

硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP及AQP3表达的影响

王郁金^{1,2}, 周永学^{2,3*}, 张红², 闫曙光², 谢培², 满思艺², 李莎²
(1. 成都中医药大学, 成都 610072; 2. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046;
3. 陕西省胃肠病证方药重点研究室, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的:**探讨硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中血管活性肠肽(VIP),水通道蛋白-3(AQP3)表达的影响。**方法:**成年SD雄性大鼠50只,随机分为正常组、模型组、硝菴通结方高、中、低剂量组(380,190,95 g·kg⁻¹),每组10只。采用复方地芬诺酯(15 mg·kg⁻¹)ig,建立SD大鼠功能性便秘模型,造模成功后各治疗组分别给予不同剂量硝菴通结方ig 3周。观察各组大鼠首粒黑便的排出时间、粪便干湿重变化,免疫组化检测大鼠结肠组织中VIP及AQP3的表达,RT-qPCR进一步检测结肠组织中VIP,AQP3 mRNA的表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠粪便量少、质地干硬,首粒黑便排出时间明显延长,大便含水率减少;结肠组织中VIP表达降低,AQP3的表达升高,均具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,硝菴通结方各剂量组大鼠粪便量增加,质地稀软,首粒黑便时间缩短,大便含水率增多;结肠组织中VIP mRNA表达明显升高,AQP3 mRNA的表达降低,均具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**大鼠功能性便秘的发生可能与结肠组织中VIP及AQP3的异常表达有关,硝菴通结方治疗功能性便秘的机制可能是通过调节结肠组织中VIP及AQP3的表达来实现。

[关键词] 硝菴通结方; 功能性便秘大鼠; 血管活性肠肽; 水通道蛋白-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0108-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015090108

Effect of Xiaofu Tongjie Fang on Expression of VIP and AQP3 in Colon Tissue of Rats with Functional Constipation WANG Yu-jin^{1,2}, ZHOU Yong-xue^{2,3*}, ZHANG Hong², YAN Shu-guang², XIE Pei², MAN Si-yi², LI Sha² (1. Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610072, China; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China; 3. Key Laboratory for Gastrointestinal Disease and Prescription in Shaanxi Province, Xiayang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Xiaofu Tongjie Fang (XFTJF) on expressions of vasoactive intestinal peptide (VIP) and aquaporin 3 (AQP3) in colon tissue of rats with functional constipation. **Method:** Fifty adult male SD rats were randomly divided into the control group, the model group, the high-, medium- and low-dose XFTJF groups (380, 190, 95 g·kg⁻¹) of 10 rats in each group. The functional constipation model was induced by using compound diphenoxylate tablets (5 mg·kg⁻¹) orally. The rats received intragastric administration of XFTJF for 3 weeks. The general performance, the time to first black stool and fecal water content were observed. The expressions of VIP and AQP3 in rat colon tissue were detected by using immunohistochemical method. The mRNA expression levels of VIP and AQP3 in colon tissue were further detected by using RT-qPCR. **Result:** Compared with the control group, the time to first black stool significantly prolonged, fecal water content reduced, VIP mRNA level decreased, and AQP3 mRNA level increased in the model group ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with the model group, the time to first black stool shortened, fecal water content increased, VIP mRNA level increased, and AQP3 mRNA level decreased in all XFTJF groups ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** The occurrence of functional constipation in rats is probably related to the abnormal expressions of

[收稿日期] 20141003(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-037);国家自然科学基金项目(81273663)

[第一作者] 王郁金,在读博士,从事方剂学研究,Tel:029-38185297,E-mail:wangyujin411@126.com

[通讯作者] *周永学,教授,从事方剂学研究,Tel:029-38185008,E-mail:zhou8521@163.com

VIP and AQP3 in colon tissue. The mechanism of XFTJF in the treatment of functional constipation may be realized through regulating the expressions of VIP and AQP3 in colonic tissue.

[Key words] Xiaofu Tongjie Fang; functional constipation rats; vasoactive intestinal peptide; aquaporin 3

随着当今社会人口老龄化、饮食习惯改变以及社会一心理等因素的影响,功能性便秘的罹患人数逐年增加,已成为困扰现代人生活质量的重要因素之一。目前其发病机制与有效的治疗方案目前尚无共识。近年来,中医药治疗便秘,取得了良好的疗效,但许多药物含有蒽醌类成分,长期服用,形成“泻剂结肠”。本课题组前期研究发现硝菴通结方对功能性便秘疗效确切,且不含蒽醌类成分。现代研究表明,功能性便秘的发生与结肠组织中血管活性肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)和水通道蛋白3(aquaporin-3, AQP3)的异常表达密切相关^[1-3]。因此笔者进一步研究该方对功能性便秘大鼠结肠组织中VIP及AQP3表达的影响,明确其治疗功能性便秘的作用机制,为进一步新药开发奠定基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级SD大鼠,雄性,50只,体重(200±20)g,购于西安交通大学医学院实验动物中心,动物合格证号SCXK(陕)2012-0003。

