

槐黄丸对慢传输型便秘大鼠结肠神经递质及SCF/c-kit通路的影响*

刘 颖, 常 有**, 李祥永, 孟 君

(南京中医药大学连云港附属医院 连云港 222000)

摘 要:目的 探讨槐黄丸对慢传输型便秘(STC)大鼠的作用及其对结肠组织神经递质和干细胞因子/酪氨酸激酶受体(stem cell factor / kit proto-oncogene, SCF/c-kit)通路的影响。方法 将60只SD大鼠随机分为正常组、模型组、槐黄丸低剂量组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、槐黄丸中剂量组($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、槐黄丸高剂量组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、莫沙必利组($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组10只。除正常组外,其他组别均对大鼠进行大黄灌胃处理模拟STC造模,并以相应药物浓度给药。给药2周后,测量24 h首次排便时间、6 h排便粒数及粪便含水量、干重和肠道推进率。采用酶联免疫反应法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测大鼠结肠P物质(Substance P, SP)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)、一氧化氮(Nitric Oxide, NO)、血管活性肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)的含量。RT-PCR法检测大鼠结肠c-kit和SCF的mRNA水平。Western blot检测大鼠结肠c-kit和SCF的蛋白水平。结果 与正常组比较,模型组大鼠首次排便时间明显延长,排便粒数及干重、粪便含水量明显减少,肠道推进率降低,SP、Ach含量降低,VIP、NO含量增高,SCF和c-kit的表达降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,槐黄丸低、中、高剂量组能缩短首次排便时间,6 h排便粒数及干重、粪便含水量明显增高,肠道推进率增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与槐黄丸低、中剂量组相比,槐黄丸高剂量组缓解STC的效果最佳,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 槐黄丸对慢传输型便秘大鼠有明显的改善作用,其机制可能与调控结肠神经递质,提高SCF/c-kit信号通路有关。

关键词:槐黄丸 慢传输型便秘 神经递质 SCF/c-kit 大鼠

doi: 10.11842/wst.20210623014 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是最常见的慢性便秘类型,以结肠活动性下降、传输时间延长引起的不经常排便和硬便为主要特征^[1]。除引起排便困难外,STC也会导致腹胀、抑郁,甚至结肠癌或脑血管等疾病^[2]。STC病因复杂,目前其潜在的病因及发病机制并不完全明确,其发病率呈现逐年上升的趋势。有研究表明,其发生可能与肠平滑肌、肠激素、神经系统和神经递质等相关^[3-4]。临床上虽有多种治疗药物和治疗方式,但仍然存在疗效不佳和不良反应等问题,因此,寻找STC的替代疗法对患者具有重要

意义。

研究显示,中医药、中药贴敷等手段对STC的治疗取得了一定的疗效。槐黄丸是我院中药制剂,由槐角、大黄、枳壳、杏仁等9味药组成,具有收敛、清热、止血、润肠通便等功效。临床上用于内痔出血、肠炎等。然而,槐角丸治疗慢传输型便秘的治疗效果及潜在机制仍未报道。其中,槐角主要有效成分为黄酮及异黄酮类化合物,有凉血止血、清肝明目的功能^[5]。临床上以槐角为原料药用以治疗冠心病、高血压等^[6]。最新研究表明,槐角还有抗氧化及抗肿瘤的功^[7-8]。我们

收稿日期:2021-06-23

修回日期:2022-02-15

* 江苏省中医药局科技项目(YB2015118):朱氏润肠方对慢传输型便秘(STC)模型水蛋白(AQP)3、8调节的研究,负责人:孟君。

** 通讯作者:常有,副主任中医师,主要研究方向:中医肛肠外科相关研究。

在前期实验中已发现医院制剂朱氏润肠方可以通过 AQP3、AQP8 的表达水平来改善 STC 症状^[9]。在临床治疗中,我们也进一步发现槐黄丸对便秘患者也有显著改善作用,效果与朱氏润肠方相当,并且依赖作用更低。枳壳和杏仁为两者共有成分,其余几味药材则不同。枳壳被报道可以改善大鼠胃肠动力障碍,推动肠道运动,促进结肠水通道蛋白 AQP3, AQP5 等表达,并且还有抗结肠肿瘤的药效^[10-11]。杏仁则可以止咳平喘,润肠通便,还用于缓解肝气犯胃,痰阻食滞,气郁化火所致胃脘疼痛、腹胀便秘、恶心呕吐等^[12]。因此,为进一步探究不同组分的中药制剂对慢传输型便秘的作用以及作用机制,本文通过建立大黄结肠致泻导致的慢传输型便秘模型,研究槐黄丸对慢传输型便秘的治疗效果及其作用机制,为临床应用槐黄丸治疗 STC 提供依据。具体研究流程见下图(图1)。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

