

· 药理 ·

脾虚一号方对脾虚型功能性消化不良大鼠胃组织 线粒体呼吸链复合物 IV 亚单位的影响

吕林¹, 王风云¹, 唐旭东^{1*}, 马祥雪², 尹晓岚³, 石啸双³

(1. 中国中医科学院 西苑医院, 北京 100091; 2. 北京中医药大学 研究生院,
北京 100029; 3. 中国中医科学院 研究生院, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨脾虚型功能性消化不良(FD)大鼠胃组织线粒体呼吸链复合物 IV 亚单位(COX VA)蛋白和 mRNA 表达及脾虚一号方对其的干预作用。方法:70 只 7 d 龄雄性 SD 大鼠随机分为正常组,FD 模型组(单模型组),脾虚型 FD 模型组(双模型组),多潘立酮组,脾虚一号方低、中、高剂量组,每组 10 只。FD 模型组、脾虚证 FD 模型组给予 0.1% 蔗糖碘乙酰胺蔗糖溶液灌胃,连续 6 d。脾虚证 FD 模型组正常饲料喂养至 6 周龄后叠加改良小平台站立,连续 14 d。造模结束后分别给予蒸馏水 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,多潘立酮 3.125 mg·kg⁻¹·d⁻¹,脾虚一号方 1.275,2.55,5.1 g·kg⁻¹·d⁻¹,灌胃 14 d。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白质免疫印迹(Western blot)和免疫组化法检测胃窦组织 COX VA mRNA 与蛋白表达量。结果:与正常组比较,脾虚一号方高剂量组 COX VA 蛋白平均积分吸光度升高($P < 0.05$);多潘立酮组、脾虚一号方低、中剂量组 COX VA 蛋白表达量均有不同程度降低($P < 0.01$),而脾虚一号方高剂量组 COX VA 蛋白表达量则升高($P < 0.01$);单模型组 COX VA mRNA 表达量升高最明显($P < 0.01$)。与双模型组比较,多潘立酮组、脾虚一号方低、中剂量组 COX VA 蛋白表达量均有不同程度降低($P < 0.01$),多潘立酮组、脾虚一号方低、中剂量组 COX VA mRNA 表达量均有不同程度降低,而脾虚一号方高剂量组、单模型组则升高,差异均无统计学意义。结论:脾虚型 FD 大鼠存在 COX VA 蛋白的表达量降低,脾虚一号方能够增加 COX VA 蛋白的表达量,改善能量代谢。

[关键词] 脾虚证; 功能性消化不良; 线粒体呼吸链复合物 IV; 细胞色素 C 氧化酶亚单位 VA; 脾虚一号方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0102-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070102

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1342.040.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 13:42

Effect of Pixu I Recipe on Cytochrome C Oxidase Subunit VA Expression in Gastric Tissues of FD Rats with Spleen Deficiency

LYU Lin¹, WANG Feng-yun¹, TANG Xu-dong^{1*}, MA Xiang-xue², YIN Xiao-lan³, SHI Xiao-shuang³

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

2. Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the protein and mRNA expression levels of mitochondrial respiratory chain complex IV A (COX VA) in gastric tissues of functional dyspepsia (FD) rats with spleen deficiency and explore the effect of Pixu I recipe intervention. **Method:** Seventy 10-day-old male SD rats were randomly divided

[收稿日期] 20160812(009)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB531703);国家自然科学基金项目(81503567);中国博士后科学基金项目(2015M1227,2016T90195)

