

消痔丸对复方地芬诺酯致小鼠便秘模型的药效评价及作用机制

宋紫腾^{1, 2, 3}, 王莲萍⁴, 姚鹏飞^{1, 2, 3, 5}, 刘永姝^{1, 2, 3, 5}, 韩彦琪^{1, 2, 3}, 许浚^{1, 2, 3}, 孙岩⁴, 赵专友^{1, 2, 3}, 郝泉⁴, 黄泽森^{1, 2, 3, 5}, 彭亚倩^{1, 2, 3, 5}, 张铁军^{1, 2, 3*}, 柴国林^{4*}

1. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462

2. 天津药物研究院 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300462

3. 天津药物研究院 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300462

4. 兰州佛慈制药股份有限公司, 甘肃 兰州 730000

5. 天津中医药大学, 天津 301617

摘要: 目的 探究消痔丸对复方地芬诺酯致小鼠便秘模型的药效作用及机制。方法 ICR小鼠随机分为对照组、模型组、溴化甲基纳曲酮(阳性对照, $58.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组和消痔丸低、中、高剂量(1.17 、 2.34 、 $4.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,连续ig给药7 d,给药同时除对照组外,其余各组按照 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig复方地芬诺酯混悬液制备小鼠便秘模型。观察小鼠一般情况;末次给药结束后,各实验组禁食不禁水16 h,模型组和各给药组ig给予复方地芬诺酯,30 min后给药组ig含相应受试药的活性炭悬液,对照组、模型组ig活性炭悬液。第1批小鼠观察首次排黑便时间、6 h内排便粒数、6 h和24 h内排便质量及粪便含水率。第2批小鼠检测小肠推进率,酶联免疫吸附实验(ELISA)检测结肠组织和血清中5-羟色胺(5-HT)、P物质(SP)、血管活性肠多肽(VIP)水平变化,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测结肠组织水通道蛋白3(AQP3)、AQP9 mRNA水平,Western blotting法检测AQP3、AQP9蛋白表达水平。**结果** 与模型组相比,各给药组小鼠粪便干结情况有所好转,排便量均有不同程度的增加,体质量有所增加,精神状态逐渐好转。与模型组相比,各给药组均能显著缩短排首粒黑便时间,提高6 h排便粒数及粪便含水率、6 h及24 h排便质量($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001);除消痔丸低剂量组,其余各给药组小鼠24 h粪便含水率均显著增加($P < 0.01$ 、 0.001);各给药组小肠炭末推进距离及炭末推进率均明显提高($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001);各给药组均能显著降低结肠组织中VIP水平($P < 0.01$ 、 0.001),除消痔丸低剂量组,其余各给药组均能显著提高结肠组织中5-HT、SP水平($P < 0.01$ 、 0.001);各给药组均能显著增加血清中5-HT、SP水平并降低VIP的表达水平($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001);各给药组AQP3蛋白表达量均显著下降($P < 0.01$ 、 0.001),AQP9蛋白表达量均显著上升($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001);各给药组AQP3 mRNA水平均显著下降($P < 0.01$ 、 0.001),AQP9 mRNA水平均显著上升($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 消痔丸对复方地芬诺酯诱导的小鼠便秘模型有显著的治疗效果,可以显著缩短便秘小鼠排首粒黑便时间、增加排便粒数并提高粪便含水率、显著促进小肠推进作用,作用机制与调节肠液分泌相关因子5-HT、SP、VIP等的释放以及AQP3、AQP9表达相关。

关键词: 消痔丸; 复方地芬诺酯; 便秘; 水通道蛋白; 5-羟色胺; P物质; 血管活性肠多肽

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)11-2330-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.11.006

Efficacy and mechanism of Xiaozhi Pills on constipation mice induced by diphenoxylate

SONG Ziteng^{1, 2, 3}, WANG Lianping⁴, YAO Pengfei^{1, 2, 3, 5}, LIU Yongshu^{1, 2, 3, 5}, HAN Yanqi^{1, 2, 3}, XU Jun^{1, 2, 3}, SUN Yan⁴, ZHAO Zhuanyou^{1, 2, 3}, HAO Quan⁴, HUANG Zesen^{1, 2, 3, 5}, PENG Yaqian^{1, 2, 3, 5}, ZHANG Tiejun^{1, 2, 3}, CHAI Guolin⁴

1. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

2. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

收稿日期: 2023-06-14

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(U21A20406);兰州市人才创新创业项目(2022-RC-2)

第一作者: 宋紫腾(1995—),女,硕士,研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail:songziteng@tipr.com

