

· 经典名方 ·

基于线粒体自噬及Pink1/Parkin信号通路探讨柴胡疏肝散 治疗功能性消化不良大鼠的作用机制

王香香, 王煜姣, 李莉, 贾庆玲, 蒋凯林, 杨珂鸣, 凌江红*
(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

[摘要] 目的:基于线粒体自噬及PTEN诱导激酶1(Pink1)/E3泛素连接酶(Parkin)信号通路探讨柴胡疏肝散治疗功能性消化不良大鼠的作用机制。方法:将40只SD大鼠按照随机分组原则分为正常组、模型组、柴胡疏肝散组、阳性药物组(多潘立酮),每组10只。正常组大鼠不予造模,其他各组采用夹尾刺激法制备功能性消化不良大鼠模型,每次造模结束后,正常组及模型组灌胃生理盐水,柴胡疏肝散组和多潘立酮组则分别用柴胡疏肝散(4.8 g·kg⁻¹)及多潘立酮(4.5 mg·kg⁻¹)灌胃。造模用药28 d后取材,检测每组大鼠胃排空率及小肠推进率;苏木素-伊红(HE)染色观察胃窦组织损伤情况;透射电子显微镜(TEM)观察胃间质细胞(ICC)超微结构;免疫荧光共定位法观察细胞色素C氧化酶(COX IV)与Parkin的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测微管相关蛋白1轻链3(LC3)、线粒体自噬相关蛋白PHB2、Pink1、Parkin、USP30的表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠胃排空率及小肠推进率均明显下降($P<0.05$);与模型组比较,柴胡疏肝散组胃排空率及小肠推进率均明显提高($P<0.05$)。透射电镜结果显示,柴胡疏肝散可减轻胃窦组织线粒体肿胀程度。免疫荧光结果显示,与正常组比较, Parkin在线粒体的荧光表达显著提高($P<0.01$);与模型组比较, Parkin在线粒体的荧光表达显著减少($P<0.01$)。Western blot结果显示,与正常组比较, LC3、Pink1、Parkin及PHB2蛋白表达均明显提高($P<0.05$, $P<0.01$), USP30蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较, LC3、Pink1、Parkin及PHB2蛋白表达均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), USP30蛋白表达显著提高($P<0.01$)。结论:柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的作用机制可能与抑制Pink1/Parkin信号通路的激活,从而抑制ICCs线粒体过度自噬有关。

[关键词] 柴胡疏肝散; 功能性消化不良; 线粒体自噬; PTEN诱导激酶1(Pink1); E3泛素连接酶(Parkin)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)02-0045-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221506

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220719.1741.008.html>

[网络出版日期] 2022-07-20 13:07

Mechanism of Chaihu Shugansan in Treatment of Functional Dyspepsia in Rats Based on Mitophagy and Pink1/Parkin Signaling Pathway

WANG Xiangxiang, WANG Yujiao, LI Li, JIA Qingling, JIANG Kailin, YANG Keming, LING Jianghong*
(Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,
Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Chaihu Shugansan in the treatment of functional dyspepsia in rats based on mitophagy and PTEN-induced kinase 1 (Pink1)/E3 ubiquitin ligase (Parkin) signaling pathway. **Method:** According to the principle of random grouping, 40 SD rats were assigned into a normal group, a model group, a Chaihu Shugansan group, and a positive drug (domperidone) group, with 10 rats in each group. The rats in other groups except the normal group received tail-clamping stimulation to replicate the model of functional dyspepsia. After each time of stimulation, the rats in the normal, model,

[收稿日期] 2022-06-03

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973774, 82174309)

