

· 经典名方 ·

香砂六君子汤对功能性消化不良脾虚证大鼠胃动力及 CRF,UCN2表达的影响

李娟娟^{1,2}, 王凤云², 吕林², 许琳¹, 梁旭², 唐旭东^{3*}

(1. 深圳市中医院, 广东深圳 518033;

2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 3. 中国中医科学院, 北京 100700)

[摘要] 目的:观察香砂六君子汤对功能性消化不良(FD)脾虚证大鼠胃排空率、促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)和尿皮质素2(UCN2)表达的影响。方法:将48只10日龄SD雄性乳鼠随机分为正常组(8只)和碘乙酰胺组(40只),分别给予2%蔗糖溶液和0.1%蔗糖碘乙酰胺溶液灌胃,连续6d。至出生3周龄,剔除母鼠,碘乙酰胺组大鼠随机分为模型组、莫沙必利组、香砂六君子汤低、中、高剂量组,每组8只。至出生6周龄,除正常组外,其余5组大鼠叠加小平台站立方法造模,共14d。造模结束后,正常组和模型组给予蒸馏水10 mL·kg⁻¹,各治疗组分别给予莫沙必利1.6×10⁻³ g·kg⁻¹及香砂六君子汤水煎液2.8, 5.6, 11.2 g·kg⁻¹灌胃,共14d。测定抓力、胃排空率,采用苏木素-伊红(HE)染色法观察胃窦基本形态,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测胃窦组织CRF,UCN2蛋白及mRNA表达量。结果:各组大鼠胃窦形态基本正常,未见器质性病变;与正常组比较,模型组大鼠抓力、胃排空率显著降低($P<0.01$),胃窦组织CRF蛋白与mRNA表达显著升高($P<0.01$),UCN2蛋白与mRNA表达明显降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,香砂六君子中、高剂量组大鼠抓力、胃排空率明显升高($P<0.05, P<0.01$),香砂六君子高剂量组CRF蛋白表达明显降低($P<0.05$),香砂六君子中、高剂量组CRF mRNA表达均有不同程度降低($P<0.05, P<0.01$),香砂六君子高剂量组UCN2蛋白与mRNA表达显著升高($P<0.01$)。结论:香砂六君子汤可发挥健脾、促进FD胃动力的作用,机制可能与降低胃组织CRF,升高UCN2的表达有关。

[关键词] 香砂六君子汤; 功能性消化不良; 胃动力; 促肾上腺皮质激素释放因子; 尿皮质素2; 脾虚证

[中图分类号] R2-0;R289;R33;R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220337

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211129.1856.007.html>

[网络出版日期] 2021-11-30 18:32

Effect of Xiangsha Liu Junzitang on Gastric Motility and CRF and UCN2 Expression in Rats with Functional Dyspepsia Due to Spleen Deficiency

LI Juan-juan^{1,2}, WANG Feng-yun², LYU Lin², XU Lin¹, LIANG Xu², TANG Xu-dong^{3*}

(1. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China;

2. Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

3. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Xiangsha Liu Junzitang (XSLJZ) on gastric emptying rate and expression levels of corticotropin-releasing factor (CRF) and urocortin 2 (UCN2) in rats with functional dyspepsia (FD) due to spleen deficiency. **Method:** Forty-eight 10-day-old male SD rats were randomly divided into the normal group ($n=8$) and iodoacetamide (IA) group ($n=40$), and they separately received 2% sucrose solution and 0.1% sucrose solution containing IA for six successive days. Following the

[收稿日期] 20210918(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873297);国家重点研发计划项目(2019YFC1709600)

