

引用:巨红叶,王俊,吴飞飞,等. 基于气津理论探讨黄芪增液汤治疗结肠慢传输型便秘作用机制[J]. 现代中医药, 2023,43(4):91-96.

基于气津理论探讨黄芪增液汤治疗 结肠慢传输型便秘作用机制^{*}

巨红叶 王俊 吴飞飞 荆威 张荣枝 李毅忠 冯智^{**}

(安康市中医医院,陕西 安康 725000)

摘要:目的 探讨黄芪增液汤治疗结肠慢传输型便秘(slow transit constation,STC)的作用机制。方法 40 只 SD 大鼠,分为空白组、模型组、中药组和西药组,除空白组,其余 3 组均建立便秘模型,模型组不用药物干预,中药组予以黄芪增液汤、西药组予以枸橼酸莫沙必利,连续治疗 7 d 后,通过腹主动脉采集各组大鼠血液,同时分离约 8~10 mm 的近端结肠备检。通过 ELISA、RT-qPCR、WesternBlot 等实验方法,提取 P 物质(Substance P, SP)、血管活性肠肽(VIP)、胃动素(MLT)、胃泌素(GAS)、蛋白激酶 A(PKA)、水通道蛋白 9(AQP9)等相关指标数据进行统计分析。**结果** 模型组首次排便时间延长,造模第 7 d,模型组粪便含水率较空白组低,差异具有统计学意义($P<0.01$),说明造模成功。血清中的 GAS、MTL 和 SP 的含量,在模型组出现不同程度的下降,与空白组比较差异非常显著,说明便秘与非便秘大鼠体内存在相关因子的差异性。通过药物的干预,中药组与西药组均有不同程度上调,中药组与模型组、西药组比较具有显著性差异($P<0.01$ 及 $P<0.05$)。说明药物干预有效,且中药组较西药组更明显。RT-qPCR、WB 实验结果表明,模型组大鼠结肠组织中 PKA- α 、PKA- β 、AQP9mRNA、PKA、VIP、AQP9 含量较空白组显著降低($P<0.01$)。中药组、西药组分别与模型组比较,显示出不同程度的治疗效果,且有显著性差异($P<0.01$ 和 $P<0.05$),说明中药的治疗效果比西药更明显。**结论** 黄芪增液汤可以通过上调 SP、VIP、MLT、GAS 等胃肠动力因子实现其益气助运作用,上调 PKA、AQP9 等因子实现其滋阴增液作用。

关键词:黄芪增液汤;慢传输型便秘;胃肠动力;结肠组织

中图分类号:R256.35 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2023)04-0091-06

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2023.04.018

慢传输型便秘(slow transit constation,STC)是由于结肠动力障碍,从而引发结肠传输时间延长、进食后结肠运动推进及收缩运动减少,属于功能性便秘^[1]。其主要临床表现为大便次数减少、便质干硬等症状^[2]。目前西医在临床多采用容积性泻药、刺激性泻药、渗透性泻药、润滑型泻药、微生态制剂和促胃肠动力药等药物治疗^[3]。但有报道显示,这些西药制剂分别会导致不同程度的副作用,例如恶心、腹泻、降低肠壁敏感性、引发人体对脂溶性维生素的吸收障碍、造成肠道菌群紊乱,甚至会引起结肠黑便病及造成肠壁神经元损伤

等^[4-5]。因此,找寻疗效显著、副作用小的中药组方已经成为现在研究的热点。黄芪增液汤是陕西省名中医李毅忠治疗便秘的经验方,具有健脾益气、滋阴通便功效。我们长期临床经验总结发现^[6-7]结肠慢传输型便秘气阴两虚证型最为多见,运用黄芪增液汤加减治疗疗效确切,在我们前期研究^[8]中已经证实黄芪增液汤可上调结肠黏膜 AQP9 表达,增加肠道水分的分泌。为进一步研究黄芪增液汤治疗慢传输型便秘的分子生物学机制,具体研究如下。