槐黄丸(连云港市中医院制剂室,批号:20200401、20210115),处方比例:麻子仁 200 g,生地黄 100 g,杏仁 100 g,枳壳 120 g,厚朴 60 g,白花蛇舌草 150 g,决明子 200 g,肉苁蓉 150 g,白芍 150 g,粉碎成

细粉,过筛,混匀,每 100g 粉末用炼蜜 130-150 g 制成大蜜丸,大蜜丸每丸重 9 g;枸橼酸莫沙必利片(成都康弘药业集团股份有限公司,50413);印度墨水(大连美伦生物技术有限公司,MB9903-1)、SP(BH4125)、Ach(BH4870)、VIP(BH4125)、NO(BH4841)ELISA 试剂盒均购自上海恪敏生物技术有限公司;SCF 抗体(ab64677)、c-kit 抗体(ab25022)、GAPDH 抗体(ab9485)、羊抗兔二抗(ab6795)均购自美国 Abcam 公司。

1.2 主要仪器与设备

5427R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);A48141 VeritiPro PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司);Western SDS-Page 电泳仪(美国 BIORAD 公司);低温高通量组织匀浆机(上海净信实业发展有限公司)。

1.3 动物

成年健康雄性 Wistar 大鼠共 60 只,体质量约 200 g,由南通大学动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(苏)2014-0001。

1.4 STC 大鼠造模和给药

将 60 只大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、槐黄丸方低剂量组、槐黄丸中剂量组、槐黄丸高剂量组和莫沙必利组,每组各 10 只。除正常组外,其余

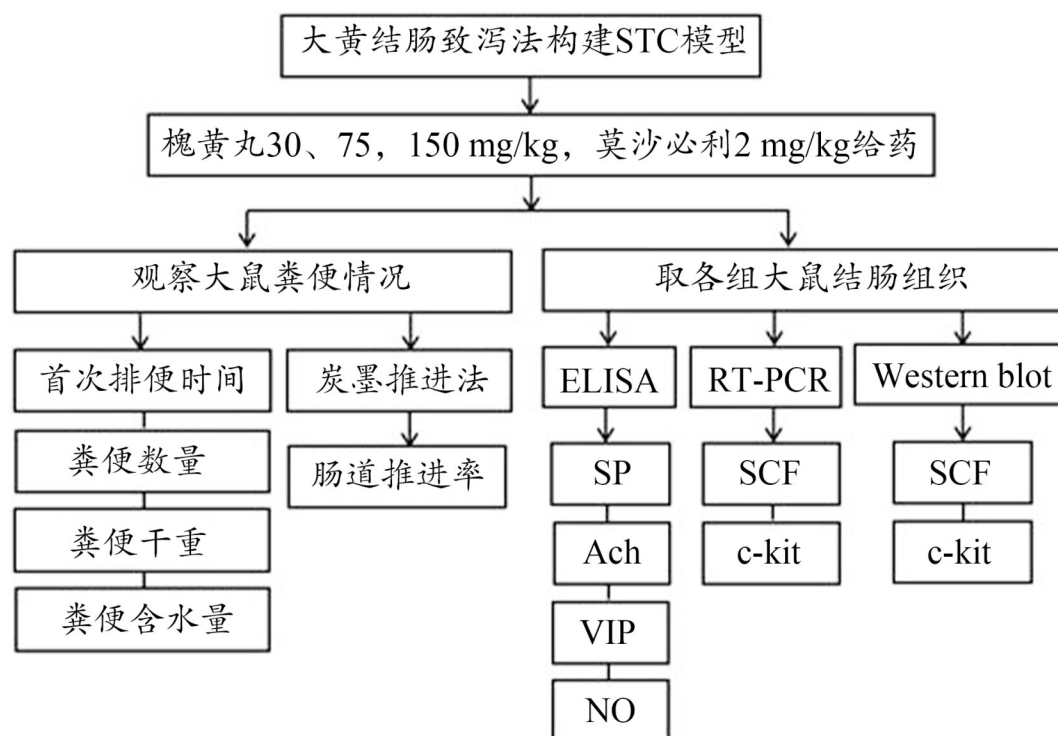


图1 本研究流程图

组别采用大黄结肠致泻法构建STC大鼠模型,以灌胃方式给予大鼠大黄悬浊液(首次剂量:150 mg/kg/天),之后按150 mg/kg/天逐渐递增,当50%大鼠开始出现腹泻症状,继续维持该给药剂量到80%的大鼠腹泻症状消失,以此为一个循环。随后再以150 mg/kg/天递增,重复3个循环。该末期剂量给予大鼠灌胃1周后,发现大鼠精神状态差,活跃度下降,粪便为偏硬的干结块状,即模型构建成功^[13]。在模型成功后,槐黄丸低剂量组、槐黄丸中剂量组、槐黄丸高剂量组、莫沙必利组大鼠分别以灌胃方式给予槐黄丸30、75、150 mg·kg⁻¹,莫沙必利2 mg·kg⁻¹。正常组和模型组给予等量生理盐水。以上药物每天给药一次,连续2周。

