

· 经典名方 ·

香砂六君子汤调控 RhoA/ROCK2/MYPT1 信号通路改善 功能性消化不良大鼠胃动力的机制

刘梦雅^{1,2}, 成映霞^{3*}, 白敏^{1,2}, 赵琳娜^{1,2}, 李润法^{1,2}, 安耀荣^{1*}, 段永强³, 李亚荣³

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省实验动物行业技术中心, 兰州 730000;
3. 宁夏医科大学 中医学院, 银川 750004)

【摘要】 目的: 基于RAS同源基因家族成员A(RhoA)/Rho关联卷曲螺旋蛋白激酶2(ROCK2)/肌球蛋白轻链磷酸酶靶向亚基1(MYPT1)信号通路探讨香砂六君子汤对功能性消化不良(FD)大鼠胃动力障碍的干预机制。方法: 将60只SPF级雄性SD乳鼠随机分为正常组($n=10$)和造模组($n=50$), 造模组大鼠采用综合造模法复制FD大鼠模型。模型复制成功后将造模组大鼠随机分为模型组、莫沙必利组和香砂六君子汤高、中、低剂量组, 共5组, 每组10只。正常组和模型组大鼠给予 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 生理盐水灌胃, 莫沙必利组给予 $1.35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 莫沙必利灌胃, 香砂六君子汤高、中、低剂量组分别给予 12 、 6 、 $3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 香砂六君子汤剂灌胃, 持续干预14 d。造模和给药前后观察大鼠一般生存状况, 测定大鼠体质量、3 h平均进食量。给药干预结束后, 测定大鼠肠推进率, 采用苏木素-伊红(HE)染色观察胃组织病理改变, 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定各组大鼠延髓和胃组织匀浆液中胆碱乙酰转移酶(ChAT)、血管活性肠肽(VIP)含量, 采用冰冻切片染色技术观察各组大鼠胃窦平滑肌中腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)酶分布, 采用蛋白免疫印迹法检测胃组织中RhoA、ROCK2、磷酸化(p)-MYPT1蛋白表达水平。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠毛发枯乱、倦懒怠动、行动迟缓, 一般生存状况较差, 体质量、3 h平均进食量以及肠推进率均明显下降($P<0.05$); 胃组织病理未见明显异常; 延髓和胃组织中ChAT含量减少, 胃组织中VIP含量增多, 胃窦平滑肌中ATP酶分布明显减少, 胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠一般生存状况明显好转, 体质量、3 h平均进食量及肠推进率明显增加($P<0.05$); 胃组织病理未见明显差异; 延髓和胃组织中ChAT含量明显增加, 胃组织中VIP含量减少, 胃窦平滑肌中ATP酶分布明显增加, 胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), 上述指标香砂六君子汤组干预作用呈剂量依赖性。结论: 香砂六君子汤能够有效改善FD大鼠一般生存状况及胃动力, 其具体机制可能与香砂六君子汤激活胃组织中RhoA/ROCK2/MYPT1信号通路调控平滑肌舒缩, 促进胃动力有关。

【关键词】 香砂六君子汤; RAS同源基因家族成员A(RhoA); Rho关联卷曲螺旋蛋白激酶2(ROCK2); 磷酸化肌球蛋白轻链磷酸酶靶向亚基1(p-MYPT1); 功能性消化不良

【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)04-0001-08

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20221804

【网络出版地址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220920.1443.002.html>

【网络出版日期】 2022-09-22 07:30:11

Mechanism of Xiangsha Liujunzi Tang in Regulation of RhoA/ROCK2/MYPT1 Pathway to Improve Gastric Motility in Rats with Functional Dyspepsia

LIU Mengya^{1,2}, CHENG Yingxia^{3*}, BAI Min^{1,2}, ZHAO Linna^{1,2}, LI Runfa^{1,2},

AN Yaorong^{1*}, DUAN Yongqiang³, LI Yarong³

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

【收稿日期】 2022-07-05

【基金项目】 宁夏回族自治区科技厅重点研发引才专项(2022BSB03080); 2022年甘肃中医药大学研究生创新创业基金资助项目(2022CX30)

【第一作者】 刘梦雅, 在读硕士, 从事方剂配伍规律及复方配伍的优化研究, E-mail: 514682910@qq.com

【通信作者】 *安耀荣, 硕士, 教授, 从事方剂配伍规律及复方配伍的优化研究, E-mail: anyr@gszy.edu.cn;