*共同通信作者: 张铁军,研究员,主要研究方向为中药新药开发及大品种二次开发研究。E-mail:zhangtj@tipr.com

柴国林,正高级工程师,主要研究方向为中药研发及中药质量控制。E-mail:3136174195@qq.com

3. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
4. Lanzhou Foci Pharmaceutical Co., Ltd., Lanzhou 730000, China
5. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of Xiaozhi Pills (XZP) on constipation induced by diphenoxylate in mice and its mechanism. **Methods** ICR mice were randomly divided into control group, model group, methylnaltrexone bromide group (positive control, 58.5 mg·kg⁻¹) and XZP low, medium, and high doses group (1.17, 2.34, and 4.68 g·kg⁻¹). Each group was administered by gavage of the corresponding drug once a day for seven days. Except for the control group, the other groups were given diphenoxylate suspension at 7.5 mg·kg⁻¹ body weight by gavage on the same day. Observe the general situation of mice. After the end of the last administration, each experimental group fasted for 16 hours and couldn't help but water. The model group and each administration group were given compound diphenoxylate by ig. After 30 minutes, the administration group ig contained activated carbon suspension of the corresponding test drug, while the control group and model group ig contained activated carbon suspension. The first batch of mice were observed for the first time of black stools, the number of stools within six hours, the quality of stools within 6 and 24 hours, and the fecal moisture content. The second batch of mice were tested for intestinal propulsion rate, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect changes in levels of serotonin (5-HT), substance P (SP), and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in colon tissue and serum, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect levels of aquaporin 3 (AQP3) and AQP9 mRNA in colon tissue, and Western blotting was used to detect protein expression levels of AQP3 and AQP9. **Results** Compared with the model group, the fecal dryness of mice in each treatment group improved, with varying degrees of increase in fecal volume, increased body mass, and gradually improved mental state. Compared with the model group, each medication group significantly shortened the first black stool discharge time, improved the number of fecal particles and fecal moisture content at six hours, and improved the quality of feces at 6 and 24 hours ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); Except for the low-dose group of XZP, the 24-hour fecal moisture content of mice in all other treatment groups significantly increased ($P < 0.01, 0.001$). The distance and rate of small intestine charcoal powder propulsion in each administration group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). All treatment groups were able to significantly reduce VIP levels in colon tissue ($P < 0.01, 0.001$). Except for the low-dose group of XZW, all other treatment groups were able to significantly increase the levels of 5-HT and SP in colon tissue ($P < 0.01, 0.001$). Each administration group significantly increased the levels of 5-HT and SP in serum and decreased the expression level of VIP ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The expression of AQP3 protein significantly decreased in each treatment group ($P < 0.01, 0.001$), while the expression of AQP9 protein significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The levels of AQP3 mRNA was significantly decreased in each treatment group ($P < 0.01, 0.001$), while the levels of AQP9 mRNA was significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** XZP had a significant therapeutic effect on the constipation model induced by compound diphenoxylate in mice. It can significantly shorten the first black stool time, increase the number of stool particles and increase the fecal water content, and significantly promote small intestine propulsion. The mechanism of action is related to regulating the release of intestinal secretion related factors such as 5-HT, SP, VIP, and the expression of AQP3 and AQP9.

Key words: Xiaozhi Pills; diphenoxylate; constipation; aquaporin; 5-hydroxytryptamine; substance P; vasoactive intestinal polypeptide

痔病是人类独有的肛肠疾病,为临床发病率最高的肛肠疾病之一。最新的流行病学调查结果显示,在我国18岁及以上的城乡居民中,肛肠疾病患病率高达50.1%,其中有痔疮症状者占98.08%^[1-2]。痔病病人常主诉有便秘或排便费力,Leicester等^[3]调查发现80%痔病病人中有不同程度的便秘。Sun等^[4]的报告表明,40%未脱出性痔病病人排便努责,16%感觉排空不全,痔病与便秘的关系非常密切。痔既是便秘的原因,也是便秘的结果,痔与便秘互为因果,形成恶性循环,所以治疗痔疮和消除便秘

同等重要。

消痔丸出自《疡医大全》^[5],由地榆(炒炭)、牡丹皮、三颗针皮(炒炭)、大黄(酒炒)、黄芪、白及、槐角(蜜炙)、防己、白术(炒)、当归(酒炒)、火麻仁(炒黄)及动物大肠12味中药组成,具有消肿生肌、清热润便、补气固脱、止血、止痛的功效,主要用于痔疾肿痛、便秘出血、脱肛不收及肠风下血、积滞不化等症,主治痔疮,临床应用效果较好^[6-7],本研究采用复方地芬诺酯建立小鼠便秘模型,探究消痔丸对便秘小鼠排便功能、小肠推进功能的影响并初步探讨其

作用机制及治疗优势。

1 材料

1.1 实验药品

消痔丸,兰州佛慈制药股份有限公司,规格每100丸质量为4 g,批号210712;复方地芬诺酯片,河南鼎昌药业有限公司,规格每片含盐酸地芬诺酯2.5 mg、硫酸阿托品25 μ g,批号20120801;溴化甲基纳曲酮(MNTX),质量分数 $\geq 99\%$,天津泰普制药有限公司提供,批号160818。

