

· 经典名方 ·

## 基于RhoA/ROCK信号通路探讨逍遥散对 肝郁脾虚证大鼠胃肠动力的影响

陈媛<sup>1</sup>, 郑于林<sup>1</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 高琳<sup>1</sup>, 李晓红<sup>1,2\*</sup>, 杨力强<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200;

2. 广西中医药大学广西中医基础研究重点实验室, 南宁 530200)

**[摘要]** 目的:通过观察逍遥散对肝郁脾虚证大鼠胃组织RAS同源基因家族成员A(RhoA)和Rho相关螺旋卷曲蛋白激酶(ROCK)1、ROCK2表达的影响,探讨其调节肝郁脾虚证大鼠胃肠动力的作用机制。方法:72只SD雄性大鼠随机分为6组,分别为正常组、模型组、氟西汀组(0.001 8 g·kg<sup>-1</sup>)、逍遥散高(16.7 g·kg<sup>-1</sup>)、中(8.35 g·kg<sup>-1</sup>)、低(4.175 g·kg<sup>-1</sup>)剂量组,每组12只。除正常组外,其余各组大鼠采用慢性束缚应激方法造模,造模同时正常组和模型组大鼠给予10 mL·kg<sup>-1</sup>生理盐水灌胃,各药物组大鼠给予相应剂量的药物灌胃,每日1次,共21 d。造模结束后,测定各组大鼠胃排空率、小肠推进率;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃组织RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA和蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠胃排空率、小肠推进率及胃组织RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA和蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与模型组比较,逍遥散高、中、低剂量组明显升高大鼠胃排空率、小肠推进率及胃组织RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA和蛋白表达水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:逍遥散对肝郁脾虚证大鼠胃肠动力的改善可能与上调胃组织RhoA/ROCK信号通路的活性有关。

**[关键词]** 逍遥散; 肝郁脾虚证; 胃组织; RAS同源基因家族成员A(RhoA)/Rho相关螺旋卷曲蛋白激酶(ROCK)

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0001-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221401

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220628.1725.006.html>

**[网络出版日期]** 2022-06-30 8:37

### Effect of Xiaoyaosan on Gastrointestinal Motility in Rats with Liver Depression and Spleen Deficiency Syndrome Based on RhoA/ROCK Signaling Pathway

CHEN Ai<sup>1</sup>, ZHENG Yulin<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, GAO Lin<sup>1</sup>, LI Xiaohong<sup>1,2\*</sup>, YANG Liqiang<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Chinese Medicine Foundation Research,

Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Xiaoyaosan on the expression of RAS homologous gene family member A (RhoA) and Rho-related coiled protein kinase 1 and 2 (ROCK1 and ROCK2) in gastric tissues of rats with liver depression and spleen deficiency syndrome and to explore its mechanism of regulating gastrointestinal motility in rats with liver depression and spleen deficiency syndrome. **Method:** Seventy-two male SD rats were randomly divided into 6 group, namely the normal group, the model group, the fluoxetine

**[收稿日期]** 2022-04-25

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81860817,81560750);广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA138018);广西中医药大学广西中医基础研究重点实验室自主研究课题(20-065-53-06);广西中医药大学研究生教育创新计划项目(YCXJ2021002)

**[第一作者]** 陈媛,在读硕士,从事证候生物学基础及方证研究,Tel:0771-4733794,E-mail:3159083397@qq.com

**[通信作者]** \* 李晓红,博士,教授,硕士生导师,从事证候生物学基础及方证研究,Tel:0771-4733794,E-mail:lsyuan2008@126.com;

\* 杨力强,博士,教授,博士生导师,从事方剂配伍规律及方证研究,Tel:0771-4733794,E-mail:ylq6606@163.com

group ( $0.0018 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), the Xiaoyaosan high ( $16.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), medium ( $8.35 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and low-dose ( $4.175 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) group, with 12 rats in each group. In addition to the normal group, the rats in other groups were used to establish the model of liver depression and spleen deficiency syndrome by chronic restraint stress. At the same time, the rats in the normal group and the model group were given normal saline ( $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and the rats in each drug group were given corresponding doses of drugs once a day for 21 d. After modeling, the gastric emptying rate and intestinal propulsion rate of rats in each group were measured. The mRNA and protein expressions of RhoA, ROCK1, and ROCK2 in gastric tissues were detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** As compared with the normal group, the gastric emptying rate, intestinal propulsion rate, and the mRNA and protein expressions of RhoA, ROCK1, and ROCK2 in gastric tissues in the model group were lower ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The abnormal changes in the above indexes in the Xiaoyaosan high, medium, and low-dose groups were all improved in varying degrees as compared with the model group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Xiaoyaosan improves gastrointestinal motility in rats with liver depression and spleen deficiency syndrome, which may be related to the up-regulation of the RhoA/ROCK signal pathway in gastric tissues.

