

通便汤对 STC 大鼠模型结肠组织中 PKA/ MAPK 信号通路的影响

万叶敏, 曾莉*, 钱海华

(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨通便汤对慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)大鼠模型结肠组织中蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)/丝裂原活化激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的影响及相关机制。**方法:**80 只 SD 大鼠随机分为正常组和造模组, 正常组 20 只, 造模组 60 只, 雌雄各半; 正常组给予普通饲料喂养, 模型组给予混有复方苯乙哌啶的饲料, 造模时间 120 d 后, 随机选取雌雄对半大鼠正常组 10 只, 造模组 20 只, 测定大鼠 24 h 排便量、含水量及小肠炭末推进率, 观察结肠留存粪便粒数, 评价 STC 大鼠造模是否成功; 停药 1 周后, 将造模组 40 只大鼠随机分为模型组, 通便汤组(33 g·kg⁻¹), 通便汤 + H89 组(PKA 信号通路阻滞剂, 5 mg·kg⁻¹), 通便汤 + U0126 组(MAPK 信号通路阻滞剂, 0.1 mg·kg⁻¹) 各 10 只, 雌雄各半, 药物通便汤干预 4 周后, 测定大鼠 24 h 排便量、含水量及小肠炭末推进率, 观察结肠留存粪便粒数; 采用免疫组化(IHC), 蛋白免疫印迹法(Western blot), 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定结肠内水通道蛋白 3 (AQP3), AQP4, PKA 及 MAPKs 信号通路的蛋白及 mRNA 表达情况。**结果:**与正常组比较, 造模组大鼠 24 h 排便量、粪便含水量、小肠炭末推进率及结肠留存粪便粒数均显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 通便汤组排便量、含水量及小肠炭末推进率均增加, 结肠留存粪便粒数减少($P < 0.01$), AQP3, AQP4 显著降低($P < 0.01$); 与通便汤组比较, 通便汤 + H89 组和通便汤 + U0126 组 AQP3, AQP4, PKA 蛋白与 mRNA 表达降低($P < 0.01$); 与通便汤 + H89 组比较, 通便汤 + U0126 组排便量、含水量、小肠炭末推进率及结肠留存粪便粒数, AQP3, AQP4, PKA, MAPK 蛋白表达量与 mRNA 含量无明显差异。**结论:**采用复方苯乙哌啶成功复制出慢性传输型便秘模型, 通便汤可以抑制 PKA 和 MAPK 信号通路, 从而下调 AQP3, AQP4 表达, 增加肠道蠕动和肠道水分, 有效治疗 STC。

[关键词] 通便汤; 慢传输型便秘; 蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) / 丝裂原活化激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路; 水通道蛋白 3, 4

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0135-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190505

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181119.1110.012.html>

[网络出版时间] 2018-11-20 16:19

Effect of Tongbiantang on PKA/MPKA Signal Pathway in Colon Tissue of STC Rat Model

WAN Ye-min, ZENG Li*, QIAN Hai-hua

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Tongbiantang on protein kinase A (PKA) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathway in colon tissue of slow transit constipation (STC) rats and its related mechanism. **Method:** Eighty SD rats were randomly divided into blank group and model group, 20 rats in blank group, 60 rats in model group, half male and half female; blank group was fed with common diet, model group was fed with compound phenylethylpiperidine, after 120 days of modeling, 10 rats in blank group and 20 rats in model group were randomly selected, and 2 rats were determined. Four-hour stool volume, water content and

[收稿日期] 20180810(012)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573979)

[第一作者] 万叶敏, 在读硕士, 从事中医外科学肛肠病研究, E-mail: 724040646@qq.com

[通信作者] * 曾莉, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医外科学肛肠病研究, E-mail: -zengbingli@163.com

small intestinal charcoal powder propelling rate were observed to observe the number of stool particles retained in colon and evaluate the success of STC rat modeling. After 1 week of drug withdrawal, 40 rats in model group were randomly divided into model group ($33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Tongbiantang group, Tongbiantang + H89 group (PKA signaling pathway blocker, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Tongbiantang + U0126 group (MPKA signaling pathway blocker, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) each. After 4 weeks of intervention with Tongbiantang, the amount of stool excretion, water content and small intestinal charcoal powder propelling rate were measured in 10 rats, and the number of stool grains in colon was observed. The protein content and mRNA expression in aquaporins 3 (AQP3), AQP4, PKA and MAPKs signaling pathways in colon was determined by immunohistochemical staining (IHC), Western blot and Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR). **Result:** Compared with the blank group, the 24-hour stool volume, fecal water content, small intestinal charcoal propelling rate and the number of fecal particles in colon of rats in the model group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with the model group, the fecal volume, water content and small intestinal charcoal propelling rate of Tongbiantang group were increased, the number of fecal particles in colon decreased ($P < 0.01$), AQP3 and AQP4 were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the Tongbiantang group, the expressions of AQP3, AQP4, PKA and mRNA in the Tongbiantang + H89 group and the Tongbiantang + U0126 group were significantly lower ($P < 0.01$); compared with the Tongbiantang + H89 group, the stool volume, water content, small intestine charcoal propelling rate and the number of stool particles in colon, AQP3, AQP4, PKA, MPKAs protein table were significantly lower ($P < 0.01$). There was no significant difference between the amount of mRNA and the content of protein. **Conclusion:** Tongbiantang can inhibit the PKA and MPKA signal pathways, thus down-regulate the expression of AQP3 and AQP4, increase intestinal peristalsis and intestinal water, and effectively treat STC.

