基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003583

长期服用普芦卡必利对慢传输型便秘雌性大鼠肠道组织及5-HT受体表达水平影响的研究

何 峰，王 琴
（贵州中医药大学第一附属医院肛肠科，贵阳 550000）

【摘 要】目的：探究长期口服普芦卡必利对慢传输型便秘雌性大鼠肠道组织及5-HT受体表达水平的影响，为该药在临床治疗中的规范应用提供理论支持。**方法：**选用成年雌性SD大鼠，将其随机分为正常组、模型组以及普芦卡必利（力洛）组，并进行为期2个月的干预。观察指标包括大鼠首次白便排出时间、粪便含水率、结肠含水量、肠道组织病理和黏液分泌情况，以及5-羟色胺（5-Hydroxytryptamine，5-HT）、5-羟色胺3受体（5-Hydroxytryptamine Receptor 3，5-HT3R）、5-羟色胺4受体（5-Hydroxytryptamine Receptor 4，5-HT4R）蛋白表达等变化。**结果：**长期服用普芦卡必利显著改善了慢传输型便秘大鼠的排便时间、结肠含水量和粪便含水率等指标（$P<0.05$）。结肠病理组织染色和黏液染色结果表明，该药物能够改善大鼠结肠组织的病理状态和结肠黏液分泌情况。酶联免疫吸附（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay，ELISA）和免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）检测显示，与模型组相比，力洛组的5-HT、5-HT3R、5-HT4R蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$），而与空白组相比，力洛组的蛋白表达水平无显著差异（$P>0.05$）。**结论：**长期服用普芦卡必利有助于改善慢传输型便秘模型大鼠的疾病状态、肠道组织病理状态和结肠黏液分泌情况，同时提高了5-HT受体的表达水平。

【关键词】普芦卡必利；慢传输型便秘；5-羟色胺；5-羟色胺3受体；5-羟色胺4受体
【中图分类号】R926 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2024-01-22

Effect of long-term administration of prucalopride on intestinal tissue and the expression levels of 5-HT receptors in female rats with slow transit constipation

He Feng, *Wang Qin*
(*Department of Coloproctology*, *The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the impact of long-term oral administration of prucalopride on intestinal tissue and the expression levels of 5-HT receptors in female rats with slow transit constipation, and to provide theoretical support for the standardized application of this drug in clinical treatment. ***Methods*:** Adult female Sprague-Dawley rats were selected and randomly divided into normal group, model group, and prucalopride (Resolor) group, and intervention was performed for 2 months. Related indicators were observed, including time to white stool discharge, fecal water content, colonic water content, intestinal histopathology and mucus secretion, and the expression of 5-HT, 5-HT3R, and 5-HT4R. ***Results*:** Long-term administration of prucalopride significantly improved defecation time, colonic water content, and fecal water content in rats with slow transit constipation ($P<0.05$). Colonic pathological tissue staining and mucus staining showed that the drug could improve the pathological status of colonic tissue and colonic mucus secretion in rats. ELISA and IHC showed that compared with the model group, the Resolor group had significant increases in the protein expression levels of 5-HT, 5-HT3R, and 5-HT4R ($P<0.05$), while there were no significant differences in protein expression levels between the Resolor group and the blank group ($P>0.05$). ***Conclusion*:** Long-term use of prucalopride helps to improve disease status, intestinal tissue pathology, and colonic mucus secretion in rats with slow transit constipation and increase the expression levels of 5-HT receptors.

【Key words】 prucalopride; slow transit constipation; 5-HT; 5-HT3R; 5-HT4R

作者介绍：何 峰，Email：460597689@qq.com，研究方向：肠疾病诊治与研究。
通信作者：王 琴，Email：wqgji1@163.com。
基金项目：贵州省卫生健康委科学技术基金资助项目（编号：gawkj2021-223）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240926.0938.010（2024-09-26）

慢传输型便秘（slow transit constipation，STC），是指结肠的运动功能障碍，肠内容物传输缓慢所引起的便秘，主要症状为排便次数少，粪便干硬，常伴排便费力、腹胀[1]。随着生活方式的改变，STC已成为影响患者身心健康的重要因素之一。国内外研究显示，慢性便秘的患病率越来越高，且随着年龄增长而增加，65岁以上人群尤为明显，女性患病的频率是男性的十倍[2-3]。

