

· 药理 ·

## 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP-cAMP-PKA-AQP3 信号通路的影响

周永学, 王郁金\*, 闫曙光, 谢培, 李莎, 王丹东  
(陕西中医药大学, 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 VIP-cAMP-PKA-AQP3 信号通路的影响。方法:SD 雄性大鼠 150 只,随机分为 5 组,分别为正常组、模型组、硝菴通结方高、中、低剂量组(380,190,95 g·kg<sup>-1</sup>),每组 30 只,除正常组外采用复方地芬诺酯 *ig* 法建立 SD 大鼠功能性便秘模型,给予不同剂量硝菴通结方 *ig*,共给药 4 周。检测大鼠首粒黑边排出时间及粪便含水率;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白质免疫印迹(Western blot)分别检测治疗 1,2,3 周不同时间点大鼠结肠组织中血管活性肠肽(VIP),环磷酸腺苷(cAMP),蛋白激酶 A(PKA),水通道蛋白 3(AQP3) mRNA 及蛋白质的表达变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠首粒黑便排出时间显著延长,粪便含水率显著降低( $P < 0.01$ ),结肠组织中 VIP,cAMP,PKA,AQP3 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ );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显著缩短,粪便含水率明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ),结肠组织中 VIP,cAMP,PKA,AQP3 的 mRNA 和蛋白表达水平均有升高趋势,且高、中剂量组较较低剂量组升高更显著,给药后第 2,3 周较第 1 周的指标变化更显著( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论:硝菴通结方能够调节胃肠动力和改善肠道水液代谢治疗功能性便秘,其机制可能是通过干预 VIP-cAMP-PKA-AQP3 通路来实现,并且具有一定的时间和剂量依赖性。

**[关键词]** 硝菴通结方; 功能性便秘大鼠; VIP-cAMP-PKA-AQP3 信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0099-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240099

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0934.034.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-29 9:34

### Effect of Xiaofu Tongjie Recipe on VIP-cAMP-PKA-AQP3 Signaling Pathway in Colon Tissues of Rats with Functional Constipation

ZHOU Yong-xue, WANG Yu-jin\*, YAN Shu-guang, XIE Pei, LI Sha, WANG Dan-dong  
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Xiaofu Tongjie recipe on VIP-cAMP-PKA-AQP3 signaling pathway in colon tissues of rats with functional constipation in rats. **Method:** Totally 150 SD male rats were randomly divided into normal group, model group, Xiaofu Tongjie recipe high dose, middle dose and low dose groups (380, 190, 95 g·kg<sup>-1</sup>),  $n = 30$  in each group. Compound diphenoxylate was applied by *ig* to induce functional constipation SD rat models, and then different doses of Xiaofu Tongjie recipe were given by *ig* administration for 4 weeks. The excretion time of first black defecating feces and moisture content in the feces were detected. The Real-time PCR and Western bolt were used respectively to detect the mRNA and protein expression levels of vasoactive intestinal peptide (VIP), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A (PKA) and aquaporin 3 (AQP3) at different time points after treatment of 1, 2, 3 weeks. **Result:** As compared with the

**[收稿日期]** 20151106(001)

**[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);陕西省教育厅项目(320104-203010021)

**[第一作者]** 周永学, 硕士, 教授, 从事方剂配伍研究工作, Tel:029-38185455, E-mail:zhou8521@163.com

**[通讯作者]** \*王郁金, 博士, 副教授, 从事中医药防治慢性病研究工作, Tel:029-38185297, E-mail:wangyujin411@126.com

normal group, the excretion time of first black defecating feces was significantly prolonged in model group; moisture content in the feces was significantly reduced ( $P < 0.01$ ); the mRNA and protein expression levels of VIP, cAMP, PKA and AQP3 in colon tissues were significantly reduced ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the excretion time of first black defecating feces was significantly shortened in various Xiaofu Tongjie recipe groups, and the moisture content in the feces was significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the mRNA and protein expression levels of VIP, cAMP, PKA and AQP3 in colon tissues were increased, and the increase was more obvious in high and middle dose groups; the changes of the indexes at week 2 and week 3 were more obvious than those of week 1 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Xiaofu Tongjie recipe can regulate the intestinal peristalsis and intestinal fluid metabolism and cure the functional constipation in a time and dose-dependent manner, which may be achieved by intervention on VIP-cAMP-PKA-AQP3 signaling pathway.