[Key words] Tongbiantang; slow transit constipation; protein kinase A (PKA) /mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathways; aquaporins 3, 4

慢性传输型便秘 (slow transit constipation, STC) 是由结肠的传输功能障碍、肠内容物传输缓慢所引起的便秘,临床主要表现为长期排便次数减少,无便意,伴有大便干结、排便费力等,是功能性便秘中常见的类型^[1]。长期便秘可继发痔疮、诱发心脑血管疾病、增加肠癌的患病风险等,还会引起焦虑、抑郁等情绪异常^[2]。STC 的发生受遗传、环境、感染等多种因素的影响,关于其发病机制,至今尚未完全阐明。因此,针对 STC 发病机制的研究,以及寻找早期治疗的靶点,是国内外学者和临床工作者不断研究的一项重要课题。

近年来研究表明,水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 是一种结肠内生物膜通道蛋白,通过调整结肠内生物膜的透水性,介导结肠内水的跨膜转运,是维持结肠内水代谢平衡的分子学基础,尤其是 AQP3 和 AQP4, AQP3 在 mRNA 水平上被环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 所上调,而这一调节又是通过蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 信号通路来实现的^[3], AQP4 的磷酸化是由 PKA 所介导,并且随后发生胞化内化,磷酸化可能是 AQP4 囊泡循环的机制^[4];丝裂原活化蛋白激酶

(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号传导通路中亚型细胞外信号调节的蛋白激酶 (extracellular signal regulating kinase, ERK), c-Jun N 端激酶 (c-Jun N terminal kinase, JNK), p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 的激活与水通道蛋白的表达有一定的相关性^[5],在 STC 的发生发展中发挥着重要作用。

通便汤是全国首批名老中医朱秉宜教授通过长期对 STC 临床特点观察,在清代吴鞠通认为温病之不大便常是因为“津液不足,无水停舟”的肠燥津亏的理论基础上,以养阴通便,理气布津为治则,自拟通便汤,以治肺为主,治脾为次。本方演化自“增液汤”和“枳术丸”,全方以火麻仁、郁李仁、瓜蒌等果仁类润肠药物为主,臣以生地、玄参、麦冬等养阴药,杏仁、厚朴等滋养肺阴,肃降肺气,辅以生白术、枳壳等益气健脾之品,恢复运化之功,濡养脏腑,润肠通便^[6]。临床实验研究中前后观察了近 240 例来自江苏省中医院及江苏省鼓楼医院肛肠科及消化内科门诊的 STC 患者,将有确定治疗作用的中成药和西药作为阳性对照,观察患者治疗前后的病情及治疗后短期便秘的复发率,研究表明通便汤能显著减轻便

秘患者的临床症状且复发率低,有较好的安全性和耐受性^[7-9]。课题组前期通过动物实验发现,通便颗粒治疗便秘可能通过下调 AQP3 和 AQP8 的表达从而调节水分的吸收和分泌,并且通便颗粒药效与剂量有一定相关性^[10]。前期实验仅指出通便颗粒通过下调 AQPs 来治疗 STC,但是通过什么通路来调控的仍不清楚。因此本研究在前期研究的基础上,采用复方苯乙哌啶建立 STC 大鼠模型,运用免疫组化法(IHC),蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)更为准确地对 AQPs 蛋白及其 mRNA 进行检测,观察通便汤对其结肠组织中 AQPs 表达的影响,并进一步探讨 PKA/MAPK 信号传导通路在通便汤对 AQPs 调节过程中的作用,旨在从分子水平探讨通便汤治疗 STC 的部分作用机制与途径,为便秘的防治提供新的思路和方法。

1 材料

1.1 动物 健康普通级 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,体质量 180 ~ 200 g,由南通大学动物中心提供。动物合格证号 SCXK(苏)2014-0001,批号 201708334。本实验经过江苏省中医院实验动物伦理委员会批准(编号 2017-010),符合实验动物伦理委员会指导原则。

1.2 药物及试剂 通便汤制剂:南沙参 20 g,麦冬 20 g,玄参 30 g,熟地黄 30 g,杏仁 10 g,白术 40 g,枳壳 15 g,厚朴 10 g,瓜蒌仁 20 g,火麻仁 10 g,郁李仁 15 g,莱菔子 15 g,由江苏省中医院制剂部制成每 1 mL 含 3 g 生药的成品,高压灭菌分瓶包装备用,经江苏省中医院主任药师周琴妹鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》的药物标准。本方药物用量为成人用量,按《医用实验动物学》计算了中药人鼠等效剂量^[11]。复方苯乙哌啶片(常州康普药业有限公司,批号 1702002);阿拉伯树胶(广州南方化玻公司分装,批号 20160103);活性炭(上海久亿化学试剂有限公司,批号 20160824);苏木素-伊红(HE)染液(武汉谷歌生物科技有限公司,批号 G1120);AQP3 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs-1253);AQP4 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 16473-1-AP);PKA,JNK 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab75991,ab179461);ERK,p38 MAPK 抗体(美国 Proteintech 公司,批号分别为 164473-1-AP,14064-1-AP);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号分别为 K257964,K3AA7487SK);ECL Plus 发光试剂盒,DS-

PAGE 蛋白上样缓冲液(5 ×),Western 及 IP 细胞裂解液,苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究,批号分别为 P0018,P0015,P0013,ST506,P0010);羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G-辣根过氧化物酶(HRP),羊抗兔 IgG-HRP(南京贝斯特生物技术有限公司,批号分别为 BK0023,BK0027);四甲基乙二胺(TEMED,美国 Sigma 公司,批号 T8090);trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 15596026);焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate,DEPC,南京凯基生物,批号 12800-082);Prime Script™ Master Mix(日本 Takara 公司,批号 RR036A)。

