

黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠的作用及机制研究

何宝佳^{1,2}, 魏蔚¹, 张艳华^{1,2}, 尹良辰¹, 张会宁^{1,2}, 年四辉^{1,2} (1. 皖南医学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 安徽省皖南地区植物药活性物质筛选与再评价工程实验室, 安徽 芜湖 241000)

摘要: **目的** 探讨黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠的作用及机制。**方法** 将 60 只昆明小鼠随机分为正常组、模型组、麻仁丸组(0.8 g·kg⁻¹)及黄秋葵粗多糖低、中、高剂量组(0.4、0.8、1.6 g·kg⁻¹)。采用灌胃番泻叶水煎液(每日 0.8 mL)结合限制饮食饮水、饥饿失常的方法复制脾虚便秘模型小鼠。模型复制成功后, 连续灌胃给药(15 mL·kg⁻¹)7 d, 每日观察小鼠状态。进行小鼠排便功能实验; 测定血清中 D-木糖含量; 计算小肠墨汁推进率; 采用免疫组化法测定小鼠肠组织酪氨酸激酶受体(c-kit)及血管活性肠肽(VIP)表达水平。**结果** 与模型组比较, 黄秋葵粗多糖中、高剂量组小鼠的首便时间显著缩短($P<0.01$), 6 h 内排便数量、粪便质量及含水量均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$); 墨汁推进长度、墨汁推进率及血清 D-木糖浓度均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$); c-kit 阳性细胞像素面积比值和 H-score 评分明显升高($P<0.01$), VIP 阳性细胞像素面积比值和 H-score 评分明显降低($P<0.01$)。**结论** 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘小鼠具有治疗作用, 可能与上调肠道组织中的 c-kit 表达水平及下调 VIP 表达水平有关。

关键词: 黄秋葵粗多糖; 脾虚便秘; 排便功能; 酪氨酸激酶受体; 血管活性肠肽; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)03-0313-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.03.006

Pharmacodynamics and Mechanistic Study of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench Crude Polysaccharide on Constipated Model Mice with Spleen Deficiency Syndrome

HE Baojia^{1,2}, WEI Wei¹, ZHANG Yanhua^{1,2}, YIN Liangchen¹, ZHANG Huining^{1,2}, NIAN Sihui^{1,2} (1. Wanan Medical College, Wuhu 241000 Anhui, China; 2. Provincial Engineering Laboratory for Screening and Reevaluation of Active Compounds of Herbal Medicines in Southern Anhui, Wuhu 241000 Anhui, China)

Abstract: **Objective** Pharmacodynamics and mechanistic study of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench crude polysaccharide on constipated model mice with spleen deficiency syndrome. **Methods** Sixty Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, hemp seed pill(0.8 g·kg⁻¹) group and *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench crude polysaccharide low-, medium- and high-dose groups (0.4, 0.8, 1.6 g·kg⁻¹). Mice with spleen deficiency and constipation were replicated by gavage of Folium Sennae decoction (0.8 mL per day) combined with restricted diet and water intake, and irregular amount of eating. After the model was successfully replicated, the mice were continuously administered by gavage (15 mL·kg⁻¹) for 7 days, and the status of the mice was observed daily. Mice defecation function experiment. The content of D-xylose in serum was determined. Small intestine ink advancement rate was calculated. The expression levels of tyrosine kinase receptor (c-kit) and vasoactive intestinal peptide (VIP) in the intestinal tissues of mice were determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the model group, first stool time of the mice in the medium- and high-dose groups of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench crude polysaccharide was significantly shortened ($P<0.01$), and the frequency of stools, stool quality and water content within 6 hours was significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$); the ink advancement length, ink

收稿日期: 2021-03-25

作者简介: 何宝佳, 女, 硕士, 中级实验师, 研究方向: 天然药物化学及新药研发。Email: 598555719@qq.com。通信作者: 年四辉, 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药活性成分与中药制剂新工艺。Email: 258402430@qq.com。

基金项目: 2017 年度安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2017A258); 皖南医学院重点科研项目培训基金项目(WK2017Z06); 皖南医学院中青年自然科学基金项目(WK201808); 安徽省大学生创新创业训练项目(S201910368079)。

advancement rate and serum D-xylose concentration were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the c-kit positive cell pixel area ratio and H-score score were significantly increased ($P < 0.01$), and VIP positive cell pixel area ratio and H-score score were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench crude polysaccharide has therapeutic effect on constipated model mice with spleen deficiency syndrome, which may be related to the up-regulation of c-kit expression level and down-regulation of VIP expression level in intestinal tissues.

