

枳术丸水煎液及其拆方含药血清对大鼠结肠Cajal间质细胞增殖和凋亡的影响

滕广飞^{1,2}, 刘富林^{1*}, 夏旭婷¹, 涂琴蓉¹, 王婷¹

(1. 湖南中医药大学 中医学院, 长沙 410000; 2. 中国中医科学院 望京医院, 北京 100102)

[摘要] 目的:探讨枳术丸水煎液及其拆方对大鼠结肠Cajal间质细胞(ICC)增殖和凋亡的影响及其分子机制,并从细胞分子层面分析中医攻补兼施法治疗慢传输型便秘可能的机制。方法:将40只大鼠随机分成白术组、枳实组、枳术丸组、空白血清组,每组10只。白术组灌以 $17.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 白术水煎液,枳实组灌以 $8.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 枳实水煎液,枳术丸组灌以 $26.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 枳术丸水煎液,空白血清组灌以无菌蒸馏水3 mL,每日1次,连续7 d,取血制备含药血清和空白血清。将4组含药血清分别配成5%,10%,15%,20%4个体积分数,干预24 h,观察ICC的数量、形态,用细胞增殖毒性检测试剂盒(CCK-8)检测各组细胞增殖情况,测定各组最佳干预体积分数。将大鼠结肠ICC细胞分为正常组、空白血清组、白术组、枳实组、枳术丸组,5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EdU)检测各组ICC的增殖情况,流式细胞仪检测各组ICC的凋亡情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组ICC中X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP),增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达情况。结果:与正常组比较,空白血清组、白术组、枳实组最佳干预体积分数均为10%,枳术丸组最佳干预体积分数为5%。与正常组比较,所有实验中空白血清组对ICC增殖和凋亡的影响没有明显差异;与正常组及空白血清组比较,白术组、枳实组、枳术丸组ICC增殖率有显著差异($P<0.05$, $P<0.01$),与白术组和枳实组比较,枳术丸组对ICC增殖率明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);与枳实组比较,白术组对ICC增殖率变化不明显。与正常组及空白血清组比较,白术组、枳实组、枳术丸组ICC的凋亡率无明显差异;与正常组及空白血清组比较,白术组、枳实组、枳术丸组内的XIAP,PCNA蛋白水平均明显上调($P<0.05$, $P<0.01$),三组间比较差异不明显。结论:枳术丸、枳实、白术在一定浓度下均能通过增加XIAP,PCNA蛋白表达促进ICC的增殖,且对ICC的凋亡无明显影响;以攻补兼施法立法的方剂枳术丸能促进ICC的增殖,并且其增殖效果优于攻伐单药枳实和补益单药白术。

[关键词] 枳术丸; Cajal间质细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 攻补兼施

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)19-0120-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201709

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200628.1256.002.html>

[网络出版日期] 2020-6-29 07:02

Efficacy of Zhizhuwan Decoction and Its Ingredient-contained Serums on Proliferation and Apoptosis of Rat Colon Interstitial Cells of Cajal

TENG Guang-fei^{1,2}, LIU Fu-lin^{1*}, XIA Xu-ting¹, TU Qin-rong¹, WANG Ting¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000, China;

2. Wangjing Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the efficacy and molecular mechanism of Zhizhuwan decoction and its ingredient-contained serums on the proliferation and apoptosis of rat colon interstitial cells of cajal (ICC), and make a molecule-level analysis of the possible mechanism of traditional Chinese medicine (TCM) purgation-tonifying therapy in treating slow transit constipation (STC). **Method:** A total of 40 rats were divided

[收稿日期] 20191230(029)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81603597);湖南省教育厅科学研究项目(17A161);湖南省中医药科研计划项目(201954)