[第一作者] 吕林,博士,从事中医药治疗功能性胃肠病工作,Tel:010-62845641,E-mail:lushangshitou@qq.com

[通讯作者] *唐旭东,博士,主任医师,从事中医药治疗消化系统疾病工作,Tel:010-62835678,E-mail:txdy@sina.com.cn

into normal group, FD model group (single model group), spleen deficiency type FD model group (dual model group), Domperidone group, Pixu I recipe low dose group, medium dose group, and high dose group. The rats in FD model group and spleen deficiency type FD model group were gavaged with 0.2 mL of 0.1% IA in 2% sucrose for 6 days. Normal feeding was given to the rats in spleen deficiency type FD model group till 6-week-old, and then modified multiple platform method (MPPM) was used for 14 days. After successful modeling, they were gavaged with 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹ distilled water, 3.125 mg·kg⁻¹·d⁻¹ Domperidone, 1.275, 2.55, 5.1 g·kg⁻¹·d⁻¹ Pixu I recipe for 14 days. COX VA mRNA and protein expression levels in liver tissues were detected by immunohistochemistry, Western blot and Real-time PCR. **Result:** As compared with the normal group, the mean optical density value of COX VA proteins was increased in high-dose Pixu I recipe group ($P < 0.05$); COX VA protein expression levels were decreased to different degrees in Domperidone group, low-dose and medium-dose Pixu I recipe groups ($P < 0.01$), while the COX VA protein expression level in high-dose Pixu I recipe group was increased; the increase in COX VA mRNA expression was most obvious in single model group ($P < 0.01$). As compared with the dual model group, COX VA protein expression levels were decreased to different degrees in Domperidone group, low-dose and medium-dose Pixu I recipe groups ($P < 0.01$), and the mRNA expression levels were also decreased while the levels in high dose group and single model group were increased without statistically significant differences. **Conclusion:** COX VA mRNA and protein expression levels were decreased in spleen deficiency type FD rats, and Pixu I recipe could increase the COX VA protein expression level and improve energy metabolism.

[Key words] spleen deficiency syndrome; functional dyspepsia; mitochondrial respiratory chain complex IV; cytochrome C oxidase subunit VA; Pixu I recipe

中医认为“脾主运化”，是“后天之本”，为气血生化之源。脾主运化，从饮食中吸收营养物质，使其输布于五脏六腑，四肢百骸。中医脾胃与现代医学的消化系统最为密切，现代医学认为机械性消化和化学性消化两功能同时进行，共同完成消化过程。其中“脾主运”属于机械性消化，胃肠肌肉的活动，将大块的食物变成碎小的，使消化液充分与食物混合，并推动食团或食糜下移；“脾主化”是化学性消化，由消化腺所分泌的各种消化液，将复杂的各种营养物质分解为肠壁可以吸收的简单的化合物，如糖类分解为单糖，蛋白质分解为氨基酸，脂类分解为甘油及脂肪酸。然后这些分解后的营养物质被小肠吸收进入体内，进入血液和淋巴液。因此，现代医学认为肌肉的舒缩功能正常与否与能量代谢密切相关^[1]，中医学者也提出了“中医脾-线粒体相关”学说^[2]。“脾主运”即机械性消化是整个消化吸收过程的前提，是以胃肠蠕动为先决条件，而胃肠平滑肌的收缩需要 ATP 提供能量，因此拥有充分的三磷酸腺苷 (ATP) 是保证机械性消化的必备条件。中医脾虚后会出现“脾不运”，出现物质能量代谢降低，进一步则会出现机械性消化能力降低，表现出胃肠动力降低现象。胃肠动力障碍性疾病临床上最常见于功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD), FD 在

治疗上常采用促进胃动力药物，但是治疗效果并不理想^[3]。中医治疗 FD 具有自身优势，在脾胃气虚证 FD 的治法上强调健脾益气、和胃降逆，选择香砂六君子汤加减^[4]。脾虚一号方是唐旭东教授在香砂六君子汤的基础上增加延胡索、枳壳等药物组成，临床上主要针对脾虚气滞证 FD 患者，具有很好的临床疗效。

线粒体作为“能量工厂”，细胞呼吸作用包括三羧酸循环和氧化磷酸化两个过程，其中氧化磷酸化过程的电子传递链/线粒体呼吸链位于线粒体内膜上，由四个相对分子质量很大的跨膜蛋白复合体 (I, II, III 和 IV) 构成。线粒体呼吸链复合物 IV (mitochondrial respiratory chain complex IV, COX IV) 又称为细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome C oxidase, COX)，由 13 个亚基组成，是参与线粒体电子传递链的关键氧化酶，主导线粒体内 90% 的分子氧消耗，其活性的强弱决定了线粒体能量代谢的高低。COX 是由细胞核基因组和线粒体基因组分别编码的亚基共同组成的复杂复合物，其中 COX VA 亚基由细胞核基因编码，指导 COX IV 的正确装配，维持结构稳定^[5]，但有关核编码的亚基是如何具体调节 COX IV 活性目前还不清楚。有研究表明在酵母菌中 COX VA 对 COX IV 活性影响较大^[6]。本研究以脾虚型

