基于水通道蛋白3和核转录因子-κB信号通路探讨电针神阙穴对功能性便秘胃肠动力的改善机制

谢林林[1],赵玉粒[2],黄明桂[1],古远云[2]

(1.西南医科大学附属中医医院经典中医诊疗中心,四川 泸州 646000;
2.西南医科大学附属中医医院老年病科,四川 泸州 646000)

[摘要]目的 探讨电针神阙穴对功能性便秘水通道蛋白3(aquaporins 3,AQP3)和核转录因子-κB(nuclear factor-κB,NF-κB)信号通路及胃肠动力的影响。**方法** 将40只健康SD大鼠随机分为空白组、模型组、苁蓉通便口服液组、电针治疗组,每组10只。模型复制成功后,按相应组别处理方法连续干预14 d。测定大鼠粪便粒数、粪便含水量及炭末推进率,苏木精-伊红染色观察结肠组织病理变化,ELISA检测结肠组织胃动素(motilin,MTL)、胃泌素(gastrin,GAS)、P物质(substance P,SP)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)、白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-alpha,TNF-α)含量,qRT-PCR检测结肠组织AQP3、NF-κB p65 mRNA表达水平,Western blot检测结肠组织AQP3、囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,CFTR)、蛋白激酶A(protein kinase A,PKA)、磷酸化核转录因子-κB p65(phosphorylated nuclear transcription factor-κB p65,p-NF-κB p65)、核因子κB抑制蛋白α(inhibitor of nuclear factor-kappa B,IκBα)表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠粪便粒数、粪便含水量及炭末推进率明显减少($P<0.05$),结肠组织黏膜层坏死较为明显,结肠组织MTL、GAS、SP含量及AQP3 mRNA和蛋白表达水平,CFTR、PKA、IκBα蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),COX-2、IL-1β、IL-6、TNF-α含量,NF-κB p65 mRNA表达水平及p-NF-κB p65蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,电针治疗组的粪便粒数,粪便含水量,炭末推进率,MTL、GAS、SP含量明显升高($P<0.05$),结肠组织COX-2、IL-1β、IL-6、TNF-α含量及NF-κB p65 mRNA表达水平明显降低($P<0.05$),结肠组织AQP3 mRNA和蛋白表达水平,CFTR、PKA、IκBα蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。**结论** 电针神阙穴能够改善功能性便秘大鼠粪便含水量和肠道转运速率,其机制可能与调节AQP3和NF-κB信号通路表达有关。

[关键词]电针;神阙穴;功能性便秘;水通道蛋白3

[中图分类号]R256.35 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2021.05.016

功能性便秘是一种与一些胃肠道表现相关的慢性疾病,影响5%~30%的人口,女性和老年人的发病率较高,严重影响患者的生活质量[1]。目前治疗便秘的方法主要包括多糖、膳食纤维、泻药、生物反馈疗法和外科治疗等,但这些治疗策略的疗效有限,且很少有关于这些疗法的长期临床研究[2]。电针疗法是中医常用的一种外治法,通过在传统针刺的基础上增加外部电刺激,可使刺激倍增,治疗效果也相应提高[3]。目前,电针已被各科医生广泛应用于治疗各类疾病,取得了满意的疗效[4]。神阙穴位于脐中,与肠腑相隔,刺激该穴位可健运脾胃[5]。然而,电针神阙穴通便作用的分子机制尚未阐明。水通道蛋白(aquaporin,AQP)是水和水/甘油通道,负责水通过膜的快速运输,目前已鉴定出13种AQP(AQP0—AQP12)[6]。其中,AQP3是结肠中最重要的AQP,与慢性便秘密切相关,有研究[7]表明,AQP3介导了泻药的通便作用。核转录因子-κB(nuclear factor-kappa B,NF-κB)在免疫反应和炎症反应过程中起重要作用。报道显示,AQP3通过NF-κB途径调节肠易激综合征大鼠的液态水代谢异常和肠通透性改变[8]。因此,本研究旨在探讨电针神阙穴对功能性便秘模型大鼠AQP3蛋白和NF-κB信号的影响,并初步探讨其改善功能性便秘胃肠动力的机制。