1.3 仪器 MM721NG1-PW 型微波炉(中国美的集团);DNP-9022 型 37 °C 恒温培养箱,DHG-9108A 型鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);CX31 型生物正置显微镜(日本 Olympus 公司);SpectraMax Plus 384 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);Mini-Protean Tetra System 型电泳系统,ChemiDoc XRS + System 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);StepOnePlus 型 Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司);Centrifuge 5424 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 各组动物雌雄分笼饲养,保持室温 18 ~ 27 °C,相对湿度 40% ~ 70%,清洁安静,通风良好,适应性正常饲养 7 d 后,按照文献报道进行造模^[12]。正常组给予普通饲料。造模组采用复方苯乙哌啶(即给予混有复方苯乙哌啶的饲料,给药剂量为 8 mg·kg⁻¹·d⁻¹)复制 STC 模型,每 5 d 记录 1 次各组粪便粒数、含水量及大鼠体质量,大鼠粪便粒数增加、含水量增加,体质量增加则相应加大给药量。实验动物自由饮水。造模时间为 120 d。模型制备结束,随机选取正常组大鼠 10 只,模型大鼠 20 只,雌雄对半,测定小肠炭末推进率及结肠留存粪便。

2.2 分组及给药 剩余动物正常组 10 只,造模组共 40 只。其中将模型大鼠随机分为模型组,通便汤(33 g·kg⁻¹)组,通便汤 + H89 组(PKA 信号通路阻滞剂),通便汤 + U0126 组(MAPK 信号通路阻滞剂)。正常组每日生理盐水 4 mL 灌胃 1 次,模型组每日生理盐水 4 mL 灌胃 1 次,治疗组中通便汤组每日通便汤 4 mL 灌胃 1 次,通便汤 + H89 组,通便汤 + U0126 组每日按通便汤分别 4 mL 灌胃 1 次,灌胃前 30 min 分别经尾静脉注射阻断剂 H89

($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[13] 和 U0126 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[14]; 正常组、模型组和治疗组以相同的二甲基亚砷 (DMSO) 含量的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液尾静脉注射作为对照, 连续治疗 4 周为 1 个周期。

2.3 指标检测

2.3.1 粪便粒数及含水量检测 造模结束后, 禁食 24 h, 分别于第 1 天与第 7 天, 测定大鼠 24 h 排便量及含水量, 作为评价复方苯乙哌啶模型制备成功及其稳定性的标准。药物通便汤干预 4 周后, 测定大鼠 24 h 的排便量及含水量。含水量测定方法: 取大鼠粪便 (计数大鼠粪便 24 h 前将 3 层滤纸铺于大鼠饲养笼内, 滤过尿液, 选取时避开被大鼠小便或饮水浸泡的粪便, 选取新鲜的光泽度高的粪便, 以减小水分蒸发的影响), 称得湿重后, 放入恒温鼓风干燥箱中烘干 (温度 $103 \text{ }^\circ\text{C}$), 称取干重, 计算含水量。粪便含水量 (g) = 粪便湿重 - 粪便干重。

2.3.2 小肠炭末推进率及结肠留存粪便量检测

造模结束后, 大鼠停药 1 周后, 禁食不禁水 24 h, 用 5% 的活性炭混悬液 2 mL 灌胃, 30 min 后颈椎脱臼处死, 立即剖腹取出从幽门至回盲部的小肠, 测量小肠的全长以及活性炭推进的长度, 计算小肠炭末推进率。同时计数结肠留存粪便粒数。炭末推进率 = (活性炭推进的长度 / 小肠的全长) $\times 100\%$ 。

2.3.3 免疫组化染色检测结肠组织中 AQP₃、PKA 与 MPKA 表达 通便汤干预 4 周, 禁食不禁水 24 h, 以 10% 水合氯醛 ($4.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉, 迅速剖腹, 留取结肠组织, 生理盐水冲洗, 采用免疫组化法 (IHC) 检测, 石蜡切片脱蜡至脱水, 抗原修复 (高火至沸, 转为低火 20 min), BSA 血清封闭后, 加一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, TBS 洗 3 次, 5 min; 加二抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育, 50 min; DAB 显色后, 再复染细胞核, 脱水封片, 显微镜镜检。用专业图像分析软件系统 (Image-Pro Plus 6.0) 在相同的灰度和光度的条件下进行分析, 计算出平均积分吸光度 IA。

2.3.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测结肠组织中 AQP₃、PKA 与 MPKAs 蛋白表达 IP 裂解细胞后使用 BCA 法测定蛋白浓度, 经过聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭后, 加一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 后洗膜, 再加二抗, 室温孵育 1 h; 电化学发光底物化学发光显色, 定影, 扫描。GAPDH 选作内参, Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值, 计算蛋白质表达的相对含量。蛋白质表达相对含量 = 蛋白质条带灰度值 / GAPDH 蛋白条带灰度值。

