

柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃组织线粒体功能及线粒体自噬的影响

李莉, 贾庆玲, 王煜姣, 王香香, 凌江红*
(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的:观察柴胡疏肝散对功能性消化不良(FD)模型大鼠胃动力、胃组织线粒体功能及线粒体自噬的影响,揭示柴胡疏肝散防治FD的作用机制。方法:将32只SPF级SD大鼠适应性喂养1周后随机分为正常组、模型组、柴胡疏肝散组(4.8 g·kg⁻¹),多潘立酮组(4.5 mg·kg⁻¹),每组8只。除正常组外,其余3组均采用改良夹尾刺激法复制FD大鼠模型。4周后,采用营养性半固体糊法观察FD大鼠胃排空率,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清柠檬酸合成酶(CS),胃动素(MTL),胃泌素(GAS)含量,苏木素-伊红(HE)染色观察胃组织病理变化,透射电镜观察线粒体特征,免疫荧光共定位法观察胃组织微管相关蛋白1轻链3(LC3)与电压依赖性阴离子通道蛋白1(VDAC1)表达,提取新鲜胃组织线粒体,生化试剂盒检测线粒体活性氧(ROS),丙二醛(MDA)水平,超氧化物歧化酶(SOD)含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测线粒体LC3,自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1),p62蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠胃排空率显著降低($P<0.01$),血清CS,MTL,GAS含量显著降低($P<0.01$),HE染色可见各组大鼠胃组织未见糜烂、溃疡等病理改变,透射电镜观察胃组织线粒体肿胀、扩张,出现空泡病变,LC3和VDAC1免疫荧光共定位表达显著增加($P<0.01$),线粒体ROS,MDA含量显著升高($P<0.01$),SOD含量显著降低($P<0.01$),LC3,Beclin1蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),p62蛋白表达水平明显下降($P<0.05$);与模型组比较,柴胡疏肝散组和多潘立酮组大鼠胃排空率均明显升高($P<0.05$),血清CS,MTL,GAS含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),透射电镜观察胃组织线粒体核膜完整,内部嵴形态清晰,嵴密度较高,部分存在线粒体分裂融合现象,LC3和VDAC1共定位表达显著减少($P<0.01$),线粒体ROS,MDA含量均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),SOD含量明显升高($P<0.05$),LC3,Beclin1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),p62蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。结论:柴胡疏肝散防治FD的作用机制可能与改善胃组织线粒体功能、抑制线粒体自噬有关。

[关键词] 柴胡疏肝散; 功能性消化不良(FD); 胃动力; 线粒体功能; 氧化应激; 线粒体自噬

[中图分类号] R2-0; R289; R33; R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0026-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212336

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211018.1438.006.html>

[网络出版日期] 2021-10-19 9:07

Effect of Chaihu Shugansan on Mitochondrial Function and Mitophagy in Gastric Tissue of Rats with Functional Dyspepsia

LI Li, JIA Qing-ling, WANG Yu-jiao, WANG Xiang-xiang, LING Jiang-hong*
(Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,
Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Chaihu Shugansan on gastric motility and mitochondrial function and mitophagy in rats with functional dyspepsia (FD) and to preliminarily reveal its mechanism in preventing and treating FD. **Method:** Thirty-two SD rats of SPF grade were randomly divided into the normal group, model group, Chaihu Shugansan (4.8 g·kg⁻¹) group, and domperidone group

[收稿日期] 20210730(001)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973774)

[第一作者] 李莉, 硕士, 从事胃肠病的中医药诊疗研究, E-mail: 862519478@qq.com

[通信作者] * 凌江红, 博士, 教授, 博士生导师, 从事胃肠病的中医药诊疗研究, E-mail: 459183870@qq.com

(4.5 mg·kg⁻¹) after one week of adaptive feeding, with eight rats in each group. Rats in all groups except for the normal group were exposed to modified tail-clamping stimulation for inducing FD. Four weeks later, the semi-solid nutritive medium was used to observe the gastric emptying rate of FD rats, and the serum citrate synthase (CS), motilin (MTL), and gastrin (GAS) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes in gastric tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, the mitochondrial characteristics by transmission electron microscopy, and the expression of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) and voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1) by immunofluorescence co-localization. The mitochondria were extracted from fresh gastric tissue for measuring the reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) levels using the biochemical kits. The mitochondrial LC3, yeast Atg6 homologous(Beclin1), and p62 protein expression was assayed by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group exhibited significantly reduced gastric emptying rate ($P<0.01$) and serum CS, MTL, and GAS levels ($P<0.01$). HE staining showed no pathological changes like erosion or ulcer in the gastric tissue of rats in each group. However, the mitochondria in the gastric tissue were observed swollen and dilated under the transmission electron microscope, and vacuolar lesions appeared. The co-expression of LC3 with VDAC1 increased significantly ($P<0.01$). The mitochondrial ROS and MDA levels were elevated significantly ($P<0.01$), while SOD content was significantly reduced ($P<0.01$). The protein expression levels of LC3 and Beclin1 were significantly up-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$), whereas p62 protein expression was down-regulated significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, Chaihu Shugansan and domperidone elevated the gastric emptying rate ($P<0.05$) and serum CS, MTL, and GAS levels ($P<0.05$, $P<0.01$). It was observed under the transmission electron microscope that the mitochondrial nuclear membrane of the gastric tissue was intact, with clear structure and high density of mitochondrial cristae, and mitochondrial fission and fusion were observed in some parts. The co-localization area of LC3 and VDAC1 was significantly reduced ($P<0.01$). The mitochondrial ROS and MDA levels declined significantly ($P<0.05$, $P<0.01$), whereas SOD level rose ($P<0.05$). The protein expression levels of LC3 and Beclin1 were significantly down-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$), while that of p62 was obviously up-regulated ($P<0.01$). **Conclusion:** The mechanism of Chaihu Shugansan in preventing and treating FD may be related to the improvement of mitochondrial function and the inhibition of mitophagy in gastric tissue.