1.5 进食情况

按照1.4构建STC模型并给药两周后,录像并记录各组大鼠24 h内进食量和进食次数。将大鼠单独置于饲养笼内,24 h后取出大鼠,称重剩余饲料计算大鼠进食量和进食次数并记录,并对大鼠进行称重记录。进食量=初始食物量-24h后食物量。

1.6 粪便情况

包括首次排便时间、粪便数量、粪便含水量、粪便干重。记录造模后和治疗后各组大鼠首次排便时间。收集24 h内大鼠粪便,记录粒数。称量大鼠粪便总质量后将粪便放入烘箱中烘干,2 h后取出并称重粪便干重。粪便含水量=(总质量-干重)/总质量。

1.7 炭墨推进法检测肠道推进率

各组大鼠造模及给药后,严禁进食,自由饮水维持12 h。取墨水0.5 mL,灌胃处理。30 min后处死上述大鼠(颈椎脱臼法)。将全部肠道取出,摆直后测量墨汁在肠道中的长度和肠道全长,计算墨汁推进距离占肠道全长的百分比。肠道推进率(%)=(墨汁推进长度/肠道全长)×100。

1.8 ELISA法检测大鼠结肠组织中SP、ACh、VIP、NO含量

取100 mg各组大鼠的结肠组织,使用预冷的PBS清洗3次,剪成细碎小块,置于组织匀浆机中,得组织匀浆。离心后(14 000 r·min⁻¹)取上清液。按照ELISA试剂盒说明书操作分别检测各种大鼠结肠上清液中SP、ACh、VIP、NO含量。

1.9 RT-PCR法检测大鼠结肠组织中SCF、c-kit的mRNA水平

按照方法“1.7”得到组织匀浆后,各组加入1 mL

trizol裂解液提取RNA。使用紫外分光光度计检测各组RNA浓度,按照反转录试剂盒说明书操作将总RNA反转录合成cDNA。反应条件:95℃预变性30 s后开始PCR循环体系:95℃变性5 s,60℃退火30 s,共循环42次。以GAPDH为内参,采用2- $\Delta\Delta C_t$ 法计算SCF、c-kit的mRNA水平。引物均由南京拜睿生物科技有限公司合成,引物序列:SCF: F: 5'-GACCTCGTGGCATGTATGGA-3', R: 5'-TTCCTAAGGGAAGTGGCTGCA-3'; c-kit: F: 5'-GCATTTAAAGGTAACAGCAAAGAGC-3', R: 5'-GGAAGCTGCGTTGGGTCTAT-3'; GAPDH: F: 5'-GCGAGATCCCGCTAACATCA-3', R: 5'-CTCGTGGTTCACACCCATCA-3'。

1.10 Western blot法检测大鼠结肠组织中SCF、c-kit的蛋白水平

按照方法“1.7”得到组织匀浆后,各组加入1 mL RIPA组织蛋白裂解液,离心后(14 000 r·min⁻¹)取上清液。采用BCA法检测组织蛋白浓度。配置所需蛋白量,用3X Loding buffer稀释样品后,煮沸灭活,冷却至室温。30 μ g蛋白上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,湿法电转将蛋白转移至PVDF膜上,5%的脱脂奶粉室温封闭2 h,加入SCF(1:1 000)、c-kit(1:1 000)、GAPDH(1:10 000)一抗,4℃摇床孵育过夜。取出后,用TBST洗涤PVDF膜3次,5 min/次,室温摇床孵育相应二抗(1:5 000)2 h。用TBST洗涤PVDF膜3次,5 min/次。置于增强型化学发光凝胶成像系统曝光。

1.11 统计学方法

采用SPSS 18.0软件对实验数据进行统计学处理,数据均以均数±标准差()表示。计量资料进行方差齐性检验及正态性检验。若满足方差齐性及正态性,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD-t检验;若不满足,则使用非参数检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 槐黄丸对STC模型大鼠体质量、进食量、进食次数、排便数量、粪便湿重、干重及肠道推进率的影响

与正常组大鼠比较,模型组与给药组大鼠体质量、进食量和进食次数的观察表明(表1),模型组大鼠体质量(340.32±11.17 g)相较于正常组(320.32±9.38

g)有显著提升,而低、中、高剂量槐黄丸组和莫沙必利组大鼠体质量(336.29±9.81 g, 331.64±6.31 g, 324.88±7.72 g, 317.44±8.39 g)依次下降并可以恢复至与正常组相比无显著差异($P>0.05$)。六组大鼠进食量和进食次数均无显著差异($P>0.05$),以上结果表明槐黄丸对于大鼠进食无显著影响(表1)。