[第一作者] 王香香, 硕士, 从事胃肠病的中医药诊疗, E-mail: 957022189@qq.com

[通信作者] * 凌江红, 教授, 主任医师, 从事胃肠病的中医药诊疗, E-mail: 459183870@qq.com

Chaihu Shugansan, and positive drug groups were administrated with normal saline, normal saline, Chaihu Shugansan ($4.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and an aqueous solution of domperidone ($4.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), respectively. After 28 days of modeling, the gastric emptying rate and the small intestine propulsion rate of the rats in each group were measured and the tissue samples were collected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was employed for observation of damage in gastric antrum tissue, and transmission electron microscopy (TEM) for ultrastructural observation of gastric interstitial cells of Cajal (ICCs). Immunofluorescence co-localization was adopted to observe the expression of cytochrome c oxidase (COX IV) and Parkin. Western blot was employed to determine the expression levels of microtubule-associated protein 1, light chain 3 (LC3), and the mitophagy-associated proteins prohibitin2 (PHB2), Pink1, Parkin, and ubiquitin-specific protease 30 (USP30). **Result:** Compared with the normal group, the modeling decreased the gastric emptying rate and the small intestine propulsion rate ($P<0.05$). Compared with the model group, Chaihu Shugansan increased the gastric emptying rate and the small intestine propulsion rate ($P<0.05$). The results of TEM showed that Chaihu Shugansan reduced the swelling degree of mitochondria in gastric antrum tissue. Compared with the normal group, the modeling increased the fluorescence intensity of Parkin in mitochondria ($P<0.01$), while such increase can be alleviated by Chaihu Shugansan ($P<0.01$). Western blotting results showed that compared with the normal group, the modeling up-regulated the protein levels of LC3, Pink1, Parkin, and PHB2 ($P<0.05$, $P<0.01$) and down-regulated the protein level of USP30 ($P<0.01$). Compared with the model group, Chaihu Shugansan down-regulated the protein levels of LC3, Pink1, Parkin, and PHB2 ($P<0.05$, $P<0.01$) and up-regulated the protein level of USP30 ($P<0.01$). **Conclusion:** Chaihu Shugansan may treat functional dyspepsia by blocking the Pink1/Parkin signaling pathway to inhibit excessive mitochondrial autophagy in ICCs.

[Keywords] Chaihu Shugansan; functional dyspepsia; mitophagy; PTEN-induced kinase 1 (Pink1); E3 ubiquitin ligase (Parkin)

根据全球数据统计结果,功能性消化不良(FD)的患病率约为16%,且不同国家的患病比例略有差异,患者的生存及生活质量受到严重威胁^[1]。其发病的主要机制是胃肠运动功能障碍^[2]。胃肠Cajal间质细胞(ICCs)一般认为是胃和小肠内的一种主要起搏细胞,它可通过平滑肌细胞传播慢波活动,是胃肠运动的基础^[3]。有研究发现,FD模型组大鼠ICCs结构和数量异常,ICCs细胞器出现空洞化变性,有大量自噬体形成,且自噬相关蛋白较正常组增高,提示调控自噬有可能成为治疗FD的靶点^[4-7]。

对于FD患者而言,西药治疗疾病往往采用单靶点治疗模式,而且长期服用西药会出现药物耐受情况,治疗效果尚不理想^[8]。有研究发现,对于FD的治疗,使用中草药的作用优于促胃肠动力剂^[9]。柴胡疏肝散源于《景岳全书》,是临床上常用的经典方剂,作用效果确切,可通过多药物成分、多机制途径、多治疗靶点发挥作用^[10]。本课题组前期研究表明,柴胡疏肝散治疗FD的机制与胃组织ICCs线粒体过度自噬有关^[7],PTEN诱导激酶1(Pink1)/E3泛素连接酶(Parkin)信号通路作为线粒体自噬最经典的一条通路,虽参与到肝纤维化及非酒精性脂肪肝

等消化系统疾病^[11-12],却在胃肠方向鲜有报道。因此,本研究通过建立FD大鼠模型,为进一步研究柴胡疏肝散对FD大鼠胃组织ICCs线粒体自噬及Pink1/Parkin信号通路的影响,以期阐述柴胡疏肝散如何治疗FD的更深层机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雌雄大鼠各半,共40只,6~8周龄,体质量180~200 g,由北京维通利华实验动物有限公司[生产合格证号SCXK(浙)2019-0001]提供,在上海中医药大学实验动物中心饲养,环境温度55%~57%,温度22~24℃及12 h明暗循环中,可随意获取水和食物,本研究获得上海中医药大学动物伦理委员会批准(伦理编号PZSHUTCM210507010)。

