

·实验研究·

本文引用: 戚椿林, 廖陈敏, 王文凤, 施敏, 朱哲琴, 魏堰肿, 刘富林, 夏旭婷. 枳术丸调节肥大细胞活化及 PAR-2/CGRP 通路治疗慢传输型便秘脾虚证小鼠的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(8): 1413-1419.

枳术丸调节肥大细胞活化及 PAR-2/CGRP 通路治疗慢传输型便秘脾虚证小鼠的机制研究

戚椿林, 廖陈敏, 王文凤, 施敏, 朱哲琴, 魏堰肿, 刘富林*, 夏旭婷*
湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨枳术丸调节肥大细胞活化及蛋白酶激活受体-2(PAR-2)/降钙素基因相关肽(CGRP)通路治疗慢传输型便秘(STC)脾虚证小鼠的机制。**方法** 30只小鼠以番泻叶灌胃+限制饮食饮水+低纤维饮食方法建立 STC 脾虚证小鼠模型,并随机均分为模型组(无菌水 10 mL/kg 灌胃)、莫沙必利组(莫沙必利溶液 2.5 mg/kg 灌胃)和枳术丸组(枳术丸水煎液 9 g/kg 灌胃);另取 10 只作为正常组(无菌水 10 mL/kg 灌胃)。干预 7 d 后,测量小鼠体质量、肠道推进率,HE 染色观察结肠黏膜病理,透射电镜观察肥大细胞(MC)形态改变,采用 RT-PCR 法检测小鼠结肠黏膜类胰蛋白酶(Tryptase)、PAR-2、CGRP mRNA 表达,免疫组化检测 Tryptase、PAR-2 表达,Western blot 检测 Tryptase、PAR-2 蛋白表达,ELISA 检测血清、脑组织、结肠黏膜中 CGRP 含量。**结果** 与正常组比较,模型组小鼠结肠黏膜水肿、炎症细胞浸润程度、MC 形态改变相对加重,炎症病理评分上升($P<0.05$),体质量及肠道推进率下降($P<0.01$),结肠黏膜 Tryptase、PAR-2 蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$),Tryptase、CGRP、PAR-2 mRNA 表达量升高($P<0.01$),血清、脑组织、结肠黏膜中 CGRP 含量升高($P<0.01$)。与模型组比较,莫沙必利组与枳术丸组组织水肿、炎症细胞浸润程度、MC 形态改变相对减轻,炎症病理评分下降($P<0.05$),小鼠体质量和肠道推进率增加($P<0.01$),Tryptase、PAR-2 蛋白表达量及 Tryptase、CGRP、PAR-2 mRNA 表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$),血清、脑组织、结肠黏膜中 CGRP 含量降低($P<0.01$)。与莫沙必利组比较,枳术丸组小鼠体质量增加($P<0.05$),Tryptase、CGRP、PAR-2 mRNA 表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 枳术丸能改善 STC 脾虚证小鼠便秘症状,其机制可能与减少 MC 活化,抑制 Tryptase、PAR-2 表达,下调 CGRP 分泌,促进肠道蠕动有关。

[关键词] 慢传输型便秘;枳术丸;肥大细胞;蛋白酶激活受体-2;降钙素基因相关肽

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.08.003

Mechanism of Zhizhu Pill on mice with slow transit constipation and spleen deficiency pattern by regulating mast cell activation and PAR-2/CGRP pathway

QI Chunlin, LIAO Chenmin, WANG Wenfeng, SHI Min, ZHU Zheqin, WEI Yanchong,
LIU Fulin*, XIA Xuting*

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of Zhizhu Pill on mice with slow transit constipation (STC) and spleen deficiency pattern by regulating mast cell (MC) activation and protease-activated receptor-2 (PAR-2)/calcitonin gene-related peptide (CGRP) pathway. **Methods** Thirty mice were used to establish an STC model with spleen deficiency pattern using a combination of senna leaf gavage, restricted diet and water intake, and a low-fiber diet. These mice were randomly divided into model group (10 mL/kg sterile water gavage, $n=10$), mosapride group (2.5 mg/kg mosapride solution gavage, $n=10$), and Zhizhu Pill group (9 g/kg Zhizhu Pill

[收稿日期]2025-05-14

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2024JJ7359);湖南省教育厅科学研究项目(23C0164);湖南省中医药科研项目(B2023151,C2022033);湖南省教育厅重点项目(23A0292);中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金资助重点项目(24PTKF1001)。

