



中国实验方剂学杂志

Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae

ISSN 1005-9903, CN 11-3495/R

## 《中国实验方剂学杂志》网络首发论文

题目： 附子-肉桂配伍调控结肠 VIP/cAMP/PKA/AQP 通路改善大鼠阳虚型慢传输型便秘

作者： 赵罗娜, 杨元凤, 黎豫川, 张远哲

DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20231212

收稿日期: 2023-05-25

网络首发日期: 2023-09-22

引用格式: 赵罗娜, 杨元凤, 黎豫川, 张远哲. 附子-肉桂配伍调控结肠 VIP/cAMP/PKA/AQP 通路改善大鼠阳虚型慢传输型便秘[J/OL]. 中国实验方剂学杂志. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20231212>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

[收稿日期] 20230525

[基金项目] 贵州省省级科技计划项目资助（黔科合基础[2020]1Y362，黔科合基础-ZK[2022]一般 510）；贵州省教育厅青年科技人才成长项目（黔教合 KY 字[2022]261 号）

[第一作者] 赵罗娜，硕士，讲师，从事中药民族医药新制剂、新剂型及药理药效研究，E-mail: 499510859@qq.com

[通信作者] \*张远哲，博士，讲师，从事肠道疾病证治与方剂配伍运用研究，E-mail: zhangyuanzhe043@gzy.edu.cn; \*黎豫川，博士，副主任药师，从事方剂配伍规律及临床应用研究，E-mail: liyuchuan192@gzy.edu.cn

## 附子-肉桂配伍调控结肠 VIP/cAMP/PKA/AQP 通路改善大鼠阳虚型慢传输型便秘

赵罗娜<sup>1</sup>，杨元凤<sup>2</sup>，黎豫川<sup>2</sup>，张远哲<sup>1\*</sup>

(1. 贵州中医药大学，贵阳，550025；2. 贵州中医药大学第二附属医院，贵阳，550025)

**[摘要]** **目的:**通过血管活性肠肽(VIP)/环状磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶 A(PKA)/水通道蛋白(AQP)通路探究附子配伍肉桂对阳虚型慢传输便秘(STC)大鼠肠道功能的影响及作用机制。**方法:**将 SD 大鼠随机分为 6 组( $n=6$ )，包括空白组，模型组，附子-肉桂高剂量组，附子-肉桂中剂量组，附子-肉桂低剂量组及普芦卡必利组。除空白组以外，其余组均采用盐酸洛哌丁胺联合冰水灌胃造模法，建立阳虚型 STC 大鼠模型。记录各组大鼠首次黑便排出时间，粪便数量，粪便含水量，肠道推进率及粪便性状评分。通过苏木精-伊红(HE)染色观察结肠组织病理形态，阿利新蓝-过碘酸-雪夫(AB-PAS)染色观察结肠黏液分泌情况。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中 VIP 的水平。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测结肠组织中 AQPs mRNA 表达水平，免疫组化检测结肠和肾组织中 AQPs 表达，蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织中 cAMP、PKA 及 VIP 的蛋白表达水平。**结果:**与阳虚型 STC 大鼠相比，高剂量附子-肉桂组大鼠首粒黑便排出时间缩短，粪便粒数及含水量增加，粪便性状评分及肠道推进率提高；高剂量附子-肉桂治疗后，大鼠肠道病变减轻，黏液分泌增加；血清中 VIP 含量增加，结肠和肾组织中水通道蛋白 1(AQP1)表达水平降低，水通道蛋白 3(AQP3)及水通道蛋白 9(AQP9)表达水平增加。高剂量附子-肉桂治疗组大鼠结肠组织中 cAMP、PKA 及 VIP 表达也显著大于模型组。中剂量及低剂量附子-肉桂的作用小于高剂量组。**结论:**高剂量附子-肉桂可以通过上调 VIP/cAMP/PKA/AQP 通路提高肠道动力，平衡肠道水液代谢，从而改善阳虚型慢传输便秘大鼠的便秘症状。

**[关键词]** 阳虚型慢传输便秘；附子-肉桂；血管活性肠肽；水通道蛋白；活性肠肽(VIP)/环状磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶 A(PKA)/水通道蛋白(AQP)通路

[中图分类号] R284；R285；R289；R287；R22；R2-031；R33；R24 [文献标识码] A

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231212

### The Combination of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Cinnamomi Cortex the VIP/cAMP/PKA/AQP Pathway in Colon to Improve Yang-deficient Slow-transmission Constipation in Rats

ZHAO Luona<sup>1</sup>, YANG Yuanfeng<sup>2</sup>, LI Yuchuan<sup>2</sup>, ZHANG Yuanzhe<sup>1\*</sup>

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550025, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the effect and mechanism of action of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex on intestinal function in rats with Yang deficiency type slow transmission constipation through VIP/cathecolamine antimicrobial peptide (cAMP)/Protein kinase A (PKA)/aquaporins (AQP) pathway. **Method:** SD rats were randomly divided into 6 groups ( $n=6$ ), including control group, model group, high dose of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex group, medium dose of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex group, low dose of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex group and prucalopride group. Except for the control group, all the groups were moulded using loperamide hydrochloride combined with ice water gavage to establish a Yang deficiency type slow transmission type constipation rat model. The number of faeces, time of first black stool, faecal water content, intestinal propulsion rate and score of faecal properties were recorded in each group. At the end of the test, the histopathological pattern of the colon was observed by Hematoxylin eosin (HE) staining and the secretion of colonic mucus was observed by AB-PAS staining. ELISA was performed to detect the level of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the serum. The mRNA expression of AQP in the colon was measured by PCR.

Immunohistochemical staining was performed to observe the expression of AQPs in colon and kidney tissues respectively. Western blot was performed to detect the protein expression levels of cAMP, PKA and VIP in colon tissues. **Result:** Compared with rats with Yang deficiency type slow transmission constipation, the rats in the high-dose of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex group had a shorter time to pass the first black stool, an increase in the number of fecal pellets and water content, as well as an increase in Bristolian trait score and intestinal advancement rate, and an improvement in constipation symptoms. The intestinal lesions of STC rats were reduced and mucus secretion was increased after high-dose of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex treatment. The VIP level was greater than that of the model group after high-dose of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex treatment. The expression levels of AQP1 in colon and kidney tissues were lower than that of the model group, while the expression levels of AQP3 and AQP9 were higher than that of the model group. Western blot results showed that the expression of cAMP, PKA and VIP in the colon tissues of Yang deficiency STC rats treated with high dose of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex was significantly greater than that of the model group. The effect of medium and low doses of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex was less than that of the high-dose group. **Conclusion:** The high dose of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex can improve intestinal motility and balance intestinal water and fluid metabolism through up-regulating the VIP-cAMP-PKA-AQP pathway, thereby improving the constipation symptoms in Yang deficiency type slow transmission type constipation rats.

**[Keywords]** Yang deficiency type slow transmission constipation; Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Cinnamomi Cortex; vasoactive intestinal peptide; aquaporins; VIP/cAMP/PKA/AQP pathway

慢传输型便秘 (STC) 是功能型便秘中发病率最高的一种, 通常以排便次数少和大便硬为特征<sup>[1]</sup>。STC 的病因复杂, 主要与生活习惯不良, 疾病因素, 药物因素及心理因素相关。临床治疗主要以药物为主, 包括促进胃肠动力药及不同作用机制的泻剂等<sup>[2]</sup>。在中医学中, STC 属于中医学“便秘”范畴, 阳虚型 STC 的病因主要与饮食寒凉, 久病阳虚以及禀赋薄弱等有关<sup>[3]</sup>, 阳气不足, 气化无力, 津液内停, 阴寒凝滞于大肠是其主要病机。通过振奋阳气, 恢复气化功能, 温化凝滞阴结而通利大便是阳虚型 STC 的重要治法<sup>[4]</sup>。

便秘的病理机制主要与肠道动力障碍及肠道水液代谢紊乱引起肠道功能失常有关<sup>[5]</sup>。血管活性肠肽 (VIP) 对于维持胃肠道的功能正常来说至关重要<sup>[6]</sup>。VIP 可以增强胃肠道黏液分泌、舒张胃肠道平滑肌及调控胃肠道的蠕动<sup>[7]</sup>。其增强胃肠道黏液分泌的作用主要通过调节肠道上皮细胞水通道蛋白 3 (AQP3) 的表达影响肠道的水液代谢<sup>[8]</sup>。研究表明 VIP 发挥以上生物功能的机制与环状磷酸腺苷 (cAMP) /蛋白激酶 A (PKA) 通路有关<sup>[9]</sup>。研究证实, VIP/cAMP/PKA/AQPs 水液代谢通路与功能性便秘的肠道水液代谢平衡息息相关<sup>[10]</sup>。

