

刘梦雅,成映霞,白敏,等. 香砂六君子汤对脾胃虚弱型功能性消化不良大鼠的干预机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(2): 232-239.

Liu MY, Cheng YX, Bai M, et al. Mechanism of Xiangsha Liujunzi Tang intervention for functional dyspepsia rats with spleen and stomach weakness through the CaM/MLCK/MLC₂₀ pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 232-239.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.02.012

香砂六君子汤对脾胃虚弱型功能性消化不良大鼠的干预机制研究

刘梦雅^{1,2}, 成映霞^{3,4*}, 白敏^{1,2}, 赵琳娜^{1,2}, 李润法^{1,2}, 张延英^{1,2}, 安耀荣^{1*}, 段永强^{3,4}

(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. 宁夏区域高发病中医药防治教育部重点实验室, 银川 750004; 4. 宁夏区域高发病中西医结合研究重点实验室, 银川 750004)

【摘要】 目的 探讨香砂六君子汤对脾胃虚弱型功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 大鼠的干预机制。方法 将60只SPF级雄性SD乳鼠随机分为空白组($n = 10$)和造模组($n = 50$), 造模组大鼠采用综合造模法(碘乙酰胺灌服+游泳力竭+饥饿失常)复制脾胃虚弱型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、阳性对照组和香砂六君子汤高、中、低剂量组, 共5组, 每组10只。空白组和模型组大鼠给予10 mL/(kg·d)生理盐水灌胃, 阳性对照组给予1.35 mg/(kg·d)莫沙必利药剂灌胃, 香砂六君子汤高、中、低剂量组分别给予12、6.3 g/(kg·d)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状况, 测定大鼠体重、3 h进食量。给药干预结束后, 测定大鼠胃排空率、肠推进率, 采用苏木素-伊红染色观察胃组织病理改变, 采用生化试剂盒测定大鼠胃组织匀浆液中Mg²⁺-ATP酶含量, 采用蛋白免疫印迹法检测胃组织中CaM、MLCK、p-MLC₂₀蛋白表达水平。结果 与空白组比较, 模型组大鼠毛发枯乱、倦懒怠动、行动迟缓, 一般状况评分显著降低, 体重、3 h进食量、胃排空率及肠推进率均显著下降($P < 0.05$); 胃组织病理未见明显异常; 胃组织中Mg²⁺-ATP酶含量减少, 胃组织中CaM、MLCK、p-MLC₂₀蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 高、中剂量给药组大鼠一般状况评分显著提升, 体重、3 h进食量以及胃排空率显著增加($P < 0.05$); 胃组织病理未见明显差异; 胃组织中Mg²⁺-ATP酶含量显著增加, 胃组织中CaM、MLCK、p-MLC₂₀蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$), 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脾胃虚弱型FD大鼠一般状况及胃动力, 作用机制可能与其激活胃组织中CaM/MLCK/MLC₂₀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; 脾胃虚弱型; CaM/MLCK/MLC₂₀通路; 功能性消化不良

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 02-0232-08

Mechanism of Xiangsha Liujunzi Tang intervention for functional dyspepsia rats with spleen and stomach weakness through the CaM/MLCK/MLC₂₀ pathway

LIU Mengya^{1,2}, CHENG Yingxia^{3,4*}, BAI Min^{1,2}, ZHAO Linna^{1,2}, LI Runfa^{1,2}, ZHANG Yanying^{1,2}, AN Yaorong^{1*}, DUAN Yongqiang^{3,4}

【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, 2022CX06)。

Funded by the Science and Technology Department of Ningxia Hui Autonomous Region Focuses on the Special Project of R & D and Attracting Talents(2022BSB03080), Project Supported by Postgraduate Innovation and Entrepreneurship Fund of Gansu University of Traditional Chinese Medicine in 2022(2022CX30, 2022CX06)。

【作者简介】 刘梦雅(1993—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 方剂配伍规律及复方配伍的优化。Email: 514682910@qq.com

【通信作者】 成映霞(1975—), 女, 教授, 博士, 研究方向: 医经理论与临床应用。Email: 1289018353@qq.com;

安耀荣(1968—), 男, 教授, 研究方向: 方剂配伍规律及复方配伍的优化。Email: anyr@gzsy.edu.cn。

* 共同通信作者

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Gansu Province Laboratory Animal Industry Technology Center, Lanzhou 730000. 3. Key Laboratory of Ministry of Education of TCM Prevention and Treatment of High-Incidence Diseases in Ningxia, Yinchuan 750004. 4. Key Laboratory of Study on Integrated Traditional Chinese and Western Medicine with High Incidence Diseases in Ningxia, Yinchuan 750004)
Corresponding author: AN Yaorong. E-mail: anyr@gszy.edu.cn; CHENG Yingxia. E-mail: 1289018353@qq.com