1.2 实验动物

雄性ICR小鼠,SPF级,160只,18~22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0010。饲养在天津天诚新药评价有限公司实验动物屏障系统[实验动物使用许可证号SYXK(津)2021-0008],温度20~26 $^{\circ}$ C,相对湿度40%~70%,通风次数为10~15次/h全新风,光照为12 h明、12 h暗,自由摄食饮水。实验动物的使用经天津天诚新药评价有限公司实验动物伦理委员会批准(IACUC: No.2022101104)。

1.3 实验试剂与仪器

小鼠5-羟色胺(5-HT)试剂盒(批号2208271)、P物质(SP)试剂盒(批号2208201)、血管活性肠多肽(VIP)试剂盒(批号2209071),均购自上海西唐生物科技有限公司;水通道蛋白3(AQP3)抗体(批号GR3454420-4)购自英国abcam公司;水通道蛋白9(AQP9)抗体(批号822204471)购自美国Gene Tex公司;总RNA提取试剂盒(批号000526304)购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;Transcript First Strand cDNA Synthesis Kit(批号63347620)、FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)(批号58596800),均购自瑞士Roche公司。

SpectraMaxM5酶标仪,德国Berthold公司;LightCycler 480荧光定量PCR仪,瑞士Roche公司;BIO-RAD T100伯乐PCR仪,美国Bio-Rad Laboratories公司;Sorvall ST 8R高速冷冻离心机,美国Thermo Fisher Scientific公司。

2 方法

2.1 活性炭悬液的制备

称量阿拉伯树胶50 g,加水400 mL后煮沸至溶液透明,加入活性炭25 g后继续煮沸3次,冷却至室温后加水定容至500 mL,即得含5%活性炭粉和10%阿拉伯树胶的活性炭悬液,4 $^{\circ}$ C保存,用前

摇匀。

2.2 实验分组

雄性ICR小鼠120只,适应性饲养1周后分为2批,每批60只小鼠,各分为6组:对照组、模型组、MNTX(阳性对照,58.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和消痔丸低、中、高剂量(1.17、2.34、4.68 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,中剂量为临床等效剂量)组,每批每组10只。第1批进行便秘小鼠排便功能实验;第2批小鼠进行小肠推进实验后取血清及结肠组织进行生化指标检测。

2.3 给药与造模

上午模型组和各给药组ig给予复方地芬诺酯7.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 造模^[8],对照组给予等量基质溶液;下午各给药组ig给予相应药物,给药体积均按10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,对照组和模型组给予等体积0.9%氯化钠溶液,连续给药7 d,期间自由饮食,记录各组小鼠摄食量和饮水量并观察小鼠的状态。

2.4 消痔丸对便秘小鼠排便的影响

第1批小鼠末次给药结束后,各实验组禁食不禁水16 h,模型组和各给药组ig给予复方地芬诺酯(7.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),对照组给予等量基质溶液。30 min后给药组ig含相应受试药的活性炭悬液,对照组、模型组ig活性炭悬液(10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)。从ig活性炭悬液开始,观察并记录各实验组小鼠首次排出黑便的时间,连续观察6 h,并记录6 h内小鼠排便颗粒数;收集6、24 h内的小鼠粪便,称质量记录为粪便湿质量,随后将粪便置于65 $^{\circ}$ C烘箱内干燥24 h,称质量记录为粪便干质量,计算小鼠粪便含水率。

含水率=(粪便湿质量-粪便干质量)/粪便湿质量

2.5 消痔丸对便秘小鼠肠蠕动的的影响

第2批小鼠末次给药结束后,各实验组禁食不禁水16 h,按照“2.4”项方法,活性炭悬液ig 25 min后,将大鼠麻醉,收集全血于抗凝采血管中,剪取上端幽门至下端回盲部的肠管,平铺于滤纸上拉成直线,测量小肠总长度以及从幽门至活性炭悬液前端的“活性炭推进长度”,计算小肠推进率,即活性炭推进长度与小肠总长度的比值。取出完整结肠,分为3段分别低温冷冻保存;第1段结肠供测定AQP3和AQP9基因表达水平;第2段结肠供测定AQP3和AQP9蛋白表达水平;第3段供ELISA检测组织相关因子的表达。

2.6 结肠组织及血清中5-HT、SP、VIP含量检测

结肠组织样品:取-80 $^{\circ}$ C冻存的结肠组织适量进行匀浆处理,离心得到组织上清液。根据相应ELISA试剂盒说明书进行结肠组织上清液中5-HT、SP和VIP含量的测定。