**[Keywords]** Xiaoyaosan; liver depression and spleen deficiency syndrome; stomach; RAS homologous gene family member A (RhoA)/Rho-related coiled protein kinase (ROCK)

肝郁脾虚证多因情志不遂,郁怒伤肝,肝失条带,木郁乘土,或饮食劳倦伤脾,脾失健运,土壅侮木,肝失疏泄所致。其临床表现除有胸胁胀满窜痛,情志抑郁,善太息,或急躁易怒等症表现外,还常有腹胀纳呆、腹痛欲泻、便溏不爽等一系列消化系统症状。肝郁脾虚证临床上可见于多种疾病,是与情志疾病相关的主要中医临床证型之一<sup>[1]</sup>。目前的研究表明,肝郁脾虚证的生物学内涵与机体的神经-内分泌-免疫功能失调密切相关,涉及中枢和外周多个器官组织的病变<sup>[2]</sup>。肝郁脾虚证动物模型的建立为从整体探索肝郁脾虚证的生物学基础提供了切入点,由于情志失调是肝郁脾虚证发生发展的关键因素,慢性应激的生理病理过程与中医情志病的产生过程类似<sup>[3]</sup>,因此,慢性束缚应激是制作肝郁脾虚证大鼠模型的常用造模方式之一<sup>[4]</sup>。逍遥散是治疗肝郁脾虚证的经典名方,并且对应激损伤性疾病具有良好的疗效<sup>[5-6]</sup>。

前期研究发现,慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠胃组织存在差异表达基因组学背景,逍遥散高、中、低剂量对胃组织差异表达基因均具有一定的调节作用<sup>[7]</sup>。RAS同源基因家族成员A(RhoA)和Rho相关螺旋卷曲蛋白激酶(ROCK)在体内广泛存在,并且在不同的组织发挥着不同的生物效应。研究发现,RhoA/ROCK信号通路可调节平滑肌收缩,影响胃肠动力<sup>[8-9]</sup>。因此,本研究通过检测观察慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠胃组织RhoA/ROCK信号通路上的关键因子RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA和

蛋白表达变化,以进一步探索肝郁脾虚证的生物学基础及逍遥散的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 72只SPF级8周龄SD雄性大鼠饲养于广西中医药大学实验动物中心,体质量( $200\pm 20$ )g,动物许可证号SYXK(桂)2019-0001,自湖南斯莱克景达实验动物有限公司购入。饲养环境明暗周期为12h昼夜节律,相对湿度保持50%~60%,温度保持22.0~24.0℃,适应性饲养5d后开始造模。实验动物处理遵守广西中医药大学动物伦理委员会要求,动物伦理号W20190111-009。

**1.2 药物** 逍遥散药物组成为当归、白芍、柴胡、茯苓、白术各30g,炙甘草15g,烧生姜10g,薄荷<sub>后下</sub>10g。将药物按传统中药煎煮方法浸泡、煎煮、过滤,逍遥散高、中、低剂量浓缩至含生药量分别为16.7、8.35、4.175g·mL<sup>-1</sup>。盐酸氟西汀胶囊购自苏州中化药品工业有限公司,国药准字H20064844,规格20mg/粒,成人用药量20mg·d<sup>-1</sup>。

**1.3 试剂** TRIzol提取试剂(美国Ambion公司,批号135305),KAPA SYBR<sup>®</sup>FAST实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix(2×)(美国Kapa Biosystems公司,批号07959389001),PrimeScript II RTase(日本Takara公司,批号AKG2253A),BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号20200924),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G抗体(武汉贝茵莱生物科技有限公司,批号均为