^{*} 基金项目:陕西省中医药管理局项目(2019-GJ-JC017)

^{**} 通讯作者:冯智,主治医师。E-mail:fengzhiyisheng@126.com

1 仪器与材料

1.1 仪器 H-2050R 超速冷冻离心机(湖南湘仪仪器有限公司)、Proline 微量移液器(美国 BIOHIT 公司);ELX-800 酶标仪(美国 BIOHIT 公司);电热恒温培养箱(天津泰斯特生物有限公司);DYY-7C 电泳仪、DYCZ-40D 转移槽、DYCZ-24DN 双垂直蛋白电泳仪、WD-9413B 凝胶成像系统(北京六一仪器有限公司)。

1.2 试药 黄芪增液汤(炙黄芪 15 g,生白术 60 g,枳实 20 g,厚朴 20 g,玄参 30 g,生地 20 g,麦冬 15 g,火麻仁 20 g,柏子仁 20 g)由安康市中医医院制剂室提供,均购于陕西兴盛德药品有限责任公司,由陕西省食品药品鉴定所谢志明教授鉴定合格。常法煎制、滤渣、浓缩药液,用超纯水调配成每毫升含生药 2.3 g 的药液。大鼠 Gastrin ELISA 检测试剂盒(批号:CEB224Ra)、大鼠 Motilin ELISA 检测试剂盒(批号:CEA575Ra)、大鼠 Substance-P ELISA(批号:CEA393Ra)检测试剂盒均购于武汉优尔生生命科技有限责任公司;全蛋白提取试剂盒(批号:WLA019)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(WLA004)、羊抗兔 IgG-HRP(WLA023)、内参抗体 β -actin(WLA01845)均购于沈阳万类生物有限公司;VIP 抗体(批号:A1804)、AQP9(批号:A8540)均购于 Abclonal 生物科技有限公司。

1.3 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雄性,体重(160~230)g,由辽宁常胜生物有限公司提供,许可证号 SCXK2015-0001。本实验获得陕西中医药大学伦理委员会批准。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 SD 大鼠雄性 40 只,体重 180~220 g,分为 4 组(空白组、模型组、中药组、西药组),每组 10 只。造模方法:40 只大鼠适应性饲养一周,温度(25 ± 5) $^{\circ}\text{C}$,湿度(55 ± 5)%。在造模前一天禁食禁水,采用灌胃法给药,空白组给予超纯水($10 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$),其余三组每天给予洛哌丁胺($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),造模 7 d,建立慢传输便秘模型;第 8 d 分别给予中药组 $4 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 的黄芪增液汤,西药组每天 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的枸橼酸莫沙必

利治疗 7 d。此后,24 h,通过腹主动脉采集血液,同时,立即分离约 8~10 mm 的近端结肠。血清及组织样品保存在 -80°C 超低温冷冻冰箱以备进一步实验,大鼠尸体交于陕西中医药大学科研实验动物中心进行无害化处理。

2.2 生化检测 采用超低温离心机分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明制作标本,并置于酶标仪下分别测定血清中所含 Gas、SP、Motilin 蛋白含量。

2.3 WesternBlot 实验 提取各组肠组织总蛋白,BCA 试剂盒测定总蛋白浓度,每孔加入 20 μL (含 40 μg 蛋白)上样液,最后加入 5 μL 蛋白 Marker,恒压行 SDS-PAGE 电泳,经 PVDF 膜转印,TBST 封闭,加入一抗(VIP、AQP9 与封闭液配制比例分别为 1:500、1:1000)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入二抗(羊抗兔 IgG-HRP2 份配制比例 1:5000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min,加 ECL 发光液,在暗室中进行曝光,最后将胶片进行扫描,用凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的光密度值。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件处理实验数据,各组间比较采用单因素 A-nova 进行方差分析,表示与空白组比较 * $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义,表示 ** $P < 0.01$ 为差异具有极显著意义。