1.2 药物及试剂 柴胡疏肝散方由柴胡、白芍、川芎、枳实、陈皮、香附、炙甘草7味药材组成(批号分别为210907、210818、210806、20210917、2021091907、210505、210729),柴胡疏肝散中药饮片购自上海中医药大学附属曙光医院东院中草药房,由上海中医药大学崔亚君副教授鉴定合格后使用。多潘立酮(西安杨森制药有限公司,批号

KDJ3YSP), 线粒体提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20201229), BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号 23227), 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、RIPA 蛋白强裂解液(上海碧云天生物科技有限公司, 批号分别为 C0105S-2、P0013B), 蛋白酶体抑制剂(PI, 美国 MCE 公司, 批号为 HY-K0010), PAGE 凝胶试剂盒(上海雅酶有限公司, 批号 02581250), LumiQ 通用型 ECL 发光液(上海圣尔生物有限公司, 批号 SB-WB012), Pink1、Parkin、Prohibitin 2 (PHB2)、细胞色素 C 氧化酶(COX IV)抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号分别为 23274-1-AP、14060-1-AP、12295-1-AP、CL594-11242、SA00001-2), USP30 抗体(美国 Novus 公司, 批号 NBP2-93487), β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Sigma 公司, 批号 089M48 50V)。

1.3 仪器 FluorChem 型超灵敏全自动多色荧光/化学发光仪(美国 Proteinsimple 公司); Leica SP8 型激光扫描共聚焦显微镜(德国徕卡公司); Tecnai G2 spirit 型透射电子显微镜(FEI 捷克有限公司); Bio-Rad 164-5050 型凝胶电泳仪(美国伯乐公司); Tanon EPS600 型转膜仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 建立 FD 大鼠模型 适应性饲养 7 d 后, 随机选取 10 只大鼠正常饲养, 其余 30 只大鼠采用课题组前期夹尾造模法^[13]复制 FD 模型, 每次 30 min, 2 次/d, 持续 4 周。以胃窦组织未发生任何器质性病理变化, 胃排空率明显降低为造模成功的标准^[14]。

2.2 药液的制备 柴胡疏肝散按原方配伍比例, 称取柴胡、陈皮各 12 g, 川芎、白芍、香附、枳实各 9 g, 炙甘草 3 g, 加入蒸馏水高于中药表面 2~3 cm 处, 浸泡 30 min, 武火煮沸并持续 15 min, 文火继续煎煮 30 min, 双层滤网过滤药液, 二煎加入蒸馏水煎煮 30 min, 2 次药液合并, 水浴浓缩为生药质量浓度 0.48 g·mL⁻¹ 的药液^[15], 置于 4 °C 冰箱保存。

2.3 分组给药 除了正常组 10 只大鼠外, 造模后 30 只大鼠随机分为模型组、柴胡疏肝散组及多潘立酮组, 每组 10 只。各组大鼠在每次造模结束后灌胃, 根据人与动物间体表面积折算出等效剂量^[16], 结合课题组前期发现的柴胡疏肝散最佳给药剂量为 4.8 g·kg⁻¹, 多潘立酮给药剂量为 4.5 mg·kg⁻¹^[15], 正常组和模型组予以等体积的生理盐水灌胃, 用药体积为 10 mL·kg⁻¹, 2 次/d, 持续 4 周。本研究中存在

大鼠灌胃后死亡的情况, 模型组和柴胡疏肝散组大鼠分别死亡 2 只、1 只。取材时发现模型组有 2 只大鼠胃黏膜糜烂, 不符合成模标准故剔除, 最终模型组剩 6 只大鼠用于实验及数据统计, 所以其余各组均随机选取 6 只大鼠用于后续实验。

2.4 指标检测

2.4.1 大鼠的胃排空率与小肠推进率检测 造模给药结束后, 灌胃半固体米糊(含碳粉), 30 min 后麻醉取出全胃, 记录全胃总质量, 空胃时质量及半固体米糊的质量。计算公式如下^[17]: 胃排空率=1-(全胃质量-空胃质量)/半固体糊质量×100%, 剥离肠管, 用直尺分别测量小肠的总长度及碳粉末推进的长度, 小肠推进率的计算如下^[18]: 小肠推进率=碳粉末推进长度/小肠总长度×100%。

