

枳实麸炒前后对功能性消化不良大鼠内质网应激相关因子的影响

曾琳琳,沈 灵,范依霖,骆巧媚,王 婷,周 霞,万 军*

(西南交通大学生命科学与工程学院,四川 成都 610031)

摘要: 目的 研究枳实麸炒前后对功能性消化不良大鼠胃组织内质网应激相关因子的影响。方法 将60只SD大鼠随机分为空白组、模型组、 $2.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 多潘立酮组、 $9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 枳实生品组(RFAI)、 $9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 枳实麸品组(FFAIWB),采用“郭海军夹尾法”加以改进,刺激21d复制功能性消化不良大鼠模型,造模结束后,灌胃给药14d。采用定量法测定大鼠的肠推进率和胃排空率;HE染色法检测大鼠胃窦的病理情况;ELISA法检测血清中胃泌素的含量;RT-PCR法检测胃窦GRP78、IRE1、JNK的表达;Western Blot法检测Bcl-2、Bax的表达。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠的肠推进率、胃排空率和血清中胃泌素的含量显著下降;胃窦IRE1、GRP78、JNK mRNA的表达和Bax蛋白的表达明显增加,Bcl-2蛋白的表达下降;HE染色发现各组大鼠胃组织无明显器质性病变,但模型组大鼠的胃窦炎症浸润明显。与模型组比较,多潘立酮、枳实生品和枳实麸品组大鼠的消化不良症状有显著改善。**结论** 枳实治疗模型大鼠与调控IRE1/GRP78/JNK信号通路有关,且麸炒后效果更佳。

关键词: 枳实;麸炒;功能性消化不良;内质网应激;胃肠动力;炮制;脾胃;夹尾刺激

中图分类号:R96

文献标志码:A

文章编号:1006-0103(2023)03-0285-05

DOI:10.13375/j.cnki.wjps.2023.03.010

Effects of *Aurantii Immaturus Fructus* and its stir fried with bran product on endoplasmic reticulum stress – related factors in rats with functional dyspepsia

ZENG Linlin, SHEN Ling, FAN Yilin, LUO Qiaomei, WANG Ting, ZHOU Xia, WAN Jun*

(School of Life Science & Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To study the effects of *Aurantii Immaturus Fructus* (AIF) and its stir fried with bran product on endoplasmic reticulum stress – related factors of gastric tissues in rats with functional dyspepsia (FD). **METHODS** Sixty SD rats were randomly divided into blank group, model group, positive group ($2.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Domperidone), raw AIF group ($9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ RAIF) and fried AIF with bran group ($9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ FAIFWB). Rats were treated with the modified "Guo Haijun tail – clamping method" for 21 d to establish the FD rat model. After the model was built, all rats were given the corresponding solution by gavage for 14 d. The intestinal propulsion rate and gastric emptying rate were measured; Hematoxylin – Eosin (HE) staining to detect the pathology of rat stomach tissue; the levels of serum gastrin were detected by enzyme linked immunosorbent assay; the expressions of glucose regulatory protein 78 (GRP78), inositol – requiring enzyme 1 (IRE1) and c – Jun N – terminal kinase (JNK) were detected by reverse transcription polymerase chain reaction; the protein expressions of B – cell lymphoma – 2 (Bcl – 2) – associated X (Bax) and Bcl – 2 were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with the blank group, the intestinal propulsion rate, gastric emptying rate, and the levels of serum gastrin of model group were significantly decreased, the mRNA expressions of IRE1, GRP78, JNK and protein expression of Bax in the gastric tissue increased; and protein expression of Bcl – 2 decreased significantly. HE staining showed that the gastric tissues of all rats had no obvious organic lesions; however, the gastric tissues of model group had a large amount of inflammatory infiltration. Compared with model group, the FD symptoms of Domperidone, RAIF and FAIFWB rats were significantly improved. **CONCLUSION** AIF treats FD rats by regulating the IRE1/GRP78/JNK signaling pathway, and FAIFWB shows better effect.

Key words: *Aurantii Immaturus Fructus*; Stir fried with bran; Functional dyspepsia; Endoplasmic reticulum stress; Gastrointestinal motility; Concoction; Spleen and stomach; Pinch tail irritation

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2682021ZTPY013);西南交通大学个性化实验项目(GX2021160016)

作者简介:曾琳琳(1999—),正攻读药理学专业的硕士学位。Email:zenglinlin00@163.com

*通信作者(Correspondent author),Email:wjun1013@126.com

CLC number: R96

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2023)03-0285-05

功能性消化不良为常见的功能性胃肠病,在临床诊断中无明显器质性病变,常伴有上腹疼痛、饱胀的症状^[1]。中医将其归于“痞满”“胃脘痛”的范畴,中医记载有郁怒伤肝、肝气郁结、侮脾犯胃,则影响中焦气机运行,致胃脘痞满,认为该病的发生与脾胃功能的失调相关。枳实,首载于《神农本草经》中,具破气消积、化淤散痞之功效,可用于积滞内停,痞满胀痛等症。中药炮制理论认为枳实“麸皮制去燥性而和胃”^[2],而其对功能性消化不良的作用机制鲜有报道。现复制功能性消化不良大鼠模型,从内质网应激探究枳实麸炒前后对模型大鼠的影响。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与动物