[第一作者] 李娟娟,博士,主治医师,从事中医药防治功能性胃肠病研究,Tel:0755-82571384,E-mail:ljj19861205@163.com

[通信作者] *唐旭东,博士,主任医师,从事消化系统疾病研究,Tel:010-62882389,E-mail:txdly@sina.com

removal of mother rats, the three-week-old IA-treated rats were randomized into five groups, namely the model group, mosapride group, and low-, middle-, and high-dose XSLJZ groups, with eight rats in each group. At the age of six weeks, rats in all groups except for the normal group were modeled by the modified multiple platform method for 14 d. Afterwards, the ones in normal group and model group were treated with 10 mL·kg⁻¹ distilled water, and those in the treatment groups with 1.6×10⁻³ g·kg⁻¹ mosapride and 2.8, 5.6, and 11.2 g·kg⁻¹ XSLJZ by gavage, respectively, for 14 d. The grasping ability and gastric emptying rate were determined. The histological changes in gastric antrum were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein and mRNA expression levels of CRF and UCN2 in gastric antrum were detected by Western blot and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** No obvious change or organic lesion was observed in gastric antrum of rats in each group. Compared with the normal group, the model group exhibited lowered gastric emptying rate and grasping ability ($P<0.01$), up-regulated CRF protein and mRNA expression in gastric antrum ($P<0.01$), and down-regulated UCN2 protein and mRNA expression ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, XSLJZ at the middle and high doses enhanced the grasping ability and gastric emptying rate ($P<0.05$, $P<0.01$) and down-regulated CRF mRNA expression to varying degrees ($P<0.05$, $P<0.01$). XSLJZ at the high dose decreased CRF protein expression ($P<0.05$) and up-regulated UCN2 protein and mRNA expression ($P<0.01$). **Conclusion:** The mechanism of XSLJZ in invigorating spleen and promoting gastric motility of FD rats may be related to its reduction of CRF and elevation of UCN2 in gastric antrum.

[Keywords] Xiangsha Liu Junzitang; functional dyspepsia; gastric motility; corticotropin-releasing factor; urocortin 2; spleen deficiency syndrome

功能性消化不良(FD)是临床常见的功能性胃肠病,主要表现为餐后饱胀不适、早饱、上腹痛、上腹烧灼感等上消化道症状。FD在亚洲国家的患病率高达8%~23%^[1],因其难治性和反复性的特点,严重影响患者的生活质量,增加经济负担,同时耗费大量的医疗资源^[2]。然而,FD的发病机制目前尚不明确,涉及的因素复杂多样,包括胃肠动力障碍、内脏高敏感、肠道菌群失调、十二指肠微炎症等多个方面,其中胃肠动力障碍被认为是FD的主要发病机制^[3]。促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)及其相关肽尿皮质激素(UCN)作为应激反应的关键介质,可通过下丘脑-垂体-肾上腺轴及外周途径抑制胃排空、促进结肠运动,从而导致胃肠动力障碍,这提示CRF系统可能是治疗FD胃肠动力障碍的靶点^[4-6]。

FD归属于中医“痞满”“胃脘痛”等范畴,目前多认为FD是以脾虚为本,脾失健运为核心病机^[7]。香砂六君子汤源自《古今名医方论》,是治疗脾虚证的经典复方,具有健脾益气、行气化痰之功效。课题组前期临床研究表明该方可显著改善FD脾虚证患者的餐后饱胀、早饱、上腹痛等症状,并有促进胃排空的作用^[8],且动物实验发现该方也能促进FD脾虚证大鼠的胃排空^[9],但其是否通过影响外周CRF,UCN2的表达而发挥促胃动力作用,目前尚不清楚。故本研究拟采用碘乙酰胺灌胃叠加小平台站立方

法建立FD脾虚证大鼠模型,观察香砂六君子汤对模型大鼠的胃排空率及胃CRF,UCN2表达的影响,旨在探讨其对FD脾虚证大鼠胃动力的影响及潜在靶点,从而为FD的中医药治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性乳鼠48只,7日龄,带母鼠6只,与所带乳鼠同笼饲养,为其提供母乳。实验动物购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0002,饲养于清洁级动物房,环境温度控制在22.0~24.0℃,相对湿度60%~70%,光照周期为12h昼夜节律。母鼠使用全价颗粒饲料喂养,自由摄食饮水。本研究所涉及的动物实验操作均获得中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会审核批准,批准号2019XLC013-2。