[通信作者]* 夏旭婷,女,博士研究生,副教授,硕士研究生导师,E-mail:308211635@qq.com;刘富林,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:616217372@qq.com。

decoction gavage, $n=10$). Ten additional mice served as the normal group (10 mL/kg sterile water gavage). After seven consecutive days of intervention, body weight and intestinal propulsion rate of mice were measured. Colonic mucosal pathology was observed via HE staining. MC morphological changes were observed via transmission electron microscopy. The mRNA expressions of tryptase, PAR-2, and CGRP in the colonic mucosa of mice were determined via RT-PCR. Expressions of tryptase and PAR-2 were checked by Immunohistochemistry (IHC). Protein expressions of tryptase and PAR-2 were measured by Western blot. CGRP content of serum, brain tissue, and colonic mucosa was measured by ELISA. **Results** Compared with the normal group, mice in the model group demonstrated aggravated colonic mucosal edema, inflammatory cell infiltration, and MC morphological changes accompanied by significantly increased inflammatory pathological points ($P<0.05$), decreased body weight and intestinal propulsion rate ($P<0.01$), elevated protein expressions of tryptase and PAR-2 in colonic mucosa ($P<0.05$, $P<0.01$), increased mRNA expressions of tryptase, CGRP, and PAR-2 ($P<0.01$), and increased CGRP content in serum, brain tissue, and colonic mucosa ($P<0.01$). Compared with the model group, both mosapride and Zhizhu Pill groups exhibited ameliorated colonic mucosal edema, inflammatory cell infiltration, and MC morphological changes with decreased inflammatory pathological points ($P<0.05$), along with increased body weight and intestinal propulsion rate ($P<0.01$), reduced protein expressions of tryptase and PAR-2, decreased mRNA expressions of tryptase, CGRP, and PAR-2 ($P<0.05$, $P<0.01$), and reduced CGRP content of serum, brain tissue, and colonic mucosa ($P<0.01$). Compared with the mosapride group, mice in the Zhizhu Pill group showed increased body weight ($P<0.05$) and decreased mRNA expressions of tryptase, CGRP, and PAR-2 ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Zhizhu Pill can alleviate constipation symptoms in STC with spleen deficiency pattern. Its mechanism may be related to the suppression of MC activation, inhibition of tryptase and PAR-2 expression, downregulation of CGRP secretion, and promotion of intestinal motility.

[**Keywords**] slow transit constipation; Zhizhu Pill; mast cell; protease-activated receptor-2; calcitonin gene-related peptide

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是因结肠动力不足导致肠道内容物传输缓慢的慢性功能性便秘,以排便次数减少、费力、粪便干结及腹胀为主要症状^[1]。STC 迁延难愈可引发心脑血管疾病、肠癌并伴随焦虑、抑郁等问题,严重影响患者生活质量^[2]。肠道动力由中枢神经系统、Cajal 间质细胞、肠神经系统主导^[3]。“脑-肠”轴功能失调是 STC 发病的关键^[4]。研究发现,肠黏膜肥大细胞(mast cell, MC)可释放类胰蛋白酶(Tryptase),裂解并激活肠神经元蛋白酶激活受体-2(protease-activated receptor-2, PAR-2),促进抑制性肽即降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)的分泌,进而调节肠道运动,该过程体现了“脑-肠”轴之间的交互协调^[5-7]。

有研究证实,STC 患者肠道炎症反应被激活,结肠组织内 MC 浸润数目显著增加^[8]。前期研究发现,STC 脾虚证小鼠结肠黏膜充血、肿胀,有轻度炎症改变^[9];进一步实验采用李东垣《脾胃论·卷下·调理脾胃治验》中的经典方剂枳术丸进行治疗,发现其能够改善 STC 脾虚证小鼠结肠黏膜炎症^[10-11]。枳术丸方中白术为君,补脾益气,枳实为臣,化积导滞,其补而不滞,消不伤正,体现“攻补兼施”的配伍思想。临床常用于脾虚导致的慢性胃炎、功能性消化不良、便秘的治疗^[12]。臧彬如^[13]研究发现,枳术丸可通过下调 CGRP 表达改善胃肠动力。但枳术丸是否能通过影响 MC 活化及 PAR-2/CGRP 通路的关键蛋白改善结肠黏膜炎症值得进一步研究。故本实验拟采用枳

术丸汤剂干预 STC 脾虚证模型小鼠,通过行为学、形态学、分子生物学等方面进一步探究枳术丸治疗 STC 脾虚证的药效学机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40 只 SPF 级健康 KM 小鼠,体质量(20 ± 2) g,雌雄各半。由湖南中医药大学实验动物中心统一购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,小鼠实验前适应性喂养 7 d,温度(22 ± 2) °C,相对湿度 45%~55%。本研究中所涉及的动物实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准同意,编号:LLBH-202104230001。实验动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004。

1.2 实验药品、试剂与仪器

麸炒枳实、生白术、番泻叶(安徽亳药千草中药饮片有限公司,批号:CK21032906、NG21042703、1904050);枸橼酸莫沙必利片(鲁南贝特制药有限公司,国药准字 H19990317)。根据李东垣《脾胃论》中枳术丸的记载,枳实与白术按 1:2 配制,取枳实 30 g、白术 60 g,加入 1 500 mL 蒸馏水中浸泡、煎煮过滤后蒸发浓缩成 1 g/mL 的药液;番泻叶 250 g 加入 2 500 mL 沸水中密封浸泡 20 min,过滤后将滤液蒸发浓缩成 1 g/mL 的药液。两种药液分装于无菌冻存管中,密封、编号,冷冻备用。