1.2 药物及试剂 硝菴通结方含肉苁蓉15g,当归15g,芒硝30g,鲜莱菴1000g,上述中药饮片购于陕西省咸阳市百姓乐大药房,并经陕西中医药大学药理实验室鉴定,鉴定人白吉庆教授,药品质量合格;以上药物鲜莱菴切片,分两次同芒硝水煎,得浓汁,入肉苁蓉、当归同煎,并浓缩至56mL(19g·mL⁻¹),4℃冰箱保存备用。复方地芬诺酯片(江苏常州康普药业有限公司,批号1304042),免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号SA1022),EasyPure RNA试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号ER101-01H30716Q046),VIP和AQP3引物由南京金斯瑞生物科技有限公司设计与合成。

1.3 仪器 EDC-810型PCR仪(北京东胜创新生物技术有限公司),NANODROP2000C型核酸测定仪(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠50只,随机分为正常组、模型组、硝菴通结方高、中、低剂量组(380,190,95g·kg⁻¹),每组10只。

2.2 功能性便秘大鼠模型的建立 动物禁食不禁

水16h后,以10mL·kg⁻¹体积(15g·L⁻¹质量浓度)给予复方地芬诺酯混悬液ig,每天1次,当大鼠出现精神状态差,进食减少,体重减轻,大便粒型小、干硬等表现时,为造模成功。

2.3 给药方法 造模成功的模型大鼠,按照以下分组进行硝菴通结方治疗。正常组和模型组正常饲养,以0.9%NaClig;硝菴通结方低、中、高剂量组分别以不同浓度的硝菴通结方水煎剂予以ig,共给药3周。

2.4 指标的检测

2.4.1 一般行为学观察 每日观察动物一般行为表现及排便情况。

2.4.2 首粒黑便及粪便含水率观测 采用活性炭灌胃法测定首粒黑便时间,观察肠道传输功能,硝菴通结方治疗后,每组随机挑取5只大鼠,单只放于大鼠代谢笼内,禁食16h后,经口灌入100g·L⁻¹活性炭混悬液2mL,从活性炭ig完毕开始记录大鼠第一粒黑便排出时间。给药结束后,将大鼠放于代谢笼,收集24h粪便,称其湿重,粪便60℃恒温干燥箱,称其干重,计算粪便含水率。

$$\text{粪便含水率} = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

2.4.3 免疫组化对大鼠结肠组织中VIP, AQP3的阳性表达进行定性检测 给药结束后,实验动物禁食不禁水24h,10%的水合氯醛4mL·kg⁻¹ip麻醉,取回盲部以下结肠组织浸入10%中性甲醛固液,根据免疫组化步骤石蜡包埋、切片、染色。

2.4.4 RT-qPCR检测进一步定量检测大鼠结肠组织中VIP, AQP3 mRNA表达水平 取结肠组织1cm左右,用预冷的生理盐水清洗,放入有RNA保护液的无菌EP管中,迅速保存至-80℃冰箱备用。组织匀浆,按RNA提取试剂盒提取总RNA,测定RNA浓度。按照反转录试剂盒说明合成cDNA,测cDNA浓度。RT-qPCR法检测mRNA表达。引物序列见表1。

2.5 统计学分析 采用SPSS 17.0处理数据,计量资料比较采用单因素方差分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般行为表现 复方地芬诺酯ig造模28d后,各造模组大鼠精神状态差,被毛脱落,活动减少,

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Sequence of RT-qPCR primer

引物名称	引物序列	引物片段 /bp
VIP	上游:5'-TCTGCAAGGGTAGCAATCGA-3'	210
	下游:5'-GGTGGAGTCCCTATCACTGG-3'	
AQP3	上游:5'-AGTGAGTCAGGAAAGTGCCA-3'	175
	下游:5'-TGAGCTACGCCCCTCTTATG-3'	
β-actin	上游:5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'	287
	下游:5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'	

大便量少干硬,粒型小,正常组大鼠精神状态良好、二便正常,造模成功。硝菴通结方治疗后,各给药组大鼠上述症状逐渐减轻并恢复,尤以高、中剂量组效果最为明显。

3.2 对功能性便秘大鼠首粒黑便排出时间、粪便含水率的影响 与正常组比较,模型组大鼠首粒黑便排出时间显著延长 ($P < 0.01$),粪便含水率明显减少 ($P < 0.05$);与模型组比较,硝菴通结方各剂量组大鼠首粒黑便排出时间均明显缩短 ($P < 0.01$),粪便含水率高剂量组明显增多 ($P < 0.01$),中剂量组也增多 ($P < 0.05$),低剂量组无显著性差异。见表 2。