[第一作者] 滕广飞,在读硕士,从事中医基础理论治则与治法研究,E-mail:745078942@qq.com

[通信作者] *刘富林,博士,副教授,硕士生导师,从事消化系统疾病中医药防治和中医基础理论治则与治法研究,E-mail:616217372@qq.com

into *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*(AMR) group, *Aurantii Fructus Immaturus*(AFI) group, Zhizhuwan group and blank serum group on random basis, with 10 in each group. Baizhu group was given $17.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of AMR decoction by gavage, AFI group was given $8.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ AFI decoction by gavage, Zhizhuwan group was given $26.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Zhizhuwan decoction by gavage, and blank serum group was given 3 mL sterile distilled water for 7 consecutive days, once a day. Drug-contained serums and blank serum were collected from blood of the above groups and diluted to 5%, 10%, 15% and 20% concentrations. Each concentration was intervened for 24 h and 48 h, and the amount and status of ICC were observed. The best intervening concentration and time for each group with cell counting kit-8 (CCK-8) were determined. Rat colon ICC was divided into blank control group, blank serum group, AMR group, AFI group and Zhizhuwan group. ICC proliferation for each group was detected with EdU, ICC apoptosis for each group was detected by flow cytometry, and expressions of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were detected by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the best intervention concentration for blank serum group, AMR group and AFI group was 10%, while that for Zhizhuwan group was 5%. The best intervention times for the above groups were all 24 h. No distinct difference between the effect of blank control group and blank serum group on the proliferation and apoptosis of ICC was observed. In comparison with blank control group and blank serum group, AMR group, AFI group and Zhizhuwan group showed significant changes in ICC proliferation rate ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was a greater increase in ICC proliferation rate of Zhizhuwan group than that of AMR group and Zhizhu group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with no distinct difference between the changes of ICC proliferation rates in AMR group and AFI group. There was no significant difference between the changes of ICC apoptosis rates in AMR group, AFI group and Zhizhuwan group than in blank control group and blank serum group. There were significant increases in the expressions of XIAP and PCNA in AMR group, AFI group and Zhizhuwan group than in blank control group and blank serum group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but with little difference among the three groups. **Conclusion:** At certain concentrations, Zhizhuwan, AFI and AMR all have the effect in improving ICC proliferation by increasing XIAP and PCNA expressions, with no evident effect on the apoptosis of ICC, based on TCM purgation-tonifying therapy, Zhizhuwan has the effect in improving ICC proliferation, with a better effect than single administration with AFI or AMR.

[Key words] Zhizhuwan; interstitial cells of Cajal; proliferation; apoptosis; purgation-tonifying therapy

慢传输型便秘(STC)属于功能性疾病,患病率占便秘总数的45.5%,是临床上最常见的一类便秘类型^[1],属于中医便秘范畴,病因为肠道蠕动功能障碍。研究表明,肠运动障碍通常与Cajal间质细胞(ICC)数量减少或超微结构损伤有关^[2],同时ICC数量的减少和发育受阻,均会引发胃肠功能障碍的疾病^[3]。WANG等^[4]对STC结肠切除术后患者的结肠切片研究发现,结肠内环肌层、外纵肌层和肌间神经丛的ICC数量均减少。因此,ICC的结构及功能变化是STC的微观改变已成为共识。枳术丸自古以来是治疗便秘的经典方,疗效显著,组方精炼,是攻补兼施法的代表方剂。中医临床中运用枳术丸及其加减方治疗便秘颇有疗效,进一步探讨枳术丸治疗便秘的作用机制尤为必要。攻补兼施法是中医治则中的重要治法之一。目前治疗STC多使用

泻下药物,其依赖性强,后期往往只能通过加大药物剂量来治疗。中医治疗STC依据攻补兼施法配伍的方药,在解除患者病证之苦的同时,更大减轻了患者的身心压力。因此尝试用现代医学中的分子机制阐述中医基础理论中攻补兼施法,可为现代医学解读中医学理论体系带来新的思路。本实验根据《脾胃论》中枳术丸记载“白术二两,枳实麸炒黄,去瓢,一两”的2:1配比进行实验。以往动物实验证实,枳实、白术单味药及配伍均对胃肠功能有良好的调节作用^[5-7]。前期动物研究证实,枳术丸能通过提高ICC的数量促进肠道蠕动,达到治疗便秘的目的^[8]。为了进一步明确枳术丸促进肠蠕动的机制,明确中医攻补兼施法与单纯攻伐或补益治法的微观差异,本实验从细胞学角度研究枳术丸水煎液及其拆方(白术和枳实)对结肠ICC增殖和凋亡的干