STC的发病机制较为复杂，目前认为可能与肠神经系统病变、Cajal间质细胞（interstitial cells of Cajal，ICC）分布与功能异常、激素神经递质包括5-HT异常等有关[4-5]。5-HT是肠道中重要的神经递质和旁分泌信号分子，与多种肠胃道疾病的发病机制相关，5-HT受体主要有7大类型，其中5-HT3R、5-HT4R与胃肠运动功能最为密切，是胃肠功能障碍治疗的主要靶点[6-8]。相关研究表明5-HT在胃肠道内的生理功能调节中起重要作用，5-HT和相关受体参与了肠道运动，肠道分泌和内脏敏感性的调节[9-10]。

普芦卡必利（力洛）是二氢苯并呋喃甲酰胺衍生物的代表药物，是首个选择性、高亲和性5-HT4受体激动剂。本学科相关经典著作及诊疗规范均已把（5-HT4受体激动剂）本药纳入STC的一线用药。目前，普芦卡必利仅批准为用于治疗成年女性患者的慢性便秘症状，由于疾病的慢性、长期反复性，患者往往需要长期服药，虽然本药的服用方法简便（每日1次，每次2 mg，连续服用4周），但长期服药对疾病进展、受体表达水平的影响尚无明确的证据；临床上联合用药、重复用药等情况多有发生，仍存在较大争议，亟待通过基础研究加以求证。

本课题拟通过选用成年雌性SD大鼠，随机分为正常组，模型组，普芦卡必利（力洛）组，分组干预2个月，通过对大鼠一般情况、首次白便排出时间、粪便含水率以及5-HT、5-HT3R、5-HT4R等变化进行观察和测量，为临床规范化应用5-HT4受体激动剂（普芦卡必利等同类药物）提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物：30只健康SD大鼠（雌性，SPF级），体重（200±20）g，6~7周，饲养于SPF实验室1周。大鼠由江西中洪博元生物技术有限公司提供（动物使用许可证号：SYXK（赣）2020-0001）。本研究所涉及的动物实验均经贵州中医药大学实验动物管理和使用委员会批准（伦理审批编号：20220155）。

实验试剂：复方地芬诺酯片（河南鼎昌药业，货号：H41023169），琥珀酸普芦卡必利片（国药豪森，货号：H20183482），AB-APS染色试剂盒（solarbio，货号：G1285），ELISA检测试剂盒（酶联生物，货号：ml003125），目的蛋白一抗（武汉菲恩生物科技有限公司，货号：FNab09928），山羊抗大鼠二抗（碧云天，货号：A0192）

1.2 方法

1.2.1 分组和造模 随机将大鼠分为空白组（10只）及造模组（20只），造模组选择复方地芬诺酯进行造模，使用15 mg/（kg·d）复方地芬诺酯进行灌胃，正常组以等体积生理盐水灌胃处理，每日1次，连续14 d。造模后第1天开始药物干预，用药剂量参照人与动物体表面积换算，剂量为0.2 mg/（kg·d），正常组和模型组给予同量生理盐水，每日1次，共给药60 d。末次给药后处死大鼠，取结肠组织、大鼠全血进行后续实验。

1.2.2 首次白便排出时间记录 大鼠给药处理30 min后，给予硫酸钡悬液（1∶1）2 mL灌胃。正式实验之前，需排除第一粒白便，随后，观察并记录每只大鼠排出首粒白便所耗的时长。记录时刻分别为：第1、7、14、21、30、40、50、60天。

1.2.3 大鼠粪便水分含量测定 收集每组大鼠在不同时刻排除的粪便做好标记，称量并记录其湿量。随后，将粪便进行烘干，再称量和记录其干重。通过公式计算并统计每组大鼠粪便中含水量差异。粪便含水量=（湿重-干重）/湿重×100%。

1.2.4 大鼠结肠含水量测定 取不同大鼠的结肠组织进行标记，称重并记录湿重。随后，将不同分组的结肠组织于60 ℃烘干箱处理6 h后称量并记录其干重。通过公式计算结肠组织的含水率。结肠含水量=（湿重-干重）/湿重×100%。

1.2.5 HE病理染色 取大鼠结肠组织用4%多聚甲醛固定24~48 h，脱水并包埋于石蜡中，随后在4 μm处连续切片。采用苏木精-伊红染色试剂盒（Solarbio，G1120）对石蜡切片进行染色。所有图像均使用显微镜（CX43，OLYMPUS）获取。

