

四磨汤口服液改善功能性消化不良模型大鼠的作用机制^Δ

符佳*,周赛男[#](湖南中医药大学第一附属医院脾胃病科,长沙 410007)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)21-2589-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.21.04



摘要 目的 探讨四磨汤口服液调控PTEN诱导假定激酶1(Pink1)/E₃泛素连接酶(Parkin)轴对功能性消化不良(FD)模型大鼠的改善作用及机制。方法 取SD雄性大鼠,利用不可预知的慢性应激法建立FD模型,然后随机分为模型组、阳性对照组(多潘立酮片,3.5 mg/kg)、四磨汤组(四磨汤口服液,5.4 mL/kg),另设不造模的空白组,每组20只。各给药组大鼠灌胃相应药物,空白组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,持续14 d。末次给药结束后,检测大鼠胃排空率和小肠推进率;检测大鼠血清中胃肠激素[胃动素(MTL)、胃泌素(GAS)、胆囊收缩素(CCK)]含量;观察大鼠胃窦组织中卡哈尔间质细胞(ICC)线粒体结构;观察大鼠胃窦组织中细胞色素C氧化酶IV(COX IV)和Parkin在线粒体中的共定位表达;检测大鼠胃窦组织中微管相关蛋白轻链3(LC3)、p62、Pink1、Parkin蛋白的表达。结果 与空白组比较,模型组大鼠胃排空率、小肠推进率和血清中MTL、GAS含量以及p62蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),血清中CCK含量和胃窦组织线粒体中COX IV、Parkin的共定位表达以及LC3、Pink1、Parkin蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);胃窦组织中ICC线粒体数量减少,线粒体空泡化,线粒体嵴模糊,自噬溶酶体较多。与模型组比较,阳性对照组和四磨汤组大鼠上述指标水平均显著逆转($P<0.05$);ICC线粒体结构逐渐恢复,线粒体嵴清晰,自噬溶酶体减少。结论 四磨汤口服液可改善FD模型大鼠的胃肠动力和胃肠激素水平,其作用机制可能与抑制Pink1/Parkin轴、阻断自噬有关。
关键词 四磨汤口服液;PTEN诱导假定激酶1;E₃泛素连接酶;功能性消化不良;自噬

Mechanism of Simotang oral liquid in improving functional dyspepsia model rats

FU Jia, ZHOU Sainan (Dept. of Spleen and Stomach Disease, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the improvement effect and mechanism of Simotang oral liquid on functional dyspepsia (FD) model rats by regulating PTEN-induced putative kinase 1 (Pink1)/E₃ ubiquitin ligase (Parkin) axis. **METHODS** SD male rats were subjected to unpredictable chronic stress to establish an FD model, and were randomly grouped into the model group, positive control group (Domperidone tablets, 3.5 mg/kg), Simo decoction group (Simotang oral liquid, 5.4 mL/kg), with 20 rats in each group. The blank group without modeling was set up. Administration groups were given relevant medicine intragastrically, blank group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 14 d. After the last administration, the gastric emptying rate and small intestine propulsion rate of rats were detected. The contents of gastrointestinal hormones [motilin (MTL), gastrin (GAS) and cholecystokinin (CCK)] in rats were determined; the mitochondrial structure of ICC in gastric antrum tissue of rats was observed; the immunofluorescence co-localization method was applied to observe the expression of cytochrome C oxidase IV (COX IV) and Parkin in gastric antrum tissue of rats; the protein expressions of LC3, p62, Pink1 and Parkin in gastric antrum tissue of rats were all detected. **RESULTS** Compared with the blank group, the gastric emptying rate, small intestinal propulsion rate, the serum contents of MTL and GAS, and protein expression of p62 in model group were all reduced significantly ($P<0.05$); the serum content of CCK, the co-localization expression of COX IV and Parkin in mitochondria, the protein expressions of LC3, Pink1 and Parkin were all increased significantly ($P<0.05$). The number of ICC mitochondria in gastric antrum tissue decreased, mitochondria became vacuolated, mitochondrial cristae were blurry, and there were more autophagic lysosomes. Compared with the model group, the above indexes of the positive control group and the Simo decoction group were reversed significantly ($P<0.05$); the mitochondrial structure of ICC gradually recovered, with clear mitochondrial cristae and reduced autophagic lysosomes. **CONCLUSIONS** Simotang oral liquid can improve gastrointestinal motility and gastrointestinal hormone levels in FD model rats, the mechanism of which may be related to inhibiting Pink1/Parkin axis and blocking autophagy. **KEYWORDS** Simotang oral liquid; PTEN-induced putative kinase 1; E₃ ubiquitin ligase; functional dyspepsia; autophagy