2.3.5 Real-time PCR 检测结肠组织中 AQP₃、PKA 与 MPKA mRNA 表达 使用 trizol 离心柱提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 反应条件 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 min, $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。然后使用 PCR 引物扩增, 以 GAPDH 选作内参, 其引物序列 (5'-3') 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。AQP₃ 上游引物 CTGTG GTTCCGTGGCTCA, 下游引物 CCAAGATGGCAAG GGTGA, 产物长度 101 bp; AQP₄ 上游引物 ATCAG CATCGCCAAGTCC, 下游引物 GGCCAGCAGTGAGG TTTC, 产物长度 145 bp; PKA 上游引物 TGAGAA CCCACAAAGAGG, 下游引物 CCATAAGAAGGG CAACAC, 产物长度 134 bp; MAPK 上游引物 TTAGC AGCAGTCTGACCCA, 下游引物 GCTCTTCTTT CGCATCCAC, 产物长度 177 bp; GAPDH 上游引物 CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT, 下游引物 AGGGGCC ATCCACAGTCTTC, 产物长度 601 bp。反应体系总体积为 $20 \text{ } \mu\text{L}$ (上游引物 $0.2 \text{ } \mu\text{L}$, 下游引物 $0.2 \text{ } \mu\text{L}$, cDNA $2 \text{ } \mu\text{L}$); 反应条件: 扩增曲线: 预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, 循环 1 次, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火延伸 30 s, 循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对 Real-time PCR 结果进行分析, 计算 $\Delta C_t = C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{治疗组}} - \Delta C_{t\text{对照组}}$; 各 mRNA 的相对表达量等于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 其中对照组的数值均为 1。

2.4 统计学分析 实验数据采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析, 组间采用单因素方差分析, 数据显示为 $\bar{x} \pm s$, 满足正态分布和方差齐性的多组之间均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD 法; 方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 复方苯乙哌啶及通便汤对 STC 大鼠模型一般情况的影响 120 d 造模结束后, 实验中均无大鼠死亡。正常组大鼠精神状态良好, 活动自如, 皮毛白亮, 光泽度好, 摄食、饮水量正常, 体质量增长平稳, 粪便质软。造模组大鼠精神萎靡, 倦怠少动, 皮毛杂乱枯槁, 暗黄无光泽, 摄食、饮水量减少, 在造模初期体质量正常增长, 造模后期逐渐减缓或不增长, 粪便的粒数明显减少, 体积变小, 干硬, 两头尖细, 夹有黑便, 表明 STC 大鼠造模成功。

3.2 复方苯乙哌啶及通便汤对 STC 大鼠模型粪便数量、含水量、小肠炭末推进率及结肠留存粪便量的影响 造模结束后 1 d 与 7 d, 与正常组比较, STC 大鼠 24 h 排便量及含水量均明显减少 ($P < 0.01$), 但 1 d 与 7 d 不同时间段 24 h 排便量及含

水量比较,未见明显改变;造模结束后,与正常组比较,STC 大鼠炭末推进率明显降低,结肠留存粪便粒数明显增多($P < 0.05$),药物干预 4 周后,与模型组比较,各用药组 24 h 排便量及含水量均显著性增加($P < 0.01$),与正常组比较无明显差异;炭末推进率比较,用药各组均显著高于模型组($P < 0.01$);结肠留存粪便粒数比较,各用药组均较模型组大鼠明显减少($P < 0.01$),但各组间无明显差异。见表 1~5。

3.3 通便汤对 STC 大鼠结肠组织中 AQP3, AQP4, PKA 与 MAPK IHC 染色与 IA 的影响 与正常组比较,模型大鼠结肠组织切片中可见 AQP3, AQP4, PKA 与 MAPK 呈圆形或椭圆形的阳性表达。其中, AQP3 主要分布于结肠黏膜的顶部上皮细胞, AQP4 主要分布在吸收细胞; PKA 主要分布于杯状细胞; MAPK 主要分布在细胞浆,细胞膜与细胞核

表 3 模型制备结束对小肠炭末推进率及结肠留存粪便量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of end of model preparation on propelling rate of small intestine and retention of feces in colon($\bar{x} \pm s$)

组别	n	小肠长度/cm	炭末推进长度/cm	炭末推进率/%	结肠留存粪便/粒
正常	10	101.90 ± 7.83	93.60 ± 12.21	91.85 ± 7.41	4.80 ± 1.40
造模	20	92.30 ± 12.66 ¹⁾	67.60 ± 24.41 ¹⁾	73.32 ± 17.95 ¹⁾	8.30 ± 3.50 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 4 通便汤干预 4 周对各组 24 h 排便量及大便含水量的影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 4 Effect of Tongbiantang intervening 4 week on 24 h defecation and fecal water content in each group($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	排便量/粒	含水量/g
正常	-	49.20 ± 6.14	0.47 ± 0.75
模型	-	17.40 ± 4.52 ¹⁾	0.28 ± 0.71 ¹⁾
通便汤	33	49.90 ± 4.13 ²⁾	0.66 ± 4.07 ²⁾
通便汤 + H89	33 + 5 × 10 ⁻³	51.10 ± 4.38 ²⁾	0.64 ± 6.01 ²⁾
通便汤 + U0126	33 + 1 × 10 ⁻⁴	52.56 ± 3.94 ²⁾	0.64 ± 3.54 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 5 同)。

较少分布;IA 显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各用药组 IA 显著降低($P < 0.01$)。见图 1,表 6。

3.4 通便汤对 STC 大鼠结肠组织中 AQP3, AQP4, PKA 与 MAPK 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 AQP3, AQP4, PKA, MAPK 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),且与 PKA, MAPK 与 AQP3, AQP4 的增长呈正相关;与模型组比较,通便汤组、通便汤 + H89 组、通便汤 + U0126 组 AQP3, AQP4, PKA, MAPK 蛋白