*成映霞, 博士, 教授, 从事医经理论与临床应用研究, E-mail: 1289018353@qq.com

2. Gansu Province Laboratory Animal Industry Technology Center, Lanzhou 730000, China;
3. College of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the intervention mechanism of Xiangsha Liujunzi Tang in rats with functional dyspepsia (FD) based on the Ras homolog gene family member A (RhoA)/Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2)/Myosin phosphatase target Subunit 1 (MYPT1) pathway. **Method:** Sixty male SD suckling rats in SPF grades were randomly divided into blank group ($n=10$) and model group ($n=50$). The comprehensive modeling method (gavage administration of iodoacetamide+exhaustion of swimming+disturbance of hunger and satiety) was used to replicate the rat model of FD. After successful replication of the model, the rats in the model group were randomly divided into model group, mosapride group, and high, middle, and low-dose Xiangsha Liujunzi Tang groups, with 10 rats in each group. Rats in the blank group and model group were given $10 \text{ mL kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ normal saline, those in the mosapride group were given $1.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ mosapride, and those in the high, middle, and low-dose Xiangsha Liujunzi Tang groups were given 12, 6, and $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Xiangsha Liujunzi Tang, respectively. The intervention lasted 14 days. The general living conditions of rats were observed before and after modeling and administration, and the 3-hour food intake and body mass of rats were measured. After intervention, the intestinal propulsion rate of rats was measured, and the pathological changes in the gastric tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The content of choline acetyl transferase (ChAT) and vasoactive intestinal peptide (VIP) in the medulla oblongata and gastric tissue homogenate was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the distribution of adenosine triphosphate (ATP) enzyme in gastric antrum smooth muscle was observed by frozen section staining, and the protein expression levels of RhoA, ROCK2, and phosphorylated-myosin phosphatase target subunit 1 (p-MYPT1) in the gastric tissue were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the model group had withered hair, lazy movement, slow action, poor general living condition, lower 3-hour food intake, body mass, and lower intestinal propulsion rate ($P<0.05$), whereas no obvious abnormality in gastric histopathology. In the model group, the content of ChAT in the medulla oblongata and gastric tissue decreased, the content of VIP in gastric tissue increased, the distribution of ATP enzyme in gastric antrum smooth muscle decreased significantly, and the protein expression levels of RhoA, ROCK2, and p-MYPT1 in the gastric tissue decreased significantly ($P<0.05$). As compared with the model group, the general living condition of rats in each intervention group was significantly improved, and the 3-hour food intake, body mass, and intestinal propulsion rate were significantly increased ($P<0.05$). There was no significant difference in gastric pathology in the intervention groups. The content of ChAT in the medulla oblongata and gastric tissue increased significantly, the content of VIP in the gastric tissue decreased, the distribution of ATP enzyme in gastric antrum smooth muscle increased significantly, and the protein expression levels of RhoA, ROCK2, and p-MYPT1 in the gastric tissue increased significantly ($P<0.05$). The intervention effect of Xiangsha Liujunzi Tang group on the above indexes was dose-dependent. **Conclusion:** Xiangsha Liujunzi Tang can effectively improve the general living condition and gastric motility of rats with FD, and its specific mechanism may be related to the activation of the RhoA/ROCK2/MYPT1 pathway in the gastric tissue to regulate smooth muscle relaxation and contraction and promote gastric motility.

[Keywords] Xiangsha Liujunzi Tang; spleen and stomach deficiency type; Ras homolog gene family member A (RhoA); Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2); phosphorylated-myosin phosphatase target subunit 1 (p-MYPT1); functional dyspepsia

功能性消化不良(FD)是临床常见的功能性胃
肠疾病,其症状以餐后饱胀、上腹痛胀、上腹烧灼感

等不适反应为主^[1]。流行病学调查显示FD临床发
病率可高达30%^[2],胃动力障碍被认为是该病发生

的关键机制之一^[3]。现代医学多用促胃动力剂、根除幽门螺杆菌(Hp)药物及益生菌类药物等进行口服治疗^[4],虽然一定程度上能够缓解FD患者临床症状,但其不良反应极大限制了临床应用。根据其临床症状特点,可归属于中医“胃胀”“痞满”范畴辨治,且多从健脾益气、理气除胀角度遣方用药,近期和远期疗效优势明显。