[Keywords] Chaihu Shugansan; functional dyspepsia (FD); gastric motility; mitochondrial function; oxidative stress; mitophagy

功能性消化不良(FD)属临床常见消化系统疾病之一,主要表现为上腹部疼痛或烧灼感、餐后腹部饱胀和早饱等^[1]。流行病学资料显示,2019年FD在人群中患病率约为20%,且发病率逐年攀升,严重影响患者生活质量^[2]。目前,FD发病机制尚未明确且与多种因素密切相关,胃肠运动障碍是其发病主要机制之一^[3]。值得关注的是,线粒体为机体胃肠蠕动的重要能量来源,当遭到氧化损伤、营养缺乏等外界刺激时易导致线粒体功能紊乱及过度自噬^[4-5],影响血清胃动素(MTL),胃泌素(GAS)水平,诱发胃肠运动障碍^[6-7]。因此,围绕改善线粒体功能紊乱及过度自噬,纠正胃肠运动障碍进一步开展研究对于防治FD具有重要意义。

柴胡疏肝散出自张介宾的《景岳全书》,为防治

肝郁气滞证的经典名方,具有疏肝理气,活血止痛之功效,对于胃脘疼痛、脘腹胀满等治疗效果显著,在FD防治中具有较好的临床应用前景^[8]。课题组前期研究发现,FD大鼠胃动力障碍伴随Cajal间质细胞(ICC)过度自噬,ICC线粒体肿胀甚至空泡化,柴胡疏肝散干预后可显著改善FD大鼠相关症状,抑制ICC过度自噬,纠正线粒体肿胀、空泡化等现象^[9-10]。本研究拟运用柴胡疏肝散干预改良夹尾刺激法复制的FD大鼠模型,观察其对模型大鼠胃动力、胃组织线粒体氧化应激水平及自噬标记蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC3),自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1),p62表达的影响,以期从线粒体功能和线粒体自噬的角度,进一步揭示柴胡疏肝散纠正胃动力功能障碍,防治FD的分子作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠32只,8周龄,雌雄各半,体质量(210±10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(浙)2019-0001。饲养于上海中医药大学实验动物中心,昼夜各12h间断照明,温度(22±2)℃,湿度(55±2)%。本研究获得上海中医药大学动物伦理委员会批准(伦理号PZSHUTCM200703021)。

1.2 药物及配置 柴胡疏肝散由柴胡(批号200713),白芍(批号200605),川芎(批号200808),枳实(批号200701),陈皮(批号200804),香附(批号200629),炙甘草(批号200803)组成,所有饮片购自曙光医院东院药房,由上海中医药大学中药鉴定教研室崔亚君副教授鉴定均为正品。多潘立酮片(西安杨森制药有限公司,批号KDJ3YSP)。柴胡疏肝散按照原方配伍比例,称取柴胡、陈皮各16g,白芍、川芎、枳实、香附各12g,炙甘草4g,蒸馏水浸泡30min,武火煮沸,文火煎煮30min,重复2次后合并煎煮液,水浴锅加热蒸发至175mL,放置于4℃冰箱保存,制成生药浓度为0.48g·mL⁻¹的水煎浓缩液,每2d重新煎煮;多潘立酮片研磨配制质量浓度为0.45g·L⁻¹的混悬液^[11-12]。

1.3 试剂 线粒体提取试剂盒(中国Solarbio公司,批号20201229);兔多克隆抗体LC3(美国Proteintech公司,批号00072777);兔多克隆抗体VDAC1(美国Santa Cruz公司,批号L0320);单克隆抗体β-肌动蛋白(β-actin,美国Sigma公司,批号089M4850V);兔多克隆抗体Beclin1,兔多克隆抗体p62,山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国CST公司,批号分别为3738S,23214S,7074P2);蛋白上样缓冲液(苏州新赛美生物科技有限公司,批号20210308);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒,彩色预染蛋白质分子量标准(上海碧云天生物科技有限公司,批号分别为C0105S-2,072621210802,P0069);活性氧(ROS),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为011521210319,20210511,20210719);柠檬酸合酶(CS),大鼠MTL,大鼠GAS酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶研生物科技有限公司,批号分别为EK-R30678,EK-R30889,EK-R30890)。

1.4 仪器 Amersham ImageQuant 800型化学发光成像仪(上海格莱赛生命科技有限公司);164-5050型凝胶电泳仪(美国伯乐公司);Centrifuge5424型冷

冻高速离心机(德国Eppendorf公司);A2-PLUS型超微量分光光度计(北京莱普特科学仪器有限公司);FlexStation 3型酶标仪(美国Molecular Devices公司);MICROM HM 325型轮转切片机(德国Thermo Fisher Microm公司)。

