

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.09.011

实验研究

通便汤对慢传输型便秘模型大鼠结肠组织 VAPB-PTPIP51 复合物及 Cajal 间质细胞自噬的影响

王楚越, 李家诚, 杨应奇, 沈思成, 陈志杨, 徐治中,
吴本升, 陈美瑶, 熊紫薇, 顾尽晖, 王晓鹏✉

南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏省苏州市姑苏区沧浪新城杨素路 18 号, 215009

[摘要] 目的 探讨通便汤治疗慢传输型便秘 (STC) 的可能作用机制。方法 将 24 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、通便汤组及莫沙必利组, 每组 6 只。除正常组以外, 其余各组均采用盐酸洛哌丁胺联合生理盐水灌胃法建立 STC 大鼠模型。造模成功后次日通便汤组大鼠给予通便汤药液 $18.63 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃, 莫沙必利组大鼠给予每只 $1.605 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 正常组和模型组大鼠给予 $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水灌胃, 各组均每日灌胃 1 次, 持续 7 天。最后一次灌胃 24 h 后计算各组大鼠粪便颗粒数、粪便含水率; 10% 活性炭悬液灌胃, 30 min 后计算小肠推进率; ELISA 法检测血清中胃泌素 (GAS)、胃动素 (MTL) 浓度; 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; 透射电镜观察结肠组织超微结构; Western Blot 法检测结肠组织中干细胞因子受体 (C-kit)、干细胞因子 (SCF)、自噬相关蛋白 5 (ATG5)、Beclin1、囊泡相关膜蛋白 B (VAPB)、蛋白酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白 51 (VAPB-PTPIP51) 蛋白水平; Real-time PCR 法检测结肠组织中 *C-kit*、*SCF*、*ATG5*、*Beclin1*、*VAPB*、*PTPIP51* mRNA 水平, 免疫组化检测结肠组织中 SCF、C-kit、Beclin1、ATG5 表达; ELISA 法检测结肠组织钙离子 (Ca^{2+}) 含量。结果 与正常组比较, 模型组大鼠粪便颗粒数、粪便含水率明显下降, 小肠推进率降低, 血清 GAS、MTL 浓度降低 ($P < 0.01$); 肠道杯状细胞数量下降, 肠黏膜层、肌层变薄; 结肠组织中 *ATG5*、*Beclin1* mRNA 表达及其蛋白水平明显升高, Ca^{2+} 含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 电镜显示结肠细胞内空泡样变性, 自噬体增多。与模型组比较, 通便汤组和莫沙必利组大鼠粪便颗粒数、粪便含水率、小肠推进率增加, 血清 GAS、MTL 浓度升高, 结肠组织 Ca^{2+} 含量升高, Beclin1、ATG5 蛋白水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 黏膜层厚度及杯状细胞数量显著增加, 结肠细胞内自噬体减少; 通便汤组 *ATG5*、*Beclin1* mRNA 表达降低, 莫沙必利组 *SCF*、*VAPB*、*PTPIP51* mRNA 表达升高, *Beclin1* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与莫沙必利组比较, 通便汤粪便颗粒数、粪便含水率、血清 GAS 浓度、结肠组织 Ca^{2+} 含量、C-kit 水平升高, ATG5、Beclin1 水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 通便汤可能通过上调线粒体-内质网互作时 VAPB-PTPIP51 复合物表达, 减轻 Cajal 间质细胞自噬, 促进肠道动力, 从而改善便秘症状。

[关键词] 慢传输型便秘; 自噬; 钙离子; Cajal 间质细胞; 囊泡相关膜蛋白 B; 蛋白酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白 51; 通便汤

基金项目: 国家卫生健康委能力建设和继续教育中心慢病管理研究课题 (GWJJMB202510010120); 江苏省自然科学基金 (BK20211085); 江苏省中医药发展计划项目 (ZD202528); 苏州市“科教强卫”面上项目 (MSXM2024028); 苏州市“科教强卫”项目 (ZDXM2025016); 苏州市科技计划项目 (SKY2023067); 苏州市临床重点病种诊疗技术专项 (LCZX202213); 姑苏卫生人才计划人才科研项目 (GSWS2024052); 苏州市青年科技人才托举工程 (QRC2507)

✉ 通讯作者: wxpeng2004@163.com

慢传输型便秘 (slow transit constipation, STC) 是功能性便秘中最常见的亚型, 约占功能性便秘的 55%, 主要表现为结肠蠕动速度缓慢、肠内容物排出延迟^[1]。STC 发病机制复杂, 结肠动力障碍是主要发病机制之一^[2]。Cajal 间质细胞 (ICC) 作为胃肠道慢波的起搏细胞, 其过度自噬与 STC 的发病机制密切相关^[3]。目前钙离子 (Ca^{2+}) 振荡学说是 ICC 细胞产生慢波电位的主流观点, 细胞外 Ca^{2+} 内流诱导内质网钙库释放 Ca^{2+} 及线粒体 Ca^{2+} 再摄取导致的钙振荡是起搏电位和慢波传播的基础^[4]。内质网、线粒体两者之间的相互作用称为内质网-线粒体互作, 与细胞内 Ca^{2+} 信号传导密切相关^[5]。当内质网钙库 Ca^{2+} 耗竭, 钙通道被激活, 大量细胞外 Ca^{2+} 内流, 导致细胞内 Ca^{2+} 稳态失衡, 诱发自噬性凋亡^[6]。线粒体相关内质网膜 (MAMs) 可以紧密连接线粒体外膜与内质网膜, 在 Ca^{2+} 运输过程中起到重要作用^[7-8]。MAMs 上的关键复合物囊泡相关膜蛋白 B (VAPB) 和蛋白酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白 51 (PTPIP51) 相互作用可以形成一个系链从而调节 Ca^{2+} 稳态^[9]。有研究发现, 上调 VAPB-PTPIP51 的表达可以增强内质网-线粒体信号传导, 可减轻 Ca^{2+} 从内质网转运到线粒体的损伤^[10]。因此, 提高 VAPB-PTPIP51 表达可能通过增强内质网-线粒体转运 Ca^{2+} 从而减轻 ICC 细胞自噬。