20200911), RhoA、ROCK1、ROCK2 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 20200911、GR194710-84、GR194710-84)。

**1.4 仪器** Nano-300型超微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司),GE48527型PCR仪(杭州柏恒科技有限公司),mini protean 3 cell型电泳仪、CFX-Connect 96型 Real-time PCR仪、Criterion Blotter型湿式转印槽(美国Bio-Rad公司),MK3型酶标仪(芬兰雷勃公司),Tanon-5200型全自动化学发光分析仪(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与造模** 大鼠适应性饲养结束后开始造模,按体质量随机分为6组,分别为正常组、模型组、逍遥散高、中、低剂量组、氟西汀组,每组12只。参照文献[7,10-11]方法将大鼠进行捆绑束缚造模,正常组大鼠不予束缚,自主活动,其余各组大鼠于每日夜间18:00-6:00用自制束缚架捆绑3h,捆绑时间点随机,连续21d。

**2.2 给药** 造模的同时每天给各组大鼠灌胃,每日1次,连续21d,灌胃量按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量计算。逍遥散组和氟西汀组大鼠每日用药量根据体表面积换算法计算,按平均体质量70kg成人每日逍遥散和氟西汀用药量计算大鼠用药量(换算公式=成人剂量 $\times 6.3/70\text{ kg}$ )<sup>[12]</sup>。逍遥散高、中、低剂量分别为 $16.7$ 、 $8.35$ 、 $4.175\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,其中中剂量与成人临床逍遥散用药量对应,氟西汀为 $1.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,正常组与模型组给予等体积生理盐水灌胃。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 胃排空率和小肠推进率** 造模结束后,大鼠禁食不禁水12h,在取材30min前,给大鼠灌胃自制10%炭粉(半固体糊)混悬液(由10%活性炭、10%阿拉伯明胶及纯水组成),灌胃容积为每只大鼠2mL。大鼠麻醉后剖开腹部,使全胃完全暴露后迅速结扎胃贲门及幽门,取出全胃称量胃的总质量,然后沿胃小弯剪开,使用生理盐水将胃内容物冲洗干净,用滤纸吸干后称量胃净质量,计算胃排空率。胃排空率= $[1-(\text{胃总质量}-\text{胃净质量})/\text{灌胃炭粉半固体糊量}]\times 100\%$ 。小肠推进率的计算:用镊子缓缓剥离整个肠管,测量幽门至炭粉半固体糊前沿的长度及幽门至回盲肠部的全长,小肠推进率=炭粉液推进长度/小肠长度 $\times 100\%$ 。

**2.3.2 Real-time PCR检测胃组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 表达** 取胃体中部上1/3的小块胃组织,使用TRIzol试剂提取胃组织总RNA,应用核

酸蛋白测定仪测定RNA浓度和纯度;使用逆转录试剂盒将RNA进行逆转录合成第一链cDNA;将制备好的cDNA进行Real-time PCR扩增,扩增体系采用 $20\text{ }\mu\text{L}$ ,反应条件为 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性3min; $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性5s; $56\text{ }^\circ\text{C}$ 退火5s; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸25s;39循环; $65\text{ }^\circ\text{C}$ ,5s; $95\text{ }^\circ\text{C}$ ,50s。由武汉天一辉远生物科技有限公司设计合成,所有实验操作严格按照试剂盒说明书进行,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA的相对表达量,PCR引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 CAAGTTCAACGGCACAG	138
	下游 CCAGTAGACTCCACGACAT	
RhoA	上游 TTGGCTTTATGGGACA	161
	下游 GGACAGAAATGCTTGACT	
ROCK1	上游 TAAAGGTAATCGGCAG	239
	下游 ACCAGGCATGTACTCC	
ROCK2	上游 TTCCTGGTCCTTGAT	196
	下游 CTTCTGTGATGCCTTA	