1 材料

1.1 实验动物 健康SD大鼠40只,体质量(230±

基金项目:四川省科技计划项目(2019YFS0512)

作者简介:谢林林(1981-),男,主治医师

通信作者:赵玉粒(1984-),女,护师,13659040793m@sina.cn

20)g,购自四川大学华西医院,使用许可证号为SYXK(川)2018-119,生产许可证号为SCXK(川)2018-026。大鼠饲养于恒温(23±2)℃、相对湿度55%±5%的环境中,常规24 h昼夜循环,并按照实验动物使用的"3R"原则给予人道关怀,实验过程严格遵守实验动物管理条例。

1.2 主要试剂及仪器 盐酸洛哌丁胺(批号140709510):西安杨森制药;苁蓉通便口服液(批号Z10910032):甘肃天水岐黄药业;苏木素染液(批号C200301)、伊红染液(批号C200403):珠海贝索生物;胃动素(motilin,MTL;批号ZC-37312)、胃泌素(gastrin,GAS;ZC-37314)、P物质(substance P,SP;批号ZC-36170)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2;批号ZC-36713)、白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β;ZC-M6681)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6;ZC-36404)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-alpha,TNF-α;ZC-37624)ELISA试剂盒:上海茁彩生物;一抗AQP3(批号AF5222)、囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,CFTR)(批号DF10310)、蛋白激酶A(protein kinase A,PKA;批号AF7746)、磷酸化核转录因子-κB p65(phosphorylated nuclear transcription factor-κB p65,p-NF-κB p65;批号AF2006)、核因子κB抑制蛋白α(inhibitor of nuclear factor-kappa B,IκBα)(批号AF5002)、ECL发光试剂盒(批号KF001):Affinity;生物素化山羊抗兔IgG(重链+轻链;批号ab6721):英国abcam;RNA Trizol试剂(vs18061730):合肥博美生物;TB Green™ Premix Ex Taq™ Ⅱ(批号RR820A):宝日医生物;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号P0009):Beyotime;PIKO Red 96实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪、MK3全功能酶标仪:美国Thermo Fisher。

2 方法

2.1 功能性便秘大鼠模型构建及分组 将大鼠随机分为空白组(n=10),模型组(n=30)。大鼠模型复制步骤如下:每只大鼠每日仅给予日平均饮水量的1/3,并灌胃盐酸洛哌丁胺1.5 mg/kg,颈背部皮下注射D-半乳糖125 mg/kg,不限制进食。空白组大鼠给予等量超纯水灌胃,颈背部皮下注射等量生理盐水,不限水,不限制进食。大鼠出现精神状态差,活动量减少,大便粒型小、干硬等表现为模型复制成功。将模型复制成功的大鼠随机分为模型组、苁蓉通便口服液组、电针治疗组,每组10只。

2.2 干预方法 电针治疗组每日9:00将大鼠仰卧固定,电针大鼠神阙穴(胸腹正中线上,剑突至耻骨联合上缘上2/3与下1/3交界处),进针5 mm左右,每日1次,每次30 min,5次为1个疗程,疗程中间休息2 d,共治疗2个疗程。穴位定位则参照《大鼠穴位图谱的研制》以及李忠仁主编的《实验针灸学》[9],电针参数参考曹洋等[10]研究结果:强度2 mA,疏密波(疏波4 Hz,密波50 Hz),以大鼠下肢稍震动为宜。为了避免强制固定时所导致的应激反应误差,空白组和模型组大鼠每日只固定不做任何处理,苁蓉通便口服液组大鼠每日固定并以0.3 mL苁蓉通便口服液灌胃,连续14 d。