STC 属于中医学“便秘”范畴, 中医药通过调节 ICC 治疗 STC 优势明显^[11]。课题组前期根据吴门医派辨治便秘的医案处方进行数据挖掘^[12], 并结合临床经验总结出治疗 STC 的经验方通便汤。前期研究^[13]已证实, 通便汤可显著改善 STC 患者便秘相关症状。因此, 本研究从 VAPB-PTPIP51 及 ICC 细胞自噬角度探讨通便汤治疗 STC 的可能作用机制, 为其临床应用提供依据。本实验经南京中医药大学附属苏州市中医医院动物伦理委员会审核批准 (20241202-006)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只, 6~8 周龄, 体质量 220~250 g, 购自上海懿尚生物科技有限公司, 饲养于南京中医药大学动物实验中心, 实验动物许可证号 SCXK (沪) 2022-0011。饲养环境: 室温 18~20 °C, 湿度 65%~70%, 人工光照明暗各 12 h。

1.2 药物

通便汤组成: 白术 30 g (批号: 241126), 黄

芪 30 g (批号: 250117), 肉苁蓉 30 g (批号: 241009), 当归 15 g (批号: 250114), 苏州市博源药业有限公司; 瓜蒌仁 15 g (批号: 241109), 苦杏仁 12 g (批号: 241203), 陈皮 10 g (批号: 241217), 枳实 15 g (批号: 241204), 槟榔 15 g (批号: 241202), 苏州市天灵中药饮片有限公司; 桔梗 10 g (批号: 241122), 紫菀 10 g (批号: 231214), 锁阳 15 g (批号: 240806), 苏州市春晖堂药业有限公司。将通便汤生药饮片煎煮、过滤、浓缩成 $1.863 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的药液。盐酸洛哌丁胺 (MCE 公司, 规格: 10 mg, 批号 HY-B0418A), 配制 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 洛哌丁胺混悬液。枸橼酸莫沙必利片 (鲁南贝特制药, 规格: 5 mg, 批号 H19990317), 配制 $0.8025 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 混悬液。

1.3 主要试剂及仪器

磷酸酶抑制剂、RIPA 裂解液 (上海碧云天生物科技股份有限公司, 货号分别为 S1873、P0013B); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京康润诚业生物科技有限公司, 货号: E162-01); 干细胞因子受体 (C-kit) 抗体、干细胞因子 (SCF) 抗体、自噬相关蛋白 5 (ATG5) 抗体、自噬相关蛋白 Beclin1 抗体、HRP 二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号分别为 18696-1-AP、26582-1-AP、10181-2-AP、11306-1-AP、RGAR011); 大鼠胃泌素 (GAS)、胃动素 (MTL) ELISA 试剂盒 (江苏苏酶科生物科技有限公司, 货号分别为 MK6744B、MK2032B); 阿利新蓝-过碘酸雪夫 (AB-PAS) 染色试剂盒、苏木素染液、醇溶伊红染液 (安徽欣乐生物技术有限公司, 货号分别为 10262411、08202420、07202415); 钙含量显色检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 货号 S1063S); 总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 货号: DP424); 显影液 (上海生工生物工程股份有限公司, 货号: 500048-0001); 活性炭粉 (国药集团化学试剂有限公司, 货号: 7440-44-0); DBA 染色液 (福州迈新生物技术开发有限公司, 货号: KIT0038); 戊二醛、俄酸固定液、乙酸铀 (美国 Ted Pella 公司, 货号分别为: 18426、18456、19481); 硝酸铅 (美国 SPI CHEM 公司, 货号: 10099); 囊泡相关膜蛋白 B (VAPB) 抗体、蛋白酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白 51 (PTPIP51) 抗体 [安诺伦 (北京) 生物科技有限公司, 货号分别为: YN3532、YN5982]。

JEM1400 型透射电镜 (日本电子株式会社); UC-7 型超薄切片机 (徕卡相机股份公司); CX41

型显微镜（日本奥林巴斯株式会社）；YB-7LF 型生物组织包埋机（湖北亚光医用电子技术有限公司）；EPOCH2 型酶标仪（美国伯腾仪器有限公司）；Stepone Plus 型 Real Time PCR 仪（美国 Thermo Fisher 公司）；POWER/PAC300 型电泳仪（美国 Bio-RAD 有限公司）。

1.4 分组、造模及给药方法

适应性饲养 1 周后，将 24 只雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、通便汤组、莫沙必利组，每组 6 只。除正常组外，其余各组大鼠均采用盐酸洛哌丁胺 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 的剂量灌胃，每日 2 次，连续 14 天，构建 STC 大鼠模型^[14]。大鼠出现排便次数、粒数减少、大便干燥、排便困难等表明造模成功^[15]。正常组大鼠同时时间给予等体积生理盐水灌胃。

根据课题组前期预实验结果，造模成功后次日通便汤组大鼠给予通便汤药液 18.63 g·kg⁻¹ 灌胃（相当于临床剂量的 6.3 倍）^[16]，莫沙必利组大鼠给予每只 1.605 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃，正常组和模型组大鼠给予 10 ml·kg⁻¹ 生理盐水灌胃。各组均每日灌胃 1 次，持续 7 天。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 粪便颗粒数及含水率 最后一次灌胃后，禁食不禁水，24 h 后收集各组大鼠 1 天的全部粪便，计算粪便颗粒数，并称质量（即湿粪质量）。将全部粪便置于恒温箱中烘烤，烘烤温度为 110℃，时间为 3 h，烘干后再次称粪便质量（即干粪质量），计算粪便含水率 [粪便含水率=（湿粪质量-干粪质量）/湿粪质量×100%]。

1.5.2 碳墨推进实验测定肠道传输功能 粪便收集完成后，用 10% 活性炭悬液灌胃，30 min 后进行取材。取出幽门至回盲部全段小肠，并不加牵引力的剥离小肠使其平铺；用直尺测量并记录大鼠幽门括约肌位置到炭末推进末端距离和从幽门到回盲部的小肠全长，计算小肠推进率。小肠推进率=肠道内炭末推进距离/小肠全长×100%。

1.5.3 ELISA 法检测血清中 GAS、MTL 浓度 肠道传输功能测定完成后各组大鼠眼球取血，静置 30 min，3000 r/min 离心 5 min，离心半径 9 cm，取上层血清，按 ELISA 试剂盒说明书操作。酶标仪上 450 nm 处，以空白对照孔为标准，检测各孔光密度值。用 Curve 软件绘制出标准回归曲线，再用光密度值按 Curve 软件的方程，计算各组 GAS、MTL 浓度。

