

- 10 He J, Cui L, Zeng Y, *et al.* REG γ is associated with multiple oncogenic pathways in human cancers [J]. *BMC Cancer*, 2012; 12(1): 1-14.
- 11 Nikaido T, Shimada K, Shibata M, *et al.* Cloning and nucleotide sequence of cDNA for Ki antigen, a highly conserved nuclear protein detected with sera from patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Immunol*, 1990; 79(2): 209-14.
- 12 Chen S, Wang L, Yao X, *et al.* miR-195-5p is critical in REG γ -mediated regulation of wnt/ β -catenin pathway in renal cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017; 8(38): 63986.
- 13 Chen X, Barton LF, Chi Y, *et al.* Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REG γ proteasome [J]. *Mol Cell*, 2007; 26(6): 843-52.
- 14 Li X, Amazit L, Long W, *et al.* Ubiquitin-and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REG γ -proteasome pathway [J]. *Mol Cell*, 2007; 26(6): 831-42.
- 15 Zhang Z, Zhang R. Proteasome activator PA28 γ regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation [J]. *EMBO J*, 2008; 27(6): 852-64.
- 16 Liu J, Yu G, Zhao Y, *et al.* REG γ modulates p53 activity by regulating its cellular localization [J]. *J Cell Sci*, 2010; 123(23): 4076-84.
- 17 Ali A, Wang Z, Fu J, *et al.* Differential regulation of the REG γ -proteasome pathway by p53/TGF- β signalling and mutant p53 in cancer cells [J]. *Nat Commun*, 2013; 4(1): 1-16.
- 18 Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, *et al.* EMT in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018; 18(2): 128-34.
- 19 Loh CY, Chai JY, Tang TF, *et al.* The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition; signaling, therapeutic implications, and challenges [J]. *Cells*, 2019; 8(10): 1118.
- 20 Yu H, Shen Y, Hong J, *et al.* The contribution of TGF- β in epithelial-mesenchymal transition (EMT): down-regulation of E-cadherin via snail [J]. *Neoplasia*, 2015; 62(1): 1-15.
- 21 Lecarpentier Y, Schussler O, Hébert JL, *et al.* Multiple targets of the canonical WNT/ β -catenin signaling in cancers [J]. *Front Oncol*, 2019; 9(18): 1248.

[2022-09-06 修回]

(编辑 张艳利)

健脾五穴点按法对老年功能性便秘大鼠的影响

史勇¹ 李成浩¹ 张红石² (1 长春大学特殊教育学院, 吉林 长春 130022; 2 长春中医药大学护理学院)

【摘要】 目的 探讨健脾五穴点按法治疗老年功能性便秘(FC)的影响因素。方法 40只Wistar大鼠,按体质量随机分为空白组、模型组、穴位按压组、阳性药物组,采用复方地芬诺酯混悬液建立FC大鼠模型。空白组、模型组不做干预治疗;穴位按压组采用健脾五穴按压治疗;阳性药物组采用莫沙必利溶剂灌胃。实验结束后,进行首粒黑便排出时间及粪便含水率检测,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清5-羟色胺(HT)和血管活性肠肽(VIP)含量,实时荧光定量-聚合酶链反应(PCR)检测结肠组织P物质(SP)mRNA和促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)mRNA水平,Western印迹检测结肠SP和CRF蛋白水平。结果 治疗7d后,各组首粒黑便排出时间比较:模型组>穴位按压组>阳性药物组(均 $P<0.05$);模型组粪便含水率、5-HT、SP、CRF mRNA和蛋白水平明显低于穴位按压组、阳性药物组,模型组VIP水平明显高于穴位按压组、阳性药物组(均 $P<0.05$)、穴位按压组和阳性药物组粪便含水率、5-HT、VIP、SP、CRF mRNA和蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 健脾五穴点按法对FC大鼠脑肠肽的紊乱具有调节作用,促进了大鼠排便,改善了功能性便秘症状。

【关键词】 健脾五穴;功能性便秘;点按法

【中图分类号】 R244 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9202(2023)21-5289-03;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2023.21.049

功能性便秘(FC)是指无代谢功能障碍、无结构异常变化、无器质性病因,出现的以排便次数减少、大便干结、排便无力为主要症状的临床病症^[1]。属于中医学“便秘”“脾约”范畴,是社区生活中较为常见的功能性疾病^[2]。流行病学显示,我国成年人FC的发病率为4%~6%,年龄越大,发病率越高^[3]。长期便秘会引起腹胀、食欲下降、口内异味等症状,便