[ **Key words** ] Xiaofu Tongjie recipe; rats with functional constipation; VIP-cAMP-PKA-AQP3 signaling pathway

功能性便秘是常见的胃肠疾病,随着人们生活水平的提高、工作节奏的加快、人口老龄化等,其发病率逐年上升。目前西医治疗功能性便秘多采用泻剂和促动力药为主,长期应用泻剂会形成“泻剂结肠”<sup>[1]</sup>。中医学认为功能性便秘,尤其老年便秘多以肾虚精亏为本,腑实燥结为标,因此本课题组参考《景岳全书》济川煎的组方,在张锡纯硝菴通结汤基础上加入肉苁蓉、当归,创立了硝菴通结方(肉苁蓉、当归、芒硝、莱菔)。本课题组前期研究发现硝菴通结方能够调节肠动力改善肠道水液代谢,从而使便秘症状显著改善<sup>[2-3]</sup>。丁义江等<sup>[4]</sup>等研究发现,功能性便秘患者结肠组织中血管活性肠肽(VIP)表达降低,引起肠道动力失常。目前研究发现,VIP还可以调节肠道水液代谢,其调节肠道水液代谢的作用是通过影响肠道上皮细胞水通道蛋白3(AQP3)的表达来实现的<sup>[5]</sup>。研究发现VIP发挥生物效应的重要中间环节之一是环磷酸腺苷-蛋白激酶A(cAMP-PKA)通路<sup>[6]</sup>,而AQP3的表达也受到cAMP-PKA通路的调节<sup>[7]</sup>,那么功能性便秘发生的水液代谢障碍可能与VIP-cAMP-PKA-AQP3信号通路有关。本实验通过进一步研究硝菴通结方对功能性便秘结肠组织中VIP-cAMP-PKA-AQP3信号通路的影响,探讨其改善肠道水液代谢的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康成年SD大鼠150只,雄性,体重(200±20)g,购于西安交通大学医学院实验动物中心,合格证号SCXK(陕)2012-0003。

**1.2 药物及试剂** 复方地芬诺酯片(江苏常州康普药业有限公司,批号1305002);硝菴通结方(肉苁蓉15g,当归15g,芒硝30g,鲜莱菔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王郁金教授鉴定,药品质量合格;以上药物鲜莱菔切片,分2次同芒硝水煎,得浓汁,入肉苁蓉、当归同煎,并浓缩至56mL(生药量19g·mL<sup>-1</sup>),4℃冰箱保存备用。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号ER101-01H30716Q046),BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海贝博生物公司,批号BB20140722);兔抗鼠VIP,兔抗鼠CAMP,兔抗鼠PKA,兔抗鼠AQP3一抗(美国Bioworld公司,批号分别为BS2919,BS6542,BS1576,BS3671);山羊抗兔IgG二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号SA1022),VIP,CAMP,PKA,AQP3引物设计与合成由南京金斯瑞生物科技有限公司提供。

**1.3 仪器** ELXSOSIU型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司),CR22G II型高速冷冻离心机(日本日立公司),ABI 7500型Real-time PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司),FC3型全自动凝胶成像系统(美国Protein Simple公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** SD雄性大鼠150只,随机分为5组,分别为正常组、模型组、硝菴通结方高、中、低剂量组(380,190,95g·kg<sup>-1</sup>),各30只。

**2.2 模型建立** 复方地芬诺酯混悬液15mg·kg<sup>-1</sup>ig建立功能性便秘大鼠模型,正常组以等体积生理盐水ig,每天1次。当大鼠出现精神状态差,活动减少,进食减少,体重减轻,大便干硬、首粒黑便排出时间延长等表现,为造模成功,共给药4周。

**2.3 给药方法** 造模结束后,正常组和模型组正常饲养,以0.9%生理盐水ig;治疗组分别给予不同浓度的硝菴通结方水煎剂ig,每日1次。根据大鼠与

人之间的用药剂量换算方法,大鼠高、中、低剂量组给药量分别给予不同剂量的硝菴通结方 *ig*。分别于硝菴通结方治疗后第 1,2,3 周,每组随机取 10 只大鼠进行标本采集与指标检测。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 首粒黑便时间及粪便含水率检测** 分别于造模结束后给药 1,2,3 周,末次给药后 30 min 以  $1\text{ m}\cdot 100^{-1}$  的墨汁 *ig*,记录时刻,待其排出第 1 粒黑便时再记录时刻,记录各组大鼠的首粒黑便的排出时间。分别于给药 1,2,3 周,收集各组大鼠 6 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。