预影响。

1 材料

1.1 细胞和动物 大鼠结肠原代 ICC, 购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司, 编号 RAT/MIC/RAB-iCell-d024。取 2~3 代生长状态良好细胞用于实验检测。SPF 级 SD 大鼠 40 只, 雄鼠, 体质量(220±5) g, 购自湖南斯莱克景达公司, 用于含药血清制备, 动物许可证号 SYXK(湘)2013-0005。实验动物经湖南中医药大学动物伦理委员会批准同意, 编号 HN-LL-2015-026。

1.2 药物 枳术丸水煎液白术与枳实按 2:1 的比例配制, 拆方中白术和枳实比为 2:1 不变, 白术 60 g, 枳实 30 g, 枳术丸总计 90 g, 以上药材由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供。所用药品均按照 2015 年版《中国药典》经湖南中医药大学第一附属医院张志国主任药师进行鉴定, 均符合标准。所有药品均制成水煎剂, 煎药 2 次后合并煎液, 将滤液浓缩成 2 kg·L⁻¹ 的水煎液放入玻璃瓶中, 编号, 冷藏。

1.3 试剂 原代细胞培养体系(赛百慷生物技术股份有限公司, 批号 PriMed-iCell-025); 胰蛋白酶(0.25%, 美国 Gibco 公司, 批号 25200056); 细胞增殖毒性检测(CCK-8)试剂(日本同仁化学研究所, 批号 KU746); EDU 检测试剂盒(广州瑞博生物公司, 批号 C10310-1); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号 KGA108); Tris, APS, SDS, TEMED, 聚山梨酯-20(Tween-20), 丙烯酰胺, 甘氨酸, 甲叉双丙烯酰胺(美国 Sigma 公司, 批号分别为 V900483, 10002618, MB2479, T105497, 30189328, 0341, V900144, 0172); 兔抗免疫球蛋白(Ig)G, 鼠抗 IgG, 大鼠抗 β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国 Proteintech 公司, 批号分别为 SA00001-1, SA00001-2, 10004413); 蛋白酶抑制剂(德国 Merck 公司, 批号 583794); 蛋白酶抑制剂(瑞士 Roche 公司, 批号 P1260); SuperECL Plus 超敏发光液(美国 Thermo Pierce 公司, 批号 K-12045-D50); 显影液、定影液(中国上海佳信公司, 批号分别为 BW-61, BW-62); 凋亡抑制蛋白(XIAP), 增殖细胞核抗原(PCNA)(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab21278, ab92552)。

1.4 仪器 DSZ2000X 型荧光倒置显微镜(北京中显恒业仪器), DH-160I 型直热式二氧化碳培养箱(上海三藤仪器), YT-CJ-2NB 型超净工作台(北京亚泰隆公司), SL02 型低速离心机(上海知信实验仪

器), EnSpire 型多功能酶标仪(美国 Perkinelmer 公司), DYCZ-24DN 型电泳槽(美国 Bio-Rad 公司), DYY-6C 型电泳仪和 DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一仪器厂), A00-1-1102 型流式细胞检测仪(美国 Beckman 公司), H1650R 型台式冷冻离心机(深圳黑马公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 将 40 只 SD 大鼠分为白术组、枳实组、枳术丸组、空白血清组, 按随机数字表法每组分配 10 只大鼠, 适应性喂养 3 d, 根据实验动物与人的体表面积比值表换算给药剂量, 白术组灌以 17.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ 白术水煎液, 枳实组灌以枳实水煎液 8.9 g·kg⁻¹·d⁻¹, 枳术丸组灌以 26.4 g·kg⁻¹·d⁻¹ 枳术丸水煎液, 空白血清组灌以 3 mL 无菌蒸馏水, 每日 1 次, 连续 7 d。末次给药 1 h 后用 10% 水合氯醛腹腔麻醉, 腹主动脉采血。56 °C 水浴 30 min 后取出, 放入 4 °C 冰箱过夜, 待充分凝固后离心(3 000 r·min⁻¹, 15 min), 取上清于灭菌后离心管中, 标记, 置于 -80 °C 冰箱贮存备用。作用于细胞前 37 °C 水浴解冻, 并用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