其中香砂六君子汤出自《古今名医方论·卷一》,该方在四君子汤补益脾胃的基础上更加陈皮、半夏、木香、砂仁以醒脾运脾,大量临床研究表明该方治疗FD疗效确切,能够明显改善患者临床症状,促进胃肠蠕动^[5-6]。然而该方发挥作用的具体机制尚不明晰。近年来研究发现平滑肌组织中RAS同源基因家族成员A(RhoA)/Rho关联卷曲螺旋蛋白激酶2(ROCK2)通路介导肌球蛋白轻链磷酸酶靶向亚基1(MYPT1)磷酸活化能够促进平滑肌组织中ATP酶产生,为胃组织收缩提供能量^[7],而胃组织中RhoA蛋白表达受来源于延髓的迷走神经以及肠神经系统的神经递质调控,如兴奋性神经递质乙酰胆碱(ACh)、抑制性神经递质血管活性肠肽(VIP)等^[8-9]。本课题前期研究已经证实香砂六君子汤能够有效调控胃肠动力,且有研究证实香砂六君子汤通过降低胃组织促肾上腺皮质激素释放因子,升高尿皮质素2的表达以改善FD大鼠胃动力^[10],本文进一步复制FD大鼠模型,观察香砂六君子汤对FD大鼠的干预作用,并结合相关分子生物学技术探讨香砂六君子汤对胃组织中RhoA/ROCK2/MYPT1信号通路及相关神经递质的影响,以期为该方的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级孕鼠15只,体质量(220~250)g,甘肃中医药大学医学实验中心提供,动物质量合格证编号No.62001000000614;动物合格证号SCXK(甘)2020-0001;实验动物均符合甘肃中医药大学动物伦理委员会要求,伦理审查编号2021-204,繁殖后选择雄性乳鼠60只纳入实验。

1.2 药物与试剂 实验所需中药饮片购自甘肃中医药大学附属医院中药房。香砂六君子汤处方:人参(批号202103001)10g、炒白术(批号220156Y101)9g、茯苓(批号冀20150023)9g、陈皮(批号202201001)9g、半夏(批号21111001)12g、砂仁(批号202104001)6g、木香(批号D3372101Y1)6g、炙甘草(批号202205002)6g,常规浸泡2h,煎煮2次,每次40min,得到药液浓缩至每毫升药液含生药

1g,冷却后置4℃冰箱备用;碘乙酰胺、ATP钠盐(北京素莱宝科技有限公司,批号分别为604E037、615B025);枸橼酸莫沙必利分散片(成都康弘药业集团股份有限公司,批号10102A01);苏木素-伊红(HE)染液套装(Servicebio公司,批号G1003);内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、二抗免疫球蛋白(Ig)G、磷酸化(p)-MYPT1抗体(北京ImmunoWay公司,批号分别为YM3215、RS002、YP0662);大鼠乙酰胆碱转移酶(ChAT)、血管活性肠肽(VIP)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,批号分别为2203R33、2203R36);硝酸钴、硫化铵(国药集团化学试剂有限公司,批号10007316、81001460);RhoA抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号2117S);ROCK2抗体(美国GeneTex公司,批号41094)。

1.3 仪器 Chemi DOC XRS⁺凝胶成像分析系统、S20210019型酶标仪、041BR69450型转膜仪(美国Bio-Rad公司);CRYOSTAR NX50型冰冻切片机(美国赛默飞世尔科技公司);NIKON ECLIPSE E100型正置光学显微镜(日本尼康公司);1323-15型电泳仪、DYY-6C型转膜仪(北京六一生物有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型复制 选取10日龄雄性乳鼠60只纳入实验,按照随机数字表法随机选取10只作为正常组,其余大鼠均依据参考文献^[11-12]采用综合因素法复制FD大鼠模型:予含有0.1%碘乙酰胺的2%蔗糖溶液灌胃,0.2mL/只,每日1次,连续灌胃6d。期间正常组大鼠予2%蔗糖溶液灌胃,0.2mL/只。之后正常饲养至大鼠3周龄时断奶,分笼。至大鼠6周龄时,除正常组外每组大鼠每日强迫游泳至力竭,并隔日给食,造模期间所有实验大鼠均给予正常饮水,连续造模14d后,造模大鼠相较于正常组大鼠皮毛枯乱不荣、倦懒怠动、行动缓迟,体质量、进食量明显降低,胃排空率均明显下降,胃组织病理学未见明显改变,提示FD大鼠造模成功。