血清样品:取“2.5”项下抗凝采血管中全血,于4℃、3 000 r·min⁻¹离心10 min,分离得到血清样品。根据相应ELISA试剂盒说明书进行血清中5-HT、SP、VIP水平的测定。

2.7 AQP3、AQP9 mRNA表达水平检测

取冻存的结肠组织,按照总RNA提取试剂盒说明书提取组织样本中总RNA,采用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA后,用荧光定量PCR进行PCR扩增。引物序列:AQP3上游引物:5'-GTTCCGTGGCTCAAGTGGTCTCAG-3',下游引物:5'-GCAGGGTTCAAGTGGGCTCCAGACA-3';AQP9上游引物:5'-TCGGCAGTCGTGATGGCTCTCTATGT-3',下游引物:5'-AGGCACCTGGCGTGGATATGAATGGA-3', β -actin上游引物:5'-GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG-3',下游引物:5'-ATGCCACAGGATTCCATACC-3'。 β -actin作为内参基因,采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因的相对表达量。

2.8 AQP3、AQP9蛋白表达检测

取小鼠结肠组织加RIPA裂解液,充分匀浆,12 000 r·min⁻¹离心10 min,收集上清液,加入4×蛋白上样缓冲液,沸水浴5 min使蛋白变性,放入-20℃冰箱保存备用。取等量蛋白样品以10% SDS-PAGE电泳分离,PVDF转膜,封闭,剪下目的蛋白条带加入一抗(1:1 000,一抗稀释液稀释),4℃孵育过夜,TBST洗6次,每次5 min,加入二抗(1:4 000,5%脱脂奶粉稀释),室温下孵育1 h后,TBST摇床洗6次,每次5 min,最后滴加ECL发光液于化学发光成像仪中进行曝光,保存条带,进一步用Image J进行定量分析。

2.9 统计方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据采用GraphPad Prism

7.0.0.159软件进行分析,组间差异性采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 一般情况观察

造模前各组小鼠精神状态良好,反应灵敏,动作敏捷,进食进水正常,皮毛光泽,排便频次、粪便干湿均正常。复方地芬诺酯造模后,与对照组小鼠相比,模型组小鼠粪便由连续湿软黄色长条形变为干硬褐色颗粒状,且排便量减少;精神和活动度较前明显变差,毛发光泽度下降;摄食量较之前整体呈下降趋势;饮水量变化较大,且发现造模组小鼠膀胱充盈,可能与饮水量变化浮动大相关;体质量增加缓慢。与模型组相比,各给药组小鼠粪便干结情况有所好转,排便量均有不同程度的增加,体质量有所增加,精神状态逐渐好转。

3.2 对便秘小鼠排便的影响

各组小鼠排便情况见表1。与对照组比较,模型组小鼠排首粒黑便时间显著延长($P<0.001$),6 h内排便粒数、排便质量及粪便含水率显著减少($P<0.001$),24 h内排便质量及粪便含水率均显著降低($P<0.001$);与模型组比较,各给药组均能显著缩短排首粒黑便时间,提高6 h排便粒数及粪便含水率、6 h及24 h排便质量($P<0.05$ 、0.01、0.001);除消痔丸低剂量组,其余各给药组小鼠24 h粪便含水率均显著增加($P<0.01$ 、0.001)。

3.3 对便秘小鼠小肠推进的影响

通过测量各组小鼠小肠总长度及炭末推进距离计算小肠推进率,结果见表2。各实验组小鼠之间小肠的总长度没有明显差异,与对照组相比,模型组小鼠小肠活性炭悬液推进长度以及炭末推进

表1 各组小鼠的排便情况和粪便含水率($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Defecation and fecal water content of mice with different treatment ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	排首粒黑便时间/ min	6 h排便粒数	6 h排便质 量/g	24 h排便质 量/g	6 h粪便含水 率/%	24 h粪便含 水率/%
对照	—	84.00±8.27	48.60±5.85	1.28±0.29	3.08±0.36	68.31±4.51	43.79±3.38
模型	—	131.20±18.54 ^{###}	23.00±2.79 ^{###}	0.71±0.08 ^{###}	2.00±0.25 ^{###}	52.02±5.47 ^{###}	32.80±4.05 ^{###}
MNTX	0.06	96.70±15.41 ^{***}	44.50±8.96 ^{***}	1.18±0.24 ^{***}	2.60±0.24 ^{**}	65.99±3.88 ^{***}	40.95±1.05 ^{**}
消痔丸	1.17	114.20±11.04 [*]	34.10±7.29 ^{**}	1.00±0.19 [*]	2.60±0.40 ^{**}	63.91±3.33 ^{**}	38.06±5.20
	2.34	105.90±16.03 ^{**}	37.50±3.57 ^{***}	1.07±0.16 ^{**}	2.79±0.29 ^{***}	65.79±2.88 ^{***}	41.36±4.49 ^{***}
	4.68	105.30±7.23 ^{***}	37.50±5.58 ^{***}	1.08±0.23 ^{**}	2.77±0.45 ^{***}	65.61±2.86 ^{***}	41.10±6.16 ^{***}