在此前提下,模型组大鼠首次排便的时间(129.27±14.27 min)延长,粪便数量(206.2±14.58粒)减少,粪便含水量(51.36±2.73%)降低、干重(0.23±0.03 g)降低,肠道推进率(53.35±2.97%)下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比,低、中、高剂量槐黄丸组和莫沙必利组大鼠首次排便的时间(105.43±9.62 min, 82.32±6.58 min, 69.58±5.32 min, 59.14±5.18 min)缩短,粪便总量(218.7±13.11粒、231.6±15.62粒、257.6±15.14粒、265.9±17.38粒)增加,粪便水分(54.50±4.37%、59.66±5.34%、62.75±4.96%、67.22±6.14%)、干重(0.28±0.25 g、0.37±0.29 g、0.40±0.27 g、0.53±0.02 g)均增加,且光滑软便量增多,肠道推进率(55.17±2.13%、58.87±2.56%、64.26±4.23%、68.35±4.59%)升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与低和中剂量槐黄丸组相比,高剂量槐黄丸组小鼠粪便及肠道推进率等指标好转更为显著,差异有统计学意义($P<0.05$)。并且与莫沙必利组相比,高剂量槐黄丸组小鼠粪便及肠道推进率等指标改善水平相差不大,差异无

统计学意义($P>0.05$)。以上结果表明不同剂量的槐黄丸均能促进STC大鼠的排便,并且高剂量槐黄丸组可以显著促进STC大鼠的排便(表2)。

2.2 槐黄丸对STC模型大鼠结肠SP、Ach、VIP、NO水平的影响

与正常组相比,模型组大鼠STC结肠中SP(130.32±14.17 ng·L⁻¹)以及Ach(294.51±7.73 ng·L⁻¹)含量显著下降,VIP(109.55±6.83 ng·L⁻¹)以及NO(43.75±4.59 ng·L⁻¹)含量显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比,低、中、高剂量槐黄丸组及莫沙必利组中SP(153.24±13.46 ng·L⁻¹、165.67±14.49 ng·L⁻¹、180.58±11.13 ng·L⁻¹、187.45±13.55 ng·L⁻¹)和Ach(300.43±9.38 ng·L⁻¹、343.16±9.65 ng·L⁻¹、389.54±10.21 ng·L⁻¹、401.43±10.76 ng·L⁻¹)含量均上升,VIP(97.34±5.33 ng·L⁻¹、91.24±5.16 ng·L⁻¹、81.33±4.87 ng·L⁻¹、85.29±3.26 ng·L⁻¹)以及NO(39.56±3.25 ng·L⁻¹、36.21±4.01 ng·L⁻¹、32.35±3.56 ng·L⁻¹、30.57±2.37 ng·L⁻¹)含量均下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。与低、中剂量槐黄丸组相比,高剂量槐黄丸组SP、Ach含量上升以及VIP、NO含量下降最为显著,差异有统计学意义($P<0.05$)。并且与莫沙必利组相比,高剂量槐黄丸组中的SP、Ach、VIP、NO含量无显著差异,差异无统计学意义($P>0.05$)。以上结果表明槐黄丸能影响STC大鼠的SP、Ach、VIP、NO的表达水平(表3)。

2.3 槐黄丸对STC模型小鼠结肠SCF和c-kit的mRNA水平的影响

与正常组相比,模型组大鼠STC结肠中SCF(0.38±0.02)和c-kit(0.42±0.04)的mRNA水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比,低、中、高剂量槐黄丸组及莫沙必利组中SCF(0.51±0.04, 0.67±0.12, 0.85±0.16, 0.80±0.13)和c-kit(0.55±0.02, 0.69±0.06, 0.87±0.08, 0.91±0.05)的mRNA水平显著回升,差异有统计学意义($P<0.05$)。与低、中剂量槐黄

表1 槐黄丸对大鼠进食无影响($n=10$)

组别	体质量(g)	进食量(g)	进食次数
正常组	320.14±9.38	4.92±1.15	4.50±0.67
模型组	340.32±11.17 ^a	5.53±1.74	4.70±0.46
槐黄丸组(低)	336.29±9.81	4.86±1.38	4.50±0.67
槐黄丸组(中)	331.64±6.31 ^b	5.16±2.23	4.60±0.66
槐黄丸组(高)	324.88±7.72 ^b	5.24±1.22	4.60±0.49
莫沙必利组	317.44±8.39 ^b	5.43±9.14	4.30±0.46

注:与正常组比较:^a $P<0.05$;与模型组相比:^b $P<0.05$ 。

表2 槐黄丸对STC大鼠排便数量、粪便湿重、干重及肠道推进率的影响($n=10$)