^Δ基金项目 湖南省自然科学基金项目(No.2022JJ70031);湖南省中医药科研计划项目(No.2021203);湖南省中医重点专科(一类)(No.湘中医药函[2023]4号)

*第一作者 主治医师,硕士。研究方向:中医药防治消化系统疾病。E-mail:253526775@qq.com

#通信作者 副主任医师,博士。研究方向:中医药防治消化系统疾病。E-mail:2396457091@qq.com

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是最常见的功能性胃肠疾病之一, 以餐后饱胀、上腹部疼痛和上腹部烧灼感为典型症状^[1]。目前, 胃动力障碍被认为是FD的病理生理学特征之一, 并与消化不良症状密切相关^[2]。虽然促动力药、抗酸剂和抗抑郁药可用于治疗FD, 但其存在副作用和耐药性, 因此开发新的FD治疗药物成为必要^[3]。

四磨汤口服液是根据明代《痘疹金镜录》中四磨汤所研制的一种中药制剂, 由槟榔、乌药、枳壳、木香组成^[4], 主要用于治疗消化系统疾病, 其作用可能是通过调节消化系统的胃肠激素和促进平滑肌收缩来促进胃肠动力^[5]。卡哈尔间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 是胃肠慢波活动的“起搏器”, 通过传递兴奋性和抑制性信号影响胃肠运动, 在肠运动中发挥重要作用^[6]。相关研究发现, 抑制ICC线粒体自噬能够改善FD模型大鼠线粒体损伤并促进其胃动力^[7]。PTEN诱导假定激酶1 (PTEN-induced putative kinase 1, Pink1)/E₃泛素连接酶 (E₃ ubiquitin ligase, Parkin) 轴是最经典的自噬途径, Pink1和Parkin之间的相互作用对线粒体自噬的启动和调节至关重要^[8]。四磨汤口服液是否可通过影响Pink1/Parkin轴改善FD尚不明确。基于此, 本研究建立FD模型大鼠, 并基于线粒体自噬和Pink1/Parkin轴探讨四磨汤口服液对FD模型大鼠的改善作用机制, 以期为临床治疗FD提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Thermo型热电FC酶标仪购自上海联迈生物工程有限公司; VHX-7000N型透射电子显微镜购自日本Keyence公司; STELLARIS 5型激光共聚焦显微镜购自德国Leica公司; iBright FL1500型凝胶成像系统购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 主要药品与试剂

四磨汤口服液 (国药准字Z20025044, 批号221026, 每1 mL相当于饮片0.15 g) 购自湖南汉森制药股份有限公司; 多潘立酮片 (批号220809, 规格10 mg) 购自西安杨森制药有限公司; 胃动素 (motilin, MTL)、胃泌素 (gastrin, GAS)、胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (批号分别为R38269、R38270、R37102) 均购自上海酶研生物科技有限公司; 兔源微管相关蛋白轻链3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、p62单克隆抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 多克隆抗体及鼠源细胞色素C氧化酶IV (cytochrome C oxidase IV, COX IV)、Pink1、Parkin单克隆抗体 (批号分别为ab128025、ab207305、ab9485、ab33985、ab186303、ab77924) 均购自英国Abcam公司; BCA蛋白定量试剂盒 (批号12L026) 购自和元李记 (上海) 生物技术有限公司; 过氧化物酶标记的山羊抗兔免

疫球蛋白G (IgG) 二抗和过氧化物酶标记的山羊抗大鼠IgG二抗 (批号分别为33116、33101) 均购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗大鼠IgG二抗 (批号1041) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级SD雄性大鼠, 共90只, 6周龄, 体重160~180 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004。所有大鼠均饲养在湖南中医药大学第一附属医院中医学内科学实验室中, 动物使用许可证号为SYXK(湘)2019-0009。饲养环境的温度为24~26 °C, 相对湿度为50%~60%。本研究经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准后实施, 批准号为ZYFY20210915。