1.2 药物 香砂六君子汤药物组成为党参6g,炒白术12g,茯苓12g,炙甘草4g,法半夏6g,陈皮5g,木香4g,砂仁5g,所有饮片均购自中国中医科学院西苑医院中药房,经中国中医科学院西苑医院郑蕊主管药师鉴定符合2015年《中华人民共和国药典》相关规定。将上述药物置于蒸馏水中浸泡30min,武火煮沸后改用文火煎煮30min,砂仁后下(在其他药文火煎煮20min后放入),过滤收集药液。滤出的药渣加入适量蒸馏水继续煎煮,武火煮沸后文火煎煮30min。将2次煎煮的药液混合,浓

缩至含生药量为 $1.12\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液,分装至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。枸橼酸莫沙必利片购自中国中医科学院西苑医院药剂科(鲁南贝特制药有限公司,批号H19990317)。

1.3 试剂 碘乙酰胺(美国Sigma公司,批号1001437587);蔗糖(拜尔迪公司,批号0552C003);兔抗CRF单克隆抗体,兔抗UCN2多克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG), β -肌动蛋白(β -actin)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab184238,ab231050,ab6721,ab8227);TRIzol总RNA提取试剂[天根生化科技(北京)有限公司,批号DP405-02];苏木素-伊红(HE)染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1005);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(日本Takara公司,批号分别为RR047B,RR82LR)。

1.4 仪器 YLS-13A型小鼠抓力测定仪(上海移数信息科技有限公司);QL-902型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);3-30K型低温离心机(美国Sigma公司);ABI7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪,NANODROP 2000型分光光度计(赛默飞世尔科技公司);Rt2100c型酶标检测仪(美国Rayto公司);GelDoc-It310凝胶成像系统(美国UVP公司);BG-subMIDI型电泳仪(北京百晶生物技术有限公司);RM2016型石蜡切片机(上海莱卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 造模 参照文献[10]方法,48只SD雄性小鼠适应性饲养3 d后,按笼随机分为2组,分别为正常组($n=8$),碘乙酰胺组($n=40$)。碘乙酰胺组给予0.1%蔗糖碘乙酰胺溶液灌胃,正常组给予2%蔗糖溶液灌胃,每只0.2 mL,连续灌胃6 d。大鼠出生3周龄时,剔除母鼠、分笼,碘乙酰胺组按大鼠体重随机分为5组,每组8只,分别为模型组、莫沙必利组、香砂六君子低、中、高剂量组。饲养大鼠至6周龄时,除正常组外,其余5组大鼠予小平台站立^[11]:向小平台水箱内注水,水面达小平台表面下2.0 cm,水温 $22.0\sim 24.0\text{ }^{\circ}\text{C}$,每个水箱放6只大鼠,大鼠可以在小平台上自由活动,但不得休息,从而造成大鼠劳倦过度。每次持续14 h,连续14 d。大鼠8周龄时,造模结束。预实验结果显示,采用碘乙酰胺灌胃叠加小平台站立复制的模型大鼠较正常组、单纯碘乙酰胺灌胃组大鼠出现毛色光泽度下降、活动度减退,体重减轻,进食量、饮水量减少,抓力、

胃排空率降低,血清检测提示淀粉酶活力及D-木糖含量降低,乳酸含量升高,而3组大鼠胃组织病理形态学均未见明显异常,符合FD脾虚证的特点,与课题组前期研究结果一致^[12],提示造模成功。

2.2 给药 造模结束后,每组大鼠均给予灌胃,灌胃量按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量计算,每天灌胃1次,连续14 d。根据60 kg成人每天香砂六君子汤用药剂量为54 g,按照公式^[13]:大鼠剂量=成人剂量/60 kg \times 6.25计算得出香砂六君子汤中剂量组大鼠给药剂量为 $5.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,低剂量组为 $2.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,高剂量组为 $11.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,分别为成人临床剂量的1,0.5,2倍。根据60 kg成人每天莫沙必利用量15 mg,按照上述公式得出莫沙必利组大鼠给药量为 $1.6\times 10^{-3}\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。正常组及模型组给予等体积蒸馏水灌胃。