附子具有回阳救逆, 补火助阳及散寒止痛的功效, 是临床用于治疗肾阳虚证的常用药物。肉桂具有补火助阳, 散寒止痛, 温经通脉的功效, 常与附子配伍用于临床治疗肾阳虚证<sup>[11]</sup>。前期研究发现, 附子与肉桂 2:1 比例配伍能明显改善阳虚型 STC 大鼠肠动力障碍<sup>[12]</sup>, 为进一步明确其作用机制, 本研究基于 VIP/cAMP/PKA/AQPs 水液代谢通路, 探究附子-肉桂配伍影响阳虚型 STC 大鼠肠道功能的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠共 36 只, 体质量为 (200±20) g。实验动物购自成都达硕生物科技有限公司, 生产合格证号为 SCXK (川)-2020-030。所有大鼠均在室温 (23±2) °C、相对湿度 (40%~60%) 的条件下饲养, 常规 12 h/12 h 光/暗循环。每日更换饮水和饲料, 自由饮食, 经适应性饲养一周后用于实验。本研究经贵州中医药大学动物伦理委员会审查及批准 (20220103)。

### 1.2 药物及试剂

白附片、肉桂饮片购自贵州中医药大学第二附属医院 (贵阳济仁堂中药饮片厂, 批号分别为 20200801、20200901)。琥珀酸普芦卡必利片 (西安杨森制药有限公司, 批号 DCL7D00)。苏木素染液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 CR22002071); 伊红染液 (合肥博美生物科技有限责任公司, 批号 YE2080); AB-PAS 染色液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1285); Rat VIP 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (上海茁彩生物科技有限公司生产, 批号 ZC-37398); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批

号 P0009); TRIzol 试剂(赛默飞世尔科技中国,批号 A33250), AQP1、AQP3 及 AQP9 抗体(美国 Abcamab 公司,批号分别为 300463、ab125219、ab84828,); cAMP 抗体、PKA 抗体、VIP 抗体、 $\beta$ -actin 抗体(abclonal, 批号分别为 A17298、A0798、A1804、AC026); 生物素化山羊抗兔 IgG (Affinity, 批号 S0001)。

### 1.3 仪器

BA210Digital 型数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业有限公司); SpectraMAX Plus384 型酶标仪(美谷分子仪器有限公司); QuantStudio TM3 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ThermoFisher 仪器有限公司); 5200 型化学发光凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 药物制备

附子-肉桂配伍水煎液配制方法: 分别称取饮片白附片 10 g, 肉桂 5 g。白附片/肉桂(2:1 比例), 生药用量为 15 g。依据人与大鼠体表面积系数法换算大鼠用药剂量, 大鼠 1 日剂量=6.25 $\times$ (15 g/70 kg), 计算得出大鼠每日给药剂量为 1.3 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 即为中剂量<sup>[11]</sup>。采用以下方法制备水煎液: 两药混合浸泡在 500 mL 蒸馏水 30 min, 煎煮 2 次, 每次煎 30 min, 过滤, 合并滤液, 60 $^{\circ}$ C 水浴浓缩为 15 mL 的母液, 按照给药容积为 20 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 标准将母液分别稀释为 0.13、0.065、0.032 5 g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。普芦卡必利悬液由琥珀酸普芦卡必利片(西安杨森制药有限公司, 批号 DCL7D00) 制成, 用蒸馏水配制。

### 2.2 造模及分组

将 SD 大鼠适应性饲养 1 周, 随机分为 6 组( $n=6$ )。包括空白组, 模型组, 附子-肉桂高剂量组, 附子-肉桂中剂量组, 附子-肉桂低剂量组, 普芦卡必利组。除空白组外, 其余各组采用 8 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 盐酸洛哌丁胺联合 20 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 的 0 $^{\circ}$ C 冰水灌胃造模法建立阳虚型 STC 大鼠模型<sup>[13]</sup>。两种药物灌胃中间间隔 1 h, 每日 1 次, 连续 45 d。空白组大鼠每日给予 2 mL 生理盐水灌胃 1 次, 连续 45 d。根据粪便含水量及肠道传输功能验证慢传输型便秘模型造模成功与否。同时在造模期间观察大鼠是否有畏寒喜暖, 活动减少, 精神萎靡, 蜷缩拱背, 小便清长及进食减少的症状, 从而鉴定阳虚证候造模是否成功。实验期间观察各项指标, 实验结束后采集各组大鼠粪便、血清、结肠及肾组织用于指标检测。

### 2.3 干预方法

成功建立阳虚型 STC 大鼠模型后, 模型组大鼠每日给予等量生理盐水灌胃 1 次, 附子-肉桂高剂量组大鼠每天灌胃给予 2.6 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 附子肉桂汤, 中剂量组大鼠每天灌胃给予 1.3 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 附子肉桂汤, 低剂量组每天灌胃给予 0.65 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 附子肉桂汤, 普芦卡必利组每日灌胃普芦卡必利悬液 0.000 18 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 各组大鼠均连续灌胃给药 21 d。

### 2.4 首粒黑便排出时间、粪便粒数、粪便含水量及粪便性状评分

末次给药后半小时, 各组随机选取 3 只大鼠, 以 2 mL/只印度墨水灌胃, 记录各组大鼠首粒黑便的排出时间。同时收集 24 h 的粪便, 记录每只大鼠粪便粒数并称重。将收集的粪便置入 90 $^{\circ}$ C 恒温箱烘烤 3 h, 烘干后再次称量粪便质量。粪便含水率=(湿粪质量-干粪质量)/湿粪质量 $\times$ 100%。观察各组大鼠最后一次排便的粪便性状, 根据布里斯托粪便性状量表, 记录各组大鼠粪便性状评分<sup>[14]</sup>。见表 1

表 1 布里斯托大便分类法

Table 1 Bristol stool classification method

种类	性状	代表的排便情况
I 型(计 1 分)	一颗颗硬球状	便秘
II 型(计 2 分)	表面凹凸的香肠状	便秘
III 型(计 3 分)	表面有裂痕的香肠状	正常
IV 型(计 4 分)	香肠状或蛇状, 表面光滑	正常
V 型(计 5 分)	柔软的半固体	腹泻
VI 型(计 6 分)	无固定外形的粥状	腹泻
VII 型(计 7 分)	水状, 完全不含固体物	腹泻

### 2.5 肠道推进率检测

最后一次灌胃给药 30 min 后, 将 2 mL 的印度墨水灌入各组大鼠胃中, 25 min 后处死大鼠, 将小肠取出, 计算碳末推进率。肠道推进率=(碳末推进距离/肠道总长度) $\times$ 100%<sup>[12]</sup>。

## 2.6 苏木精-伊红 (HE) 染色

采取大鼠结肠组织进行常规石蜡切片,经二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水后,进行苏木精-伊红染色。经酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,而后于光学显微镜下放大观察,使用图像采集软件采集图像,观察各组大鼠结肠组织的病理形态变化。

## 2.7 阿利新蓝-过碘酸-雪夫 (AB-PAS) 染色

采取大鼠结肠组织进行常规石蜡切片,脱蜡至水。将切片放入 AB-PAS 染色液中染色,使用蒸馏水冲洗后,氧化, Schiff Reagent 浸染,蒸馏水冲洗,苏木素染色,酸性分化液分化, Scott 蓝化液返蓝,梯度乙醇浸泡,二甲苯透明及中性树胶封片。切片于光学显微镜下放大观察,采集图像,观察各组大鼠结肠组织中杯状细胞染色情况,从而判断结肠黏液分泌情况<sup>[15]</sup>。

## 2.8 ELISA 实验

根据 Rat VIP ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测各组大鼠血清中血管活性肠肽的水平。