1.2.6 结肠黏液分泌观察 取结肠组织约1 cm（距盲肠4 cm处），4%多聚甲醛固定，石蜡包埋，常规切片，阿利新蓝-过碘酸-雪夫染色（periodic acid schiff and alcian blue staining，AB-PAS），于光镜下观察结肠黏液分泌情况。

1.2.7 ELISA法检测血清5-HT含量 取大鼠全血，室温自然凝固10~20 min，随后离心20 min左右（2 000~3 000 r/min）；仔细收集上清液，加入显色剂A、B和终止液，加入配好的标准品和样本，封膜，轻轻振荡混匀，37 ℃温育；弃去液体，甩干，加洗涤液，静置后弃去，拍干；先后加入底物液，需振荡混匀后避光显色；加终止液终止反应，15 min内、450 nm波长依序测量各孔的吸光度（absorbance，A）值。

1.2.8 IHC法检测结肠组织5-HT3R、5-HT4R表达 大鼠结肠组织切片，烤片、脱蜡、水化后，用柠檬酸缓冲液进行抗原修复。经5% BSA抗原封闭后，用5-HT3R、5-HT4R抗体（1∶100）进行一抗孵育，4 ℃过夜后，进行辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗（1∶100）孵育，经DAB显色，苏木精复染

反蓝，脱水透明后，封片，在显微镜下（CX43，OLYMPUS）进行观察。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0.1软件进行数据分析，计量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）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2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。检验水准α=0.05，以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 普芦卡必利对STC模型大鼠的首粒白便排除时间，粪便含水量，以及结肠含水量的影响

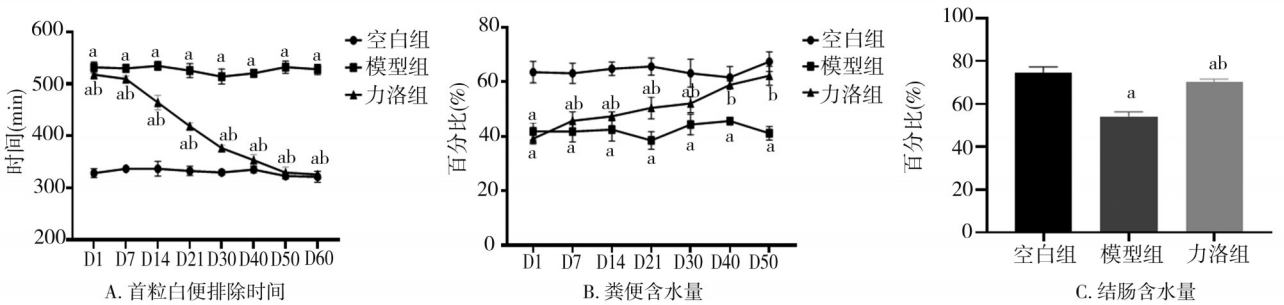
首粒白便排除时间结果表明，3组比较差异具有统计学意义（F=275.720，P<0.05）。模型组大鼠首粒白便排除时间显著长于对照组的，提示造模成功。与模型组相比，力洛组大鼠首粒白便排出时间显著减少（P<0.05）且随时间的增加排便时间与模型组间差异越来越大。随着治疗时间加长力洛组排便时间显著减少，与空白组相比，第50天和60天无统计学差异（P=0.81、P=0.72）。结果表示力洛治疗之后可以改善大鼠大便排出时间；粪便含水量的结果显示，3组比较差异具有统计学意义（F=24.440，P<0.05）。与空白组相比，模型组的含量显著降低（P<0.05），而力洛组含水量逐渐升高，最后接近于空白组；相较于模型组，力洛组粪便含水量显著升高（P<0.05），且随着时间的推移效果更为明显。

结肠含水量结果显示，3组比较差异具有统计学意义（F=263.400，P<0.05）。与空白组相比，模型组含水量显著降低（P<0.05），力洛组含水量降低程度远小于模型组，更接近于空白组；与模型组相比，力洛组的含水量显著升高（P<0.05）。这些结果表示力洛治疗可以改善大鼠的病理状态，改善疾病状态，见图1。

2.2 普芦卡必利对结肠组织形态以及结肠黏液分泌的影响

HE染色结果可见，空白组大鼠结肠黏膜层、黏膜下层、肌层及浆膜层结构较完整，未见明显病理改变；模型组大鼠结肠形态结构异常，肠绒毛排列紊乱，杯状细胞明显减少，见少量炎性细胞浸润；力洛组大鼠结肠形态结构正常，未见明显组织病理损伤，提示长期给药干预未引发结肠组织病理学改变。