2.3 检测

2.3.1 大鼠一般状态观察 观察大鼠皮毛、耳廓、鼠尾的色泽,大鼠活动度及粪便情况。

2.3.2 大鼠体质量、进食量测定 每组随机抽取6只大鼠单笼饲养,记录大鼠给药前、给药后体质量和进食量。

2.3.3 抓力测定仪检测大鼠抓力 每组随机抽取6只大鼠,将大鼠抓住后轻轻地放在抓力板上,右手握住大鼠尾部,左手将大鼠头部固定在抓力板,松开左手,右手抓住鼠尾轻轻向后牵拉,待大鼠抓牢抓力板后,右手均匀用力往后拉,致使大鼠松爪,仪器自动记录大鼠的最大抓力,每只大鼠连续测量3次取平均值。

2.3.4 半固体糊法检测大鼠胃排空率 大鼠末次给药后,禁食不禁水24 h,取羧甲基纤维素钠10 g,溶于250 mL蒸馏水中,分别加入奶粉16 g,糖8 g,淀粉8 g和活性炭末2 g,搅拌均匀,配制成约300 g的黑色半固体糊状物300 mL。每只固定灌胃3 mL,50 min后7%水合氯醛 $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉、开腹,用3/0线结扎胃贲门及幽门,取出全胃,用滤纸吸干后称量胃全重,然后沿胃大弯剪开,用生理盐水清洗胃内容物后吸干,称量胃净重,按照如下公式计算胃排空率:胃排空率= $[1-(\text{胃全质量}-\text{胃净质量})/\text{灌胃量}]\times 100\%$ 。

2.3.5 HE染色观察大鼠胃窦组织病理形态 取胃窦组织,放入4%多聚甲醛固定液中,经石蜡包埋、切片后进行HE染色,观察胃窦基本形态,以检测胃窦组织有无器质性病变。

2.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠CRF,UCN2蛋白表达 取胃窦组织,加入RIPA裂

解液,低温匀浆,4 °C,12 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液。BCA 法测定蛋白浓度,配制 10%SDS-PAGE 凝胶,依次进行上样、电泳、转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h后,分别加入一抗 CRF(1:2 500),UCN2(1:3 000),4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,然后加入二抗 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:3 000)室温摇床孵育 2 h,经 ECL 显色、曝光、显影、拍照,保存图像,采用 Image J 图像分析软件对目的条带灰度值进行分析。

2.3.7 Real-time PCR 检测大鼠 CRF, UCN2 mRNA 表达 取胃窦组织,使用 TRIzol 总 RNA 提取试剂进行 RNA 提取,经紫外吸收测定法检测 RNA 浓度和纯度。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录,实验操作按产品说明书进行,以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火及延伸 40 s,共 40 个循环。引物由北京 Invitrogen 公司设计合成,序列为 CRF 上游 5'-TGTCGCCCTGTCTGCCTTGC-3',下游 5'-CAGCGGGACTTCTGTTGAGGTTC-3',长度 180 bp; UCN2 上游 5'-ATGATGACCAGGTGGGCACTG-3',下游 5'-AGGTCACCCCATCTTTATGAC-3',长度 367 bp; β -actin 上游 5'-CCTAAGCCAACCGTGAAAA-3',下游 5'-GACCAGAGGCATACAGGGACA-3',长度 106 bp。每个样本检测 3 个复孔,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析 CRF,UCN2 mRNA 相对表达量。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,首先做正态性检验,若符合正态分布,则采用单因素方差分析,方差齐时选用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐选用 Games-Howell 检验;若不符合正态分布则采用非参数检验的多个独立样本 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 FD 脾虚证大鼠一般状态的影响 与正常组比较,模型组大鼠精神萎靡,反应迟钝,活动性降低,皮毛干枯不荣,大便稀溏;与模型组比较,各给药组大鼠一般状态均有所改善,精神转好,行动正常,毛色恢复,大便成形。