**2.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 的蛋白表达** 取胃体中部上1/3的小块胃组织,低温条件下,加入RIP1强裂解液进行充分匀浆,然后 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心15min(离心半径13.5cm),抽取上清液,BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。制备12%的SDS-PAGE凝胶,然后依次进行上样、电泳、湿转膜,转膜前将PVDF膜在甲醇中浸泡5min,再孵育于冰冷的电转缓冲液中2min。转膜结束后在室温下将膜用5%的脱脂奶粉封闭 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。封闭结束后加入一抗[RhoA(1:5000)、ROCK1(1:2000)、ROCK2(1:1万)、GAPDH(1:1万)]和膜室温孵育1h,然后PBST洗膜3次,每次5min;随后加入二抗(1:2万)与膜室温孵育1h,再PBST洗膜3次,每次5min。ECL试剂显影,凝胶图像系统测定目的蛋白条带灰度值,统计分析各检测蛋白表达量变化。

**2.4 统计学方法** 本实验数据均采用SPSS 22.0统计软件进行分析,首先对数据进行正态性和方差齐性检验,若符合正态分布且方差齐,两两组间比较用最小显著性差异法(LSD),多组间比较用单因素方差分析;若不符合正态分布或方差不齐者采用多个独立样本Kruskal-Wallis H法,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对肝郁脾虚证大鼠胃排空率和小肠推进率的影响** 造模21 d,与正常组比较,模型组大鼠胃排空率和小肠推进率均显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,各药物组大鼠胃排空率和小肠推进率均明显上升( $P<0.05, P<0.01$ )。见表2

表2 逍遥散对肝郁脾虚证大鼠胃排空率和小肠推进率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

Table 2 Effect of Xiaoyaosan on gastric emptying rate and small intestinal propulsion rate of rats with liver depression and spleen deficiency syndrome ( $\bar{x}\pm s, n=9$ ) %

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	胃排空率	小肠推进率
正常组		67.55±4.80	70.06±5.76
模型组		45.40±8.27 <sup>2)</sup>	52.84±9.20 <sup>2)</sup>
逍遥散高剂量组	16.7	59.14±7.67 <sup>4)</sup>	61.79±9.54 <sup>3)</sup>
逍遥散中剂量组	8.35	60.43±7.55 <sup>4)</sup>	62.47±6.34 <sup>4)</sup>
逍遥散低剂量组	4.175	57.10±8.38 <sup>4)</sup>	60.89±7.37 <sup>3)</sup>
氟西汀组	0.001 8	57.79±6.92 <sup>4)</sup>	62.20±6.97 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表3和表4同)

**3.2 对肝郁脾虚证大鼠胃组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 和蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 和蛋白表达均显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,逍遥散高、中、低剂量组和氟西汀组大鼠 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 和蛋白表达均显著升高( $P<0.01$ )。见表3、图1和表4。

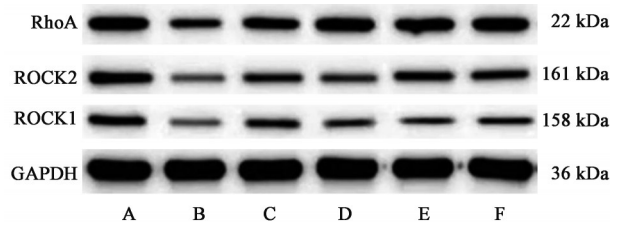
表3 逍遥散对肝郁脾虚证大鼠胃组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Xiaoyaosan on expression of RhoA, ROCK1 and ROCK2 mRNA in gastric tissue of rats with liver depression and spleen deficiency syndrome ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	RhoA	ROCK1	ROCK2
正常组		1.02±0.08	1.01±0.08	1.03±0.09
模型组		0.36±0.07 <sup>2)</sup>	0.42±0.09 <sup>2)</sup>	0.31±0.08 <sup>2)</sup>
逍遥散高剂量组	16.7	0.85±0.11 <sup>4)</sup>	0.87±0.11 <sup>4)</sup>	0.75±0.15 <sup>4)</sup>
逍遥散中剂量组	8.35	0.97±0.13 <sup>4)</sup>	0.64±0.10 <sup>4)</sup>	0.62±0.12 <sup>4)</sup>
逍遥散低剂量组	4.175	1.04±0.14 <sup>4)</sup>	0.96±0.13 <sup>4)</sup>	0.59±0.09 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.001 8	0.95±0.12 <sup>4)</sup>	0.86±0.14 <sup>4)</sup>	0.65±0.11 <sup>4)</sup>