2.4.2 HE 染色观察大鼠胃窦组织病理学变化 取各组大鼠的部分胃窦组织, 石蜡包埋, 将组织切成 4 μ m 厚的切片, 脱蜡, 切片染色用苏木素、伊红, 封片用中性树脂, 在光学显微镜下观察各组大鼠胃窦组织损伤情况。

2.4.3 透射电子显微镜法(TEM)观察大鼠胃窦组织 ICCs 超微结构 取各组大鼠的部分胃窦组织, 剪碎成约 1 mm³ 体积的小块, 先用 2.5% 戊二醛溶液将组织固定后, 接着用 1% 锇酸把组织固定 2 h。乙醇梯度脱水后, 包埋切片, 在电镜下观察并摄图。

2.4.4 免疫荧光共定位法观察大鼠胃窦组织 COX IV 与 Parkin 表达 胃窦组织切片脱蜡后, 柠檬酸缓冲液抗原把切片修复 10 min 后, 冷却至室温的切片用 10% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h, 一抗(COX IV、Parkin 稀释倍数 1:200)4 °C 封闭过夜, 室温下, 荧光二抗(1:200)避光孵育 1 h, 封片用含 4', 6 二甲基-2-苯吡啶(DAPI)的抗猝灭剂, 共聚焦显微镜下观察 COX IV 与 Parkin 的共定位情况。

2.4.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃窦组织线粒体 LC3、Pink1、Parkin、PHB2、USP30 蛋白表达 提取大鼠胃窦组织线粒体总蛋白, 各组蛋白浓度定量, 变性后上样, 进行 SDS-PAGE, 封闭后敷上一抗(Pink1、Parkin、PHB2、USP30、LC3 稀释倍数 1:1 000, β -actin 为 1:5 000), 4 °C 过夜。次日洗去一抗, 室温下再用二抗(1:2 000, 山羊抗兔 IgG)孵育 1 h。用 TBST 洗后显影, 通过 Image J 软件对各组图像的灰度值分析。

2.4.6 统计学分析 使用 SPSS 25.0 软件统计分析数据, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差(one-way ANOVA)分析比较多组间数据, 均数间两两比

较则使用SNK-q检验, $P < 0.05$ 表示差异有明显统计学意义。

3 结果

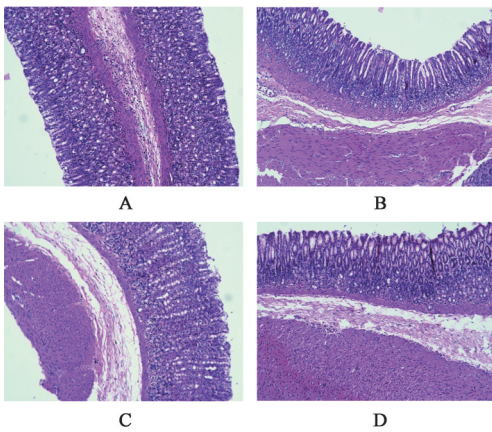
3.1 对FD大鼠胃排空率与小肠推进率的影响 与正常组比较,模型组大鼠的胃排空率和小肠推进率均明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,柴胡疏肝散组大鼠的胃排空率和小肠推进率均明显提高($P < 0.05$),多潘立酮组小肠推进率明显提高($P < 0.05$),胃排空率无统计学意义。见表1。

表1 柴胡疏肝散对FD模型组大鼠的胃排空率与小肠推进率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	胃排空率	小肠推进率
正常组		61.11±7.20	71.38±6.24
模型组		46.67±4.71 ¹⁾	58.14±9.86 ¹⁾
柴胡疏肝散组	4.8	55.56±5.44 ²⁾	69.92±7.41 ²⁾
多潘立酮组	4.5×10^{-3}	53.89±7.72	68.79±8.87 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$

3.2 对FD大鼠胃窦组织病理学变化的影响 柴胡疏肝散组和多潘立酮组腺体表面均可见炎性细胞浸润,未见溃疡、增生、化生等病理变化。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.柴胡疏肝散组;D.多潘立酮组(图2-图4同)

