

· 基础研究 ·

橙皮苷改善洛哌丁胺诱导便秘大鼠结肠
SIP 合胞体功能的研究占 煜^{1,2} 闻 永^{3,4} 杜丽娟⁵ 申旭龙⁶ 王晓翔² 王雪霏² 唐学贵⁷

摘要 目的 探讨橙皮苷对便秘大鼠结肠 SIP 合胞体功能的影响及机制。方法 将 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为模型组、橙皮苷低、中、高剂量组和聚乙二醇 4000 散干预组（简称西药组），模型组予以洛哌丁胺 [1.5 mg/(kg·d)] 灌胃，每天 2 次，连续 14 天，建立便秘模型，各干预组在此基础上于第 8 天起同步予以橙皮苷 [50、100、200 mg/(kg·d)] 和聚乙二醇 4000 散 [0.9 g/(kg·d)] 灌胃，每天 1 次，连续 7 天。同时另设 6 只为空白组，灌胃给予等量的生理盐水。观察干预前后大鼠的一般情况、排便情况、体重、进食量、粪便含水量变化。第 1、14 天灌以墨汁后记录首粒黑便时间。采用 ELISA 法检测 5-羟色胺 (5-HT)、5-羟色胺 4 型受体 (5-HT₄R) 含量，HE 染色观察组织形态，Western Blot、qRT-PCR 检测钙激活氯通道蛋白 (ANO1)、酪氨酸受体激酶蛋白 c-kit (c-kit)、血小板衍生因子受体 α (PDGFR α)、P2 嘌呤受体 1 (P2Y₁)、SK3 通道蛋白 (SK3) 蛋白及 mRNA 表达水平。免疫荧光双染检测结肠钙激活氯通道蛋白 (ANO1)-PDGFR α 和 PDGFR α -蛋白基因产物 9.5 (PGP9.5) 的表达分布。结果 与空白组比较，模型组大鼠排便减少，间隔时间延长 ($P<0.01$)，粪质干硬、粪便含水量降低 ($P<0.05$)，结肠 5-HT、5-HT₄R 含量均下降 ($P<0.05$)，组织结构及形态发生改变（上皮坏死脱落、肌纤维肿胀变厚、肌层变薄等），PDGFR α 、ANO1 和 PGP9.5 的阳性染色减少，PDGFR α 、ANO1、P2Y₁、c-kit、SK3 蛋白及 mRNA 水平均降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，橙皮苷中、高剂量组及西药组排便间隔时间缩短，粪便含水量增加，5-HT 和 5-HT₄R 含量升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，橙皮苷均呈剂量-效应关系。橙皮苷高剂量组及西药组结肠组织形态明显恢复，PDGFR α 、ANO1 和 PGP9.5 的阳性染色增加，PDGFR α 、ANO1、P2Y₁、c-kit、SK3 蛋白及 mRNA 水平均增加 ($P<0.01$)。结论 橙皮苷可能通过上调结肠 ANO1、c-kit、PDGFR α 、P2Y₁、SK3 表达水平，恢复 Cajal 间质细胞和 PDGFR α 细胞的表型及功能，改善 SIP 合胞体功能及结肠动力，从而干预便秘大鼠。

关键词 功能性便秘；SIP 合胞体；结肠动力；枳实；橙皮苷；中药

Hesperidin Improves the Function of Colonic SIP Syncytium in Rats with Loperamide Induced Constipation ZHAN Yu^{1,2}, WEN Yong^{3,4}, DU Li-juan⁵, SHEN Xu-long⁶, WANG Xiao-xiang², WANG Xue-fei², and TANG Xue-gui⁷ 1 Department of Anorectal, Affiliated Hospital of Integrative Chinese Medicine and Western Medicine of Chengdu University of TCM, Chengdu (610041); 2 Department of Anorectal and Department of Gastroenterology, Chengdu Integrated TCM & Western Medicine Hospital/Chengdu First People's Hospital, Chengdu (610041); 3 Department of Clinical Medicine, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu (610072); 4 Department of TCM/Anorectal, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan (646099); 5 Department of Anorectal, The Third People's Hospital of Chengdu, Sichuan (610014); 6 Department of Anorectal, Luzhou People's Hospital, Sichuan (646099); 7 Institute of Anorectal Diseases,

基金项目：国家自然科学基金资助项目 (No. 82004173, No. 82074429)

作者单位：1. 成都中医药大学附属中西医结合医院肛肠科 (成都 610041)；2. 成都市中西医结合医院 / 成都市第一人民医院肛肠科、消化内科 (成都 610041)；3. 成都中医药大学附属医院临床医学院 (成都 610072)；4. 西南医科大学附属医院中医科 / 肛肠科 (四川 646099)；5. 成都市第三人民医院肛肠科 (成都 610014)；6. 泸州市人民医院肛肠科 (四川 646099)；7. 川北医学院肛肠疾病研究所 (四川 637000)

通讯作者：唐学贵，Tel: 0817-2598191, E-mail: txg668nc@sohu.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220831.211

North Sichuan Medical College, Sichuan (637000)