HE 染液(武汉博尔夫生物科技有限公司,批号: BH0001);电镜固定液(武汉市皮诺飞生物科技有限公司,批号:210104);Tryptase 抗体、重组 PAR-2 抗体

(美国 Abcam 公司,批号:ab2378、ab180953);CGRP ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号:027706MO)。

透射电镜(日本日立株式会社,型号:JEM1400);荧光定量 PCR 仪、凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:CFX Connect、Chemidoc XRS+);酶标仪(雷杜生命科学股份有限公司,型号:Rt-6100)。

1.3 模型制备

采用经本课题组多年论证建立的 STC 脾虚证小鼠模型^[14],即:第 1~7 天,按 0.5 mL/只每天灌胃 1 g/mL 番泻叶药液,正常饮食饮水,造成脾虚状态;第 8 天起停止灌胃,隔天喂食生大米 6 g/只、自由饮水 1 次,每次 30 min,连续 8 d;15 d 后,小鼠通过低纤维饮食、限食和限水以减慢肠道蠕动,造成便秘状态。造模成功标准:小鼠精神状态较差,性情急躁易怒,外形瘦小,被毛发黄疏松、欠光泽,甚者竖毛,皮肤松软,部分拱背、脱肛,活动减少,食纳减少,造模前期大便溏稀,次数增多,后期大便逐渐成形、变硬,次数减少,颗粒变小;小鼠消化道解剖示,大便主要聚集在结肠,呈串珠状,空肠和回肠无明显粪便残留,检测小鼠肠道推进率较正常小鼠均明显降低^[15]。

1.4 分组及给药

将 40 只小鼠随机分为正常组(10 只)和造模组(30 只)。造模 15 d 后,将造模组按随机数字表法均分为模型组、枳术丸组和莫沙必利组,并每组取 3 只验证造模成功。按 60 kg 成人的体表面积与临床给药剂量折算出小鼠每天给药剂量^[13]。枳术丸组按 9.0 g/(kg·d)给药,莫沙必利组按 2.5 mg/(kg·d)给药,模型组和正常组给予 0.1 mL/10 g 蒸馏水灌胃,每天 2 次,持续给药 7 d。枳术丸、莫沙必利实验用量均为临床等效剂量。

1.5 取材

治疗完成后,小鼠禁食不禁水 24 h,经口灌入印度墨水 0.2 mL/只,20 min 后眼球取血并脱颈处死,立即剖腹取出幽门至回盲部的全部肠道,生理盐水冲洗,取近端结肠新鲜肠壁 3 段,分装、保存。

1.6 指标检测

1.6.1 体质量及肠道推进率测量 测量并记录小鼠治疗前后的体质量变化。测量肠道染黑长度及肠道全长,并计算肠道推进率。肠道推进率=肠道染黑长度(cm)/肠道全长(cm)×100%。

1.6.2 HE 染色观察小鼠结肠黏膜病理情况 取 4%多聚甲醛固定小鼠结肠组织 24 h 以上,脱水包埋切片及 HE 染色后,光学显微镜下观察小鼠结肠

黏膜病理改变并拍照记录。样本以 4%多聚甲醛进行固定,梯度浓度乙醇脱水、包埋、切片、染色后,镜下观察。HE 染色步骤如下。(1)脱蜡、水化:60 °C 烘箱 60 min,二甲苯 5~10 min×2 次,95%、85%、75%无水乙醇 3~5 min×2 次,漂洗 2~3 min。(2)染色:苏木素浸染,水洗;1%盐酸乙醇分化,冲洗,组织呈现为蓝色;伊红浸染,通过显微镜观察,细胞核呈现为蓝紫色,胞质呈现为粉红色。(3)脱水:75%、85%、95%无水乙醇,3~5 min×2 次。(4)透明:二甲苯 3~5 min×2 次。(5)封片:中性树胶封片。

1.6.3 透射电镜观察小鼠结肠组织 MC 形态 取各组无污染的近端结肠组织约 1 mm³,立刻置于 2.5%戊二醛中固定,4 °C 避光保存后置入 PBS 缓冲液中。再放入 1%锇酸后固定 1~2 h,依次逐级脱水、浸泡,纯环氧树脂包埋后烘烤。取出包埋块修块后切取超薄切片。铜网捞片,电子染色(铅、铀染色)。用透射电镜观察,数码相机记录图像。

1.6.4 免疫组化检测小鼠结肠黏膜 Tryptase、PAR-2 蛋白表达 用石蜡包埋小鼠结肠组织,切片脱蜡脱水,进行抗原修复,在 3%过氧化氢溶液中室温避光孵育 25 min 后,滴加 3%BSA 室温封闭 30 min。滴加一抗 Tryptase(1:200)、PAR-2(1:200)于湿盒内 4 °C 孵育过夜。滴加二抗 Tryptase(1:500)、PAR-2(1:500)室温孵育 50 min。PBS 洗涤后滴加新鲜配制的 DAB 显色液。苏木素复染,脱水,中性树胶封片后,显微镜镜检,图像采集分析。