[Abstract] Objective To explore the mechanisms involved in Xiangsha Liujunzi Tang intervention for functional dyspepsia (FD) in rats with spleen and stomach weakness via the CaM/MLCK/MLC₂₀ pathway. **Methods** 60 SPF male SD suckling rats were randomly divided into blank ($n = 10$) and modeling ($n = 50$) groups. A comprehensive modeling method (gavage administration of iodoacetamide + exhaustion of swimming + disturbance of hunger and satiety) was used to replicate an FD rat model with spleen and stomach weakness. After successful replication of the model, the rats in the modeling group were randomly divided into a model; positive control; and Xiangsha Liujunzi Tang high-, middle-, and low-dose groups, with 10 rats in each group. Rats in the blank and model groups were given 10 mL/(kg · d) normal saline; the positive control group was given 1.35 mg/(kg · d) mosapride; and the high-, middle-, and low-dose Xiangsha Liujunzi Tang groups were given 12, 6, and 3 g/(kg · d) Xiangsha Liujunzi Tang, respectively. The intervention lasted 14 days. The general condition of each rat was observed before and after modeling and administration, and food intake and body mass were measured. After the intervention, the gastric emptying rate and intestinal propulsion rate were measured, and pathological changes to gastric tissue were observed by hematoxylin-eosin staining. The content of Mg²⁺-ATP enzyme in the gastric tissue was determined biochemically, and the protein expression levels of CaM, MLCK, and p-MLC₂₀ in gastric tissue were detected by Western Blot. **Results** Compared with the blank group, the model group rats had withered hair; lazy movements; slow actions; significantly reduced general survival score; and lower food intake, body mass, gastric emptying rate, and intestinal propulsion rate ($P < 0.05$), but there was no obvious abnormality in their gastric histopathology. The content of Mg²⁺-ATP enzyme in the gastric tissue decreased, and the protein expression levels of CaM, MLCK, and p-MLC₂₀ in the gastric tissue decreased significantly. Compared with the model group, the high- and middle-dose group rats had significantly improved general survival status scores, while their food intake, body mass, gastric emptying rate, and intestinal propulsion rate were significantly increased ($P < 0.05$), but there was no significant difference in gastric pathology. The content of Mg²⁺-ATP enzyme and the protein expression levels of CaM, MLCK, and p-MLC₂₀ in gastric tissue also increased significantly. The intervention effect of Xiangsha Liujunzi Tang was dose dependent. **Conclusions** Xiangsha Liujunzi Tang effectively improved the general condition and gastric motility of FD rats with spleen and stomach weakness. The specific mechanism may be related to the activation of the CaM/MLCK/MLC₂₀ pathway in gastric tissue to regulate smooth muscle contraction and promote gastric motility.

[Keywords] Xiangsha Liujunzi Tang; spleen and stomach weakness type; CaM/MLCK/MLC₂₀ pathway; functional dyspepsia

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

功能性消化不良 (functional dyspepsia, 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], FD 发病机制涉及胃动力障碍、内脏高敏感性、十二指肠嗜酸性粒细胞增多、小肠黏膜通透性增高等, 其中胃动力障碍被认为是该病发生的关键机制之一^[3]。胃动力是指胃部肌肉的收缩蠕动力, 包括胃部肌肉收缩的力量和频率。目前研究发现平滑肌细胞内 CaM/MLCK/MLC₂₀ 信号通路的激活及级联响应调控 ATP 酶的产生进而水解 ATP, 为平滑肌的收缩提供能量的过程是维持平滑肌正常收缩的关键所

在^[4], 故 CaM/MLCK/MLC₂₀ 信号通路的激活及对 ATP 的调控是胃动力正常的保证。

功能性消化不良是现代医学病名, 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“胃脘痛”“痞满”等病症范畴, 中医理论认为脾胃虚弱是该病发生的关键病机之一^[5]。香砂六君子汤出自《古今名医方论·卷一》, 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, 临床研究表明该方治疗脾胃虚弱型 FD 疗效确切^[6-7]。然而其有效干预脾胃虚弱型 FD 的具体机制尚不明晰。本研究拟通过综合造模法复制脾胃虚弱型 FD 大鼠模型, 观察香砂六君子汤对

脾胃虚弱型 FD 大鼠的干预作用,并进一步探讨胃窦平滑肌组织中 CaM/MLCK/MLC₂₀ 信号通路的响应机制,以期为该方的临床运用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