2 方法

2.1 FD大鼠模型的制备

将大鼠适应性饲养1周后, 随机选取20只大鼠作为空白组, 正常饲养。其余大鼠均采用不可预知的慢性应激法制备FD大鼠模型^[9], 每日随机选取下述9种刺激之一, 且相邻2 d不重复: (1) 食物剥夺 (24 h); (2) 饮水剥夺合并空瓶刺激 (12 h); (3) 倒悬 (30 min); (4) 束缚 (30 min); (5) 夹尾 (1 h); (6) 明暗颠倒 (24 h); (7) 湿笼饲养 (24 h); (8) 超声刺激 (2 h); (9) 强迫游泳 (45 °C, 5 min)。连续刺激21 d。当大鼠表现出易怒、行动缓慢、体重增长以及排稀便等症状, 表明FD模型建立成功^[10]。

2.2 动物分组及给药处理

将造模成功的60只大鼠随机分为模型组、阳性对照组、四磨汤组, 每组20只。阳性对照组大鼠灌胃3.5 mg/kg多潘立酮片溶液^[11], 四磨汤组大鼠灌胃5.4 mL/kg四磨汤口服液 (为临床等效剂量), 空白组和模型组大鼠均灌胃等体积生理盐水, 每天1次, 持续14 d。

2.3 样本采集

末次给药结束后, 用1%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉大鼠, 然后腹主动脉采血3 mL于离心管中, 放置2 h后在4 °C下以3 000 r/min离心15 min, 收集上清液保存于-20 °C冰箱中备用。每组随机选取15只大鼠, 断颈处死后对大鼠进行剃毛消毒, 无菌条件下解剖并分离胃窦组织, 然后每组随机挑取5个组织立即置于2.5%戊二醛中固定2 h, 另每组取5个组织置于4%多聚甲醛中固定, 剩余组织均冻存于-80 °C冰箱中。

2.4 大鼠血清中胃肠激素的含量检测

取出“2.3”项下保存的血清, 置于冰上溶解, 然后按试剂盒说明书方法操作, 检测大鼠血清中胃肠激素MTL、GAS和CCK的含量。

2.5 大鼠胃排空率检测

采用酚红含量法进行检测。将每组剩余的5只大鼠禁食18 h, 然后灌胃含有0.05%酚红的1.5%羧甲基纤维

素钠盐溶液 0.5 mL, 20 min 后麻醉并处死大鼠, 取出胃组织。以 10 mL 的 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液冲洗胃组织, 收集胃内容物并以 3 500 r/min 离心 15 min, 收集上清液。使用酶标仪在 558 nm 波长处测定吸光度(A), 记为实测酚红 A。在另外的容器中加入含有 0.05% 酚红的 1.5% 羧甲基纤维素钠盐溶液 0.5 mL 和 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液 10 mL, 搅拌均匀后测定其在 558 nm 波长处的 A, 记为标准酚红 A。计算各组大鼠的胃排空率: 胃排空率 (%) = (1 - 实测酚红 A / 标准酚红 A) × 100%。

2.6 大鼠小肠推进率检测

在“2.3”项下取出胃组织后, 各组大鼠随机取 5 只剪下幽门至回盲部的一段肠道组织, 将其置于无菌的玻璃板上, 不设任何牵引力, 测量取下的肠管总长以及酚红溶液自幽门向盲肠推进的距离。计算小肠推进率: 小肠推进率 (%) = 酚红溶液自幽门向盲肠推进距离 / 肠管总长 × 100%。

2.7 大鼠胃窦组织中 ICC 线粒体结构观察

将“2.3”项下固定 2 h 后的胃窦组织冲洗干净, 再以 1% 锇酸固定 2 h; 经双蒸水冲洗后, 以乙醇脱水 10 min, 再以环氧丙烷孵育 20 min 后, 以 Spurr 树脂包埋剂进行包埋。采用透射电子显微镜观察并拍照。

2.8 大鼠胃窦组织中 COX IV、Parkin 在线粒体中共定位表达的检测

采用免疫荧光共定位法进行检测。将“2.3”项下固定于 4% 多聚甲醛中的胃窦组织取出, 进行常规石蜡包埋和切片 (4 μm); 切片经二甲苯和梯度乙醇脱蜡水化后, 放入抗原修复液中, 于 95 °C 下水浴 15 min; 冷却至室温后, 以 0.5% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 加入 COX IV、Parkin 一抗 (稀释度为 1:200), 4 °C 封闭过夜; 加入 FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 二抗 (稀释度为 1:500), 室温避光孵育 1 h; 以磷酸盐缓冲液清洗后, 用含 DAPI 的抗荧光猝灭封片剂封片; 10 min 后在激光共聚焦显微镜下观察 COX IV、Parkin 的染色情况, 并利用 Image J 软件分析其共定位表达的面积。其中, COX IV 抗体标记线粒体为红色, Parkin 抗体标记 Parkin 为绿色, DAPI 标记细胞核为蓝色; 若 Parkin 进入线粒体, 则共定位显示为黄色或橙色。