2.3 炭末推进实验及粪便含水量测定 治疗结束后,每组取5只大鼠灌胃墨汁,40 min后将大鼠脱颈椎处死,分离肠系膜。从幽门至炭末前沿的距离作为炭末在小肠中推进距离。碳末推进率=碳末在小肠中的推进距离/小肠总长度×100%。收集各组大鼠24 h粪便,称量各组大鼠粪便的湿质量及干质量[先称量粪便湿质量($m_{湿}$),然后将粪便放入烘干箱烘干后再次称量粪便干质量($m_{干}$)],粪便含水量=($m_{湿}-m_{干}$)/$m_{湿}$×100%。

2.4 结肠组织病理学观察 收集各组剩余5只大鼠的结肠组织,用4%多聚甲醛固定,将固定组织经脱水、包埋、切片(厚度5 μm),用苏木精-伊红染色,二甲苯透明,中性树胶封固、光学显微镜下观察。

2.5 MTL、GAS、SP、COX-2、IL-1β、IL-6、TNF-α含量检测 按照ELISA试剂盒说明书操作,检测大鼠结肠组织MTL、GAS、SP、COX-2、IL-1β、IL-6、TNF-α的含量。

2.6 AQP3、NF-κB p65 mRNA表达水平检测 按照TRIzol试剂盒说明书从结肠组织中提取总RNA,逆转录合成cDNA,用Takara TB Green™ PreMix Ex Taq™测定基因表达水平。引物序列:

AQP3:5′-GGTTCCATCGCTGGTGTCTTCGTGTA-3′(正向),5′-CCGAGAGAGGCATCACAAAGGGCTTT-3′(反向);

NF-κB p65:5′-GCCAGCACCAAGACCGAAGCAATT-3′(正向),5′-TACCGCCAGCAGCATCTTCACATCTC-3′(反向);

GADPH:5′-ATCCCATCACCATCTTCCCAG-3′(正向),5′-CCATCACGCCAGTTTTCC-3′(反向)。

以GAPDH内参。qRT-PCR反应条件:95 ℃初始变性10 min,随后95 ℃变性10 s,60 ℃退火

10 s,72 ℃延伸10 s,45个循环,记录 C_T 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析相对表达水平。

2.7 AQP3、CFTR、PKA、p-NF-κB p65、IκBα 蛋白表达水平检测 取大鼠结肠组织,加入蛋白裂解液提取蛋白,冰上孵育离心后,收集上清液,用BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。后将上清液与SDS-PAGE样品加载缓冲液混合,并转移到PVDF膜上,在5%脱脂牛奶中室温封闭2 h后,将膜与抗AQP3、CFTR、PKA、p-NF-κB p65、IκBα(均1∶500)或β-actin(1∶2 500)的一抗在4 ℃孵育过夜,随后与二级抗体(1∶3 000)室温孵育1 h,使用化学发光检测试剂盒暗室显色,显色后的蛋白使用Bio-Rad全功能成像系统采集图像,Image-Pro Plus分析光密度,以β-actin为内参,对照组目标蛋白质相对含量为1,计算各组蛋白质的相对表达量,实验重复3次。

2.8 统计学方法 使用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析,数据采用"均数±标准差($\bar{x}\pm s$)"表示。采用Shapiro-Wilk检验数据是否符合正态分布,对于符合正态分布的数据,两组间均数比较采用LSD检验,多组间比较采用单因素方差分析。对于非正态分布的数据比较采用非参数Mann-Whitney U 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 电针神阙穴对功能性便秘大鼠粪便粒数、粪便含水量及炭末推进率的影响 大鼠在整个实验过程中均未死亡。与空白组比较,模型组大鼠粪便粒数、粪便含水量及炭末推进率均明显减少($P<0.05$);与模型组比较,苁蓉通便口服液组和电针治疗组大鼠粪便粒数、粪便含水量及炭末推进率均明显升高($P<0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠粪便粒数($n=10$)、粪便含水量($n=10$)及炭末推进率($n=5$)比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	粪便粒数	粪便含水量/%	炭末推进率/%
空 白	33.00±4.54	39.84±2.24	64.25±1.78
模 型	26.00±3.50*	24.88±4.22*	58.73±3.79*
苁蓉通便口服液	29.00±3.95#	35.83±6.28#	61.19±5.44#
电针治疗	31.00±4.11#	37.95±2.95#	63.70±2.13#

