway; Chinese herbal medicine

慢传输型便秘 (slow transit constipation, STC) 属于功能性便秘, 是多种原因导致的结肠传输动力减慢、传输时间延长而引起, 在我国发病率逐年升高^[1]。长期便秘可诱发结肠癌、直肠癌、心脑血管疾病等, 并引起焦虑、抑郁等情志异常, 严重影响人类的身心健康及生活质量^[1, 2]。目前临床缺乏治疗 STC 的特效药, 现代医学治疗主要采用缓泻剂、手术及生物反馈疗法等, 泻剂容易出现结肠黑变病、泻剂结肠等不良反应^[3], 手术治疗潜在并发症较多^[4], 生物反馈疗法国内起步较晚, 缺乏循证医学证据支持, 不利于临床推广^[5]。

肠道动力障碍是 STC 的主要病理改变, 其发生与 Cajal 神经间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC)、肠神经递质有密切关系^[6-8]。ICC 可以诱导肠道肌肉自律性活动 (慢波), 并介导肠神经传递以促进结肠运动, 在调节肠胃运动中有核心作用, 而 ICC 的分化、增殖与干细胞因子 (stem cell factor, SCF)、酪氨酸激酶 (c-kit proto-oncogene protein, c-Kit) 信号通路密切相关^[9]。随着中医学的发展, 中药在本病的治疗中受到越来越多的关注, 被广泛用于本病的研究中。STC 属中医学“便秘”范畴, 阳虚证是本病的多发证型, 温阳方药在阳虚型 STC 的治疗中具有重要作用。附子-肉桂是经典温阳药对, 在众多温阳方剂中高频出现, 临床研究显示附子-肉桂

配伍应用能够明显改善阳虚便秘^[10, 11]。本研究应用附子-肉桂配伍干预阳虚型 STC 大鼠, 通过 5-羟色胺 (5-hydroxy-tryptamine, 5-HT)、血管活性肠多肽 (vasoactive intestinal polypeptide, VIP)、P 物质 (substance P, SP) 等神经递质、SCF、c-Kit 表达变化探讨其推动肠动力的相关机制。

材料与方法

1 动物 SPF 级 4~6 周龄 SD 大鼠 90 只, 雌雄各半, 体重 (200 ± 20) g。购自成都达硕实验动物中心, 生产许可证号为: SYXK (川) 2015-010。饲养于屏障环境, 采用分笼饲养, 每笼 5 只大鼠, 自由饮食、饮水, 保持温度 $20 \sim 26^\circ\text{C}$, 相对湿度 $40\% \sim 70\%$, 昼夜光照。本实验经过贵州中医药大学实验动物伦理委员会审批 (No. 20210042)。

2 药物 普芦卡必利片 (2 mg / 片, 江苏豪森药业集团有限公司, 批号: 13320070), 将其研磨至粉末状, 再用蒸馏水配制成 0.018 mg/mL 混悬液 (根据成人剂量换算成大鼠剂量^[12], 成人每日口服剂量为 2 mg , 标准成人体重为 70 kg , 得出大鼠每日给药剂量为 0.18 mg/kg 现用现配)。盐酸洛哌丁胺 (2 mg / 粒, 西安杨森制药有限公司, 批号: JGJOM4J), 用蒸馏水配制成 0.2 mg/mL 混悬液, 现用现配。单味药附子、肉桂及附子-肉桂配伍水煎液制备方法:

白附片、肉桂饮片购自贵州中医药大学第二附属医院(贵阳济仁堂中药饮片厂,批号:20200801,20200901)。分别称取饮片白附片 15 g、肉桂 15 g、白附片 10 g/肉桂 5 g (2:1 比例)、白附片 7.5 g/肉桂 7.5 g (1:1 比例)、白附片 5 g/肉桂 10 g (1:2 比例)。单味药附子、肉桂及不同比例配伍下成人每日用量含生药均为 15 g,依据人与大鼠体表面积系数法换算大鼠用药剂量,大鼠每日剂量 $=6.25 \times (15 \text{ g}/70 \text{ kg})^{[12]}$,计算得出不同比例配伍下大鼠每日剂量给药剂量均为每只 1.3 g/kg。采用以下方法制备单味药附子、肉桂水煎液:将白附片、肉桂分别加入纯化水,白附片第一次煎煮 60 min,滤出药液,第二次煎煮 25 min,滤出药液,合并两次滤液,得到附子水煎液;肉桂第一次煎煮 30 min,滤出药液,第二次煎煮 25 min,滤出药液,合并两次滤液,得到肉桂水煎液。采用以下方法制备两药不同比例水煎液:白附片加入纯化水先煎 30 min,后加入肉桂共同煎煮 30 min,滤出药液,第二次煎煮 25 min,滤出药液,合并两次滤液,得到两药不同比例水煎液。将上述各水煎液分别用 100 ℃水浴浓缩为 0.13 g 生药材/mL 浓度的药液,4 ℃保存备用。