2.9 大鼠胃窦组织中 LC3、p62、Pink1、Parkin 蛋白表达的检测

采用 Western blot 法进行检测。将“2.3”项下冻存的胃窦组织取出, 加入 RIPA 裂解缓冲液进行匀浆, 并在 4 °C 下以 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用 BCA 试剂盒测定其中总蛋白浓度。将 100 μg 蛋白样品溶解在溴酚蓝上样缓冲液中进行煮沸变性, 然后每孔上样 20 μg 进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并湿转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭孵育 PVDF 膜 1 h, 加入 LC3、p62、Pink1、Parkin、GAPDH 一抗 (LC3、p62、Pink1 稀释度为 1:1 000, Parkin 稀释度为 1:2 000, GAPDH 稀释度为 1:2 500), 4 °C 孵育过夜; 洗膜后, 加入

过氧化物酶标记的山羊抗兔或山羊抗大鼠 IgG 二抗 (稀释度为 1:3 000), 室温孵育 1 h; 以 TBST 洗涤 3 次后, 在 ECL 溶液中避光孵育 5 min。采用凝胶成像系统成像并拍照, 采用 Image J 软件进行灰度值分析。以目的蛋白与内参蛋白 (GAPDH) 灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平; 其中 LC3 在细胞中以 LC3 I 和 LC3 II 2 种形式存在, 以 LC3 II / LC3 I 的比值表示 LC3 蛋白的表达水平。

2.10 统计学方法

采用 Graphpad prism 8.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 四磨汤口服液对大鼠血清中 MTL、GAS、CCK 含量的影响

与空白组比较, 模型组大鼠血清中 MTL、GAS 含量均显著降低 ($P < 0.05$), CCK 含量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和四磨汤组大鼠血清中 MTL、GAS 含量均显著升高 ($P < 0.05$), CCK 含量均显著降低 ($P < 0.05$); 四磨汤组与阳性对照组比较, 上述指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 MTL、GAS、CCK 含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 20, \text{pg/mL}$)

组别	MTL	GAS	CCK
空白组	238.69 ± 14.68	259.16 ± 18.37	176.82 ± 17.87
模型组	82.97 ± 6.74 ^a	91.68 ± 9.32 ^a	246.38 ± 25.10 ^a
阳性对照组	209.78 ± 12.52 ^b	221.07 ± 16.43 ^b	206.74 ± 21.63 ^b
四磨汤组	216.37 ± 13.93 ^b	232.25 ± 15.94 ^b	201.92 ± 22.51 ^b

a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3.2 四磨汤口服液对大鼠胃排空率和小肠推进率的影响

与空白组比较, 模型组大鼠的胃排空率和小肠推进率均显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和四磨汤组大鼠的胃排空率和小肠推进率均显著升高 ($P < 0.05$); 四磨汤组与阳性对照组比较, 上述指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠胃排空率和小肠推进率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5, \%$)

组别	胃排空率	小肠推进率
空白组	58.97 ± 3.61	84.56 ± 6.27
模型组	34.16 ± 2.54 ^a	51.63 ± 3.71 ^a
阳性对照组	47.62 ± 3.15 ^b	69.12 ± 5.69 ^b
四磨汤组	50.31 ± 3.47 ^b	72.84 ± 5.73 ^b