Keywords: *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench crude polysaccharide; constipation due to spleen deficiency; defecation function; tyrosine kinase receptor(c-kit); vasoactive intestinal peptide(VIP); mice

黄秋葵 *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench 别名黄葵、补肾菜、羊角豆、毛茄、咖啡黄葵、洋辣椒等^[1], 其嫩果、花、叶和芽均可食用, 其中以嫩果为主要食用部位。黄秋葵嫩果中富含多糖类、果胶、蛋白质等营养物质^[2], 具有降血糖、维持胃肠道蠕动、保护胃黏膜、防治便秘及提高机体免疫力等作用^[3], 属于优质的药食两用型保健蔬菜。《中华本草》中记载, 黄秋葵对脾虚所引发的乏力、肠燥性便秘等病症有治疗效果^[4]。因此, 本研究拟选择黄秋葵富含的粗多糖提取物作为研究对象, 探讨其对脾虚便秘模型小鼠的治疗作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物 健康昆明小鼠 60 只, SPF 级, 雌雄各半, 体质量(20 ± 2)g, 购自长沙市天勤生物技术有限公司, 动物质量合格证号: 11072619110016, 动物生产许可证号: SCXK(湘)2019-0014。动物自由摄食饮水, 实验前于皖南医学院 SPF 级恒温恒湿动物实验室适应性饲养 7 d。

1.2 药材及其制备 黄秋葵嫩果购自芜湖农贸市场, 番泻叶购自芜湖市中山大药房, 经皖南医学院年四辉教授鉴定分别为锦葵科秋葵属黄秋葵 *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench 的嫩果和豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl 的干燥小叶。黄秋葵粗多糖制备^[5]: 黄秋葵嫩果经烘干、粉碎、过筛处理后, 将其粗粉置于索氏提取器中, 用石油醚(沸点 $30 \sim 60$ °C)重复回流 3 次脱脂。待石油醚挥发完全并干燥后, 在黄秋葵粗粉中加入蒸馏水(料液比为 1:30), 超声提取 2 次(50 °C, 每次 15 min), 合并 2 次滤液, 减压浓缩得 1/5 原体积的浓缩液。在浓缩液中加入 5 倍量的无水乙醇进行醇析, 静置过夜, 留取沉淀物; 经减压干燥后得到黄秋葵粗多糖, 置于 4 °C 冰箱冷藏备用。番泻叶水煎液的制备^[6]: 称取番泻叶

500 g, 加 10 倍量沸水浸渍 10 min, 蒸发浓缩成 100%的水煎液, 置于 4 °C 冰箱冷藏备用。

1.3 药物及试剂 麻仁丸(国药准字 Z32020097, 每瓶 60 g), 南京同仁堂药业公司, 批号: 180601; D-木糖标准品, 合肥博美生物公司, 批号: 58-86-6; 墨汁, 上海国葆墨水有限公司; 4%多聚甲醛通用型组织固定液(批号: G1101)、兔抗鼠酪氨酸激酶受体(c-kit)抗体(批号: 13839-1-AP)、血管活性肠肽(VIP)抗体(批号: A12631)、二抗(批号: CR2011134)、正常山羊血清(批号: 15J23C09)、DAB 显色试剂盒(批号: HP201904), 均由武汉塞维尔生物科技有限公司提供。

1.4 主要仪器 U-5100 型紫外可见分光光度计, 日本日立公司; HD-325B 型石蜡切片机, 湖北慧达仪器有限公司; BK-TEII 型生物组织包埋机, 山东博科生物产业有限公司; Panoramic MIDI 组织切片扫描仪、Quant Center 图像分析系统, 匈牙利 3D HISTECH 公司。