ABSTRACT Objective To explore the effects and mechanisms of hesperidin on the function of colonic SIP syncytium in rats with constipation. **Methods** Thirty male Wistar rats were randomly divided into the model group, and intervention groups (hesperidin low/medium/high-dose, and the Macrogol 4000 Powder). The constipation rat model was established by intragastrically administrated with loperamide ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) twice a day for 14 days. On the 8th day of modeling, synchronously, the intervention groups of rats were respectively given hesperidin (50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and Macrogol 4000 Powder ($0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage once a day for 7 days. Meanwhile, another 6 Wistar rats were set up as a blank group and given equal amount of saline by gavage. The changes in general condition, defecation, body mass, food intake, and fecal water content were observed in before and after intervention. Meanwhile, the time of the first black stool was recorded at the 1st and 14th days after the gavage of ink. Contents of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-hydroxytryptamine 4 receptor (5-HT₄R) were measured by ELISA. HE staining was used to observe the pathology of colon tissue. Quantified protein and mRNA levels of anoctamin 1 (ANO1), type III receptor tyrosine kinase (c-kit), platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α), P2Y purinoceptor 1 (P2Y₁), and KCa2.3 (SK3) by Western Blot and qRT-PCR. Finally, the expression and distribution of ANO1-PDGFR α and PDGFR α -protein gene product 9.5 (PGP9.5) were detected by Immunofluorescence double staining in the colon. **Results** Compared with the blank group, the rats in the model group had fewer bowel movements, longer interval-time ($P < 0.01$), dry and hard feces, and lower fecal water content ($P < 0.05$). The 5-HT and 5-HT₄R levels in the colon were significantly decreased ($P < 0.05$). The structure and morphology of colonic tissues altered (epithelial necrosis and detachment, swelling and thickening of muscle fibers, thinning of the muscle layer, etc.). The positive expression of PDGFR α , ANO1, and PGP9.5 were obviously reduced. The mRNA and protein levels of PDGFR α , ANO1, P2Y₁, c-kit, and SK3 reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, the interval between defecation was shortened, the fecal water content increased, and the levels of 5-HT and 5-HT₄R increased in the hesperidin medium, high-dose intervention group, and Macrogol 4000 Powder intervention group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while hesperidin with a dose-dependent manner. It could be observed that apparent recovery of colonic tissue morphology and gain of positive expression of PDGFR α , ANO1, and PGP9.5 in the rats of hesperidin high-dose intervention group and Macrogol 4000 Powder intervention group. At the same time, the mRNA and protein levels of PDGFR α , ANO1, P2Y₁, c-kit, and SK3 upregulated in the colon ($P < 0.01$). **Conclusion** Hesperidin may treat constipated rats by restoring the phenotype and function of interstitial cells of Cajal and PDGFR α + cells and improving the function of SIP syncytium as well as motility via up-regulation of colonic ANO1, c-kit, PDGFR α , P2Y₁, and SK3 expression.

KEYWORDS functional constipation; SIP syncytium; colonic motility; fructus citrus immaturus; hesperidin; Chinese herbs

功能性便秘 (functional constipation, FC) 是一种以排便困难、排便次数减少或排便不尽为主要表现的功能性肠病 (functional bowel disorders, FBDs)^[1]。FC 病理生理较为复杂, 发生因素通常与遗传、生活方式、饮食、肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 功能障碍、神经递质改变等相关。这些因素可导致结肠推动力不足, 直肠敏感性下降^[1]。肠道动力本质上取决于平滑肌细胞 (smooth muscle cells, SMC) 的兴奋性。作为胃肠道时相性收缩即慢波 (slow wave, SW) 的起搏点和传导者, Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC)、血小板衍生因子受体 α 阳性细胞 (platelet-derived growth

factor receptor α -positive cells, PDGFR α + cells) 与 SMC 通过缝隙连接、电耦合共同构成 SIP 合胞体 (SMC-ICC-PDGFR α + cells syncytium, SIP syncytium)。据报道, SIP 合胞体功能与肠道动力密切相关, 参与胃肠基本电节律调控和神经递质信号传导^[2]。传统中药方剂在 FC 的治疗方面占据重要地位。目前, 枳术丸及其配伍药材 (枳实和白术) 加减是常用于纳差、腹胀、便秘等胃肠症状的有确切疗效的临床代表方剂^[3]。本课题组在应用中发现其有促胃肠动力的作用。通过相关文献的查阅, 发现该功能可能与有效组分黄酮 (苷) 类 (如橙皮苷) 有关^[4]。因此, 本研究旨在基于结肠 SIP 合胞体功能探讨橙皮苷干预

洛哌丁胺诱导的大鼠便秘相关作用机制。

材料与方 法

1 动物纳入及排除标准 纳入标准: 选用 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 5 周龄, 体重 125~140 g, 进食、饮水、排便、活动等均正常。排除标准: 体重不达标或进食、饮水、排便、活动等不正常的大鼠。

2 样本量计算方法 本实验应用单因素方差分析进行各组大鼠间各项指标的比较, 大鼠样本量计算公式如下:

$$N1=N2=2 \frac{n(\mu_a+\mu_b)}{(\delta/\sigma)} + \frac{1}{4} \mu_a^2, N1、N2$$

为两样本所需含量; 两总体均数之差 $\delta = \mu_1 - \mu_2$; σ 为总体标准差 (假设两总体标准差相等); μ_a 和 μ_b 分别为检验水准 α 和第二类错误概率 β 对应的 μ 值 ($\alpha=0.05$, $\beta=0.01$)。在未指定 δ 情况, 可对 δ/σ 进行适当假定来估计样本量 N ; 在指定 δ 的情况下, 用样本标准差 S 代替 δ [5]。

3 动物 本实验在四川生物医药产业技术研究院完成, 36 只 5 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体重 125~140 g, 实验动物使用许可证号: SYXK (川) 2018-076, 由四川省实验动物管理委员会颁发, 适用范围为屏障环境大鼠。实验动物饲养环境保持温度 20~26 °C, 湿度 40%~70%, 换气次数为每小时 15 次, 空气洁净度 7 级, 12/12 h 的昼夜节律。实验方案经川北医学院动物伦理委员会审核 [(2021) 106 号], 符合动物保护、动物福利和伦理原则, 符合国家实验动物福利伦理的相关规定。

4 药物 盐酸洛哌丁胺胶囊 (2 mg/粒, 批号: LB J8215) 由西安杨森制药有限公司提供。聚乙二醇 4000 散 (10 g/袋, 批号: P21731) 由马应龙药业集团股份有限公司提供。橙皮苷 (300 mg/盒, 批号: 21060909), 含量为 99.48%, 由成都普菲德生物技术有限公司提供。