组别	首次排便时间(min)	粪便数量(粒)	粪便含水量(%)	粪便干重(g)	肠道推进率(%)
正常组	46.05±3.26	273.5±18.86	70.22±5.19	0.61±0.03	71.25±3.41
模型组	129.27±14.27 ^a	206.2±14.58 ^a	51.36±2.73 ^a	0.23±0.03 ^a	53.35±2.97 ^a
槐黄丸组(低)	105.43±9.62 ^b	218.7±13.11 ^b	54.50±4.37 ^b	0.28±0.25 ^b	55.17±2.13 ^b
槐黄丸组(中)	82.32±6.58 ^b	231.6±15.62 ^b	59.66±5.34 ^b	0.37±0.29 ^b	58.87±2.56 ^b
槐黄丸组(高)	69.58±5.32 ^{bcd}	257.6±15.14 ^{bcd}	62.75±4.96 ^{bcd}	0.40±0.27 ^{bcd}	64.26±4.23 ^{bcd}
莫沙必利组	59.14±5.18 ^b	265.9±17.38 ^b	67.22±6.14 ^b	0.53±0.02 ^b	68.35±4.59 ^b

注:与正常组比较:^a $P<0.05$;与模型组相比:^b $P<0.05$;与槐黄丸低剂量组相比:^c $P<0.05$;与槐黄丸中剂量组相比:^d $P<0.05$ 。

表3 槐黄丸对STC大鼠结肠SP、Ach、VIP、NO水平的影响($n=10$)

组别	SP (ng·L ⁻¹)	Ach (pmol·L ⁻¹)	VIP (ng·L ⁻¹)	NO (μmol·L ⁻¹)
正常组	207.14±15.28	422.25±11.15	86.18±4.34	29.54±3.76
模型组	130.32±14.17 ^a	294.51±7.73 ^a	109.55±6.83 ^a	43.75±4.59 ^a
槐黄丸组(低)	153.24±13.46 ^b	300.43±9.38 ^b	97.34±5.33 ^b	39.56±3.25 ^b
槐黄丸组(中)	165.67±14.49 ^b	343.16±9.65 ^b	91.24±5.16 ^b	36.21±4.01 ^b
槐黄丸组(高)	180.58±11.13 ^{bcd}	389.54±10.21 ^{bcd}	81.33±4.87 ^{bcd}	32.35±3.56 ^{bcd}
莫沙必利组	187.45±13.55 ^b	401.43±10.76 ^b	85.29±3.26 ^b	30.57±2.37 ^b

注:与正常组比较:^a $P<0.05$;与模型组相比:^b $P<0.05$;与槐黄丸低剂量组相比:^c $P<0.05$;与槐黄丸中剂量组相比:^d $P<0.05$ 。

丸组相比,高剂量槐黄丸组SCF和c-kit的mRNA水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。并且与莫沙必利组相比,高剂量槐黄丸组中的SCF和c-kit的mRNA水平无显著差异,差异无统计学意义($P>0.05$)。以上结果表明槐黄丸能影响STC大鼠的SCF和c-kit的mRNA水平的表达(表4)。

2.4 槐黄丸对STC模型大鼠结肠SCF和c-kit的蛋白水平的影响

与对照组相比,模型组SCF(0.41±0.02)、c-kit(0.32±0.03)蛋白水平显著下降,差异具统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比,低、中、高剂量槐黄丸组及莫沙必利组中SCF(0.55±0.04, 0.69±0.12, 0.87±0.16, 0.91±0.19)、c-kit(0.43±0.05, 0.59±0.04, 0.78±0.07, 0.65±0.11)蛋白水平均上升,差异具统计学意义($P<0.05$)。与低、中剂量槐黄丸组相比,高剂量槐黄丸组SCF和c-kit的蛋白水平升高,差异具统计学意义($P<0.05$)。并且与莫沙必利组相比,高剂量槐黄丸组中的SCF和c-kit的蛋白水平无显著差异,差异无统计学意义($P>0.05$)。以上结果表明槐黄丸能影响STC大鼠的SCF和c-kit的蛋白的表达(图2、表5)。

3 讨论

慢传输型便秘是一种临床上常见的疾病,是由于大肠功能紊乱,信号传导失常,从而导致排便周期延长和排便困难,可由外界多种因素诱发,如长期不良的生活习惯以及长期服用泻药等^[14]。考虑到STC病因复杂,探求其潜在机制并寻求新靶点至关重要。槐黄丸的主治功能为肠风,脏毒,便血,痔漏等,但其作用机制尚未可知。

本实验采用大黄灌胃模拟STC模型,针对不同剂量的槐黄丸检测大鼠排便情况,神经递质及相关作用机制,结果显示槐黄丸可以减少大鼠首次排便的时间,增加大鼠排便量的同时提高粪便水分和软便量,

表4 槐黄丸对STC大鼠结肠SCF和c-kit的mRNA水平的影响($n=10$)