与对照组比较: ^{###} $P<0.001$;与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$

^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group

表2 各组小鼠6 h的小肠推进率($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Intestine pushing rate of mice with different treatment for 6 h ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	小肠总长度/cm	炭末推进距离/cm	炭末推进率/%
对照	—	56.57±5.84	50.31±5.18	89.00±4.37
模型	—	56.01±3.81	16.58±2.03 ^{###}	29.78±4.42 ^{###}
MNTX	0.06	57.05±5.02	26.20±6.80 ^{***}	45.59±9.10 ^{***}
消痔丸	1.17	56.06±3.23	24.11±1.81 [*]	43.07±3.17 ^{**}
	2.34	57.89±3.60	28.00±6.64 ^{***}	48.49±11.62 ^{***}
	4.68	56.00±3.19	31.38±6.74 ^{***}	55.84±10.55 ^{***}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

率显著减小($P < 0.001$);与模型组相比,经不同剂量消痔丸治疗后,小肠炭末推进距离及炭末推进率均明显提高($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

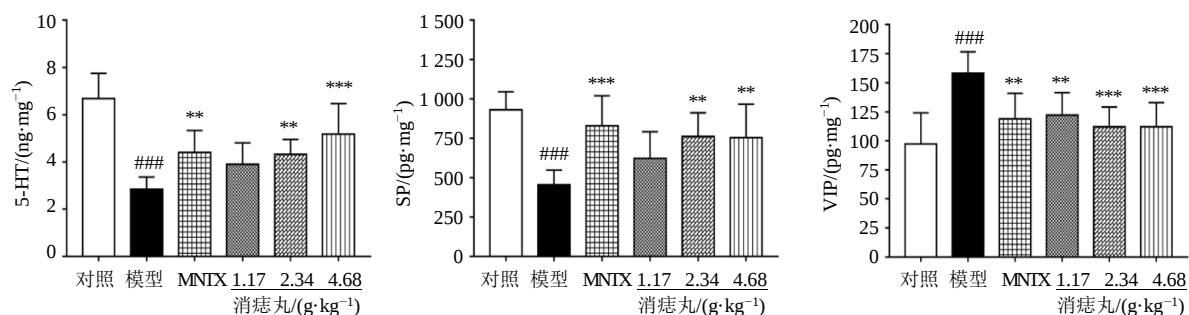
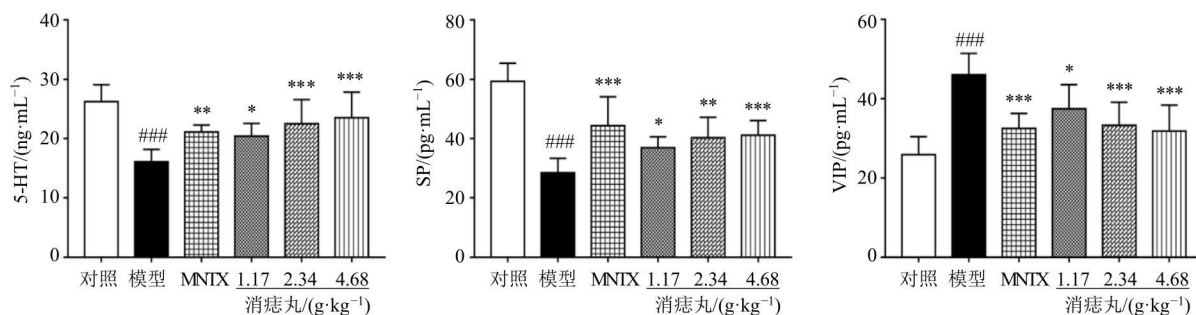
3.4 对便秘小鼠结肠组织5-HT、SP、VIP水平的影响

各组小鼠结肠组织中5-HT、SP和VIP表达水平如图1所示,与对照组比较,模型组结肠组织中5-HT、SP水平均显著降低($P < 0.001$),VIP表达水平显著升高($P < 0.001$);与模型组相比,各给药组均能显著降低结肠组织中VIP水平($P <$