1.5 分组、模型复制^[6]及给药 适应性饲养后, 随机选取 10 只小鼠作为正常组, 其余小鼠作为造模组。第 1~7 天, 正常饮食饮水, 造模组小鼠每日灌胃给予 0.8 mL 番泻叶水煎液, 以令其达到脾虚状态; 正常组小鼠灌胃等量生理盐水。第 8 天起, 停止番泻叶灌胃, 采取限制饮食饮水的方法维持脾虚状态; 隔天饲喂生大米 1 次, 每只小鼠 4~8 g, 自由饮水 1 次, 每次 0.5 h。该方法在脾虚状态基础上形成便秘模型, 模型复制时间为 15 d。造模结束后, 随机处死模型小鼠, 观察肠道内特征, 若出现腹腔内体液减少, 粪块基本聚集在结肠, 呈球形或串珠状等特征时, 表明脾虚便秘小鼠模型复制成功^[6]。

将脾虚便秘模型小鼠随机分为黄秋葵低、中、高剂量组(0.4、0.8、1.6 g·kg⁻¹)^[7]及模型组、麻仁丸组(阳性对照药, 0.8 g·kg⁻¹)^[8-9], 每组 10 只。模型复制

成功后,次日开始灌胃给药($15\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),每天早晚各给药 1 次,连续 7 d;正常组及模型组小鼠分别灌胃同体积生理盐水。

1.6 排便功能实验 第 6 天给药前小鼠禁食 12 h,给药 1 h 后,对各组小鼠在 6 h 内的首次排便时间、黑便数、粪便含水量等进行检测、记录^[8]。

1.7 血清 D-木糖浓度测定^[6,10-12] 称取 D-木糖标准品 30.10 mg,用蒸馏水溶解定容至 100 mL;吸取上述标准液 50 μL 于 10 mL 试管中,加入间苯三酚显色剂 5 mL,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 15 min,流水冷却至室温;以蒸馏水作空白对照,在 400~700 nm 范围内进行全波长扫描,确定 D-木糖最大吸收波长为 554 nm。分别准确吸取标准溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 于 10 mL 容量瓶中并定容至刻度(10 mL);分别吸取 50 μL 标准溶液于 10 mL 试管中,重复上述操作后于 554 nm 波长下测定吸光度(A)值,并绘制标准曲线。

各组小鼠禁食 20 h,末次给药 30 min 后,按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量给予 3% D-木糖溶液灌胃。1 h 后,眼球取血 1 mL 至离心管中,以 $1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径为 8 cm)离心 10 min,取上清液于 554 nm 波长下测定 A 值,计算血清 D-木糖浓度。

1.8 肠道推进实验^[6,9,13] 各组小鼠在 D-木糖灌胃 40 min 后,给予每只 0.3 mL 墨汁灌胃;20 min 后眼球取血,并脱颈椎处死;迅速解剖,剪取上端自幽门,下端至直肠末端的全部肠道组织,置于干净的白板上;分别测量肠道总长度及墨汁推进长度(从幽门至墨汁前沿长度),计算:墨汁推进率(%)=墨汁推进长度/肠道总长度 $\times 100\%$ 。

1.9 免疫组化法测定小鼠肠道组织 c-kit、VIP 表达水平 截取小鼠 1 cm 结肠组织,用生理盐水冲洗干净;以 4%多聚甲醛溶液固定后,石蜡包埋、切片、常规二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化。热修复抗原后,以 5% BSA 封闭 20 min(室温);甩去多余液体,分别滴加兔抗鼠 c-kit 抗体(1:500)、VIP 抗体(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;滴加生物素标记的二抗,室温下孵育 20 min;甩去二抗,滴加 SABC,室温下孵育 20 min;上述各步骤间均用 PBS 洗片(5 min $\times 3$)。滴加 DAB,室温下显色 10 min 后,置于自来水中终止显色;蒸馏水洗涤后,苏木素复染,于显微镜下可见浅蓝色即可;常规脱水、透明、中性树胶封片^[14-15]。采用 Panoramic MIDI 组织切片扫描仪记录信息,并用 Quant Center 图像分析软件处理。深棕色