FD大鼠模型为对象,从线粒体能量代谢关键酶-COX IV的角度,观察了脾虚一号方对其亚单位COX VA蛋白及基因水平的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性乳鼠70只,7 d龄,带母鼠,每只母鼠带10只幼鼠,为其提供母乳。母鼠与所带幼鼠为一笼,饲养于清洁级动物房,12 h节律,室温(22 ± 2) °C,湿度60%~70%。母鼠以全价颗粒饲料喂养,自由饮水。实验动物均由斯贝福(北京)实验科技有限公司提供。许可证号SYXK(京)2013-0012。本研究所涉及的动物实验均获得中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 兔抗COX VA单克隆抗体(艾博抗贸易有限公司,批号ab180129),HRP标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(圣克鲁斯生物技术公司,批号Sc-2004),超纯RNA提取试剂盒,HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒,UltraSYBR Mixture(With ROX),DNase 1,5 × RNA Loading Buffer(康为世纪公司,批号分别为CW0581, CW0744, CW0956, CW2090, CW0611A);碘乙酰胺(西奥格玛公司,批号1001437587),蔗糖(拜尔迪公司,批号0552C003),多潘立酮片(西安杨森制药有限公司,批号141124263),脾虚一号方(香砂六君子汤加减,由中国中医科学院西苑医院药剂科制作)。

1.3 仪器 QL-902型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),NANODROP 2000型分光光度计及MULTISKAN MK3型酶标仪(赛默飞世尔科技公司),ABI7500型实时荧光定量PCR仪(美国应用生物系统公司),VE-180型电泳仪及VE-186型转膜仪(上海天能科技有限公司),6100型凝胶成像仪[赛智科技(杭州)有限公司]。

2 方法

2.1 分组 取雄性SD大鼠(乳鼠)70只,根据体重随机分成正常组($n = 10$),FD模型组(单模型组, $n = 10$),脾虚型FD模型组(双模型组, $n = 50$)。造模结束后,将脾虚型FD大鼠随机分为双模型组、多潘立酮组、脾虚一号方低、中、高剂量组,每组10只。

2.2 造模 参照文献[7],健康雄性SD大鼠(乳鼠)70只,出生7 d,带母鼠,每只母鼠带10只乳鼠。购进动物先进行3 d适应性饲养。40周日光灯照射(8:00~20:00),室内温度控制在 $22.0 \sim 24.0$ °C,保持安静,每只笼内放1只母鼠带5只乳鼠。常规鼠类饲料喂养母鼠。正常组出生10日SD雄性乳鼠,每日2%蔗糖溶液灌胃(ig),每只0.2 mL,连续

ig 6 d;碘乙酰胺组加小平台站立组(双模型组);碘乙酰胺组(单模型组);出生10日SD雄性乳鼠,每日0.1%蔗糖碘乙酰胺溶液ig,每只0.2 mL,连续ig 6 d;大鼠3周龄时,剔除母鼠,分笼,每笼5只,正常鼠饲料喂养。至大鼠6周龄后,正常组(前期蔗糖溶液ig大鼠),继续给予正常鼠饲料喂养;碘乙酰胺组前期给予碘乙酰胺蔗糖溶液ig大鼠,继续给予正常鼠饲料喂养;碘乙酰胺加小平台站立组前期给予碘乙酰胺蔗糖溶液ig大鼠,继续给予正常鼠饲料喂养,至出生第43天,每日17:00~7:00进行小平台站立,连续14 d。

改良小平台法^[8]:向小平台站立箱水槽中注水,水温(22 ± 2) °C,注水量以水面达到小平台台面下2.0 cm为宜。大鼠在小平台上可以自由活动,一旦进入睡眠状态就会因为肌肉舒张、松弛而落入水中,不能休息,以此造成大鼠劳倦。每日17:00~7:00进行小平台站立,持续14 h,连续14 d。