2.2 动物分组及给药 造模结束后,除正常组外,将成模大鼠按照随机数字表法随机分为5组,分别为模型组、莫沙必利组、香砂六君子汤高、中、低剂量组,每组10只。香砂六君子汤高、中、低剂量组每日分别给予12、6、3g·kg⁻¹·d⁻¹香砂六君子汤灌胃;莫沙必利组每日给予1.35mg·kg⁻¹·d⁻¹莫沙必利灌胃,等效剂体积按人与动物体表系数折算^[13]。正常组和模型组每日给予等量生理盐水灌胃,持续干预

14 d。

2.3 标本采集 于末次灌胃给药后,各组大鼠禁食不禁水24 h,灌胃半固体状营养糊,30 min后采用3%戊巴比妥钠按 $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射进行麻醉后,常规开腹,剖取全胃,沿胃大弯剪开,生理盐水冲洗,部分采用4%多聚甲醛固定,以备病理切片制备,剩余直接 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存,以备后续分子生物学检测。

2.4 观察各组大鼠一般生存状况 实验过程中观察各组大鼠一般生存状况,如毛发、游泳耐力、进食量以及体质量等指标的改变。

2.5 测定各组大鼠肠推进率^[14] 各组大鼠禁食不禁水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、蔗糖8 g、淀粉8 g和活性炭末2 g,搅拌均匀,配置成300 mL约300 g的黑色半固体糊状物。每只固定灌胃2 mL。30 min后予以3%的戊巴比妥钠($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉,迅速打开腹腔,分离肠系膜,将胃幽门部至盲肠部的肠管剪下,平铺于吸水滤纸上,直尺测量肠道全长及固体糊自幽门向盲肠推进的距离并记录,并按照如下公式计算其肠推进率。肠推进率($\%$)= $L_0/L\times 100\%$,小肠总长度 L (幽门至盲肠的距离),固体糊推进距离 L_0 (幽门至黑色固体糊推进前端)。

2.6 HE染色观察各组大鼠胃组织病理学改变 将4%多聚甲醛固定后的胃组织进行石蜡包埋,常规制备蜡块后切片,采用HE染色法制备病理切片,显微镜下观察。

2.7 ELISA检测大鼠胃组织和延髓组织中ChAT、VIP含量 分别取胃组织和延髓组织匀浆0.1 g,加入磷酸盐缓冲液(PBS)溶液0.9 mL,制备胃组织和延髓组织匀浆液,离心取上清,随后严格按照试剂盒操作步骤进行指标检测,按照公式计算组织匀浆液中ChAT、VIP含量。

2.8 冰冻切片染色检测各组大鼠胃组织中ATP酶含量 取新鲜组织进行冰冻切片,使用pH 10.4和pH 9.4的孵育液分别进行孵育;使用 CaCl_2 和硝酸钴溶液浸染,自来水浸洗;使用现配1%硫化铵溶液(现用现配)浸染,自来水浸洗;使用梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片;显微镜镜检,采用Image J软件分析图像。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达水平 取胃组织0.1 g,加入裂解液(PMSF+RIPA)后匀浆、离心取上清,使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓

度,加 $5\times$ 上样缓冲液制备蛋白上样;采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白(80 V);使用电转仪转移蛋白于PVDF膜上(120 V,2 h);摇床上常温使用封闭液(TBST+脱脂奶粉)封闭2 h,洗膜(3次,10 min/次);孵育一抗(1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,同上洗膜;孵育二抗(1:5 000),室温摇床2 h,同上洗膜;发光液(A、B液等比配制)发光,采集数据,使用Image J软件分析数据。

2.10 统计学方法 采用SPSS 24.0统计软件统计分析,实验所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐时采用Tamhane's T_2 法检验,以 $P<0.05$ 为组间差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对FD大鼠一般生存状态的影响 正常组大鼠始终状态良好,进食量基本稳定,体质量增长稳定;与正常组比较,模型组大鼠生存状态差,进食量减少,体质量增加减缓,毛发枯乱,倦懒怠动,行动迟缓;与模型组比较,各给药组大鼠生存状态不同程度改善,香砂六君子汤干预效果存在量效关系,尤以高剂量组明显。