表示强阳性,棕黄色表示中度阳性,浅黄色表示弱阳性,蓝色细胞核为阴性;计算阳性细胞像素面积表达百分比和 H-score 评分^[16-17]。H-score 评分= $\Sigma(\text{PI}\times\text{I})$,PI 表示阳性细胞百分比,I 表示着色强度。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析;计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用 LSD 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠一般状态的影响 与正常组比较,造模组小鼠第 1 天便开始出现便溏、肛门周围有污物、活动量减少等症状。第 3 天开始,造模组小鼠被毛逐渐无光泽且凌乱,饮食饮水量均减少。第 15 天后,造模组小鼠出现明显消瘦、困倦、四肢无力等现象;大便粒数减少,颗粒变小且干硬,出现了便秘状态;解剖可见,不规则形状的粪便主要聚集在结肠,回肠等部位未见明显残存粪便。给药后,与模型组比较,各治疗组小鼠的脾虚便秘情况有所好转,饮食饮水量逐渐恢复,大便数量增加、质软,活动增多,以黄秋葵粗多糖高剂量组恢复效果最为明显。

2.2 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠排便功能的影响 结果见表 1。与正常组比较,模型组小鼠的首便时间显著延长($P<0.01$),6 h 内排便数量、粪便质量及含水量均显著降低($P<0.01$),提示模型复制成功。与模型组小鼠比较,黄秋葵粗多糖中、高剂量组小鼠的首便时间显著缩短($P<0.01$),6 h 内排便数量、粪便质量及含水量均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,黄秋葵粗多糖可促进脾虚便秘模型小鼠排便功能的恢复。

2.3 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠肠道推进率的影响 结果见表 2。与正常组比较,模型组小鼠的墨汁推进长度和墨汁推进率显著下降($P<0.01$);与模型组比较,给药组小鼠的墨汁推进长度及墨汁推进率均显著升高($P<0.01$)。结果表明,黄秋葵粗多糖可促进脾虚便秘模型小鼠的肠道蠕动,提高肠道推进率。

2.4 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠血清 D-木糖浓度的影响 结果见表 3。与正常组比较,模型组小鼠的血清 D-木糖浓度明显降低($P<0.05$);与模型组比较,给药组小鼠的血清 D-木糖浓度均明显升高

表 1 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠排便功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 1 Effect of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench Crude polysaccharide on the defecation function of constipated model mice with spleen deficiency type($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	6 h 内的首便时间/min	6 h 排便数量/粒	粪便含水量/%	粪便质量/g
正常组	—	139.00 ± 7.92	11.20 ± 4.61	49.06 ± 4.98	1.79 ± 0.69
模型组	—	188.20 ± 15.38**	5.40 ± 2.63**	36.71 ± 4.91**	0.45 ± 0.26**
麻仁丸组	0.8	142.70 ± 6.85**	9.90 ± 2.33**	48.67 ± 6.06**	1.02 ± 0.55*
黄秋葵粗多糖低剂量组	0.4	160.10 ± 11.38**	7.90 ± 1.91	40.87 ± 4.94	0.83 ± 0.29
黄秋葵粗多糖中剂量组	0.8	148.20 ± 7.77**	8.80 ± 2.57*	44.69 ± 6.88**	1.22 ± 0.66**
黄秋葵粗多糖高剂量组	1.6	141.90 ± 7.29**	11.40 ± 3.24**	47.37 ± 5.39**	1.49 ± 0.51**