表 1 复方苯乙哌啶对造模前、造模结束后 1,7 d 的 24 h 排便量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of compound piperidine on 1 d and 7 d 24 h defecation before and after modeling($\bar{x} \pm s$) 粒

组别	n	造模前	造模结束后 1 d	造模结束后 7 d
正常	20	50.25 ± 3.77	52.38 ± 7.71	51.9 ± 6.83
造模	60	51.16 ± 3.93 ¹⁾	28.14 ± 6.43 ^{2,3)}	30.4 ± 7.52 ^{2,3)}

注:造模前与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;造模结束后与正常组比较²⁾ $P < 0.01$;与造模前比较³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 复方苯乙哌啶对造模前、造模结束后 1,7 d 的 24 h 大便含水量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of compound phenethidine on 1 d and 7 d 24 h water content of stool before and after modeling($\bar{x} \pm s$) g

组别	n	造模前	造模结束后 1 d	造模结束后 7 d
正常	20	0.47 ± 0.06	0.46 ± 0.07	0.49 ± 0.23
造模	60	0.46 ± 0.35 ¹⁾	0.28 ± 0.76 ^{2,3)}	0.31 ± 0.03 ^{2,3)}

表达显著下降($P < 0.01$)。见图 2,表 7。

3.5 通便汤对 STC 大鼠结肠组织中 AQP3, AQP4, PKA 与 MAPK mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 AQP3, AQP4, PKA, MAPK mRNA 的表达显著升高($P < 0.01$),且 AQP3, AQP4 的变化趋势与 PKA, MAPK 呈正相关;与模型组比较,通便汤组、通便汤 + H89 组、通便汤 + U0126 组 AQP3, AQP4, PKA 和 MAPK mRNA 表达显著下降($P < 0.01$),与通便汤组比较,通便汤 + H89 组、通便汤 + U0126 组 AQP3, AQP4, PKA 和 MAPK mRNA 表达显著下降($P < 0.01$)。见表 8。