0.01、0.001),除消痔丸低剂量组,其余各给药组均能显著提高结肠组织中5-HT、SP水平($P < 0.01, 0.001$)。

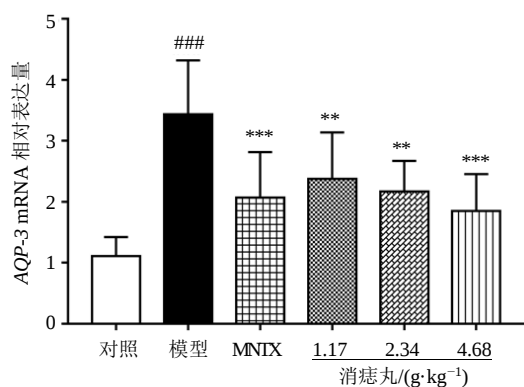
3.5 对便秘小鼠血清5-HT、SP、VIP水平的影响

各组小鼠血清中5-HT、SP和VIP表达水平如图2所示。与对照组比较,模型组血清中5-HT、SP水平均显著降低($P < 0.001$),VIP表达水平显著升高($P < 0.001$);与模型组相比,各给药组均能显著增加血清中5-HT、SP水平并降低VIP的表达水平($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group图1 消痔丸对便秘小鼠结肠组织中5-HT、SP和VIP水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Fig. 1 Effect of XZP on 5-HT, SP, and VIP contents in colonic tissues of constipation mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group图2 消痔丸对便秘小鼠血清中5-HT、SP和VIP水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Fig. 2 Effect of XZP on 5-HT, SP, and VIP contents in serum of constipation mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.6 对便秘小鼠结肠组织中AQP3、AQP9 mRNA表达的影响

各组小鼠结肠组织AQP3、AQP9 mRNA相对表达量结果见图3,与对照组相比,模型组AQP3 mRNA相对表达水平显著升高($P<0.001$),AQP9 mRNA相对表达水平显著降低($P<0.001$);与模型组相比,经不同给药组处理后小鼠结肠组织中AQP3 mRNA相对表达水平均显著下降($P<0.01$ 、 0.001),AQP9 mRNA相对表达水平均显著上升($P<0.05$ 、 0.01)。

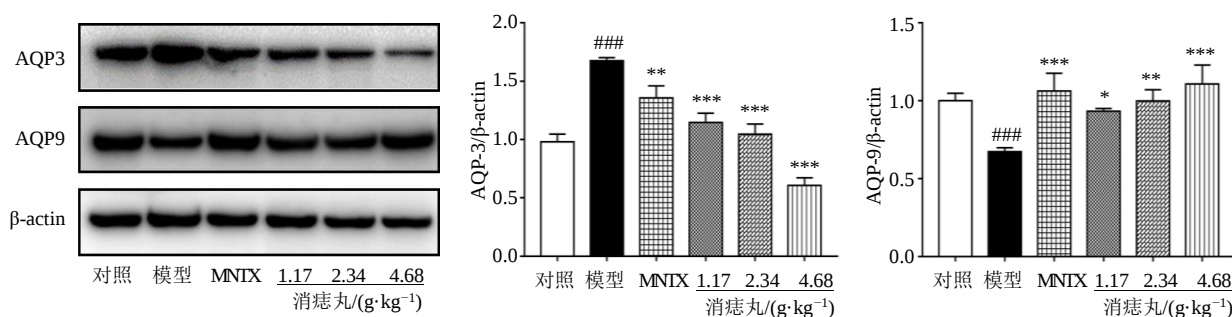


与对照组比较:### $P<0.001$;与模型组比较:* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

图3 消痔丸对便秘小鼠结肠组织中AQP3、AQP9 mRNA相对表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 3 Effect of XZP on mRNA expression of AQP3 and AQP9 in colonic tissues of constipation mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)



与对照组比较:### $P<0.001$;与模型组比较:* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

图4 消痔丸对便秘小鼠结肠组织中AQP3、AQP9蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 4 Effect of XZP on protein expression of AQP3 and AQP9 in colonic tissues of constipation mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

4 讨论

痔病通常被认为与便秘相关,有研究表明便秘患者的患病率高于健康人群^[9]。因此,便秘症状的治疗可有效缓解痔病的发生与发展。复方地芬诺酯由盐酸地芬诺酯和减少其依赖性的硫酸阿托品组成^[10],常用于大小鼠便秘模型的建立^[11],其机制是肠道平滑肌兴奋剂,能提高肠张力,抑制肠蠕动,使肠内容物推进延迟,肠内水分吸收增加,止泻,甚至导致便秘^[12]。本实验成功建立了复方地芬诺酯

3.7 对便秘小鼠结肠组织中AQP-3、AQP-9蛋白表达的影响

各组小鼠结肠组织中AQP3、AQP9蛋白表达结果如图4所示,与对照组相比,模型组AQP3蛋白表达水平显著升高($P<0.001$),AQP9蛋白表达水平显著降低($P<0.001$);与模型组相比,各给药组AQP3蛋白表达量均显著下降($P<0.01$ 、 0.001),AQP9蛋白表达量均显著上升($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

诱导的小鼠便秘模型,结果发现,消痔丸干预后小鼠排首粒黑便时间显著缩短;6 h排便粒数、质量和粪便含水率,24 h排便质量和粪便含水率均显著增多;小肠炭末推进距离和推进率均显著增大,表明消痔丸可显著改善便秘小鼠的排便功能。