组别	SCF	c-kit
正常组	1.06±0.09	1.03±0.07
模型组	0.38±0.02 ^a	0.42±0.04 ^a
槐黄丸组(低)	0.51±0.04 ^b	0.55±0.02 ^b
槐黄丸组(中)	0.67±0.12 ^b	0.69±0.06 ^b
槐黄丸组(高)	0.85±0.16 ^{bcd}	0.87±0.08 ^{bcd}
莫沙必利组	0.80±0.13 ^b	0.91±0.05 ^b

注:与正常组比较:^a $P<0.05$;与模型组相比:^b $P<0.05$;与槐黄丸低剂量组相比:^c $P<0.05$;与槐黄丸中剂量组相比:^d $P<0.05$ 。

增加大鼠胃肠动力,从而最终改善STC症状。此外,槐黄丸改善STC的作用呈现剂量依赖性,作用效果随着剂量的增加而提高。

肠神经系统在STC的演变过程中也扮演着至关重要的作用,神经递质也是临床研究的关注点^[15]。调节肠道蠕动的神经递质分为两类,兴奋性递质和抑制性递质,兴奋性神经递质包括Ach、SP、MTL等;抑制性神经递质则包括NO、VIP、5-HT等^[16];兴奋性神经递质可促进胃肠粘膜电解质的转运,刺激肠道运动,改善肠道功能。抑制性神经递质则调控血管平滑肌和肠道平滑肌的舒张,从而最终导致肠道的有效推进度减弱^[17-18]。本实验通过ELISA法检测STC大鼠结肠中各种神经递质的含量发现,与正常组相比,模型组中STC结肠中SP以及Ach含量显著下降,VIP以及NO含量显著升高。反之,槐黄丸治疗组中SP和Ach含量呈现浓度依赖性上升,VIP以及NO含量呈现浓度依赖性下降。该结果提示,槐黄丸可通过调控肠道中神经递质的变化水平,从而改善慢传输型便秘。

Cajal间质细胞(ICC)是一类分布于胃肠道内的特殊间质细胞,其可调控神经递质以及胃肠激素的传递,并进一步调控胃肠平滑肌的蠕动^[19-20]。在ICC细胞膜上存在一种特殊且极其重要的蛋白受体,即酪氨酸激酶c-kit,c-kit被间接作为ICC细胞的特异性标记

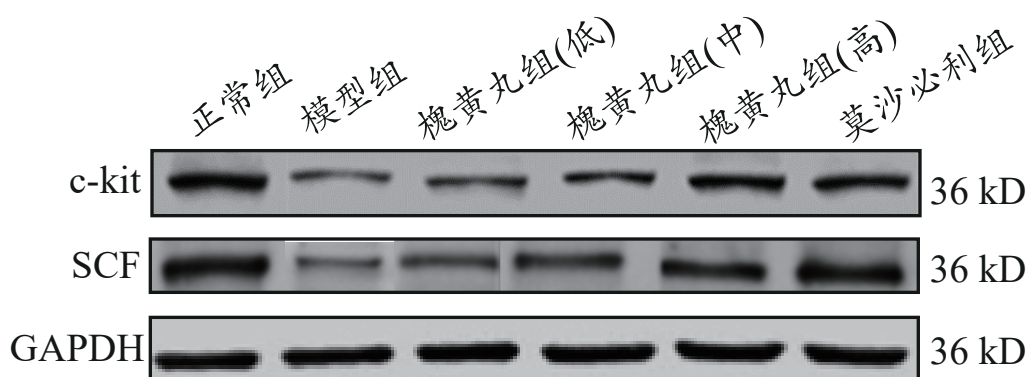


图2 槐黄丸对大鼠结肠 SCF、c-kit 蛋白表达的影响

表5 槐黄丸对STC大鼠结肠SCF和c-kit蛋白水平的影响(n=10)

组别	SCF	c-kit
正常组	1.07±0.09	0.97±0.07
模型组	0.41±0.02 ^a	0.32±0.03 ^a
槐黄丸组(低)	0.55±0.04 ^b	0.43±0.05 ^b
槐黄丸组(中)	0.69±0.12 ^b	0.59±0.04 ^b
槐黄丸组(高)	0.87±0.16 ^{bcd}	0.78±0.07 ^{bcd}
莫沙必利组	0.91±0.19 ^b	0.65±0.11 ^b

注:与正常组比较:^a $P<0.05$;与模型组相比:^b $P<0.05$;与槐黄丸低剂量组相比:^c $P<0.05$;与槐黄丸中剂量组相比:^d $P<0.05$ 。