a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

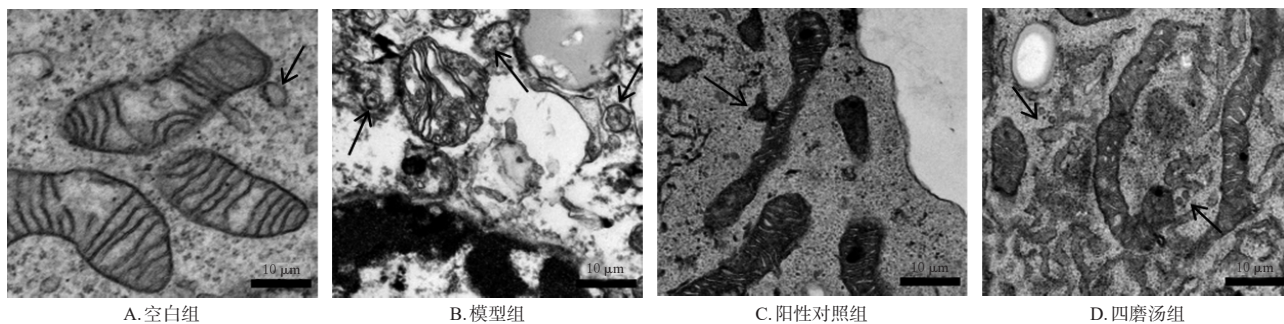
3.3 四磨汤口服液对大鼠胃窦组织中 ICC 线粒体结构的影响

空白组大鼠 ICC 形态和结构清晰, 核膜完整, 线粒体嵴密度高。与空白组比较, 模型组大鼠 ICC 线粒体数量减少, 线粒体空泡化, 线粒体嵴模糊, 并在其周围观察到大量自噬溶酶体。与模型组比较, 阳性对照组和四磨汤组大鼠 ICC 线粒体结构逐渐恢复, 线粒体嵴清晰, 自噬溶酶体减少。结果见图 1。

3.4 四磨汤口服液对大鼠胃窦组织中 COX IV、Parkin 共定位表达的影响

与空白组[(354.52 ± 31.68) μm²]比较,模型组大鼠胃窦组织中 COX IV、Parkin 在线粒体中的共定位表达面积[(1 258.97 ± 72.94) μm²]显著增大($P < 0.05$);与模型

组比较,阳性对照组和四磨汤组大鼠胃窦组织中 COX IV、Parkin 在线粒体中的共定位表达面积[分别为(483.54 ± 38.64)、(465.76 ± 35.47) μm²]均显著减小($P < 0.05$)。四磨汤组与阳性对照组比较,上述指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图2。