图1 柴胡疏肝散对FD组大鼠胃窦组织病理变化的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effects of Chaihu Shugansan on histopathological changes of gastric antrum in FD rats (HE, ×100)

3.3 对FD大鼠胃窦组织 ICCs 细胞超微结构的影响 正常组大鼠 ICCs 细胞结构完整,细胞器完整,线粒体嵴清晰;模型组大鼠 ICCs 细胞发现胞核染色质出现固缩,线粒体发生肿胀,线粒体嵴破坏严重,发生解离现象,有自噬体形成;与模型组比较,柴胡

疏肝散组线粒体呈不同程度肿胀,嵴排列较紊乱,自噬相关单侧膜结构减少。见图2。

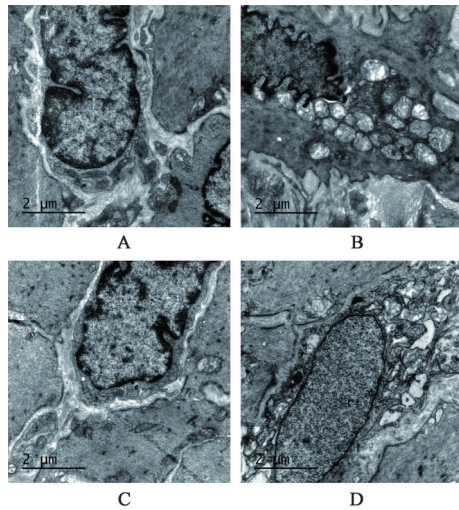


图2 柴胡疏肝散对FD大鼠 ICCs 细胞超微结构的影响(透射电镜, ×8 200)

Fig. 2 Effect of Chaihu Shugansan on ultrastructure of ICCs in FD rats (TEM, ×8 200)

3.4 对FD大鼠胃窦组织 COX IV 与 Parkin 共定位表达的影响 与正常组比较,模型组 Parkin 在线粒体中表达显著提高(COX IV 代表线粒体骨架)($P < 0.01$);与模型组比较,柴胡疏肝散组和多潘立酮组 Parkin 在线粒体中表达显著下降($P < 0.01$)。见表2和图3。

表2 柴胡疏肝散对FD大鼠胃窦组织 COX IV 与 Parkin 荧光共定位表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	共定位表达面积/ μm^2
正常组		218.61±78.08
模型组		1 127.98±114.53 ¹⁾
柴胡疏肝散组	4.8	447.31±35.18 ²⁾
多潘立酮组	4.5×10^{-3}	552.34±52.76 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$

3.5 对FD大鼠胃窦组织线粒体 LC3、Pink1、Parkin、PHB2、USP30 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠胃窦组织线粒体中 LC3 II /LC3 I 及 Pink1、Parkin、PHB2 表达均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$), USP30 表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,柴胡疏肝散组和多潘立酮组 LC3 II /LC3 I 及 Pink1、Parkin、PHB2 表达均明显下降($P < 0.05, P < 0.01$), USP30 表达显著升高($P < 0.01$)。见表3和图4。