3 主要试剂与仪器 主要试剂: DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,货号: ZLI-9018); 正常山羊血清(北京中杉金桥生物有限公司,货号: SP9002); 5-HT1A (ABcam 公司,货号: ab85615); SP-1 抗(北京博奥森生物技术公司,货号: Bs-0065r); VIP-1 抗(Bioworld, 货号: Bs07153); 二抗(Servicebio, 货号: GB23303)兔克隆 c-Kit 抗体(abclonal, 货号: A0357); 兔克隆 SCF 抗体(proteintech, 货号: 26582-1-ap); Western 及 IP 细胞裂解液(Beyotime, 货号: P0013); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime, 货号: P0009); 预染蛋白 Marker (ABClone, 货号: RM19001); CL 发光试剂盒(Affinity, 货号: KF001); β -actin 抗体,兔克隆抗体(abclonal, 货号: AC026); 生物素化山羊抗兔 IgG (H+L)(affinity, 货号: s0001); RNA Trizol Reagent(合肥博美生物科技有限公司生产,批号: BM1144); PrimeScript RT reagent Kit(宝日医生物技术有限公司,货号: RR047A); TB Green TM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus), (宝日医生物技术有限公司,货号: RR820A)。

主要仪器: 垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司,型号: JY-SCZ4+); 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司,型号: JY200C); 实时荧

光定量(RT-PCR)仪(美国 ThermoFisher 仪器有限公司生产,型号: QuantStudio 3); 高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔科技有限公司生产,型号: KZ-III -F); 低温离心机(湖南湘仪实验仪器厂生产,型号: C2500); 显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司,型号: BA410); 包埋机(常州郊区中威电子仪器厂,型号: BMJ-III); 切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号: RM2016)。

4 动物分组与模型建立 90 只大鼠适应性饲养 1 周,完全随机法分为空白组(15 只)和模型组(75 只)。模型组大鼠每日给予 8 mg/kg 盐酸洛哌丁胺混悬液加灌 20 mL/kg 的 0 ℃冰水灌胃^[12],连续给药 45 天。空白组相同时间予蒸馏水灌胃,连续灌胃 45 天。造模过程无大鼠死亡,造模结束后两组随机选择 5 只大鼠计算粪便含水率,灌胃 10% 碳末后处死测肠推进率,粪便含水率减少、肠道推进率减缓提示造模成功^[12]。造模成功后,70 只模型大鼠随机分为模型对照组、附子-肉桂(2:1)组、附子-肉桂(1:2)组、附子-肉桂(1:1)组、附子组、肉桂组、普芦卡必利组,每组 10 只,同时空白组为 10 只大鼠。

5 给药方法 附子-肉桂(2:1)组、附子-肉桂(1:1)组、附子-肉桂(1:2)组、附子组、肉桂组分别给予相应水煎液灌胃,普芦卡必利组给予 0.18 mg/kg 普芦卡必利混悬液灌胃,空白组和模型对照组大鼠给予 10 mL/kg 体积蒸馏水灌胃,每天 1 次,各组大鼠均连续灌胃给药 14 天。

6 检测指标及方法

6.1 粪便含水率检测 各组随机选择 5 只大鼠,分别于造模结束后、末次给药后取 24 h 粪便,称其湿重,放入干燥箱中烘干后称粪便干重,计算粪便含水率。粪便含水率(%) = (粪便湿重 - 粪便干重) / 粪便湿重 $\times 100\%$ 。给药期间观察大鼠一般情况、粪质干湿情况。

6.2 肠道推进率检测 各组大鼠分别于造模结束后(各组随机选择 5 只大鼠)、末次给药后 30 min 灌胃 10% 碳末(2% CMC-Na 配制成混悬液,0.5 mL/只),20 min 后颈椎脱臼处死大鼠,迅速解剖取出肠道,用直尺记录幽门至回盲部总长度和墨汁在肠道中推进的距离(幽门到墨汁推进前端的距离)。按照“推进距离 / 幽门至回盲部总长度 $\times 100\%$ ”计算肠推进率。

6.3 ELISA 法检测结肠 5-HT、VIP、SP 表达 取各组大鼠部分结肠组织准确称取质量、除去残留血液,按质量体积比 1:9 加入 PBS,使用组织研磨

仪进行组织匀浆,匀浆液在 $5\,000\times g$ 条件下,离心 10 min,取上清液待测,常规 ELISA 法检测血清、结肠 5-HT、VIP、SP 含量。