2 方法

2.1 半固体糊的制备 将羧甲基纤维素钠5g,脱脂奶粉8g,淀粉4g,糖4g溶于125mL蒸馏水中,充分混匀后制成150mL的营养半固体糊,4℃冰箱保存备用。

2.2 分组、造模及给药 适应性喂养1周后,32只大鼠按照雌雄各半的原则随机分为正常组、模型组、柴胡疏肝散组、多潘立酮组,每组8只。除正常组外,其余各组均参照课题组前期改良夹尾法造模^[13],每次30min,2次/d,持续4周,若各组大鼠胃组织未出现明显病理变化且模型组大鼠胃排空率明显降低则提示造模成功^[14]。课题组依据普通成人(体质量60kg)的临床用量、动物与人间的等效剂量换算公式及前期研究发现柴胡疏肝散组剂量为4.8g·kg⁻¹时综合效果更佳^[12-13],故每次夹尾法造模结束后,柴胡疏肝散组、多潘立酮组分别给予柴胡疏肝散水煎液4.8g·kg⁻¹,多潘立酮溶液4.5mg·kg⁻¹灌胃,模型组给予等体积生理盐水灌胃,用药体积为10mL·kg⁻¹,2次/d,持续4周。

2.3 大鼠标本收集与处理 末次给药后,大鼠禁食12h。次日各组大鼠给予半固体糊灌胃30min后,腹腔注射2%戊巴比妥钠(2.25mL·kg⁻¹)麻醉,腹主动脉取血,静置于促凝管中30min后,3000r·min⁻¹离心10min(离心半径13.5cm,下同),收集血清,-80℃保存;暴露全胃,用外科手术线迅速将贲门及幽门结扎,剥离胃体表面的结缔组织,称取全胃质量并记录,沿胃大弯剪开,生理盐水冲洗胃内容物,滤纸拭干后称质量并记录空胃质量,取胃组织,一部分分别置于5%戊二醛及4%多聚甲醛中固定保存,一部分按照线粒体提取试剂盒说明书提取线粒体,一部分置于-80℃冰箱保存。

2.4 营养性半固体糊法测定胃排空率 收集并记录全胃质量、空胃质量、半固体糊质量,按照如下公式进行计算^[15-16]:胃排空率=[1-(全胃质量-空胃质量)/半固体糊质量]×100%。

2.5 ELISA检测大鼠血清中CS,MTL,GAS含量 按照大鼠ELISA试剂盒说明书进行大鼠血清CS,MTL,GAS含量测定,在酶标仪450nm波长处读取各样品吸光度A,绘制标准曲线,按曲线方程计算各

样本浓度值。

2.6 HE染色观察大鼠胃组织病理变化 胃组织切片脱蜡后,行苏木素染色2 min,流水冲洗5 min,伊红染色90 s,流水冲洗10 min,60℃烘箱30 min,中性树脂封片,观察各组胃组织病理变化情况。

2.7 透射电镜观察大鼠胃组织线粒体结构 胃组织迅速置于2.5%戊二醛固定,漂洗3次,每次10 min,经1%锇酸固定液后固定2 h,漂洗10 min/次,3次,乙醇梯度脱水10 min×5次,100%丙酮浸透10 min/次,3次,37℃包埋12 h,切片,染色,透射电子显微镜观察与拍照。

2.8 免疫荧光共定位观察大鼠胃组织LC3与VADC1表达 胃组织切片脱蜡后,0.01 mol·L⁻¹柠檬酸缓冲液抗原修复15 min后自然冷却至室温,PBS清洗,10%BSA室温封闭1 h后,一抗(LC3,VADC1多克隆抗体稀释倍数均为1:200)4℃冰箱过夜,PBS清洗,荧光二抗(1:200)室温避光孵育1 h,PBS清洗,DAPI染核5 min后封片,荧光显微镜观察LC3与VDAC1表达,Image J软件统计分析荧光表达面积。

2.9 化学荧光法测定大鼠胃组织线粒体ROS水平 参照线粒体提取试剂盒说明书提取大鼠胃组织线粒体,按照ROS测试盒说明书步骤进行操作,激发波长485 nm,发射波长525 nm测定各样品A。

2.10 水溶性四唑盐(WST-1)法测定大鼠胃组织线粒体SOD含量 取-80℃冻存线粒体,按SOD检测试剂盒说明书操作。依次加入各待测样品后充分混匀,37℃孵育20~30 min,450 nm测各样品A。

2.11 硫代巴比妥酸(TBA)法测定大鼠胃组织线粒体MDA含量 取-80℃冻存线粒体,按MDA检测试剂盒说明书操作。加样混匀后,95℃水浴锅水浴40 min,流水冷却后,4 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清加至48孔板中,酶标仪532 nm处,测定各样品A。

2.12 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠胃组织LC3蛋白表达 按照线粒体提取试剂盒说明书提取大鼠胃组织线粒体,BCA法测定蛋白浓度,10%SDS-PAGE电泳分离90 min,湿转法转膜(300 mA,30 min),5%脱脂牛奶室温摇床封闭1 h,兔抗LC3,Beclin1,p62(1:1 000),兔抗β-actin(1:1万)4℃冰箱孵育过夜;次日羊抗兔IgG(1:5 000)室温孵育1 h,TBST缓冲液洗膜10 min/次,3次,超敏ECL液显影,用Image J分析条带灰度值。

2.13 统计学方法 使用SPSS 27.0进行统计学分析,各数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较选择单因素方差

分析检验,当方差齐性时采用最小显著性差异法(LSD)进行组间两两比较,当方差不齐时采用Tamhane's T2进行组间两两比较,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对FD模型大鼠胃排空率的影响 与正常组比较,FD模型组大鼠胃排空率显著降低($P<0.01$);与模型组比较,柴胡疏肝散组和多潘立酮组大鼠胃排空率均明显升高($P<0.05$)。见表1。