5 主要试剂及仪器 钙激活氯通道蛋白 (anoctamin1, ANO1) 抗体 (美国 Bioss 公司, bs-3794R)。酪氨酸受体激酶蛋白 (type III receptor tyrosine kinase, c-kit) 抗体 (英国 Abcam 公司, ab231780)。PDGFR α 抗体 (江苏 Affinity 公司, AF0241)。P2 嘌呤受体 1 (P2Y purinoceptor 1, P2Y1) 抗体 (江苏 Affinity 公司, DF10258)。KCNN3/SK3 通道蛋白 (KCa2.3, SK3) 抗体 (江苏 Affinity 公司, DF13233)。PDGFR α - 蛋白基因产物 9.5 (protein gene product 9.5, PGP9.5) 抗体 (江苏 Affinity 公司, DF6854)。水合氯醛 (上海 Aladdin 公司,

#C104202)。引物 (上海生工生物工程股份有限公司)。正置荧光显微镜 (日本尼康, Nikon ECLIPSE C1)、成像系统 (日本尼康, Nikon DS-U3)、化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司, ChemiScope 610)、台式高速冷冻离心机 (美国赛洛捷克, SCILOGEX D3024)、高速低温组织研磨仪 (武汉赛维尔生物, KZ- III -F)、全自动医用 PCR 分析系统 (上海宏石医疗科技有限公司, SLAN-96S)、电泳仪 (美国 Bio-Rad Laboratories, PowerPac Basic)、光谱仪 (美国伯滕 Bio Tek, μ Quant) 等。

6 动物造模及干预方法 根据《药理实验方法学》计算大鼠等效剂量 [6], 结合文献报道 [7] 和前期研究基础 [8], 35 只 Wistar 大鼠以盐酸洛哌丁胺 (1.5 mg/kg) 灌胃, 1 天 2 次建立便秘模型, 干预时间为 9:00 和 18:00。通过一般情况、排便情况、粪便性状、粪便含水量、首粒黑便时间验证造模成功。造模过程中无死亡, 造模成功 31 只, 成功率 88.6%。选取 30 只用于后续试验。

将所有 Wistar 大鼠适应环境饲养 7 天后采集基线数据, 选取造模成功的 Wistar 大鼠 30 只随机分为模型组、橙皮苷低剂量组、橙皮苷中剂量组、橙皮苷高剂量组、聚乙二醇 4000 散干预组 (简称西药组), 每组 6 只, 单独饲养于代谢笼中。另设空白组 6 只予以造模药等量的生理盐水灌胃 14 天, 在最后 7 天同时予以干预药等量的生理盐水灌胃。模型组予以洛哌丁胺溶液灌胃 14 天, 在最后 7 天同时予以干预药等量的生理盐水灌胃。结合文献报道 [9], 设置橙皮苷低、中、高剂量组予以洛哌丁胺溶液灌胃 14 天, 在最后 7 天同时予以橙皮苷混悬液 [低剂量组: 50 mg/(kg·d); 中剂量组: 100 mg/(kg·d); 高剂量组 200 mg/(kg·d), 分别相当于成人用量的 1、2、4 倍] 灌胃, 干预时间为 13:30。西药组予以洛哌丁胺溶液灌胃 14 天, 在最后 7 天同时予以聚乙二醇 4000 散 [0.9 g/(kg·d)] 灌胃, 干预时间为 13:30。

末次给药后 6 h (24:00) 左右集体处死大鼠, 颈椎脱臼处死大鼠后迅速剖腹, 截取所需位置及质量的结肠肠段组织, PBS 缓冲液轻柔洗净后, 立即置于液氮罐内, -80 °C 冰箱保存组织。

7 检测指标及方法

7.1 一般情况 实验过程中观察并记录各组大鼠的一般情况, 记录每天实验前后的体重、进食量、排便情况等。

7.2 首粒黑便时间 于第 1 天和第 14 天清晨

(7:00), 均给予大鼠 10 mL/kg 的墨汁灌胃, 记录准确灌胃时间及首粒黑便排出时间, 得出间隔时间。

7.3 粪便含水量的检测 及时收集第 1 天和第 14 天实验前 (0:00~7:00) 所有粪便排泄物, 将粪便 (含离心管) 称重 (湿重), 后置于 37 °C 温箱中干燥 5 天, 称干燥后粪便 (含离心管) 重量 (干重), 按以下公式计算粪便含水量。粪便含水量 (%) = (湿重 - 干重) / (湿重 - 离心管重) × 100%。

7.4 ELISA 检测结肠组织中 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 及 5-羟色胺 4 型受体 (5-hydroxytryptamine 4 receptor, 5-HT4R) 含量 截取 100 mg 结肠组织, 剪成小块放入组织研磨器, 加入 1 mL PBS, 制成匀浆, 置于 -20 °C 冰箱过夜。经反复冻融 2 次破坏细胞膜后, 将组织匀浆以 2~8 °C, 5 000 × g, 离心 5 min, 取上清。取适量上清液立即进行实验, 避免反复冻融。操作步骤严格按照 5-HT、5-HT4R EIA kit 试剂盒说明进行。

7.5 HE 染色 结肠组织样本经 4% 多聚甲醛固定, 固定状态良好后, 严格按照病理实验检测 SOP 程序进行修剪、脱水、包埋、切片、染色、封片最后镜检合格的样片, 厚度 3 μm。从 3 个中药干预组中选取便秘表型改善最为明显的 1 个组大鼠结肠组织进行检测及比较, 下同。

7.6 Western Blot 检测结肠组织中 PDGFR α、P2Y1、c-kit、SK3、ANO1 蛋白水平 截取的 Wistar 大鼠结肠组织放入 RIPA 裂解液中于冰上裂解 10 min, 裂解完成后以 1 2000 × g 离心力离心 10 min, 用 BCA 法测定蛋白浓度。配置浓缩胶和 12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。在 S1 模式电压 80 V 和 S2 模式 120 V 电压下分离, 200 mA 将凝胶上的蛋白湿转到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭液室温摇床封闭 1 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜 PDGFR α (1:1 000), KCNN3 (1:1 000), ANO1 (1:1 000), P2Y12 (1:1 000), c-kit (1:1 000)。TBST 漂洗后加入二抗 (HRP 标记山羊抗兔 IgG) (1:10 000), 室温孵育 1 h, 再次 TBST 漂洗。PVDF 膜的蛋白面朝上放在样本托盘上, ECL (biosharp, BL520B) 与此混合液充分接触, 在图像采集软件下采集图像, 使用勤翔化学分析软件进行灰度分析。