2.2 各组含药血清和空白血清作用浓度筛选 取生长状态良好, 处于生长期的 2~3 代大鼠结肠 ICC, 将细胞稀释为 1×10⁵ 个/mL, 取 100 μL/孔接种至 96 孔板, 每组设 6 个复孔, 将 96 孔板放至 37 °C 5%CO₂ 培养箱培养。待观察细胞贴壁生长且形状良好, 选取贴壁 50% 且生长良好的 ICC, 吸出原培养液, 每组中每孔加入培养基稀释后体积分数为 5%, 10%, 15%, 20% 的各组含药血清和空白血清 100 μL, 作用 24 h, 全程避光吸出原细胞培养液, 每孔加入新细胞培养液和 CCK-8 溶液 10 μL, 将 96 孔板在培养箱内继续孵育 4 h, 用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度 A, 计算细胞增殖率。

2.3 EDU 检测各组细胞增殖情况 取贴壁生长良好的 ICC, 胰蛋白酶 1 min 消化后, 细胞重悬计数, 调至细胞浓度为 1×10⁵ 个/mL, 平均分成 5 组贴壁培养, 加入含药血清和完全新鲜的培养基, 处理 24 h 后按 EDU 检测试剂盒说明书上步骤操作, 染色完成后立即荧光倒置显微镜进行观测。

2.4 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况 按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作。待细胞加入各组含药血清培养 24 h 后, 收集细胞。加入试剂盒中试剂打散细胞团形成悬浮液; 避光室温下加入 Annexin V-FITC 混匀, 反应 15 min 后, 避光室温下加入 PI 混匀反应 15 min; 1 h 内进行

流式细胞仪检测。Annexin V-FITC(激发波长 $E_x=488\text{ nm}$, 发射波长 $E_m=530\text{ nm}$) 的绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测; PI 红色荧光(流式 $E_x=488\text{ nm}$, 发射波长 $E_m\geq 630$) 通过(即 PE 通道)进行检测。收集整理数据。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞内 XIAP, PCNA 蛋白表达 各组细胞进行不同浓度含药血清干预 24 h 后, 冰上预冷, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 2 次, 弃上清液, 加入 RIPA 裂解液 200 μL 吹打混匀, 冰上裂解 10 min, 用细胞刮子将裂解后的细胞刮下, 4 $^{\circ}\text{C}$, 低温离心后上清分装到 0.5 mL 的离心管中。按照 BCA 试剂盒使用说明操作, 测定蛋白浓度。根据待测的蛋白相对分子质量大小, 配置 12% 分离胶, 加入 TEMED 后混匀液体, 异丙醇封胶。配置 4.8% 的浓缩胶, 加入 TEMED 后混匀液体, 每个孔上样品蛋白 50~100 μg , 计算各个样品所需取样量, 加入制备好的电泳液, 4 组每孔上样 20 μL 开始电泳, 浓缩胶电泳电压 80 V, 分离胶电泳电压 120 V。待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳。分别切胶 XIAP, PCNA, β -actin。接通电源转膜 300 mA, XIAP 约 80 min, PCNA 约 50 min, β -actin 约 1 h。转膜完毕后, 取出放入 TBST 中洗, 染膜, 检测蛋白转膜的效率。用 TBST 洗净。将取出的膜放入 5% 的脱脂奶粉溶液中, 摇床上充分封闭, 室温 1.5 h。将膜放入稀释好的一抗 (XIAP, 1:1 000; PCNA, 1:5 000) 中孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。洗膜 3 次, 每次 15 min。放入稀释后的二抗 1:5 000 共同孵育 90 min。吸出二抗, 洗膜每次 15 min 共 3 次。将膜用 ECL 化学发光液孵育 3 min, 保鲜膜将膜包裹杂交膜, 在暗盒内与 X 胶片曝光 5 min, 进行显影冲洗。用 Image J 软件分析。

2.6 统计学方法 实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 数据结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 满足正态性和方差齐性的计量资料采用多组计量资料单因素方差分析, 各组间两两比较使用 LSD 法; 不满足方差齐性, 采用多个独立样本比较的秩和检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同体积分数各组含药血清对 ICC 增殖率的影响 与正常组相比较, 作用 24 h, 各体积分数的空白血清组对 ICC 增殖率均无明显差异; 白术组 5%, 10%, 15%, 20% 4 个体积分数干预后大鼠结肠 ICC 增殖率升高 ($P<0.05, P<0.01$); 枳实组 5%, 10%, 15% 3 个体积分数干预后 ICC 增殖率升高 ($P<0.05,$