表 2 硝菴通结方对功能性便秘大鼠首粒黑便排出时间、粪便含水率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

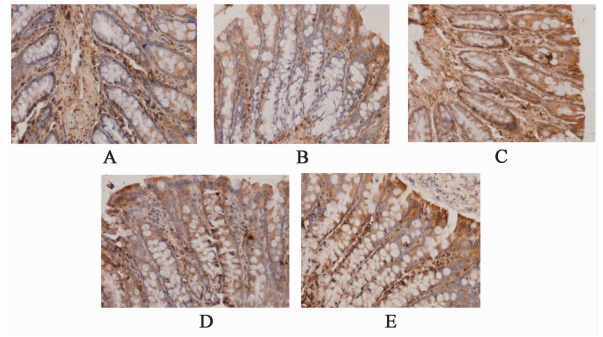
Table 2 Effects of Xiaofu Tongjie Fang on first grain of black stool elimination time, fecal water content influence in functional constipation rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	首粒黑便排出时间 /min	粪便含水率 /%
正常	-	177.66 ± 21.50	51.44 ± 6.25
模型	-	287.69 ± 25.99 ²⁾	43.27 ± 5.34 ¹⁾
硝菴通结方	380	169.45 ± 23.99 ⁴⁾	54.03 ± 9.35 ⁴⁾
	190	184.24 ± 13.43 ⁴⁾	49.16 ± 5.92 ³⁾
	95	206.74 ± 38.49 ⁴⁾	45.24 ± 8.55

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP, AQP3 免疫组化定性表达的影响 免疫组化结果显示, VIP 和 AQP3 阳性反应细胞均主要以胞核表达为主,呈棕黄色,胞核为蓝色。与正常组比较,模型组大鼠结肠组织中 VIP 阳性表达明显减少, AQP3 阳性表达明显升高;与模型组比较,硝菴通结方各剂量组大鼠结肠组织中 VIP 阳性表达明显升高, AQP3 阳性表

达明显降低,且高剂量组差异最为显著。见图 1, 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 硝菴通结方 380 g·kg⁻¹组; D. 硝菴通结方 190 g·kg⁻¹组; E. 硝菴通结方 95 g·kg⁻¹组(图 2 同)。

图 1 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP 表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 1 Effects of Xiaofu Tongjie Fang on expression of VIP in colon tissue of functional constipation rats (immunohistochemistry, ×200)

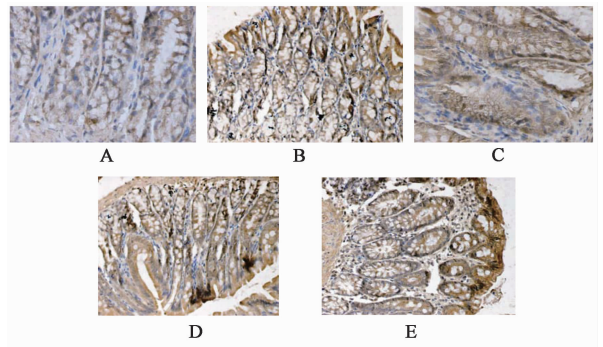


图 2 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 AQP3 表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effects of Xiaofu Tongjie Fang on expression of AQP3 in colon tissue of functional constipation rats (immunohistochemistry, ×200)

3.4 对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP, AQP3 mRNA 表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织中 VIP, AQP3 mRNA 表达明显降低,有显著性差异 ($P < 0.01$);与模型组比较,硝菴通结方各剂量组大鼠结肠组织中 VIP mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.01$), AQP3 mRNA 表达高剂量组明显升高 ($P < 0.01$),中剂量组亦升高 ($P < 0.05$),小剂量组无显著差异。见表 3。

4 讨论

中医学认为便秘的基本病变属大肠传导失常,同时与肺、脾、胃、肝、肾等脏腑功能失调有关。尤其是老年便秘多与肾虚有关,肾主五液而司二便,肾虚精亏,精血不足,肠失濡润,传导不利,导致大便秘结。本病肾虚精亏为本,腑实燥结为标,因此笔者参考《景岳全书》济川煎的组方,在张锡纯硝菴通结汤

表 3 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP, AQP3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Xiaofu Tongjie Fang on expression of VIP and AQP3 mRNA levels in colon tissue of functional constipation rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VIP	AQP3
正常	-	1.00 ± 1.57	1.00 ± 0.18
模型	-	0.29 ± 0.32 ²⁾	1.89 ± 0.53 ²⁾
硝菴通结方	380	1.07 ± 1.66 ⁴⁾	0.84 ± 0.34 ⁴⁾
	190	0.83 ± 0.96 ⁴⁾	1.28 ± 0.53 ³⁾
	95	0.61 ± 0.47 ³⁾	1.41 ± 0.66