PIKORed 96 实时荧光定量仪、MK3 全功能酶标仪(美国 Thermo Fisher)。胃泌素酶联免疫(ELISA)试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司);胃窦葡萄糖调节蛋白(GRP78)抗体、肌醇需求酶1(IRE1)抗体(英国 Abcam);应激活化蛋白激酶(JNK)兔克隆抗体、促凋亡基因 Bax 兔克隆抗体(美国 Proteintech);胃窦 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)兔克隆抗体(美国 Abclonal);枳实饮片(四川新荷花中药饮片有限公司);麦麸(重庆元阳农业有限公司);多潘立酮(四川奥维制药有限公司,批号:H20093491)。60 只♂ SPF 级 SD 大鼠(成都达硕实验动物有限公司,许可证号:SCXK 川 2020-030),180~220 g。

1.2 方法与结果

1.2.1 供试药物的制备 取同一批枳实饮片,按 2020 年版《中国药典》中麸炒法(通则 0213)制备。先加入 10 倍比例麦麸炒制冒烟后加入枳实,中火加热炒至枳实表面变深,筛去麦麸,即得麸炒枳实。取生枳实饮片和麸炒枳实饮片各 200 g,分别加入 600 mL 蒸馏水浸泡 30 min 后,加入适量蒸馏水煎煮提取(30 min × 2),合并煎液,用纱布过滤,去除药渣,浓缩为 0.9 g·mL⁻¹的水煎液,药物浓度按成人与动物体表面积折算,按 2022 年版《中国药典》中记载的枳实药量 10 g 为成人临床用药量,70 kg 为成人体质量进行计算。取 10 g CMC-Na,溶于 250 mL 蒸馏水中,加

入 16 g 奶粉、8 g 淀粉、8 g 白砂糖、2 g 活性炭粉混匀,制成 300 mL 重约 300 g 的黑色营养半固体糊状物。

1.2.2 大鼠的分组、造模与给药 将 60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机均分为空白组、模型组、阳性组、枳实生品组和枳实麸炒品组。除空白组外,其余各组参照“郭海军夹尾法”加以改进,复制功能性消化不良(FD)大鼠模型^[3]。包括:夹尾刺激(用医用胶带缠绕的文件夹夹住大鼠尾部 1/3 处,激怒大鼠,持续 30 min,每日 2 次)、强迫游泳(取塑料水桶,装入 2/3 的 22~25 ℃ 的自来水,分组将大鼠放入桶内,使其游至力竭)、不规则喂食(大鼠隔日禁食禁水)。以上刺激方法持续造模 21 d。造模结束后,各组大鼠均恢复正常饮食,枳实生品组和枳实麸炒品组分别给予 9 g·kg⁻¹的生枳实和麸炒枳实药液,阳性组给予 2.7 mg·kg⁻¹多潘立酮溶液,空白组和模型组给予等体积生理盐水,持续给药 14 d。

1.2.3 胃肠运动指标的检测 末次给药禁食 24 h 后,每只大鼠灌胃 2 mL 营养半固体糊,30 min 后以 10% 水合氯醛麻醉大鼠,经腹主动脉采血,结扎贲门和幽门口后,取完整胃体及小肠。完整胃体剔除表面黏膜,擦净后,称胃全重(M₁),沿胃大弯处剪开全胃,用生理盐水洗去胃内剩余糊状物,滤纸拭干水分,称取胃净重(M₂),胃排空率 = [1 - (M₁ - M₂) / 灌胃营养半固体糊重] × 100%。称取胃净重后,剪取胃窦组织两份,1 份用 10% 中性甲醛固定,用于病理学检查;1 份放入离心管中,置 -80 ℃ 下冻存。小肠取出后平铺于白纸上,分别测量幽门到黑色营养半固体糊的距离(L₁)及幽门至回盲部的距离(L₂),小肠推进率 = L₁ / L₂ × 100%。由图 1 可知:与空白组比

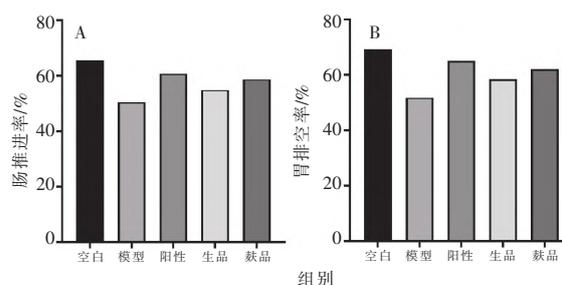


图 1 FD 大鼠小肠推进率(A)及胃排空率(B)水平的比较

Figure 1 Comparison of small intestinal propulsion rate (A) and gastric emptying rate levels (B) in FD rats