3.2 对 FD 脾虚证大鼠体质量的影响 与正常组比较,模型组大鼠体质量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠体质量均有不同程度增长,其中莫沙必利组及香砂六君子中、高剂量组增长最显著($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 香砂六君子汤对 FD 脾虚证大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on body weight of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n=6$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药前	给药后
正常		360.87±6.13	447.63±30.00
模型		278.85±14.81 ²⁾	350.28±22.48 ²⁾
莫沙必利	1.6×10 ⁻³	278.25±9.85	401.05±20.39 ⁴⁾
香砂六君子汤	2.8	279.25±12.29	380.83±11.92 ³⁾
	5.6	272.68±5.13	418.07±14.87 ⁴⁾
	11.2	272.77±6.16	405.10±28.47 ⁴⁾

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 2~6 同)。

3.3 对 FD 脾虚证大鼠进食量的影响 与正常组比较,模型组大鼠进食量显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠进食量均显著增加($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 香砂六君子汤对 FD 脾虚证大鼠进食量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on food intake of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n=6$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药前	给药后
正常		34.02±1.62	43.07±0.73
模型		30.12±0.42 ²⁾	37.21±0.48 ²⁾
莫沙必利	1.6×10 ⁻³	29.94±1.37	40.45±0.69 ⁴⁾
香砂六君子汤	2.8	29.23±0.57	41.52±0.95 ⁴⁾
	5.6	29.31±0.78	41.54±0.77 ⁴⁾
	11.2	29.25±0.84	39.28±0.28 ⁴⁾

3.4 对 FD 脾虚证大鼠抓力的影响 与正常组比较,模型组大鼠抓力显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,莫沙必利组及香砂六君子中、高剂量组大鼠抓力明显增加($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 香砂六君子汤对 FD 脾虚证大鼠抓力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on grasping ability of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n=6$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药前	给药后
正常		1 738.02±47.36	1 844.20±40.61
模型		1 386.37±106.47 ²⁾	1 634.40±84.09 ²⁾
莫沙必利	1.6×10 ⁻³	1 408.25±41.97	1 799.73±43.55 ³⁾
香砂六君子汤	2.8	1 407.85±42.09	1 686.25±122.00
	5.6	1 428.08±76.10	1 819.90±42.54 ³⁾
	11.2	1 448.15±95.35	1 792.83±55.92 ³⁾

3.5 对 FD 脾虚证大鼠胃排空率的影响 与正常组比较,模型组大鼠胃排空率显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,莫沙必利组及香砂六君子中、高剂量

组大鼠胃排空率显著升高($P<0.01$)。见表4。

表4 香砂六君子汤对FD脾虚证大鼠胃排空率的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on gastric emptying rate of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	胃排空率/%
正常		73.79±7.78
模型		51.67±7.04 ²⁾
莫沙必利	1.6×10^{-3}	72.54±11.45 ⁴⁾
香砂六君子汤	2.8	57.88±12.92
	5.6	69.29±10.20 ⁴⁾
	11.2	74.08±10.08 ⁴⁾

3.6 对FD脾虚证大鼠胃窦组织病理形态的影响

各组大鼠胃窦组织病理形态基本正常,未见明显器质性改变,无炎症细胞浸润、溃疡及腺体萎缩等表现。见图1。

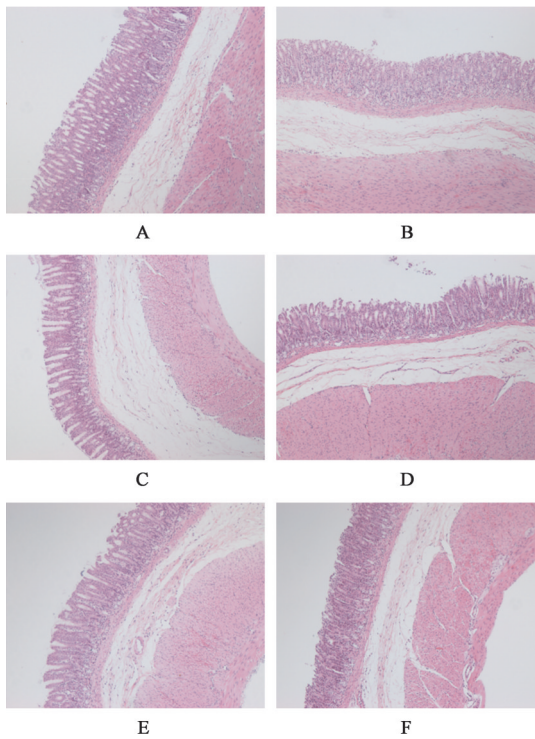


图1 香砂六君子汤对FD脾虚证大鼠胃窦组织病理形态的影响(HE, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on gastric antral morphology of FD rats with spleen deficiency (HE, $\times 100$)