基础上加入肉苁蓉、当归,创立了硝菴通结方(肉苁蓉、当归、芒硝、莱菴),四药合用,有温肾益精养血,软坚润下通便的功效,对功能性便秘标本同治,针对性强。本方另一优势是各味药材均不含蒽醌类成分,无导致“泻剂结肠”之忧。

目前,功能性便秘确切病因仍未明确,与多种因素相关。VIP 是肠神经系统中最具代表性和研究得最深入的神经递质,对胃肠运动有重要的调节作用,其受体广泛分布于人和动物的多种组织器官上。它与结肠的节段非推进性运动有关,参与调节肠道动力及肠黏膜的机械化学免疫屏障,VIP 减少使结肠非推进性运动增加,表现为出现过度的节段性蠕动,使肠道有效的推动性运动减少^[4]。VIP 作为一种多效性作用的神经递质,具有扩张血管、降低血压的作用,对肠液的分泌具有很强的促进作用,对胃液的分泌可起抑制作用,对消化道平滑肌的收缩产生抑制作用^[5]。但是目前许多研究结果表明便秘的肠组织与正常的相比,VIP 阳性表达明显减少^[1-2]。这可能由于 VIP 异常改变,导致肠神经系统功能紊乱,从而引起功能性便秘。以上结果表明 VIP 既可调节胃肠蠕动又可调节肠道水液代谢,与功能性便秘的发生密切相关。AQP3 属跨膜蛋白家族,主要分布于人类小肠和结肠的上皮细胞中,其所介导的自由水快速被动的跨生物膜转运是水进出细胞的主要途径,在消化道上皮细胞对水的吸收中起重要作用^[6]。Silberstein C 等研究发现 AQP3 在结肠表达明显高于胃、空肠和回肠,且局限在结肠绒毛上皮细胞^[7]。Tsuji-kawa T 等将 6 周龄雄性大鼠切除 80% 小肠,术后 1,3,5,7 d 分别测定残余的回肠和结肠 AQPs mRNA 表达的情况,结果显示,大鼠肠黏膜 AQP1,3,7,8 mRNA 表达在术后 7 d 内都显著增加,这表明小肠大部切除术后残余肠段 AQP1,3,7,8 表达适应性增强,从而使残余肠段对液体的吸收增多,

术后腹泻情况得到改善^[8]。这些研究结果均提示 AQP3 在结肠水分吸收过程中起着很重要的作用。AQP3 表达升高引起粪便含水量降低,继而引发便秘,这可能是便秘发生的一个重要机制。

本实验通过免疫组化定性,RT-qPCR 进一步定量检测,结果表明功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP 水平明显降低,AQP3 水平明显升高,这与有关文献报道相一致。硝菴通结方治疗组,便秘大鼠的便秘症状明显改善,首粒黑便排出时间缩短,粪便含水率明显升高。同时大鼠结肠组织中 VIP 表达水平升高,AQP3 表达水平降低。方中肉苁蓉、当归合用具有温肾益精、养血润肠之功,芒硝、莱菴合用具有软坚润肠通便之效,四药合用从而使肠道滋润,大便软化,这与与肠道水液代谢密切相关。提示硝菴通结方治疗功能性便秘的作用机制可能与通过改变结肠组织中 VIP 及 AQP3 的表达进而调节肠道水液代谢来实现。

[参考文献]

- [1] 丁义江,哈楠林,丁曙晴,等. 结肠慢传输型便秘与突触素和 P 物质及 VIP 的临床研究[J]. 中华胃肠外科杂志,2004,7(6):485-487.
- [2] 何俊堂,刘海峰,房殿春,等. 慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛内 VIP 能神经,SP 能神经的免疫组化研究[J]. 消化外科,2004,3(2):122-124.
- [3] Ikarashi N, Kon R, Iizasa T, et al. Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea [J]. Biol Pharma Bull,2012,35(6):957-962.
- [4] 陆忠凯,陈卫昌. 血管活性肠肽在调节肠黏膜屏障功能中的作用[J]. 国际消化病杂志,2008,28(3):226-228.
- [5] Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions [J]. Amino Acids,2011,1007(11):1184-1188.
- [6] Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A. Aquaporins in the digestive system [J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(2):71-80.
- [7] Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, et al. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon [J]. Braz J Med Biol Res, 1999, 32(10):1303-1313.
- [8] Tsujikawa T, Itoh A, Fuhmaga T, et al. Alteration of aquaporin mRNA expression after small bowel resection in the rat residual ileum and colon [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003,18(7):803-808.

[责任编辑 周冰冰]