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

3.2 电针神阙穴对功能性便秘大鼠组织病理学的影响 空白组大鼠结肠组织未见明显病理变化。模型组大鼠结肠组织结构被破坏,黏膜层坏死较为明显,上皮基本脱落后缺失,固有层肠腺结构模糊,杯状细胞较少或基本不见,坏死区域及肠腔内可见坏死细胞碎片。苁蓉通便口服液组大鼠局部结肠组织结构被破坏,黏膜浅表变性坏死,见上皮坏死脱落,固有层内少量肠腺溶解坏死,坏死区域染色较浅,结构模糊。电针治疗组大鼠局部结肠组织结构被破坏,部分区域黏膜坏死,上皮缺失,固有层内少量肠腺结构模糊。见图1。

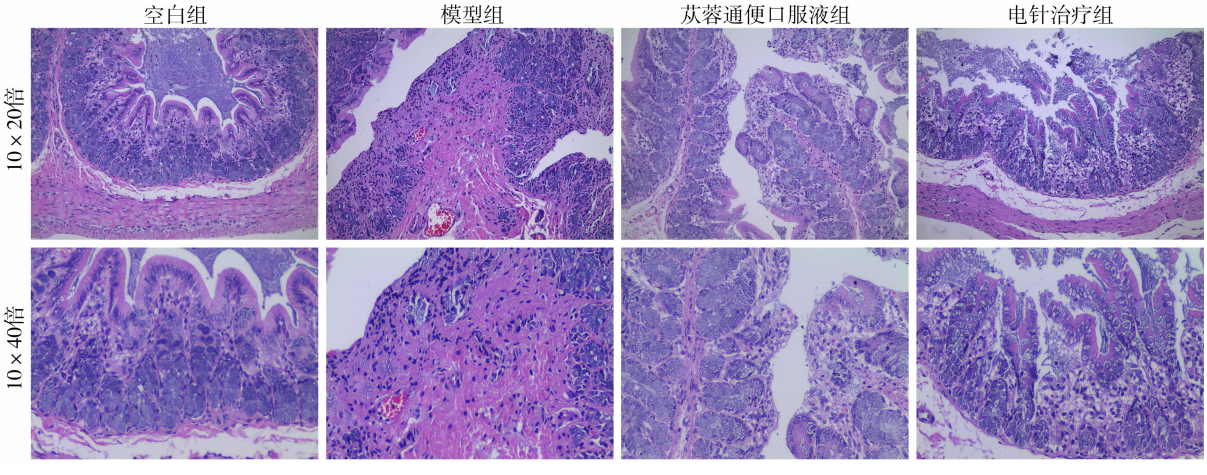


图1 各组大鼠结肠组织病理学变化(苏木精-伊红染色)

3.3 电针神阙穴对功能性便秘大鼠结肠MTL、GAS、SP含量的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织MTL、GAS、SP含量均明显降低($P<0.05$);与模型组比较,苁蓉通便口服液组和电针治疗组大鼠结肠组织MTL、GAS、SP含量均明显升高($P<0.05$)。见表2。

3.4 电针神阙穴对功能性便秘大鼠炎症因子水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织COX-2、IL-1β、IL-6、TNF-α含量均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,苁蓉通便口服液组和电针治