物^[21]。与此同时,SCF做为c-kit的配体,在正常生理以及疾病过程中发挥多种生物学特性^[22]。SCF/kit信号传递系统在维持ICC细胞发育、形态、功能及谱系中必不可少^[23]。本实验通过RT-PCR以及Western实验检测STC大鼠结肠中SCF/kit含量发现,造模后大鼠STC结肠中c-kit和SCF的基因和蛋白水平显著降低。槐黄丸给药后c-kit和SCF的基因和蛋白水平显著升高。以上结果表明,槐黄丸可显著增强c-kit/SCF信号通路缓解慢传输型便秘。莫沙必利属于胃肠促动力药物,是选择性5-HT受体激动剂,能够促进乙酰胆碱的释放,从而刺激胃肠道的蠕动,发挥它的促动力作用,从而改善功能性消化不良患者的胃肠道症状。槐黄丸是我院针对内痔出血、肠炎、便秘等疾病而配制的中药制剂,由槐角、大黄、枳壳、杏仁等9味药组成,具有

收敛、清热、止血、润肠通便等功效。本研究表明,槐黄丸能够缓解慢传输型便秘,稳定患者胃肠道功能。其中发挥作用的槐角主要有效成分为黄酮及异黄酮类化合物,有凉血止血、清肝明目的功能^[5]。枳壳可以改善大鼠胃肠动力障碍,推动肠道运动,促进结肠水通道蛋白AQP3, AQP5等表达,并且还有抗结肠肿瘤的药效^[10-11]。杏仁则可以止咳平喘,润肠通便,还用于缓解肝气犯胃,痰阻食滞,气郁化火所致胃脘疼痛、腹胀便秘、恶心呕吐等^[12]。本研究首次发现槐黄丸可以缓解大鼠胃肠便秘症状的作用及作用机制。此外,临床使用槐黄丸显示,槐黄丸有显著的改善便秘效果,并且停药反应低。值得注意的是,使用槐黄丸治疗后还可以稳定患者胃肠道功能,改善身体整体的状态。通过我们的研究,提示上述现象可能是通过各种神经因子及胃肠激素影响了肠神经系统和胃肠道的动力,从而舒缓整个身体机能。

综上所述,槐黄丸对慢传输型便秘具有显著的改善作用,其机制可能是通过增强c-kit/SCF信号通路,提高调节肠道神经递质Ach、SP、VIP以及NO含量,改善肠道中神经传导反射,提高ICC细胞的稳态,从而缩短首次排便时间,增加排便粒数及干重、粪便含水量,提高肠道推进率,并最终缓解便秘。本研究为槐黄丸治疗慢传输型便秘的临床应用提供了坚实的理论基础,也为其分子机制提供了依据。

参考文献

- Deng Z T, Fu Z T, Yan W, *et al.* The different effects of Chinese Herb Solid Drink and lactulose on gut microbiota in rats with slow transit constipation induced by compound diphenoxylate. *Food Res Int*, 2021, 143:110273.
- 于永铎, 尹玲慧, 张斯瑶, 等. 慢传输型便秘伴焦虑抑郁中西医研究进展. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(5):5-8.
- Altomare D F, Picciariello A, Di Ciaula A, *et al.* Effects of temporary sacral nerve stimulation on gastrointestinal motility and function in