3.7 对FD脾虚证大鼠胃窦组织CRF,UCN2蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠胃窦组织CRF蛋白表达显著升高($P<0.01$),UCN2蛋白表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,莫沙必利组、香

砂六君子高剂量组CRF蛋白表达明显降低($P<0.05$),香砂六君子高剂量组UCN2蛋白表达显著升高($P<0.01$)。见图2,表5。

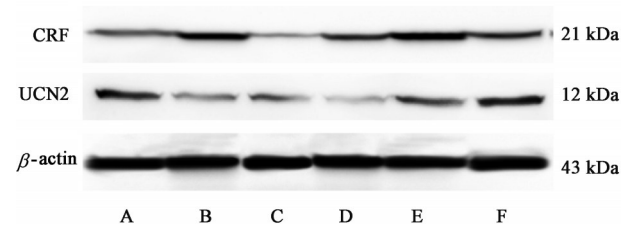


图2 FD脾虚证大鼠胃窦组织CRF,UCN2蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of CRF and UCN2 protein in gastric antrum tissues of FD rats with spleen deficiency

表5 香砂六君子汤对FD脾虚证大鼠胃窦组织CRF,UCN2蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on expression of CRF and UCN2 protein in gastric antrum tissues of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	CRF/ β -actin	UCN2/ β -actin
正常		0.37±0.17	0.70±0.14
模型		0.77±0.20 ²⁾	0.37±0.17 ¹⁾
莫沙必利	1.6×10^{-3}	0.42±0.17 ³⁾	0.40±0.19
香砂六君子汤	2.8	0.59±0.33	0.25±0.19
	5.6	0.58±0.12	0.49±0.23
	11.2	0.42±0.08 ³⁾	0.82±0.15 ⁴⁾

3.8 对FD脾虚证大鼠胃窦组织CRF,UCN2 mRNA表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠胃窦组织CRF mRNA表达量显著升高($P<0.01$),UCN2 mRNA表达量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,香砂六君子中剂量组CRF mRNA表达量有所降低($P<0.05$),而莫沙必利组、香砂六君子高剂量组降低更明显($P<0.01$),香砂六君子高剂量组UCN2 mRNA表达量升高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。见表6。

表6 香砂六君子汤对FD脾虚证大鼠胃窦组织CRF,UCN2 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 6 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on expression of CRF and UCN2 mRNA in gastric antrum tissues of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	CRF	UCN2
正常		0.30±0.05	1.63±0.13
模型		0.75±0.33 ²⁾	0.49±0.12 ²⁾
莫沙必利	1.6×10^{-3}	0.17±0.09 ⁴⁾	0.73±0.23
香砂六君子汤	2.8	0.57±0.20	0.73±0.20
	5.6	0.38±0.16 ³⁾	0.92±0.41
	11.2	0.31±0.16 ⁴⁾	1.58±0.46 ⁴⁾

4 讨论

FD的发病机制尚不明确,目前仍认为胃动力障碍是其主要病理基础,而胃动力障碍的首要表现为胃排空延迟。有研究发现25%~35%的FD患者存在胃排空延迟,这与FD症状如餐后饱胀、早饱感、恶心呕吐等密切相关^[14]。中医认为胃的动力依赖于脾胃气机升降^[15]。脾胃同居中焦,互为表里,“脾主运且升清,胃主纳且降浊”,两者共同维持胃运动的基本动力。当各种原因引起脾虚,“脾病不能为胃行其津液”,脾胃升降失常,则发生胃动力障碍。可见,中焦脾胃升降失常是本病的基本病机,而脾虚为病机关键,治疗以健脾为主。