15 只 SPF 级 3 月龄 SD 孕鼠,体重 220 ~ 250 g,购于甘肃中医药大学实验动物中心【SCXK(甘)2020-0001】,繁殖后选择雄性乳鼠 60 只纳入实验。饲养期间自由饮水,昼夜各半循环照明,相对湿度 50% ~ 60%,温度 21 ~ 25℃,饲养于甘肃中医药大学实验动物中心【SYXK(甘)2020-0009】。所有操作均符合甘肃中医药大学实验动物中心伦理学要求(2021-204)。

1.1.2 主要试剂与amp;仪器

香砂六君子汤实验处方:人参 10 g、炒白术 9 g、茯苓 9 g、陈皮 9 g、半夏 12 g、砂仁 6 g、木香 6 g、炙甘草 6 g,实验所需中药材购自甘肃中医药大学附属医院中药房。常规浸泡 2 h,煎煮 2 次,每次 40 min,得到药液浓缩至每毫升药液含生药 1 g,冷却后置 4℃ 冰箱备用;碘乙酰胺(北京索莱宝科技有限公司,604E037);枸橼酸莫沙必利分散片(成都康弘药业集团股份有限公司,10102A01);HE 染液套装(Servicebio, G1003);Calmodulin 抗体(GeneTex, 39577);MLCK 抗体(GeneTex, 64416);Muosin Light Chain 2 抗体(Cell Signaling Technology, 3672S);内参 GAPDH(ImmunoWay, YM3215);二抗 IgG(ImmunoWay, RS002);ATP 酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,20220114);

Chemi DOC XRS+凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司,美国);紫外可见分光光度计,(北京莱伯泰科仪器股份有限公司,中国);酶标仪(Bio-Rad 公司, S20210019,美国);电泳仪电源 DYY-6C 型(北京六一生物有限公司,1323-15,中国);转膜仪(Bio-Rad 公司,041BR69450,美国)。

1.2 方法

1.2.1 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 只作为空白组,其余大鼠均依据参考文献^[8-9]采用综合因素(碘乙酰胺灌服+饥饿失常+游泳竭力)复制脾胃虚弱型 FD 大鼠模型:予含有 0.1% 碘乙酰胺的 2% 蔗糖溶液灌胃,每只

0.2 mL,每日 1 次,连续灌胃 6 d。期间空白组大鼠予 2% 蔗糖溶液灌胃,每只 0.2 mL。之后正常饲养至大鼠 3 周龄时断奶,分笼。至大鼠 6 周龄时,除空白组外每组大鼠每日于 25℃ 温水中强迫游泳至力竭,以 5 s 内无法自主浮出水面为度,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 14 d 后,造模大鼠相较于空白组大鼠皮毛枯乱不荣、倦懒怠动、行动缓迟,体重、进食量显著降低,胃排空率及肠推进率均显著下降,胃组织病理学未见明显改变,提示脾胃虚弱型 FD 大鼠造模成功。

1.2.2 动物分组及amp;实验干预

造模结束后,除空白组外,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、阳性对照组、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、3 g/(kg·d)香砂六君子汤药剂灌胃,阳性对照组每日给予 1.35 mg/(kg·d)莫沙必利灌胃,等效剂量按人与动物体表系数折算^[10]。空白组和模型组每日给予等量生理盐水灌胃,持续干预 14 d。

1.2.3 样本采集

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 mL/kg 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℃ 冰箱冻存,以备后续分子生物学检测。

1.2.4 观察各组大鼠一般状况、体重和 3 h 进食量

实验过程中观察各组大鼠一般状况,根据表 1 分别从皮毛、活动度、精神状态 3 个方面进行评分。并测定大鼠体重和 3 h 进食量。3 h 进食量测定方法:大鼠禁食不禁水 12 h 后,给予各组大鼠饲料每只 30 g,3 h 后测定剩余饲料量,3 h 饲料摄入量(g) = 30(g) - 剩余饲料(g)。

1.2.5 测定各组大鼠胃排空率及amp;肠推进率

各组大鼠禁食不禁水 24 h,取 10 g 羧甲基纤维素钠溶于 250 mL 蒸馏水中,分别加入 16 g 奶粉、8 g 蔗糖、8 g 淀粉和 2 g 活性炭末,搅拌均匀,配制成 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 mL/kg)腹腔注射麻醉,迅速打开腹腔,结扎贲门和幽门,分离全胃,用滤纸拭干后称量胃全重。之后沿胃大弯剪开胃体,用生理盐水洗净胃内容物并拭干后称量胃净重;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,按照如下公式计算其胃排空率及肠推进率^[11]。

$$\text{胃排空率}(\%) = 1 - [(\text{胃全重} - \text{胃净重}) / \text{黑色固}$$

$$\text{体糊灌胃量}] \times 100\%$$

$$\text{肠推进率}(\%) = L_0 / L \times 100\%$$

,小肠总长度 L(幽门至盲肠的距离),固体糊推进距离 L₀(幽门至黑色固体糊推进前端)。

表 1 一般状况评分表

Table 1 General condition score form

生存体征/分数 Survival signs/score	5 分 5 points	3 分 3 points	1 分 1 point
皮毛 Fur	光泽顺亮 Shiny and smooth	一般光泽 Mediocre gloss	干枯毛躁 Dry and irritable
活动度 Activity degree	敏捷 Agile	中等敏捷性 Mediocre agility	行动迟缓 Slow to move
精神状态 Mentality	活泼好动 Lively and active	平静顺从 Calm and obedient	倦懒怠动 Tired and lazy