便秘机制与胃肠道动力功能、胃肠道分泌功能以及神经调节密不可分,主要表现在肠道蠕动减慢和粪便干结2方面^[13-14]。国内外研究肠神经递质的专家学者通过大量的实验证实,便秘的发病与肠神

经递质的改变有着不可分割的联系^[15],其数量主要有十几种,共分为2类,第1类是抑制性递质:一氧化氮(NO)、VIP、前列腺素E₂(PGE₂)等,第二类是兴奋性递质:5-HT、乙酰胆碱(Ach)、SP等。其中5-HT^[16]已被证明在肠道内的双重作用,既是重要的神经递质也是信号传递分子,5-HT的减少使得肠壁神经丛反应迟缓,直接导致肠道蠕动减慢以及腺体分泌不足,导致或加剧便秘。SP^[17]和VIP^[18]则是肠道内作用相反的一对神经递质,两者对于胃肠动力功能以及胃肠分泌功能均有影响。SP的升高将促进胃肠平滑肌的收缩使得胃肠动力增强,同时促进肠道分泌功能,利于排便;VIP作为抑制性神经递质,它的降低能起到相同作用。本实验结果表明,消痔丸可通过促进小鼠血清和结肠组织中5-HT、SP的分泌并抑制VIP的表达起到调节肠液分泌作用。

此外,在胃肠道中,存在一类水通道蛋白(AQPs),研究证实肠黏膜分布大量AQPs,通过介导水分子跨膜运输,在肠道吸收、分泌、水代谢调节中扮演枢纽角色^[19]。近些年来国内外学者研究表明,在哺乳类动物的消化系统中AQP1、AQP3、AQP4、AQP8、AQP9等9种AQPs亚型出现^[20],且便秘的发生与结肠组织中AQPs的异常表达有关^[21]。研究证实AQP3和消化系统水液平衡有密切联系,AQP3与很多细胞因子、炎症介质的调控有关,例如VIP、NO、PGE₂、Ach、SP等,继而调节结肠对水分的吸收速率^[19]。Ye等^[22]发现,AQP9在小鼠结肠部分杯状细胞上表达,其功能可能是合成和(或)分泌黏液,保护肠黏膜和润滑大便。Kon等^[23]通过吗啡导致便秘,发现结肠组织AQP3表达明显增加,通过促进腔侧到血管侧的水吸收引起便秘,AQP9则被证实能够在正常大鼠结肠内显著表达,便秘组AQP9表达水平显著降低^[24],提示了两者参与结肠水液代谢,参与便秘形成。本实验发现,与肠液分泌相关蛋白AQP3和AQP9的基因和蛋白表达与模型组相比也有显著性差异,消痔丸可显著降低模型小鼠结肠组织中AQP3 mRNA和蛋白的相对表达量,增加AQP9 mRNA和蛋白的相对表达量,表明其润肠通便的作用与AQP3和AQP9蛋白的表达调控有关。

消痔丸对复方地芬诺酯诱导的小鼠便秘模型有显著的治疗效果,其可以通过调节肠液分泌相关因子5-HT、SP、VIP等的释放以及AQP3、AQP9基因及蛋白的表达以显著缩短便秘小鼠排首粒黑便时间,增加6 h排便粒数、提高6 h和24 h粪便含水率、促进小肠推进,发挥润肠通便作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 冯娇娇, 凡会霞, 杨会举. 痔疮的中医治疗进展 [J]. 光明中医, 2021, 36(23): 3973-3977.
Feng J J, Fan H X, Yang H J. Progress in traditional Chinese medicine in the treatment of hemorrhoids [J]. Guangming J Chin Med, 2021, 36(23): 3973-3977.
- [2] 最新全国肛肠疾病流调结果发布 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(11): 1489.
The latest national epidemiological survey of anorectal diseases was released [J]. World J Integr Tradit West Med, 2015, 10(11): 1489.
- [3] 张东铭. 痔源性便秘 [J]. 中国实用外科杂志, 2002, 22(12): 711-714.
Zhang D M. Hemorrhoid constipation [J]. Chin J Pract Surg, 2002, 22(12): 711-714.
- [4] Sun W M, Read N W, Shorthouse A J. Hypertensive anal cushions as a cause of the high anal canal pressures in patients with haemorrhoids [J]. Br J Surg, 1990, 77(4): 458-462.
- [5] (清)顾世澄撰, 凌云鹏点校. 疡医大全 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987.
Gu S C, Ling Y P. *Surgical Encyclopedia* [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1987.
- [6] 杨俊莲, 徐孟庭. 消痔丸治疗250例内痔临床观察 [J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27(1): 53.
Yang J L, Xu M T. Clinical observation on 250 cases of internal hemorrhoids treated by Xiaozhi pill [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2004, 27(1): 53.
- [7] 孙科, 李新, 韩彦琪, 等. 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠的药效及作用机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6734-6742.
Sun K, Li X, Han Y q, et al. Pharmacodynamic effect and mechanism of Xiaozhi Pills in croton oil preparation induced hemorrhoidal model in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(20): 6734-6742.
- [8] 王煜, 王自立, 王志旺, 等. 润肠通便合剂对便秘模型小鼠结肠MUC₂、AQP3的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2022, 38(2): 159-162.
Wang Y, Wang Z L, Wang Z W, et al. Effect of Runchang Tongbian mixture on MUC₂ and AQP3 in colon of constipation model mice [J]. Chin J Appl Physiol, 2022, 38(2): 159-162.
- [9] 刘智勇, 杨关根, 沈忠, 等. 杭州市城区便秘流行病学调查 [J]. 中华消化杂志, 2004, 24(7): 435-436.
Liu Z Y, Yang G G, Shen Z, et al. Epidemiological investigation of constipation in Hangzhou city [J]. Chin J Dig, 2004, 24(7): 435-436.