2.3 给药 脾虚一号方高、中、低剂量组按照大鼠用药剂量 = 大鼠体重/60 kg × 6.25 公式计算,60 kg成人使用香砂六君子汤的原生药量为125 g,对应大鼠生药用量为 $125 \text{ g}/60 \text{ kg} \times 6.25 = 1.3 \text{ g}/100 \text{ g}$,按照1 g颗粒剂含有5.1 g生药计算,每只大鼠ig给药量为 $2.55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,按照每只大鼠100 g ig 1 mL溶液计算,中剂量每只大鼠ig $2.55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,低剂量为 $1.275 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,高剂量为 $5.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每日1次;按照多潘立酮成人每次1片,每日3次,60 kg成人使用量是 $30 \text{ mg}/60 \text{ kg}$,SD大鼠使用量为 $30 \text{ mg}/60 \text{ kg} \times 6.25 = 3.125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;正常组、单模型组、双模型组灌服蒸馏水量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每日上午ig给药1次,连续用药14 d。

2.4 取材 在末次给药禁食不禁水12 h,麻醉前1 h称体重,7%水合氯醛($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉开腹,剪取胃体组织约 $2.0 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$,4 °C生理盐水冲洗,滤纸吸干,放入液氮中,然后转移到-80 °C冰箱中保存待测。另剪取胃体组织约 $1.0 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$ 大小,以4 °C生理盐水冲洗,滤纸吸干后,置入4%多聚甲醛固定液中,脱水,石蜡包埋,切片,备用。

2.5 检测

2.5.1 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)法检测COX VA mRNA的表达 从-80 °C超低温冰箱取出胃体组织,在研磨器中研磨裂解后, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min。胃体组织总RNA的提取严格按试剂盒说明进行,所提总RNA经核酸测定仪测定样品RNA含量和纯度。根据总RNA的含量逆转录为

cDNA, 以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, COX VA 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 特异性引物由北京亿鸣复兴生物科技有限公司设计合成, COX VA 引物序列: 上游 5'-CTGCCGCTGTCTGTTCCATTCG-3', 下游 5'-TGTCAC CCAGCGAGCATCAAAC-3', 扩增片段长度 80 bp; GAPDH 的上游 5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTT-3', 下游 5'-TGTCATATTCTCGTGGTTCA-3', 扩增片段长度 138 bp。反应条件如下: 先 94 °C 预变性 5 min, 后 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s, 总共 36 个循环, 最后 72 °C 延长 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳后采用凝胶成像分析软件分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行相对定量, ΔC_t = 基因 C_t - 内参 C_t , $\Delta\Delta C_t$ = 实验组 C_t - 正常组 C_t 。

2.5.2 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 COX VA 蛋白表达 将胃体样本低温研磨, 加入 RIPA 裂解液, 碧云天 BCA 工作液于紫外分光光度仪上测定蛋白浓度。样品上样, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 半干电转膜仪转膜。封闭后按照一抗: 封闭液 1:1 万的比例配置一抗孵育液, 4 °C 过夜。洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔抗体, 振荡。将 PVDF 膜于室温下振荡温育。ECL 显色, X 射线胶片曝光, 经显影、定影、扫描后观察结果。应用 Quantity one 软件对扫描图像的目的条带进行灰度值分析, 各目的条带与 GAPDH 的吸光度比值为目的蛋白的相对表达量。

2.5.3 免疫组化法测定大鼠胃体组织中 COX VA 表达量 取胃体组织石蜡切片常规脱蜡水化, PBS (pH 7.4) 冲洗 3 min × 3 次; 滴加过氧化酶阻断溶液 50 μL, 室温孵育 10 min; PBS 冲洗 3 min × 3 次; 滴加一抗 50 μL, 4 °C 过夜, PBS 冲洗 3 min × 3 次; 滴加生物素标记的二抗 50 μL, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 min × 3 次; 滴加链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液 5 μL, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 min × 3 次; DAB 显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。Quantity one 分析系统分析, 高倍显微镜 (×400) 下观察胃体组织横断面固有层单位面积上 COX VA 的表达量, 每张切片随机观察 5 个视野, 分别统计积分吸光度 IA, 然后求取每组大鼠 COX VA 表达量的平均值。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析时先进行正态性检验, 然后进行单因素方差分析。若满足方差齐性, 用 LSD 法和 Dunnett 进行分析; 若方差不齐, 则用 Tamhane's