注:箭头所指为自噬溶酶体。

图1 各组大鼠胃窦组织中 ICC 线粒体超微结构的观察结果

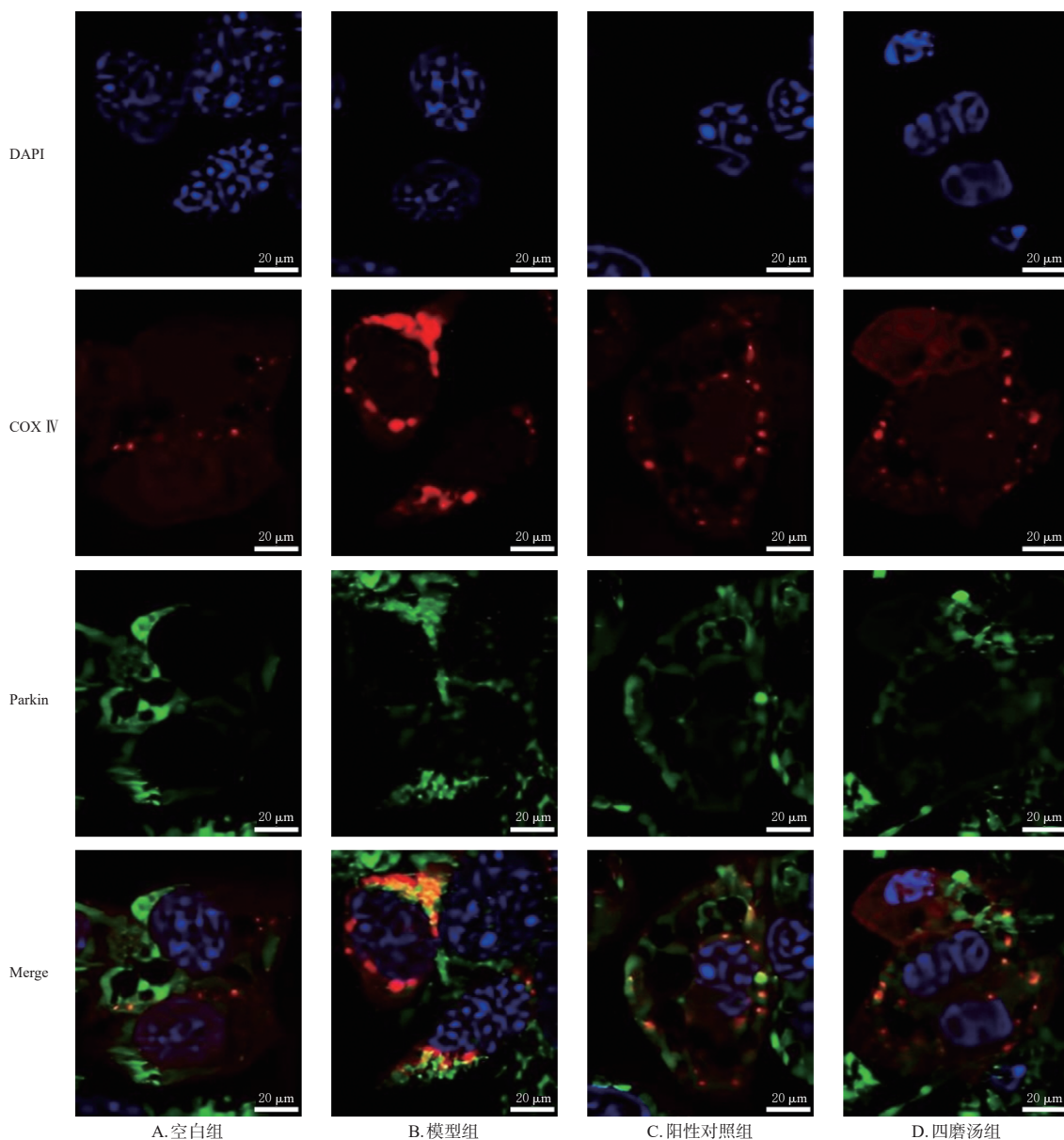


图2 各组大鼠胃窦组织中 COX IV、Parkin 共定位表达的观察结果

3.5 四磨汤口服液对大鼠胃窦组织中 LC3、p62、Pink1、Parkin 蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠胃窦组织中 LC3、Pink1、Parkin 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$),p62 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和四磨汤组大鼠胃窦组织中 LC3、Pink1、Parkin 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$),p62 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);四磨汤组与阳性对照组比较,上述指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图3、表3。

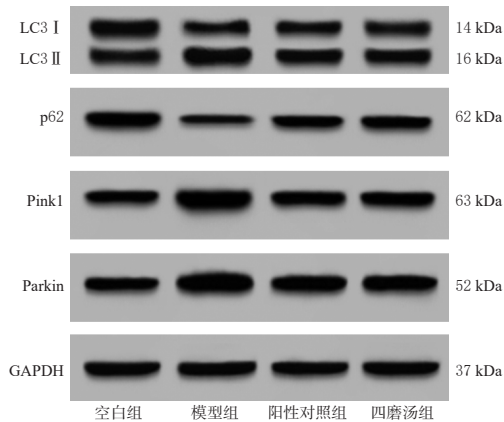


图3 各组大鼠胃窦组织中 LC3、p62、Pink1、Parkin 蛋白表达的电泳图

表3 各组大鼠胃窦组织中 LC3、p62、Pink1、Parkin 蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	LC3 II / LC3 I	p62/GAPDH	Pink1/GAPDH	Parkin/GAPDH
空白组	0.94 ± 0.06	1.08 ± 0.06	0.97 ± 0.07	1.02 ± 0.07
模型组	1.65 ± 0.12 ^a	0.37 ± 0.02 ^a	1.72 ± 0.14 ^a	1.79 ± 0.12 ^a
阳性对照组	1.16 ± 0.08 ^b	0.81 ± 0.05 ^b	1.20 ± 0.09 ^b	1.26 ± 0.08 ^b
四磨汤组	1.13 ± 0.07 ^b	0.85 ± 0.06 ^b	1.17 ± 0.08 ^b	1.23 ± 0.08 ^b

a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

FD 是一种胃肠道运动障碍综合征,其临床症状包括慢性上腹部疼痛和不适。FD 的发病机制较为复杂,包括胃和十二指肠的功能性运动障碍、心理压力以及不良饮食习惯等^[12]。如果没有及时治疗,FD 可能发展为消化性溃疡或胃癌。目前,针对 FD 症状的治疗方法主要包括饮食调节、药物治疗和心理治疗^[13]。长期以来,传统中医理论被广泛用于功能性胃肠疾病的初始治疗^[14]。在中医上,根据 FD 症状特点,可将其归属于“痞满、胃胀”范畴,多从健脾益气、疏肝消痞角度用药,疗效优势明显^[15]。本研究通过不可预知的慢性应激法建立 FD 大鼠模型来探讨四磨汤对 FD 的作用。结果显示,模型组大鼠的胃排空率和小肠推进率较空白组降低,表明模型大鼠制备成功。四磨汤口服液给药后,大鼠的胃排空率和小肠推进率较模型组升高。这表明四磨汤口服液可改善 FD 模型大鼠的胃肠动力。