3.2 对FD大鼠体质量的影响 与正常组比较,模型组大鼠体质量明显降低($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠体质量均不同程度增加,增加程度呈剂量依赖($P<0.05$)。见表1。

表1 香砂六君子汤对FD大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Xiangsha Liujunzi Tang on body weight of FD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	大鼠体质量/g
正常组		390.50±34.30
模型组		305.20±33.10 ¹⁾
莫沙必利组	1.35×10^{-3}	344.30±34.10 ²⁾
香砂六君子汤高剂量组	12	352.40±33.40 ²⁾
香砂六君子汤中剂量组	6	338.30±34.84 ²⁾
香砂六君子汤低剂量组	3	326.10±33.70

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表2-表6同)

3.3 对FD大鼠3 h平均进食量的影响 与正常组比较,模型组大鼠3 h平均进食量明显降低($P<0.05$),与模型组比较,各给药组大鼠3 h平均进食量均不同程度增加,增加程度呈剂量依赖($P<0.05$)。见表2。

3.4 对FD大鼠肠推进率的影响 与正常组比较,模型组大鼠肠推进率明显降低($P<0.05$);与模型组

表2 香砂六君子汤对FD大鼠3 h平均进食量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Xiangsha Liujunzi Tang on 3-hour average food intake of FD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 h平均进食量/g
正常组		14.51±1.36
模型组		10.31±1.37 ¹⁾
莫沙必利组	1.35×10 ⁻³	13.25±1.37 ²⁾
香砂六君子汤高剂量组	12	13.77±1.55 ²⁾
香砂六君子汤中剂量组	6	12.99±1.34 ²⁾
香砂六君子汤低剂量组	3	11.22±1.73

比较,各给药组大鼠肠推进率均不同程度升高,升高程度呈剂量依赖性($P<0.05$)。见表3、图1。

表3 香砂六君子汤对FD大鼠肠推进率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Xiangsha Liujunzi Tang on intestinal propulsion rate of FD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	大鼠肠推进率/%
正常组		86.66±12.26
模型组		35.38±11.53 ¹⁾
莫沙必利组	1.35×10 ⁻³	64.07±14.80 ²⁾
香砂六君子汤高剂量组	12	75.09±10.10 ²⁾
香砂六君子汤中剂量组	6	60.29±13.26 ²⁾
香砂六君子汤低剂量组	3	45.64±10.98

3.5 对FD大鼠胃组织病理形态的影响 各组大鼠胃组织结构清晰,肌层排列及腺体结构规整,黏膜层未见明显炎性细胞浸润及坏死,各组大鼠胃组织病理无明显差异。见图2。

3.6 对FD大鼠延髓和胃平滑肌组织中ChAT、VIP含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠延髓和胃平滑肌组织中ChAT含量明显降低,胃平滑肌组织中VIP含量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组延髓和胃平滑肌组织中ChAT含量不同程度升高,胃平滑肌组织中VIP含量不同程度降低,其中尤

表4 香砂六君子汤对FD大鼠延髓和胃平滑肌组织中ChAT、VIP含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Xiangsha Liujunzi Tang on contents of ChAT and VIP in medulla oblongata and gastric smooth muscle tissue of FD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ChAT/pmol·L ⁻¹		VIP/ng·L ⁻¹	
		延髓	胃	延髓	胃
正常组		275.36±58.84	243.61±45.77	214.05±55.32	111.41±39.70
模型组		73.42±22.61 ¹⁾	98.11±45.22 ¹⁾	246.71±85.77	285.34±43.28 ¹⁾
莫沙必利组	1.35×10 ⁻³	170.86±49.91 ²⁾	171.96±24.46 ²⁾	193.22±36.09	208.41±35.56 ²⁾
香砂六君子汤高剂量组	12	243.39±49.53 ²⁾	197.09±43.71 ²⁾	201.47±57.91	176.40±47.99 ²⁾
香砂六君子汤中剂量组	6	163.36±45.55 ²⁾	165.57±35.64 ²⁾	240.64±35.93	204.51±36.50 ²⁾
香砂六君子汤低剂量组	3	109.35±34.86	138.45±20.51	197.45±74.12	247.69±52.87