疗组大鼠结肠组织 COX-2、IL-1β、IL-6、TNF-α 含量均明显降低($P<0.05$)。见表3。

表2 各组大鼠结肠运动指数功能比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MTL/(pg/mL)	GAS/(pg/mL)	SP/(ng/mL)
空白	5	67.84±2.24	56.83±1.78	1.67±0.10
模型	5	47.88±4.22*	38.73±3.79*	1.13±0.11*
苁蓉通便口服液	5	56.83±6.28#	48.19±5.44#	1.36±0.09#
电针治疗	5	57.95±2.95#	46.70±2.13#	1.40±0.06#

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

3.5 电针神阙穴对功能性便秘大鼠 AQP3 和 NF-κB 信号通路的影响

与空白组比较,模型组大鼠结肠组织 AQP3 mRNA 及其蛋白表达水平,CFTR、PKA、IκBα 蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$),NF-κB p65 mRNA 表达水平及 p-NF-κB p65 蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,苁蓉通便口服液组和电针治疗组大鼠结肠组织 AQP3、CFTR、PKA、IκBα 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),NF-κB p65 mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$),电针治疗组 AQP3 mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$),而苁蓉通便口服液组 AQP3 mRNA 表达水平无明显变化($P>0.05$)。见图2、图3、图4。

表3 各组大鼠炎症细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	COX-2/(U/L)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)
空白	5	17.95±3.31	4.73±0.40	27.05±0.91	36.84±3.56
模型	5	26.37±1.88*	5.63±0.34*	34.22±2.14*	49.22±2.52*
苁蓉通便口服液	5	20.64±2.19#	5.01±0.14#	28.74±1.82#	41.02±3.60#
电针治疗	5	21.34±1.49#	4.82±0.31#	29.49±0.76#	42.15±4.11#

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

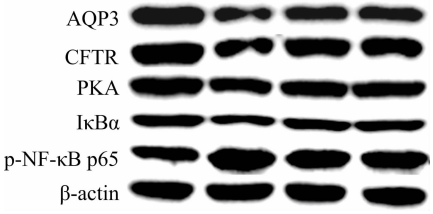
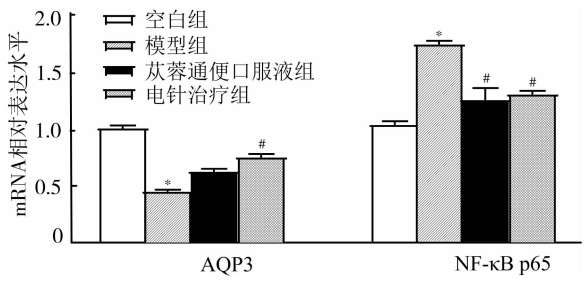
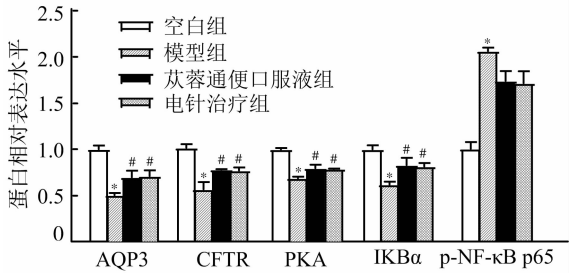


图2 Western blot 法检测各组结肠组织 AQP3、CFTR、PKA、p-NF-κB p65、IκBα 蛋白表达水平



注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

图3 各组大鼠结肠组织 AQP3、NF-κB mRNA 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$,$n=5$)



注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

图4 各组大鼠结肠组织 AQP3、CFTR、PKA、p-NF-κB p65、IκBα 蛋白相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