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

**2.4.2 Real-time PCR 检测** 取新鲜冻存的大鼠结肠组织 100 mg,置于 5 mL 离心管中,加入 RNAhold 1 mL,裂解液 0.5 mL,匀浆;按照 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,上机检测总 RNA 浓度。总 RNA 反转录 cDNA:将总 RNA 稀释为  $150\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,抽取总 RNA 6  $\mu\text{L}$ ,加入 Mix 4  $\mu\text{L}$  及无 RNA 酶水 10  $\mu\text{L}$ ,共 20  $\mu\text{L}$  的反应体系;轻轻混匀后 42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min,85  $^{\circ}\text{C}$  加热 5 s 失活,上机检测 cDNA 浓度。向各管中加入  $2\times\text{PCR Taq Mix}$  12.5  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  各基因正反向引物混合物 0.5  $\mu\text{L}$ ,对应的 cDNA 各 1  $\mu\text{L}$ ;一管中不加模板用作阴性组;各管补加水至 25  $\mu\text{L}$ ,混匀;置于 PCR 仪中进行检测,PCR 的统计学分析采用的是相对定量,采用  $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算相对表达量。引物系列见表 1。

**2.4.3 蛋白质免疫印迹 (Western bolt) 检测** 取结肠组织 200 mg 左右放入 5 mL 离心管中,用眼科剪刀剪碎;加入配置好的裂解液,放于冰上裂解 30 min,匀浆;充分裂解后,于 4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 3~5 min;采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,收集蛋白。按照说明配胶、灌胶、上样,每条泳道上 50  $\mu\text{g}$  样品蛋白;在  $1\times$  的电泳缓冲液中电泳

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Sequence of Real-time PCR primer

| 引物名称           | 引物序列                          | 片段长度/ pb |
|----------------|-------------------------------|----------|
| VIP            | 上游 5'-TCTGCAAGGCTAGCAATCGA-3' | 229      |
|                | 下游 5'-GGTGGAGTCCCTATCACTGG-3' |          |
| cAMP           | 上游 5'-TGAGGACCCAGATACTCCCA-3' | 200      |
|                | 下游 5'-CAAAAGACTCTGCAGCCTGG-3' |          |
| PKA            | 上游 5'-GGGTAGCCTCAGTGCTTACA-3' | 193      |
|                | 下游 5'-CCACGGCAACATTAGACCAG-3' |          |
| AQP3           | 上游 5'-AGTGAGTCAGGAAAGTGCCA-3' | 205      |
|                | 下游 5'-TGAGCTACGCCCTCTTATG-3'  |          |
| $\beta$ -actin | 上游 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3' | 180      |
|                | 下游 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3' |          |

1.5 h;采用 100 V 冰水混合浴中转膜;1 $\times$ TBST 洗膜,5% 脱脂奶粉 + TBST 封闭。加入稀释 500 倍的一抗 4 mL,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育;TBST 洗膜;加入稀释 1 000 倍的二抗 4 mL,室温下孵育 2 h;洗膜。滴加 ECL 发光液于膜表面,采用全自动凝胶成像系统进行拍照。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行处理,实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料用 One-WAY ANOVA 方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对功能性便秘大鼠首粒黑便排除时间的影响** 与正常组比较,模型组大鼠首粒黑便出现时间均显著延长 ( $P < 0.01$ );治疗 1,2 周后,与模型组比较,高、中、低剂量组首粒黑便出现时间均明显缩短 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );3 周后高、中、低剂量组大鼠首粒黑便时间显著缩短 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.2 对功能性便秘大鼠粪便含水率的影响** 与正常组比较,模型组大鼠粪便含水率明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,硝菴通结方治疗 1,2,3 周后,高、中剂量组粪便含水率明显增多 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3。