香砂六君子汤源自《古今名医方论》,该方是在四君子汤为主方的基础上加半夏、陈皮、木香、砂仁而成,方中党参、白术、茯苓、甘草组成四君子汤,可益气健脾,加半夏、陈皮可燥湿化痰,木香、砂仁可行气开郁。全方配伍,温而不燥,健中有消,补而不滞,具有健脾益气、行气化痰之功,被推荐为治疗FD脾虚证的代表方^[16]。现代药理学研究发现香砂六君子汤具有保护胃黏膜,促进胃排空的作用^[17]。本实验中,模型组大鼠一般状态较差,体质量、进食量、抓力及胃排空率较正常组明显降低,胃窦组织无病理形态学改变,这符合FD脾虚证的症状特点,经中、高剂量香砂六君子汤干预后,上述症状及胃排空率出现不同程度的改善,提示香砂六君子汤对FD脾虚证大鼠具有改善症状、促进胃动力的作用。

CRF是一种由41个氨基酸组成的神经内分泌肽,广泛分布于中枢神经系统与胃肠道等外周组织^[18]。CRF可引起胃动力的改变,最常见的形式为抑制胃排空,多数研究认为这与应激诱发的中枢CRF激活相关^[19]。越来越多证据表明外周CRF对胃动力也有相同的影响,实验动物腹腔内注射CRF可导致胃排空延迟^[20],在体外实验中CRF能够抑制大鼠离体胃窦平滑肌的自发收缩^[21]。本研究观察了FD脾虚证大鼠模型胃窦CRF mRNA与蛋白表达情况及香砂六君子汤的干预作用。结果显示,模型组大鼠胃窦CRF mRNA与蛋白表达量均明显高于正常组;给予药物干预后,香砂六君子汤高剂量组胃窦CRF mRNA与蛋白表达量较模型组明显降低,提示香砂六君子汤能够降低FD脾虚证大鼠胃窦CRF的表达水平,并且呈现一定的量效关系,高剂量作用更显著。

UCN2是CRF肽家族的新成员,在大鼠胃组织中主要表达于黏膜层与肌层^[22]。有研究发现外周

UCN2通过与CRF2受体特异性结合,能够引起与CRF类似的胃排空抑制作用^[23]。另一方面,UCN2做为CRF2受体的激动剂,可抑制CRF1受体,从而阻断CRF对胃平滑肌的收缩功能^[24]。目前有研究显示,FD大鼠模型中碘乙酰胺能造成胃组织CRF2受体蛋白表达减少,沉默胃CRF RNA又能增加CRF2受体表达^[25]。但UCN2在FD胃中的表达情况及作用尚不可知。本研究发现,FD脾虚证大鼠胃窦UCN2 mRNA与蛋白表达量较正常组均明显下降,香砂六君子汤高剂量能提高UCN2 mRNA与蛋白表达量。

综上所述,香砂六君子汤可降低FD脾虚证大鼠胃窦CRF蛋白和基因表达,抑制CRF介导的胃动力障碍,同时又能上调UCN2蛋白和基因表达,通过调节CRF-UCN2平衡进一步发挥促胃动力作用,这可能是健脾复方治疗FD的作用靶点,为其临床应用提供了一定的实验证据。但仍需深入探索外周CRF1,CRF2受体在CRF-UCN2失衡导致FD胃动力障碍中的作用及香砂六君子汤对其的影响。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GHOSHAL U C, SINGH R, CHANG F Y, et al. Epidemiology of uninvestigated and functional dyspepsia in Asia: facts and fiction [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 17(3): 235-244.
- [2] LACY B E, WEISER K T, KENNEDY A T, et al. Functional dyspepsia: the economic impact to patients [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013, 38(2): 170-177.
- [3] FORD A C, MAHADEVA S, CARBONE M F, et al. Functional dyspepsia [J]. *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30469-4.
- [4] MARTINEZ V, WANG L, MILLION M, et al. Urocortins and the regulation of gastrointestinal motor function and visceral pain [J]. *Peptides*, 2004, 25(10): 1733-1744.
- [5] TACHE Y, LARAUCHE M, YUAN P Q, et al. Brain and gut CRF signaling: biological actions and role in the gastrointestinal tract [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2018, 11(1): 51-71.
- [6] BROWNING K N, BABIC T, TOTI L, et al. Plasticity in the brainstem vagal circuits controlling gastric motor function triggered by corticotropin releasing factor [J]. *J Physiol*, 2014, 592(20): 4591-4605.
- [7] 尹晓岚,唐旭东,王风云,等. 脾失健运与功能性消化不良发病机制探讨 [J]. *世界中医药*, 2017, 12(1):