MTL、GAS 是广泛分布在胃肠道的胃肠激素。MTL 是一种能刺激胃肠平滑肌的活性肽,能促进胃蛋白

酶的分泌,提高胃排空率,缩短食物在小肠中的时间;GAS 由十二指肠黏膜和胃窦的 G 细胞分泌,可以调节胃肠蠕动,促进胃排空,并刺激胃酸分泌^[16]。CCK 是一种脑肠肽,在摄入含有高脂肪或蛋白质的食物时,由小肠上部的 I 细胞释放。而有研究报道,CCK 拮抗剂加速了胃排空率,这可能有益于 FD 患者的恢复^[17]。本研究结果显示,模型组大鼠血清中 MTL、GAS 含量低于空白组,CCK 含量高于空白组;而阳性对照组和四磨汤组大鼠血清中 MTL、GAS 含量较模型组升高,CCK 含量较模型组降低。这表明四磨汤口服液可促进 FD 模型大鼠血清中胃肠激素 MTL、GAS 的分泌,抑制脑肠肽 CCK 的释放,进而加速胃排空,促进胃肠运动。

相关研究发现,ICC 中自噬的过度激活以及线粒体形态和结构的异常可导致胃肠节律紊乱^[18]。Pink1 和 Parkin 是参与调节自噬的 2 个关键分子。线粒体的去极化阻断了 Pink1 的转移,导致 Pink1 在线粒体膜上积累,然后促进 Parkin 磷酸化并使其从细胞质基质募集到线粒体外膜上,从而触发线粒体自噬^[19]。线粒体呼吸链上的 COX 主要包含 4 个酶复合体(I、II、III、IV),其中 COX IV 是 COX 中的关键亚型,对线粒体呼吸链的装配与功能至关重要,其表达正常与否可以影响整条呼吸链的功能状态以及细胞的能量生成^[20]。本研究通过检测 COX IV、Parkin 在线粒体中共定位表达发现,模型组大鼠胃窦组织中 COX IV、Parkin 在线粒体中的共定位表达升高,表明模型组大鼠 Pink1/Parkin 轴被激活。p62 的功能是连接受损的线粒体和线粒体溶酶体,其中线粒体溶酶体是由线粒体吞噬体和溶酶体融合形成,可介导受损线粒体的降解^[21]。LC3 蛋白在自噬体的形成中也起着关键作用,其包含 I 型和 II 型,LC3 I 蛋白的含量与自噬活动密切相关^[22]。本研究结果发现,模型组大鼠胃窦组织中 Pink1、Parkin 及 LC3 蛋白的表达均升高,p62 的表达降低;而阳性对照组和四磨汤组大鼠胃窦组织中 Pink1、Parkin、LC3 蛋白的表达均降低,p62 蛋白表达均升高。这表明四磨汤口服液可抑制 Pink1/Parkin 轴,阻断自噬,进而改善大鼠 FD。

综上所述,四磨汤口服液可改善 FD 模型大鼠的胃肠动力和胃肠激素水平,其作用机制可能与抑制 Pink1/Parkin 轴、阻断自噬有关。

参考文献

- [1] SUN R R, ZHOU J, QU Y Z, et al. Resting-state functional brain alterations in functional dyspepsia: protocol for a systematic review and voxel-based meta-analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(48): e23292.
- [2] HUANG J K, LIU J L, LIU Z H, et al. Reliability of the evidence to guide decision-making in acupuncture for functional dyspepsia[J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 842096.
- [3] XIAO H L, XIAO Y J, WANG Q, et al. Moxibustion regu-