4 讨论

功能性便秘严重者可能导致躁动、呕吐、肠梗阻、穿孔,并可能与致命的肺栓塞或吸入有关[11]。目前,20%~30%的60岁以上老年人每周需使用一种以上的泻药,含有番泻苷或氧化镁的药物有很强的通便活性,然而这些药物会产生不良反应[12],频繁使用可诱发结肠黑变病,这是结肠肿瘤的危险因素[13]。研究[14]显示,俞募配穴电针对功能性肠病具有双向调节作用。然而有关电针神阙穴对功能性便秘作用的报道较少。因此,本研究观察了电针神阙穴对功能性便秘大鼠组织病理学、结肠运动指数、炎症因子、AQP3 和 NF-κB 信号通路的影响,以探讨电针神阙穴治疗功能性便秘的作用机制。

功能性便秘发病机制尚不十分清楚,可能与结肠动力改变、直肠功能障碍、胃肠神经分泌异常等因素有关,而这些因素不仅导致功能性便秘患者胃肠功能障碍,也会诱发全身性炎症免疫反应[15]。孙伟义等[16]报道,采用黄芪、肉苁蓉等清热解毒通腑汤灌肠可有效降低功能性便秘机械通气伴胃肠功能障碍患者 IL-6、TNF-α 含量,改善胃肠功能。在本研究中,模型组大鼠粪便粒数、粪便含水量、炭末推进率及结肠组织 MTL、GAS、SP 含量明显低于空白组,且结肠组织结构被破坏,黏膜层坏死较明显,而结肠组织 COX-2、IL-1β、IL-6、TNF-α 含量明显高于空白组,提示胃肠激素及炎症因子可能参与功能性便秘的进展。苁蓉通便口服液组和电针治疗组大鼠粪便粒数、粪便含水量、炭末推进率及结肠组织 MTL、GAS、SP 含量明显升高,结肠组织 COX-2、IL-1β、IL-6、TNF-α 含量明显

降低,结肠炎症细胞浸润减少,可见电针神阙穴可以有效延缓结肠组织病变程度。研究[17]显示,苁蓉通便口服液具有滋阴补肾、润肠通便、调节免疫、抗氧化、抗衰老及抗疲劳等功能,已被应用于便秘的治疗。本研究应用苁蓉通便口服液作为阳性对照,发现电针神阙穴与苁蓉通便口服液具有同等的调节作用。

有报道显示,AQP1—AQP4 和 AQP8 在动物结肠黏膜上皮细胞中表达[18],且便秘的发病机制与结肠 AQP 的异常密切相关[19]。Chao 等[8]证实 AQP 的异常表达可以影响结肠水代谢和肠道通透性的改变。本研究结果显示,电针神阙穴可明显升高结肠组织 AQP3 mRNA 和蛋白的表达水平,提示电针神阙穴上调结肠组织 AQP3 表达。环磷酸腺苷反应原件结合蛋白(cyclic adenosine monophosphate response element binding protein,CREB)的磷酸化是由 PKA、丝裂原活化蛋白激酶、蛋白激酶 C 和钙/钙调素依赖性蛋白激酶等蛋白激酶介导的,CREB 的磷酸化可以促进 AQP3 的转录和表达[20]。CFTR 氯通道是驱动肠液分泌的主要途径,在维持管腔内容物的润滑中起重要作用[21]。Harada 等[22]研究表明,麻仁丸可通过激活 CFTR 氯通道改善阿片类药物诱导的便秘。本研究结果显示,苁蓉通便口服液、电针神阙穴可上调 PKA、CFTR 的蛋白表达水平,与 AQP3 的上调趋势一致,可能共同起到治疗便秘的作用。

有研究[23]结果显示,抑制 NF-κB 信号通路的激活可进一步促进 AQP3 的表达,NF-κB 信号的激活对 AQP2 通道的下调非常重要。此外,IκBα 与 NF-κB 结合组成 NF-κB/IκBα 复合体,以无活性的形式存在于细胞质中,激活的 IKKβ 靶向 IκBα 蛋白的丝氨酸残基,促使 IκBα 发生泛素化、磷酸化反应或降解,使得 NF-κB 游离并活化,游离的 NF-κB 能够调控 IL-6、TNF-α 等,进而加速疾病的进展[24]。本研究结果发现,苁蓉通便口服液、电针神阙穴明显降低大鼠结肠组织 NF-κB p65 的表达水平,增加 AQP3 的表达水平,提示电针神阙穴增加 AQP3 的作用可能是通过下调 NF-κB 信号通路实现的。