秘产生的有害物质亦会增加患者并发胃肠道疾病的风险^[4]。健脾五穴点按法治疗老年FC,有着较好的临床疗效,但作用机制不明。因此,本研究主要是立足于对健脾五穴的实验机制研究,围绕“脑-肠轴”调节FC的关键作用,探讨健脾五穴点按法治疗老年FC的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级,Wistar大鼠40只,雌雄各半,9月龄,体质量300~350g,购于长春市亿斯实验动物技术有限责任公司[许可证号码:SCXK(吉)-2020-0002]。适应性喂养1w,雌雄分笼,每笼5只,

基金项目:吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20220612KJ)

通信作者:张红石(1979-),女,博士,教授,硕士生导师,主要从事康复护理研究。

第一作者:史勇(1979-),男,硕士,副教授,硕士生导师,主要从事中医药及中医外治技术研究。

摄食饮水不限,自然照明,保持环境温度 22~24 ℃,湿度 55%~60%。

1.2 药品及试剂 莫沙必利片,5 mg/片,国药准字 J20110022。复方地芬诺酯片(康普),2.5 mg/片,国药准字 H32022716。大鼠 5-羟色胺(HT)、人血管活性肠肽(VIP)酶联免疫试剂盒(96T;组织匀浆;上海茁彩生物科技有限公司,ZC35959J,ZC37398)。总 RNA 提取试剂(ml095476)、HG TaqMan miRNA 反转录试剂盒(ml095527)、DNA Marker 2000(ml095609)、P 物质(SP)兔抗多克隆抗体(ml091754)、促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)兔抗单克隆抗体(ml091933)均购自上海酶联生物科技有限公司;β-actin 鼠抗单克隆抗体(北京安诺伦生物科技有限公司,YM3029);阿拉伯树胶粉(天津市光复精细化工研究所);异氟烷(上海玉研科学仪器有限公司);98%氯苯丙氨酸(PCPA,上海麦克林生化科技股份有限公司)。

1.3 仪器设备 气麻仪(上海玉研科学仪器有限公司,MR7654);9 cm 镊针(宸之瑞办公专营店);酶标仪(BIOTEK,ELX-800);电泳仪(DYY-7C)、转移槽(DYCZ-40D)、水平摇床(WD-9405B)均购自北京六一生物科技有限公司;实时荧光定量-聚合酶链反应(PCR)仪(Applied Biosystems,ABI7500)、超速冷冻离心机(湖南湘仪,H-2050R);电热恒温培养箱(天津泰斯特,DH36001B);离心机(益世科生物科技有限公司,MCR-88-8)。

1.4 动物分组及造模 40 只 Wistar 大鼠,喂养 7 d 后,分为雌雄两笼,每笼 20 只,按体质量随机分为空白组、模型组、穴位按压组、阳性药物组,每组 10 只,雌雄分笼各半。空白组给予 2%蔗糖灌胃,其余各组采用复方地芬诺脂混悬液建立 FC 大鼠模型,将复方地芬诺酯片溶解稀释后按大鼠 10 mg/kg 灌胃,每天 1 次,连续 14 d,当大鼠出现首粒黑便排出时间延长时,为 FC 模型造模成功。

1.5 实验动物干预及取材 空白组、模型组:每日正常饮食饮水,不做干预治疗。穴位按压组:采用 9 cm 镊针进行健脾五穴按压治疗,大鼠治疗前采用气麻仪固定在鼠板上,以镊针垂直在大鼠神阙、中脘、章门(左右)、天枢(左右)和气海进行点按,力度以镊针自身重力为最大值,每日 1 次,连续治疗 7 d。大鼠穴位定位参照文献^[5]。阳性药物组:将莫沙必利溶解稀释后按人鼠比例 1:30 进行等效剂量换算灌胃(每 100 g 大鼠给予 25 mg 药物),每日 1 次,连续 7 d。干预结束后,禁食 24 h。麻醉成功后,经腹主动脉采血 5 ml,从降结肠与乙状结肠交界处向上