表1 柴胡疏肝散对FD模型大鼠胃排空率的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Chaihu Shugansan on gastric emptying rate in FD model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 胃排空率/% |
|-------|-----------------------|---------------------------|
| 正常 | | 55.80±11.08 |
| 模型 | | 38.65±12.53 ²⁾ |
| 柴胡疏肝散 | 4.8 | 51.12±9.45 ³⁾ |
| 多潘立酮 | 4.5×10 ⁻³ | 49.92±7.04 ³⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~5同)。

3.2 对FD模型大鼠血清CS,MTL,GAS含量的影响 与正常组比较,FD模型组大鼠血清CS,MTL,GAS含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,柴胡疏肝散组和多潘立酮组大鼠血清CS,MTL,GAS含量明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表2。

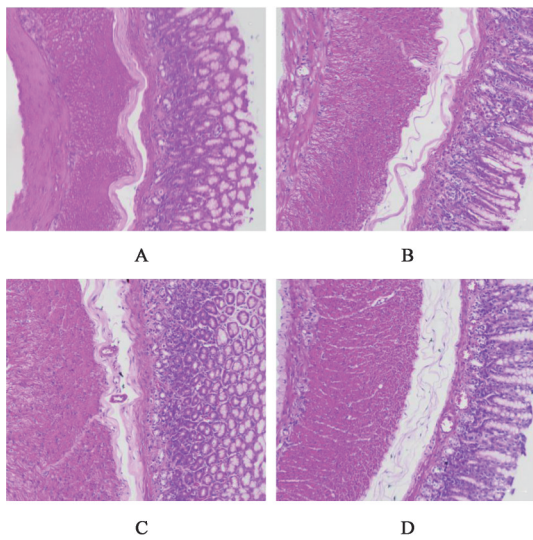
表2 柴胡疏肝散对FD模型大鼠血清CS,MTL,GAS含量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Chaihu Shugansan on serum of CS, MTL and GAS Contents in FD model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | CS/U·L ⁻¹ | MTL/ng·L ⁻¹ | GAS/ng·L ⁻¹ |
|-------|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常 | | 16.4±2.6 | 262.8±17.3 | 244.8±16.4 |
| 模型 | | 10.6±2.3 ²⁾ | 201.6±15.1 ²⁾ | 184.2±15.6 ²⁾ |
| 柴胡疏肝散 | 4.8 | 14.4±3.4 ³⁾ | 221.6±11.4 ³⁾ | 208.0±21.2 ³⁾ |
| 多潘立酮 | 4.5×10 ⁻³ | 15.7±3.8 ⁴⁾ | 225.2±19.8 ⁴⁾ | 203.3±18.4 ³⁾ |

3.3 对FD模型大鼠胃组织病理改变的影响 各组大鼠胃组织结构层次清晰,胃组织黏膜光滑,腺体结构规整,胃黏膜上皮细胞形状及间质大小一致;模型组、柴胡疏肝散组和多潘立酮组可见少量中性粒细胞浸润,未见糜烂、溃疡等病理改变。见图1。

3.4 对FD模型大鼠胃组织ICC线粒体超微结构的影响 正常组ICC形态结构清晰,呈长梭状或椭圆形,核膜完整,细胞器结构完整,胞质中有大量线粒体;模型组线粒体形态较模糊,呈分枝状,可见线粒体肿胀、扩张,出现空泡病变;柴胡疏肝散组和多潘



A. 正常组; B. 模型组; C. 柴胡疏肝散组; D. 多潘立酮组(图2~4同)
图1 柴胡疏肝散对FD模型大鼠胃组织病理学的影响(HE, ×200)
Fig. 1 Effect of Chaihu Shugansan on histopathology of stomach in FD model rats (HE, ×200)

立酮组形态结构较为清晰, 嵴密度较高, 线粒体呈长梭状, 核膜完整, 存在少量线粒体分裂融合现象。见图2。

3.5 对FD模型大鼠胃组织LC3与VDAC1荧光共定位表达的影响 与正常组比较, 模型组LC3和

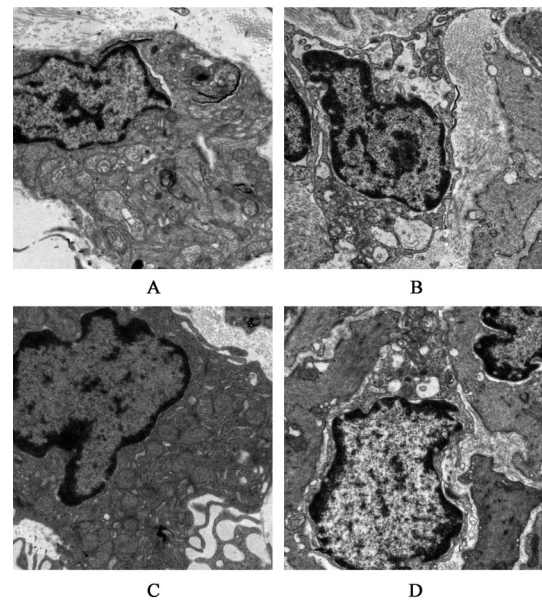


图2 柴胡疏肝散对FD模型大鼠胃组织ICC线粒体超微结构的影响(透射电镜, ×8 200)