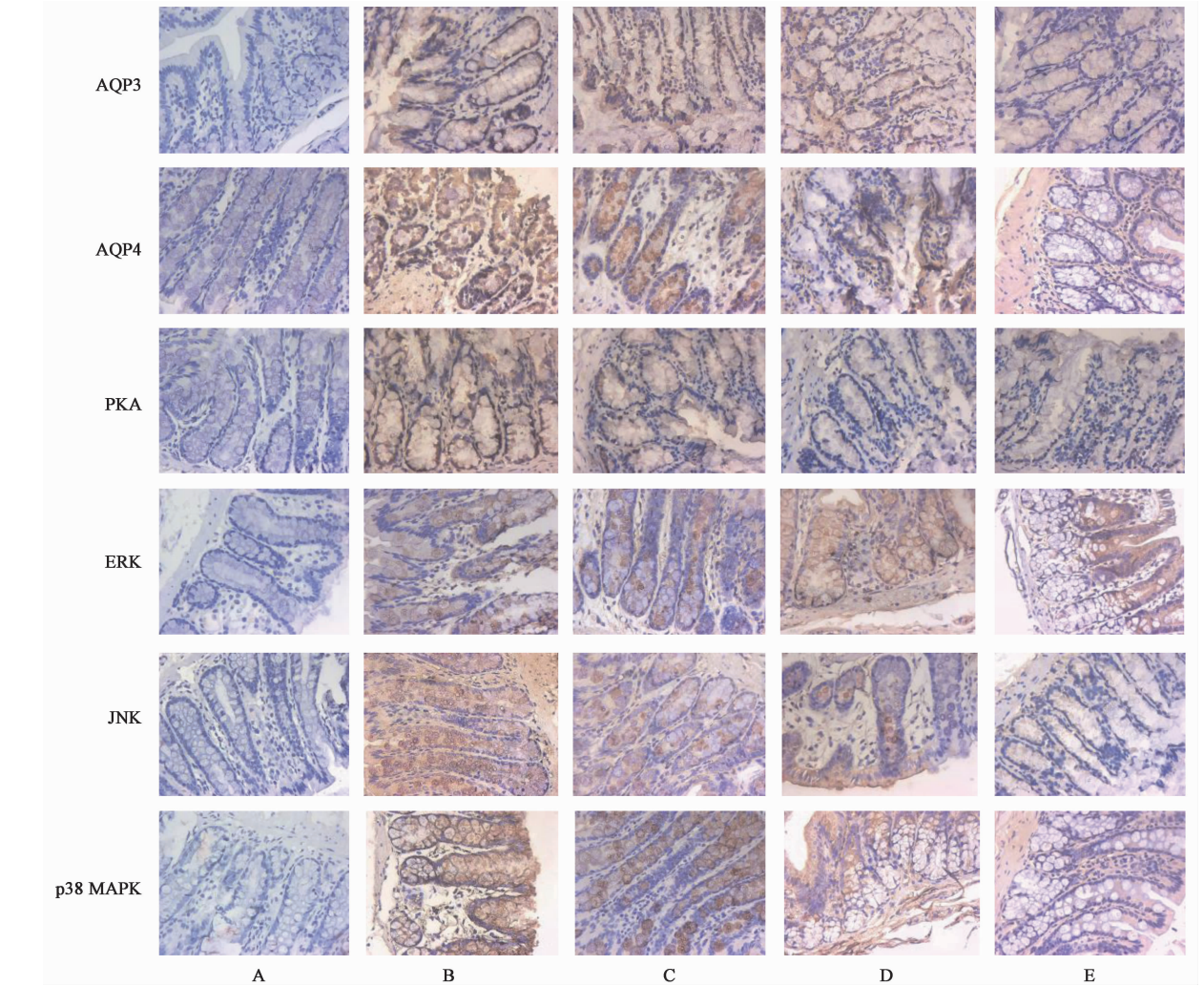
4 讨论

STC 病因复杂,可能与肠神经系统、Cajal 间质细胞、神经递质、精神心理等因素有关,近来研究认为 AQPs 在 STC 发病中有重要作用。AQPs 广泛分布于结肠组织内,与水分的吸收密切相关,研究发现肠道有大量的 AQPs 表达,现已确定的有 AQP3, AQP4, AQP8 等,提示 AQP3, AQP4, AQP8 高表达可引起结肠黏膜对水重吸收增加从而导致便秘^[15-17], AQP3, AQP4 的短期调节机制需要磷酸化,在某些因素的作用下,PKA 信号传导系统被活化,催化 AQPs

表 5 通便汤干预 4 周对各组小肠炭末推进率及结肠留存粪便量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Tongbiantang intervening 4 week on intestinal propelling rate of small intestine and retention of feces in colon of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	小肠长度/cm	炭末推进长度/cm	炭末推进率/%	结肠留存粪便/粒
正常	-	107.05 ± 19.68	95.45 ± 15.46	89.16 ± 12.01	3.76 ± 1.16
模型	-	103.29 ± 15.27 ¹⁾	61.16 ± 15.41 ¹⁾	59.21 ± 11.52 ¹⁾	7.93 ± 0.82 ¹⁾
通便汤	33	104.34 ± 10.33 ²⁾	94.28 ± 11.57 ²⁾	90.35 ± 10.03 ²⁾	3.43 ± 0.45 ²⁾
通便汤 + H89	33 + 5 × 10 ⁻³	110.36 ± 11.87 ²⁾	94.67 ± 11.31 ²⁾	85.78 ± 6.74 ²⁾	2.99 ± 1.23 ²⁾
通便汤 + U0126	33 + 1 × 10 ⁻⁴	109.75 ± 11.24 ²⁾	93.22 ± 11.45 ²⁾	84.93 ± 6.27 ²⁾	2.86 ± 0.96 ²⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 通便汤组; D. 通便汤 + H89 组; E. 通便汤 + U0126 组 (图 2 同)

图 1 通便汤对大鼠结肠组织中 AQP3, AQP4, PKA, ERK, JNK, p38 MAPK 的影响 (IHC, ×400)

Fig. 1 Effect of Tongbiantang on AQP3, AQP4, PKA, ERK, JNK and p38 MAPK in colon tissue of rats (IHC, ×400)

上的丝氨酸磷酸化,增加 AQP_s 高表达,从而增加膜对水的通透性。MAPK 信号通路由一组以级联方式依次活化的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶组成,以此将细胞外信号逐渐放大并传导到细胞内乃至细胞核,把膜受体结合的胞外刺激物与细胞质和细胞核中的效应分子连接起来,这一通路介导了细胞的生长、发育、分裂、死亡以及细胞间的功能同步等多种细胞生

理过程。国内外研究表明 MAPK 信号通路激活与 AQP_s 的表达有一定的相关性^[18],在渗透压对 AQP4 表达的研究中,陈春玲等^[19]认为 AQP4 上调的机制可能与 p38 MAPK 信号通路有关。因此 PKA 和 MAPK 信号通路在 AQP_s 的调控中有着重要的作用,并且与 STC 的发病密切相关。

大肠为“传道之官,变化出焉”,其功能的正常

表 6 通便汤干预 4 周对大鼠结肠组织中 AQP3, AQP4, PKA 与 MPKAs IA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of Tongbiantang intervening 4 week on AQP3, AQP4, PKA and MPKAs IA of colon tissue in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AQP3	AQP4	PKA	ERK	JNK	p38 MAPK
正常	-	1.59 ± 0.96	1.72 ± 0.81	1.63 ± 0.65	1.62 ± 1.02	1.75 ± 0.87	1.56 ± 0.65
模型	-	114.91 ± 18.13 ¹⁾	111.37 ± 27.02 ¹⁾	106.76 ± 33.64 ¹⁾	115.15 ± 15.83 ¹⁾	120.62 ± 19.16 ¹⁾	130.72 ± 18.28 ¹⁾
通便汤	33	93.99 ± 13.26 ²⁾	90.68 ± 12.34 ²⁾	64.25 ± 15.81 ²⁾	86.75 ± 10.85 ²⁾	85.15 ± 10.06 ²⁾	105.41 ± 10.24 ²⁾
通便汤 + H89	33 + 5 × 10 ⁻³	81.49 ± 18.90 ³⁾	79.44 ± 12.60 ³⁾	54.44 ± 15.79 ³⁾	75.74 ± 15.37 ³⁾	77.73 ± 14.05 ³⁾	77.85 ± 12.86 ³⁾
通便汤 + U0126	33 + 1 × 10 ⁻⁴	66.56 ± 14.72 ³⁾	24.08 ± 7.85 ³⁾	63.85 ± 14.39 ³⁾	27.86 ± 7.49 ³⁾	35.09 ± 10.98 ³⁾	33.87 ± 7.33 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.01;与模型组比较²⁾P < 0.01;与通便汤组比较³⁾P < 0.01(表 7, 8 同)。