表 2 硝菴通结方对功能性便秘大鼠首粒黑便排除时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of Xiaofu Tongjie recipe on first grain of black stool elimination time in functional constipation rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 1 周                              | 2 周                              | 3 周                              |
|-------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 正常    | -                                 | 195.14 $\pm$ 20.78               | 188.55 $\pm$ 19.59               | 177.66 $\pm$ 21.50               |
| 模型    | -                                 | 324.56 $\pm$ 40.75 <sup>2)</sup> | 282.06 $\pm$ 38.80 <sup>2)</sup> | 287.69 $\pm$ 25.99 <sup>2)</sup> |
| 硝菴通结方 | 380                               | 206.91 $\pm$ 15.96 <sup>4)</sup> | 178.54 $\pm$ 16.30 <sup>4)</sup> | 169.45 $\pm$ 23.99 <sup>4)</sup> |
|       | 190                               | 220.11 $\pm$ 38.06 <sup>4)</sup> | 192.74 $\pm$ 16.04 <sup>4)</sup> | 184.24 $\pm$ 13.43 <sup>4)</sup> |
|       | 95                                | 261.36 $\pm$ 40.17 <sup>3)</sup> | 225.11 $\pm$ 37.58 <sup>3)</sup> | 206.74 $\pm$ 38.49 <sup>4)</sup> |

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 3~7 同)。

表 3 硝菴通结方对功能性便秘大鼠粪便含水率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Xiaofu Tongjie recipe on fecal water content influence in functional constipation rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | 1 周                      | 2 周                      | 3 周                      |
|-------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常    | -                     | 52.4 ± 3.7               | 51.0 ± 5.2               | 51.4 ± 6.3               |
| 模型    | -                     | 40.6 ± 2.6 <sup>2)</sup> | 41.9 ± 3.5 <sup>2)</sup> | 44.3 ± 5.4 <sup>1)</sup> |
| 硝菴通结方 | 380                   | 47.0 ± 2.6 <sup>4)</sup> | 50.2 ± 6.3 <sup>4)</sup> | 54.0 ± 9.4 <sup>4)</sup> |
|       | 190                   | 43.2 ± 3.8 <sup>3)</sup> | 45.5 ± 5.5 <sup>3)</sup> | 47.2 ± 5.9 <sup>3)</sup> |
|       | 95                    | 41.8 ± 6.1               | 43.8 ± 8.2               | 45.2 ± 8.6               |

### 3.3 对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP, cAMP, PKA, AQP3 mRNA 表达水平的影响

**3.3.1** 对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织 VIP mRNA 表达显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比

较,给药 1 周后高剂量组 VIP mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ ),中剂量组也明显升高( $P < 0.05$ ),低剂量组无显著差异;给药 2,3 周后高、中剂量组 VIP mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ ),低剂量组 VIP mRNA 表达也明显升高( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP mRNA 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of Xiaofu Tongjie recipe on expression of VIP mRNA levels in colon tissue of functional constipation rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | 1 周                       | 2 周                       | 3 周                       |
|-------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常    | -                     | 1.00 ± 0.24               | 1.00 ± 0.26               | 1.00 ± 0.57               |
| 模型    | -                     | 0.31 ± 0.08 <sup>2)</sup> | 0.19 ± 0.09 <sup>2)</sup> | 0.29 ± 0.03 <sup>2)</sup> |
| 硝菴通结方 | 380                   | 0.78 ± 0.36 <sup>4)</sup> | 0.91 ± 0.42 <sup>4)</sup> | 1.07 ± 0.66 <sup>4)</sup> |
|       | 190                   | 0.42 ± 0.12 <sup>3)</sup> | 0.79 ± 0.51 <sup>4)</sup> | 0.83 ± 0.09 <sup>4)</sup> |
|       | 95                    | 0.33 ± 0.24               | 0.41 ± 0.21 <sup>3)</sup> | 0.61 ± 0.47 <sup>3)</sup> |

**3.3.2** 对功能性便秘大鼠结肠组织中 cAMP mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 cAMP mRNA 表达显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,给药 1 周后高、中剂量组 cAMP mRNA 表达明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),低剂量组无显著差异;给药 2

周后硝菴通结方高、中剂量组 cAMP mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ ),低剂量组无显著差异;给药 3 周后高、中剂量组 cAMP mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ ),低剂量组 cAMP mRNA 表达也明显升高( $P < 0.05$ )。见表 5。