7.7 qRT-PCR 检测结肠组织中 PDGFR α、P2Y1、c-kit、SK3、ANO1 的 mRNA 水平 截取距盲肠 2 cm 新鲜近端结肠组织 150 mg, 采用 Tripure 一步法提取细胞 RNA, 取 2 μL RNA 加入 98 μL DEPC-水中, 紫外分光光度计测定 RNA 样品在

260 nm 和 280 nm 处的 OD 值, 以在 1.8~2.0 之间为合格。以 RNA 为模版反转录合成 cDNA。按总体积 20 μL (顺序: 上游引物 1.0 μL、下游引物 1.0 μL、FastStart Universal SYBR Green Master 10.0 μL、cDNA 模版 5.0 μL、H₂O 3.0 μL) 加待测样品基因反应体系: 反应条件为: 95 °C 10 min, 循环 1 次; 95 °C 15 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s, 循环 40 次; 最后加熔解曲线 (95 °C 15 s、60 °C 15 s, 逐渐升至 95 °C 超过 30 min)。在 PCR 仪上反应, 每份样品 3 个复孔测定, 设阴性、空白对照。通过分析软件得到样品阈值循环数 (Ct) 和相对的拷贝定量, 再进行样本之间的比较。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对结果进行数据分析, $\Delta Ct =$ 目的基因 Ct - 内参基因 Ct; $\Delta\Delta Ct =$ 干预组 ΔCt - 空白组 ΔCt ; 相差倍数 $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 对照组的数值设为 100%。引物信息如下 (表 1)。

表 1 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
β-Actin	上游: TGTCACCAACTGGGACGATA	165
	下游: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	
ANO1	上游: GTTCGTTGCGTCCTTCCCTCTG	119
	下游: TGGCTCTGATGGCTACTGGTCTC	
c-Kit	上游: CAACGGCACGGTGGAGTGAAG	99
	下游: GGCTGGATTGCTCTTTGCTGTTAC	
PDGFR α	上游: AAGATTGTGCCGCTGAGTTTCGTC	129
	下游: GCTACTGTTGTTCTCCTCGGTTCTG	
SK3	上游: CGGCTTTTCAGGGCTCCCAATTC	124
	下游: CTTGTGGCTGTGGAAGTGGAGAG	
P2Y1	上游: GGCAGCATCTTGTTCCTCACCTG	126
	下游: CCACCACCACAATGAGCCATACC	

7.8 免疫荧光 (双重染色) 检测结肠组织中 ANO1-PDGFR α 和 PDGFR α-PGP9.5 的表达 分别脱蜡至水: 依次将石蜡切片放入二甲苯 I 15 min-二甲苯 II 15 min-无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-85% 酒精 5 min-75% 酒精 5 min-蒸馏水洗。抗原修复: 置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH8.0) 的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。中火 8 min 停火 8 min 转中低火 7 min, 此过程中应防止缓冲液过度蒸发, 切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS (pH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。画圈自发荧光淬灭: 切片稍干后用组化笔在组织周围画圈 (防止抗体流走), 在圈内加入自发荧光淬灭剂 5 min, 流水冲洗 10 min。血清封闭: 在圈内滴加 BSA 孵育 30 min。加一抗 (PDGFR α) 后将切片平放于湿盒内 4 °C 孵育过夜。加二抗 (ANO1

或蛋白基因产物 9.5/PGP9.5): 玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加二抗覆盖组织, 避光室温孵育 50 min。DAPI 复染细胞核: 玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min。封片: 玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。镜检拍照: 切片于荧光显微镜下观察并采集图像 (DAPI 紫外激发波长 330~380 nm, 发射波长 420 nm, 发蓝光; FITC 激发波长 465~495 nm, 发射波长 515~555 nm, 发绿光; CY3 激发波长 510~560, 发射波长 590 nm, 发红光)。

8 统计学方法 采用 SPSS 28.0 统计软件对数据进行处理分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态性和方差齐性的多组之间均数比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD 法, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。数据结果用 GraphPad prism8.0 制作图形。

结 果

1 一般情况 造模前各组大鼠均活泼好动, 皮毛光泽度好, 粪便呈连续条状, 质软且表面水分较多。第 3~7 天, 模型组和各干预组均出现活动量减少, 皮毛光泽度变黯淡, 粪粒干硬、粒形缩短, 排便量下降,

模型组上述表现持续至第 14 天, 而各干预组第 9~10 天后症状逐渐改善, 尤其橙皮苷中、高剂量干预组和西药组第 13~14 天粪粒性状与空白组相近。

2 各组体重和进食量比较 (表 2) 与本组干预第 1 天比较, 各组第 14 天大鼠的体重均有增长 ($P < 0.01$), 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 各组大鼠进食量干预前后及组间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 各组粪便含水量和首粒黑便时间比较 (表 3) 与空白组同期比较, 第 14 天模型组粪便含水量降低 ($P < 0.05$), 首粒黑便时间延长 ($P < 0.01$); 与模型组同期比较, 干预第 14 天橙皮苷中、高剂量组和西药组的粪便含水量增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 首粒黑便时间缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 第 14 天各干预组组间两两比较, 橙皮苷高剂量组的粪便含水量高于低剂量组, 首粒黑便时间短于低剂量组 ($P < 0.05$), 余差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 各组结肠组织 5-HT 和 5-HT4R 含量比较 (表 4) 与空白组比较, 模型组结肠 5-HT 和 5-HT4R 含量均降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 橙皮苷中、高剂量组结肠 5-HT 和 5-HT4R 含量均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 各干预组组间两两比较, 橙皮苷高剂量组结肠 5-HT 和 5-HT4R 含量均高于低剂量组和西药组 ($P < 0.05$), 橙皮苷中剂量组结肠 5-HT4R 含量高于西药组 ($P < 0.05$), 余差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组体重和进食量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重 (g)		进食量 (g/24 h)	
		第 1 天	第 14 天	第 1 天	第 14 天
空白	6	182.74 ± 10.37	304.23 ± 19.34*	12.24 ± 6.33	14.61 ± 6.67
模型	6	183.90 ± 11.20	296.28 ± 20.47*	13.12 ± 6.13	14.44 ± 6.50
橙皮苷低剂量	6	182.54 ± 11.16	299.53 ± 20.73*	12.64 ± 7.01	13.93 ± 7.44
橙皮苷中剂量	6	183.92 ± 12.01	302.65 ± 21.70*	12.55 ± 6.40	14.83 ± 6.32
橙皮苷高剂量	6	181.42 ± 10.56	301.61 ± 20.82*	12.83 ± 6.72	14.27 ± 7.20
西药	6	183.70 ± 11.31	298.36 ± 20.15*	12.77 ± 6.77	14.71 ± 7.37