1.6.5 Western blot 检测小鼠结肠黏膜 Tryptase、PAR-2 蛋白表达 取出小鼠结肠组织样本,依次进行 PBS 缓冲液漂洗、总蛋白提取、BCA 法测定蛋白浓度、总蛋白溶液变性、电泳、转膜、脱脂牛奶封闭 1 h 后,装入相应的一抗 Tryptase(1:1 000)、PAR-2(1:1 000)稀释液杂交袋中 4 °C 孵育过夜。加入稀释后的二抗(1:20 000)与膜孵育 1 h,滴加新鲜配制的显影液到膜的蛋白面侧,显影、定影。将胶片进行扫描存档,采用 AlphaEaseFC 6.0 软件处理系统分析目标条带的光密度值。

1.6.6 RT-PCR 检测小鼠结肠黏膜 Tryptase、PAR2、CGRP mRNA 表达 取小鼠结肠组织于 700 μL 的 Trizol 匀浆管中,依次进行匀浆、温育、离心后,提取组织总 RNA,置于 -80 °C 冰箱保存备用。消除总 RNA 中的 DNA 和 DNaseI,对其进行反转录,合成 cDNA 的第一条链,置于 -20 °C 保存。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,设计引物序列(见表 1),完成后放入荧光定量 PCR 仪中并在 Bio-Rad CFX Manager 软件上设定检测。

表 1 Tryptase、PAR-2、CGRP 基因序列

Table 1 Tryptase, PAR-2, and CGRP gene sequences

引物名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')	引物长度/bp
Tryptase	CTCCTCACTGTGTCCAAATGC	TAGAGTACTGCTTACGGAGC	142
PAR-2	CTGGCTCTTCTTCGTGCTCT	CAGGAACACGCAGAAGAAGG	150
CGRP	GCCTGGGAAGAATAATAAAAG	CAGTTGGTTTTTCTCTCCTCT	250
GAPDH	GCACTGGCAAAGTGGAGATT	TCTCCATGGTGGTGAAGACA	141

1.6.7 ELISA 检测小鼠血清、脑组织、结肠黏膜 CGRP 含量 取出小鼠眼球血清上清液、结肠、脑组织解冻后按 CGRP 的 ELISA 检测试剂盒说明书操作检测 CGRP 含量。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计学软件处理。计量资料若数据满足正态分布且方差齐性检验时,采取单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;若不满足时,采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量、肠道推进率比较

与正常组比较,模型组体质量及肠道推进率降低($P < 0.01$)。与模型组比较,枳术丸组体质量增加($P < 0.01$);莫沙必利组和枳术丸组肠道推进率升高($P < 0.01$)。与莫沙必利组比较,枳术丸组体质量增加($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 各组小鼠体质量和肠道推进率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 2 Comparison of body weight and intestinal propulsion rate among different groups of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体质量/g	肠道推进率/%
正常组	40.33±2.00	49.38±12.98
模型组	35.07±2.88**	22.20±8.09**
莫沙必利组	36.84±2.41	50.15±7.96 [#]
枳术丸组	39.73±1.70 ^{#□}	39.39±11.23 [#]

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$;与莫沙必利组比较,[□] $P < 0.05$ 。

2.2 各组小鼠结肠黏膜 HE 病理检测结果

正常组小鼠结肠黏膜结构完整,腺体丰富,排列整齐,无充血、水肿等改变,未见明显炎症细胞浸润。模型组小鼠结肠黏膜结构尚完整,腺体排列不齐,结肠黏膜可见轻微充血、水肿,可见部分炎症细胞浸润。莫沙必利组及枳术丸组小鼠结肠黏膜层黏膜结

构较完整,腺体丰富,排列整齐,无充血、水肿等改变,可见少量炎症细胞浸润。对结肠病理表现进行验证评价,与模型组相比,正常组、莫沙必利组及枳术丸组炎症评分均下降($P < 0.05$)。详见图 1。

2.3 各组小鼠结肠黏膜 MC 透射电镜观察结果

正常组小鼠结肠黏膜 MC 形态规则,呈圆形,胞膜完整,颗粒未脱落。与正常组比较,模型组小鼠结肠黏膜 MC 形态较不规则,细胞周围多片絮状物,呈脱落颗粒状。与模型组比较,莫沙必利组 MC 形态较规则,呈圆形,细胞周围少片絮状物,脱落颗粒程度不明显;枳术丸组 MC 形态规则,呈圆形,细胞周围少片絮状物,脱落颗粒程度不明显。详见图 2。