Fig. 2 Effect of Chaihu Shugansan on ultrastructure of mitochondria in stomach tissue ICC in FD model rats (TEM, ×8 200)

VDAC1共定位表达显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 柴胡疏肝散组LC3和VDAC1共定位表达显著减少($P < 0.01$)。见图3, 表3。

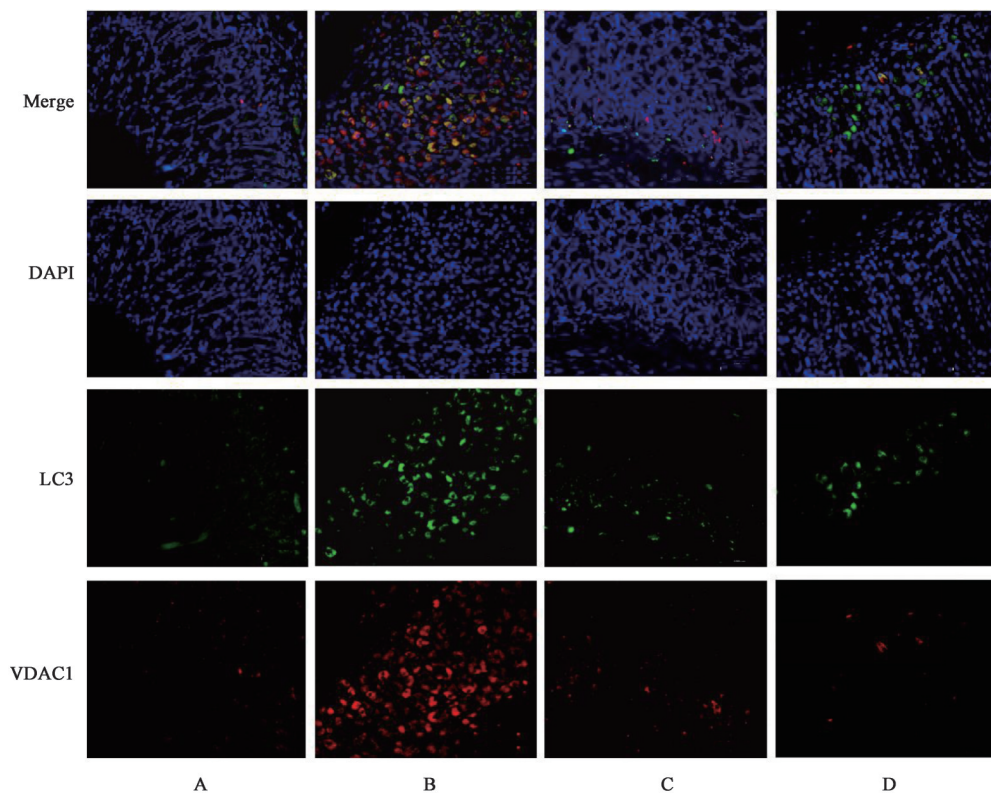


图3 柴胡疏肝散对FD模型大鼠胃组织LC3与VDAC1荧光共定位表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 3 Effect of Chaihu Shugansan on fluorescence colocalization expression of LC3 and VDAC1 in gastric tissue in FD model rats (IF, ×200)

表3 柴胡疏肝散对FD模型大鼠胃组织LC3与VDAC1荧光共定位表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Chaihu Shugansan on fluorescence colocalization expression of LC3 and VDAC1 in gastric tissue in FD model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 共定位表达面积/μm ² |
|-------|-----------------------|--------------------------------|
| 正常 | | 829.9±315.7 |
| 模型 | | 21 461.3±1 408.2 ²⁾ |
| 柴胡疏肝散 | 4.8 | 3 316.5±793.4 ⁴⁾ |
| 多潘立酮 | 4.5×10 ⁻³ | 4 479.6±657.5 ⁴⁾ |

3.6 对FD模型大鼠胃组织线粒体ROS,MDA,SOD含量的影响 与正常组比较,模型组胃组织线粒体ROS,MDA含量显著升高($P<0.01$),SOD含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,柴胡疏肝散组、多潘立酮组胃组织线粒体ROS,MDA含量均明显降低($P<0.05, P<0.01$),SOD含量明显升高($P<0.05$)。见表4。

3.7 对FD模型大鼠胃组织线粒体LC3 I,LC3 II,LC3 II/LC3 I,Beclin1,p62蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组胃组织线粒体LC3 I,p62蛋白表达水平明显下降($P<0.05, P<0.01$),LC3 II蛋白表达

水平及LC3 II/LC3 I,Beclin1蛋白表达水平明显上升($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,柴胡疏肝散组和多潘立酮组LC3 I,p62蛋白表达水平明显升高($P<0.05, P<0.01$),LC3 II及LC3 II/LC3 I,Beclin1蛋白表达水平明显下降($P<0.05, P<0.01$)。见图4,表5。