注:A.正常组;B.模型组;C.莫沙必利组;D.香砂六君子汤高剂量组;E.香砂六君子汤中剂量组;F.香砂六君子汤低剂量组(图2-图4同)

图1 香砂六君子汤对FD大鼠肠推进率的影响(cm)

Fig. 1 Effect of Xiangsha Liujunzi Tang on intestinal propulsion rate of FD rats (cm)

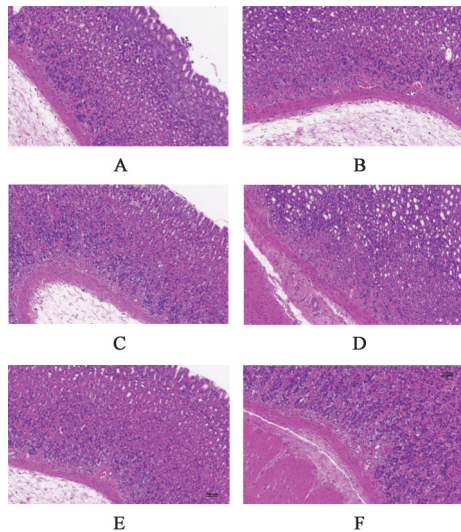


图2 香砂六君子汤对FD大鼠胃组织病理形态的影响(HE,×200)

Fig. 2 Effect of Xiangsha Liujunzi Tang on gastric histomorphology of FD rats (HE,×200)

以香砂六君子汤高剂量组最为明显($P<0.05$)。见表4。

3.7 对FD大鼠胃平滑肌组织中ATP酶含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠胃平滑肌组织中ATP酶分布明显减少($P<0.05$);与模型组比较,各给药组胃平滑肌组织中ATP酶分布不同程度升高,其中尤以香砂六君子汤高剂量组最为明显($P<0.05$)。见表5、图3。

表5 香砂六君子汤对FD大鼠胃平滑肌组织中ATP酶含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Xiangsha Liujunzi Tang on content of ATP enzyme in gastric smooth muscle tissue of FD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ATP酶阳性区域比例/%
正常组		81.13±11.25
模型组		42.85±10.02 ¹⁾
莫沙必利组	1.35×10 ⁻³	66.65±11.26 ²⁾
香砂六君子汤高剂量组	12	75.96±12.02 ²⁾
香砂六君子汤中剂量组	6	62.03±10.55 ²⁾
香砂六君子汤低剂量组	3	51.54±12.97

3.8 对FD大鼠胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达明显

表6 香砂六君子汤对FD大鼠胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Xiangsha Liujunzi Tang on protein expression of RhoA, ROCK2 and p-MYPT1 in gastric tissue of FD rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RhoA/GAPDH	ROCK2/GAPDH	p-MYPT1/GAPDH
正常组		1.12±0.14	1.24±0.17	1.21±0.12
模型组		0.42±0.08 ¹⁾	0.49±0.09 ¹⁾	0.53±0.12 ¹⁾
莫沙必利组	1.35×10 ⁻³	0.86±0.12 ²⁾	1.02±0.17 ²⁾	0.87±0.14 ²⁾
香砂六君子汤高剂量组	12	1.03±0.16 ²⁾	1.19±0.15 ²⁾	1.06±0.13 ²⁾
香砂六君子汤中剂量组	6	0.74±0.13 ²⁾	0.95±0.21 ²⁾	0.77±0.12 ²⁾
香砂六君子汤低剂量组	3	0.53±0.09	0.70±0.10	0.62±0.09

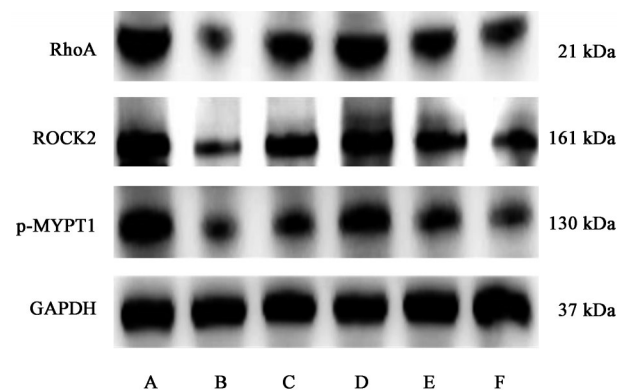


图4 各组大鼠胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白电泳
Fig. 4 Electrophoresis of RhoA, ROCK2, p-MYPT1 protein in gastric tissue of FD rats