## 2.9 Real-time PCR 实验

取大鼠结肠组织,根据 TRIzol 法提取样品总 RNA。以组织样品总 mRNA 为模板进行逆转录,产物进行荧光定量 PCR 反应以检测 AQP1、AQP3 及 AQP9 的 mRNA 表达水平。所有 PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 引物序列见表 2。反应条件为 95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 10 s, 72°C 退火 15 s, 循环 40 次。反应完成后,拷贝数据,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算各目的基因相对表达量。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
AQP1	上游 TCAACCCAGCCGTCACAC	189
	下游 CCTGGCCTGAGTTCACAC	
AQP3	上游 GTTCCGTGGCTCAAGTGGTGCTCAG	133
	下游 GCAGGGTTCAAGTGGGCTCCAGACA	
AQP9	上游 TCGGCAGTCGTGATGGCTCTCTATGT	192
	下游 AGGCACCTGGCGTGGATATGAATGGA	
$\beta$ -actin	上游 GGGAAATCGTGC GTGACATT	76
	下游 GCGGCAGTGGCCATCTC	

## 2.10 免疫组化实验

采集各组大鼠结肠组织和肾脏组织,石蜡切片脱蜡至水,依次经过抗原修复,灭活内源性过氧化物酶,滴加山羊血清封闭液,加入一抗 (AQP1、AQP3、AQP9), 4°C 过夜后滴加二抗, PBS 洗 3 次后进行 DAB 显色,苏木素复染细胞核,脱水封片。苏木素染色细胞核为蓝色, DAB 显示棕黄色为阳性表达。显微镜观察后采集图像,使用 Image Pro plus 6.0 版图像分析系统测量蛋白阳性表达区域的平均光密度值。

## 2.11 Western blot 实验

采集各组大鼠结肠组织,加入 RIPA 裂解液进行匀浆裂解。4°C、12 000 r·min<sup>-1</sup>,离心半径 6.215 cm,离心 10 min 取上清液,使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。样品加入上样缓冲液进行混合后,沸水浴使蛋白质变性,分装冻存待用。蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白质电转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭后,4°C 下以 cAMP (1:2 000)、PKA (1:1 000)、VIP (1:2 000) 及  $\beta$ -actin (1:50 000) 一抗孵育过夜。经 TBST 清洗,加入二抗 (1:5 000),常温孵育后,分别进行显影,拍照。使用 ImageJ 软件进行蛋白条带灰度值比较,以  $\beta$ -actin 为内参,对目的蛋白进行半定量分析。

## 2.12 统计分析

SPSS 24.0 软件用于本研究统计分析,定量资料采用  $\bar{x}\pm s$  表示,首先进行正态性和方差齐性检验,检验符合正态分布且方差齐,则两组间比较为非配对 t 检验,多组间的比较应采用单因素方差分析,多组之间两两比较,采用 SNK-Q 检验的方法。以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 一般状态变化

造模后小鼠进食量明显减少,活动也明显减少,喜扎堆,毛发不顺,眯眼,饮水次数增多,大便干结。说明此次造模基本成功,与 STC 常见的临床表现相吻合。灌服附子-肉桂配伍水煎液后,大便变软,或溏薄,活动

增加,进食量增加。

### 3.2 附子-肉桂对大鼠首粒黑便排出时间、粪便粒数、含水量及性状评分的影响

末次给药后记录每只大鼠首粒黑便排出时间,末次给药后 24 h 内各组大鼠的粪便粒数,以及粪便含水量。结果见表 3,模型组大鼠首粒黑便排出时间相比空白组显著延长( $P<0.01$ ),粪便粒数显著少于空白组( $P<0.01$ ),粪便含水量也显著低于空白组( $P<0.01$ )。与模型组比较,附子-肉桂高剂量组及中剂量组大鼠首粒黑便排出时间显著缩短( $P<0.01$ ),粪便粒数及含水量均增加( $P<0.01$ )。附子-肉桂低剂量组的首粒黑便排出时间缩短( $P<0.01$ ),粪便粒数及含水量相对模型组大鼠无显著性差异。同时,阳性药物空白组,即普芦卡必利组大鼠的首粒黑便排出时间显著减少( $P<0.01$ ),粪便粒数及含水量大于模型组( $P<0.01$ )。

观察各组大鼠粪便性状,根据布里斯托大便分类法进行评分,结果见表 4。其中,空白组大鼠粪便性状多为 3 分,属于正常粪便。模型组大鼠的粪便性状评分为 1~2 分,低于空白组( $P<0.05$ ),属于便秘。经中剂量或低剂量附子-肉桂治疗后,评分未有明显提高。经高剂量附子-肉桂及普芦卡必利( $P<0.05$ )治疗后,大鼠粪便性状评分提升至 2~3 分。以上结果说明,经高剂量附子-肉桂及普芦卡必利的治疗,大鼠便秘的症状得到明显改善。

表 3 各组大鼠首粒黑便排出时间,粪便粒数及含水量( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Time of first black stool discharge, number of stool particles and water content ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	首粒黑便排出时间/min	粪便粒数/个	粪便含水量/%
空白组		311.50±10.50	26.0±1.63	52.87±1.39
模型组		517.57±4.26 <sup>1)</sup>	9.67±0.47 <sup>1)</sup>	32.28±1.02 <sup>1)</sup>
附子-肉桂高剂量	2.6	346.33±7.24 <sup>2)</sup>	14.00±0.82 <sup>2)</sup>	47.53±0.98 <sup>2)</sup>
附子-肉桂中剂量	1.3	414.93±11.75 <sup>2)</sup>	13.67±0.47 <sup>2)</sup>	40.44±1.32 <sup>2)</sup>
附子-肉桂低剂量组	0.65	471.77±10.85 <sup>2)</sup>	11.67±0.94	35.43±1.46
普芦卡必利组	0.000 18	417.83±9.68 <sup>2)</sup>	17.00±0.82 <sup>2)</sup>	47.52±0.84 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ,与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表 5、表 7、表 8 同)

表 4 粪便性状布里斯托评分( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Bristow score for fecal traits( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	布里斯托评分
空白组		2.67±0.47
模型组		1.33±0.47 <sup>1)</sup>
附子肉桂高剂量组	2.6	2.33±0.47
附子肉桂中剂量组	1.3	1.33±0.47
附子肉桂低剂量组	0.65	1.33±0.47
普芦卡必利组	0.000 18	2.67±0.47 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$

### 3.3 附子-肉桂对大鼠肠道推进率的影响

与空白组比较,模型组大鼠的肠道推进率显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,附子-肉桂高剂量组及普芦卡必利组肠道推进率均显著增加( $P<0.01$ )。其余组别肠道推进率未有显著变化,且附子-肉桂的剂量越高,肠道推进率越高。见表 5。

表 5 各组大鼠肠道推进率( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Intestinal propulsion rate of rats in each group( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肠道推进率/%
空白组		67.66±3.66
模型组		39.49±2.85 <sup>1)</sup>
附子肉桂高剂量组	2.6	59.77±0.29 <sup>2)</sup>
附子肉桂中剂量组	1.3	48.10±3.37
附子肉桂低剂量组	0.65	41.03±3.32
普芦卡必利组	0.000 18	60.91±4.80 <sup>2)</sup>

### 3.4 附子-肉桂对结肠组织病理学形态的影响

空白组大鼠的结肠组织结构完整，固有层内大肠腺排列秘籍，杯状细胞数量较多，均未见明显病理改变。模型组结肠组织结构较完整，固有层内杯状细胞数量相比空白组显著减少，其他未见明显病理改变。与模型组比较，附子-肉桂低剂量及中剂量组结肠组织无显著改变。附子-肉桂高剂量组及普芦卡必利组结肠组织结构较完整，只见部分区域的杯状细胞数量减少，病变程度均得到改善。见图 1。在 200 倍镜下计数统计各组结肠组织的杯状细胞数量，结果显示模型组 ( $306.33\pm110.20$ ) 的杯状细胞数量显著少于空白组 ( $637.27\pm48.22$ ) ( $P<0.01$ )。与模型组对比，附子肉桂高剂量组 ( $505.33\pm58.53$ ) 及普芦卡必利组 ( $575.67\pm50.01$ ) 杯状细胞数量明显增多 ( $P<0.05$ )，其余组差异无统计学意义。见表 6。