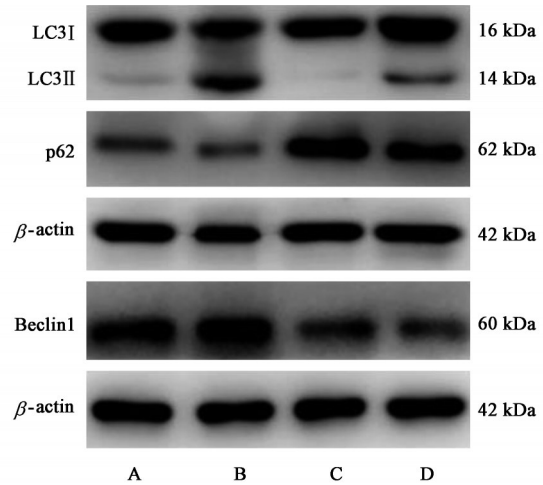


图4 FD模型大鼠胃组织线粒体LC3 I,LC3 II,LC3 II/LC3 I,Beclin1,p62蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of LC3 I,LC3 II,LC3 II/LC3 I,Beclin1,p62 protein expression in gastric tissue in FD model rats

表4 柴胡疏肝散对FD模型大鼠胃组织线粒体ROS,MDA,SOD含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Chaihu Shugansan on contents of mitochondria ROS, MDA and SOD in FD model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | ROS/RFU·mgprot ⁻¹ | MDA/μmol·gprot ⁻¹ | SOD/U·mgprot ⁻¹ |
|-------|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 正常 | | 4 870.1±720.9 | 17.6±3.2 | 231.2±23.5 |
| 模型 | | 15 172.2±1 170.3 ²⁾ | 28.6±1.3 ²⁾ | 185.3±16.2 ²⁾ |
| 柴胡疏肝散 | 4.8 | 9 900.1±1 373.3 ⁴⁾ | 22.6±2.7 ⁴⁾ | 202.9±11.1 ³⁾ |
| 多潘立酮 | 4.5×10 ⁻³ | 11 706.2±1 348.5 ⁴⁾ | 25.5±2.3 ³⁾ | 205.5±14.1 ³⁾ |

表5 柴胡疏肝散对FD模型大鼠胃组织线粒体LC3 I,LC3 II,LC3 II/LC3 I,Beclin1,p62蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Chaihu Shugansan on expression of LC3 I,LC3 II,LC3 II/LC3 I,Beclin1,p62 protein in gastric mitochondria in FD model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | LC3 I/β-actin | LC3 II/β-actin | LC3 II/LC3 I | Beclin1/β-actin | p62/β-actin |
|-------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常 | | 0.64±0.05 | 0.08±0.03 | 0.12±0.05 | 0.69±0.04 | 0.41±0.07 |
| 模型 | | 0.51±0.09 ²⁾ | 0.47±0.07 ²⁾ | 0.94±0.19 ²⁾ | 0.79±0.09 ¹⁾ | 0.33±0.04 ¹⁾ |
| 柴胡疏肝散 | 4.8 | 0.61±0.05 ³⁾ | 0.11±0.05 ⁴⁾ | 0.18±0.09 ⁴⁾ | 0.71±0.06 ³⁾ | 0.69±0.08 ⁴⁾ |
| 多潘立酮 | 4.5×10 ⁻³ | 0.60±0.08 ³⁾ | 0.22±0.04 ⁴⁾ | 0.37±0.07 ⁴⁾ | 0.70±0.10 ³⁾ | 0.57±0.06 ⁴⁾ |

4 讨论

FD在各年龄段均可发病,症状反复,严重困扰着病人的身心健康。中医内科学认为FD属“胃脘痛”“痞满”“嘈杂”等范畴,病位居胃,与肝、脾密切相关,多由饮食失节、情志不调、素体不足、久病体虚等引起,肝气郁结,脾气乏清致使腹满疼痛是本

病的关键所在,宜从疏肝、健脾、行气等方面展开治疗。柴胡疏肝散源自《景岳全书·古方八阵》,方中柴胡可疏肝理气为君,香附、川芎可活血化瘀、行气止痛为臣,陈皮、白芍、炙甘草、枳壳可理气和胃、柔肝止痛、消痞散结为佐,炙甘草可调和药性,兼为使。全方配伍精良,具有疏肝解郁、行气止痛、健脾

和胃之功,被历代医家广泛运用于“痞满”等症的治疗,与FD病机相契合^[17]。

现代药理研究发现,柴胡疏肝散不仅能调节FD大鼠胃动力的各项指标及激素水平,还可纠正多种疾病的机体线粒体功能障碍及过度自噬情况^[18-19]。如给予肝郁气滞型FD模型大鼠经柴胡疏肝散有效部位治疗后,胃排空率和小肠推进率显著增加,胃饥饿素(ghrelin),MTL和血管活性肠肽(VIP)等相关胃肠道激素水平及胃组织紧密连接蛋白-2(ZO-2),Yes相关蛋白(YAP),降钙素基因相关肽(CGRP)蛋白表达情况明显改善^[20]。给予阿尔茨海默病(AD)模型大鼠柴胡疏肝散治疗后,线粒体损伤减轻,AD症状改善^[21]。给予H9C2心肌细胞缺血/再灌注损伤模型臣药川芎主要活性成分治疗后,ROS生成数量显著减少,明显缓解线粒体功能障碍及过度自噬情况^[22]。

胃肠运动障碍是FD的重要发病因素之一,胃肠道的运动和分泌主要受胃肠内分泌细胞分泌的激素和中枢肠神经系统释放的神经递质调节。MTL,GAS均属于胃肠激素,MTL由Mo细胞分泌,MTL通过与ICC膜上的受体相互作用,释放乙酰胆碱进而促进胃平滑肌的收缩^[23];GAS主要由G细胞分泌,受迷走神经兴奋性调节,能够促进胃体、胃窦环形肌收缩,增加胃肠道的运动以及幽门括约肌舒张^[24]。若MTL,GAS分泌不足,易导致胃肠平滑肌收缩减慢,减缓胃排空,导致胃肠运动障碍。本实验中,模型组大鼠胃排空率,血清MTL,GAS含量较正常组下降,柴胡疏肝散干预后,FD大鼠胃排空率、血清MTL,GAS含量均有不同程度的上升,这提示柴胡疏肝散可能促进胃肠Mtl,GAS分泌进而促进胃动力。