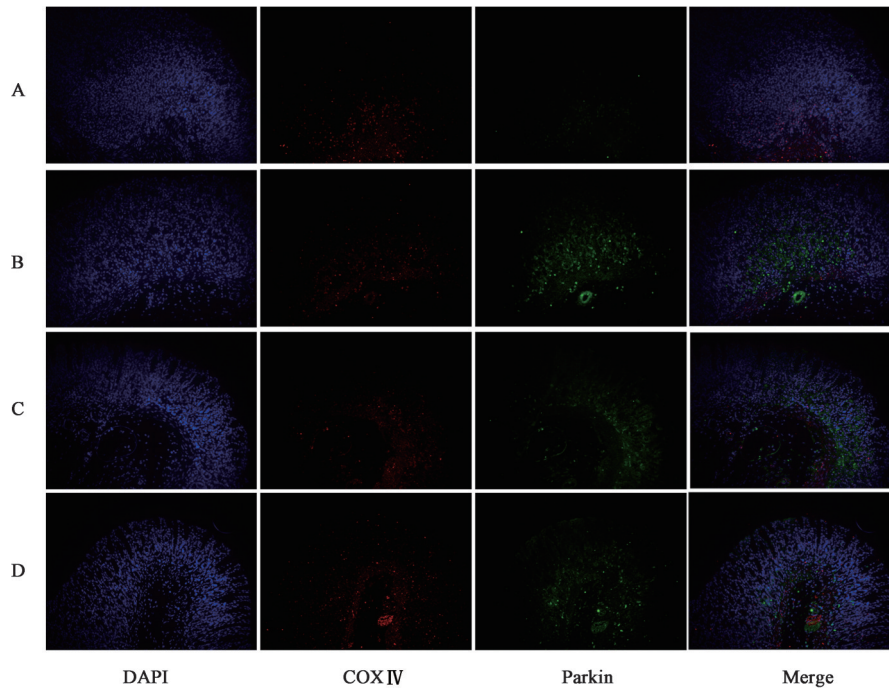


图3 柴胡疏肝散对FD大鼠胃窦组织COX IV与Parkin荧光共定位表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 3 Effect of Chaihu Shugansan on colocalization expression of COX IV and Parkin fluorescence in gastric antral tissue of FD rats (IF, ×200)

表3 柴胡疏肝散对FD大鼠胃窦组织线粒体LC3、Pink1、Parkin、PHB2、USP30蛋白表达的影响(̄x±s, n=6)

Table 3 Effect of Chaihu Shugansan on bexpression of mitochondrial LC3, Pink1, Parkin, PHB2 and USP30 proteins in gastric antrum of FD rats (̄x±s, n=6)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LC3 II /LC3 I	Pink1/β-actin	Parkin/β-actin	PHB2/β-actin	USP30/β-actin
正常		1.24±0.12	1.26±0.05	1.32±0.03	0.92±0.12	1.31±0.04
模型		1.51±0.08 ¹⁾	1.59±0.09 ²⁾	1.58±0.03 ¹⁾	1.50±0.06 ²⁾	0.31±0.01 ²⁾
柴胡疏肝散	4.8	1.08±0.22 ³⁾	0.71±0.11 ³⁾	1.07±0.16 ³⁾	1.19±0.07 ³⁾	1.22±0.03 ³⁾
多潘立酮	4.5×10 ⁻³	0.91±0.08 ³⁾	0.54±0.14 ³⁾	0.80±0.17 ³⁾	0.80±0.07 ³⁾	1.03±0.08 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与FD模型组比较³⁾P<0.01

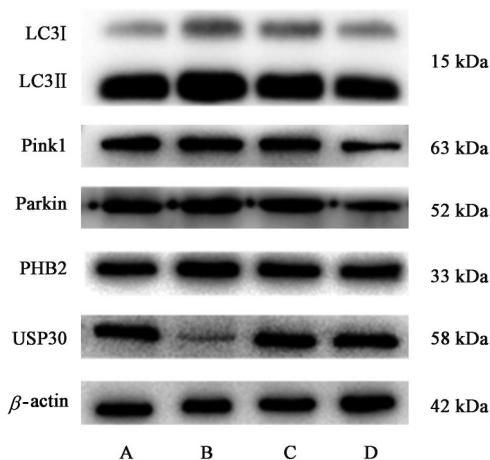


图4 各组大鼠胃窦组织线粒体LC3、Pink1、Parkin、PHB2、USP30蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of mitochondrial LC3, Pink1, Parkin, PHB2, USP30 protein expression in gastric antrum tissue of rats in each group

4 讨论

《伤寒论》中指出“满而不痛者,此为痞”,中医将根据FD的上腹痛、饱胀感等症状归属为“痞满”范畴,其主要病位在胃,涉及肝脾^[19]。《景岳全书》记载:“怒气暴伤,肝气未平而痞者^[20]。”情志因素被认为是痞满形成的重要病因,怒气伤肝,肝失疏泄导致气机逆乱,肝气犯胃,从而发生痞满。综上,疏肝行气、和胃消痞成为治疗FD的关键方向。柴胡疏肝散中柴胡升散条达、疏肝解郁为君;香附则助柴胡以解肝郁;川芎、白芍行气活血止痛作为臣药;枳实、陈皮理气行滞为佐药;甘草调诸药则为使药,诸药合奏从而达到疏肝解郁的目的。