1.5.4 Real-time PCR 法检测结肠组织 *C-kit*、*SCF*、*ATG5*、*Beclin1*、*VAPB*、*PTPIP51* mRNA 表达 采用 Trnzol 法提取各组结肠组织样本总 RNA，以总 mRNA 为模板，逆转录 cDNA，逆转录产物可直接用于 Real-time PCR 反应，进行扩增。运用 Primer 5 软件设计引物，PCR 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成，引物序列见表 1。定量 PCR 扩增程序：94℃ 预变性 30 s，进入以下循环：94℃ 变性 5 s；60℃ 退火 30 s，共 40 个循环。以 β -actin 为内参，使用 ABI Stepone Plus 软件读取各 PCR 反应 Ct 值，用相对定量法计算目的基因的表达水平，相对表达量用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 表示。每个样本独立重复实验 3 次。

表 1 大鼠结肠组织 *C-kit*、*SCF*、*ATG5*、*Beclin1*、*VAPB* 和 *PTPIP51* 引物序列

Table 1 Primer sequences of <i>C-kit</i> , <i>SCF</i> , <i>ATG5</i> , <i>Beclin1</i> , <i>VAPB</i> , and <i>PTPIP51</i> in rat colon tissue		
基因	序列 (5'—3')	产物长度/bp
<i>C-kit</i>	上游: GTGCCCCGAAACAAGTCATCTCC	113
	下游: GGCTGAGGGTTCAACTTTATCCAC	
<i>SCF</i>	上游: CCCAGGCCTACAATGGACAG	75
	下游: AAGGCTCCAAAAGCAAAGCC	
<i>ATG5</i>	上游: GACCACAAGCAGCTCTGGAT	173
	下游: ACAGGACGGAACAGCTTCTG	
<i>Beclin1</i>	上游: GGGTCTAAGCGCTCCAGCAG	114
	下游: TTCCTGAATGCTCACTCGGTCC	
<i>VAPB</i>	上游: CACGAGCTCAAGTTCCGAGG	252
	下游: GGGCGGAGCAAACATAGACT	
<i>PTPIP51</i>	上游: GAGATTGTCGGGGAGGTTTCG	82
	下游: TCTCCCTGGCAAAGGGAAC	
β -actin	上游: GTCGTACCACTGGCATTGTG	180
	下游: TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG	

注: *C-kit*, 干细胞因子受体; *SCF*, 干细胞因子; *ATG5*, 自噬相关蛋白 5; *VAPB*, 囊泡相关膜蛋白 B; *PTPIP51*, 蛋白酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白 51; β -actin, β -肌动蛋白。

1.5.5 Western Blot 法检测结肠组织 *C-kit*、*SCF*、*ATG5*、*Beclin1*、*VAPB*、*PTPIP51* 蛋白水平 取大鼠结肠组织 100 mg，加入 RIPA 裂解液 100 μ l，制备蛋白样品并进行 SDS-PAGE 凝胶，半干电泳转移，转膜，PVDF 膜置入。4℃ 下以 *C-kit* (1: 5000)、*SCF* (1: 1000)、*ATG5* (1: 1000)、*Beclin 1* (1: 250)、*VAPB* (1: 500)、*PTPIP51* (1: 1000) 一抗孵育过夜，清洗 PVDF 膜 4 次，加入 HRP 二抗 (1: 1000)，37℃ 温育 2 h。用显影液显影并成像，Image J 1.8.0 软件对图像进行分析处理。

1.5.6 结肠组织病理观察 取大鼠远端结肠组织

100 mg 用生理盐水进行清理后放入 4% 多聚甲醛中进行固定、脱水、透明、浸蜡与包埋，制成蜡块，石蜡切片。苏木精-伊红 (HE) 染色观察结肠组织结构杯状细胞和隐窝的深度；AB-PAS 染色观察结肠肌层、黏膜层厚度、杯状细胞数以及黏膜层中黏液物质面积等结肠组织学参数。

1.5.7 免疫组化检测结肠自噬相关蛋白水平 大鼠结肠组织石蜡切片脱蜡至水，依次抗原修复，阻断内源性过氧化物酶，滴加山羊血清封闭液，加入一抗 SCF (1:250)、C-kit (1:1000)、Beclin1 (1:200)、ATG5 (1:2000)，4℃过夜后滴加 HRP 二抗 (1:4000)，磷酸盐缓冲液 (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 图像分析系统测量蛋白阳性表达区域的平均光密度值 (平均光密度值=积分光密度/阳性像素总面积)。

1.5.8 透射电镜观察大鼠结肠超微结构 取大鼠部分远端结肠组织 1 mm³，于 2.5% 戊二醛中固定，4℃保存。取出切块的结肠组织，PBS 漂洗 3 次，每次 10~15 min；1% 锇酸固定液固定 2 h，梯度乙醇脱水处理，环氧树脂浸透，包埋。超薄切片机切片后，3% 乙酸铀及硝酸铅双染色，透射电镜观察并拍片。

1.5.9 结肠组织 Ca²⁺ 含量检测 取约 100 mg 结肠组织，于冰上加入适量生理盐水进行组织匀浆，在匀浆器中充分匀浆后于 4℃、12 000 r/min (离心半径 9 cm) 离心 10 min，取上清备用。将 50 μl 样品加入 96 孔板中，加入 250 μl 显色工作液，轻轻混匀后于室温孵育 10 min。使用酶标仪在吸光度 575 nm 处测定吸光度。绘制标准曲线图，并依据标准曲线计算结肠组织中 Ca²⁺ 含量。

表 2 各组大鼠小肠推进率、粪便含水率、粪便颗粒数及血清 GAS、MTL 浓度比较

Table 2 Comparison of small intestinal transit rate, fecal water content, fecal pellet number, and serum GAS and MTL levels among groups of rats

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	粪便颗粒数/个	粪便含水率/%	小肠推进率/%	GAS 浓度/pg·ml ⁻¹	MTL 浓度/pg·ml ⁻¹
正常组	6	17.67±0.42	55.66±1.08	67.18±3.03	352.92±33.25	428.09±42.29
模型组	6	10.17±0.60 ^{a)}	31.52±1.66 ^{a)}	15.80±1.20 ^{a)}	161.64±23.65 ^{a)}	226.17±35.65 ^{a)}
通便汤组	6	16.17±0.48 ^{b)}	49.36±1.29 ^{b)}	62.70±4.13 ^{b)}	281.67±36.04 ^{b)}	342.13±43.33 ^{b)}
莫沙必利组	6	13.00±0.37 ^{b) d)}	39.54±0.70 ^{b) d)}	52.34±2.92 ^{b)}	220.77±40.19 ^{c) e)}	300.65±29.17 ^{c)}