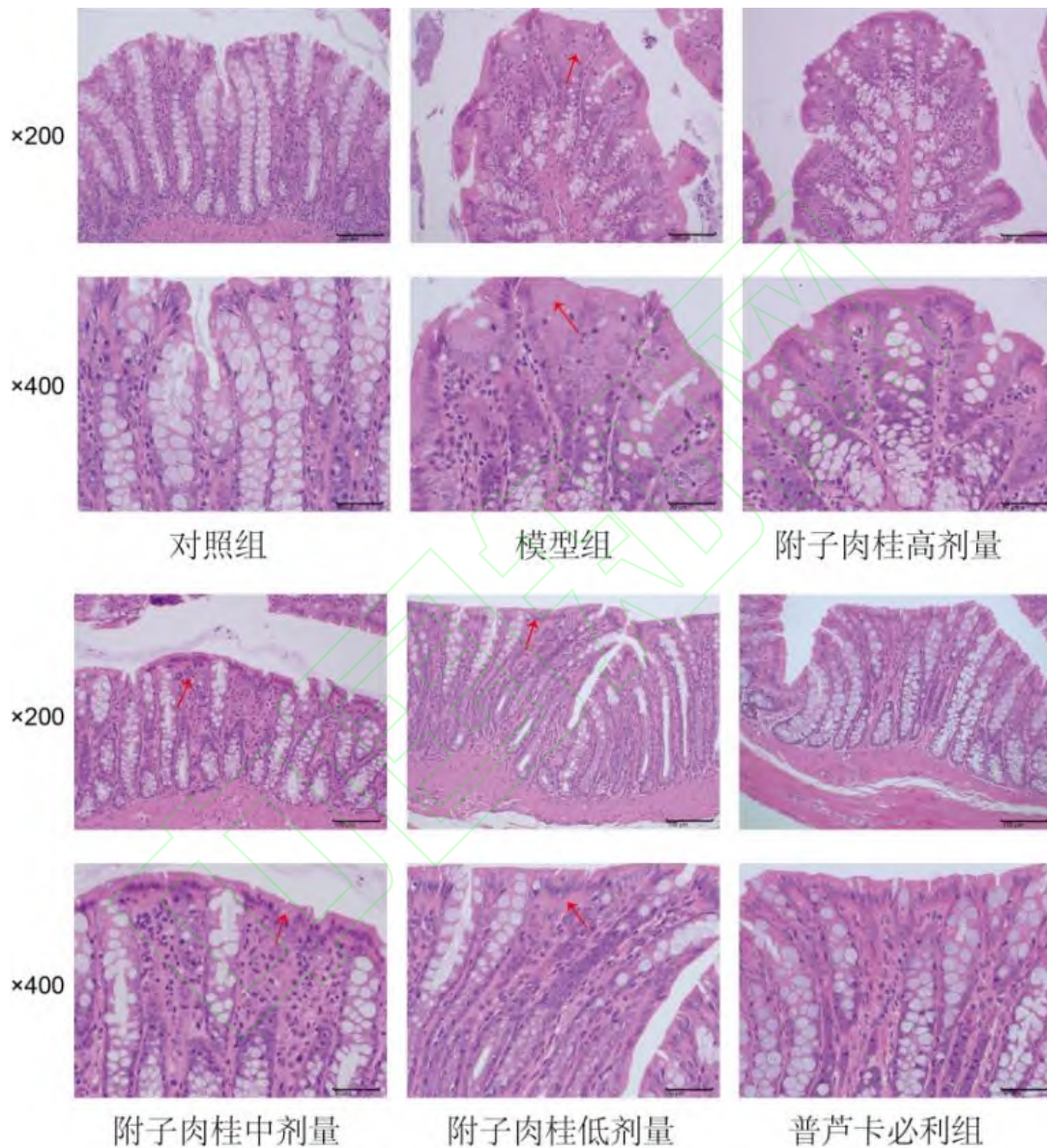


图 1 各组大鼠结肠组织病理形态观察 (HE, ↑ 表示杯状细胞减少)

Fig.1 Observation of histopathological morphology of colon in each group of rats (HE, ↑ indicates reduced cup cells)

表 6 杯状细胞数量统计结果 ( $\times 200$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Table 6 Statistical results of the number of cup-shaped cells( $\times 200$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	杯状细胞数量/个
空白组		$637.27\pm48.22$
模型组		$306.33\pm110.20^{1)}$
附子肉桂高剂量组	2.6	$505.33\pm58.53^{2)}$
附子肉桂中剂量组	1.3	$493.00\pm185.60$
附子肉桂低剂量组	0.65	$356.67\pm37.21$

普芦卡必利组	0.000 18	575.67±50.01 <sup>2)</sup>
--------	----------	----------------------------

注：与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ；与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$

### 3.5 附子-肉桂对结肠黏液分泌情况的影响

AB-PAS 染色是一种常见的特殊染色法，可用于显示中性黏液和酸性黏液，中性黏液显示红色，酸性黏液显示蓝色。空回肠、结肠含杯状细胞黏液为酸性，被染成蓝色<sup>[16]</sup>。各组大鼠结肠组织 AB-PAS 染色结果见图 2。肉眼观察到，模型组结肠组织染色区域远远小于空白组，经附子-肉桂的干预治疗后，染色区域随着剂量的增加而扩大。对图片内的杯状细胞数量进行计数，统计结果见表 7。模型组杯状细胞数量明显少于空白组（ $152.11 \pm 2.46$  vs  $67.56 \pm 1.90$ ,  $P < 0.01$ ）。与模型组比较，附子-肉桂及普芦卡必利的治疗，均显著提高了杯状细胞数量（ $P < 0.01$ ）。随着附子-肉桂的剂量增加，杯状细胞的数量也显著增加，呈剂量依赖性。

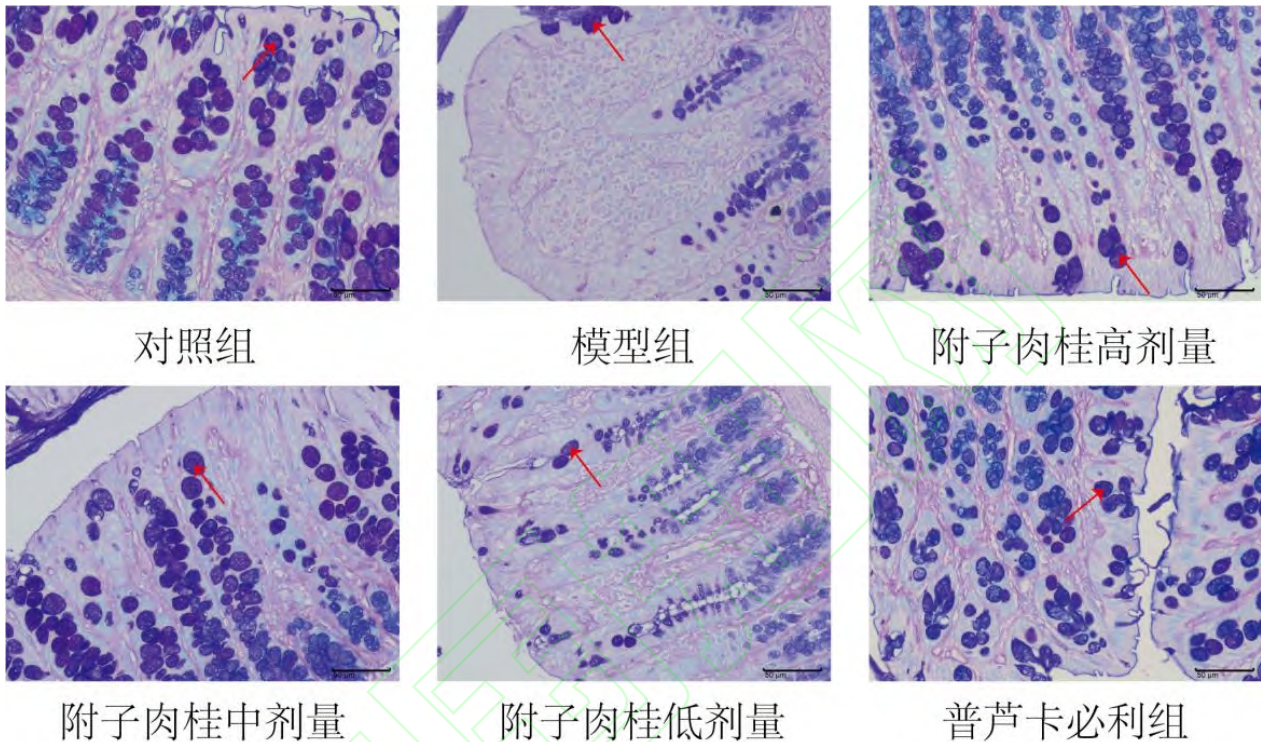


图 2 各组大鼠结肠组织黏液分泌情况（AB-PAS,  $\times 400$ ,  $\uparrow$  表示杯状细胞）

Fig.2 Mucus secretion in colonic tissue of rats in each group (AB-PAS,  $\times 400$ ,  $\uparrow$  indicates cup cells)