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 表 2 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠肠道推进率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 2 Effect of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench Crude polysaccharide on intestinal propulsion rate in constipated model mice with spleen deficiency type($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	墨汁推进长度/cm	墨汁推进率/%
正常组	—	41.94 ± 1.80	75.07 ± 2.49
模型组	—	23.06 ± 1.60**	41.74 ± 2.58**
麻仁丸组	0.8	41.58 ± 1.97**	74.63 ± 3.27**
黄秋葵粗多糖低剂量组	0.4	35.47 ± 2.31**	63.52 ± 4.43**
黄秋葵粗多糖中剂量组	0.8	39.82 ± 2.49**	71.24 ± 3.95**
黄秋葵粗多糖高剂量组	1.6	42.95 ± 3.23**	77.29 ± 5.74**

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$ 表 3 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠血清 D-木糖浓度的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 3 Effect of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench Crude polysaccharide on D-xylose concentrated of serum in constipated model mice with spleen deficiency type($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

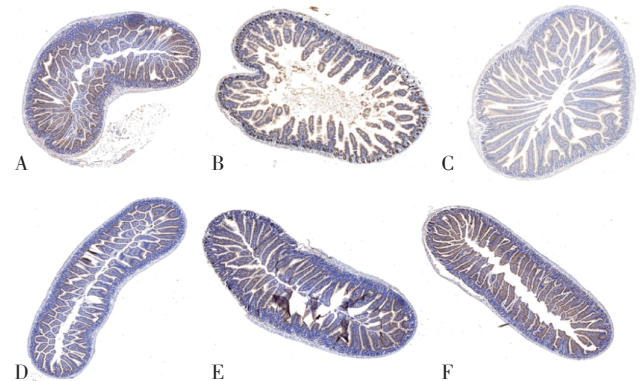
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	D-木糖浓度/($\times 10^{-4}$, mg·mL ⁻¹)
正常组	—	22.60 ± 7.43
模型组	—	16.90 ± 3.02*
麻仁丸组	0.8	21.77 ± 3.49**
黄秋葵粗多糖低剂量组	0.4	18.93 ± 1.11*
黄秋葵粗多糖中剂量组	0.8	20.86 ± 3.84*
黄秋葵粗多糖高剂量组	1.6	23.70 ± 2.51**

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

($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, 黄秋葵粗多糖可促进脾虚便秘模型小鼠的肠道吸收功能。

2.5 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠肠组织 c-kit 表达水平的影响 结果见图 1、表 4。正常组小鼠的肠黏膜组织完整清晰, c-kit 阳性细胞染色后胞浆中的染色颗粒多呈浅棕色、棕黄色或棕褐色。与正常组比较, 模型组小鼠肠黏膜组织中 c-kit 阳性细胞表

达减少, 分布稀疏, c-kit 阳性细胞像素面积比值和 H-score 评分显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 给药组小鼠肠组织中的 c-kit 阳性细胞表达均有不同程度增加, 分布密集, 黄秋葵粗多糖中、高剂量组的 c-kit 阳性细胞像素面积比值和 H-score 评分明显升



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 麻仁丸组; D. 黄秋葵粗多糖低剂量组; E. 黄秋葵粗多糖中剂量组; F. 黄秋葵粗多糖高剂量组

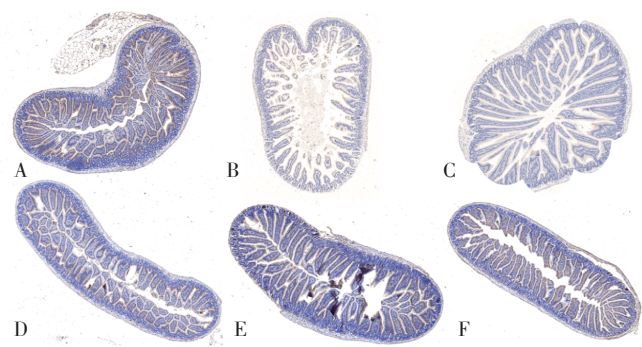
图 1 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠肠组织 c-kit 表达水平的影响(免疫组化, $\times 40$)Figure 1 Effect of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench Crude polysaccharide on c-kit expression in intestinal tissues of constipated model mice with spleen deficiency type(IHC, $\times 40$)表 4 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠肠组织 c-kit 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 4 Effect of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench Crude polysaccharide on c-kit expression in intestinal tissues of constipated model mice with spleen deficiency type($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	阳性细胞面积比/%	H-Score 评分/分
正常组	—	32.25 ± 1.30	47.49 ± 1.86
模型组	—	24.85 ± 2.09**	40.19 ± 1.81**
麻仁丸组	0.8	34.16 ± 2.74**	47.66 ± 7.42**
黄秋葵粗多糖低剂量组	0.4	29.64 ± 3.66**	42.42 ± 4.33
黄秋葵粗多糖中剂量组	0.8	33.15 ± 5.48**	53.65 ± 5.82**
黄秋葵粗多糖高剂量组	1.6	37.71 ± 5.80**	56.95 ± 9.04**