T2 进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对脾虚型功能性消化不良大鼠胃组织 COX VA 蛋白 IA 表达的影响 各组胃体组织细胞胞浆可见棕黄色颗粒, 与双模型组比较, 其余各组 COX VA 蛋白平均 IA 均有不同程度升高, 但是差异无统计学意义; 与正常组比较, 除双模型组外, 其余各组 COX VA 蛋白平均 IA 均有不同程度升高, 其中脾虚一号方高剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 1。

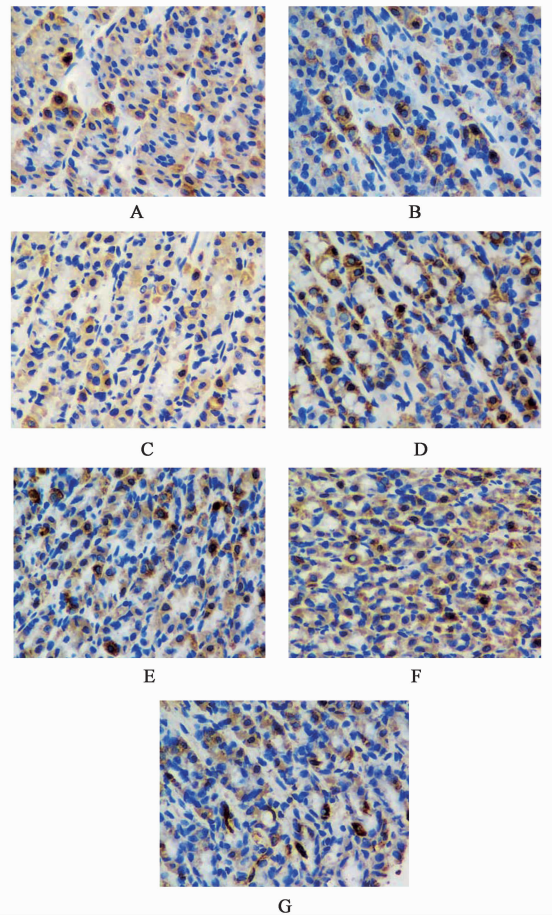


图 1 脾虚型功能性消化不良大鼠胃组织 COX VA 蛋白表达 (免疫组化, ×400)

Fig.1 Expression of COX VA protein in gastric tissues of FD rats with spleen deficiency (IHC, ×400)

3.2 对脾虚型功能性消化不良大鼠 COX VA 蛋白表达的影响 与双模型组比较, 正常组、多潘立酮组、脾虚一号方低、中剂量组、单模型组 COX VA 蛋白表达量均有不同程度降低, 其中多潘立酮组、脾虚一号方低、中剂量组降低最明显, 差异有统计学意义

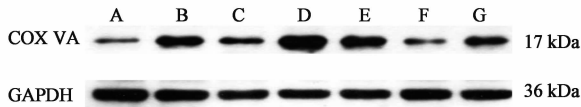
表 1 脾虚一号方对脾虚型功能性消化不良大鼠胃组织 COX VA 蛋白 IA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Pixu I recipe on expression of COX VA protein IA in gastric tissues of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	COX VA 蛋白
正常	-	0.018 ± 0.005
双模型	-	0.015 ± 0.004
多潘立酮	3.125 × 10 ⁻³	0.020 ± 0.004
脾虚一号方	1.275	0.024 ± 0.009
	2.55	0.024 ± 0.004
	5.1	0.027 ± 0.004 ²⁾
单模型	-	0.025 ± 0.006

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

($P < 0.01$);与正常组比较,多潘立酮组、脾虚一号方低、中剂量组、单模型组 COX VA 蛋白表达量均有不同程度降低,其中多潘立酮组、脾虚一号方低、中剂量组差异有统计学意义($P < 0.01$),而脾虚一号方高剂量组则升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2,表 2。