6.4 免疫组化检测结肠 5-HT、VIP、SP、SCF、c-Kit 表达 检测各组结肠 5-HT、VIP、SP 表达,结合前期检测结果,取各比例附子-肉桂配伍组中与模型对照组比较差异最显著组别与空白组、模型对照组、附子组、肉桂组、普芦卡必利组检测 c-Kit、SCF 表达水平。干预给药结束后处死大鼠,从肛门上约 3 cm 处向上剪取约 3 cm 结肠组织,挤出残留粪便,立即用 0.9% 氯化钠溶液清洗血液及杂物。取部分结肠组织固定、修切、石蜡包埋并切片,脱蜡至水,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶, PBS 洗 3 次,血清封闭,滴加一抗, $4\,^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBS 洗 3 次后滴加二抗, $37\,^{\circ}\text{C}$ 30 min; PBS 洗 3 次, DAB 显色,复染细胞核,清水返蓝后流水冲洗,脱水封片。使用显微摄像系统对切片进行图像采集,苏木素染细胞核为蓝色, DAB 显出的阳性表达为棕黄色。使用 Halo 数据分析系统计算每张图像阳性面积占比 (%)。样本量为 4。

6.5 Western Blot 检测 c-Kit、SCF 蛋白表达水平 干预给药结束后处死大鼠,根据前期检测结果,取各比例附子-肉桂配伍组中与模型对照组比较,差异最显著组别与空白组、模型对照组、附子组、肉桂组、普芦卡必利组检测 c-Kit、SCF 蛋白表达水平,取上述组别部分结肠组织放入另 1.5 mL EP 管中,迅速放入 $-80\,^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱冻存。组织解冻后取出放入 2 mL 研磨管中,然后向每管加入 3 mm 钢珠及 RIPA 裂解液(按照质量比样本:裂解液 = 1:10),置于高速低温组织研磨仪内(温度 $-20\,^{\circ}\text{C}$, 研磨 4 次,每次 60 s);取出放 $4\,^{\circ}\text{C}$ 冰箱 30 min 进行裂解,30 min 后取出放入离心机($4\,^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心、10 min);离心完后取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。放入化学发光凝胶成像系统曝光,用天能 GIS 机箱控制软件 V2.0 对条带进行扫描并分析。样本量为 6。

6.6 实时荧光定量(RT-PCR)检测 c-Kit、SCF mRNA 表达水平 根据前期检测结果,取各比例附子-肉桂配伍组中与模型对照组比较差异最显著组别,与空白组、模型对照组、附子组、肉桂组、普芦卡必利组检测 c-Kit、SCF mRNA 表达水平,取上述组别适量组织转移至已加入 1 mL TRIzol 的 1.5 mL 无酶 EP 管,捣碎,完全分离核酸蛋白复合物,提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,扩增反应体系为预变性

$95\,^{\circ}\text{C}$, 30 s, 循环反应 $95\,^{\circ}\text{C}$, 5 s, 退火 $55\,^{\circ}\text{C}$, 30 s, 荧光采集 $72\,^{\circ}\text{C}$, 30 s, 45 个循环。结果以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算相对 mRNA 表达水平。引物设计使用 Primer Premier 软件进行筛选,以 β -actin 为管家基因,所有引物均交由上海生工生物工程技术服务有限公司设计合成,引物序列详见表 1。样本量为 6。

表 1 引物序列

基因	序列(5'-3')	长度(bp)
β -actin	上游: CATCACTATCGGCAATGAGCGGTTCC	410
	下游: ACGCAGCTCAGTAACAGTCCGCCTA	
c-Kit	上游: CCACTCACACGGGCAATACACG	84
	下游: GTACGGCAGGATCTCTAACGAACAC	
SCF	上游: TCTCGTCAAACTCAGGAGATCTGC	125
	下游: CATCCATCCCGGCGACATAGTTG	

7 统计学方法 用 SPSS 21.0 软件分析,各组数值均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组采用单因素方差分析,两两比较方差齐用 LSD 法比较,方差不齐用 Tamhane's 比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般情况 模型建立期间,空白组大鼠活动自如、反应迅速、抓爬有力、毛发光泽、胡须粗壮、饮食饮水正常、大小便正常。模型组大鼠活动减少、反应迟缓、爪甲青紫、弓背蜷缩、毛发苦涩减少、大便先稀溏,而后干硬减少。各中药干预组给药后上述情况均有所改善。

2 各组大鼠粪便含水率、肠道推进率比较(表 2) 造模后肠推进率和粪便含水率空白组分别为 ($63.55\%\pm 7.54\%$) 和 ($11.65\%\pm 1.40\%$);模型组分别为 ($39.13\%\pm 8.70\%$) 和 ($7.45\%\pm 0.80\%$),与空白组比较,模型组粪便含水率、肠道推进率明显降低($P<0.01$),提示 STC 模型造模成功。给药后,与模型对照组比较,附子-肉桂(2:1)组、肉桂组、