$P<0.01$); 枳术丸组 5%, 10%, 15% 3 个体积分数干预后 ICC 增殖率升高 ($P<0.05, P<0.01$)。空白血清组、白术组、枳实组均选用 10% 为最佳作用体积分数, 枳术丸组选用 5% 为最佳干预体积分数。见表 1。

表 1 不同体积分数各组含药血清对 ICC 干预 24 h 增殖率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of ingredient-contained serums of different concentrations on proliferation rate of ICC after 24 h ($\bar{x}\pm s, n=6$)

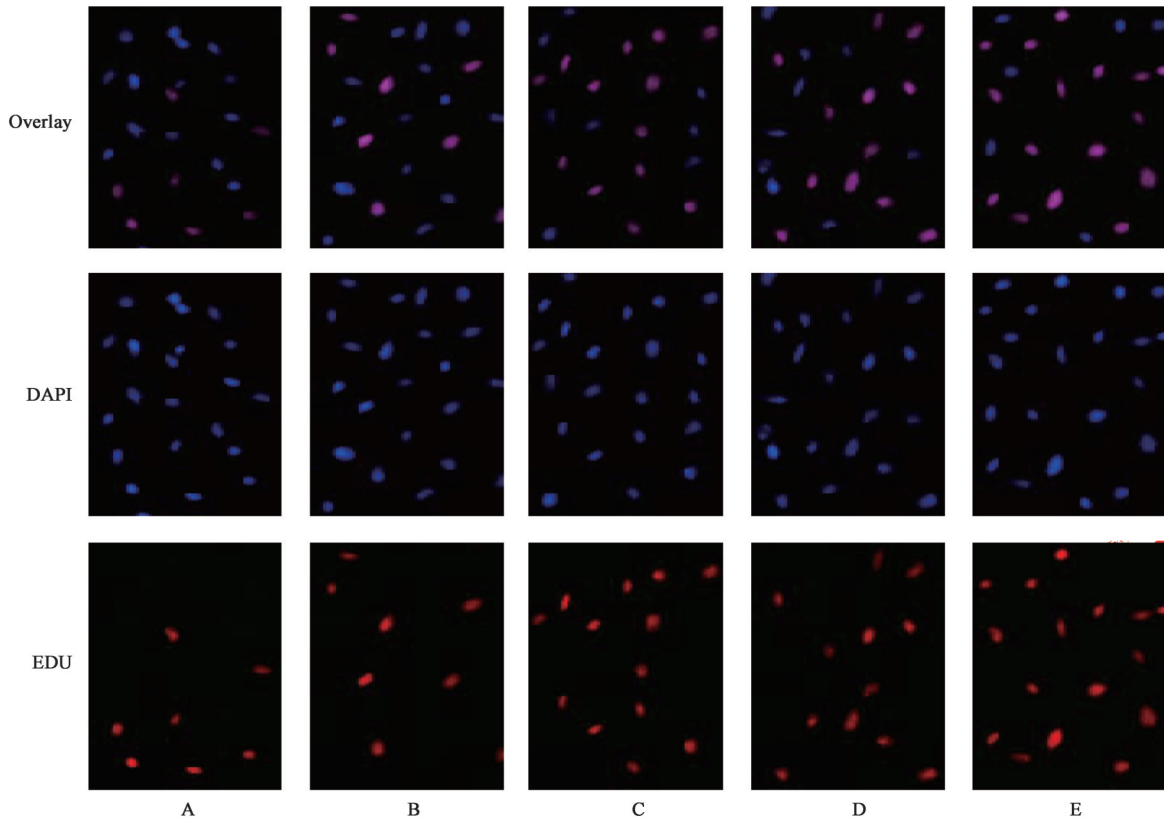
组别	体积分数/%	增殖率/%
正常	-	101.51 \pm 7.99
	-	101.51 \pm 7.99
	-	101.51 \pm 7.99
	-	101.51 \pm 7.99
空白血清	5	103.02 \pm 0.91
	10	103.83 \pm 0.27
	15	102.14 \pm 0.24
	20	100.16 \pm 1.70
白术	5	122.95 \pm 3.84 ¹⁾
	10	132.93 \pm 2.78 ²⁾
	15	125.29 \pm 2.52 ²⁾
	20	116.24 \pm 2.70 ¹⁾
枳实	5	118.45 \pm 1.12 ¹⁾
	10	126.66 \pm 3.96 ²⁾
	15	120.66 \pm 1.55 ¹⁾
	20	114.71 \pm 2.57
枳术丸	5	142.14 \pm 2.73 ²⁾
	10	129.64 \pm 5.87 ²⁾
	15	123.33 \pm 6.02 ¹⁾
	20	116.13 \pm 4.74