3 结果

3.1 粪便含水率结果测定 图 1、表 1 结果表明,模型组的含水率随天数的增加而减少,而空白组则呈现稳定的趋势,说明成功建立了便秘大鼠模型,且差异具有极显著意义 $P < 0.01$ 。

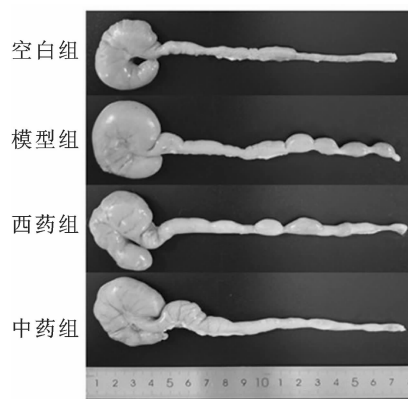


图 1 各组大鼠肠组织表现

表 1 粪便含水率结果测定($\bar{x} \pm s$)

组别	n	造模前含水率(%)	第一次粪便排出时间(min)	造模 7 d 后含水率(%)
空白组	10	56.82 ± 1.2	243.5 ± 25.4	59.38 ± 4.09
模型组	10	57.51 ± 1.3	421.5 ± 23.9 **	30.04 ± 4.03 **

注: ** 表示差异极显著($P < 0.01$)

3.2 黄芪增液汤对大鼠肠组织中 GAS、MTL 和 SP 蛋白含量的比较 通过 ELISA 检测血清中的 GAS、MTL 和 SP 的含量,结果如图 2 显示,模型组出现不同程度的下降趋势,与空白组相比差异非常显著($P < 0.01$),说明造模成功。中药组、西药

组分别与模型组比较均具有显著性差异($P < 0.01$),说明无论中药还是西药均能提高 GAS、MTL 和 SP 的表达量,中药组与西药组比较无统计学差异($P > 0.05$),说明中药和西药均无治疗优势。

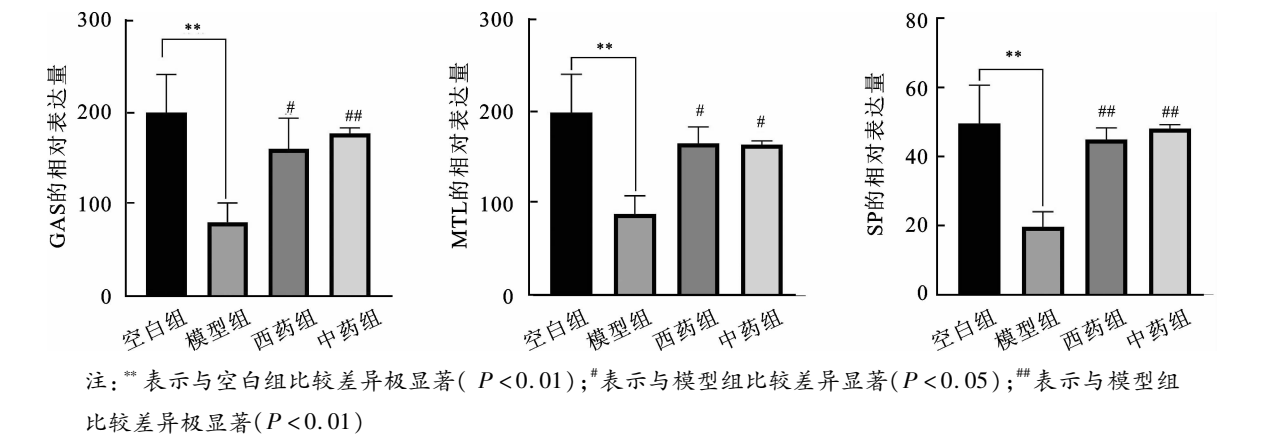


图 2 各组大鼠 GAS、MTL 和 SP 含量的比较

3.3 黄芪增液汤对大鼠肠组织中 PKA- α 、PKA- β 和 AQP9mRNA 含量的比较 如图 3 所示,模型组便秘大鼠结肠组织中 PKA- α 、PKA- β 和 AQP9mRNA 含量较空白组显著降低($P < 0.01$),说明便秘大鼠确实存在 PKA- α 、PKA- β 和 AQP9mRNA 的低表达。中药组、西药组分别与模