1.2.6 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,采用苏木素-伊红染色法制备病理切片,显微镜下观察。

1.2.7 比色法检测各组大鼠胃组织匀浆液中 Mg²⁺-ATP 酶含量

取 0.1 g 胃组织,加入 0.9 mL PBS 溶液,制备胃组织匀浆液,离心取上清,采用 BCA 法进行蛋白定量,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 Mg²⁺-ATP 酶含量。

1.2.8 蛋白免疫印迹法检测大鼠胃组织中 CaM、MLCK、p-MLC₂₀ 蛋白表达水平

取 0.1 g 胃组织,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×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,每次 10 min);孵育一抗(1:1000),4℃冰箱过夜,同上洗膜;孵育二抗(1:5000),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。

1.3 统计学分析

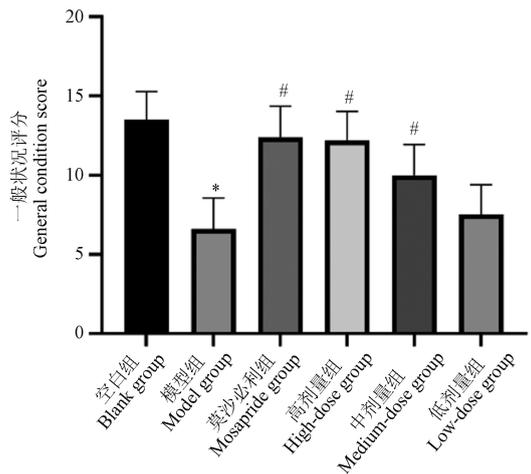
采用 SPSS 24.0 统计软件统计分析,实验所得数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用 LSD 法检验,方差不齐时采用 Tamhane's T2 法检验,以 $P < 0.05$ 为组间差异具有显著性。

2 结果

2.1 香砂六君子汤对各组大鼠一般状况的影响

如图 1 所示,空白组大鼠始终状况良好;与空白组比较,模型组大鼠一般状况评分显著降低($P <$

0.05);与模型组相比,高、中剂量给药组大鼠一般状况评分均不同程度提高,提高程度呈剂量依赖,组间差异具有显著性($P < 0.05$)。



注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。(下同)

图 1 香砂六君子汤对各组大鼠一般状况的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Compared with blank group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on general condition of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.2 香砂六君子汤对各组大鼠体重的影响

如图 2 所示,与空白组比较,模型组大鼠体重显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,高、中剂量给药组大鼠体重均不同程度增加,增加程度呈剂量依赖,组间差异具有显著性($P < 0.05$)。

2.3 香砂六君子汤对各组大鼠 3 h 进食量的影响

如图 3 所示,与空白组比较,模型组大鼠 3 h 进食量显著降低($P < 0.05$);与模型组相比较,高、中剂量给药组大鼠 3 h 进食量均不同程度增加,增加程度呈剂量依赖,组间差异具有显著性($P < 0.05$)。