注: 与正常组比较 ¹⁾ $P<0.05, ^{2)}$ $P<0.01$ 。

3.2 对 ICC 增殖率的影响 与正常组比较, 空白血清组对 ICC 增殖率影响差异无统计学意义, 白术组、枳实组、枳术丸组均可提高 ICC 增殖率 ($P<0.05, P<0.01$); 与空白血清组比较, 白术组、枳实组、枳术丸组均可提高 ICC 增殖率 ($P<0.05, P<0.01$); 白术组、枳实组、枳术丸组 3 组间比较, ICC 增殖率有明显差异 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 2, 图 1。

3.3 对 ICC 凋亡率的影响 流式细胞仪检测结果显示, 各组含药血清干预 ICC 24 h 后对细胞凋亡影响, 差异均无统计学意义。见表 3。

3.4 对 ICC 中 XIAP, PCNA 蛋白表达的影响 与正常组比较, 空白血清组对 ICC 增殖率影响差异无统计学意义; 与空白血清组比较, 白术组、枳实组、枳术丸组内的 XIAP, PCNA 蛋白水平均明显上调



A. 正常组; B. 空白血清组; C. 白术组; D. 枳实组; E. 枳术丸组(图2同)

图1 各组含药血清对ICC增殖率的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 1 Effect of ingredient-contained serums on proliferation rate of ICC (IF, ×400)

表2 各组含药血清对ICC增殖率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of ingredient-contained serums on proliferation rate of ICC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	增殖率/%
正常	-	28.80±2.60
空白血清	10	31.24±0.77
白术	10	64.07±2.43 ^{4,7)}
枳实	10	54.57±2.49 ^{4,5)}
枳术丸	5	73.87±2.02 ^{4,6,8)}

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与空白血清组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与白术组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与枳实组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$ (表3,4同)。

表3 各组含药血清对ICC凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of ingredient-contained serums on apoptosis of ICC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	凋亡率/%
正常	-	0.72±0.06
空白血清	10	0.81±0.10
白术	10	0.79±0.09
枳实	10	0.77±0.08
枳术丸	5	0.69±0.11

($P<0.05, P<0.01$);白术组、枳实组、枳术丸组3组间比较, XIAP, PCNA蛋白水平差异无统计学意义。见图2,表4。

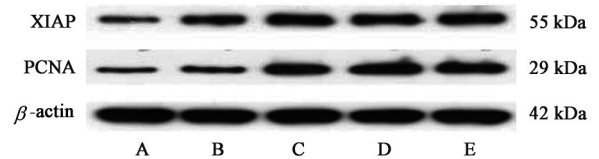


图2 各组含药血清对ICC中XIAP, PCNA蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of XIAP and PCNA expression in ICC

表4 各组含药血清对ICC中XIAP, PCNA蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of ingredient-contained serums on expression of XIAP and PCNA in ICC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	XIAP/ β -actin	PCNA/ β -actin
正常	-	0.147±0.021	0.140±0.030
空白血清	10	0.200±0.026	0.207±0.040
白术	10	0.350±0.046 ^{2,4)}	0.427±0.060 ^{2,4)}
枳实	10	0.383±0.021 ^{2,4)}	0.383±0.038 ^{2,4)}
枳术丸	5	0.427±0.025 ^{2,4)}	0.477±0.050 ^{2,4)}