表 7 杯状细胞计数结果 ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 7 Statistical results of number of cup-shaped cells ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	杯状细胞数量/个
空白组		$152.11 \pm 2.46$
模型组		$67.56 \pm 1.90^{1)}$
附子肉桂高剂量组	2.6	$140.66 \pm 5.86^{2)}$
附子肉桂中剂量组	1.3	$96.00 \pm 7.69^{2)}$
附子肉桂低剂量组	0.65	$109.78 \pm 2.55^{2)}$
普芦卡必利组	0.000 18	$119.22 \pm 1.50^{2)}$

### 3.6 附子-肉桂对大鼠血清中血管活性肠肽水平的影响

模型组大鼠血清中血管活性肠肽含量为（ $13.44 \pm 0.52$ ） $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ，显著低于空白组（ $23.78 \pm 0.73$ ） $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ （ $P < 0.01$ ）。附子-肉桂治疗组及普芦卡必利治疗组大鼠血清中血管活性肠肽水平均显著高于模型组（ $P < 0.01$ ），随着附子-肉桂的剂量增加，血管活性肠肽水平越高。见表 8。

表 8 各组大鼠血清中血管活性肠肽水平（ $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ）

Table 8 Vasoactive intestinal peptide levels in the serum of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	血管活性肠肽浓度/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
空白组		$23.78 \pm 0.73$
模型组		$13.44 \pm 0.52^{1)}$



附子肉桂高剂量组	2.6	18.32±0.56 <sup>2</sup>
附子肉桂中剂量组	1.3	16.81±0.44 <sup>2</sup>
附子肉桂低剂量组	0.65	15.16±0.41 <sup>2</sup>
普芦卡必利组	0.000 18	20.49±0.46 <sup>2</sup>

### 3.7 附子-肉桂对结肠组织 AQP1、AQP3 及 AQP9 的 mRNA 表达水平的影响

荧光定量 PCR 实验检测结果显示见表 9, 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织中 AQP1 表达明显增加 ( $P<0.01$ ), AQP3 及 AQP9 表达明显降低 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 附子-肉桂高剂量组结肠组织 AQP1 表达量降低 ( $P<0.05$ ), AQP3 ( $P<0.01$ ) 及 AQP9 ( $P<0.05$ ) 表达量增加。附子-肉桂中剂量及低剂量组结肠组织水通道蛋白 mRNA 表达水平与模型组对比时, 无显著变化。普芦卡必利组结肠组织 AQP1 表达水平显著小于模型组、AQP3 及 AQP9 表达水平显著大于模型组 ( $P<0.01$ )。在肾脏组织中 (表 10), 模型组 AQP1 表达显著高于空白组 ( $P<0.01$ ), AQP3 及 AQP9 表达水平低于空白组 ( $P<0.05$ )。与模型组比较, 附子-肉桂高剂量组及普芦卡必利组的 AQP1 表达水平明显降低 ( $P<0.05$ ), AQP3 及 AQP9 表达水平明显增加 ( $P<0.05$ ), 附子-肉桂中剂量及低剂量组则差异无统计学意义。

表 9 各组大鼠结肠组织 AQP1、AQP3 及 AQP9 mRNA 表达水平 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 9 mRNA expression levels of AQP1, AQP3 and AQP9 in the colon tissues of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AQP1	AQP3	AQP9
空白组		1.03±0.30	1.01±0.18	1.00±0.08
模型组		2.38±0.40 <sup>1)</sup>	0.37±0.07 <sup>1)</sup>	0.40±0.08 <sup>1)</sup>
附子肉桂高剂量组	2.6	1.28±0.39 <sup>2)</sup>	0.77±0.05 <sup>2)</sup>	0.71±0.24 <sup>2)</sup>
附子肉桂中剂量组	1.3	1.40±0.61	0.59±0.10 <sup>2)</sup>	0.60±0.21
附子肉桂低剂量组	0.65	1.59±0.39	0.47±0.08	0.50±0.32
普芦卡必利组	0.000 18	1.17±0.08 <sup>3)</sup>	0.87±0.13 <sup>3)</sup>	0.85±0.08 <sup>3)</sup>

注: 与空白组比较 <sup>1)</sup>  $P<0.01$ ; 与模型组比较 <sup>2)</sup>  $P<0.05$ , <sup>3)</sup>  $P<0.01$

表 10 各组大鼠肾脏组织 AQP1、AQP3 及 AQP9 mRNA 表达水平 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 10 mRNA expression levels of AQP1, AQP3 and AQP9 in the kidney tissues of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AQP1	AQP3	AQP9
空白组		1.01±0.19	1.02±0.22	1.02±0.23
模型组		2.74±0.49 <sup>2)</sup>	0.35±0.17 <sup>1)</sup>	0.38±0.23 <sup>1)</sup>
附子肉桂高剂量组	2.6	1.42±0.14 <sup>3)</sup>	0.71±0.16 <sup>3)</sup>	0.70±0.18 <sup>3)</sup>
附子肉桂中剂量组	1.3	1.71±0.32	0.58±0.06	0.60±0.09
附子肉桂低剂量组	0.65	2.01±0.41	0.48±0.19	0.48±0.14
普芦卡必利组	0.000 18	1.15±0.12 <sup>4)</sup>	0.81±0.08 <sup>3)</sup>	0.83±0.07 <sup>3)</sup>

注: 与空白组比较 <sup>1)</sup>  $P<0.05$ , <sup>2)</sup>  $P<0.01$ ; 与模型组比较 <sup>3)</sup>  $P<0.05$ , <sup>4)</sup>  $P<0.01$

### 3.8 附子-肉桂对结肠组织及肾脏组织中 AQP1、AQP3、AQP9 蛋白表达的影响

免疫组化染色结果见图 3 和表 11, 模型组结肠 AQP1 蛋白表达水平显著高于空白组 ( $P<0.01$ ), AQP3 及 AQP9 表达水平显著低于空白组 ( $P<0.01$ )。经高剂量附子-肉桂或普芦卡必利治疗之后, AQP1 表达水平降低, 明显低于模型组 ( $P<0.01$ ), 而 AQP3 及 AQP9 则增加, 明显大于模型组 ( $P<0.01$ )。在肾脏组织中, 水通道蛋白表达的变化趋势与结肠相同, 见图 4 和表 12。与空白组比较, 模型组大鼠肾脏组织中 AQP1 蛋白表达显著增加 ( $P<0.01$ ), AQP3 和 AQP9 显著降低 ( $P<0.01$ )。高剂量附子-肉桂或普芦卡必利治疗后的肾脏组织中, AQP1 蛋白表达水平明显低于模型组 ( $P<0.01$ ), AQP3 及 AQP9 表达水平明显大于模型组 ( $P<0.01$ )。

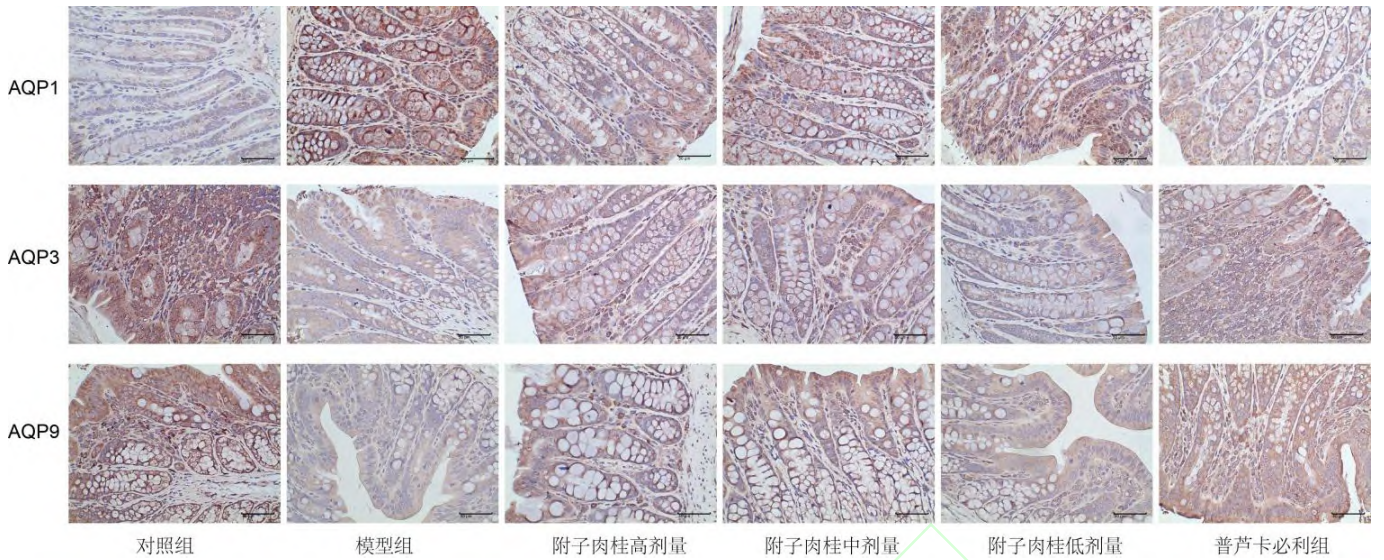


图3 免疫组化染色结肠组织水通道蛋白结果(×40)