型组相比,均有显著性差异($P < 0.01$),说明中药、西药均具体现出治疗效果,中药组与西药组比较,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$),说明中药在干预 PKA- α 、PKA- β 和 AQP9mRNA 等指标上具有优势。

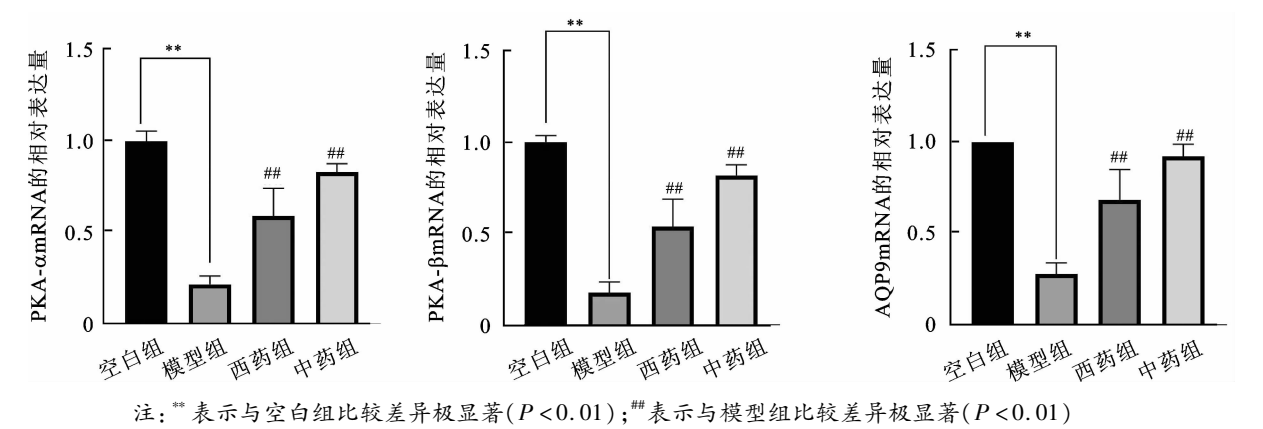


图 3 各组大鼠肠组织中 PKA- α 、PKA- β 和 AQP9mRNA 表达水平的比较

3.4 黄芪增液汤对大鼠肠组织中 VIP 和 AQP9 蛋白表达水平的比较 如图 4 中 WB 实验结果表明,模型组与空白组相比,AQP9 和 VIP 蛋白表达下降

($P < 0.01$),说明便秘模型大鼠存在 AQP9 和 VIP 的低表达。中药组、西药组分别与模型组相比,蛋白表达呈上升趋势,且具有极显著性差异($P <$