综上所述,电针神阙穴可改善功能性便秘大鼠粪便含水量和肠道转运速率,改善结肠组织病理变化,其机制可能与调节 AQP3、NF-κB 信号通路有关。

参考文献:

[1] FOROOTAN M, BAGHERI N, DARVISHI M. Chronic constipation: a review of literature[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(20): e10631.

[2] VAN MILL M J, KOPPEN I J N, BENNINGA M A. Controversies in the management of functional constipation in children[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2019, 21(6): 23.

[3] 张子迪,王锐卿,刘敬萱,等. 基于数据挖掘探讨电针治疗周围神经病的临床应用特点[J]. 针刺研究, 2021, 46(3): 240-247.

[4] 汪洋,王玉娟,武九龙,等. 电针对 PSD 大鼠行为学及神经营养因子和炎症因子的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(2): 263-269.

[5] 司原成,任晨晨,陈波,等. 吴茱萸透皮贴剂贴敷神阙穴对营养性肥胖小鼠脂质代谢及肠道菌群的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 715-718.

[6] IKARASHI N, KON R, SUGIYAMA K. Aquaporins in the colon as a new therapeutic target in diarrhea and constipation[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(7): 1172.

[7] KON R, IKARASHI N, HAYAKAWA A, et al. Morphine-induced constipation develops with increased aquaporin-3 expression in the colon via increased serotonin secretion[J]. Toxicol Sci, 2015, 145(2): 337-347.

[8] CHAO G, ZHANG S. Aquaporins 1, 3 and 8 expressions in irritable bowel syndrome rats' colon via NF-κB pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(29): 47175-47183.

[9] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2007: 255-257.

[10] 曹洋. 电针大肠俞募穴对慢传输型便秘大鼠结肠组织 GDNF 甲基化修饰状态的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2019.

[11] JIANG H, DONG J, JIANG S, et al. Effect of Durio zibethinus rind polysaccharide on functional constipation and intestinal microbiota in rats[J]. Food Res Int, 2020, 136: 109316 [2021-05-16]. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996920303410. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109316.

[12] LIM J M, KIM Y D, SONG C H, et al. Laxative effects of triple fermented barley extracts (FBe) on loperamide (LP)-induced constipation in rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 143.

[13] HARADA T, IMAI H, FUMITA S, et al. Opioid-induced constipation in patients with cancer pain in Japan (OIC-J study): a post hoc subgroup analysis of patients with gastrointestinal cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2021, 26(1): 104-110.

[14] 赵盼盼,智斌,鲁刚,等. 基于俞募配穴理论观察电针对功能性肠病双向调节作用[J]. 上海针灸杂志, 2020, 39(9): 1099-1103.

[15] 牛英颖. 垂丝海棠花多糖改善功能性便秘及增强免疫力评价[D]. 郑州:河南大学, 2019.

[16] 孙伟义,孔建兄,吴杰英,等. 中药鼻饲加灌肠联合西医治疗 ICU 机械通气伴胃肠功能障碍临床观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 2015, 25(5): 461-463.

[17] 鲁燕. 腹部推拿联合苁蓉通便口服液治疗精神分裂症合并便秘临床研究[J]. 新中医, 2019, 51(8): 263-266.

[18] CAO Y, HE Y, WEI C, et al. Aquaporins alteration profiles revealed different actions of senna, sennosides,

and sennoside a in diarrhea-rats[J]. Int J Mol Sci, 2018,19(10):3210.

[19] 智会,袁维堂.水通道蛋白3、4、8在大鼠慢传输型便秘模型结肠黏膜中的表达[J].中华胃肠外科杂志,2011,14(6):459-461.