注: 与本组干预第 1 天比较, * $P < 0.01$

表 3 各组粪便含水量百分比和首粒黑便时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	粪便含水量百分比 (%)		首粒黑便时间 (min)	
		第 1 天	第 14 天	第 1 天	第 14 天
空白	6	62.37 ± 13.44	65.10 ± 11.50	178.31 ± 35.62	171.20 ± 40.33
模型	6	61.77 ± 11.62	49.43 ± 10.48*	181.45 ± 38.20	287.33 ± 50.67**
橙皮苷低剂量	6	63.40 ± 12.33	54.30 ± 11.27 [▲]	183.62 ± 35.77	255.62 ± 45.72 [▲]
橙皮苷中剂量	6	62.85 ± 12.50	65.13 ± 11.43 [△]	182.45 ± 36.09	221.07 ± 51.47 [△]
橙皮苷高剂量	6	64.50 ± 12.84	69.64 ± 11.17 ^{△△}	185.63 ± 40.55	176.55 ± 47.86 ^{△△}
西药	6	63.47 ± 12.71	69.43 ± 13.46 ^{△△}	183.32 ± 37.40	195.70 ± 48.37 ^{△△}

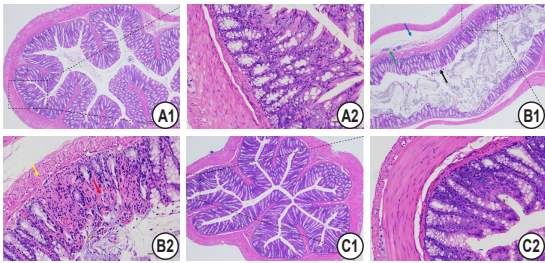
注: 与空白组同期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同期比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与橙皮苷高剂量组同期比较, [▲] $P < 0.05$

表 4 各组结肠组织 5-HT 和 5-HT₄R 含量比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HT	5-HT ₄ R
空白	6	4.46 ± 1.50	8.52 ± 2.48
模型	6	2.35 ± 1.32*	4.75 ± 2.15*
橙皮苷低剂量	6	2.66 ± 1.46 [▲]	4.80 ± 2.66 [▲]
橙皮苷中剂量	6	4.58 ± 2.05 [△]	7.96 ± 2.27 [△]
橙皮苷高剂量	6	5.12 ± 1.67 ^{△△}	9.20 ± 3.06 [△]
西药	6	2.78 ± 1.44 [▲]	4.93 ± 2.37 ^{▲○}

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与橙皮苷高剂量组比较, $\Delta P<0.05$;与橙皮苷中剂量组比较, $\circ P<0.05$

5 各组结肠病理结果比较(图 1) 橙皮苷高剂量组的疗效最为显著,故选择空白组、模型组和橙皮苷高剂量组的结肠组织进行检测及比较。空白组和橙皮苷高剂量组:结肠各层结构清晰紧密,黏膜上皮完整,肠腺丰富,排列整齐,肠腺上皮中杯状细胞清晰可见,未见明显其他异常。模型组大鼠结肠黏膜层上皮坏死脱落,肠腺局灶性坏死,黏膜肌层肌纤维肿胀变厚;黏膜下层重度水肿,结缔组织疏松,其内淋巴管扩张,管腔内大量淋巴细胞,肌层变薄。



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为橙皮苷高剂量组;绿色箭头提示其内淋巴管扩张,管腔内大量淋巴细胞,蓝色箭头提示黏膜下层重度水肿,结缔组织疏松,黑色箭头提示肠黏膜层上皮坏死脱落,黄色箭头提示黏膜肌层肌纤维肿胀变厚,红色箭头提示肠腺局灶性坏死;A1~C1 $\times 40$, A2~C2 $\times 200$

图 1 3 组大鼠结肠组织病理结果比较(HE)

6 3 组结肠组织 SIP 合胞体标记蛋白表达水平比较(表 5, 图 2) 与空白组比较,模型组结肠

表 5 3 组结肠组织 SIP 合胞体标记蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

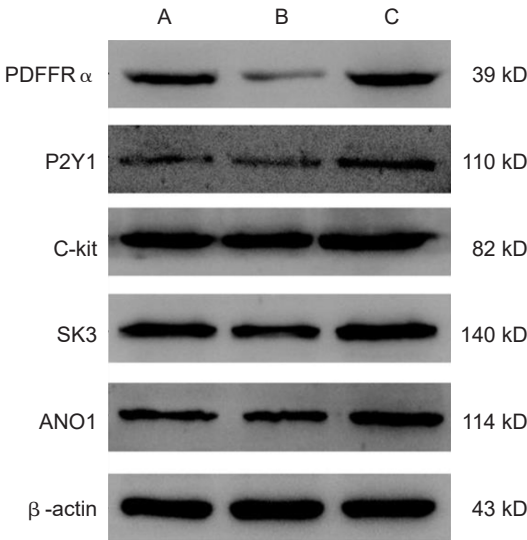
组别	n	PDGFR α	P2Y1	c-kit	SK3	ANO1
空白	6	0.378 ± 0.11	0.632 ± 0.21	0.393 ± 0.14	0.388 ± 0.15	1.195 ± 0.31
模型	6	0.214 ± 0.14*	0.189 ± 0.10*	0.246 ± 0.11*	0.207 ± 0.09*	0.842 ± 0.27*
橙皮苷高剂量	6	0.417 ± 0.23 [△]	0.692 ± 0.30 [△]	0.438 ± 0.26 [△]	0.421 ± 0.18 [△]	1.303 ± 0.37 [△]