AB-PAS染色结果可见，结肠中的中性黏液呈紫红色，酸性黏液呈蓝色。与空白组相比，模型组中的中性黏液明显较少，因此颜色浅于空白组；与模型组相比，力洛组颜色较深，表明经过普芦卡必利的长期治疗不会影响结肠黏液成分以及水平，见图2。



注：a，与空白组比较，P<0.05；b，与模型组比较，P<0.05

图1 普芦卡必利对STC模型大鼠的首粒白便排除时间，粪便含水量，以及结肠含水量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10）

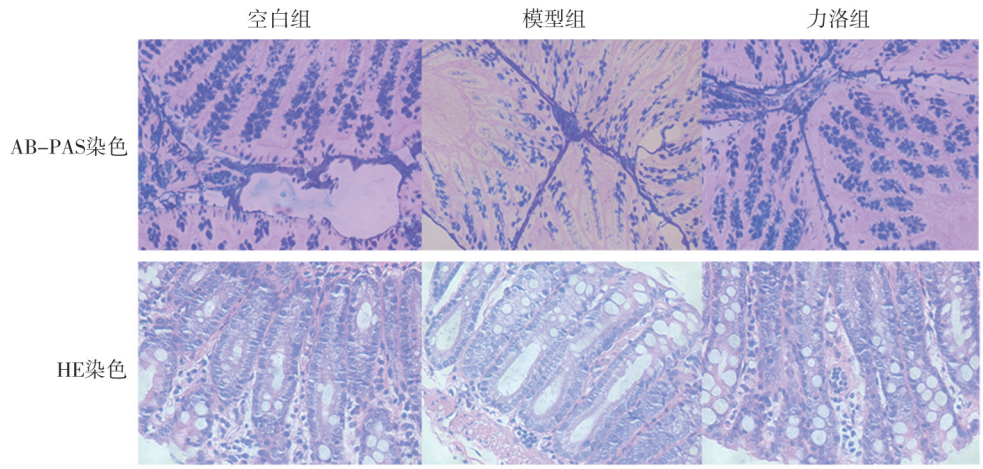
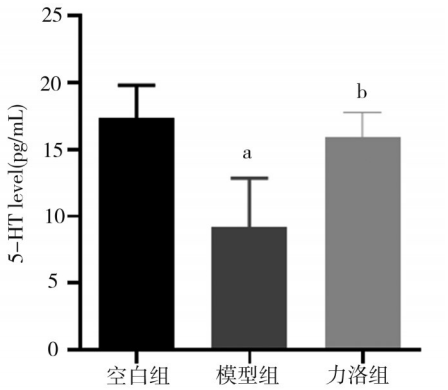


图2 普芦卡必利对结肠组织形态以及结肠黏液分泌的影响

2.3 普芦卡必利对血清5-HT含量的影响

5-HT含量检测结果表明，3组比较差异具有统计学意义（F=23.590，P<0.05）。与空白组相比，模型组大鼠结肠5-HT表达明显下降，差异具有统计学意义。与模型组相比，力洛组的表达水平增高，差异有统计学意义（P<0.05）。而与空白组相比，5-HT表达水平并无明显变化（P=0.510），见图3。



注：a，与空白组比较，P<0.05；b，与模型组比较，P<0.05

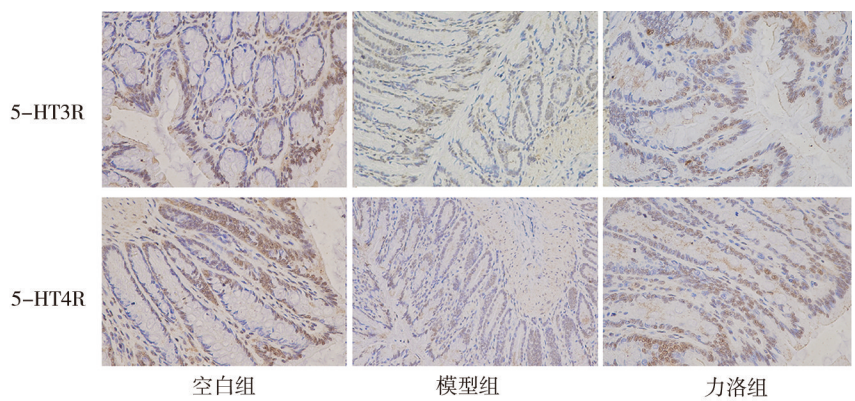
图3 普芦卡必利对血清5-HT含量的影响（$\bar{x}\pm s$；n=10）