注：GAS，胃泌素；MTL，胃动素。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与通便汤组比较， $P<0.01$ ；e) 与通便汤组比较， $P<0.05$ 。

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计分析，计量资料均符合正态分布用均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组数据间比较采用单因素方差分析，两组间数据采用 LSD 分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠粪便颗粒数及含水率、小肠推进率和血清 GAS、MTL 浓度比较

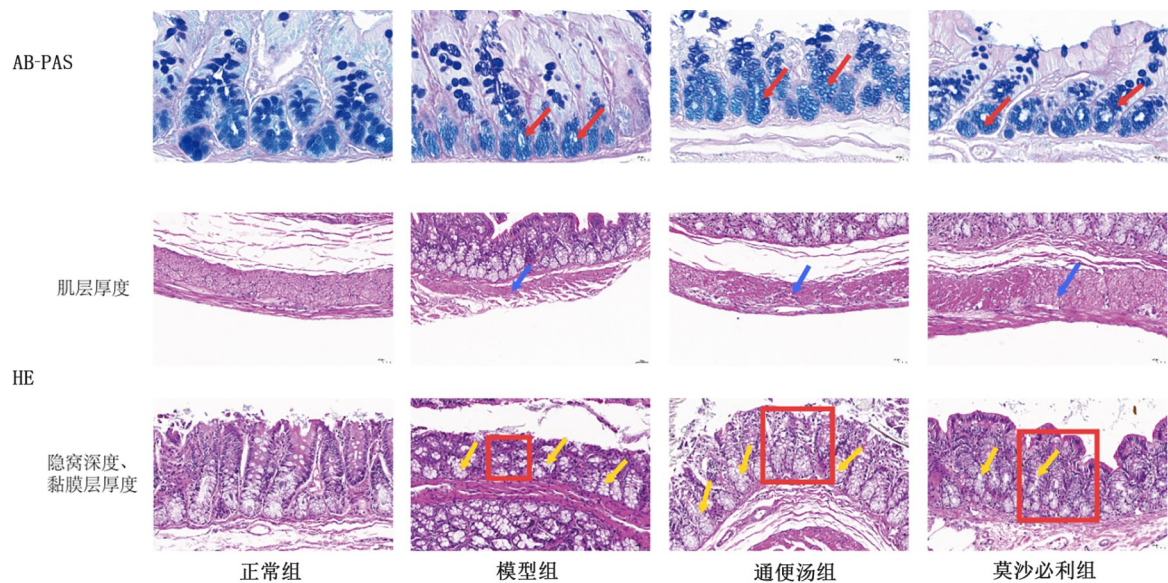
表 2 示，与正常组比较，模型组大鼠粪便颗粒数、粪便含水率、小肠推进率明显下降，血清 GAS、MTL 浓度降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，通便汤组和莫沙必利组大鼠粪便颗粒数、粪便含水率、小肠推进率增加，血清 GAS、MTL 浓度升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与莫沙必利组比较，通便汤粪便颗粒数、粪便含水率和血清 GAS 浓度升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 各组大鼠结肠组织 HE 染色、AB-PAS 染色病理结果比较

图 1 示，正常组大鼠结肠组织见腺体结构正常，排列密集，杯状细胞完整；模型组大鼠结肠黏膜层、肌层变薄，隐窝深度显著变浅，杯状细胞明显减少，细胞形态瘦小，排列不整齐；通便汤组、莫沙必利组大鼠黏膜层厚度较模型组恢复，结肠肌层增厚，隐窝深度增加，杯状细胞数量显著增加。

2.3 各组大鼠结肠组织 SCF、C-kit、ATG5、Beclin1、VAPB、PTPIP51 mRNA 表达比较

表 3 示，与正常组相比，模型组大鼠结肠组织中 ATG5、Beclin1 mRNA 表达升高，SCF、C-kit、VAPB、PTPIP51 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，通便汤组 ATG5、Beclin1 mRNA 表达降低；莫沙必利组 SCF、VAPB、PTPIP51 mRNA 表达升高，Beclin1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注：红色箭头示杯状细胞；蓝色箭头示肌层厚度；黄色箭头示隐窝深度；红色方框示黏膜层厚度。

图1 各组大鼠结肠组织HE染色、AB-PAS染色病理图（×400）

Figure 1 Histopathological images of HE staining and AB-PAS staining of colon tissue in rats from each group (×400)

表3 各组大鼠结肠组织SCF、C-kit、ATG5、Beclin1、VAPB、PTPIP51 mRNA表达比较

Table 3 Comparison of mRNA expression levels of SCF, C-kit, ATG5, Beclin1, VAPB, and PTPIP51 in colon tissue among groups of rats (x̄±s)

组别	鼠数	C-kit	SCF	ATG5	Beclin1	VAPB	PTPIP51
正常组	6	1.02±0.20	1.01±0.19	1.02±0.20	1.01±0.15	1.01±0.17	1.01±0.15
模型组	6	0.37±0.04 ^{a)}	0.42±0.07 ^{a)}	1.98±0.39 ^{a)}	2.91±0.46 ^{a)}	0.57±0.07 ^{a)}	0.47±0.05 ^{a)}
通便汤组	6	0.66±0.09	0.59±0.09	1.21±0.21 ^{b)}	1.38±0.27 ^{c)}	0.77±0.09	0.69±0.10
莫沙必利组	6	0.72±0.09	0.74±0.06 ^{b)}	1.33±0.24	1.73±0.28 ^{c)}	0.88±0.09 ^{b)}	0.83±0.13 ^{b)}

注：C-kit，干细胞因子受体；SCF，干细胞因子；ATG5，自噬相关蛋白5；VAPB，囊泡相关膜蛋白B；PTPIP51，蛋白酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白51。

a) 与正常组比较，P<0.01；b) 与模型组比较，P<0.05；c) 与模型组比较，P<0.01。

2.4 各组大鼠结肠组织中C-kit、SCF、ATG5、Beclin1蛋白免疫组化检测水平比较

表4示，与正常组比较，模型组大鼠结肠组织SCF、C-kit水平降低，Beclin1、ATG5水平升高(P<0.01)。与模型组比较，通便汤组大鼠结肠组织SCF、C-kit水平升高，Beclin1、ATG5水平显著降低；莫沙必利组Beclin1、ATG5水平亦降低(P<