Fig.3 Results of immunohistochemical staining of colonic tissue for aquaporins(×40)

表 11 免疫组化检测结肠组织各水通道蛋白的平均光密度值统计结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 11 Statistical results of immunohistochemical detection of mean optical density values of aquaporins in colonic tissues( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AQP1	AQP3	AQP9
空白组		0.183±0.012	0.329±0.020	0.340±0.012
模型组		0.266±0.009 <sup>1)</sup>	0.157±0.020 <sup>1)</sup>	0.128±0.011 <sup>1)</sup>
附子肉桂高剂量组	2.6	0.227±0.009 <sup>3)</sup>	0.260±0.008 <sup>3)</sup>	0.271±0.014 <sup>3)</sup>
附子肉桂中剂量组	1.3	0.245±0.008 <sup>2)</sup>	0.210±0.049 <sup>2)</sup>	0.245±0.014 <sup>3)</sup>
附子肉桂低剂量组	0.65	0.255±0.014	0.191±0.007	0.136±0.014
普芦卡必利组	0.000 18	0.205±0.002 <sup>3)</sup>	0.273±0.040 <sup>3)</sup>	0.290±0.026 <sup>3)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup> P<0.01; 与模型组比较<sup>2)</sup> P<0.05, <sup>3)</sup> P<0.01 (表 12 同)

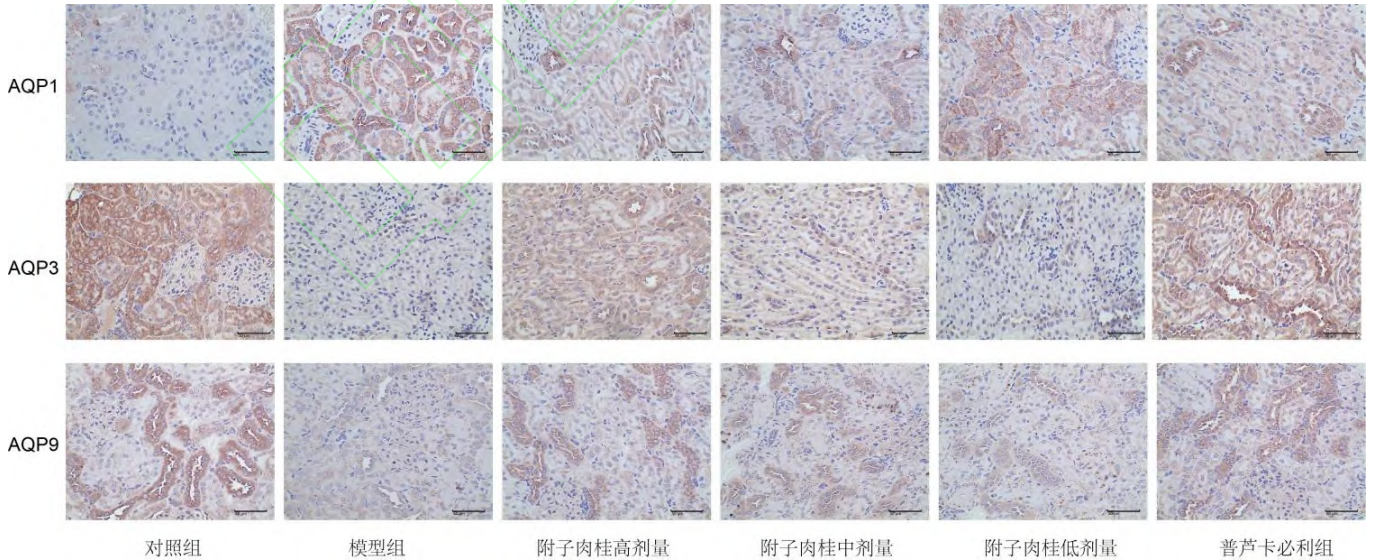


图4 免疫组化染色肾脏组织水通道蛋白结果(×40)

Fig.4 Results of immunohistochemical staining of kidney tissue for aquaporins(×40)

表 12 免疫组化检测肾脏组织各水通道蛋白的平均光密度值统计结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 12 Statistical results of immunohistochemical detection of mean optical density values of aquaporins in kidney tissues( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AQP1	AQP3	AQP9
空白组		0.128±0.012	0.303±0.019	0.279±0.011

模型组		0.329±0.046 <sup>1)</sup>	0.205±0.012 <sup>1)</sup>	0.210±0.006 <sup>1)</sup>
附子肉桂高剂量组	2.6	0.252±0.023 <sup>3)</sup>	0.251±0.011 <sup>3)</sup>	0.260±0.003 <sup>3)</sup>
附子肉桂中剂量组	1.3	0.260±0.010 <sup>2)</sup>	0.227±0.008 <sup>2)</sup>	0.239±0.016 <sup>3)</sup>
附子肉桂低剂量组	0.65	0.278±0.016 <sup>2)</sup>	0.202±0.006	0.231±0.006 <sup>2)</sup>
普芦卡必利组	0.00018	0.218±0.039 <sup>3)</sup>	0.286±0.012 <sup>3)</sup>	0.258±0.006 <sup>3)</sup>

### 3.9 附子-肉桂对大鼠结肠 cAMP、PKA 及 VIP 蛋白表达水平的影响

Western blot 检测结果显示,模型组结肠组织中 cAMP、PKA 及 VIP 蛋白表达水平均显著低于空白组( $P<0.01$ )。与模型组比较,附子-肉桂配伍高剂量组及普芦卡必利组 cAMP、PKA 及 VIP 蛋白表达水平均显著增高( $P<0.01$ )。见图 5 和表 13。

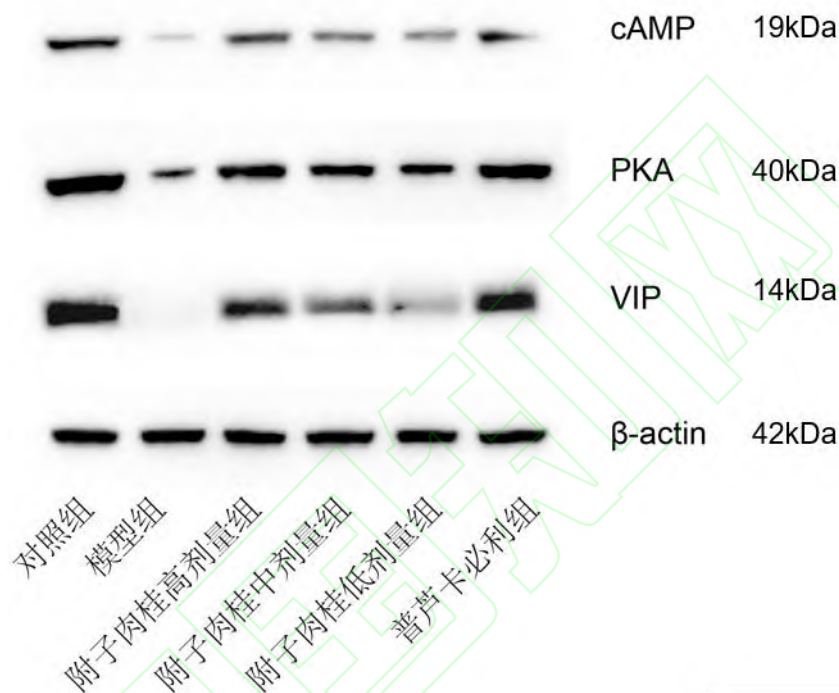


图 5 WB 检测结肠 cAMP、PKA 及 VIP 蛋白表达

Fig.5 WB detection of cAMP, PKA and VIP protein expression levels in the colon

表 13 各组大鼠结肠组织中 cAMP、PKA 及 VIP 蛋白表达统计结果( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 13 Statistical results of cAMP, PKA and VIP protein expression in colon tissues of rats in each group( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	cAMP	PKA	VIP
空白组		1.00±0.16	1.00±0.17	1.00±0.10
模型组		0.08±0.02 <sup>1)</sup>	0.18±0.06 <sup>1)</sup>	0.03±0.01 <sup>1)</sup>
附子肉桂高剂量组	2.6	0.46±0.08 <sup>3)</sup>	0.58±0.06 <sup>3)</sup>	0.29±0.11 <sup>3)</sup>
附子肉桂中剂量组	1.3	0.25±0.06 <sup>2)</sup>	0.49±0.06 <sup>3)</sup>	0.16±0.09
附子肉桂低剂量组	0.65	0.16±0.07	0.37±0.07 <sup>2)</sup>	0.07±0.34
普芦卡必利组	0.000 18	0.57±0.11 <sup>3)</sup>	0.78±0.12 <sup>3)</sup>	0.63±0.07 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P<0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P<0.01$