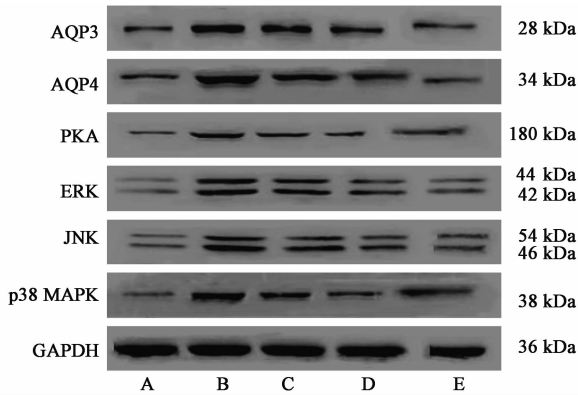


图 2 大鼠结肠组织 AQP3, AQP4, PKA, ERK, JNK, p38 MAPK 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of AQP3, AQP4, PKA, ERK, JNK and p38 MAPK in colon tissue of rats

运行与肺主行水、脾主运化密切相关。《素灵微蕴》提出“肺与大肠表里同气,肺气化精,滋灌大肠,则肠滑便易”,《素问·厥论篇》第四十五所言“脾失健运,津液不布,肠道失润则后不利”,正如《素问·经脉别论》曰“饮入于胃,游溢精气,上输于脾,脾气散精,上归于肺,通调水道,下输膀胱”,因此通便汤根据“津不足,津不布”的理论,创制通便汤,以补益肺脾,行气布津,增液润肠通便为治则,全方 12 位中药,组方严谨,配伍精当,辨证准确,治疗 STC 安全有效、简便价廉,便于推广,具有重要的现实意义和社会价值。复方苯乙哌啶的主要成分包括盐酸地芬诺酯和硫酸阿托品,主要作用于 U 型阿片受体,能镇静中枢神经系统,降低内脏敏感性,提高平滑肌

表 7 通便汤干预 4 周对大鼠结肠组织中 AQP3, AQP4, PKA 与 MPKA 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of Tongbiantang intervening 4 week on relative protein content of AQP3, AQP4, PKA and MPKA of colon tissue in rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AQP3 /GAPDH	AQP4 /GAPDH	PKA /GAPDH	ERK /GAPDH	JNK /GAPDH	p38 MAPK /GAPDH
正常	-	0.21 ± 0.06	0.22 ± 0.04	1.19 ± 0.05	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.05	1.19 ± 0.05
模型	-	0.59 ± 0.13 ¹⁾	0.64 ± 0.18 ¹⁾	0.56 ± 0.16 ¹⁾	0.57 ± 0.18 ¹⁾	0.55 ± 0.16 ¹⁾	0.60 ± 0.10 ¹⁾
通便汤	33	0.40 ± 0.11 ²⁾	0.48 ± 0.11 ²⁾	0.45 ± 0.09 ²⁾	0.48 ± 0.12 ²⁾	0.46 ± 0.18 ²⁾	0.43 ± 0.08 ²⁾
通便汤 + H89	33 + 5 × 10 ⁻³	0.33 ± 0.00 ³⁾	0.33 ± 0.09 ³⁾	0.32 ± 0.15 ³⁾	0.29 ± 0.17 ³⁾	0.31 ± 0.05 ³⁾	0.28 ± 0.16 ³⁾
通便汤 + U0126	33 + 1 × 10 ⁻⁴	0.34 ± 0.15 ³⁾	0.32 ± 0.10 ³⁾	0.29 ± 0.09 ³⁾	0.29 ± 0.14 ³⁾	0.29 ± 0.18 ³⁾	0.28 ± 0.13 ³⁾

张力,减缓肠道蠕动,肠内容物停留时间延长,水分吸收增加,因此本实验采用复方苯乙哌啶构建 STC 大鼠模型,运用 IHC, Western bolt, Real-time PCR 等方法观察通便汤干预后 AQP3, AQP4, PKA 及 MAPKs 的蛋白和 mRNA 的表达情况。研究发现,本课题选择长时间模型制备方法,避免了灌胃对消化道黏膜的刺激和手术、注射等造成的感染和应激状态,模拟了 STC 自然发病过程,与临床 STC 的发病机制更为吻合。造模期间显示,STC 大鼠精神较差,活动度少,皮毛缺乏光泽,进食量少,粪便粒数减少、体积小、形态两头尖细。造模 120 d 结束停药 1 周

后炭末推进率显示,STC 大鼠肠道传输功能持续低下,未能自然修复。表明 STC 大鼠造模成功且以复方苯乙哌啶制备 STC 大鼠模型具有稳定性。经通便汤干预 4 周,各用药组 24 h 排便量及含水量明显增加,接近正常组水平,证实通便汤可以增加肠道水分;通便汤组炭末推进率推进程度优于正常组,通便汤 + H89 组和通便汤 + U0126 组次之,证实通便汤可以增加肠道蠕动功能;与模型组比较,各用药组 AQP3, AQP4 检测,IA 值, mRNA, 蛋白含量表达均见明显下调,接近正常组水平,显示通便汤药效的有效性。分别阻断 PKA 及 MAPK 信号通路的通便汤干