表 5 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 cAMP mRNA 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effect of Xiaofu Tongjie recipe on expression of cAMP mRNA levels in colon tissue of functional constipation rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | 1 周                       | 2 周                       | 3 周                       |
|-------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常    | -                     | 1.00 ± 0.78               | 1.00 ± 0.66               | 1.00 ± 0.67               |
| 模型    | -                     | 0.27 ± 0.14 <sup>2)</sup> | 0.48 ± 0.24 <sup>2)</sup> | 0.34 ± 0.18 <sup>2)</sup> |
| 硝菴通结方 | 380                   | 1.12 ± 0.38 <sup>4)</sup> | 1.26 ± 0.39 <sup>4)</sup> | 1.37 ± 0.21 <sup>4)</sup> |
|       | 190                   | 0.46 ± 0.16 <sup>3)</sup> | 0.95 ± 0.57 <sup>4)</sup> | 0.89 ± 0.18 <sup>4)</sup> |
|       | 95                    | 0.25 ± 0.15               | 0.61 ± 0.17               | 0.62 ± 0.32 <sup>3)</sup> |

**3.3.3** 对功能性便秘大鼠结肠组织中 PKA mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 PKA mRNA 表达显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,给药 1 周后高剂量组 PKA mRNA 显著升高( $P < 0.01$ ),硝菴通结方中、低剂量组无显著差异;给药 2 周后高、中剂量组 PKA mRNA 显著升高( $P < 0.01$ ),低剂量组无显著差异;给药 3 周后高、中、低剂量组 PKA mRNA

明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 6。

**3.3.4** 对功能性便秘大鼠结肠组织中 AQP3 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 AQP3 mRNA 表达显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,给药 1 周后中、高剂量组 AQP3 mRNA 明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ );给药 2,3 周后高、中剂量组 AQP3 mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ )。见表 7。

表 6 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 PKA mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 6 Effect of Xiaofu Tongjie recipe to expression of PKA mRNA levels in colon tissue of functional constipation rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 1 周                       | 2 周                       | 3 周                       |
|-------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常    | -                     | 1.00 ± 0.46               | 1.00 ± 0.33               | 1.00 ± 0.27               |
| 模型    | -                     | 0.24 ± 0.11 <sup>2)</sup> | 0.49 ± 0.18 <sup>2)</sup> | 0.58 ± 0.24 <sup>2)</sup> |
| 硝菴通结方 | 380                   | 0.89 ± 0.16 <sup>4)</sup> | 1.43 ± 0.52 <sup>4)</sup> | 2.13 ± 1.05 <sup>4)</sup> |
|       | 190                   | 0.59 ± 0.23               | 1.18 ± 0.44 <sup>4)</sup> | 1.32 ± 0.33 <sup>4)</sup> |
|       | 95                    | 0.37 ± 0.24               | 0.64 ± 0.24               | 0.79 ± 0.45 <sup>3)</sup> |

表 7 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 AQP3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 7 Effect of Xiaofu Tongjie formula on expression of AQP3 mRNA levels in colon tissue of functional constipation rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

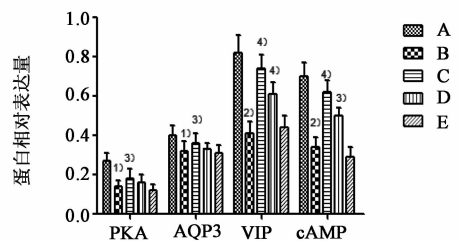
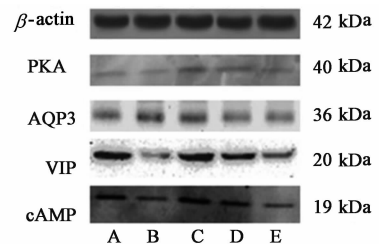
| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 1 周                       | 2 周                       | 3 周                       |
|-------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常    | -                     | 1.00 ± 0.18               | 1.00 ± 0.21               | 1.00 ± 0.37               |
| 模型    | -                     | 0.16 ± 0.03 <sup>2)</sup> | 0.33 ± 0.15 <sup>2)</sup> | 0.58 ± 0.07 <sup>2)</sup> |
| 硝菴通结方 | 380                   | 1.37 ± 0.21 <sup>4)</sup> | 1.45 ± 0.25 <sup>4)</sup> | 1.90 ± 0.53 <sup>4)</sup> |
|       | 190                   | 0.45 ± 0.17 <sup>3)</sup> | 0.68 ± 0.21 <sup>4)</sup> | 0.89 ± 0.29 <sup>4)</sup> |
|       | 95                    | 0.38 ± 0.04               | 0.44 ± 0.31               | 0.62 ± 0.32               |