A. 多潘立酮组; B. 双模型组(脾虚型 FD 模型组); C. 脾虚一号方 1.275 g·kg⁻¹组; D. 脾虚一号方 5.1 g·kg⁻¹组; E. 单模型组(FD 模型组); F. 脾虚一号方 2.55 g·kg⁻¹组; G. 正常组

图 2 脾虚型功能性消化不良大鼠胃组织 COX VA 蛋白表达

Fig. 2 Expression of COX VA protein in gastric tissues of FD rats with spleen deficiency

表 2 脾虚一号方对脾虚型功能性消化不良大鼠胃组织 COX VA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Pixu I recipe on expression of COX VA protein in gastric tissues of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	COX VA
正常	-	1.452 ± 0.173
双模型	-	1.573 ± 0.276
多潘立酮	3.125 × 10 ⁻³	0.244 ± 0.030 ^{1,3)}
脾虚一号方	1.275	0.462 ± 0.062 ^{1,3)}
	2.55	0.263 ± 0.056 ^{1,3)}
	5.1	1.903 ± 0.174 ²⁾
单模型	-	1.398 ± 0.243

3.3 对脾虚型功能性消化不良大鼠 COX VA mRNA 表达的影响 与双模型组比较,正常组、多潘立酮组、脾虚一号方低、中剂量组 COX VA mRNA 表达量均有不同程度降低,而脾虚一号方高剂量组、

单模型组则升高,差异均无统计学意义;与正常组比较,单模型组 COX VA mRNA 表达量升高最明显,差异有统计学意义($P < 0.01$),其余各组虽有不同程度升高,但差异均无统计学意义。见表 3。

表 3 脾虚一号方对脾虚型功能性消化不良大鼠 COX VA mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Pixu I recipe on expression of COX VA mRNA in gastric tissues of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	COX VA
正常	-	1.156 ± 0.451
双模型	-	2.591 ± 0.886
多潘立酮	3.125 × 10 ⁻³	1.497 ± 0.731
脾虚一号方	1.275	1.215 ± 0.311
	2.55	1.263 ± 0.300
	5.1	3.526 ± 1.195
单模型	-	2.708 ± 0.578 ³⁾

4 讨论

线粒体是细胞的“动力工厂”,线粒体的活跃状况很大程度上决定了细胞活性,维持线粒体含量和功能对于维持机体健康非常重要^[9],人体每天进行正常活动所需的 ATP 量约等于他的体重,如体重为 70 kg,则每天即需合成 70 kg 的 ATP^[10]。

COX IV 在 ATP 生成的过程中扮演者其将由复合体 I, II, III 传递的电子给氧分子,同时耦合膜内外质子的易位,最终被氧化,并伴随一分子水生成的角色^[11]。随后线粒体内膜上的 ATP 合酶利用跨膜电位合成 ATP,合成的 ATP 通过线粒体内膜 ADP/ATP 载体与细胞质中 ADP 交换进入细胞质,参与细胞的各种需能过程,因此,线粒体跨膜电位和 ATP 的变化直接影响着细胞的动能,继而会影响到相应组织的运动能力^[12-13]。通常线粒体跨膜电位和 ATP 水平的升高表明,线粒体功能增强,能量供应充足,动能增加,细胞/组织运动能力加强。既往研究发现急性心肌梗死(AMI)大鼠模型中存在能量代谢(氧化磷酸化)作用通路相关基因—COX VA 基因异常表达现象,可能是引起 AMI 心肌损伤的重要分子机制之一^[14],益气养阴活血配伍中药能够使 AMI 模型大鼠明显下降的 COX VA 基因的表达与 COX IV 酶活性上调^[15]。朱金照等^[16]发现肝硬化大鼠胃运动功能减退与胃窦平滑肌 COX IV 亚单位 II mRNA 的表达下降及线粒体膜电位的降低有关。