表 2 各组大鼠肠推进率、粪便含水率比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	肠推进率	粪便含水率
空白	5	67.10 ± 10.28	10.41 ± 0.86
模型对照	5	$39.79\pm 10.81^*$	$6.65\pm 0.80^*$
附子-肉桂(2:1)	5	$60.62\pm 6.26^{\Delta}$	$9.33\pm 1.20^{\Delta}$
附子-肉桂(1:1)	5	51.09 ± 10.66	7.11 ± 0.32
附子-肉桂(1:2)	5	49.32 ± 9.23	7.52 ± 0.89
附子	5	50.24 ± 5.28	7.28 ± 1.73
肉桂	5	$55.59\pm 5.43^{\Delta}$	$7.59\pm 2.05^{\Delta}$
普芦卡必利	5	$63.46\pm 11.82^{\Delta}$	$9.71\pm 0.66^{\Delta}$

注:与空白组比较, $*P<0.05$;与模型对照组比较, $^{\Delta}P<0.05$

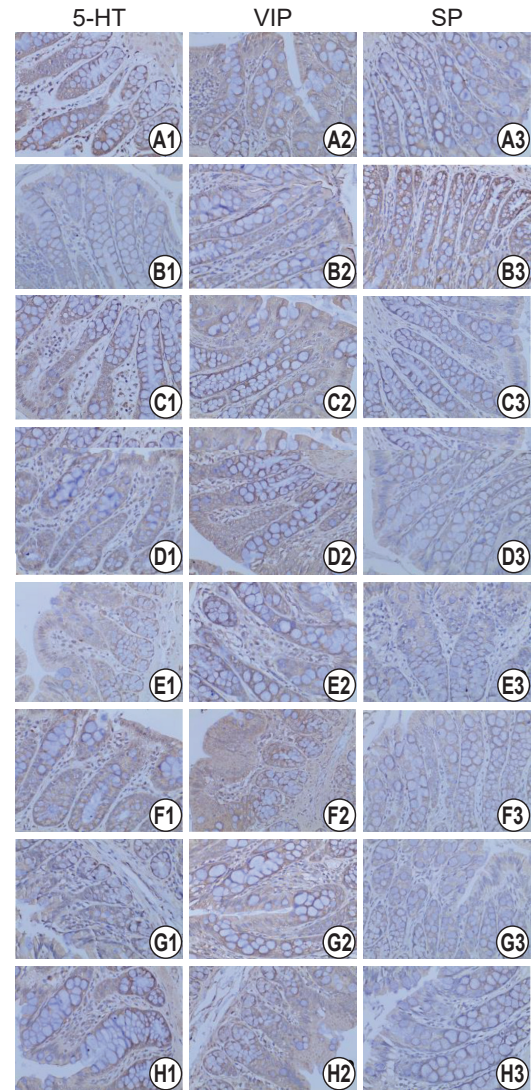
普芦卡必利组肠推进率升高 ($P<0.05$), 附子 - 肉桂 (2:1) 组、附子 - 肉桂 (1:2) 组、肉桂组、普芦卡必利组粪便含水率升高 ($P<0.05$); 给药组之间比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 各组大鼠结肠 5-HT、VIP、SP 比较 (表 3) 与空白组比较, 模型对照组结肠 5-HT、SP 浓度降低, VIP 浓度明显升高 ($P<0.01$)。与模型对照组比较, 附子 - 肉桂 (2:1) 组、附子 - 肉桂 (1:1) 组、附子组、普芦卡必利组大鼠结肠 5-HT 浓度升高, VIP 浓度降低 ($P<0.01, P<0.05$), 附子 - 肉桂 (2:1) 组、附子组、普芦卡必利组 SP 度升高 ($P<0.01, P<0.05$); 给药组之间比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

4 各组大鼠结肠 5-HT、VIP、SP 表达水平比较 (图 1, 表 4) 与空白组比较, 模型对照组结肠 5-HT、SP 表达下降 ($P<0.01$), VIP 表达增高 ($P<0.01$); 与模型对照组比较, 附子 - 肉桂 (2:1) 组、普芦卡必利组 5-HT、SP 明显增高 ($P<0.01$), 附子 - 肉桂 (1:1) 组 5-HT 明显增高 ($P<0.05$), 普芦卡必利组、附子 - 肉桂 (2:1) 组、附子组、肉桂组 VIP 表达明显降低 ($P<0.01, P<0.05$)。各给药组之间比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

5 各组大鼠结肠 c-Kit、SCF 表达水平比较 (图 2, 表 5) 与空白组比较, 模型对照组大鼠结肠 c-Kit、SCF 表达下降 ($P<0.01$); 与模型对照组比较, 各组大鼠结肠 c-Kit、SCF 均有下降, 其中普芦卡必利组、附子 - 肉桂 (2:1) 组差异有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$)。与附子 - 肉桂 (2:1) 组比较, 普芦卡必利组、附子组、肉桂组结肠 c-Kit 表达下降, 其中附子组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

6 各组大鼠 c-Kit、SCF 蛋白表达比较 (图 3、表 6) 与空白组比较, 模型对照组大鼠结肠 c-Kit、SCF 蛋白表达下降 ($P<0.01$); 与模型对照组比较, 普芦卡必利组、附子 - 肉桂 (2:1) 组 c-Kit 蛋白