- patients with chronic refractory slow-transit constipation. *Tech Coloproctol*, 2021, 25(3):291-297.
- 4 Mazzone A, Strege P R, Gibbons S J, *et al.* microRNA overexpression in slow transit constipation leads to reduced Na1.5 current and altered smooth muscle contractility. *Gut*, 2020, 69(5):868-876.
 - 5 金浩, 余佳, 王梓瑜, 等. 槐角黄酮通过调控 LncRNA FBXL19-AS1/miR-342-3p 通路抑制肝癌细胞增殖、迁移及侵袭的机制研究. *中国中药杂志*, 2020, 45(18):4440-4447.
 - 6 宋涛, 刘平, 贾芳. 槐角丸的研究进展. *中国实用医药*, 2014, 9(5):263-264.
 - 7 王杰, 刘瑞珍, 刘东超, 等. 槐角多糖抗氧化活性研究. *食品研究与开发*, 2020, 41(1):25-29.
 - 8 金浩, 余佳, 王梓瑜, 等. 槐角黄酮通过调控 LncRNA FBXL19-AS1/miR-342-3p 通路抑制肝癌细胞增殖、迁移及侵袭的机制研究. *中国中药杂志*, 2020, 45(18):4440-4447.
 - 9 孟君, 陆建良, 孙勇, 等. 朱氏润肠方对慢传输型便秘大鼠的作用及其机制研究. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(4):489-492, 500.
 - 10 罗曦, 李天娇, 包永睿, 等. 基于 HT-29 细胞的枳壳治疗结肠肿瘤药效物质组分提取工艺研究. *中南药学*, 2021, 19(3):455-459.
 - 11 王红阳, 钟佩芸, 梁家怡, 等. 制枳壳 HPLC 指纹图谱与小肠推动作用的关系. *中成药*, 2021, 43(3):750-754.
 - 12 蔡欢, 蔡柳洲. 杏仁在脾肾疾病中的临床运用探析. *中医临床研究*, 2021, 13(4):79-80.
 - 13 刘兴, 王文革. 慢传输型便秘动物模型研究进展. *中国中西医结合消化杂志*, 2013, 21(10):548-551.
 - 14 杨瑞勇, 张桢, 王姗姗. 电针联合穴位埋线治疗慢传输便秘气阴两虚证临床研究. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(6):88-93.
 - 15 王森, 王慧静, 魏薇, 等. 慢传输型便秘的病理生理机制研究进展. *中日友好医院学报*, 2020, 34(4):239-241.
 - 16 李佳, 杨斌, 石小乐, 等. 加味济川煎对老年阳虚慢传输型便秘患者 MTL、SP、VIP 影响的研究. *中国中医药现代远程教育*, 2021, 19(2):102-105.
 - 17 李林, 茹立强. 大鼠肠道内 ACh 能、SP、VIP-肽能和 NO 能神经的分布模式及相互关系. *华中科技大学学报(医学版)*, 2009, 38(5):575-580.
 - 18 张喻然, 王波. 济川煎加味联合腹针针对慢传输型便秘(脾肾阳虚型)疗效及对血清 SP 和 NO 水平的干预影响. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26(3):238-242.
 - 19 王星月, 肖国辉, 冯雯. 山药芝麻糊治疗慢性传输型便秘大鼠的疗效及对结肠组织中 SP、VIP、ICC 含量的影响. *人人健康*, 2020(14):660.
 - 20 王婷, 涂琴蓉, 刘富林, 等. Cajal 间质细胞与消化系统疾病相关性研究进展. *湖南中医杂志*, 2019, 35(9):160-162.
 - 21 肖秋平, 洪燕秋, 耿学斯, 等. 肠润方对功能性便秘大鼠结肠 Cajal 间质细胞及 c-kit/SCF 信号通路的影响. *中医药通报*, 2020, 19(2):57-62.
 - 22 殷胜勇, 胡晨, 李锦军, 等. 受体酪氨酸激酶 c-kit 及其配体 SCF 在正常肝及肝癌组织中的共表达. *肿瘤*, 2006(6):502-506, 518.
 - 23 王计雨, 康朝霞, 韩永丽, 等. 电针足三里调控 SCF/c-kit 信号通路对功能性消化不良大鼠胃窦组织肌内 Cajal 间质细胞的作用. *湖北中医杂志*, 2019, 41(4):3-8.

Effect of Huaihuang Pills on Colonic Neurotransmitter and SCF/c-kit Pathway in Rats with Slow Transit Constipation

Liu Ying, Chang You, Li Xiangyong, Meng Jun

(Lianyungang Affiliated Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Lianyungang 222000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Huaihuang Pill on slow transit constipation (STC) rats and its mechanism via colonic neurotransmitter and (stem cell factor) SCF/ (kit proto-oncogene) c-kit pathway. Methods Sixty SD rats were randomly divided into normal group, model group, Huaihuang Pill low-dose group (30 mg·kg⁻¹), Huaihuang Pill medium-dose group (75 mg·kg⁻¹), and Huaihuang Pill high-dose group (150 mg·kg⁻¹), mosapride group (2 mg·kg⁻¹), 10 rats in each group. Except for the normal group, rats in other groups were treated with rhubarb gavage to simulate STC modeling, and they were administered according to the drug concentration of the corresponding group. After 2 weeks of administration, the time of first defecation in 24 hours, the number and dry weight of stool in 6 hours, the water content of feces, and intestinal propulsion rate were measured. ELISA method was used to detect the contents of in rat colon. RT-PCR method was used to detect the mRNA levels of c-kit and SCF in rat colon. The protein levels of c-kit and SCF in rat colon were determined by Western blot. Results Compared with the normal group, the rats in the model group had significantly longer first defecation time. The number of stools, dry weight, and fecal water content in 6 hours were

significantly reduced, and the intestinal propulsion rate was reduced. The content of SP and Ach were reduced, and the content of VIP and NO was increased. The expression of c-kit and SCF decreased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, the low, medium, and high dose groups of Huaihuang Pills could shorten the first defecation time, the number of stools and dry weight in 6 hours; and the water content of stool were significantly increased; the intestinal propulsion rate was increased; the SP and Ach content were increased; and the VIP and NO were reduced; the difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the low and medium dose groups of Huaihuang Pills, the high dose group of Huaihuang Pills had the best effect in relieving slow transit constipation, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Conclusion Huaihuang Pills have a significant improvement effect on rats with slow transit constipation, and its mechanism may be related to the regulation of colonic neurotransmitters and the improvement of SCF/c-kit signaling.

Keywords: Huaihuang Pills, Slow transit constipation, Neurotransmitters, SCF/c-kit, Rat

(责任编辑:周阿剑、李青, 责任译审:周阿剑, 审稿人:王瑀、张志华)