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$

高($P<0.01$)。结果表明,黄秋葵粗多糖可能通过上调小鼠肠组织中的 c-kit 表达水平来改善其脾虚便秘症状。

2.6 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠肠组织 VIP 表达水平的影响 结果见图 2、表 5。正常组小鼠的肠黏膜组织完整清晰, VIP 阳性细胞染色后胞浆中的染色颗粒多呈浅棕色、棕黄色或棕褐色。与正常组比较,模型组小鼠肠黏膜组织中的 VIP 阳性细胞表达增加, VIP 阳性细胞像素面积比值和 H-score 评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组小鼠肠组织中的 VIP 阳性细胞表达有不同程度下调,黄秋葵粗多糖中、高剂量组的 VIP 阳性细胞像素面积比值和 H-score 评分明显降低($P<0.01$)。结果表明,黄秋葵粗多糖可能通过下调小鼠肠组织中的 VIP 表达水平来改善其脾虚便秘症状。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 麻仁丸组; D. 黄秋葵粗多糖低剂量组; E. 黄秋葵粗多糖中剂量组; F. 黄秋葵粗多糖高剂量组

图 2 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠肠组织 VIP 表达水平的影响(免疫组化, ×40)

Figure 2 Effect of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench Crude polysaccharide on VIP level of intestinal tissues in constipated model mice with spleen deficiency type(IHC, ×40)

表 5 黄秋葵粗多糖对脾虚便秘模型小鼠肠组织 VIP 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Effect of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench Crude polysaccharide on VIP level of intestinal tissues in constipated model mice with spleen deficiency type($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	阳性细胞 面积比/%	H-Score 评分 /分
正常组	—	27.27 ± 1.70	32.88 ± 2.06
模型组	—	34.28 ± 3.03**	46.21 ± 4.73**
麻仁丸组	0.8	29.38 ± 3.89**	39.31 ± 4.50**
黄秋葵粗多糖低剂量组	0.4	33.42 ± 2.92	44.86 ± 2.77
黄秋葵粗多糖中剂量组	0.8	29.73 ± 3.33**	39.39 ± 3.50**
黄秋葵粗多糖高剂量组	1.6	24.87 ± 2.84**	28.87 ± 3.12**

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ** $P<0.01$

3 讨论

血液中的 D-木糖浓度常作为检测脾虚模型小肠消化和吸收功能的敏感指标^[18]。D-木糖具有特殊的五碳糖结构,可在小肠内通过被动扩散的方式被吸收,整个过程中没有消化酶参与,也不能被肝脏代谢,而是经肾排出体外。因此, D-木糖在血液中的水平能够反映小肠的消化、吸收功能^[19]。本研究结果表明,脾虚便秘模型小鼠经黄秋葵粗多糖干预后,血液中的 D-木糖浓度明显升高,说明黄秋葵粗多糖能够促进脾虚便秘小鼠小肠消化、吸收功能的恢复,从而提高了血液中的 D-木糖浓度。