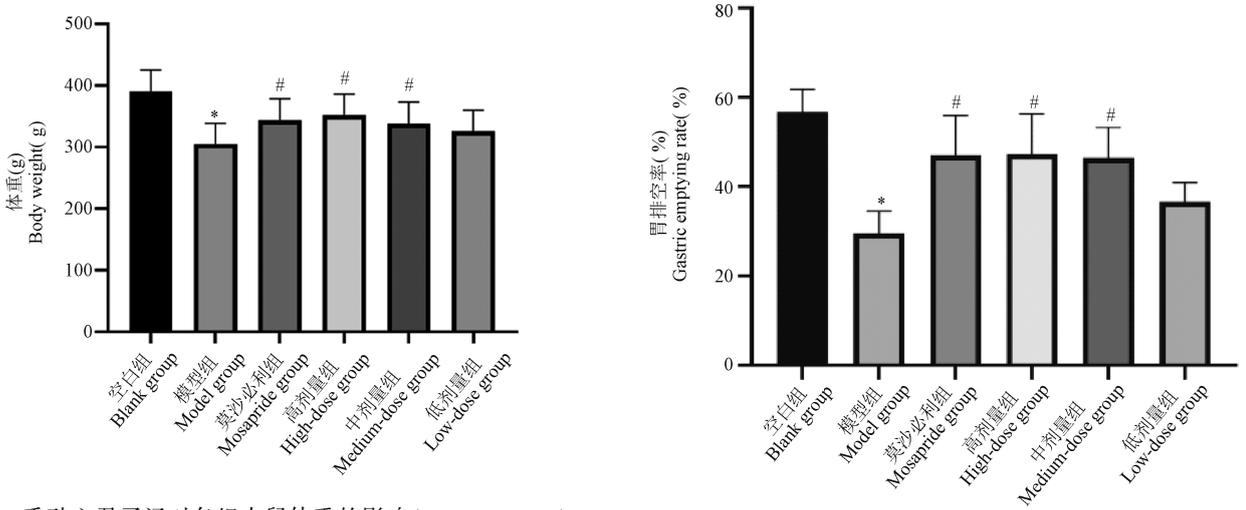


图 2 香砂六君子汤对各组大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Figure 2 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on body weight of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

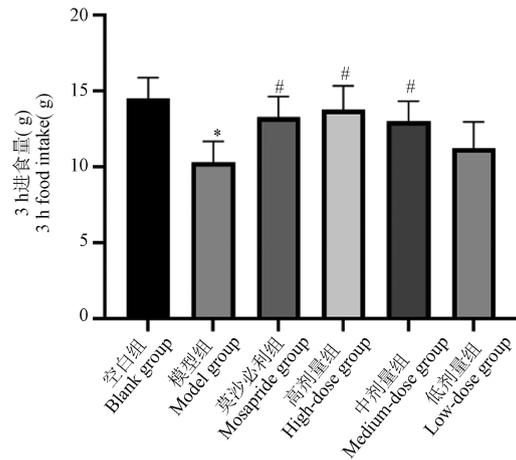


图 3 香砂六君子汤对各组大鼠 3 h 进食量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Figure 3 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on 3 h food intake of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

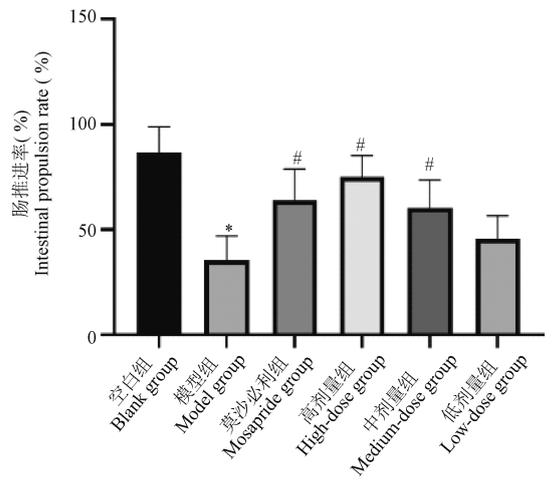


图 4 香砂六君子汤对各组大鼠胃排空率及肠推进率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Figure 4 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on gastric emptying rate and intestinal propulsion rate of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

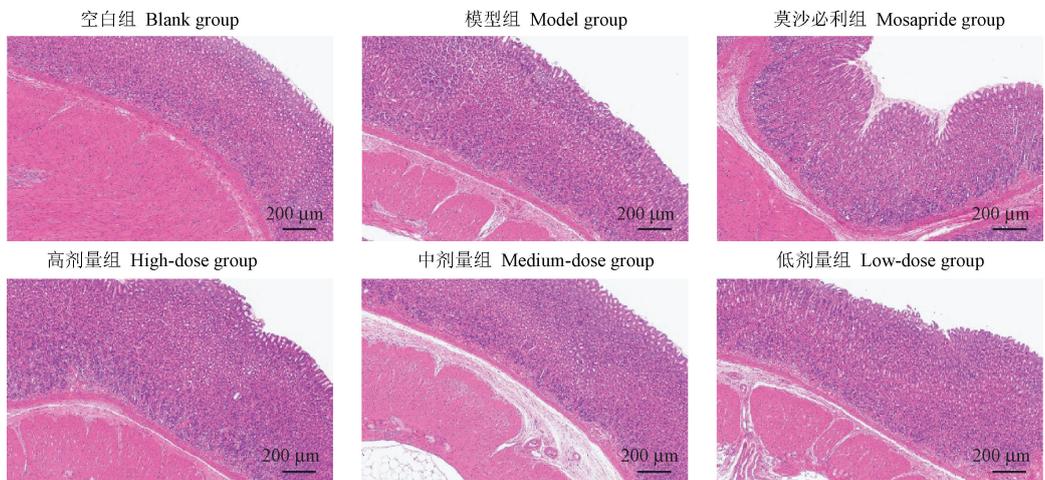


图 5 香砂六君子汤对各组大鼠胃组织病理形态的影响

Figure 5 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on gastric histomorphology of rats in each group