2.4 结肠组织5-HT3R、5-HT4R表达变化

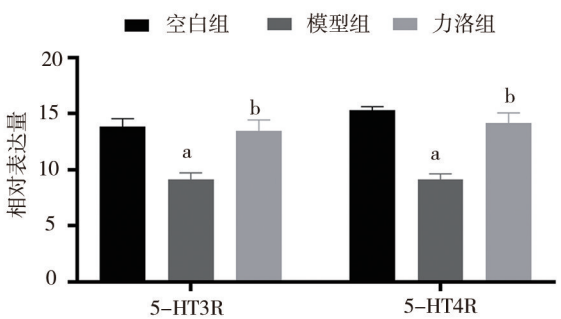
5-HT3R、5-HT4R蛋白表达结果显示，3组比较差异具有统计学意义（F=105.900，P<0.05）。与空白对照组相比，大鼠模型组结肠组织中5-HT3R表达被明显抑制（P<0.05），力洛组表达水平无统计学差异（P=0.75）。与模型组相比，经普芦卡必利治疗后（力洛组），结肠组织中5-HT3R表达水平显著升高（P<0.05）；同样，与空白对照组相比，模型组结肠组织中5-HT4R表达被抑制（P<0.05），力洛组无统计学差异（P=0.17）。与模型组相比，经普芦卡必利治疗后（力洛组），结肠组织中5-HT4R表达显著显著升高（P<0.05），见图4。

3 讨 论

目前治疗STC的药物众多，主要是针对其结肠动力异常，包括选择性2型氯通道激活剂—鲁比前列酮、鸟苷酸环化酶激动剂—利那洛肽以及新型促动力剂—普芦卡必利[11]。其中西沙必利和替加色罗等早期原型虽然有效，但最终因心血管不良事件而被撤回，部分原因是受体非选择性[12]。普芦卡必利为二氢苯并呋喃甲酰胺衍生物的代表药物，是一种高选择性、高亲和力的5-HT4受体激动剂。研究证明其能促进胃、小肠和结肠平滑肌运动，可增加动物模型结肠的蠕动反射和集团运动，与非靶器官的相互作用极小[13-14]。但长期服此药对疾病进展、受体表达水平的影响尚无明确的证据，本课题通过选用成年雌性SD大鼠，随机分为正常组、模型组、普芦卡必利（力洛）组，分组干预2个月，通过对大鼠一



A. 免疫组化检测



B. 蛋白表达定量分析

注：a，与空白组比较，P<0.05；b，与模型组比较，P<0.05

图4 结肠组织5-HT3R、5-HT4R表达变化（$\bar{x}\pm s$；n=10）

般情况、首次白便排出时间、粪便含水率、5-HT、5-HT3R、5-HT4R 的评价分析，以充分评估普芦卡必利的远期疗效、稳定性、受体表达水平的影响，为临床规范化应用 5-HT4 受体激动剂普芦卡必利等同类药物提供理论支撑。

胃肠道传输功能检测包括首粒大便排出时间、粪便含水量、结肠含水量等。在本研究中，长期服用普芦卡必利可以极大改善大鼠排便时间、结肠含水量、粪便含水量等问题；同样结肠病理组织染色以及结肠黏液染色结果表明，长期服用普芦卡必利不会引起结肠组织病理学以及结肠黏液成分、水平的改变。这些结果表明，长期服用普芦卡必利可以改善大鼠的病理状态。

为了探讨长期服用普芦卡必利对 5-HT 受体表达的影响，本实验进行了进一步对肠道动力活动密切相关的 5-HT 及 5-HT3R/5-HT4R 的变化进行了研究。5-HT 是 5-HT 信号通路的核心，它既是神经递质，又是胃肠激素，绝大部分 5-HT 都存在于胃肠道内，其主要功能包括促进胃肠道的运动、血管舒张及胰液的分泌等[14]。其中普芦卡必利通过与胃肠道中存在的 5-HT4 受体相互作用来刺激肠道蠕动，导致胆碱能神经元释放乙酰胆碱，乙酰胆碱反过来刺激结肠纵向肌肉层的收缩和环形肌肉层的松弛，从而导致管腔内容物的推进[15-16]。本研究中，STC 模型大鼠 5-HT、5-HT3R、5-HT4R 蛋白表达水平均下降，这与以往的研究一致[17-18]，而长期服用普芦卡后，5-HT、5-HT3R、5-HT4R 蛋白表达水平升高，且水平接近于空白组。