酪氨酸激酶受体(c-kit)由 Cajal 间质细胞(ICC)特异性表达,其所介导的信号通路与 ICC 的生长、发育、增殖密切相关^[20-22]。而 ICC 细胞作为特殊的间质细胞,被喻为胃肠动力的起搏器,以细胞网络的方式贯穿于胃肠道的各个角落,与胃肠的运动密切相关,既可以产生慢波和传导电兴奋,还可调节神经递质。研究发现,血虚便秘模型小鼠结肠组织的 c-kit 阳性分布明显减少^[14],便秘型肠易激综合征大鼠结肠平滑肌 c-kit 阳性细胞数量明显减少,表达减弱^[23]。c-kit 作为 ICC 的特异性标记, ICC 间质细胞减少与 c-kit 表达下调密切相关^[24-26]。本研究结果显示,不同剂量黄秋葵粗多糖干预后,脾虚便秘小鼠肠组织中的 c-kit 阳性细胞表达有不同程度增加。推测黄秋葵粗多糖可能通过上调小鼠肠组织中的 c-kit 表达水平,促进电兴奋传递和胃肠运动,从而改善其脾虚便秘症状。

血管活性肠肽(VIP)作为胃肠神经系统中重要的抑制性神经递质^[27],具有很强的扩张血管作用,其分布于肠道全层,能够松弛胃肠道平滑肌,抑制胃肠道蠕动,从而导致慢性便秘的发生^[28]。研究^[28-31]表明, VIP 在便秘动物模型肠组织的肌间神经丛中表达升高,可抑制胃肠道平滑肌收缩和肠肌紧张性,导致蠕动性收缩运动减弱,进而引起便秘。本研究结果表明,不同剂量黄秋葵粗多糖干预后,脾虚便秘小鼠肠组织中的 VIP 阳性细胞表达有不同程度下调。推测黄秋葵粗多糖可能通过下调小鼠肠组织中的 VIP 表达水平,促进胃肠运动,从而改善其脾虚便秘的症状。

综上所述,黄秋葵粗多糖能有效缓解脾虚型便秘,其作用机制可能与上调肠道组织中的 c-kit 表达水平及下调 VIP 表达水平有关。本研究结果可为治疗脾虚型便秘,尤其是在老年人中常见的脾虚型便

秘提供新的思路。脾虚便秘对于老年人来说,不但治疗周期长且容易反复发作,这也加大了治疗难度。单纯的导泻不能从根本上解决问题,还会伤及正气,而黄秋葵作为优质的药食两用保健蔬菜,不仅能促进排便功能的恢复,增强胃肠动力,还能提高机体免疫功能,有助于改善脾虚型便秘患者的生活质量。本研究结果可为黄秋葵产品的开发利用提供新的思路。

参考文献:

- [1] 董彩文, 梁少华. 黄秋葵的功能特性及综合开发利用[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(5): 180-182.
- [2] 韩菊兰, 李臻, 胡韬, 等. 黄秋葵的功能特性及综合应用[J]. 现代农业科技, 2013, 20(3): 105-106.
- [3] 钱文文, 辛宝, 杨燕. 黄秋葵的营养保健功能及开发应用前景[J]. 现代中医药, 2016, 36(5): 112-115.
- [4] 国家中医药管理局, 中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 4322-4323.
- [5] 何宝佳, 魏蔚, 张艳华, 等. 不同产地黄秋葵粗多糖体外抗氧化活性研究[J]. 通化师范学院学报, 2020, 41(2): 13-16.
- [6] 邹颖, 郑学宝, 戴世学, 等. 小鼠脾虚便秘模型的建立[J]. 北京中医药, 2009, 28(1): 60-62.
- [7] 刘雪蕊. 黄秋葵多糖的提取及其降血糖活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
- [8] 杨琦. 归芪通便汤对便秘模型小鼠排便及血管活性肠肽的影响[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2015.
- [9] 张国民, 黄志芳, 刘惠萍, 等. 不同剂量生山药煎液对脾虚便秘模型小鼠的胃肠道影响[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(2): 272-275.
- [10] 景文祥, 杨国恩, 韩莹莉, 等. 甘蔗渣中木聚糖的提取研究[J]. 中国食品添加剂, 2013, 20(2): 88-93.
- [11] 李篮, 何群, 王欢欢, 等. 不同治疗方法对脾气虚证模型兔血清D-木糖含量的影响[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2165-2167.
- [12] 余玉英, 吴雅韵, 王露莎, 等. 复方贞术调脂方调节肠道糖吸收功能伴糖代谢改善的机制[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(5): 509-515.
- [13] 林仁敬, 鲁海燕, 何永恒, 等. 白术七物颗粒剂对气阴两虚型慢传输型便秘模型大鼠肠组织c-kit的影响及其作用机制[J]. 中国全科医学, 2017, 20(21): 2640-2643.
- [14] 徐冰, 杨云生, 彭丽华, 等. 便秘型肠易激综合征大鼠肠道Cajal间质细胞的免疫组织化学研究[J]. 临床医药实践杂志, 2005, 7(14): 485-487.
- [15] 魏珍珍, 方晓艳, 王灿, 等. 败酱总黄酮对局灶性脑缺血再灌注大鼠的神经保护作用及炎症因子的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(4): 396-402.
- [16] YEO W, CHAN S L, MO F, et al. Phase I/II study of temsirolimus for patients with unresectable Hepatocellular Carcinoma (HCC) – a correlative study to explore potential biomarkers for response[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 395-406.
- [17] HATEM A A, FEDRO A P, SYLVAIN B, et al. RANK-ligand (RANKL) expression in young breast cancer patients and during pregnancy[J]. Breast Cancer Res., 2015, 17(1): 24-35.
- [18] 郑小伟, 王颖, 宋红, 等. 三种脾气虚证模型大鼠血清胃泌素及胃窦G细胞的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(6): 338-340.
- [19] 樊欣荣, 朱文锋, 伍参荣, 等. 太阴与阳明病证实验大鼠小肠D-木糖的吸收功能及肝脏ATP酶活性研究[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(4): 47-49.
- [20] LI J, GOODYER C G, FELLOWS F, et al. Stem cell factor/C-kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 37(5-6): 961-972.
- [21] BASHAMBOO A, TAYLOR H, SAMUEL K, et al. The survival of differentiating embryonic stem cells is dependent on the SCF-KIT pathway[J]. J Cell Sci, 2006, 119(15): 3039-3046.
- [22] SUNG R, KIM Y C, YUN H Y, et al. Interstitial cells of Cajal (ICC) – like – C-kit positive cells are involved in gastritis and carcinogenesis in human stomach[J]. Oncol Rep, 2011, 26(1): 33-42.
- [23] 杜丽东, 牛亨惠, 吴国泰, 等. 当归对血虚便秘模型小鼠胃肠激素与酪氨酸激酶受体C-kit表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(10): 1195-1198.
- [24] 杨倩, 杜姚, 郭子敬, 等. 麻积降浊方对便秘型肠易激综合征大鼠肠道间质细胞的影响[J]. 中医杂志, 2015, 56(12): 1058-1060.
- [25] 林琳, 姜柳琴, 张红杰, 等. 慢传输运动小鼠结肠组织中Cajal间质细胞的改变[J]. 胃肠病学, 2006, 11(8): 462-467.
- [26] 丁瑞峰, 王爱鱼, 王宏杰, 等. 内脏高敏感大鼠结肠Cajal间质细胞C-kit表达增加[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(5): 566-569.
- [27] 束樱子. 益气健脾通便方对慢传输型便秘大鼠S-100蛋白及血清MTL, VIP的影响[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
- [28] 杜丽娟, 唐学贵, 吴至久, 等. VIP在慢性便秘大鼠结肠肌间神经丛中的表达和意义[J]. 医学理论与实践, 2011, 24(15): 1755-1756.
- [29] 王巍峰, 杨云生, 孙刚, 等. 肠易激综合征大鼠模型肠神经系统神经递质表达的初步研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2004, 13(6): 578-583.
- [30] 时乐. 生白术提取物治疗慢传输型便秘的作用及机理研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
- [31] 姜涛, 刘建, 王巧利, 等. 蒲辅周润肠通便制剂对慢传输型便秘小鼠血清血管活性肠肽及结肠组织一氧化氮的影响[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(10): 36-37.

(编辑: 邹元平)