表 8 通便汤干预 4 周对大鼠结肠组织中 AQP3, AQP4, PKA 与 MAPKs mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Effect of Tongbiantang intervening 4 week on expression of AQP3, AQP4, PKA and MAPKs mRNA of colon tissue in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP3	AQP4	PKA	ERK	JNK	p38 MAPK
正常	-	1.12 ± 0.52	1.10 ± 0.49	1.04 ± 0.67	1.08 ± 0.13	1.09 ± 0.43	1.18 ± 0.22
模型	-	7.81 ± 3.55 ¹⁾	7.75 ± 3.52 ¹⁾	7.29 ± 3.31 ¹⁾	8.54 ± 2.23 ¹⁾	7.32 ± 1.65 ¹⁾	8.38 ± 1.29 ¹⁾
通便汤	33	4.20 ± 2.13 ²⁾	4.16 ± 2.08 ²⁾	3.92 ± 1.98 ²⁾	4.12 ± 1.81 ²⁾	3.77 ± 1.67 ²⁾	4.93 ± 1.25 ²⁾
通便汤 + H89	33 + 5 × 10 ⁻³	2.98 ± 1.16 ^{2,3)}	3.67 ± 2.16 ^{2,3)}	2.55 ± 2.02 ^{2,3)}	3.97 ± 1.01 ^{2,3)}	3.74 ± 1.56 ^{2,3)}	3.89 ± 2.13 ^{2,3)}
通便汤 + U0126	33 + 1 × 10 ⁻⁴	2.82 ± 0.96 ^{2,3)}	3.28 ± 0.98 ^{2,3)}	2.63 ± 0.98 ^{2,3)}	2.35 ± 0.82 ^{2,3)}	2.56 ± 0.26 ^{2,3)}	2.87 ± 0.42 ^{2,3)}

预大鼠的结果显示, PKA 及 MAPK 表达与 AQP3, AQP4 变化趋势呈正相关, 进一步证实通便汤方能阻断 PKA 及 MAPK 信号通路下调 AQP3, AQP4 表达量, 有效抑制水分重新吸收, 减少 STC 发生。

综上所述, 本研究证实了通便汤能有效治疗 STC, 减轻临床症状, 其作用机制可能之一通过抑制 PKA 和 MPKA 信号通路的高表达, 从而下调 AQP3, AQP4 表达, 增加肠道水分促进肠道蠕动, 使得 STC 大鼠的肠道功能有一定的恢复。然而通便汤中有效成分较多, 具体是哪种成分调节了 PKA 和 MAPK 信号通路仍然需进一步研究。

[参考文献]

[1] 刘振华, 蔡晓辉, 张磊, 等. 慢性传输型便秘的病因及发病机制[J]. 医学综述, 2007, 13(22): 1738-1740.

[2] Suares N C, Ford A C. Prevalence of and risk factors for chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and Meta-analysis [J]. Am J Gastroenterol, 2011, 106(9): 1582-1591.

[3] WANG S B, Amidi F, YIN S L, et al. Cyclic adenosine monophosphate regulation of aquaporin gene expression in human amnion epithelia [J]. Reprod Sci, 2007, 14(3): 234-240.

[4] Carmosino M, Procino G, Tamma G, et al. Trafficking and phosphorylation dynamics of AQP4 in histamine-treated human gastric cells [J]. Biol Cell, 2007, 99(1): 25-36.

[5] Bell C E, Lariviere N M, Watson P H, et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways mediate embryonic responses to culture medium osmolality by regulating Aquaporin 3 and 9 expression and localization, as well as embryonic apoptosis [J]. Hum Reprod, 2009, 24(6): 1373-1386.

[6] 周兵, 王月容. 健脾润肠通便汤治疗中老年功能性便秘[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 268-270.

[7] 徐天舒, 钱海华. “通便汤”治疗慢性传输型便秘 30 例临床观察[J]. 江苏中医药, 2012, 44(5): 36-37.

[8] 颜帅, 曾莉, 钱海华. 养阴润肠汤治疗慢性传输型便

秘 54 例 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(4): 335-337.

[9] 张荣枝, 杨光, 钱海华. 通便汤治疗便秘的临床对照观察 [J]. 湖北中医药大学学报, 2014, 16(4): 80-82.

[10] 钱海华, 徐天舒, 曾莉, 等. 通便颗粒调节慢传输型便秘大鼠结肠水通道蛋白 3, 水通道蛋白 8 表达的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 180-184.

[11] 施建新. 医用实验动物学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 481-421.

[12] 何俊堂, 刘海峰, 房殿春, 等. 慢传输型便秘大鼠结肠肌电生理变化及其意义 [J]. 解放军医学杂志, 2004, 10(20): 857-858.

[13] 宋涛, 刘跃亮, 赵艳芳, 等. cAMP-PKA-CREB 信号通路在骨形态发生蛋白 9 诱导小鼠间充质干细胞成骨分化中的作用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(2): 189-196.

[14] 张树恒, 衣服新, 倪伟民, 等. U0126 对实验性脑出血大鼠脑内水通道蛋白 4 表达的影响 [J]. 辽宁医学院学报, 2009, 30(1): 214-215.

[15] Silberstein C. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon [J]. Braz J Med Biol Res, 1999, 32(10): 1303-1313.

[16] WANG K S, MA T, Filiz F, et al. Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279(2): 463-470.

[17] 许惠娟, 许慧慧, 滕超, 等. 痛泻药方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠水通道蛋白 8 表达影响的机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 141-144.

[18] Umenishi F, Schrier R W. Hypertonicity-induced aquaporin-1 (AQP1) expression is mediated by the activation of MAPK pathways and hypertonicity-responsive element in the AQP1 gene [J]. J Biol Chem, 2003, 278(18): 15765-15770.

[19] 陈春玲, 李涛平, 朱丽华. MAPK 信号阻断剂 U0126 对油酸致急性肺损伤大鼠肺泡 II 型上皮细胞中 AQP4 表达的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(8): 1525-1528.

[责任编辑 周冰冰]