0.05或P<0.01)。各组大鼠结肠组织C-kit、SCF、ATG5、Beclin1蛋白免疫组化图见图2。

2.5 各组大鼠结肠组织C-kit、SCF、ATG5、Beclin1、VAPB、PTPIP51蛋白Western Blot法检测结果比较

表5示，与正常组比较，模型组大鼠结肠组织中ATG5、Beclin1水平升高，C-kit、SCF、VAPB、

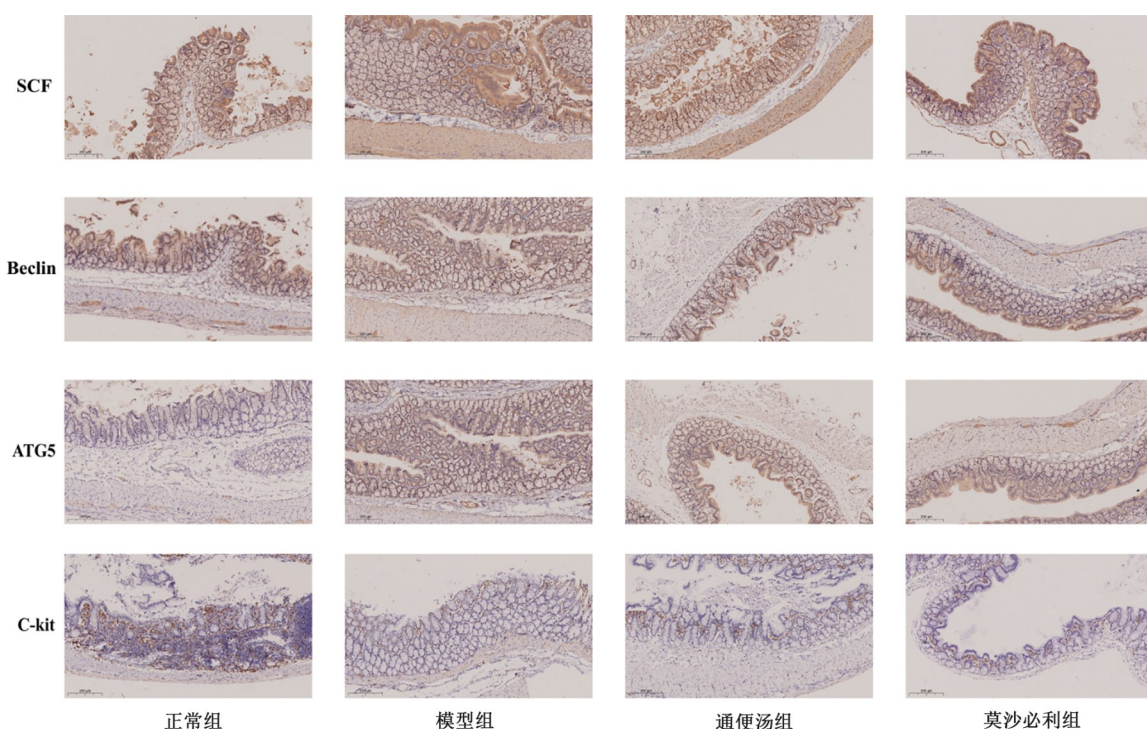
表4 各组大鼠结肠组织C-kit、SCF、ATG5、Beclin1蛋白免疫组化检测水平比较

Table 4 Comparison of immunohistochemical protein expression levels of C-kit, SCF, ATG5, and Beclin1 in colon tissue among groups of rats (x̄±s)

组别	鼠数	C-kit	SCF	ATG5	Beclin1
正常组	6	0.043±0.002	0.043±0.003	0.032±0.002	0.028±0.005
模型组	6	0.024±0.001 ^{a)}	0.021±0.002 ^{a)}	0.066±0.009 ^{a)}	0.063±0.006 ^{a)}
通便汤组	6	0.035±0.006 ^{b)}	0.039±0.005 ^{c)}	0.039±0.007 ^{c)}	0.036±0.006 ^{c)}
莫沙必利组	6	0.029±0.005	0.030±0.002	0.042±0.003 ^{c)}	0.044±0.005 ^{b)}

注：C-kit，干细胞因子受体；SCF，干细胞因子；ATG5，自噬相关蛋白5。

a) 与正常组比较，P<0.01；b) 与模型组比较，P<0.05；c) 与模型组比较，P<0.01。



注：棕褐色区域为目标蛋白表达；蓝紫色区域为细胞核复染；C-kit，干细胞因子受体；SCF，干细胞因子；ATG5，自噬相关蛋白5。

图2 各组大鼠结肠组织C-kit、SCF、ATG5、Beclin1蛋白免疫组化图(×200)

Figure 2 Immunohistochemical images of C-kit, SCF, ATG5, and Beclin1 protein expression in colon tissue of rats in each group (×200)

表5 各组大鼠结肠组织C-kit、SCF、ATG5、Beclin1、VAPB、PTPIP51蛋白Western Blot法检测结果比较

Table 5 Comparison of Western Blot results of C-kit, SCF, ATG5, Beclin1, VAPB, and PTPIP51 protein expression in colon tissue among groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	C-kit	SCF	ATG5	Beclin1	VAPB	PTPIP51
正常组	6	1.000±0.104	0.961±0.054	0.436±0.025	0.247±0.010	0.816±0.050	0.961±0.054
模型组	6	0.599±0.125 ^{a)}	0.517±0.033 ^{b)}	0.923±0.039 ^{b)}	0.803±0.045 ^{b)}	0.305±0.056 ^{b)}	0.517±0.033 ^{b)}
通便汤组	6	1.417±0.133 ^{c)}	0.655±0.039 ^{d)}	0.581±0.018 ^{c)}	0.423±0.007 ^{c)}	0.571±0.047 ^{c)}	0.655±0.039 ^{d)}
莫沙必利组	6	0.900±0.077 ^{d) e)}	0.725±0.053 ^{c)}	0.668±0.032 ^{c) f)}	0.548±0.023 ^{c) e)}	0.676±0.066 ^{c)}	0.725±0.053 ^{c)}