### 4 讨论

逍遥散出自《太平惠民和剂局方》,由当归、白芍、柴胡、茯苓、白术、炙甘草、烧生姜、薄荷8味药物组成,为中医疏肝解郁,调和肝脾的经典方剂<sup>[13-14]</sup>。



注:A.正常组;B.模型组;C.逍遥散高剂量组;D.逍遥散中剂量组;E.逍遥散低剂量组;F.氟西汀组

图1 各组大鼠胃组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白表达电泳

Fig. 1 Protein expression electrophoresis of RhoA, ROCK1 and ROCK2 in gastric tissue of rats in each group

表4 逍遥散对肝郁脾虚证大鼠胃组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Xiaoyaosan on expression of RhoA, ROCK1 and ROCK2 proteins in gastric tissue of rats with liver depression and spleen deficiency syndrome ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	RhoA /GAPDH	ROCK1 /GAPDH	ROCK2 /GAPDH
正常组		0.66±0.01	0.53±0.02	0.47±0.02
模型组		0.41±0.02 <sup>2)</sup>	0.25±0.03 <sup>2)</sup>	0.19±0.01 <sup>2)</sup>
逍遥散高剂量组	16.7	0.49±0.03 <sup>4)</sup>	0.40±0.03 <sup>4)</sup>	0.37±0.03 <sup>4)</sup>
逍遥散中剂量组	8.35	0.64±0.03 <sup>4)</sup>	0.34±0.02 <sup>2,4)</sup>	0.26±0.03 <sup>4)</sup>
逍遥散低剂量组	4.175	0.69±0.02 <sup>4)</sup>	0.50±0.03 <sup>4)</sup>	0.26±0.01 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.001 8	0.65±0.03 <sup>4)</sup>	0.43±0.02 <sup>2,4)</sup>	0.30±0.02 <sup>4)</sup>

方中柴胡疏肝解郁为君药,白术、茯苓益气健脾助运化为臣药,君臣配伍,肝脾同调;当归、白芍养血柔肝为佐药,合君药补肝体助肝用,气血兼顾;薄荷辛凉既助柴胡疏肝解郁又可散肝之郁热,烧生姜温胃和中,助白术、茯苓健脾和胃亦为佐药;甘草调和诸药,合白术、茯苓健脾为佐使药;诸药合用,肝脾同调,气血兼顾,共奏疏肝解郁,益气健脾之功。现代药理研究发现<sup>[15-17]</sup>,逍遥散可兴奋胃平滑肌而增强小肠推进功能和胃蠕动功能,柴胡中的柴胡皂苷和柴胡多糖可通过调节胃肠激素促进胃肠动力,对胃黏膜起到保护作用;白芍中的白芍总苷具有舒张肠道、抗炎、镇痛等多种治疗效果;茯苓及白术中的苍术酮可通过改善胃肠动力而对大鼠腹泻症状起到明显治疗作用;当归中的阿魏酸成分具有抗炎、解痉止痛作用;炙甘草中的甘草酸等成分通过分泌胃黏液而起到抗酸解痉作用;生姜油、薄荷酮等化学成分具有改善胃肠动力等作用。

以往的研究表明21 d慢性束缚应激可以造成动物的“郁怒”状态,郁怒日久,木郁乘土,从而可以模拟出肝郁脾虚证的病理演变过程<sup>[7,10-11,18]</sup>。胃肠道的动力主要源于胃肠平滑肌的推动作用,中医认

为胃肠动力障碍其主要病位在脾、胃,脾气主升,胃主通降,一升一降,两者共同维持胃肠运动的基本动力。若脾气虚,则二者升降功能受损,就会直接导致胃肠运动功能障碍<sup>[19]</sup>。同时中医认为脾主肌肉,脾气虚弱则不能把食物中营养物质充分吸收而容易引起肌肉松弛无力,从而出现胃肠道蠕动减慢,因此,脾气虚常出现胃排空延迟,胃排空率和小肠推进率降低<sup>[20-22]</sup>。本实验结果显示,模型组大鼠胃排空率和小肠推进率均降低,提示21 d慢性束缚应激已导致模型大鼠胃肠道功能紊乱,同时实验过程中也观察到模型大鼠摄食量降低,体质量增长缓慢,大便稀软等表现,表明模型大鼠已出现脾虚表现。逍遥散高、中、低剂量组胃排空率和小肠推进率均升高,表明逍遥散具有改善胃肠动力障碍的作用。