2.4 香砂六君子汤对各组大鼠胃排空率和肠推进率的影响

如图 4 所示,与空白组比较,模型组大鼠胃排空率、肠推进率显著降低($P < 0.05$);与模型组相比较,高、中剂量给药组大鼠胃排空率、肠推进率均不同程度升高,升高程度呈剂量依赖性,组间差异具有显著性($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠胃组织病理学改变

如图 5 所示,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显著性差异。

2.6 各组大鼠胃组织匀浆液中 Mg^{2+} -ATP 酶含量

如图 6 所示,与空白组比较,模型组大鼠胃组织中 Mg^{2+} -ATP 酶含量显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,高、中剂量给药组大鼠胃组织中 Mg^{2+} -ATP 酶含量不同程度升高,其中尤以香砂六君子汤高剂量组最为显著,组间差异具有显著性($P < 0.05$)。

2.7 香砂六君子汤对各组大鼠胃组织中 CaM、MLCK、p-MLC₂₀ 蛋白表达水平的影响

如图 7 所示,与空白组比较,模型组大鼠胃组织中 CaM、MLCK、p-MLC₂₀ 蛋白表达显著下调($P < 0.05$);与模型组比较,高、中剂量给药组大鼠胃组

织中 CaM、MLCK、p-MLC₂₀ 蛋白表达不同程度升高,组间差异具有显著性($P < 0.05$)。

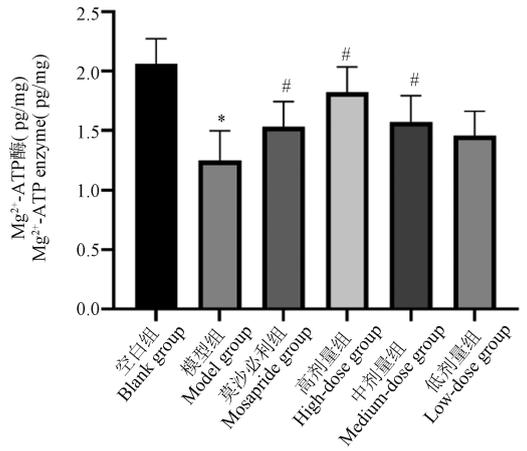


图 6 香砂六君子汤对各组大鼠胃组织匀浆液中 Mg^{2+} -ATP 酶含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Figure 6 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on Mg^{2+} -ATP enzyme content in gastric tissue homogenate of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论

功能性消化不良是现代医学病名,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

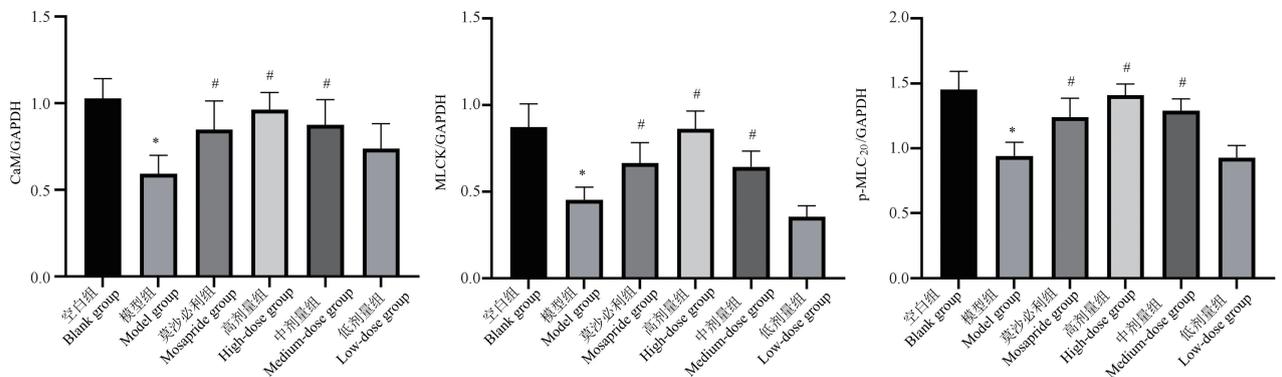
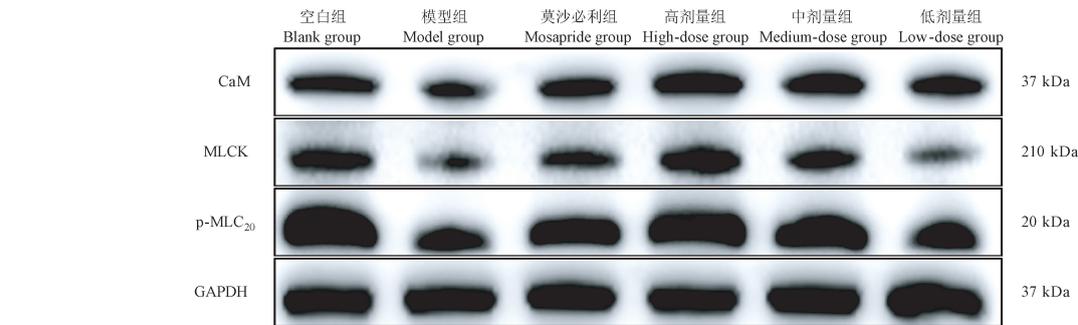