注：C-kit，干细胞因子受体；SCF，干细胞因子；ATG5，自噬相关蛋白5；VAPB，囊泡相关膜蛋白B；PTPIP51，蛋白酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白51。

a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与正常组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与通便汤组比较， $P<0.01$ ；f) 与通便汤组比较， $P<0.05$ 。

PTPIP51水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，通便汤组和莫沙必利组大鼠结肠组织ATG5、Beclin1水平降低，C-kit、SCF、VAPB、PTPIP51水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与通便汤组比较，莫沙必利组大鼠结肠组织C-kit水平降低，ATG5、Beclin1水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠结肠组织C-kit、SCF、ATG5、Beclin1、VAPB、PTPIP51蛋白电泳图见图3。

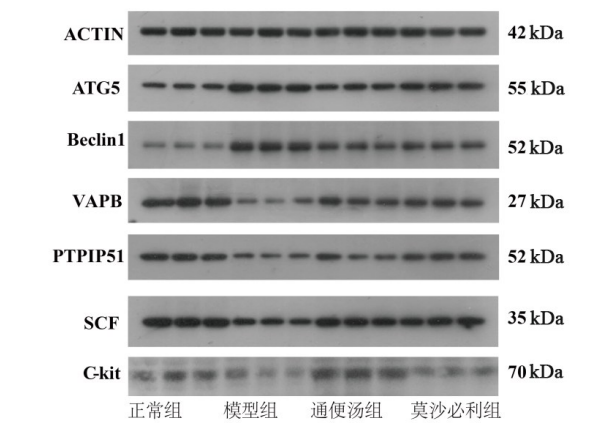
2.6 各组大鼠结肠组织Ca²⁺含量比较

表6示，与正常组比较，模型组大鼠结肠组织

Ca²⁺含量显著下降($P<0.01$)。与模型组比较，通便汤组和莫沙必利组大鼠结肠组织Ca²⁺含量明显上升($P<0.01$)，且通便汤组Ca²⁺含量高于莫沙必利组($P<0.05$)。

2.7 各组大鼠结肠组织超微结构比较

图4示，正常组可见结肠组织中ICC细胞丰富且结构完整的细胞器，无明显自噬体；模型组可见线粒体结构被破坏，有空泡样变性，自噬体明显增多；通便汤组结肠ICC各细胞器结构较完整，未见明显自噬体或自噬体较少。



注：C-kit，干细胞因子受体；SCF，干细胞因子；ATG5，自噬相关蛋白5；VAPB，囊泡相关膜蛋白B；PTPIP51，蛋白酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白51。

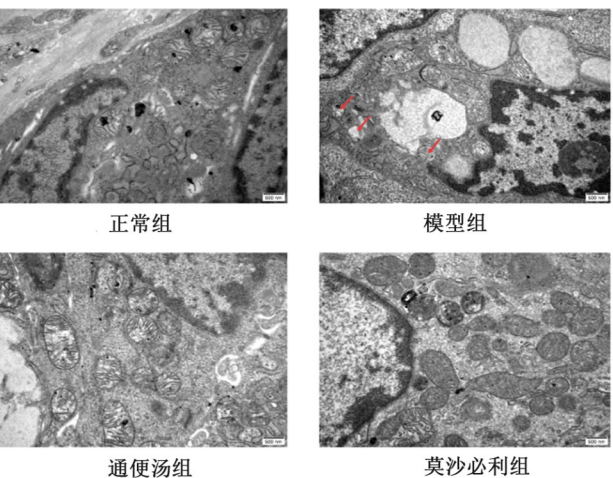
图3 各组大鼠结肠组织C-kit、SCF、ATG5、Beclin1、VAPB、PTPIP51蛋白电泳图

Figure 3 Western Blot electrophoretic bands of C-kit, SCF, ATG5, Beclin1, VAPB, and PTPIP51 proteins in colon tissue of rats in each group

表6 各组大鼠结肠组织Ca²⁺含量比较
Table 6 Comparison of Ca²⁺ content in colon tissue among groups of rats (μmol·g⁻¹, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Ca ²⁺ 含量
正常组	6	47.98±1.63
模型组	6	30.22±1.27 ^{a)}
通便汤组	6	43.78±1.19 ^{b)}
莫沙必利组	6	39.94±1.56 ^{b) c)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与通便汤组比较， $P<0.05$ 。



注：红色箭头指示为自噬体；A，正常组；B，模型组；C，通便汤组；D，莫沙必利组。

图4 各组大鼠结肠组织透射电镜超微结构图(×25 000)
Figure 4 Transmission electron microscopy images of the ultra-structure of colon tissue in rats from each group (×25 000)

3 讨论

《素问·五脏别论篇》载：“魄门亦为五脏使”，表明魄门（肛门）虽属大肠，但并非只由大肠统摄，而是五脏功能的体现。故魄门启闭正常，大便顺利排出不仅有赖于大肠的传导，还依赖肝气条达、脾气启闭、肾气开阖、肺气肃降、心神主宰。课题组继承清代吴门医派医家宣肺运脾温肾等治疗思路^[12]，结合临床经验拟定通便汤。方中黄芪、白术健脾补中、当归润燥通便。锁阳、肉苁蓉温肾益精，暖腰润肠。紫菀、苦杏仁、桔梗宣降肺气，具有“提壶揭盖”作用，布津化液于大肠；瓜蒌仁润肺化痰，滑肠通便，归于肺经；槟榔、枳实、陈皮行腑气，归于大肠经。诸药合用，发挥宣肺健脾温肾润肠通便之功。前期临床研究^[17]证实，通便汤能显著改善盆底障碍型便秘人群的肛管直肠静息压、初始感觉阈值、排便窘迫感觉阈值和直肠最大耐受量，临床效果显著。现代研究^[18]显示，胃肠激素可以增加平滑肌收缩，加强肠道蠕动，而STC患者胃肠道激素含量显著降低。本实验结果显示，与正常组相比，模型组大鼠小肠推进率、粪便颗粒数、粪便含水率明显减少，血清GAS、MTL浓度降低；结肠杯状细胞明显减少，排列不整齐，隐窝深度显著变浅，黏膜层、肌层变薄，提示STC大鼠肠道动力障碍，肠道结构受损。与模型组相比，通便汤组和莫沙必利组大鼠粪便数量和含水率明显增加，肠道推进率提高，结肠内MTL、GAS的含量增加，结肠杯状细胞数量、结肠黏膜层和肌层厚度均改善。同时，通便汤组在粪便含水率、颗粒数、GAS等方面的改善优于莫沙必利组，说明通便汤在改善肠道动力、缓解STC症状等方面更具优势。