0.01),说明中药和西药均能上调 VIP 和 AQP9 的表达。中药组与西药组比较,差异具有显著统计

学意义($P < 0.01$),说明中药在提高 AQP9 和 VIP 的含量上,要优于西药。

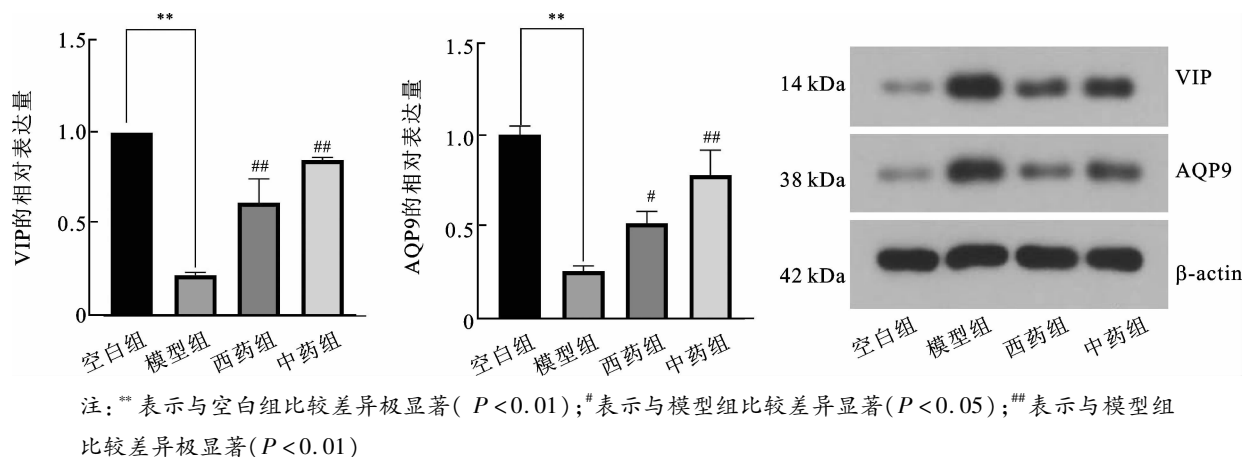


图4 各组大鼠肠组织 VIP 和 AQP9 蛋白表达水平比较

4 讨论

中药复方是由多味中药组成的成方制剂,能够通过多途径、多环节、多靶点发挥不同的体内药效学机制,从而达到治愈疾病的目的^[9]。《兰室秘藏·大便结燥》曰:“夫肾主五液,津液润则大便如常。”中医气和津液的理论指出,气具有推动作用,津液有滋润作用,气和津足则大便质软、便次正常,如气津不足,则大便次数减少,大便干结^[10]。然慢传输型便秘最主要的临床症状即是便次减少和大便干燥,黄芪增液汤是陕西省名中医李毅忠治疗便秘的经验方,以黄芪、大剂量生白术健脾益气为君药,玄参、生地、麦冬滋阴增液为臣药,厚朴、枳实下气导滞为佐,火麻仁、柏子仁润肠通便为使,从而能“增水行舟”,达到健脾益气、滋阴通便的功效。从本研究结果来看,模型组首次排便时间延长,造模第 7 d,模型组粪便含水率较空白组底,差异具有统计学意义($P < 0.01$),说明造模成功。生化检测血清中的 GAS、MTL 和 SP 的含量,在造模大鼠中出现不同程度的下降,与空白组比较差异非常显著,说明便秘与非便秘大鼠体内存在相关因子的差异性。通过药物的干预,中药组与西药组均有不同程度上调,中药组与模型组、西药组比较具有显著性差异($P < 0.01$ 及 $P < 0.05$)。说明药物干预有效,且中药组较西药组更明显。RT-qPCR、WB 实验结果表明,模型组大鼠结肠组织中 PKA- α 、PKA- β 、AQP9 mRNA、PKA、VIP、AQP9 含量

较空白组显著降低($P < 0.01$)。中药组、西药组分别与模型组比较,显示出不同程度的治疗效果,且有显著性差异($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),说明中药的治疗效果比西药更明显。