取 50 mm×3 mm×3 mm 肠组织,分别存于-80 ℃冰箱冻存备用。

1.6 首粒黑便时间及粪便含水率检测 分别于造模 14 d 及治疗 7 d 清晨给水 30 min 后,给予 10 ml/kg 的墨汁灌胃,记录每只大鼠墨汁灌胃时间及各组大鼠的首粒黑便排出时间。粪便含水率(%)=(粪便湿重-粪便干重)/粪便湿重×100%。

1.7 血清酶联免疫吸附试验(ELISA) 检测大鼠血清 5-HT 和 VIP 的含量。按 ELISA 试剂盒说明测定各组大鼠血清 5-HT 和 VIP 的含量。建立标准曲线的直线回归方程式,计算出每个样品 5-HT 和 VIP 的含量。

1.8 结肠组织 PCR 检测 将结肠组织置于离心管中,加入 TRNzol 总 RNA 提取试剂进行总 RNA 提取,采用分光光度计测定样品浓度和纯度,逆转录合成 cDNA,随后进行 PCR。SP:上游引物 5'-GCATTGCCTCCTTGATTTGG-3',下游 5'-TGGCGGTC-TTTTTCTCTGTT-3',81 bp;CRF:上游引物 5'-TCTCTG-GATCTCACCTTCCACCTT-3',下游 5'-AGTTTCCTGT-TGCTGTGAGCTTGC-3',92 bp;(引物由美国 Invitrogen 生物技术有限公司合成,以 GAPDH 为内参),数据采用 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

1.9 Western 印迹 检测结肠组织中 SP、CRF 蛋白表达。采用二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量,完成蛋白提取、定量、电泳、转印、封闭、抗体孵育、底物发光等,完成胶片扫描,采用图像处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带及光密度值。蛋白的相对含量以目的蛋白灰度值与 β-actin 灰度值的比值表示。

1.10 统计学方法 采用 SPSS19.0 软件进行方差分析、t 检验。

2 结果

2.1 各组治疗 7 d 后首粒黑便排出时间及粪便含水率比较 治疗 7 d 后,各组首粒黑便排出时间比较:模型组>穴位按压组>阳性药物组(均 $P<0.05$);模型组粪便含水率明显低于穴位按压组、阳性药物组(均 $P<0.05$),穴位按压组和阳性药物组粪便含水率差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.2 ELISA 检测各组 5-HT、VIP 水平 模型组 5-HT 明显低于穴位按压组、阳性药物组,模型组 VIP 水平明显高于穴位按压组、阳性药物组(均 $P<0.05$),穴位按压组和阳性药物组 5-HT、VIP 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.3 PCR 检测各组结肠组织 SP、CRF mRNA 和蛋白水平 模型组 SP、CRF mRNA 和蛋白水平明显低于穴位按压组、阳性药物组(均 $P<0.05$),穴位按压

组和阳性药物组 SP、CRF mRNA 和蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1 各组治疗 7 d 后首粒黑便排出时间、粪便含水率、血清 5-HT、VIP 和 SP、CRF mRNA 及蛋白水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	首粒黑便排出 时间(min)	粪便含水率 (%)	5-HT (pg/ml)	VIP (pg/ml)	SP mRNA	CRF mRNA	SP 蛋白	CRF 蛋白
模型组	344.50±38.02	34.86±3.50	374.27±23.75	195.98±10.51	0.602±0.087	0.448±0.125	0.418±0.044	0.598±0.087
穴位按压组	240.90±38.37 ¹⁾	42.91±2.92 ¹⁾	414.46±19.53 ¹⁾	166.90±14.90 ¹⁾	0.779±0.102 ¹⁾	0.867±0.108 ¹⁾	0.556±0.051 ¹⁾	0.698±0.117 ¹⁾
阳性药物组	211.90±15.64 ¹⁾²⁾	42.90±2.92 ¹⁾	412.80±25.93 ¹⁾	157.97±10.10 ¹⁾	0.710±0.851 ¹⁾	0.658±0.050 ¹⁾	0.521±0.145 ¹⁾	0.772±0.133 ¹⁾