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$

表 6 3 组结肠组织 SIP 合胞体标记蛋白 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PDGFR α	P2Y1	c-kit	SK3	ANO1
空白	6	1	1	1	1	1
模型	6	0.312 ± 0.12*	0.243 ± 0.10*	0.357 ± 0.14*	0.563 ± 0.27*	0.643 ± 0.20*
橙皮苷高剂量	6	0.954 ± 0.20 [△]	1.134 ± 0.24 [△]	0.913 ± 0.25 [△]	1.053 ± 0.31 [△]	1.107 ± 0.33 [△]

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$



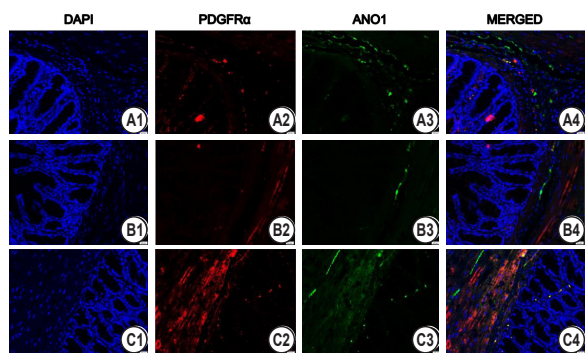
注:A 为空白组;B 为模型组;C 为橙皮苷高剂量组

图 2 3 组大鼠结肠组织 PDGFR α 、P2Y1、c-kit、SK3、ANO1 蛋白表达

PDGFR α 、P2Y1、c-kit、SK3、ANO1 蛋白表达水平平均降低($P<0.01$);与模型组比较,橙皮苷高剂量组结肠 PDGFR α 、P2Y1、c-kit、SK3、ANO1 蛋白表达水平平均升高($P<0.01$)。

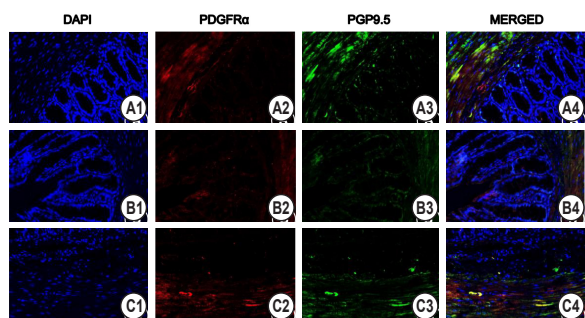
7 3 组结肠组织 SIP 合胞体标记蛋白 mRNA 表达水平比较(表 6) 与空白组比较,模型组结肠 PDGFR α 、P2Y1、c-kit、SK3、ANO1 mRNA 水平平均降低($P<0.01$);与模型组比较,橙皮苷高剂量组结肠 PDGFR α 、P2Y1、c-kit、SK3、ANO1 mRNA 水平平均升高($P<0.01$)。

8 3 组大鼠免疫荧光结果比较(图 3、4) 空白组大鼠结肠中 PDGFR α 阳性(红光)和 ANO1 阳性(绿光)主要共表达在肌间和肌层,二者似呈伴行、毗邻的关系,而在黏膜、黏膜下层仅有少量表达。橙皮苷高剂量组与空白组相似,且 PDGFR α 与 ANO1 共表达更为明显。相较于空白组和橘皮苷高剂



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为橙皮苷高剂量组

图 3 3 组大鼠结肠组织 PDGFR α (红光) 和 ANO1 (绿光) 荧光染色结果



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为橙皮苷高剂量组

图 4 3 组大鼠结肠组织 PDGFR α (红光) 和 PGP9.5 (绿光) 荧光染色结果

量组, 模型组阳性染色明显减少, 在结肠肌间和肌层有少量表达。

空白组大鼠结肠中 PDGFR α 阳性 (红光) 和 PGP9.5 阳性 (绿光) 主要共表达在肌间和肌层, 且呈伴行、毗邻的关系, 而在黏膜、黏膜下层亦有少量表达, 橘皮苷高剂量组与空白组相似。相较于空白组和橘皮苷高剂量组, 模型组阳性染色明显减少, 在结肠肌间和肌层仅有少量表达。

讨 论

中医药在便秘的治疗中占据重要地位, 许多中药及中药复方均具有导泻通便或调节肠道功能等作用。经典方枳术丸是从《金匮要略》的枳术汤化裁而来, 由张元素创制, 首载于李东垣《脾胃论》“枳实麸炒黄色, 去穰, 一两, 白术二两, 上同为极细末, 荷叶裹烧饭为丸”^[10], 有“治痞、消食、强胃”之功^[3]。Sun H 等^[11]对枳术丸含药血浆的药代动力学分析显示橙皮苷药峰浓度 = 776.06 ng/mL, 药时曲线下面积 = 9 473 ng/(mL·h), t_{1/2} = 5.26 h。有研究枳术丸加味制成便塞通合剂 (Bian Sai Tong, BST), 其对老年性便秘的临床疗效不逊于促动力剂莫沙必利, 研

究证实 BST 有促进便秘小鼠肠道蠕动, 加快传输之功^[12]。枳术丸、BST、白术、枳实中均可能含有促胃肠动力的药效成分 / 组分。白术的主要成分为内酯类, 枳实则为黄酮 (苷) 类、挥发油类、生物碱类。其中, 白术内酯类和枳实黄酮 (苷) 类化合物都被报道具有促胃肠动力的活性^[4]。然而, 橙皮苷同时是枳实生药及枳术丸中含量最高的活性成分^[13], 能有效激活 H1 组胺受体, 具有刺激胃肠道运动的作用^[14]。其在便秘的治疗功效及作用机制需进一步研究。