图 7 各组大鼠胃组织中 CaM、MLCK 和 p-MLC₂₀ 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 7 Protein expression of CaM, MLCK and p-MLC₂₀ in gastric tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

状将其纳入中医学“胃脘痛”“痞满”等病症范畴^[5]。中医理论认为该病的发生是多因素致病的结果,各种因素损伤脾胃,导致脾虚气弱,运化无力,水谷不行,终致脾胃升降失司,纳运失职而发病。脾胃虚弱、气滞中焦是该病发生及进展的关键病机所在。而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、砂仁行气助运,燥湿健脾。纵观全方,补益之中佐以行气,以防补品滞而不行。四君得四辅,而补力倍增;四辅有四君,而元气大振,全方共奏补脾益胃、行气化滞之功效。本研究采用综合因素(饥饿失常+游泳竭力+碘乙酰胺灌服)复制脾胃虚弱型 FD 大鼠模型^[8-9],结果发现与空白组比较,模型组大鼠毛发枯乱不荣、倦懒怠动、行动迟缓,一般状况较差,进食量、体重、胃排空率以及肠推进率显著下降($P < 0.05$),而与模型组比较,香砂六君子汤高、中剂量组大鼠一般状况明显好转,进食量、体重、胃排空率以及肠推进率显著增加($P < 0.05$),提示香砂六君子汤能显著改善脾胃虚弱型 FD 大鼠的胃动力。

目前,关于 FD 发病机制尚不明晰,胃肠动力障碍被认为是该病发生的病理基础,而胃肠动力障碍发生与胃肠平滑肌收缩的改变关系密切。研究证实平滑肌细胞内钙依赖通道的激活是维持平滑肌正常收缩的关键所在。当胃肠平滑肌细胞受到外部电信号刺激时,胞外的 Ca^{2+} 进入胞内,与钙调蛋白(calmodulin, CaM) 结合形成复合物并激活 CaM,复合物继而激活钙依赖通道的关键蛋白肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)^[12],活化的 MLCK 催化肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)在丝氨酸-19 位点的磷酸化,导致肌球蛋白头部的 Mg^{2+} -ATP 酶活性增加,水解 ATP 并为肌球蛋白与肌动蛋白的相对滑动提供能量,引起平滑肌收缩^[13-14]。目前已有研究证实促进 MLCK 蛋白高表达能够有效改善胃肠运动动能,缓解胃动力障碍^[15]。

本研究结果显示与空白组比较,模型组大鼠胃窦平滑肌组织中 Mg^{2+} -ATP 酶含量减少,胃窦平滑肌组织内 CaM、MLCK、p-MLC₂₀ 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,高、中剂量给药组大鼠胃窦平滑肌组织中 Mg^{2+} -ATP 酶含量显著增加,胃窦平滑肌中 CaM、MLCK、p-MLC₂₀ 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),上述指标香砂六君子汤组

干预作用呈剂量依赖性,提示香砂六君子汤可能通过调控脾胃虚弱型 FD 大鼠胃窦平滑肌细胞内 CaM/MLCK/MLC₂₀ 通路相关分子表达,从而增加肌球蛋白头部 Mg^{2+} -ATP 酶含量,为胃窦平滑肌组织的收缩提供能量,进而促进胃动力。

参 考 文 献(References)