4 讨论

慢传输型便秘属于中医“便秘”范畴,脾胃虚弱、脾肾阳虚、肠道气滞为便秘患者最多的三大证型,其中脾虚症状更是多达76.06%^[9],故慢传输型便秘的中医辨证多为“脾虚气滞”型。《脾胃论·脾胃虚则九窍不通论》云:“夫元气、谷气、营气、卫气、生发诸阳之气,此数者,皆饮食入胃上行,胃气之异名,其实一也。”指出脾气旺才能不受邪气干扰,保证脏腑功能正常。张仲景将本病称之为“脾约”,阐述脾胃对便秘治疗的重要性。国医大师路志正教授认为便秘是由肠道传导失常所致,根在脾胃,不可过度滥用峻下猛攻之法治便秘^[10]。本实验选用攻补兼施法方药枳术丸补脾和攻下并用,其方由枳实与白术组成。枳实,苦、辛,微寒,归脾、胃、大肠经,破气消积,化痰除痞。白术,苦、甘,温。归脾、胃经。补气健脾,燥湿利水,止汗安胎。二药配伍,一泻一补,一走一守,一急一缓,正合“脾宜升则健,胃宜降则和”之理,枳实攻大便不通之实邪,白术补脾胃运化之不利,两者补消兼顾,寓攻疾于消积中,白术用量二倍与枳实,重健脾行气之功,从而增强枳实消积导滞之效,气行则腑通,大便自然而然下,可谓运用攻补兼施治法之经典方。前期研究证实^[8,11],枳术丸可以显著改善患者胃肠功能和相应症状促进肠道蠕动,机制可能与提高ICC的数量,影响SCF/C-Kit信号通路相关;枳术丸可通过提高血清中胃动素、胃泌素增强小肠传输功能、减少胃内残留物^[12]。也有不少学者认为枳术丸有效改善胃肠道症状的作用机制可能为升高胃促生长素,5-羟色胺含量,降低降钙素基因相关肽含量等因素相关^[13-15]。

STC病因尚不明确且多样,结肠组织中ICC数量、形态结构改变,可使肠慢波发生改变,产生不规则慢波,信号传递改变,基因变异等从而诱发STC^[16]。现有研究认为肠神经系统功能紊乱及ICC数目异常在STC发病中有重要作用^[17]。因此促进ICC的增殖,改善ICC的结构对于调节胃肠道功能,治疗STC具有重要意义。XIAP蛋白可直接调控半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)和Caspase-7,多途径调节细胞凋亡^[18],其变化能可靠的反映细胞凋亡情况^[19]。PCNA蛋白具有启动细胞增殖作用,是细胞增殖的标志,通过检测PCNA蛋白的表达来反应细胞增殖情况是可靠的^[20]。本实验结果表明,空白血清组与正常组的对比结果均无统计学意义,基本可排除空白血清对ICC生长的影响。

枳术丸含药血清对ICC具有增殖作用,无促进凋亡作用,且能增强XIAP蛋白表达,促进PCNA蛋白表达,说明枳术丸能够通过提高XIAP和PCNA蛋白的表达量,抑制ICC的凋亡,促进ICC增殖,该机制是枳术丸治疗STC的机制之一。研究过程发现,达到最佳作用效果的枳术丸含药血清浓度不高,说明枳术丸的有效药用剂量存在峰值的可能。枳术丸的组方简单,只有枳实和白术2味药,一攻一补,易于研究探讨攻补兼施治法与单纯攻下法和补益法治疗效果微观层面的对比。实验结果表明,枳术丸、白术和枳实含药血清对ICC的增殖作用明显。CCK-8结果的组间提示白术组与枳实组差异无统计学差异,但都与枳术丸组无明显差异,通过具体数据值可看出,最佳作用浓度和时间下白术组增殖率数值要高于枳实组,同时EDU检测结果表明枳实、白术、枳术丸对ICC的增殖作用效果依次增强,2种检测之间的统计学分析存在差异的原因可能与检测方法和操作细节有关,但2个检测的实验结果均说明以攻补兼施立法的复合方剂枳术丸比其拆方治疗效果更佳,证实攻补兼施法治疗STC优于攻伐单药和补益单药。另文献记载枳术丸为“荷叶裹烧饭为丸”的丸剂,实验中运用汤剂虽符合现代临床应用和实验研究,且荷叶用量及改用汤剂后功效与丸剂功效的一致性不好定量与鉴别,因此对于其中的差别尚有待进一步研究。