RhoA是Ras超家族中具有三磷酸鸟苷(GTP)酶活性的一种小G蛋白分子,被称为Rho GTP酶。Rho GTP酶在细胞内起到双向生物学分子开关的作用,当与GTP结合时呈激活状态,能够与其特定的效应物结合行使各种生物学功能,当与二磷酸鸟苷(GDP)结合时则没有活性处于无生物学功能的状态。RhoA活化后可激活一系列下游效应器而发挥生理作用,ROCK是RhoA的重要下游效应分子之一,主要有ROCK1和ROCK2两个亚型。RhoA/ROCK信号通路参与调节多种细胞生物学过程,如细胞骨架重组、细胞的黏附、迁移、增殖、凋亡及细胞收缩等<sup>[23-24]</sup>。目前的研究认为RhoA/ROCK信号通路是一种Ca<sup>2+</sup>非依赖性的平滑肌收缩调节机制,可以调节平滑肌的收缩与松弛<sup>[25]</sup>,而ROCK是下游分子中参与平滑肌收缩最重要的效应靶分子,ROCK的活化可以增强平滑肌的收缩力,并且ROCK2在参与平滑肌的收缩反应中起主要作用<sup>[26]</sup>。胃肠道平滑肌的收缩和舒张活动是维持正常消化过程的基础,研究表明RhoA/ROCK信号通路对胃平滑肌的收缩发挥重要作用,是导致胃肠平滑肌收缩异常与胃肠动力障碍的重要信号通路<sup>[27]</sup>,如RATZ等<sup>[28]</sup>的研究表明ROCK参与调节兔胃底平滑肌的收缩,TOMOMASA等<sup>[29]</sup>发现ROCK抑制剂Y27632可引起大鼠胃平滑肌的收缩力急剧下降,陈小丽等<sup>[30]</sup>的研究表明针刺能上调胃窦平滑肌组织RhoA/ROCK通路的表达,进而促进糖尿病胃轻瘫(DGP)大鼠胃平滑肌收缩,改善胃排空。邱娟娟等<sup>[31]</sup>的研究表明四磨汤能促进功能性消化不良大鼠胃组织RhoA、ROCK的表达而增强胃平滑肌收

缩。本实验结果显示,模型组大鼠胃组织中RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA和蛋白表达显著下降,提示模型大鼠胃平滑肌的收缩力降低,因而可以推测模型大鼠胃排空率和小肠推进率的降低可能与胃组织RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA和蛋白表达降低有关。逍遥散高、中、低剂量均能在一定程度上升高模型大鼠RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA和蛋白表达,从而改善模型大鼠胃肠动力障碍。

综上所述,RhoA/ROCK信号通路可能参与了肝郁脾虚证的发生,逍遥散可升高肝郁脾虚证大鼠胃组织RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA和蛋白表达,调节RhoA/ROCK信号通路的活性可能是逍遥散防治肝郁脾虚证和应激性疾病的机制之一。但肝郁脾虚证是一种复杂综合性的证候,RhoA/ROCK信号通路的生理功能复杂,靶点较多,因此,后续仍将对这条通路的上下游靶点进行深入研究,以进一步探索肝郁脾虚证的发生机制及逍遥散的作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 李妍,吴望男,聂文祎,等. 基于文献分析共情缺陷相关病症的中医证候规律研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2020,26(4):503-505,521.
- [2] 刘燕,陈家旭,邹小娟,等. 肝郁脾虚证的现代生物学基础探讨[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2017,19(8):1401-1405.
- [3] 史亚飞,张荣. 基于生命早期应激探讨情志内伤肝失疏泄病证机理[J]. 中国中医基础医学杂志,2018,24(6):726-729.
- [4] 丁凤敏,陈家旭,邹小娟,等. 抑郁症中医证候动物模型研究进展[J]. 中华中医药杂志,2019,34(1):245-247.
- [5] 王一旭,李媛媛,张碧涛,等. 逍遥散对慢性不可预知温和应激大鼠下丘脑弓状核JAK/STAT通路变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(21):21-27.
- [6] 刘燕,陈家旭,邹小娟,等. 逍遥散方证研究概况[J]. 中华中医药杂志,2018,33(3):1008-1010.
- [7] 李晓红,陈家旭,张煜,等. 逍遥散对肝郁脾虚证大鼠胃组织基因表达谱的影响[J]. 世界中医药,2017,12(3):499-503.
- [8] WANG Y, ZHENG X R, RIDDICK N, et al. ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res,2009,104(4):531-540.
- [9] MURTHY K S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut[J]. Annu Rev