STC是以结肠传输功能障碍为主的一种功能性便秘，ICC细胞可以产生结肠慢波，促进肠道蠕动，其数量、分布和结构异常与STC的发病密切相关^[19]。STC模型大鼠中，ICC细胞表现出过度自噬^[3]，提示肠道动力障碍的发病机制可能与ICC细胞的过度自噬和分化异常有关。人体肠腔的ICC细胞起搏电位和慢波传播与ICC细胞中Ca²⁺浓度呈动态相关，表达特征性Ca²⁺依赖性电导^[20-21]。研究^[22-23]表明，VAPB或PTPIP51的过量表达可增强内质网与线粒体间的联系，从而抑制自噬的形成，反之则促进细胞自噬。因此，在STC发生发展过程中，VAPB-PTPIP51复合物可能通过调节内质网-线粒体互作影响Ca²⁺的流动，进而诱发ICC细胞选择性自噬。C-kit及其配体SCF是ICC细胞的特异性

标志物, ATG5 和 Beclin1 是自噬体形成过程中所必需的两种自噬相关蛋白质^[24]。本研究结果显示, 模型组大鼠结肠组织中 ATG5、Beclin1 mRNA 表达升高, SCF、C-kit、VAPB、PTPIP51 mRNA 降低, Western Blot 法及免疫组化结果亦显示 SCF、C-kit、VAPB、PTPIP51 水平降低, Beclin1、ATG5 水平增加, 同时结肠组织 Ca²⁺ 含量显著下降, 透射电镜进一步表明结肠组织线粒体结构被破坏, 有空泡样变性, 自噬体明显增多, 提示 VAPB-PTPIP51 介导的细胞内 Ca²⁺ 失衡导致的 ICC 细胞过度自噬引起的肠道动力障碍是导致 STC 的重要原因之一。而通便汤干预后, 可以提高 SCF、C-kit、VAPB、PTPIP51 水平及其 mRNA 表达, 降低 ATG5、Beclin1 水平及其 mRNA 表达, 同时增加 Ca²⁺ 含量, 电镜结果显示治疗后结肠 ICC 细胞各细胞器结构较完整, 自噬体明显减少, 提示通便汤可以有效改善 STC 大鼠 ICC 细胞过度自噬, 可能和增加 VAPB 和 PTPIP51 表达从而保持细胞内 Ca²⁺ 稳态有关。另外, 通便汤组在 C-kit、ATG5、Beclin1 及 Ca²⁺ 含量方面的改善优于莫沙必利组, 说明通便汤可能在改善结肠细胞自噬, 维持细胞 Ca²⁺ 稳态等方面优于莫沙必利, 但需进一步研究证实。

综上所述, 通便汤可以通过上调线粒体-内质网互动时 VAPB 和 PTPIP51 的表达从而减轻 ICC 细胞自噬, 改善肠道动力, 从而改善 STC 大鼠的便秘症状, 为临床应用通便汤治疗 STC 提供一定的选择及实验依据。但本研究样本量有限, 后续应扩大样本以进一步验证结果的稳健性。此外, 本研究仅初步检测了 VAPB 和 PTPIP51 蛋白和 mRNA 表达情况, 未来可以通过细胞实验或进一步利用基因敲除等技术明确 VAPB-PTPIP51 复合物在通便汤治疗 STC 疗效中的作用机制。

参考文献

- [1] AZIZ I, WHITEHEAD W E, PALSSON O S, et al. An approach to the diagnosis and management of Rome IV functional disorders of chronic constipation [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 14(1): 39-46.
- [2] SHAHID S, RAMZAN Z, MAURER A H, et al. Chronic idiopathic constipation: more than a simple colonic transit disorder [J]. J Clin Gastroenterol, 2012, 46(2): 150-154.
- [3] ZHENG H, LIU Y J, CHEN Z C, et al. miR-222 regulates cell growth, apoptosis, and autophagy of interstitial cells of Cajal isolated from slow transit constipation rats by targeting c-kit [J]. Indian J Gastroenterol, 2021, 40(2): 198-208.
- [4] 陈健海, 仲婕, 王凡, 等. 胃肠道 Cajal 间质细胞起搏功能的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(1): 184-188.
- [5] 屈川人, 刘奎. 内质网-线粒体互作与钙稳态 [J]. 中国科学: 生命科学, 2024, 54(8): 1327-1336.
- [6] WEN Y, ZHAN Y, CHEN T, et al. Total flavonoids of aurantii fructus immaturus regulate miR-5100 to improve constipation by targeting Fzd2 to alleviate calcium balance and autophagy in interstitial cells of Cajal [J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(8): 5882-5900.
- [7] ZHANG Y, YAO J Y, ZHANG M M, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs): possible therapeutic targets in heart failure [J]. Front Cardiovasc Med, 2023, 26: 10: 1083935. doi: 10.3389/fcvm.2023.1083935.
- [8] GIL-HERNÁNDEZ A, SILVA-PALACIOS A. Relevance of endoplasmic reticulum and mitochondria interactions in age-associated diseases [J]. Ageing Res Rev, 2020, 64: 101193. doi: 10.1016/j.arr.2020.101193.
- [9] JIANG T, RUAN N, LUO P, et al. Modulation of ER-mitochondria tethering complex VAPB-PTPIP51: novel therapeutic targets for aging-associated diseases [J]. Ageing Res Rev, 2024, 98: 102320. doi: 10.1016/j.arr.2024.102320.
- [10] MARKOVINOVIC A, MARTÍN-GUERREROS M, MÓROTZ G M, et al. Stimulating VAPB-PTPIP51 ER-mitochondria tethering corrects FTD/ALS mutant TDP43 linked Ca²⁺ and synaptic defects [J]. Acta Neuropathol Commun, 2024, 12(1): 32.
- [11] 黄业保, 刘春强. 中医药治疗慢传输型便秘的实验研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 87-89.
- [12] 吴凯文, 陈涤平, 李文林, 等. 历代吴门医派存世文献中诊治便秘方药特色分析及价值 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(4): 541-544.
- [13] 颜帅, 董宏利, 乐音子, 等. 通便汤治疗老年慢传输型便秘多中心、双盲、随机对照临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 1171-1174.
- [14] 阳艾玲, 闫怡欣, 何昊, 等. 四种小鼠功能性便秘模型制备的比较研究 [J]. 中国医学工程, 2019, 27(3): 1-4.
- [15] 许燕城, 刘启鸿, 柯晓. 慢传输型便秘动物模型的研究进展 [J]. 医学综述, 2022, 28(8): 1561-1567.
- [16] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [17] YUE Y, WANG X, YANG H, et al. Clinical efficacy of the traditional Chinese herbal formula, (Tong Bian Decoction) on laxative dependence constipation in elderly persons: a randomized, multicenter, controlled trial [J]. Eur J Integr Med, 2018, 24: 23-29. doi: 10.1016/j.