- 207-210.
- [8] LV L, WANG F Y, MA X X, et al. Efficacy and safety of Xiangsha Liujunzi granules for functional dyspepsia: a multi-center randomized double-blind placebo-controlled clinical study [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(30): 5589-5601.
- [9] 田亚欣. 基于胃肠动力探讨健脾方剂对FD脾虚证病证结合大鼠模型的作用研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2017.
- [10] LIU L S, WINSTON J H, SHENOY M M, et al. A rat model of chronic gastric sensorimotor dysfunction resulting from transient neonatal gastric irritation [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(7): 2070-2079.
- [11] SUCHECKI D, TUFIK S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat [J]. *Physiol Behav*, 2000, 68(3): 309-316.
- [12] 吕林, 唐旭东, 王凤云, 等. 胃动力障碍型功能性消化不良动物模型的建立[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(8): 944-949.
- [13] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 202-203.
- [14] CHOKSHI R V, CHANG L. Is it time to abandon gastric emptying in patients with symptoms of gastroparesis and functional dyspepsia? [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2021, 23: S1542-3565.
- [15] 郭彬彬, 于庆生, 沈毅, 等. 中医药对应激性胃肠动力障碍的治疗研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2018, 30(3): 578-581.
- [16] 张声生, 赵鲁卿. 功能性消化不良中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(6): 2595-2598.
- [17] 杨森林, 黄福斌. 香砂六君子汤药理研究及临床应用进展[J]. *国际中医中药杂志*, 2016, 38(5): 467-469.
- [18] GIANNOGONAS P, APOSTOLOU A, MANOUSOPOULOU A, et al. Identification of a novel interaction between corticotropin releasing hormone (CRH) and macroautophagy [J]. *Sci Rep*, 2016, doi:10.1038/srep23342.
- [19] 彭随风, 刘诗. CRF与应激相关的胃肠动力和内脏感觉改变的关系[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2007, 16(3): 294-297.
- [20] HUSSAIN Z, KIM H W, HUH C W, et al. The effect of peripheral CRF peptide and water avoidance stress on colonic and gastric transit in guinea pigs [J]. *Yonsei Med J*, 2017, 58(4): 872-877.
- [21] PORCHER C, PEINNEQUIN A, PELLISSIER S, et al. Endogenous expression and *in vitro* study of CRF-related peptides and CRF receptors in the rat gastric antrum [J]. *Peptides*, 2006, 27(6): 1464-1475.
- [22] YUAN P Q, WU S V, TACHÉ Y. Urocortins and CRF type 2 receptor isoforms expression in the rat stomach are regulated by endotoxin: role in the modulation of delayed gastric emptying [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(1): G20-G31.
- [23] CZIMMER J, TACHE Y. Peripheral corticotropin releasing factor signaling inhibits gastric emptying: mechanisms of action and role in stress-related gastric alterations of motor function [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(27): 4042-4047.
- [24] NOZU T, TSUCHIYA Y, KUMEI S, et al. Peripheral corticotropin-releasing factor (CRF) induces stimulation of gastric contractions in freely moving conscious rats: role of CRF receptor types 1 and 2 [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2013, 25(2): 190-197.
- [25] HAGIWARA S I, KAUSHAL E, PARUTHIYIL S, et al. Gastric corticotropin-releasing factor influences mast cell infiltration in a rat model of functional dyspepsia [J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e203704.

[责任编辑 孙丛丛]