本课题组前期研究结果表明,柴胡疏肝散治疗FD的有效机制与调控ICCs密切相关。柴胡疏肝散作用后,可提高ICCs的特异性标志物c-kit及其配体

干细胞生长因子(SCF) mRNA和蛋白水平的表达^[4];提高 ICCs内Ca²⁺浓度^[21];升高 ICCs细胞周期G₀/G₁及S期比例^[22],从而促进 ICCs增殖。同时可减轻 ICCs的超微结构破坏程度^[23];抑制FD大鼠ICC-MY过度自噬、抑制非依赖性mTOR自噬信号通路^[24-26];抑制 ICCs线粒体过度自噬,进而促进胃动力^[7]。

线粒体自噬是指细胞通过自噬机制选择性降解细胞内损伤的线粒体,对提高线粒体质量及维持数量的动态平衡过程中发挥极为重要的作用,若线粒体过度自噬则无法调控或维持细胞的稳态,从而使细胞发生凋亡^[27]。微管相关蛋白1轻链3(LC3)作为哺乳动物细胞自噬体形成的关键蛋白,分I型和II型。当自噬发生时,磷脂酰乙醇胺与LC3 I结合,转变成LC3 II,位于自噬体内外膜上,通常LC3 II被认为是自噬的标志性蛋白^[28]。LC3 II/LC3 I的提高表示自噬流的活化,也是评价自噬水平的重要指标^[29]。PHB2是位于线粒体内膜上的蛋白,当线粒体外膜发生破裂后,它可以与LIR作用结合LC3蛋白,从而介导线粒体自噬的发生^[30]。研究表明^[31],PHB2可通过调节线粒体蛋白酶PARL的活性进一步对Pink1加工,因此,PHB2作为评价线粒体自噬程度的指标之一。本研究结果显示,FD模型组大鼠胃组织线粒体中LC3 II/LC3 I显著升高,PHB2蛋白表达增强,表明线粒体自噬参与FD的过程。柴胡疏肝散作用后,LC3 II/LC3 I明显下降,PHB2蛋白表达降低,且在透射电镜下观察 ICCs胞浆空泡数量减少及线粒体肿胀情况得以改善,提示柴胡疏肝散抑制胃组织 ICCs线粒体过度自噬。

Pink1/Parkin信号通路是调控线粒体自噬的经典通路之一,Pink1在正常线粒体中含量极低。若线粒体发生受损,Pink1将由细胞质移至线粒体外膜上,同时会把位于细胞质中的Parkin招募到线粒体外膜,进一步介导线粒体外膜底物的泛素化^[32-33]。USP30是一种位于线粒体外膜上的去泛素化(Dub)酶,USP30调控Pink1/Parkin通路是通过去泛素化线粒体外膜蛋白和Parkin自身,进而影响线粒体自噬^[34]。值得注意的是,USP30与Parkin两者之间存在靶向关系,USP30直接剪切与线粒体外膜Parkin受体结合位点的泛素链,以达到抑制线粒体自噬的目的^[35]。本研究结果发现,FD模型组大鼠Pink1、Parkin蛋白表达增强,在免疫荧光实验中,FD模型组胃窦组织Parkin由胞质转移到线粒体,说明Pink1/Parkin信号通路被激活。同时发现FD模型组

USP30蛋白表达显著降低,提示FD大鼠胃窦组织中,有部分线粒体有可能发生异常的自噬行为。相反,柴胡疏肝散干预后Pink1、Parkin蛋白表达降低,胃窦组织中Parkin在线粒体中几乎不表达,且USP30蛋白表达显著升高,提示柴胡疏肝散可抑制Pink1/Parkin信号通路的异常激活。