2.4 各组小鼠结肠黏膜 Tryptase、PAR-2 的免疫组化结果

正常组小鼠结肠黏膜有微量浅棕色颗粒分布,提示有少量 Tryptase、PAR-2 阳性表达;模型组小鼠结肠黏膜呈现大量棕色颗粒,提示 Tryptase、PAR-2 阳性表达增加;莫沙必利组及枳术丸组中小鼠结肠黏膜可见部分棕色颗粒分布,提示 Tryptase、PAR-2 阳性表达均呈减少趋势。详见图 3—4。

2.5 各组小鼠结肠黏膜 Tryptase、PAR-2 蛋白表达水平比较

与正常组比较,模型组 Tryptase、PAR-2 蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。与模型组比较,莫沙必利组、枳术丸组 Tryptase、PAR-2 蛋白表达水平降低($P < 0.05, P < 0.01$)。详见图 5、表 3。

2.6 各组小鼠结肠黏膜 Tryptase、CGRP、PAR-2 mRNA 表达水平比较

与正常组比较,模型组 Tryptase、CGRP、PAR-2 mRNA 表达水平升高($P < 0.01$)。与模型组比较,莫沙必利组、枳术丸组 Tryptase、CGRP、PAR-2 mRNA 表达水平降低($P < 0.01$)。与莫沙必利组比较,枳术丸组 Tryptase、CGRP、PAR-2 mRNA 表达水平降低($P < 0.01$)。详见表 4。

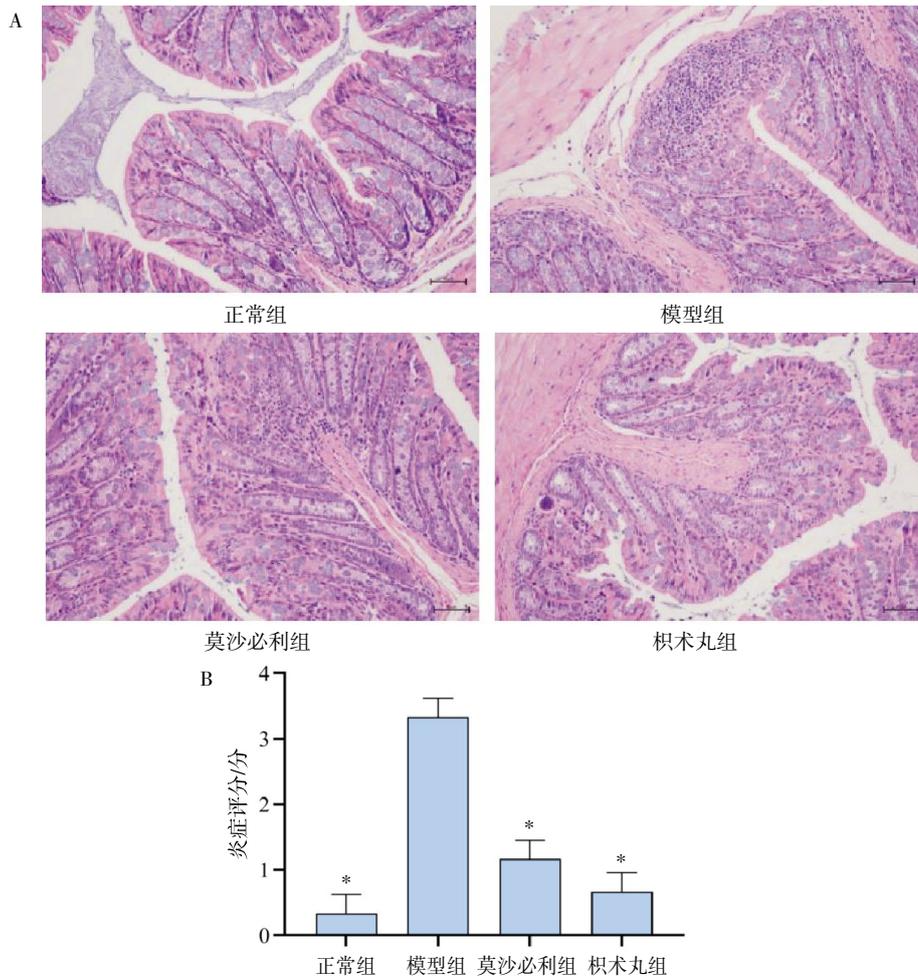


图 1 各组小鼠结肠黏膜形态和炎症评分比较

Fig.1 Comparison of morphology and inflammation points in colonic mucosa among different groups of mice
注:A.各组小鼠结肠黏膜 HE 染色图(×200);B.各组小鼠结肠黏膜组织炎症评分比较,与模型组比较,*P<0.05。