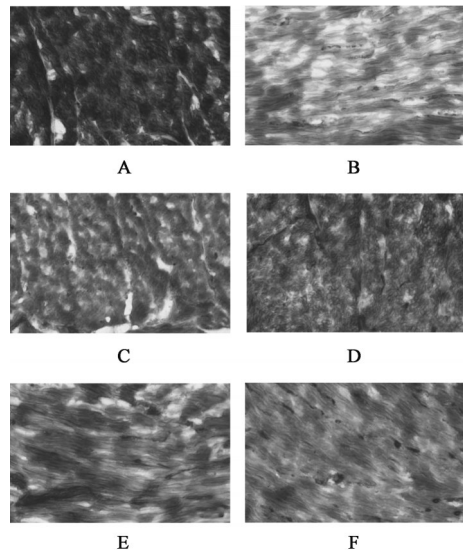


图3 香砂六君子汤对FD大鼠胃平滑肌组织中ATP酶含量的影响 (ATP酶染色, ×400)

Fig. 3 Effect of Xiangsha Liujunzi Tang on content of ATP enzyme in gastric smooth muscle tissue of FD rats (ATPase, ×400)

下调($P<0.05$);与模型组比较,各给药组胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达不同程度升高,其中尤以香砂六君子汤高剂量组最为明显($P<0.05$)。见表6、图4。

4 讨论

FD是现代医学病名,中医学根据该病临床胃脘胀满、痞结疼痛、胃纳呆滞等主要症状将其纳入中医学“胃胀”“痞满”等病证范畴^[15]。诚如李用粹《证治汇补·痞满》云:“大抵心下痞闷,必是脾胃受亏,浊气挟痰,不能运化为患”,张景岳《景岳全书·痞满》亦云:“脾虚不运而痞塞不开”皆指出脾胃虚弱,运化不及是中焦痞满不适的重要病机之一,再加之脾胃运化失司,痰湿内生进一步困遏脾土是该病持续进展的关键病机所在。

香砂六君子汤作为补益脾胃,行气化滞的经典方剂,该方以四君子汤坐镇中州,大补脾胃之虚损,

再加陈皮、半夏、木香、砂仁行气除痰,燥湿运脾。诚如清·柯琴曰:“人参致冲和之气,白术培中宫,茯苓清治节,甘草调五藏,胃气既治,病安从来,然拨乱反正又不能无为而治,必大举行气之品以辅之。则补者不至泥而不行,故加陈皮以利肺金之逆气,半夏以疏脾土之湿气,而痰饮可除也,加木香以行三焦之滞气,缩砂以通脾肾之元气,而赅郁可开也,四君得四辅则功力倍宣,四辅奉四君则元气大振,相得而益彰矣。”FD总以脾胃虚弱为本,兼有痰阻气滞,故见痞闷呕呃,不思饮食之症,而香砂六君子以四君子补脾胃之虚,以木香、砂仁、陈皮、半夏行气化痰除湿,其主治与FD的病机基本一致。

本研究采用综合因素(饥饿失常+游泳竭力+碘乙酰胺灌服)复制FD大鼠模型^[11-12],结果发现与正常组比较,模型组大鼠毛发枯乱不荣,倦懒怠动,行动缓迟,一般生存状况较差,进食量、体质量及肠推进率明显下降;与模型组比较,香砂六君子汤给药组大鼠一般生存状况明显好转,进食量、体质量及肠推进率明显增加,提示香砂六君子汤能明显改善FD大鼠的胃肠动力,这与之前的研究结果基本一致^[10]。