注: A 为空白常组; B 为模型对照组; C 为附子 - 肉桂 (2:1) 组; D 为附子 - 肉桂 (1:2) 组; E 为附子 - 肉桂组 (1:1); F 为附子组; G 为肉桂组; H 为普芦卡必利组

图 1 各组大鼠结肠 5-HT、VIP、SP 表达水平比较 (IHC, $\times 40$)

表达升高 ($P<0.01$), 各药物组 SCF 蛋白表达均升高 ($P<0.01$)。与附子 - 肉桂 (2:1) 组和普芦卡必利组比较, 附子组、肉桂组 c-Kit 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。

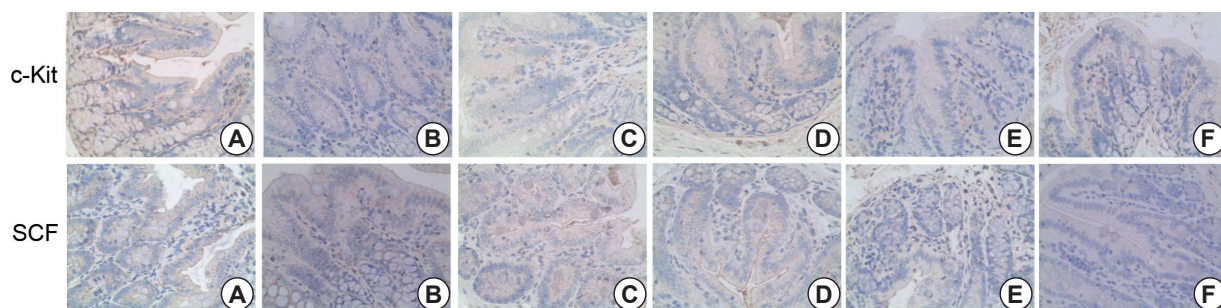
表 3 各组大鼠结肠 5-HT、VIP、SP 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HT (ng/mL)	VIP (pg/mL)	SP (ng/mL)
空白	10	3.49 ± 0.31	7.56 ± 1.12	8.06 ± 1.06
模型对照	10	1.74 ± 0.51*	11.03 ± 1.58*	6.26 ± 0.58*
附子 - 肉桂 (2:1)	10	3.27 ± 0.36 ^{△△}	8.24 ± 1.10 ^{△△}	8.11 ± 1.12 ^{△△}
附子 - 肉桂 (1:2)	10	2.13 ± 0.26	9.32 ± 0.98	6.34 ± 0.37
附子 - 肉桂 (1:1)	10	2.34 ± 0.35 [△]	8.89 ± 0.66 [△]	6.97 ± 0.76
附子	10	2.82 ± 0.39 ^{△△}	8.67 ± 0.52 [△]	7.36 ± 1.11 [△]
肉桂	10	2.09 ± 0.29	9.11 ± 1.02	7.02 ± 0.54
普芦卡必利	10	3.18 ± 0.22 ^{△△}	8.00 ± 0.69 ^{△△}	8.52 ± 0.44 ^{△△}

注: 与空白组比较, * $P<0.01$; 与模型对照型组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$

表 4 各组大鼠结肠 5-HT、SP、VIP 表达比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	阳性面积占比		
		5-HT	VIP	SP
空白	4	8.63 ± 0.65	4.32 ± 0.74	4.98 ± 1.10
模型对照	4	4.61 ± 0.36*	9.04 ± 2.32*	2.23 ± 0.12*
附子-肉桂 (2:1)	4	7.16 ± 0.68 ^{△△}	5.83 ± 1.42 ^{△△}	3.92 ± 0.81 ^{△△}
附子-肉桂 (1:2)	4	5.15 ± 0.61	6.98 ± 1.38	2.72 ± 0.61
附子-肉桂 (1:1)	4	6.18 ± 0.58 [△]	6.32 ± 1.67	2.63 ± 0.12
附子	4	5.96 ± 0.74	4.25 ± 0.64 ^{△△}	3.03 ± 0.32
肉桂	4	5.37 ± 0.31	6.06 ± 1.33 [△]	2.98 ± 0.76
普芦卡必利	4	7.64 ± 0.54 ^{△△}	5.34 ± 1.10 ^{△△}	4.03 ± 1.23 ^{△△}

注:与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 

注: A 为正常组; B 为模型对照组; C 为附子-肉桂 (2:1) 组; D 为普芦卡必利组; E 为附子组; F 为肉桂组

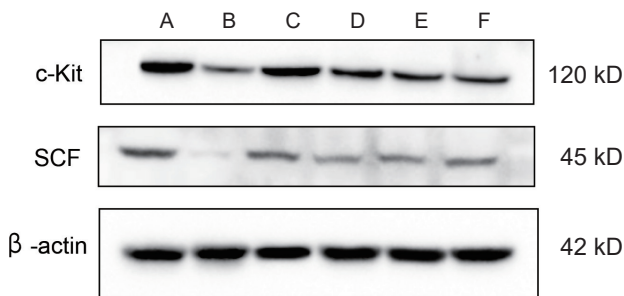
图 2 各组大鼠结肠 c-Kit、SCF 表达水平比较 (IHC, ×40)