- eujim. 2018. 10. 010.
- [18]李雪. 慢传输型便秘患者结肠动力学与胃肠激素的关系研究[J]. 当代临床医刊, 2023, 36(3): 13-14.
- [19]HUIZINGA J D, HUSSAIN A, CHEN J H. Interstitial cells of Cajal and human colon motility in health and disease [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2021, 321(5): G552-G575.
- [20]BAKER S A, KARWA M, LEE J Y, et al. Ca^{2+} signaling in myenteric interstitial cells of Cajal (ICC-MY) and their role as conditional pacemakers in the colon [J]. Cell Calcium, 2024, 125: 102990. doi: 10.1016/j.ceca.2024.102990.
- [21]SANDERS K M, DRUMM B T, COBINE C A, et al. Ca^{2+} dynamics in interstitial cells: foundational mechanisms for the motor patterns in the gastrointestinal tract [J]. Physiol Rev, 2024, 104(1): 329-398.
- [22]GOMEZ-SUAGA P, PAILLUSSON S, STOICA R, et al. The ER-Mitochondria tethering complex VAPB-PTPIP51 regulates autophagy [J]. Current Biology, 2017, 27(3): 371-385.
- [23]GÓMEZ-SUAGA P, PÉREZ-NIEVAS B G, GLENNON E B, et al. The VAPB-PTPIP51 endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins are present in neuronal synapses and regulate synaptic activity [J]. Acta Neuropathol Commun, 2019, 7(1):35.
- [24]ZHANG L, SONG Z, HUANG X, et al. Research progress on the regulation of interstitial cell of Cajal autophagy and apoptosis crosstalk by traditional Chinese medicine in gastrointestinal motility disorders [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 351: 120128. doi: 10.1016/j.jep.2025.120128.

Effect of *Tongbian Decoction* (通便汤) on the VAPB-PTPIP51 Complex and Autophagy of Interstitial Cells of Cajal in the Colon of Slow Transit Constipation Model Rats

WANG Chuyue, LI Jiacheng, YANG Yingqi, SHEN Sicheng, CHEN Zhiyang, XU Zhizhong, WU Bensheng, CHEN Meiyao, XIONG Ziwei, GU Jinhui, WANG Xiaopeng

Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou, 215009

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Tongbian Decoction* (通便汤, TD) in treating slow transit constipation (STC). **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into normal group, model group, TD group, and mosapride group, with 6 rats per group. Except for the normal group, STC models were established by intragastric administration of loperamide hydrochloride combined with normal saline. On the day following successful model establishment, rats in the TD group received $18.63 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of TD by gavage, while those in the mosapride group received $1.605 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ of mosapride, and those in the normal group and the model group received $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ of normal saline by gavage. All treatments were administered once daily for 7 consecutive days. Twenty-four hours after the last administration, fecal pellet number and fecal water content were measured. After intragastric administration of a 10% activated charcoal suspension, the small intestinal transit rate was calculated 30 minutes later. Serum levels of gastrin (GAS) and motilin (MTL) were measured by ELISA. Colonic histopathology was observed by HE staining, and mucus secretion by Alcian blue-periodic acid-Schiff (AB-PAS) staining. Ultrastructure of colon tissue was examined using transmission electron microscopy. Protein expression levels of C-kit, stem cell factor (SCF), autophagy-related protein 5 (ATG5), Beclin1, vesicle-associated membrane protein B (VAPB), and protein tyrosine phosphatase interacting protein 51 (VAPB-PTPIP51) were measured by Western Blot, and the mRNA levels were detected by real-time PCR. Immunohistochemistry was used to detect SCF, C-kit, Beclin1, and ATG5 expression. The calcium content in colon tissue was determined by ELISA. **Results** Compared to the normal group, rats in the model group showed significantly reduced fecal pellet number, fecal water content, small intestinal transit rate, and serum GAS and MTL levels ($P < 0.01$); the number of goblet cells decreased, and the mucosal and muscular layers of the colon became thinner; mRNA and protein expression levels of ATG5 and Beclin1 in colon tissue significantly increased, while calcium content decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); and electron microscopy revealed vacuolar degeneration and increased autophagosomes in colonic cells. Compared to the model group, both TD group and mosapride group showed increased fecal pellet number, fecal water content, small intestinal transit rate, serum GAS and MTL levels, and colonic calcium content, along with decreased Beclin1 and ATG5 protein levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the mucosal thickness and goblet cell number increased significantly, and autophagosomes decreased; in the TD group, ATG5 and Beclin1 mRNA levels decreased; in the mosapride group, SCF, VAPB, and PTPIP51 mRNA levels increased, while Beclin1 mRNA decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the mosapride group, the TD group showed higher fecal pellet number, fecal water content, serum GAS levels, colonic calcium content, and C-kit expression, along with lower ATG5 and Beclin1 levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** TD may improve constipation symptoms by upregulating the VAPB-PTPIP51 complex during mitochondria-endoplasmic reticulum interactions, reducing autophagy of interstitial cells of Cajal, and promoting intestinal motility.

Keywords slow transit constipation; autophagy; calcium; interstitial cells of Cajal; vesicle-associated membrane protein B; protein tyrosine phosphatase interacting protein 51; *Tongbian Decoction* (通便汤)

(收稿日期: 2025-10-23; 录用日期: 2025-12-18; 修回日期: 2026-03-05)

[编辑: 邓媛]