洛哌丁胺灌胃是目前行之有效的 FC 造模方式之一。据报道, 洛哌丁胺可导致结肠肌层变薄、杯状细胞减少, 肠绒毛及黏膜上皮坏死脱落, 绒毛排列松散, 部分腺体结构消失, 固有层炎症细胞浸润^[15-17]。在本研究中, 洛哌丁胺造模导致的病理改变与之前报道相吻合, 且大鼠肠道传输减慢, 符合 FC 表型。研究表明, FC 模型大鼠的结肠组织结构及形态发生明显改变, 但橙皮苷干预后黏膜上皮的坏死脱落及炎症细胞浸润现象得到明显改善, 肠道传输加快。大鼠的便秘症状得到明显好转, 证实了橙皮苷对大鼠 FC 确有疗效。

SIP 合胞体对于胃肠动力调节具有重要意义。尽管橙皮苷治疗 FC 的效果与聚乙二醇 4000 散类似, 但二者的作用机制并不相同。5-HT 作为一种重要的肠神经递质, 其信号系统广泛参与调节胃肠道的运动、蠕动、分泌和感觉^[18]。5-HT 受体脱敏及信号减弱与 FC 发病有关^[19]。多项研究提示橙皮苷可通过增强 5-HT 信号促进肠动力^[9, 20]。与之相吻合的是, 本研究中橙皮苷干预显著上调了 FC 大鼠结肠组织中 5-HT 和 5-HT₄R 的表达。提示橙皮苷可激活 5-HT 信号, 改善 SIP 合胞体功能促进肠动力进而治疗便秘, 但其分子机制和信号通路仍需进一步研究。而聚乙二醇 4000 散对 5-HT 信号无明显作用, 其主要是通过改变肠道内渗透压改善便秘。

据报道, 结肠存在多种 ICC 亚型, 其中肌间型和黏膜下层型为构成 SIP 合胞体的主要亚型^[2]。通常, 肠运动神经元的神经末梢含多种神经递质, 释放后扩散到邻近 SIP 合胞体发挥效应。兴奋性递质如乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach)、P 物质 (substance P, SP), 结合 ICC 上特定受体 (如 M₃、NK₁) 后, 增加内质网 Ca²⁺ 释放, 激活 ANO1, 引起 ICC 去极化而导致 SMC 收缩^[2, 21]。相反, 抑制性递质如一氧化氮 (nitric oxide, NO)、 β -NAD, 可结合 PDGFR α + 细胞上特定受体 (如 sGC、P₂Y₁) 后引起超极化, 导致 SMC 舒张^[2]。据报道, 小鼠结肠

中 PDGFR α + 细胞及 SMC 过度超极化可引起结肠慢传输^[22]。SMC 的收缩与舒张直接影响着 SW 的强度。有研究证实慢传输型 FC 患者结肠 ICC 细胞数量明显减少,其保留的 SW 无法与推进性运动同步及协调^[23-26]。因此 ICC 与 PDGFR α + 细胞的表型维持对逆转 FC 至关重要。

PGP9.5 是一种反映神经元密度的泛神经元标志物,在黏膜下和肌间神经丛中均有表达^[27]。在本研究中,ANO1 被用于标记 ICC,PDGFR α 被用于标记 PDGFR α + 细胞,其荧光强度显示二者在结肠中的分布。结果显示,便秘大鼠结肠中 PGP9.5 阳性染色明显减少,ANO1、PGP9.5 均与 PDGFR α 呈现共表达、伴行、毗邻的分布特点。提示 ICC 和 PDGFR α + 细胞与 ENS 的肠内神经伴行和毗邻,SIP 合胞体受 ENS 神经-内分泌信号调控,与文献报道一致^[2]。然而,橙皮苷高剂量显著上调了 ICC 和 PDGFR α + 细胞的表达,为 FC 治疗提供了细胞物质基础。

ICC 特异性高表达 c-kit 信号对于 ICC 表型维持至关重要,严重影响 SMC 起搏及传导功能^[28]。ANO1 激活后引起自发性瞬时去极化,产生 SW,激活 SMC 上的 L-型钙通道而引发平滑肌收缩^[2]。PDGFR α + 细胞特异性嘌呤类递质 P2Y1 受体和小电导钙激活钾通道 3 (small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel 3, SK3) 激活后的效应与 ANO1 相反^[2]。二者互作共同维持 SW 强度。因此,ANO1、PDGFR α 、c-kit、P2Y1、SK3 表达水平降低反映 ICC 和 PDGFR α + 细胞数量减少,SIP 合胞体活性下降与结肠动力障碍。然而,橙皮苷干预显著逆转了 FC 大鼠结肠组织中标志物蛋白 (PDGFR α 、ANO1) 和功能蛋白 (P2Y1、c-kit、SK3、ANO1) 的下调。反映了橙皮苷促进了 SIP 合胞体表型及功能,肠动力的恢复。值得注意的是,笔者发现有部分数据似与报道有悖,例如,在两种肠动力障碍小鼠模型 (糖尿病-结肠慢传输、部分结肠梗阻) 中发现 PDGFR α 、SK3 表达上调^[22, 29],但笔者认为并不矛盾。究其原因,PDGFR α + 细胞-SMC 舒张过度或减弱都可能破坏 SIP 合胞体的抑制性调节,从而导致有效推进性活动减少。另外,虽然 HE 染色显示橙皮苷可能还具备缓解炎症及修复肠上皮的功能 (图 1),但本研究未进一步探讨。综上所述,研究提示橙皮苷可能通过可激活结肠 5-HT 信号,上调 ANO1、c-kit、PDGFR α 、P2Y1 和 SK3 的表达水平,恢复 ICC 和 PDGFR α + 细胞的表型及功能,改善 SIP 合胞体功