- lates gastrointestinal motility via HCN₁ in functional dyspepsia rats[J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e932885.
- [4] 胡娟, 刘莉, 米本中, 等. 四磨汤对幼龄小鼠厌食症模型的影响[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(6): 27-31.
HU J, LIU L, MI B Z, et al. Therapeutic effect and mechanism of Simo decoction on the anorexia model in young mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2019, 35(6): 27-31.
- [5] 黎敏, 米本中, 刘莉, 等. 四磨汤口服液药理及临床应用研究进展[J]. *中南药学*, 2020, 18(12): 2031-2036.
LI M, MI B Z, LIU L, et al. Research progress in pharmacology and clinical application of Simotang oral liquid[J]. *Cent South Pharm*, 2020, 18(12): 2031-2036.
- [6] JIA Q L, LI L, WANG X X, et al. Hesperidin promotes gastric motility in rats with functional dyspepsia by regulating Drp1-mediated ICC mitophagy[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 945624.
- [7] LI L, JIA Q L, WANG X X, et al. Chaihu Shugan san promotes gastric motility in rats with functional dyspepsia by regulating Drp-1-mediated ICC mitophagy[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 249-258.
- [8] LI L Q, HUANG T J, YANG J, et al. Pink1/Parkin pathway-mediated mitophagy by AS-IV to explore the molecular mechanism of muscle cell damage[J]. *Biome Pharmacother*, 2023, 161: 114533.
- [9] 谭树慧, 任卫琼, 夏伯候, 等. 醋炙乌药-木香对肝郁气滞型功能性消化不良大鼠胃排空及胃肠激素的影响[J]. *中国药房*, 2019, 30(5): 684-688.
TAN S H, REN W Q, XIA B H, et al. Effects of *Lindera aggregate* of stir-baking with vinegar-*aucklandia lappa* on gastric emptying and gastrointestinal hormones in functional dyspepsia liver depression and qi stagnation model rats[J]. *China Pharm*, 2019, 30(5): 684-688.
- [10] 周姝, 周赛男, 韩运宗, 等. 四磨汤对肝脾气滞证功能性消化不良大鼠胃肠运动及血清GAS、MTL的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2023, 32(1): 55-58, 132.
ZHOU S, ZHOU S N, HAN Y Z, et al. Effects of Simo decoction on gastrointestinal motility and serum GAS and MTL in rats with functional dyspepsia with syndrome of liver-spleen qi stagnation[J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2023, 32(1): 55-58, 132.
- [11] WANG C, WANG B, AILI M, et al. Effect of *Artemisia rupestris* L. extract on gastrointestinal hormones and brain-gut peptides in functional dyspepsia rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 2528617.
- [12] ZHU J, TONG H L, YE X D, et al. The effects of low-dose and high-dose decoctions of *Fructus aurantii* in a rat model of functional dyspepsia[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e919815.
- [13] YANG W, LIU R, ZHOU L H, et al. Effects of ganoderic acid A on gastrointestinal motility and brain-gut peptide in rats with functional dyspepsia[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 2298665.
- [14] XIAO Z L, XU J, TAN J, et al. Zhizhu Kuanzhong, a traditional Chinese medicine, alleviates gastric hypersensitivity and motor dysfunction on a rat model of functional dyspepsia[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1026660.
- [15] 刘梦雅, 成映霞, 白敏, 等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(4): 1-8.
LIU M Y, CHENG Y X, BAI M, et al. Mechanism of Xiangsha Liujunzi tang in regulation of RhoA/ROCK2/MYPT1 pathway to improve gastric motility in rats with functional dyspepsia[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, 29(4): 1-8.
- [16] SHAO Z M, ZHONG J D, FANG Y M, et al. Effect of kvass on improving functional dyspepsia in rats[J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 5169892.
- [17] VAN DEN HOUTE K, SCARPELLINI E, VERBEURE W, et al. The role of GI peptides in functional dyspepsia and gastroparesis: a systematic review[J]. *Front Psychiatry*, 2020, 11: 172.
- [18] 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.
- [19] ABUDUREYIMU M, YU W J, CAO R Y, et al. Berberine promotes cardiac function by upregulating Pink1/parkin-mediated mitophagy in heart failure[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 565751.
- [20] 于亮, 史霄雨, 刘子铭, 等. 运动时长和强度对大鼠骨骼肌线粒体自噬的影响及其机制[J]. *生理学报*, 2020, 72(5): 631-642.
YU L, SHI X Y, LIU Z M, et al. Effects of exercises with different durations and intensities on mitochondrial autophagy and FUNDC1 expression in rat skeletal muscles[J]. *Acta Physiol Sin*, 2020, 72(5): 631-642.
- [21] ZHANG Z H, CHEN Z G, LIU R M, et al. Bcl-2 proteins regulate mitophagy in lipopolysaccharide-induced acute lung injury via Pink1/parkin signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6579696.
- [22] MU N H, ZHANG T, ZHU Y, et al. The mechanism by which miR-494-3p regulates PGC1- α -mediated inhibition of mitophagy in cardiomyocytes and alleviation of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2023, 23(1): 204.

(收稿日期: 2023-05-10 修回日期: 2023-09-13)

(编辑: 唐晓莲)