表 5 各组大鼠结肠 c-Kit、SCF 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	阳性面积占比 (%)	
		c-Kit	SCF
空白	6	3.72 ± 1.03	4.70 ± 1.05
模型对照	6	0.77 ± 0.75*	0.43 ± 0.20*
附子-肉桂 (2:1)	6	4.55 ± 1.79 ^{△△}	2.72 ± 1.29 [△]
普芦卡必利	6	2.69 ± 2.74 [△]	3.05 ± 1.25 ^{△△}
附子	6	1.77 ± 0.72 [△]	1.95 ± 1.72
肉桂	6	2.19 ± 1.69	1.82 ± 0.28

注:与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与附子-肉桂 (2:1) 组比较, [△] $P < 0.05$ 表 6 各组大鼠 c-Kit、SCF 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	c-Kit	SCF
空白	6	0.98 ± 0.08	1.07 ± 0.08
模型对照	6	0.30 ± 0.09*	0.26 ± 0.18*
附子-肉桂 (2:1)	6	0.63 ± 0.11 [△]	0.71 ± 0.19 [△]
普芦卡必利	6	0.61 ± 0.14 [△]	0.78 ± 0.04 [△]
附子	6	0.36 ± 0.12 ^{△○}	0.67 ± 0.11 [△]
肉桂	6	0.43 ± 0.12 ^{△○}	0.70 ± 0.19 [△]

注:与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, [△] $P < 0.01$; 与附子-肉桂 (2:1) 组比较, [△] $P < 0.05$; 与普芦卡必利组比较, [○] $P < 0.05$ 

注: A 为空白组; B 为模型对照组; C 为附子-肉桂配伍组 (2:1); D 为普芦卡必利组; E 为附子组; F 为肉桂组

图 3 各组大鼠 c-Kit、SCF 蛋白表达

表 7 各组大鼠 c-Kit、SCF mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	c-Kit / (2 ^{-△△△△})	SCF / (2 ^{-△△△△})
空白	6	1.01 ± 0.16	1.04 ± 0.33
模型对照	6	0.05 ± 0.05*	0.08 ± 0.06*
附子-肉桂 (2:1)	6	0.51 ± 0.16 [△]	0.69 ± 0.32 [△]
普芦卡必利	6	0.55 ± 0.30 [△]	0.75 ± 0.32 [△]
附子	6	0.15 ± 0.03 ^{△○}	0.30 ± 0.12 ^{△△○○}
肉桂	6	0.18 ± 0.10 ^{△○}	0.34 ± 0.18 ^{△△○○}

注:与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, [△] $P < 0.01$; 与附子-肉桂 (2:1) 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与普芦卡必利组比较, [○] $P < 0.05$, ^{○○} $P < 0.01$

7 各组大鼠 c-Kit、SCF mRNA 表达水平比较 (表 7) 与空白组比较, 模型对照组 c-Kit、SCF mRNA 表达下降 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 普芦卡必利组、附子-肉桂 (2:1) 组 c-Kit、SCF

mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 与附子-肉桂 (2:1) 组和普芦卡必利组比较, 附子组、肉桂组 c-Kit、SCF mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

STC 属中医学“便秘”范畴,病位在大肠,与肺、脾、肾均有联系,临床上阳虚型是本病的常见证型^[13]。现代临床研究指出,本病证患者多由于劳累耗气或贪凉饮冷,过用寒凉药物导致脾肾阳气虚弱,温煦无权,推动无力,阴寒内结肠道而致^[14],阳虚型 STC 患者临床表现为排便费力,艰涩难解及阳虚证的基础证候表现^[15]。本研究采用杜丽东等^[16]及前期实验^[12]建立阳虚便秘模型的方法,给予盐酸洛哌丁胺联合 0℃ 冰水灌胃方法建立阳虚型 STC 大鼠模型,大鼠在造模后出现精神萎靡、爪甲青紫、弓背蜷缩等畏寒怕冷等表现,符合中医阳虚证临床症状及已有模型结果^[15],结合模型组大鼠肠道推进率下降,粪便含水率减少,与既往 STC 模型建立结果一致^[7, 9]。提示盐酸洛哌丁胺混悬液与 0℃ 冰水复合灌胃成功制备阳虚型 STC 大鼠模型。