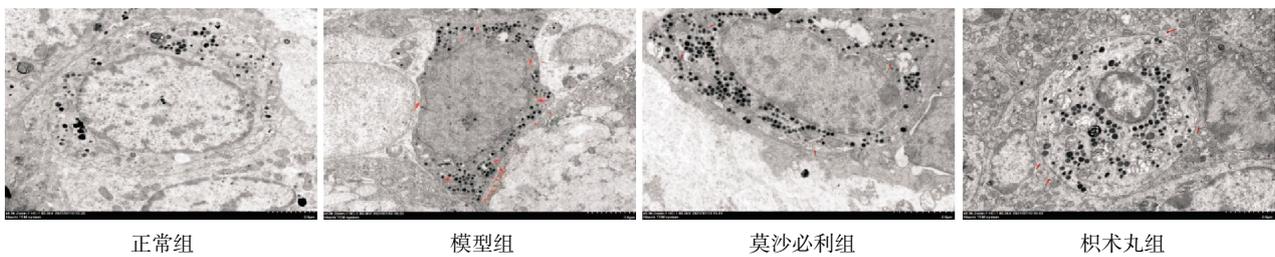


图 2 各组小鼠结肠黏膜 MC 透射电镜图(×15 000)

Fig.2 Transmission electron microscopy images of MC in colonic mucosa in each group of mice (×15 000)

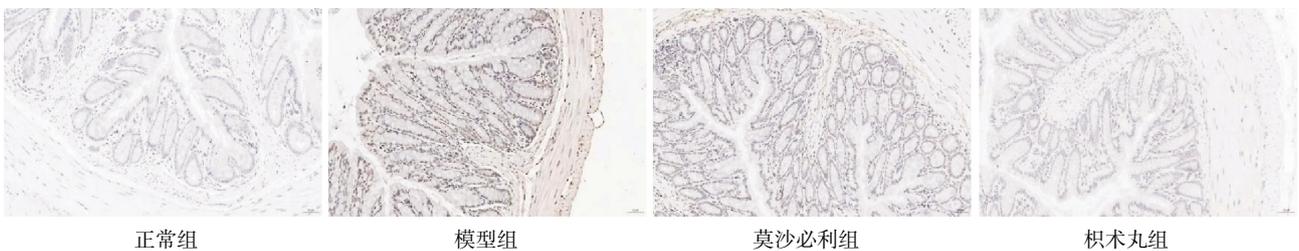


图 3 各组小鼠结肠黏膜 Tryptase 免疫组化图(×200)

Fig.3 Immunohistochemistry images of tryptase in colonic mucosa in each group of mice (×200)

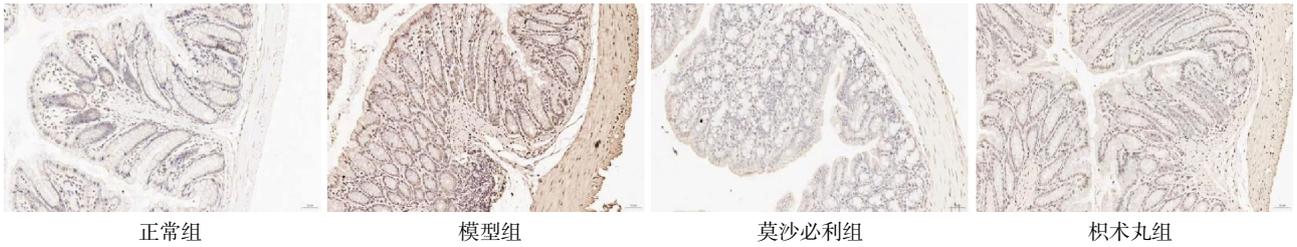


图 4 各组小鼠结肠黏膜 PAR-2 免疫组化图(x200)

Fig.4 Immunohistochemistry images of PAR-2 in colonic mucosa in each group of mice (x200)

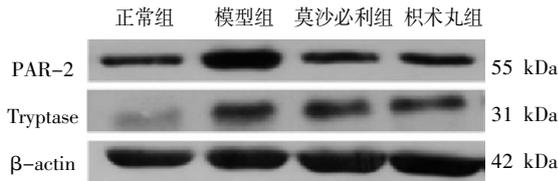


图 5 各组小鼠结肠黏膜 Tryptase、PAR-2 蛋白表达电泳图

Fig.5 Electrophoretogram of Tryptase and PAR-2 protein expressions in colonic mucosa in each group of mice

表 3 各组小鼠结肠黏膜 Tryptase、PAR-2 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 3 Comparison of protein expression levels of Tryptase and PAR-2 in colonic mucosa among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	Tryptase/ β -actin	PAR-2/ β -actin
正常组	0.50 \pm 0.30	0.75 \pm 0.14
模型组	1.03 \pm 0.35*	1.07 \pm 0.30*
莫沙必利组	0.41 \pm 0.20 [#]	0.75 \pm 0.14 [#]
枳术丸组	0.50 \pm 0.15 [#]	0.55 \pm 0.20 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