胃肠动力障碍被认为是FD发生的关键病理机制之一,而胃肠平滑肌的舒缩运动受来自延髓的迷走神经和肠神经系统所分泌的神经递质调控,其中主要包括兴奋性的神经递质ACh及抑制性的神经递质VIP等^[9,16]。近年来,研究发现ACh能够通过激活RhoA/ROCK信号通路进而诱导胃组织平滑肌收缩,改善胃肠动力障碍,ChAT作为ACh的合成酶,可作为反映ACh表达的标志物,而VIP则抑制该信号通路的响应,拮抗其收缩^[17-18]。RhoA作为Ras超家族成员,是一种具有GTP酶活性的G蛋白分子。RhoA在神经递质的调控下响应,ROCK作为RhoA蛋白的关键转接分子,主要有ROCK1和ROCK2 2个亚型,其中ROCK2蛋白在调控平滑肌收缩反应的过程中尤为重要,研究证实阻断胃平滑肌肌条组织中RhoA/ROCK信号通路响应明显抑制了肌条的收缩功能,且FD大鼠胃组织中RhoA/ROCK信号通路被明显抑制,这与胃平滑肌肌条收缩功能减弱呈一致性^[19]。研究表明RhoA能够调控激活ROCK2将MYPT1在Thr696位点处磷酸化,进而抑制MLCP的催化活性,促进平滑肌组织ATP酶的产生,为平滑肌的收缩提供能量,进而增强胃肠舒缩功能^[20-21]。

本实验研究显示,与正常组比较,模型组大鼠

延髓及胃组织中ChAT含量明显降低,胃组织中VIP含量明显升高;胃平滑肌组织中ATP酶含量减少,胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达水平均明显降低。结果表明模型大鼠肠推进率的降低可能与胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达降低有关。香砂六君子汤各剂量均不同程度上调模型大鼠胃组织中RhoA、ROCK2、p-MYPT1蛋白表达,且呈明显剂量依赖,从而改善模型大鼠胃肠动力障碍。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HANTORO I F, SYAM A F, MUDJADDID E, et al. Factors associated with health-related quality of life in patients with functional dyspepsia [J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2018, 16(1):83.
- [2] SPERBER A D, BANGDIWALA S I, DROSSMAN D A, et al. Worldwide prevalence and burden of functional gastrointestinal disorders, results of rome foundation global study [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(1):99-114.
- [3] ENCK P, AZPIROZ F, BOECKXSTAENS G, et al. Functional dyspepsia [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3:17081.
- [4] TALLEY N J. American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: Evaluation of dyspepsia [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(5):1753-1755.
- [5] 褚宝强. 香砂六君子汤加减治疗脾胃虚弱型功能性消化不良效果分析 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2019, 7(28):155, 165.
- [6] 邱晓静. 香砂六君子汤加减治疗功能性消化不良(脾胃虚弱型)临床研究 [J]. *亚太传统医药*, 2022, 18(1):116-118.
- [7] SANDERS K M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2008, 20(Suppl 1):39-53.
- [8] 尹晓岚, 唐旭东, 王凤云, 等. 功能性消化不良平滑肌舒缩障碍中G蛋白偶联信号转导机制的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(6):886-893.
- [9] 李兆龙, 周晏仪, 万燊燊, 等. 迷走神经回路与胃肠动力的关系 [J]. *神经解剖学杂志*, 2020, 36(6):697-700.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] YE Y, WANG X R, ZHENG Y, et al. Choosing an animal model for the study of functional dyspepsia[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 2(12): 1531-1538.
- [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] 王丽芳, 高文远, 徐鑫, 等. 神曲鲜干品组方对食积小鼠胃肠动力及肠道菌群调整的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4):20-24.
- [15] 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, 329(6):2595-2598.
- [16] 何元琴, 杨改琴. 基于脑肠轴理论探讨针刺治疗功能性消化不良的研究思路[J]. 上海针灸杂志, 2021, 40(2):243-249.
- [17] ZOU X, WANG Y, WANG Y, et al. Paeoniflorin alleviates abnormalities in rats with functional dyspepsia by stimulating the release of acetylcholine [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:5623-5632.
- [18] 孙方圆. 气滞胃痛颗粒治疗功能性消化不良的脑肠轴机制研究[D]. 天津:天津医科大学, 2017.
- [19] 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.
- [20] KUO I Y, EHRlich B E. Signaling in muscle contraction[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(2):a006023.
- [21] 吴雪芬, 陈小丽, 郑雪娜, 等. 不同刺激强度电针对糖尿病胃轻瘫大鼠胃肠运动功能及胃窦平滑肌 Ras 同源物基因组成员 A/相关卷曲螺旋蛋白激酶信号表达的影响[J]. 针刺研究, 2018, 43(3):169-174.

[责任编辑 周冰冰]