近年来,线粒体功能障碍及自噬诱发的胃动力障碍在FD的发病机制中备受关注^[25]。减缓胃内线粒体自噬,改善线粒体功能,恢复胃动力有望成为FD防治的潜在靶点。线粒体不仅是细胞能量的主要来源之一,还在氧化应激、信号转导、细胞凋亡等生物学过程中发挥重要作用^[26]。线粒体功能与胃动力关系密切,胃肠道ICC内有丰富的线粒体结构,为胃肠运动的起搏提供大量能量^[27]。值得注意的是,胃肠道线粒体是产生ROS的重要场所^[28],分布于线粒体基质中的SOD为线粒体关键的抗氧化酶,其主要通过清除对机体有害的超氧阴离子实现抗氧化应激的作用^[29];MDA是ROS攻击不饱和脂肪酸后产生的一种过氧化产物,具有反映线粒体抗氧

化潜在能力等作用,可间接反映线粒体过氧化损伤程度^[30]。当发生FD时,胃内线粒体供氧不足,线粒体呼吸链的电子传递受到抑制,释放出大量ROS及MDA,SOD活性降低,抗氧化能力减弱,线粒体通透性转换孔异常开放,线粒体内膜通透性增加,膜电位下降,导致线粒体形态异常及线粒体功能受损。CS为机体内三羧酸循环的关键酶之一,其表达水平的改变直接影响线粒体ATP及自由基产生,对于维持线粒体正常功能具有重要作用^[31]。本研究发现,经柴胡疏肝散干预后,FD大鼠胃排空率增加,线粒体ROS,MDA释放显著减少,SOD活性增强,血清CS含量升高,透射电镜下线粒体形态结构较为清晰、核膜较完整,提示柴胡疏肝散促胃动力作用可能是通过减缓胃内线粒体氧化应激,维持线粒体结构及功能稳态,增强线粒体活性实现的。

线粒体自噬是细胞正常的生理活动,属细胞自噬形式之一^[32]。线粒体膜电位下降,ROS及MDA生成增多,SOD大量减少,ATP产量减少等均会引起线粒体功能紊乱,诱导机体启动线粒体自噬,使自噬体与溶酶体结合,以维持线粒体内环境稳态^[33-34]。LC3为线粒体自噬小体标志物,具有I型和II型两种主要存在形式。当线粒体自噬发生时,定位于细胞质的LC3 I会经泛素化修饰后与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺结合形成定位于自噬体膜表面的LC3 II,LC3 II及LC3 II/LC3 I,在某种程度上代表了机体线粒体自噬水平^[35]。p62为线粒体自噬的特异性底物,可与LC3相互作用,负性调节线粒体自噬活性^[36]。Beclin1为线粒体自噬关键调控蛋白之一,能够促进LC3 I向LC3 II转化,并加速自噬体与溶酶体融合,激活线粒体自噬^[37]。因此,当LC3 II,Beclin1表达水平上升,p62表达水平下调可快速激活线粒体自噬,使大量正常线粒体被自噬溶酶体吞噬,影响胃肠活动能量供给,诱导胃肠功能紊乱,从而引发胃动力障碍^[38]。本研究发现,经柴胡疏肝散干预后,FD大鼠胃组织线粒体LC3和VDAC1共定位表达减少,LC3,Beclin1蛋白表达水平下调,p62蛋白表达水平上升,提示柴胡疏肝散能抑制FD大鼠线粒体自噬。