表 4 各组小鼠结肠黏膜 Tryptase、CGRP、PAR-2 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of mRNA expression levels of Tryptase, CGRP, and PAR-2 in colonic mucosa among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Tryptase mRNA	CGRP mRNA	PAR2 mRNA
正常组	4	1.01 \pm 0.03	1.09 \pm 0.19	1.02 \pm 0.02
模型组	3	3.32 \pm 0.00**	10.41 \pm 0.36**	10.14 \pm 0.15**
莫沙必利组	4	2.26 \pm 0.07 [#]	6.34 \pm 0.35 [#]	6.43 \pm 0.31 [#]
枳术丸组	4	1.56 \pm 0.07 [#] \square	3.68 \pm 0.20 [#] \square	4.18 \pm 0.33 [#] \square

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与莫沙必利组比较, \square $P<0.01$ 。

2.7 各组小鼠血清、脑组织、结肠黏膜 CGRP 含量比较

与正常组比较,模型组小鼠血清、脑组织、结肠黏膜 CGRP 含量升高($P<0.01$)。与模型组比较,莫沙必

利组和枳术丸组小鼠血清、脑组织、结肠黏膜 CGRP 含量降低($P<0.01$)。与莫沙必利组比较,枳术丸组小鼠脑组织 CGRP 含量升高($P<0.01$)。详见表 5。

表 5 各组小鼠血清、脑组织、结肠黏膜 CGRP 含量比较($\bar{x}\pm s, \text{pg/mg}$)

Table 5 Comparison of CGRP content of serum, brain tissue, and colonic mucosa among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, \text{pg/mg}$)

组别	n	血清	脑组织	结肠黏膜
正常组	5	114.58 \pm 11.77	1 051.51 \pm 108.40	1 121.19 \pm 117.67
模型组	5	268.08 \pm 25.89**	1 890.62 \pm 191.67**	1 865.91 \pm 104.49**
莫沙必利组	6	168.41 \pm 17.81 [#]	1 033.11 \pm 130.76 [#]	1 296.90 \pm 235.83 [#]
枳术丸组	6	160.19 \pm 21.12 [#]	1 312.01 \pm 54.23 [#] \square	1 265.46 \pm 223.26 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与莫沙必利组比较, \square $P<0.01$ 。

3 讨论

STC 是临床上常见的慢性功能性肠道疾病,归属于中医学“便秘”范畴,脾虚证是 STC 临床常见证型。脾主运化,若脾胃健运则中焦气机顺畅,气血津液生化有源,则大肠传导有序,腑气通畅,糟粕得排;脾胃虚弱导致运化功能失常,则清阳不升,浊阴不降,食滞胃肠,糟粕难下,则排便困难、大便干结及上腹部胀满^[6]。本实验所用枳术丸,方中白术用量倍于枳实,白术甘温健脾以补中,枳实苦辛破气以消痞,考李东垣制方之意,以“以补为体,寓消于补”的配伍玄机,针对脾虚失运之候,使补益不滞邪、行气不伤正,为攻补兼施治法之典范^[7]。

MC 脱颗粒是肠道内炎症激发的先导,能影响肠黏膜通透性、胃肠动力以及炎症反应^[18]。Tryptase 属于丝氨酸蛋白酶家族,是 MC 中含量最多的中性蛋白酶,总细胞蛋白含量高达 25%,其储存和表达在 MC 中显示出高度的选择性,是 MC 活化及颗粒脱落的重要标志^[19]。PAR2 属于 G 蛋白偶联受体亚族,参与多种胃肠道疾病的发生^[20-21]。本实验结果显示,STC 脾虚证小鼠体重减轻、肠道推进率降低,

结肠黏膜呈现炎症浸润等病理特征,而枳术丸和莫沙必利药物干预后可显著改善上述症状,增强STC脾虚证小鼠肠道动力,起到治疗便秘的作用。模型组小鼠结肠Tryptase、PAR-2蛋白和mRNA表达水平较正常组明显升高,经枳术丸治疗后Tryptase、PAR-2表达量明显下降,表明STC脾虚证小鼠的发病与结肠黏膜MC活化及Tryptase、PAR-2表达水平上升有关,枳术丸能下调STC脾虚证小鼠结肠Tryptase、PAR-2表达水平。MC活化后所产生的Tryptase可释放并激活PAR-2,PAR-2可作用于邻近的内分泌细胞和肠神经系统,释放CGRP,参与调节胃肠动力^[22-23]。CGRP是一种特殊的神经肽,广泛分布于中枢、外周及胃肠道壁内脏神经丛,在消化系统中发挥抑制胃酸分泌和胃肠道运动的作用,是“脑-肠”轴中的关键介质^[24]。实验结果显示,模型组小鼠血清、脑组织、结肠组织CGRP含量较正常组明显升高,经枳术丸治疗后其含量明显下降,表明STC发病可能与CGRP表达水平上升有关,且枳术丸能降低STC脾虚证小鼠体内CGRP表达量,与臧彬如等^[13]的研究结果一致。