综上所述,柴胡疏肝散治疗FD的作用机制可能与抑制Pink1/Parkin信号通路的激活,进而抑制胃窦组织中 ICCs线粒体过度自噬有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] FORD A C, MAHADEVA S, CARBONE M F, et al. Functional dyspepsia[J]. Lancet, 2020, 396(10263): 1689-1702.
- [2] 沈少英,许丰. 功能性消化不良病理生理机制及治疗进展[J]. 现代实用医学, 2021, 33(1): 138-140.
- [3] BLAIR P J, RHEE P L, SANDERS K M, et al. The significance of interstitial cells in neurogastroenterology[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2014, 20(3): 294-317.
- [4] ZHANG L M, ZENG L J, DENG J, et al. Investigation of autophagy and differentiation of myenteric interstitial cells of Cajal in the pathogenesis of gastric motility disorders in rats with functional dyspepsia[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2018, 65(4): 533-539.
- [5] SANDERS K M. Spontaneous electrical activity and rhythmicity in gastrointestinal smooth muscles [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1124: 3-46.
- [6] 郭璇,阳松威,姜苏南,等. 舒胃汤对FD肝郁脾虚证模型大鼠胃肠平滑肌Beclin-1、mTOR、Cx43蛋白与mRNA表达的影响[J]. 中成药, 2018, 40(2): 270-275.
- [7] 李莉,贾庆玲,王煜姣,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23): 26-34.
- [8] 肖慧明,彭莉莉. 功能性消化不良的中医治疗综述[J]. 世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊, 2019, 19(71): 135-136, 139.
- [9] CHU M, WU I, HO R, et al. Chinese herbal medicine for functional dyspepsia: Systematic review of systematic reviews [J]. Therap Adv Gastroenterol, 2018, 11: 1756284818785573.
- [10] 白娟,刘燕,王丹妮,等. 柴胡疏肝散在肝郁证中的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(3): 199-204.
- [11] LIU P, LIN H, XU Y, et al. Frataxin-mediated PINK1-

- Parkin-dependent mitophagy in hepatic steatosis: The protective effects of quercetin[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(16): e1800164.
- [12] KANG J W, HONG J M, LEE S M. Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis [J]. *J Pineal Res*, 2016, 60(4): 383-393.
- [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] 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.
- [16] 徐叔云, 汴如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.
- [17] 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.
- [18] 郭璇, 阳松威, 徐寅, 等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠小肠推进功能及 CNP/cGMP 信号通路的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(3): 276-281.
- [19] 吕林, 王静, 唐旭东, 等. 基于脾主运化水液理论探讨功能性消化不良症状的产生[J]. *中医杂志*, 2016, 57(6): 470-472.
- [20] 张介宾. 景岳全书[M]. 广州: 广东科技出版社, 1984: 54.
- [21] 宁海恩, 凌江红, 梁纲, 等. 柴胡疏肝散对大鼠胃Cajal间质细胞活性及细胞内钙离子浓度的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(9): 1091-1096.
- [22] 张智, 凌江红, 宁海恩, 等. 柴胡疏肝散含药血清对大鼠胃Cajal间质细胞增殖及细胞周期的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(30): 4792-4799.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 张智. 柴胡疏肝散对大鼠胃Cajal间质细胞自噬的影响及其机制的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- [26] TAN R Q, ZHANG Z, JU J, et al. Effect of Chaihu Shugan powder-contained serum on glutamate-induced autophagy of interstitial cells of cajal in the rat gastric antrum [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 7318616.
- [27] SULKSHANE P, RAM J, THAKUR A, et al. Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia[J]. *Redox Biol*, 2021, 45: 102047.
- [28] MARTINEZ J, MALIREDDI R K, LU Q, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 893-906.
- [29] GONG L, HE J, SUN X, et al. Activation of sirtuin1 protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 110021.
- [30] WEI Y, CHIANG W C, SUMPTER R, et al. Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 224-238.
- [31] YAN C, GONG L, CHEN L, et al. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis [J]. *Autophagy*, 2020, 16(3): 419-434.
- [32] SHIBA-FUKUSHIMA K, ARANO T, MATSUMOTO G, et al. Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(12): e1004861.
- [33] OKATSU K, KOYANO F, KIMURA M, et al. Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor[J]. *J Cell Biol*, 2015, 209(1): 111-128.
- [34] BINGOL B, TEA J S, PHU L, et al. The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy[J]. *Nature*, 2014, 510(7505): 370-375.
- [35] DEOL K K, EYLES S J, STRIETER E R, et al. Quantitative middle-down MS analysis of parkin-mediated ubiquitin chain assembly[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020, 31(5): 1132-1139.

[责任编辑 周冰冰]