与模型组比较:1) $P<0.05$;与穴位按压组比较:2) $P<0.05$

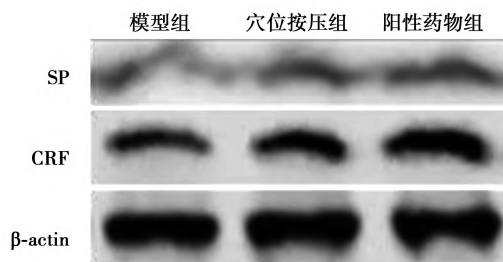


图 1 Western 印迹检测各组结肠组织 SP、CRF 蛋白表达

3 讨论

FC 是消化系统常见的功能性胃肠道疾病,发病机制尚未完全明确。西药治疗主要以刺激性泻药为主,效果欠佳,容易反复,长期便秘发作甚至会诱发心脑血管疾病^[6]。中医治疗疗效确切持久、治病求本、历史悠久,副作用少,有独特的优势,中医学家认为 FC 的病因病机主要从脾胃论治,常兼其他脏腑病变^[7]。治疗方法有中药方剂内服施治、中医外治两类。中药根据临床症状、舌脉表现,四诊合参进行辨证分型施治,效果显著。外治方法多样化,以针灸治疗、穴位贴敷、穴位注射、推拿疗法、中药灌肠为主,疗效显著^[8]。健脾五穴,是中医腹部按摩常用的推拿选穴。选穴包括神阙、中脘、章门、天枢、气海。神阙是骆竞洪九宫腹部推拿中的中宫,善于运气健脾,调畅气机;中脘、章门,一脏会一腹会,是脏腑点穴中两个合用穴;气海有提气健脾之法,临床效果颇为明显;天枢为天地交接之处、气机转输之纽,点按此穴有利于助气海,运气下行。健脾五穴点按法治疗老年 FC 临床疗效较好,但因缺少有效的机制支撑,故阻碍了有效的临床推广及应用。近年来研究发现,“脑-肠轴”调节失衡在 FC 发病过程中扮演了重要的角色,该学说正逐渐成为 FC 机制研究的新热点^[9]。相关研究表明,5-HT、VIP、SP、CRF 等脑肠肽的表达差异可影响患者的胃肠排空功能和肠蠕动,并与 FC 的发病密切相关^[10]。本研究在以往临床研

究及动物研究的基础上,结合现代理化技术、模型技术、动物治疗技术等,开展针对健脾五穴点按法治疗老年 FC 大鼠影响的研究,从“脑-肠轴”调节上阐述健脾五穴对老年 FC 的影响作用。

综上,经健脾五穴按压治疗后,提高了 FC 大鼠结肠组织中 SP、CRF mRNA 表达和蛋白活性,对脑肠肽的紊乱具有调节作用,促进了大鼠排便,改善了 FC 症状。

4 参考文献

- 1 汤水华,李思汉,林翔英,等. 理气通便方对功能性便秘气滞证大鼠脑肠肽的影响[J]. 北京中医药大学学报,2021;44(7):615-24.
- 2 张雨柔,隋楠. 中医药干预功能性便秘肠道菌群影响的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2023;25(8):26-9.
- 3 马倩莹,何新芳. 温针灸八髎穴治疗阳虚型慢性功能性便秘的临床研究[J]. 广州中医药大学学报,2023;40(2):363-7.
- 4 李燕凤,刘娜,冯敏婷. 肠道实热型小儿便秘应用推拿治疗的效果分析[J]. 中国继续医学教育,2021;13(20):177-80.
- 5 丛德毓,唐成林. 实验推拿学[M]. 北京:科学出版社,2019:171-5.
- 6 Sandra A, Esther S, Mateu SP, et al. Functional constipation in older adults: prevalence, clinical symptoms and subtypes, association with frailty, and impact on quality of life[J]. Gerontology, 2021;56(7):153-517.
- 7 顾志坚,林江,丛军. 芍药对复方地芬诺酯致便秘模型大鼠的影响[J]. 中医学报,2021;36(7):1501-5.
- 8 陈静,吕文良. 中医药防治功能性便秘研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2021;23(6):134-40.
- 9 Junpeng Y, Liping C, Siyuan Z, et al. Acupuncture methods for functional constipation: protocol for a systematic review and network meta-analysis[J]. Ann Palliat Med, 2021;12(1):256-9.
- 10 魏小丽,王宇航,李成,等. 针刺天枢穴联合莫沙必利治疗习惯性便秘及对血清 VIP、MTL、5-HT 的影响[J]. 中华中医药学刊,2021;39(7):95-8.

[2023-06-19 修回]

(编辑 李男)