- [10] 中国药典 [S]. 二部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume II. 2020.
- [11] 郑倩, 徐华. 便秘动物模型的研究进展 [J]. 临床消化病杂志, 2012, 24(3): 189-191.
Zheng Q, Xu H. Research progress of animal models of constipation [J]. Chin J Clin Gastroenterol, 2012, 24(3): 189-191.
- [12] 刘井如, 季宇彬, 陈明苍. 便秘动物模型的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 353-356.
Liu J R, Ji Y B, Chen M C. Advances of pharmacological researches in constipation animal model [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2012, 18(22): 353-356.
- [13] Carrington E V, Evers J, Grossi U, et al. A systematic review of sacral nerve stimulation mechanisms in the treatment of fecal incontinence and constipation [J]. Neurogastroenterol Motil, 2014, 26(9): 1222-1237.
- [14] 王振华, 丁良, 梁婧, 等. Cajal 间质细胞在慢性传输型便秘中的临床研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(1): 164-166.
Wang Z H, Ding L, Liang J, et al. Clinical research progress of interstitial cells of Cajal in chronic transit constipation [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2015, 31(1): 164-166.
- [15] Hubball A, Martin J E, Lang B, et al. The role of humoral autoimmunity in gastrointestinal neuromuscular diseases [J]. Prog Neurobiol, 2009, 87(1): 10-20.
- [16] Hoffman J M, Tyler K, MacEachern S J, et al. Activation of colonic mucosal 5-HT(4) receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity [J]. Gastroenterology, 2012, 142(4): 844-854.e4.
- [17] 孙祥珍, 马臻棋, 马雪芹. 初探 VIP、P 物质与便秘的关系 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(26): 113-114.
Sun X Z, Ma Z Q, Ma X Q. Preliminary study on the relationship between VIP, substance P and constipation [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(26): 113-114.
- [18] 高峰, 张胜本, 张连阳, 等. 慢传输型便秘乙状结肠 VIP、SP 免疫组化研究 [J]. 中华消化杂志, 1998, 18(1): 34-36.
Gao F, Zhang S B, Zhang L Y, et al. Lmmunohistochemical study of VIP and SP on the colonic wall in patients with slow trentise constipation [J]. Chin J Dig, 1998, 18(1): 34-36.
- [19] Laforenza U. Water channel proteins in the gastrointestinal tract [J]. Mol Aspects Med, 2012, 33(5/6): 642-650.
- [20] Hardin J A, Wallace L E, Wong J F K, et al. Aquaporin expression is downregulated in a murine model of colitis and in patients with ulcerative colitis, Crohn's disease and infectious colitis [J]. Cell Tissue Res, 2004, 318(2): 313-323.
- [21] 吴霜, 程滢瑞, 周锦勇, 等. 洛哌丁胺构建大鼠便秘模型对水通道蛋白 AQP3 和 AQP8 的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(7): 969-974.
Wu S, Cheng Y R, Zhou J Y, et al. Expression of AQP3 and 8 in loperamide induced constipation in rats [J]. World Chin J Dig, 2014, 22(7): 969-974.
- [22] Ye Y W, Ran J H, Yang B X, et al. Aquaporins in digestive system [J]. Adv Exp Med Biol, 2023, 1398: 145-154.
- [23] Kon R, Ikarashi N, Hayakawa A, et al. Morphine-induced constipation develops with increased aquaporin-3 expression in the colon via increased serotonin secretion [J]. Toxicol Sci, 2015, 145(2): 337-347.
- [24] 霍明东. 济川煎对"泻剂结肠"的治疗作用及其机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
Huo M D. Study on therapeutic effect and mechanism of Jichuan Decoction on "cathartic colon" [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2013.

[责任编辑 兰新新]