此外,本研究结果中发现,SP、VIP、PKA、AQP9 等指标的增加呈正相关,可能是通过 PKA 来作为中间递质实现的,换言之,可能存在 SP/VIP-PKA-AQPs 信号通路,此通路可调控肠道水液,从而促肠道水液分泌和促胃肠动力,这与周永学等^[10]前期研究成果表现一致。有研究已发现 c-AMP-PKA 途径是 VIP 发挥生物效应的重要中间环节之一^[11]。P 物质(Substance P, SP)作为兴奋性胃肠神经递质的一种,是体内最强的消化道平滑肌兴奋物质之一。研究^[12-13]认为 SP 与便秘的发生有着密切关联,SP 大量分布于机体中枢神经系统和肠肌间神经丛中,主要功能是刺激和保持肠的蠕动性,增强结肠收缩和运动,促进胃肠运动。血管活性肠肽(VIP)广泛分布于胃肠道及神经系统内,参与胃肠道传输功能的调节^[14]。胃动素(MLT)生理作用是促进肠运动,提高胃肠道的收缩力和张力^[15]。胃泌素(GAS)又称促胃液素,具有与胃动素具有类似的促进胃排空作用,也可作用于平滑肌细胞的特异性受体,激发胃窦平滑肌的收缩反应。胃泌素与胃动素均能促进胃肠平滑肌收缩促进胃肠动力,二者分泌紊乱可能导致胃动力障碍^[16-17]。VIP、SP、胃动素和胃泌素与胃肠

动力密切相关^[18-19]。cAMP 信号通路又称 PKA 系统 (protein kinase A system, PKA), 是环核苷酸系统的一种, 以 cAMP 为第二信使的信号通路的主要效应是通过活化 cAMP 依赖的 PKA 使下游靶蛋白磷酸化, 从而影响细胞代谢和细胞行为^[20-21]。AQP_s 大都含有蛋白激酶 A (Protein kinase A, PKA) 磷酸化的同源序列, 这些水通道蛋白受到磷酸化作用的直接调节^[22]。AQP_s 磷酸化是环磷酸腺苷 (cAMP) 依赖性的, 即在某些因素作用下, 腺苷酸环化酶 (AC) 被激活, 使细胞内 cAMP 水平上升, 进而激活 cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA), PKA 信号传导系统被活化后, 催化 AQP 上的丝氨酸磷酸化, 从而使 AQP 高表达, 增加膜对水的通透性^[23-24]。

在前期的动物实验研究中, 已经证实黄芪增液汤治疗 STC 的作用机制与结肠黏膜 AQP₉ 表达的上调, 增加肠道水分分泌有关, 但不足以证实黄芪增液汤益气增液机制, 本研究通过上述实验方法检测发现, 黄芪增液汤可上调便秘大鼠血清中 SP、VIP、MLT、GAS 等参与胃肠动力的因子, 证实黄芪增液汤有极强的促胃肠动力作用, 中国医学认为推动作用为气的作用之一, 慢传输型便秘最主要的临床症状就是结肠传输功能缓慢, 大便次数减少, 因此, 中医在治疗上, 会应用大量补气的方法和中药, 这也就揭示了黄芪增液汤具有促胃肠动力的作用机制。另外, 慢传输型便秘还有一个主要的临床症状就是大便干燥, 因为肠内容物在肠道存留时间过长, 其水分被肠道大量吸收, 导致大便干燥^[25], 因此, 中医在治疗便秘过程中会利用滋阴增液的方法, 通过本研究也证实黄芪增液汤可通过上调 PKA、AQP₉ 等因子, 增加肠道水分, 来实现其增液行舟功能。

综上所述, 黄芪增液汤的作用机制可能是通过上调 SP、VIP、MLT、GAS 等胃肠动力因子实现其益气助运作用, 上调 PKA、AQP₉ 等因子实现其滋阴增液作用, 总而言之, 黄芪增液汤具有促胃肠动力和肠道水液分泌双重作用, 故而, 黄芪增液汤是治疗慢传输型便秘的可靠、有效方剂。后期我们将进一步研究黄芪增液汤对 SP/VIP-PKA-AQP_s 信号通路的作用机制, 为证实其体内药效学机制奠

定理论依据。

参考文献

[1] 钱梦焯, 戴高中. 中药治疗慢传输型便秘临床及实验研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(3): 518-520.

[2] 易顺, 杜丽娟. 慢传输型便秘与肠道微生态的关系及治疗的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2020, 33(12): 1306-1309.

[3] 朱国栋, 朱安龙. 慢传输型便秘病因机制研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(23): 4623-4628.

[4] 李沛东, 薛源, 闫在华, 等. 慢传输型便秘分子机制的研究进展[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2020, 4(20): 119-122.