FD 是一种常见的临床慢性疾病,病理机制主要涉及胃动力障碍占 23%,内脏高敏感占 35%,胃

容受性舒张障碍为 40%^[17]。FD 亚型餐后不适综合征 (PDS) 患者胃电节律紊乱可能与腹胀、腹部不适、早饱等消化不良症状有关,其机制可能是胃电节律紊乱引起胃部肌肉收缩异常、胃排空障碍或胃动力低下^[18]。中医脾虚证存在物质能量降低现象^[19],脾虚能够导致纳差、疲倦、乏力,是胃肠动力障碍性疾病的主要病机。正如《素问·太阴阳明论》曰:“今脾病不能为胃行其津液,四肢不得禀水谷气,气日以衰,脉道不利,筋骨肌肉,皆无气以生,故不用焉。”FD 的中医病机是中焦脾胃升降失常所致^[20],中医从“脾主运化”理论入手,强调了“脾主运”针对胃动力障碍的 FD,治疗上以健脾为主^[21]。六君子汤是中医经典健脾方剂,《医学正传》中其药物组成是人参、白术、茯苓、炙甘草、半夏、陈皮,目前临床上运用治疗 FD 取得了很好的疗效^[22],在此基础上加木香、砂仁组成香砂六君子汤,治疗 FD 也取得了很好的疗效^[23]。本次使用的脾虚一号方是在香砂六君子汤的基础上加延胡索、枳壳等药物组成,临床上治疗脾虚气滞证 FD 治疗有很好的疗效,能够提高 FD 患者胃排空率^[24]。

研究结果显示,造模结束,FD 模型组和脾虚型 FD 组存在 COX VA 蛋白的表达量降低,虽然没有给予药物干预,但是与正常组比较,在 14 d 后出现了 COX VA mRNA 及蛋白的表达量增加,在蛋白水平表达上无统计学差异,但是在基因水平,FD 模型组差异有统计学意义,提示在功能性疾病阶段的脾虚轻度程度时,机体具有自己调节恢复能力。给予药物干预后,多潘立酮组、脾虚一号方低、中剂量组 COX VA mRNA 及蛋白的表达量却有所降低,其中在蛋白水平上,该 3 组与正常组的差异均有统计学意义,但是在基因水平上,上述 3 组的差异无统计学意义。结果提示尽管给予了健脾药物干预,但是没有达到合适的剂量还是没有作用。笔者还发现给予脾虚一号方高剂量后,COX VA mRNA 及蛋白的表达量较正常组均明显升高,但是仅在蛋白水平出现了统计学差异,提示脾虚一号方能够提高 COX VA 蛋白表达量来发挥治疗脾虚作用,改善能量代谢。在 COX VA 蛋白胃体定位表达中,双模型组的 COX VA 蛋白平均 IA 最低,其余各组却比正常组增加,但是仅仅在脾虚一号方高剂量组差异有统计学意义,提示脾虚一号方能够增加胃体组织 COX VA 蛋白表达量。FD 模型未出现 COX VA 蛋白表达上与正常组的差异,但是在叠加小平台站立构建脾虚型 FD 模型上,却出现了 COX VA 蛋白水平与正常组比较