## 4 讨论

STC 是一种复杂的特发性疾病,具体发病机制尚不清楚。主要由肠道运动障碍及水液代谢紊乱引起,使得肠道内容物转运缓慢,水分吸收增加,排便次数减少,大便干燥和硬结<sup>[17]</sup>。近年来,全球慢性便秘的发病率都在逐年增加,尽管有多种治疗方法,但疗效不佳和不良反应的现象仍然普遍存在<sup>[18-20]</sup>。STC 严重影响着患者的生活质量和心理健康,探索更多治疗 STC 的方法尤为重要。STC 属于中医学“便秘”范畴,最早见于《黄帝内经》,谓之“大便难”“大肠结”,历代医家所论“阴结”“脾约”等与其概念相当。研究发现阳虚型为 STC 的常见证型之一<sup>[21]</sup>。中医学认为人以阳气为本,大肠作为机体的一部分,阳气维持其传导功能的重要条件,阳

气不足，气化无力，津液内停，阴寒留滞、凝结不通而发为便秘。温阳散寒类方药可通过振奋阳气，恢复气化功能，津液得以温化而通利大便。附子性烈，长于回阳救逆，散寒止痛；肉桂性缓，长于暖下焦而温肾阳，并引火归元。王志荣<sup>[4]</sup>发现，附子丁香散加味穴位贴敷治疗可以有效改善阳虚型 STC 患者的症状，同时改善阳虚型 STC 大鼠的肠道功能。李智辉<sup>[11]</sup>证明，桂附汤（附子配伍肉桂）对于肾阳虚小鼠具有良好的疗效，且呈剂量依赖性。本研究通过盐酸洛哌丁胺联合冰水灌胃法建立阳虚型便秘大鼠模型<sup>[13]</sup>，并通过附子-肉桂配伍干预阳虚型 STC 大鼠，以探究附子-肉桂配伍治疗阳虚型 STC 大鼠的作用。实验结果证明，经附子-肉桂配伍治疗的阳虚型 STC 大鼠，首粒黑便排出时间缩短，粪便粒数及含水量增加，布里斯托性状评分及肠道推进率提高，证明附子-肉桂配伍对阳虚型 STC 大鼠的便秘症状有所改善。

肠道杯状细胞是一类特化肠上皮细胞，可以分泌碱性液体，保护结肠粘膜，从而帮助顺利排便<sup>[5]</sup>。若杯状细胞减少或功能异常，则会导致黏液屏障功能障碍，从而引起便秘等多种疾病<sup>[22]</sup>。HE 染色结果观察到，与模型组大鼠对比，附子-肉桂配伍可以有效减轻阳虚型 STC 大鼠结肠组织的病变程度，抑制杯状细胞减少的现象。AB-PAS 染色结果也显示，相比模型组，附子-肉桂配伍治疗后的大鼠结肠组织内杯状细胞数量显著增加。提示附子-肉桂配伍能够减轻阳虚型 STC 大鼠结肠的病变，改善杯状细胞的分泌功能，促进肠液分泌，并且附子-肉桂配伍的剂量越大促进效果越明显。

VIP 是一种抑制性神经递质和肠肽类激素，具有调节肠道水液代谢平衡的作用。当 VIP 含量降低，可能会引起结肠过度的阶段性蠕动，从而引起便秘<sup>[23]</sup>。多项研究表明，STC 患者或大鼠的肠道中 VIP 的表达明显下降<sup>[10, 24-25]</sup>。本研究结果显示，模型组大鼠 VIP 含量显著低于空白组，经附子-肉桂配伍治疗后 VIP 含量大于模型组，附子-肉桂配伍的剂量越大，VIP 含量越高。提示附子-肉桂配伍促进肠道黏液分泌的作用可能与 VIP 含量增加有关。而现有研究表明 VIP 可以通过影响肠道上皮细胞 AQP<sub>s</sub> 的表达，从而调节肠道水液代谢平衡<sup>[8]</sup>。

AQP<sub>s</sub> 是一类位于细胞膜上的膜通道蛋白家族<sup>[26]</sup>，可以吸收或分泌结肠水分，是参与肠道水液代谢的重要结构蛋白，与便秘的发生发展过程息息相关<sup>[27-28]</sup>。“肾主水”在维持机体内水液代谢方面起着主导作用，水通道蛋白广泛分布于肾脏的不同节段和细胞<sup>[29]</sup>。肾主水，司二便，当肾阳不足时，阳虚则寒，阴寒内结，大肠传导失常则便秘<sup>[30]</sup>。当“肾主水”功能异常时，常与肾脏 AQP<sub>s</sub> 异常表达密切相关<sup>[31]</sup>。因此，通过 PCR 及免疫组化实验分别检测了肾脏组织及结肠组织中 AQP<sub>s</sub> 表达水平。其中 AQP1 在食管到结肠整个消化道均有表达，赵兵等<sup>[32]</sup>研究显示，大鼠近端结肠 AQP1 的表达增高，使得结肠吸收水分，引起排便困难，导致慢传输便秘的发生。我们的实验结果显示，模型组大鼠肾脏及结肠组织中 AQP1 表达明显大于正常空白组，附子-肉桂配伍高剂量治疗组及普芦卡必利组可以降低 STC 大鼠 AQP1 的表达水平。AQP3 在多种便秘动物模型中均出现表达升高的情况<sup>[33-35]</sup>，也有研究证明，部分便秘动物结肠组织中 AQP3 表达低于空白组<sup>[36, 37]</sup>，AQP3 介导的水分子通道可能存在双向调节或代偿性表达的效应<sup>[38]</sup>。AQP9 主要参与肠道的分泌功能，便秘患者的结肠组织中存在 AQP9 低表达情况，使得黏液分泌减少从而导致大便排出困难<sup>[39-40]</sup>。本次实验结果显示，阳虚型 STC 大鼠结肠及肾脏组织中 AQP3 和 AQP9 的表达水平均低于空白组，高剂量附子-肉桂配伍治疗后则明显提高 AQP3 及 AQP9 表达水平。提示高剂量附子-肉桂配伍可能是通过调节 STC 大鼠肾脏和结肠组织水通道蛋白的表达，从而调节水液代谢平衡，促进了肠液分泌改善便秘。

cAMP 可以介导多种生物学过程，当细胞内 cAMP 含量增加时，可以促进 cAMP 依赖性 PK 的活化，进而调节新陈代谢<sup>[24]</sup>。VIP 与特异性受体作用后，可以激活 cAMP-PKA 信号通路，从而引起平滑肌舒张，调节水通道蛋白表达，发挥重要的生物效应<sup>[9, 41-42]</sup>。周永学等<sup>[10]</sup>研究证实，硝菝通结方通过干预 VIP/cAMP/PKA/AQP3 通路调节胃肠动力和改善水液代谢，从而治疗功能性便秘。从丽敏<sup>[43]</sup>的实验发现，VIP 通过提高 cAMP/PKA 通路蛋白表达，促进 AQP3 的表达水平，从而改善便秘的症状。王璐等<sup>[25]</sup>的结果证明，助阳通便膏可以通过提高结肠组织中 VIP/CAMP/PKA/AQP3 通路表达水平治疗 STC。本实验 Western blot 结果显示，模型组结肠组织中 cAMP、PKA 及 VIP 蛋白表达水平均显著低于空白组，高剂量附子-肉桂治疗组及普鲁卡比例治疗组 cAMP、PKA 及 VIP 蛋白表达水平均显著大于模型组。提示高剂量附子-肉桂配伍可能是通过调节 VIP/cAMP/PKA/AQP<sub>s</sub> 通路，改善阳虚型慢传输便秘大鼠的症状。