3.4 对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP, cAMP, PKA, AQP3 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠结肠组织中 VIP, AQP3, cAMP, PKA 蛋白均明显降低 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ); 硝菴通结方治疗 1 周后, 与模型组比较, 高剂量组 VIP, AQP3, cAMP, PKA 蛋白表达水平有明显升高 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 低剂量变化不显著; 硝菴通结方治疗 2 周后, 与模型组比较, 各剂量组 VIP, AQP3, cAMP, PKA 蛋白表达水平有一定升高趋势, 以高、中剂量组升高较为显著 ( $P < 0.01$ ); 硝菴通结方治疗 3 周后, 与模型组比较, 各剂量组 VIP, AQP3, cAMP, PKA 蛋白表达水平有明显升高趋势 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。见图 1~3。

#### 4 讨论

现代研究表明, 肠道动力障碍和肠道水液代谢紊乱引起的肠道功能失常是功能性便秘形成的核心因素<sup>[8-9]</sup>。其中 VIP 与胃肠道动力关系最为密切, 具有使胃肠道平滑肌松弛和舒血管作用<sup>[10-11]</sup>。功能性便秘可能与结肠组织中 VIP 水平降低异常改变, 导致肠神经系统功能紊乱, 肠动力障碍有关<sup>[4,12]</sup>。VIP 发挥生物效应的重要中间环节之一是 cAMP-PKA 通路<sup>[13]</sup>, 目前研究发现, AQP3 在调节结肠水液代谢中起着重要的作用, 大黄素可以通过上调 cAMP-PKA 信号通路使小鼠结肠组织和人结肠上皮细胞 (HT-29) 中 AQP3 mRNA 和蛋白的表达升高, 提高小鼠粪便量和粪便含水率, 起到润肠通便治疗便秘的作用<sup>[14]</sup>。

中医认为功能性便秘尤其是老年便秘多与肾虚有关<sup>[15]</sup>, 肾主五液而司二便, 肾虚精亏, 肠道失润, 推动无力, 传导不利, 导致大便秘结。本病肾虚精亏



A. 正常组; B. 模型组; C. 硝菴通结方 380 g·kg<sup>-1</sup> 组; D. 硝菴通结方 190 g·kg<sup>-1</sup> 组; E. 硝菴通结方 95 g·kg<sup>-1</sup> 组。与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (图 2, 3 同)

图 1 硝菴通结方治疗 1 周后对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP, cAMP, PKA, AQP3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Effect of Xiaofu Tongjie recipe on expression of VIP, cAMP, PKA, AQP3 protein levels in colon tissue of functional constipation rats after 1 weeks of treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

为本, 腑实燥结为标, 因此参考《景岳全书》济川煎的组方, 在张锡纯硝菴通结汤基础上加入肉苁蓉、当归, 创立了硝菴通结方。方中肉苁蓉味咸性温, 温肾益精, 润肠通便, 为君药; 芒硝既能助肉苁蓉润肠通便, 又能轻下肠热, 为臣药; 当归养血润肠通便; 莱菔既能宽肠利气、增强通便作用, 又能制约芒硝之寒凉, 缓其泻下, 共为佐药。四药合用, 既可温肾益精以治其本, 又能润肠泻下通便治其标。前期研究发现硝菴通结方可调节肠动力和肠道水液代谢治疗功能性便秘, 本研究进一步发现其调节胃肠动力和改

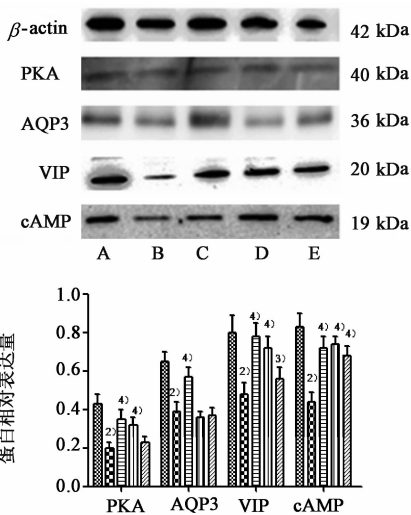


图 2 硝菴通结方治疗 2 周后对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP, cAMP, PKA, AQP3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Effect of Xiaofu Tongjie recipe on expression of VIP, cAMP, PKA, AQP3 protein levels in colon tissue of functional constipation rats after 2 weeks of treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