综合而言，本研究结果表明，随着普芦卡必利用药时间的延长，不仅能够改善大鼠的排便时间、粪便含水量、结肠含水量，肠道组织病理状态以及肠道结肠黏液分泌情况，而且能够提高 5-HT 受体表达水平。这为普芦卡必利等 5-HT4 受体激动剂的长期治疗效果提供了理论支持。

参 考 文 献

[1] Sailer M. Slow transit constipation[J]. Zentralbl Chir, 2019, 144(2):179-189.

[2] Jin L, Deng L, Wu W, et al. Systematic review and meta-analysis of the effect of probiotic supplementation on functional constipation in children[J]. Medicine, 2018, 97(39):e12174.

[3] Qi ZY, Middleton JW, Malcolm A. Bowel dysfunction in spinal cord injury[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2018, 20(10):47.

[4] Dhruva Rao PK, Lewis M, Peiris SPM, et al. Long-term outcome of prucalopride for chronic constipation: a single-centre study[J]. Colorectal Dis, 2015, 17(12):1079-1084.

[5] Chuah KH, Mahadeva S. Cultural factors influencing functional gastrointestinal disorders in the east[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2018, 24(4):536-543.

[6] 叶 飞，王巧民. 慢性便秘的流行病学研究进展[J]. 中国临床保健杂志，2010(6):665-667.
Ye F, Wang QM. 慢性便秘的流行病学研究进展[J]. Chin J Clin Healthc, 2010(6):665-667.

[7] Black CJ, Ford AC. Chronic idiopathic constipation in adults: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and clinical management[J]. Med J Aust, 2018, 209(2):86-91.

[8] Shin JE, Park KS, Nam K. Chronic functional constipation[J]. Korean J Gastroenterol, 2019, 73(2):92-98.

[9] Margolis KG, Gershon MD. Enteric neuronal regulation of intestinal inflammation[J]. Trends Neurosci, 2016, 39(9):614-624.

[10] Coates MD, Tekin I, Vrana KE, et al. Review article: the many potential roles of intestinal serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) signalling in inflammatory bowel disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2017, 46(6):569-580.

[11] Vijayvargiya P, Camilleri M. Use of prucalopride in adults with chronic idiopathic constipation[J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2019, 12(7):579-589.

[12] 方秀才. 慢传输型便秘的药物治疗新进展[J]. 第三军医大学学报，2013, 35(21):2259-2261.
Fang XC. Current pharmacologic therapies for chronic slow transit constipation[J]. J Third Mil Med Univ, 2013, 35(21):2259-2261.

[13] Lanthier C, Dallemagne P, Lecoutey C, et al. Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT_4 receptor: a patent review (2014-present)[J]. Expert Opin Ther Pat, 2020, 30(7):495-508.

[14] Omer A, Quigley EMM. An update on prucalopride in the treatment of chronic constipation[J]. Therap Adv Gastroenterol, 2017, 10(11):877-887.

[15] Jin X, Guan YT, Bai H, et al. Effects of sEA on slow transit constipation through the microbiota-gut-brain axis in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020:8828846.

[16] Galligan JJ. Colonic 5-HT_4 receptors are targets for novel prokinetic drugs[J]. Neurogastroenterol Motil, 2021, 33(4):e14125.

[17] 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.
Zhang YZ, Li YC, Zhao LN. Effect of fuzi-Rougui on 5-HT signal pathway and c-kit expression in rats with slow transit constipation[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(3):1111-1121.

[18] 李秦帆，苏 煌，陈志祥，等. 利那洛肽联合逍遥散加味治疗便秘型肠易激综合征的疗效观察及其对血浆 5-HT、VIP 的影响[J]. 中国中医药科技，2023, 30(5):898-900.
Li QF, Su H, Chen ZX, et al. Clinical observation on curative effect of linaclotide combined with Xiaoyao Powder (逍遥散) modified in treatment of constipation-predominant irritable bowel syndrome and effects on plasma 5-HT and VIP[J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2023, 30(5):898-900.

（责任编辑：周一青）