综上所述,本研究结果表明,枳术丸可以通过抑制MC脱颗粒,减少结肠黏膜中Tryptase释放,抑制PAR-2的激活,下调CGRP在中枢及外周的表达,促进肠道蠕动,缓解STC脾虚证小鼠便秘症状。研究初步证实,枳术丸改善炎症治疗STC脾虚证可能与其调节MC活化-PAR-2-CGRP环路并调控“脑-肠”轴有关,为阐明STC的发病机制及枳术丸治疗STC脾虚证的药效机制提供了实验依据,从方证结合角度为开展中医经典方的现代研究提供了新思路和新方法。

参考文献

- [1] VLISMAS L J, WU W, HO V. Idiopathic slow transit constipation: Pathophysiology, diagnosis, and management [J]. *Medicina*, 2024, 60(1): 108.
- [2] WANG L F, WU F, HONG Y L, et al. Research progress in the treatment of slow transit constipation by traditional Chinese medicine[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 290: 115075.
- [3] SANDERS K M, WARD S M, KOH S D. Interstitial cells: Regulators of smooth muscle function[J]. *Physiological Reviews*, 2014, 94(3): 859-907.
- [4] 刘启鸿. 基于“脑-肠-菌”轴探讨理气通便方对气滞证慢传输型便秘患者脑肠肽及肠道菌群的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2020.
- [5] 张云枝, 张廷涛, 任相海, 等. 慢传输型便秘患者结肠组织中肥大细胞浸润与microRNA-128表达的关系[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2014, 35(6): 896-898.
- [6] 柯少雄, 杨长青, 陈俊杰, 等. 肠易激综合征患者肠道菌群特征及其与肠黏膜肥大细胞活化的关系[J]. *山东医药*, 2020, 60(2): 31-34.
- [7] 徐万里. 基于MC活化-PAR2-CGRP环路探讨电针缓解PI-IBS模型大鼠内脏高敏感的作用机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [8] 张华, 李溥, 贺银菊, 等. 七味清肠胶囊对慢性功能性便秘模型大鼠症状以及血清和结肠组织中VIP、SP、MOT、CGRP含量的影响[J]. *中国药房*, 2018, 29(16): 2170-2174.
- [9] 夏旭婷. 枳术丸对脾虚证慢传输型便秘小鼠结肠黏膜C-kit、SCF表达的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [10] 王文凤, 刘富林, 夏旭婷, 等. 枳术丸对脾虚证慢传输型便秘小鼠结肠PI3K、AKT表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(6): 2824-2828.
- [11] 夏旭婷, 刘富林, 王文凤, 等. 枳术丸对慢传输型便秘脾虚证模型小鼠肠道传导功能的影响[J]. *中医杂志*, 2020, 61(19): 1725-1730.
- [12] 李冀, 连建伟. 方剂学[M]. 新世纪4版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 187.
- [13] 臧彬如. 基于体内外化学成分和药效的变化解析枳术丸中生、制白术的炮制机理[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2020.
- [14] 夏旭婷, 樊俊阳, 王碧玉, 等. 脾虚证慢传输型便秘小鼠模型构建方法的比较研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2014, 34(12): 4-7, 81.
- [15] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001: 48-49.
- [16] 姜亚欣, 刘俊红, 刘翔, 等. 加味枳术汤联合浮针治疗慢传输型便秘脾虚气滞证[J]. *中医学报*, 2025, 40(3): 661-667.
- [17] 王曼莉, 冯哲. 李东垣对枳术丸及其类方的应用解析[J]. *江苏中医药*, 2018, 50(8): 70-72.
- [18] 郭雨栋, 任旭, 唐秀芬, 等. 肥大细胞在炎症性肠病中的作用研究[J]. *中华消化内镜杂志*, 2016, 33(8): 547-549.
- [19] ATIYAKSHIN D, BUCHWALOW I, SAMOILOVA V, et al. Tryptase as a polyfunctional component of mast cells[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2018, 149(5): 461-477.
- [20] 江彩云, 王雪雪, 张双双, 等. 粪菌移植调控PAR2-TRPV1通路对肠易激综合征模型大鼠内脏高敏感性、肥大细胞活化及肠道菌群的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24(13): 2417-2422.
- [21] 姚晓茹, 年媛媛, 曹佳馨. PAR2-PKC信号通路在胃食管反流病黏膜损伤中的作用[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2023, 32(3): 247-251.
- [22] 刘凡, 张书, 郭洁, 等. 半夏调中颗粒介导MC-PAR-2-TRPV1通路调控非糜烂性反流病大鼠模型内脏高敏感的作用机制[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(10): 2355-2359.
- [23] 李妍, 张苑, 杨柳. 基于脑-肠-菌轴浅谈中医药治疗腹泻型肠易激综合征实验研究进展[J]. *新中医*, 2021, 53(17): 17-21.
- [24] 丁少卿, 楼杰, 丁沛文. 藿蔻理气除湿汤治疗腹泻型肠易激综合征疗效观察及对肠屏障功能、胃肠道激素水平的影响[J]. *新中医*, 2023, 55(22): 64-68.