[5] 陈容, 周冷. 结肠慢传输型便秘的研究进展[J]. 海南医学, 2020, 31(18): 2409-2413.

[6] 冯智, 胡忠园, 王俊, 等. 李毅忠运用黄芪增液汤治疗结肠慢传输型便秘经验[J]. 河南中医, 2019, 39(1): 44-47.

[7] 冯智, 李毅忠, 王俊. 八髎穴埋线联合黄芪增液汤治疗结肠慢传输型便秘 37 例[J]. 现代中医药, 2020, 40(2): 57-61.

[8] 冯智, 陈强, 李毅忠, 等. 黄芪增液汤对便秘大鼠结肠 AQP₉ 的表达影响[J]. 中医临床研究, 2020, 12(6): 147-149.

[9] 黄业保, 刘春强. 中医药治疗慢传输型便秘的实验研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 87-89.

[10] 窦亚飞, 闫永彬. 小儿便秘辨治概要[J]. 现代中医药, 2022, 42(1): 73-77.

[11] 周永学, 文颖娟, 闫曙光. 硝菴通结方治疗功能性便秘的机制探讨[J]. 现代中医药, 2013, 33(5): 12-15.

[12] 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]. Journal of Leukocyte Biology, 2008, 83(4): 972-981.

[13] 李明, 王建民, 杨玲玲, 等. 慢传输型便秘中医证型与血管活性肠肽和 P 物质关系[J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33(5): 21-23.

[14] 胡晔东, 林琳, 张红杰, 等. Cajal 间质细胞与一氧化氮在吗啡诱导慢传输运动小鼠结肠中的改变[J]. 中国临床康复, 2005, 9(44): 134-136, 193.

[15] 潘慧,姚宏健,常为伟,等. 通便丸治疗胃肠实热型便秘的疗效及对血清 SP、VIP 和 NO 水平的影响[J]. 江西中医药,2021,52(10):41-43.

[16] 王郁金,周永学,张红,等. 功能性便秘大鼠在体结肠肌电及血清中胃动素、胃泌素的变化[J]. 陕西中医,2014,35(9):1255-1256.

[17] Konturek JW, Thor P, Maczka M, et al. Role of cholecystokinin in the control of gastric emptying and secretory response to a fatty meal in normal subjects and duodenal ulcer patients [J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1994, 29(7):583-590.

[18] Xu L, Gao S, Guo F, et al. Effect of motilin on gastric distension sensitive neurons in arcuate nucleus and gastric motility in rat [J]. Neurogastroenterology & Motility, 2011, 23(3):265-e121.

[19] Amir AA. Etiological factors of constipation in the elderly, with emphasis on functional causes[J]. Eastern Mediterranean Health Journal, 2011, 17(8):708-711.

[20] Lu ZZ, Yin XJ, Teng WJ, et al. Comparative effect of electroacupuncture and moxibustion on the expression of substance P and vasoactive intestinal peptide in patients with irritable bowel syndrome[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine = Chung i Tsa Chih Ying Wen Pan, 2015, 35(4):402-410.

[21] 王璐,隋楠. 基于大肠主津理论助阳通便膏对便秘模型小鼠结肠组织 VIP-CAMP-PKA-AQP3 通路的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(5):147-151, 277.

[22] 周永学,王郁金,闫曙光,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24):99-104.

[23] 杜真臻. 基于蛋白激酶 A(PKA) 传导通路探讨通便汤治疗慢传输型便秘(STC)的机制研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2018.

[24] 智会. 水通道蛋白 3、4、8 在大鼠慢传输便秘模型结肠黏膜中的表达[D]. 郑州:郑州大学, 2011.

[25] 马丙旭. 温阳调中汤治疗慢传输便秘(阳虚寒凝证)临床疗效观察[D]. 郑州:河南中医药大学, 2021.

(修回日期:2023-05-07 编辑:崔春利)