[20] WU M,LI Y,GU Y. Hesperidin improves colonic motility in loeramide-induced constipation rat model via 5-hydroxytryptamine 4R/cAMP signaling pathway[J]. Digestion,2020,101(6):692-705.

[21] CIL O,PHUAN P W,LEE S,et al. CFTR activator increases intestinal fluid secretion and normalizes stool output in a mouse model of constipation[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol,2016,2(3):317-327.

[22] HARADA Y,IIZUKA S,SAEGUSA Y,et al. Mashiningan improves opioid-induced constipation in rats by activating cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2017,362(1):78-84.

[23] WANG C,YAN M,JIANG H,et al. Protective effects of puerarin on acute lung and cerebrum injury induced by hypobaric hypoxia via the regulation of aquaporin (AQP) via NF-κB signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol,2016,40:300-309.

[24] 江志超,黄水仙.基于NF-κB信号通路的变化探讨"肺与大肠相表里"[J].广西中医药大学学报,2018,21(1):1-4.

(收稿日期:2021-05-18)

Acupuncture at Shenque Point Improves Gastrointestinal Motility in Functional Constipation by Regulating the Aquaporin-3 and Nuclear Factor-kappa B Signaling Pathways

XIE Lin-lin[1], *ZHAO Yu-li*[2], *HUANG Ming-gui*[1], *GU Yuan-yun*[2]

(1. *Classical TCM Diagnosis and Treatment Center, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou* 646000, *China*; 2. *Department of Geriatrics, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou* 646000, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of acupuncture at Shenque point on the aquaporin-3 (AQP3) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling pathways and gastrointestinal motility in functional constipation. **Methods** A total of 40 healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank group, model group, Congrong Tongbian Oral Liquid group, and acupuncture treatment group, with 10 rats in each group. After successful modeling, the rats were given corresponding treatment for 14 consecutive days. Number of fecal pellets, fecal water content, and charcoal propulsion rate were measured; HE staining was used to observe the pathological changes of colon tissue; ELISA was used to measure the levels of motilin (MTL), gastrin (GAS), substance P (SP), cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in colon tissue; qRT-PCR was used to measure the mRNA expression of AQP3 and NF-κB p65 in colon tissue; Western blot was used to measure the protein expression of AQP3, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), protein kinase A (PKA), NF-κB p65, and inhibitor of nuclear factor-kappa B (IκBα) in colon tissue. **Results** Compared with the blank group, the model group had significant reductions in the number of fecal pellets, fecal water content, and charcoal propulsion rate ($P<0.05$), obvious mucosal necrosis of colon tissue, and significant reductions in the levels of MTL, GAS, and SP, the mRNA and protein expression levels of AQP3, and the protein expression levels of CFTR, PKA, and IκBα in colon tissue ($P<0.05$), as well as significant increases in the levels of COX-2, IL-1β, IL-6, and TNF-α, the mRNA expression level of NF-κB p65, and the protein expression level of p-NF-κB p65 ($P<0.05$). Compared with the model group, the acupuncture treatment group had significant increases in the number of fecal pellets, fecal water content, charcoal propulsion rate, and the levels of MTL, GAS, and SP ($P<0.05$), significant reductions in the levels of COX-2, IL-1β, IL-6, and TNF-α and the mRNA expression level of NF-κB p65 in colon tissue ($P<0.05$), and significant increases in the mRNA and protein expression levels of AQP3 and the protein expression levels of CFTR, PKA, and IκBα in colon tissue ($P<0.05$). **Conclusion** Acupuncture at Shenque point can improve fecal water content and intestinal transport rate in rats with functional constipation, possibly by regulating the expression of the AQP3 and NF-κB signaling pathways.

[**Key words**]Electroacupuncture; Shenque point; Functional constipation; Aquaporin-3