中医学认为“阳主动”,大肠的传导功能依赖阳气的推动,对于阳虚型 STC 治疗应注意温阳方药的配伍应用。附子、肉桂是古代先秦至明清时期温下方剂中的高频药对^[10]。附子善入气分而温通散寒,肉桂善入血分而温经通脉,二药相须为用,既得通阳化气,又可和阳通滞^[17]。临床研究显示,吴佩衡应用附子配伍肉桂治疗肠胃疾病获得良好疗效^[18]。历代含附子、肉桂的温阳剂中二药配伍比例以 2:1、1:1 为多,现代实验研究发现,附子与肉桂 2:1 比例配伍后总碱、酯碱含量下降幅度均较小,从而较好的保留了附子的有效成分的含量^[19]。故本研究选用 2:1、1:1、1:2 比例附子-肉桂配伍观察对阳虚型 STC 大鼠肠动力障碍改善情况。研究发现,与模型对照组比较,各给药组大鼠肠推进率及粪便含水率均增加,同时各中药干预组大鼠爪甲青紫、弓背蜷缩等表现好转,尤其以附子-肉桂(2:1)组效果显著。提示附子-肉桂能够有效纠正大鼠阳虚状态,调节肠道运转,增加肠道推进率,其作用优于单味药附子、肉桂,可见两药配伍后发挥协同增效作用,加强了温通助阳的功效。

肠动力障碍是 STC 的主要病理特点^[20]。SP 是胃肠道的兴奋性神经递质,具有促进肠道蠕动的的作用,肠 SP 含量下降是 STC 发生的重要原因之一^[7]。5-HT 具有调节胃肠道动力的功能,研究显示 STC 患者结肠 5-HT 表达降低^[8]。VIP 具有舒张平滑肌而减慢结肠运动的作用^[7, 8],属于抑制性神经递质,研究表明 VIP 浓度升高能松弛胃肠道平滑肌而导致 STC 发生^[21]。本研究结果显示,与空白组比较,模型对

照组大鼠结肠 SP、5-HT 表达降低, VIP 表达升高。与模型对照组比较,附子-肉桂(2:1)组、附子组、普芦卡必利组大鼠结肠 5-HT、SP 表达升高, VIP 表达降低,提示附子-肉桂(2:1)改善阳虚型 STC 大鼠肠动力障碍的作用与改变 5-HT、SP 及 VIP 表达相关。

本实验发现,不同比例附子-肉桂配伍组中对阳虚型 STC 大鼠肠动力促进及肠神经递质调节最显著组别为附子-肉桂(2:1)组,为进一步研究附子-肉桂(2:1)配伍改善肠动力的机制,本实验对大鼠结肠 SCF、c-kit 表达进行检测。ICC 是胃肠道慢波活动的起搏和调节细胞,在调节胃肠道慢波电位、介导神经信号、维持节律性运动等方面具有重要作用^[22]。ICC 既能够接受 SP、5-HT 等兴奋性神经递质介导肠壁紧张性收缩,加速肠道运动;同时也能够接受抑制性神经递质如 VIP 等,令肠壁松弛^[23, 24]。SCF、c-kit 是 ICC 正常生长、增殖和分化以及 ICC 网络表型和功能维持所必需的信号通路^[25, 26]。研究发现 c-Kit 或 SCF 功能缺陷的突变大鼠在小肠中表现出明显的 ICC 缺陷^[27],STC 患者乙状结肠内 c-Kit 阳性的 ICC 面积减少,外源性 SCF 通过 SCF、c-Kit 途径能够维持 ICC 数量和功能^[28]。本研究结果显示,与空白组比较,模型对照组大鼠结肠 c-Kit、SCF 阳性面积表达显著减少, mRNA 及蛋白表达下调,推测阳虚型 STC 大鼠 SCF、c-Kit 表达减少,影响 ICC 功能,从而影响肠道肌肉慢波传导和神经传递,最终导致胃肠运动障碍的发生。给药后,附子-肉桂(2:1)组及普芦卡必利组大鼠结肠 c-Kit、SCF 表达面积、蛋白水平以及基因表达水平均有所增加,且趋势优于单一附子、肉桂组,表明附子肉桂配伍相须、相使,有效改善 SCF、c-Kit 表达低下状态,提高 ICC 功能,恢复肠道运动节律。

综上所述,附子-肉桂(2:1)配伍对阳虚型 STC 大鼠肠道功能障碍有正向调节作用,可能与提升 SCF、c-Kit 基因、蛋白表达水平,上调结肠 5-HT、SP,下调 VIP 表达有关。本研究证实了温阳药对附子-肉桂对阳虚型 STC 的具有明显干预作用,为临床应用用于本病治疗提供了相关实验依据。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Wang LF, Wu F, Hong YL. Research progress in the treatment of slow transit constipation by traditional Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol,