综上所述，高剂量的附子-肉桂配伍可以提高阳虚型便秘大鼠血清 VIP 含量，降低肾脏和结肠 AQP1 表达水平，增加肾脏和结肠 AQP3、AQP9 及结肠 cAMP、PKA 及 VIP 表达水平。由此可见，高剂量附子-肉桂配伍通过上调 VIP/cAMP/PKA/AQP<sub>s</sub> 通路，从而提高肠道动力，平衡肠道水液代谢，增加阳虚型 STC 大鼠肠道推进率及粪便含水量，从而改善大鼠便秘症状。本研究可为临床应用温阳方药治疗阳虚型慢传输便秘提供一

定的选择及实验依据。

**[利益冲突]** 本文不存在任何利益冲突。

#### **[参考文献]**

- [1] SUN Y, YAN C, JIN S, et al. Curative effect and mechanism of guiren runchang granules on morphine-induced slow transit constipation in mice[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5493192.
- [2] TILLOU J, POYLIN V. Functional Disorders: Slow-Transit Constipation[J]. *Clin Colon Rectal Surg*, 2017, 30(1): 76-86.
- [3] 王盼盼, 张小元. 基于开阖枢理论探讨脾肾阳虚型便秘的辨治[J]. *中国民间疗法*, 2022, 30(19): 29-31.
- [4] 王志荣. 附子丁香散加味穴位贴敷治疗阳虚型 STC 的临床观察和实验研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [5] 周永学, 王郁金, 张红, 等. 血管活性肠肽对便秘大鼠排便及结肠组织中 VIP-cAMP-PKA-AQP3 信号通路的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2016, 41(11): 1175-1180.
- [6] BAINS M, LANEY C, WOLFE A E, et al. Vasoactive Intestinal Peptide Deficiency Is Associated With Altered Gut Microbiota Communities in Male and Female C57BL/6 Mice[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2689.
- [7] 叶俊雯. 建中活血行气汤对慢传输型便秘大鼠的疗效及作用机制研究[D]. 重庆: 西南医科大学, 2018.
- [8] IKARASHI N, MOCHIDUKI T, TAKASAKI A, et al. A mechanism by which the osmotic laxative magnesium sulphate increases the intestinal aquaporin 3 expression in HT-29 cells[J]. *Life Sci*, 2011, 88(3-4): 194-200.
- [9] 杨清瑞, 胡泽玉, 雷玉玉, 等. 基于 5-羟色胺信号通路探讨中医药辨证治疗腹泻型肠易激综合征的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20232291.
- [10] 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.
- [11] 李智辉. 附子配伍肉桂对肾阳虚小鼠治疗的实验研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2008.
- [12] 张远哲, 黎豫川, 赵罗娜. 附子-肉桂对慢传输型便秘大鼠 5-HT 信号通路及 c-Kit 表达的影响[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2023, 25(3): 1111-1121.
- [13] 范明明, 林伟, 韩海瑞, 等. 慢传输型便秘动物模型构建方法的研究进展[J]. *广西医学*, 2022, 44(14): 1657-1660.
- [14] JARUVONGVANICH V, PATCHARATRAKUL T, GONLACHANVIT S. Prediction of Delayed Colonic Transit Using Bristol Stool Form and Stool Frequency in Eastern Constipated Patients: A Difference From the West[J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2017, 23(4): 561-568.
- [15] 王亚文. 桑叶提取物对豚鼠离体肠肌及洛哌丁胺所致便秘大鼠肠道功能的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [16] 邓振旭, 楚德昌. 消化道组织块黏液细胞的组织化学染色[J]. *生物技术*, 2007, 17(6): 41-43.
- [17] ZHANG D, ZHU A. Pathogenesis and treatment of slow transit constipation[J]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2016, 19(12): 1447-1450.
- [18] Guidelines--Rome III Diagnostic Criteria for Functional Gastrointestinal Disorders[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2006, 15(3): 307-312.
- [19] MUGIE S M, BENNINGA M A, DI LORENZO C. Epidemiology of constipation in children and adults: a systematic review[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(1): 3-18.
- [20] BHARUCHA A E, PEMBERTON J H, LOCKE G R 3rd. American Gastroenterological Association technical review on constipation[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(1): 218-238.
- [21] 顾尽晖, 史仁杰. 慢性功能性便秘从肾阳虚论治[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2010, 12(10): 99-101.
- [22] 刘莹, 侯晓华, 宋军. 消除对肠杯状细胞的"刻板印象"—肠杯状细胞的研究进展[J]. *临床消化病杂志*, 2023, 35(2): 159-163.
- [23] 程晓雯, 林中, 郑清华, 等. 重症急性胰腺炎伴胃肠动力障碍大鼠结肠黏膜下血管活性肠肽神经元的变化[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(2): 183-187.
- [24] 武云朋. 舒肝解郁胶囊对功能性便秘大鼠胃肠动力学及肠神经递质 VIP、cAMP、AQP3 影响机制的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021.
- [25] 王璐, 隋楠. 基于大肠生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, 277-278.
- [26] HE J, YANG B. Aquaporins in Renal Diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 366.
- [27] 马雪巍, 刘传佳, 唐学贵. 增液汤对慢传输型便秘大鼠结肠 AQP9 的影响及血清中 5-HT 的表达变化[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(4): 125-129, 后插 11.

- [28] 杜丽娟, 占煜, 吴至久, 等. 大黄对便秘大鼠肠动力及结肠水通道蛋白 3 表达的调节作用[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(4): 873-875.
- [29] 王沐晨, 单思, 刘红宁. 水通道蛋白与“肾主水”理论的关系探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18): 205-212.
- [30] 梁星琛, 周永学, 张小波. 基于“肾主水司二便”探讨硝菴通结方对功能性便秘大鼠水通道蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(1): 57-60.
- [31] 刘娇, 陈明, 陈鑫, 等. 从水通道蛋白诠释“肾主水”的现代科学内涵[J]. 山东中医杂志, 2021, 40(8): 884-889.
- [32] 赵兵, 孔鹏飞, 吴至久, 等. AQP1 在慢传输型便秘发病过程中的作用机制探讨[J]. 川北医学院学报, 2014, 29(6): 527-530.
- [33] LIU W, ZHI A. The potential of Quercetin to protect against loperamide-induced constipation in rats[J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(6): 3297-3307.
- [34] CONG L, DUAN L W, SU W P, et al. Efficacy of high specific volume polysaccharide-A new type of dietary fiber - on molecular mechanism of intestinal water metabolism in rats with constipation[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 5028-5035.
- [35] 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.
- [36] TAN Q, HU J, ZHOU Y, et al. Inhibitory Effect of Lactococcus lactis subsp. lactis HFY14 on Diphenoxylate-Induced Constipation in Mice by Regulating the VIP-cAMP-PKA-AQP3 Signaling Pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 1971-1980.
- [37] ZHAN Y, TANG X, XU H, et al. Maren Pills Improve Constipation via Regulating AQP3 and NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Slow Transit Constipation In Vitro and In Vivo[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9837384.
- [38] 储正达, 蔡彬. 肠道水通道蛋白与便秘的相互关系[J]. 现代消化及介入诊疗, 2023, 28(1): 117-121.
- [39] ZHU C, CHEN Z, JIANG Z. Expression, Distribution and Role of Aquaporin Water Channels in Human and Animal Stomach and Intestines[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1399.
- [40] 杨会锋, 袁维堂. 水通道蛋白 3 和水通道蛋白 9 在结肠黏膜的表达及意义[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(6): 12-14, 封 4.
- [41] EL HALAWANI M E, PITTS G R, SUN S, et al. Active immunization against vasoactive intestinal peptide prevents photo-induced prolactin secretion in turkeys[J]. Gen Comp Endocrinol, 1996, 104(1): 76-83.
- [42] HALIMI F, PIOT O, GUIZE L, et al. Electrophysiological effects of vasoactive intestinal peptide in rabbit atrium: a modulation of acetylcholine activity[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(1): 37-44.
- [43] 丛丽敏. 益生菌联合膳食纤维改善便秘[D]. 大连: 大连医科大学, 2016.