- Physiol, 2006, 68: 345-374.
- [10] 刘玥芸, 赵歆, 张曼, 等. 肝郁脾虚证大鼠海马 Notch 信号通路改变及逍遥散的调节作用[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(11): 1989-1996.
- [11] 张铮, 洪妙莹, 蓝敏敏, 等. 逍遥散对慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠学习记忆能力及 NGF、p75NTR 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 5: 718-722.
- [12] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 333-335.
- [13] 卫拂晓, 刘欢乐, 范毓慧, 等. 基于网络药理学探讨逍遥散“异病同治”抑郁症、乳腺增生和功能性消化不良的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(16): 4230-4237.
- [14] 杨皓然, 刘丽娜, 葛飞, 等. 基于海马小胶质细胞 M1 型极化研究逍遥散对 OVX 联合 CUS 焦虑抑郁模型大鼠的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4964-4970.
- [15] 程华尧, 江雪梅, 徐蕴杰, 等. 逍遥散联合西药治疗肝郁脾虚型功能性消化不良及对胃肠激素和炎症因子的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(9): 1380-1385.
- [16] 郭蕾, 李强, 陈少丽, 等. 补中益气汤“要药”的配伍对脾虚大鼠胃肠动力影响的机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(9): 2156-2160.
- [17] 王虎平, 米彩云. 基于“三阴并调”探析黑逍遥散调控肠道菌群 TMA/FMO3/TMAO 代谢通路防治 AD 的思路与策略[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 248-254.
- [18] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭, 等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(6): 396-400.
- [19] 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]. 中医临床杂志, 2018, 30(3): 578-581.
- [20] 戴宁. 功能性消化不良脾虚证证候及香砂六君子加减方的作用机理研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [21] 范明明, 张嘉裕, 张湘龙, 等. 功能性消化不良造模方法的述评[J]. 世界中医药, 2020, 15(7): 1080-1083.
- [22] 李娟娟, 王凤云, 吕林, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3): 1-7.
- [23] SCHAEFER A, REINHARD N R, HORDIJK P L. Toward understanding RhoGTPase specificity: Structure, function and local activation [J]. Small GTPases, 2014, 5(2): 6.
- [24] MATTHEW J B, JEFFERY D M. Abstract12346: Palmitoylation-dependent regulation of RhoGTPase signaling and cardiac hypertrophy [J]. Circulation, 2018, 138(Suppl 1): A12346.
- [25] HENNIG G W, SPENCER N J, JOKELA-WILLIS S, et al. ICC-MY coordinate smooth muscle electrical and mechanical activity in the murine small intestine [J]. Neurogastroenterol Motil, 2010, 22(5): e138-e151.
- [26] WANG Y, ZHENG X R, RIDDICK N, et al. ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res, 2009, 104(4): 531-540.
- [27] 徐俊, 张瑶, 胡昭端, 等. 养元通络法针刺对糖尿病胃轻瘫作用机制的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11): 2801-2803.
- [28] RATZ P H, MEEHL J T, EDDINGER T J. RhoA kinase and protein kinase C participate in regulation of rabbit stomach fundus smooth muscle contraction [J]. Br J Pharmacol, 2002, 137(7): 983-992.
- [29] TOMOMASA T, TAKAHASHI A, KANEKO H, et al. Y-27632 inhibits gastric motility in conscious rats [J]. Life Sci, 2000, 66(2): PL29-PL34.
- [30] 陈小丽, 刘丽, 文琪琦, 等. 按部选穴针刺对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦平滑肌 RhoA/ROCK 信号表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(23): 3508-3516.
- [31] 邱娟娟, 李玉春, 邱阳, 等. 四磨汤与功能性消化不良模型大鼠胃 RhoA 及 ROCK 的关系研究[J]. 吉林中医药, 2022, 42(1): 58-61.

[责任编辑 周冰冰]