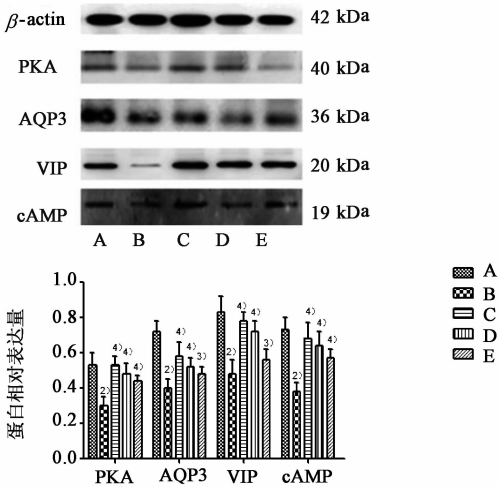


图 3 硝菴通结方治疗 3 周后对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP, cAMP, PKA, AQP3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 3 Effect of Xiaofu Tongjie recipe on expression of VIP, cAMP, PKA, AQP3 protein levels in colon tissue of functional constipation rats after 3 weeks of treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

善肠道水液代谢的机制可能是通过干预 VIP-cAMP-PKA-AQP3 通路来实现。

【参考文献】

[ 1 ] 郭慧,孙建华.慢传输型便秘发病因素的研究[J].辽宁中医杂志,2010,37(5):949-952.  
[ 2 ] 王郁金,周永学,谢培,等.硝菴通结方对功能性便秘大鼠排便及胃肠动力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(17):146-149.

[ 3 ] 王郁金,周永学,张红,等.硝菴通结方对功能性便秘大鼠肠道水液代谢的影响[J].陕西中医,2015,36(3):368-370.  
[ 4 ] 丁义江,哈楠林,丁曙晴.结肠慢传输型便秘与突触素和 P 物质及血管活性肠肽的临床研究[J].中华胃肠外科杂志,2004,7(6):485-487.  
[ 5 ] Ikarashi N, Mochiduki T, Takasaki A, et al. A mechanism by which the osmotic laxative magnesium sulphate increases the intestinal aquaporin 3 expression in HT-29 cells[J]. Life Sci, 2011, 88(3/4):194-200.  
[ 6 ] El Zein N, Badran B, Sariban E. VIP differentially activates beta2 integrins, CR1, and matrix metalloproteinase-9 in human monocytes through cAMP/PKA, EPAC, and PI-3K signaling pathways via VIP receptor type 1 and FPRL1[J]. J Leukoc Biol, 2008, 83(4):972-981.  
[ 7 ] Itoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, et al. Enhancement of aquaporin3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell line[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(2):203-210.  
[ 8 ] 姚景春,冯芹,孙宝存.己酮可可碱对慢传输型便秘模型大鼠的结肠黏液分泌和结肠肌电活动的影响[J].中国药理学通报,2011,27(12):1749-1752.  
[ 9 ] Amir A A. Etiological factors of constipation in the elderly, with emphasis on functional causes[J]. East Mediterr Health J, 2011, 17(8):708-711.  
[ 10 ] 刘映,赵小睿,王锐,等.枳术丸对 2 型糖尿病功能性便秘血清胃肠激素的影响[J].中国中药杂志,2008,33(24):2966-2968.  
[ 11 ] 包云光,舒小莉,李小兵,等.肠神经系统递质和 Cajal 间质细胞在大鼠慢传输型便秘中的作用[J].中国当代儿科杂志,2009,11(6):481-485.  
[ 12 ] 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.  
[ 13 ] 李雪,沈明勤.肠康方对腹泻型肠易激综合征大鼠 SP, VIP 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(12):112-115.  
[ 14 ] Zheng Y F, Liu C F, Lai W F, et al. The laxative effect of emodin is attributable to increased aquaporin 3 expression in the colon of mice and HT-29 cells[J]. Fitoterapia, 2014, 96:25-32.  
[ 15 ] 唐洪波,陈宝国,付倩雨,等.右归丸治疗脾肾阳虚型老年便秘的临床观察[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(23):168-171.

【责任编辑 周冰冰】