有明显的降低,尽管不给于药物干预后也能恢复至正常水平,但是给予高剂量健脾中药干预后还是会有明显改善。

综上所述,本研究表明脾虚证 FD 大鼠存在能量代谢降低现象,并且机体具有自动调节恢复能力,不给于药物干预的状态下仍能够恢复至正常状态,但是给予健脾中药干预后,机体能够恢复至更高水平。此外,从另外一个方面来看,中药的剂量对于脾虚型 FD 模型大鼠的物质能量代谢的恢复也是很重要,不合适的剂量会延缓机体的恢复时间,也有可能是由于本次研究给予 14 d 的干预时间,尚未达到既定的疗程,因此未出现脾虚一号方低、中剂量组在 COX VA 蛋白表达水平恢复至正常水平。这在以后的实验中需要进一步设置不同的干预周期来进一步验证。此外尽管健脾中药能够对脾虚型 FD 大鼠 COX VA 蛋白表达水平有相应的影响,但是是否能够进一步提高 COX IV 的活性仍需要进一步研究。总之,中药健脾治疗 FD 的机制可能是从改善能量代谢的角度发挥作用,本研究丰富了中医脾-线粒体学说,并为临床运用提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 刘友章,刘江凯,弓淑珍,等. 中医“脾主肌肉”与骨骼肌舒缩运动中能量代谢关系的探讨[J]. 江苏中医药, 2009, 41(4): 5-7.
- [2] 刘友章,宋雅芳,劳绍贤,等. 胃脘痛患者胃黏膜超微结构研究及中医“脾-线粒体相关”理论探讨[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(12): 2439-2442.
- [3] Miwa H, Ghoshal U C, Gonlachanvit S, et al. Asian consensus report on functional dyspepsia [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2012, 18(2): 150-168.
- [4] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 功能性消化不良的中西医结合诊疗共识意见(2010)[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(11): 1545-1549.
- [5] Ludwig B, Bender E, Arnold S, et al. Cytochrome c oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation [J]. Chembiochem, 2001, 2(6): 392-403.
- [6] Dodia R, Meunier B, Kay C W M, et al. Comparisons of subunit 5A and 5B isoenzymes of yeast cytochrome c oxidase [J]. Biochem J, 2014, 464(Pt 3): 335-342.
- [7] 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.
- [8] Suchecki D, Tufk S. Social stability attenuates the stress in the modified multipleplatform method for paradoxical

- sleep deprivation in the rat [J]. *Physiol Behav*, 2000, 68 (3):309-316.
- [9] Russell A P, Foletta V C, Snow R J, et al. Skeletal muscle mitochondria: a major player in exercise, health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840 (4): 1276-1284.
- [10] 杨福愉. ATP合酶:一个最小的蛋白质分子转动马达[J]. *医学分子生物学杂志*, 2005, 2(4):243-249.
- [11] Belevich I, Verkhovsky M. Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(1):1-29.
- [12] Mironova G D, Kachaeva E V, Kopylov A T. Mitochondrial ATP-dependent potassium channel 1. The structure of the channel, the mechanisms of its functioning and regulation [J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2007(2):34-43.
- [13] Akopova O V, Nosar V I, Mankovskaya I N, et al. Calcium uptake in rat liver mitochondria accompanied by activation of ATP dependent potassium channel [J]. *Biochemistry: Mosc*, 2008, 73(10): 1146-1153.
- [14] 郭春雨, 殷惠军, 蒋跃绒, 等. 急性心肌梗死大鼠心肌基因表达谱构建、鉴定及功能基因的研究[J]. *北京大学学报:医学版*, 2008, 40(3):251-257.
- [15] 殷惠军, 郭春雨, 史大卓. 益气养阴活血配伍对缺血心肌差异基因表达的影响[J]. *科学通报*, 2009, 54(16):2325-2328.
- [16] 朱金照, 张志坚, 许其增, 等. 肝硬化大鼠胃窦平滑肌细胞色素氧化酶 II 基因及线粒体膜电位的变化[J]. *福建医科大学学报*, 2006, 40(3):228-230.
- [17] Tack J, Talley N J, Camilleri M. Functional gastroduodenal disorders [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(5): 1466-1479.
- [18] 俞媛洁, 陈继红, 于文蓁, 等. 功能性消化不良餐后不适综合征患者体表胃慢波信号特征[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2014, 35(3):787-800.
- [19] 刘友章, 王昌俊, 周俊亮, 等. 四君子汤修复脾虚大鼠线粒体细胞色素氧化酶的作用及机制[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(35): 118-122.
- [20] 肖洪玲, 吴元洁, 王翔, 等. 基于 CNKI 分析中医药治疗功能性消化不良用药规律[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(19):3866-3869.
- [21] 吕林, 唐旭东, 王凤云, 等. 从“脾主运化”理论探讨论治功能性胃肠病[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(1): 160-162.
- [22] 牛学恩, 王宇亮. 六君子汤治疗功能性消化不良伴抑郁症 43 例[J]. *中医杂志*, 2013, 54(17):38-39.
- [23] 范钦平. 香砂六君子汤加味方治疗功能性消化不良的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(3):146.
- [24] 吕林, 唐旭东, 王静, 等. 四君子汤对功能性消化不良餐后不适综合征患者胃中液体食物分布的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(12):4318-4323.

[责任编辑 周冰冰]