能及结肠动力,从而对洛哌丁胺诱导的便秘大鼠起到干预作用。为 FC 乃至 FBDs 的治疗提供新思路。

利益冲突: 无任何利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Drossman DA. Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features and rome IV [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150 (6): 1262-1279.
- [2] Schneider S, Wright CM, Heuckeroth RO. Unexpected roles for the second brain: enteric nervous system as master regulator of bowel function [J]. *Annu Rev Physiol*, 2019, 81: 235-259.
- [3] 王文凤,刘富林,夏旭婷,等. 枳术丸对脾虚证慢传输型便秘小鼠结肠 PI3K, AKT 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35 (6): 2824-2828.
- [4] Wang S, Bao YR, Li TJ, et al. Mechanism of fructus aurantii flavonoids promoting gastrointestinal motility: from organic and inorganic endogenous substances combination point of view [J]. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13 (51): 372-377.
- [5] 张琪,李芳芳,温欣,等. 大川芎方抑制血管紧张素 II 诱导高血压模型的异常交感神经活动和脑内 NADPH 氧化酶表达 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42 (4): 470-476.
- [6] 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, 2003: 202-204.
- [7] Wu D, Wang X, Zhou J, et al. Traditional Chinese formula, lubricating gut pill, improves loperamide-induced rat constipation involved in enhance of Cl⁻ secretion across distal colonic epithelium [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130 (2): 347-353.
- [8] 占煜,申旭龙,徐红,等. 大黄对洛哌丁胺便秘模型大鼠结肠水通道蛋白 3 表达及肠动力的作用研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34 (10): 2315-2320.
- [9] Wu M, Li Y, Gu Y. Hesperidin improves colonic motility in Loperamide-induced constipation rat model via 5-Hydroxytryptamine 4R/cAMP signaling pathway [J]. *Digestion*, 2020, 101 (6): 692-705.
- [10] 金·李杲. 脾胃论 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1957: 8-9.
- [11] Sun H, Dong T, Zhang A, et al. Pharmacokinetics of hesperetin and naringenin in the Zhi Zhu Wan,

- a traditional Chinese medicinal formulae, and its pharmacodynamics study[J]. *Phytother Res*, 2013, 27 (9): 1345–1351.
- [12] 唐学贵, 伍静, 刘芳. 便塞通合剂对便秘模型小鼠胃肠蠕动功能的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28 (3): 498–500.
- [13] 臧彬如, 单国顺, 贾天柱, 等. UPLC 法测定生, 制白术配伍枳术丸中 10 种成分 [J]. *中成药*, 2020, 42 (4): 960–964.
- [14] Fang YS, Shan DM, Liu JW, et al. Effect of constituents from *Fructus Aurantii Immaturus* and *Radix Paeoniae Alba* on gastrointestinal movement[J]. *Planta Med*, 2009, 75 (1): 24–31.
- [15] Zhan Y, Wen Y, Zhang LL, et al. Paeoniflorin improved constipation in the loperamide-induced rat model via TGR5/TRPA1 signaling-mediated 5-Hydroxytryptamine secretion[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021 (6076293): 1–19.
- [16] Zhang Y, Ge T, Ping X, et al. Therapeutic effect of protease-activated receptor 2 agonist SLIGRL-NH2 on loperamide-induced Sprague-Dawley rat constipation model and the related mechanism[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 2403–2411.
- [17] Zhang X, Zheng FJ, Zhang Z. Therapeutic effect of *Cistanche deserticola* on defecation in senile constipation rat model through stem cell factor/C-kit signaling pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27 (32): 5392–5403.
- [18] Drokhyansky E, Smillie CS, Van Wittenberghe N, et al. The human and mouse enteric nervous system at single-cell resolution[J]. *Cell*, 2020, 182 (6): 1606–1622.
- [19] Costedio MM, Coates M, Brooks EM, et al. Mucosal serotonin signaling is altered in chronic constipation but not in opiate-induced constipation[J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105 (5): 1173.
- [20] Hwang M, Kim JN, Kim BJ. Hesperidin depolarizes the pacemaker potentials through 5-HT4 receptor in murine small intestinal interstitial cells of Cajal[J]. *Anim Cells Syst (Seoul)*, 2020, 24 (2): 84–90.
- [21] Drumm BT, Rembetski BE, Huynh K, et al. Excitatory cholinergic responses in mouse colon intramuscular interstitial cells of Cajal are due to enhanced Ca²⁺ release via M3 receptor activation[J]. *FASEB J*, 2020, 34 (8): 10073–10095.
- [22] Song NN, Lu HL, Lu C, et al. Diabetes-induced colonic slow transit mediated by the up-regulation of PDGFRalpha (+) cells/SK3 in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2018, 30 (8): 1–14.
- [23] Wedel T, Spiegler J, Soellner S, et al. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon[J]. *Gastroenterology*, 2002, 123 (5): 1459–1467.
- [24] Dinning PG, Wiklendt L, Maslen L, et al. Colonic motor abnormalities in slow transit constipation defined by high resolution, fibre-optic manometry[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2015, 27 (3): 379–388.
- [25] He CL, Burgart L, Wang L, et al. Decreased interstitial cell of cajal volume in patients with slow-transit constipation[J]. *Gastroenterology*, 2000, 118 (1): 14–21.
- [26] Lyford GL, He CL, Soffer E, et al. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation[J]. *Gut*, 2002, 51 (4): 496–501.
- [27] Aktar R, Parkar N, Stentz R, et al. Human resident gut microbe *Bacteroides thetaiotaomicron* regulates colonic neuronal innervation and neurogenic function[J]. *Gut Microbes*, 2020, 11 (6): 1745–1757.
- [28] 宋妮娜, 许文燮. 胃肠平滑肌运动单位 SIP 合胞体的生理与病理生理学意义 [J]. *生理学报*, 2016, 68 (5): 621–627.
- [29] Wang Q, Zang J, Huang X, et al. Colonic dysmotility in murine partial colonic obstruction due to functional changes in interstitial cells[J]. *J Neurogastroenterol*, 2019, 25 (4): 589–601.

(收稿: 2021-12-06 在线: 2023-01-05)

责任编辑: 白霞