- 2022, 5 (290): 115075.
- [2] Patton V, Balakrishnan V, Pieri C, et al. Subtotal colectomy and ileorectal anastomosis for slow transit constipation: clinical follow-up at median of 15 years[J]. *Tech Coloproctol*, 2020, 24 (11): 173–179.
- [3] Zhou SL, Zhang XL, Wang JH. Comparison of electroacupuncture and medical treatment for functional constipation: a systematic review and meta-analysis[J]. *Acupunct Med*, 2017, 35 (5): 324–331.
- [4] Bharucha AE, Wald A. Chronic constipation[J]. *Mayo Clin Proc*, 2019, 94 (11): 2340–2357.
- [5] Skaroon GR, Khera AJ, Emmanuel AV, et al. Dyssynergic defaecation and biofeedback therapy in the pathophysiology and management of functional constipation[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 46 (4): 410–423.
- [6] Kaji N, Hori M. Interstitial cells of Cajal in gastrointestinal inflammatory diseases[J]. *J Smooth Muscle Res*, 2023, 59: 1–13.
- [7] 崔梦晓, 孙瑜培, 李晓峰, 等. 不同频率电针“天枢”对慢传输型便秘大鼠结肠肌电及 P 物质、血管活性肠肽的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47 (8): 710–714.
- [8] 魏小丽, 王宇航, 李成, 等. 针刺天枢穴联合莫沙必利治疗对习惯性便秘患者血清 VIP、MTL、5-HT 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39 (7): 95–98.
- [9] Wang H, Ren BB, Pan J. Effect of miR-129-3p on autophagy of interstitial cells of Cajal in slow transit constipation through SCF C-kit signaling pathway[J]. *Acta Biochim Pol*, 2022, 69 (3): 579–586.
- [10] 黎豫川. 温下方剂配伍规律的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [11] 邵贵宏, 叶常春, 张晓琳, 等. 吴佩衡附子与肉桂配伍经验[J]. *河南中医*, 2012, 32 (7): 826–828.
- [12] 张远哲, 赵罗娜, 黎豫川. 3 种方法建立阳虚型慢传输型便秘大鼠模型比较研究[J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31 (5): 618–628.
- [13] 黄璇. 慢传输型便秘与出口梗阻型便秘的中医证型分布研究[J]. *内蒙古中医药*, 2016, 2 (155): 159–160.
- [14] 白克运, 韩玮玮, 王本军. 附子丁香散加味穴位贴敷对阳虚型慢传输型便秘大鼠血清血管活性肠肽、P 物质水平的影响[J]. *山东医药*, 2018, 58 (3): 42–44.
- [15] 周仲瑛主编. 中医内科学[M]. 第 5 版. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 266.
- [16] 杜丽东, 任远, 牛亭惠, 等. 3 种模拟中医体征的体虚便秘大鼠模型建立及效果观察[J]. *中国应用生理学杂志*, 2017, 33 (2): 140–145.
- [17] 邓家刚, 范丽丽, 郝二伟, 等. 附子的回阳救逆量效关系研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16 (9): 150–154.
- [18] 邵贵宏, 叶常春, 张晓琳, 等. 吴佩衡附子与肉桂配伍经验[J]. *河南中医*, 2012, 32 (7): 826–828.
- [19] 叶强, 石媛慧, 彭成. 附子配伍桂枝肉桂调控药性研究[J]. *成都中医药大学学报*, 2011, 34 (3): 65–68.
- [20] Moezi P, Salehi A, Molavi H, et al. Prevalence of chronic constipation and its associated factors in pars cohort study: a study of 9000 adults in southern Iran[J]. *Middle East J Dig Dis*, 2018, 10 (2): 75–83.
- [21] 张喻然, 王波. 济川煎加味联合腹针对慢传输型便秘(脾肾阳虚型)疗效及对血清 SP 和 NO 水平的干预影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26 (3): 238–242.
- [22] Sanders KM. Spontaneous electrical activity and rhythmicity in gastrointestinal smooth muscles[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1124: 3–46.
- [23] Singh RD, Gibbons SJ, Saravanaperumal SA, et al. Ano1, a Ca^{2+} -activated Cl-channel, coordinates contractility in mouse intestine by Ca^{2+} transient coordination between interstitial cells of Cajal[J]. *J Physiol*, 2014, 592 (18): 4051–4068.
- [24] Radu P, Zuru M, Paic V, et al. Interstitial cells of Cajal—origin, distribution and relationship with gastrointestinal tumors[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2022, 59 (1): 63.
- [25] Tong WD, Liu BH, Zhang LY, et al. Expression of c-KIT messenger ribonucleic acid and c-KIT protein in sigmoid colon of patients with slow transit constipation[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2005, 20: 363–367.
- [26] Ma Y, Chen Y, Zheng Y, et al. SCF/c-kit signaling pathway participates in ICC damage in neurogenic bladder[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19 (16): 2074–2080.
- [27] Sanders KM, Ward SM. Kit mutants and gastrointestinal physiology[J]. *J Physiol*, 2007, 578: 33–42.
- [28] Tong W, Jia H, Zhang L, et al. Exogenous stem cell factor improves interstitial cells of Cajal restoration after blockade of c-KIT signaling pathway[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2010, 45: 844–851.

(收稿: 2022-08-08 在线: 2023-09-28)

责任编辑: 白霞