综上,柴胡疏肝散可能是通过恢复胃组织线粒体功能,抑制线粒体自噬,从而纠正大鼠胃动力功能障碍,防治FD,但具体的机制还有待进一步研究。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MADISCH A, ANDRESEN V, ENCK P, et al. The diagnosis and treatment of functional dyspepsia [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2018, 115(13):222-232.
- [2] FORD A C, MAHADEVA S, CARBONE M F, et al. Functional dyspepsia [J]. *Lancet*, 2020, 396(10263):1689-1702.
- [3] WAUTERS L, TALLEY N J, WALKER M M, et al. Novel concepts in the pathophysiology and treatment of functional dyspepsia [J]. *Gut*, 2020, 69(3):591-600.
- [4] BERGER E, RATH E, YUAN D, et al. Mitochondrial function controls intestinal epithelial stemness and proliferation [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:13171.
- [5] BAECHLER B L, BLOEMBERG D, QUADRILATERO J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation [J]. *Autophagy*, 2019, 15(9):1606-1619.
- [6] 毛兰芳,梁乾坤,汪龙德,等. 基于脑肠轴研究功能性消化不良模型大鼠的胃肠动力及平胃胶囊的干预作用[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(5):84-90.
- [7] ZHU J, TONG H, YE X, et al. The effects of low-dose and high-dose decoctions of fructus aurantii in a rat model of functional dyspepsia [J]. *Med Sci Monit*, 2020, doi:10.12659/MSM.919815.
- [8] 钱舒乐,俞赞丰,张尉勤,等. 柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的Meta分析和试验序贯分析[J]. *中医临床研究*, 2021, 13(8):142-148.
- [9] 邓静,凌江红,曾丽君,等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃Cajal间质细胞增殖及其超微结构的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(4):1410-1417.
- [10] TAN R Q, ZHANG Z, JU J, et al. Effect of Chaihu Shugansan-contained serum on glutamate-induced autophagy of interstitial cells of cajal in the rat gastric antrum [J]. *Evi Based Complement Alternat Med*, 2019, doi:10.1155/2019/7318616.
- [11] 徐宽,凌江红,周洲,等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠内质网应激相关分子IRE1和TRAF2表达的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(4):516-520.
- [12] 罗高标,凌江红. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃窦组织中GRP78和c-JNK表达的影响[J]. *山西中医*, 2019, 35(5):56-58.
- [13] 王煜姣,凌江红,张钰琴,等. 疏肝理气法对功能性消化不良大鼠行为学及胃肠动力的影响[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(4):999-1001.
- [14] 卢鹏飞,左艇,苗明三. 基于中西医临床病证特点的功能性消化不良动物模型分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(18):210-215.
- [15] 周洲,凌江红,徐宽,等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃排空的促进作用及机制[J]. *山东医药*, 2017, 57(37):5-8.
- [16] 王婷,孙静莹,刘翠,等. 麸炒枳实对功能性消化不良大鼠肠道菌群的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(13):1068-1075.
- [17] 张喆,赵静洁,王永志,等. 柴胡疏肝散药理作用及机制研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2017, 24(9):128-131.
- [18] 凌江红,韦连明,张钰琴,等. 疏肝理气法对功能性消化不良大鼠下丘脑和胃窦胃泌素、生长抑素表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(22):3069-3073.
- [19] 曾丽君,凌江红,邓静,等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃窦肌间Cajal间质细胞自噬的影响[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(5):1041-1044.
- [20] 齐美欣,苏婷,姜文月,等. 柴胡疏肝散有效部位对功能性消化不良大鼠胃肠动力的影响[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(3):15-19.
- [21] 赵唯贤,李高申,薛红莉,等. 柴胡疏肝散对阿尔茨海默病大鼠海马CA1区超微结构的影响[J]. *中国基础医学杂志*, 2012, 18(6):621-623.
- [22] LUO C, ZHANG Y, GUO H, et al. Ferulic acid attenuates hypoxia/reoxygenation injury by suppressing mitophagy through the PINK1/parkin signaling pathway in H9c2 cells [J]. *Front Pharmacol*, 2020, doi:10.3389/fphar.2020.00103.
- [23] SAGKAN O A, AYDIN M, BOZKURT Y A, et al. Short term effects of experimental gastric outlet obstruction and truncal vagotomy on gut hormones [J]. *Biotech Histochem*, 2021, 16:1-9.
- [24] 独思静,从禹,国嵩,等. 康复新液对慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃组织病理的影响[J]. *中医杂志*, 2020, 61(22):1990-1995.
- [25] ZHU L, QI B, HOU D. Roles of HIF1 α -and HIF2 α -regulated BNIP3 in hypoxia-induced injury of neurons [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(4):822-827.
- [26] FUHMANN D C, BRUNE B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia [J]. *Redox Biol*, 2017, 12(C):208-215.
- [27] LI J, KONG D, HE Y, et al. The impact of inflammatory cells in malignant ascites on small intestinal ICCs' morphology and function [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(9):2118-2127.
- [28] BHATTACHARYYA A, CHATTOPADHYAY R, MITRA S, et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases

- [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(2): 329-354.
- [29] LIU Z, WANG X, LI L, et al. Hydrogen sulfide protects against paraquat-induced acute liver injury in rats by regulating oxidative stress, mitochondrial function, and inflammation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, doi: 10. 1155/2020/6325378.
- [30] TIAN L, CAO W, YUE R, et al. Pretreatment with Tiliacin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 alpha signaling pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(4): 352-360.
- [31] 蔡全香. 柠檬酸合成酶基因低表达导致细胞超氧化物生成增加和细胞凋亡 [D]. 滨州: 滨州医学院, 2017.
- [32] MIZUSHIMA N, KOMASU M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [33] KUMAR A, SHAHA C. SESN2 facilitates mitophagy by helping parkin translocation through ULK1 mediated Beclin1 phosphorylation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 615.
- [34] PAUL S, SAHA D, BINUKUMRA B K. Mitochondrial dysfunction and mitophagy closely cooperate in neurological deficits associated with Alzheimer's disease and type 2 diabetes [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(8): 3677-3691.
- [35] 刘通, 于佳妮, 刘悦, 等. 去血清饥饿条件下肌卫星细胞增殖及自噬蛋白 LC3、Beclin1 的表达 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(11): 1657-1661.
- [36] YAMADA T, DAWSON T M, YANAGAWA T, et al. SQSTM1/p62 promotes mitochondrial ubiquitination independently of PINK1 and PRKN/parkin in mitophagy [J]. *Autophagy*, 2019, 15(11): 2012-2018.
- [37] YEO D, KANG C, GOMEZ-CABRERA M C, et al. Intensified mitophagy in skeletal muscle with aging is downregulated by PGC-1alpha overexpression *in vivo* [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 130: 361-368.
- [38] WEI X, LIN Y, ZHAO D, et al. Electroacupuncture relieves suppression of autophagy in interstitial cells of cajal of diabetic gastroparesis rats [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2020, doi: 10. 1155/2020/7920715.

[责任编辑 孙丛丛]