枳实攻下和白术补益的作用机理可能是通过促进ICC的增殖,加强肠道蠕动促进粪便排出。对于XIAP和PCNA蛋白的调节作用,两单药组之间比较以及与枳术丸组比较差异不明显,说明两单药和枳术丸促进ICC增殖的具体机制与XIAP和PCNA因子有关,若要更好的说明枳术丸中攻伐与补益的差异,需要通过寻找其他途径来证实。因此,枳术丸及其拆方可通过增加结肠ICC数量治疗STC,分子机制可能是上调ICC内XIAP,PCNA蛋白表达;枳术丸对结肠ICC的增殖效果优于其拆方(白术、枳实),提示治疗慢传输型便秘运用攻补兼施法方药配伍效果优于单纯使用攻下或补益法,这也是中医“整体观念”的具体体现。

[参考文献]

- [1] 刘振华,蔡晓辉,张磊,等.慢传输型便秘的病因及发病机制[J].医学综述,2007,13(22):1738-1740.
- [2] MIKKELSEN H B. Interstitial cells of Cajal, macrophages and mast cells in the gut musculature:

- morphology, distribution, spatial and possible functional interactions [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14 (4):818-832.
- [3] 韩鹏. Kit信号通路调控新生小鼠结肠Cajal间质细胞发育和增殖的实验研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2010.
- [4] WANG L M, MCNALLY M, HYLAND J, et al. Assessing interstitial cells of Cajal in slow transit constipation using CD117 is a useful diagnostic test[J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32(7):980-985.
- [5] 马丽. 枳实与枳壳对燥结便秘小鼠的谱效学评价[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [6] 马晓松, 樊雪萍, 陈忠, 等. 白术对离体豚鼠回肠收缩的影响[J]. *新消化病学杂志*, 1996, 4(11):603-604.
- [7] 郑学宝, 叶秋丽, 戴世学, 等. 枳术汤对脾虚便秘小鼠P物质和降钙素基因相关肽基因的靶向调控[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2008, 16(3):155-158.
- [8] 夏旭婷. 枳术丸对脾虚证慢传输型便秘小鼠结肠黏膜C-kit、SCF表达的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [9] 陈延, 伍灿贤, 朱盈盈, 等. 功能性便秘的中医证候研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(2):212-214.
- [10] 刘燕君, 常玉娟, 张平, 等. 中医药治疗功能性便秘优势初探[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2015, 23(8):589-591.
- [11] 刘富林, 谷井文, 易健, 等. 枳术丸超微颗粒与传统汤剂治疗脾虚气滞型功能性消化不良的比较研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2010, 30(5):52-54.
- [12] 刘富林, 易健, 刘柏炎, 等. 超微枳术丸对功能性消化不良小鼠胃肠运动及MTL、GAS的影响[J]. *中国中医急症*, 2011, 20(4):594-595, 604.
- [13] 贺梅娟, 杨晋翔, 赵晨, 等. 枳术丸对慢传输型便秘大鼠的影响[J]. *环球中医药*, 2015, 8(1):26-28.
- [14] 李晓玲, 张声生, 杨成, 等. 枳术丸对功能性消化不良大鼠胃平滑肌收缩反应及胃促生长素受体蛋白表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(2):210-215.
- [15] 李晓玲, 张声生, 杨成, 等. 枳术丸对功能性消化不良大鼠胃排空功能及Ghrelin、5-HT、CGRP的影响[J]. *北京中医药*, 2014, 33(11):856-860.
- [16] 夏旭婷, 樊俊阳, 易健, 等. Cajal间质细胞在慢传输型便秘发病机制中的作用[J]. *湖南中医杂志*, 2014, 30(10):172-174.
- [17] 李乾元, 杨关根. 慢传输便秘发病机理的研究[J]. *光明中医*, 2009, 24(12):2394-2395.
- [18] CHAI J, SHIOZAKI E, SRINIVASULA S M, et al. Structural basis of Caspase-7 inhibition by XIAP [J]. *Cell*, 2001, 104(5):769-780.
- [19] 厉广洲, 徐继蕊, 张丽丽. miR-200c-3p靶向XIAP调控缺氧复氧诱导的心肌细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 28(7):572-577.
- [20] 陶柏桦. 健脾益气方治疗慢性萎缩性胃炎的疗效及对胃黏膜组织的影响[J]. *中国现代医药杂志*, 2019, 21(9):77-79.

[责任编辑 周冰冰]