- [1] Hantoro IF, Syam AF, 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 AD, Bangdiwala SI, Drossman DA, 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] Kuo IY, Ehrlich BE. Signaling in muscle contraction [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(2): a006023.
- [5] 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. Zhang SS, Zhao LQ. Consensus opinions of TCM diagnosis and treatment experts on functional dyspepsia (2017) [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(6): 2595-2598.
- [6] 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. Chu BQ. Analysis of the effect of Xiangsha Liujunzi decoction in the treatment of functional dyspepsia with spleen and stomach weakness [J]. Cardiovasc Dis Electron J Integr Tradit Chin West Med, 2019, 7(28): 155, 165.
- [7] 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. Qiu XJ. Clinical observation of Xiangsha Liujunzi Decoction in the treatment of patients with functional dyspepsia (spleen-stomach deficiency type) [J]. Asia Pac Tradit Med, 2022, 18(1): 116-118.
- [8] 龙涛, 郭保君, 赵映, 等. 基于复合因素诱导功能性消化不良大鼠模型的研究评述 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 102-106. Long T, Guo BJ, Zhao Y, et al. Research and commentary on the rat model of functional dyspepsia induced by compound factors [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(7): 102-106.
- [9] 刘成全, 邓青, 谭志超, 等. 功能性消化不良脾虚证大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(3): 311-315. Liu CQ, Deng Q, Tan ZC, et al. Establishment and assessment of a rat model of functional dyspepsia with spleen deficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(3): 311-315.
- [10] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2003. Xu SY. Pharmacological experimental methodology [M].

- Beijing: People's Medical Publishing House; 2003.
- [11] 张丛敏, 朱晓静, 魏金铠, 等. 神曲消食口服液对功能性消化不良小鼠胃肠运动的影响及机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 83-88.
- Zhang CM, Zhu XJ, Wei JK, et al. Effects and mechanism of Shenqu Xiaoshi oral liquid on gastrointestinal motility in mice with functional dyspepsia [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 83-88.
- [12] Tang Z, Chen H, Yang J, et al. The comparison of Ca^{2+} /CaM-independent and Ca^{2+} /CaM-dependent phosphorylation of myosin light chains by MLCK [J]. Physiol Res, 2005, 54(6): 671-678.
- [13] He WQ, Peng YJ, Zhang WC, et al. Myosin light chain kinase is central to smooth muscle contraction and required for gastrointestinal motility in mice [J]. Gastroenterology, 2008, 135(2): 610-620.
- [14] Martinsen A, Dessy C, Morel N. Regulation of calcium channels in smooth muscle: new insights into the role of myosin light chain kinase [J]. Channels, 2014, 8(5): 402-413.
- [15] 林益群, 罗明艳, 张望. 人参总皂苷对功能性消化不良大鼠胃窦平滑肌组织的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(20): 3313-3316.
- Lin YQ, Luo MY, Zhang W. Effects of total ginsenoside on gastric antrum smooth muscle tissues in rats with functional dyspepsia [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(20): 3313-3316.
- [收稿日期] 2022-09-01

小鼠背侧导水管周围灰质在先天胁迫下逃跑和僵立的不同编码特征

鼠类为了躲避天敌常常表现出逃跑 (flight) 或僵立 (freezing) 的先天防御行为, 该行为的产生与中脑导水管周围灰质 (periaqueductal gray, PAG) 有关。目前, 背侧 PAG (dorsal PAG, dPAG) 对这两种防御行为的神经编码机制尚需要进一步研究。

该研究采用模拟天敌迫近的 Looming 和模拟天敌掠过的 sweeping 两种视觉刺激范式诱导 C57BL/6 小鼠先天性防御行为, 并将 4×4 的微电极阵列植入 dPAG 记录小鼠产生两种防御行为的神经信号, 从胞外动作电位 (spike) 和局部场电位 (local field potential, LFP) 中分别提取和分析两种防御行为的神经编码特征。结果表明, dPAG 在 C57 小鼠逃跑和僵立时神经放电模式和编码特征不同; 逃跑行为比僵立行为的时间延迟更短, 逃跑时 dPAG 的 Spike 发放率显著升高, 而僵立行为的则显著下降; 此外, 两种防御行为的 dPAG 神经动作电位放电序列的峰峰间隔 (Inter Spike Interval, ISI) 分布差异主要表现在 $2 \sim 10$ ms 内, 且逃跑行为高于僵立行为。两种防御行为 dPAG 的 LFP 差异主要集中在 theta 频带, 其中逃跑行为 $8 \sim 10$ Hz, 而僵立行为则在 $6 \sim 8$ Hz。同步似然算法构建脑功能网络表明, 逃跑和僵立时 dPAG theta 频带的脑功能网络连接密度显著增强。

综上所述, 该研究揭示了视觉诱导的恐惧情绪在小鼠防御运动行为调制中发挥关键作用。Looming 刺激模拟天敌迫近, 诱发小鼠强烈的恐惧应激产生潜意识快速逃跑行为; 而 Sweeping 刺激模拟天敌掠过, 刺激相对较弱可能诱发僵立行为, 揭示了小鼠 dPAG 在先天恐惧范式中诱发逃跑和僵立行为的神经编码机制, 证实了恐惧核团在哺乳动物行为调控中发挥重要作用。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(6): 491-501; <https://doi.org/10.1002/ame2.12276>)