较,模型组大鼠的肠推进率及胃排空率均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,阳性组、枳实生品组和枳实麸炒品组大鼠的小肠推进率及胃排空率均显著增加($P < 0.01$);与枳实生品组比较,枳实麸炒品组大鼠的小肠推进率显著增加($P < 0.05$)。

1.2.4 胃泌素含量的检测 经大鼠腹主动脉采5 mL血,室温下静置1~2 h后,以 $3 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,取血清置离心管中,采用ELISA试剂盒,按说明书检测胃泌素的含量。由图2可知:与空白组比较,模型组大鼠血清中胃泌素的含量

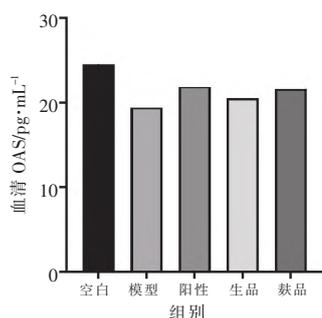


图2 各组大鼠血清中胃泌素浓度水平的对比

Figure 2 Comparison of serum GAS concentration levels in each group of rats

显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,阳性组、枳实生品组和枳实麸炒品组大鼠血清中胃泌素的含量明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与枳实生品组比较,枳实麸炒品组大鼠血清胃泌素的含量增加,但无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2.5 病理学的检查 取用10%中性甲醛固定的胃窦组织,进行脱水、包埋、切片、HE染色、在显微镜下观察大鼠胃窦的病理情况。由图3可知:各组大鼠胃组织的黏膜层、黏膜下层、肌层及外膜结构完整,分层明显,肌层和外膜未见明显增生。空白组大鼠固有层内的胃腺排列紧密,无炎细胞浸润;模型组的固有层内部分区域胃腺排列较为紊乱,管状结构较为模糊,黏膜浅表或黏膜下层内毛细血管扩张,胃腺底部及黏膜下层内大量炎性细胞浸润,可见淋巴细胞、中性粒细胞或嗜酸性粒细胞;阳性组、枳实生品组和枳实麸炒品组的固有层内胃腺排列较为整齐,胃腺底部或黏膜下层内少量炎细胞浸润,病变程度轻于模型组的,其他未见明显病理变化。HE病理结果表明:FD、枳实生品、麸炒品均不会对大鼠胃组织造成病理性损伤。

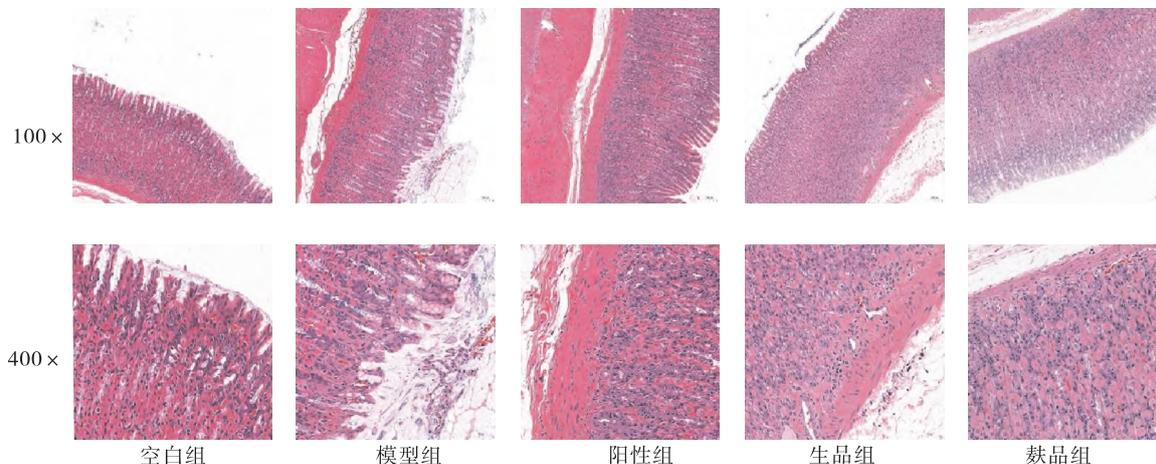


图3 FD大鼠胃窦组织的HE染色

Figure 3 HE staining of gastric sinus tissues in FD rats

1.2.6 IRE1、GRP78、JNK mRNA 表达的检测 将 -80°C 下保存的大鼠胃窦样品,加入TRIzol试剂提取总RNA。样本总RNA进行基因组DNA去除反应,用PrimeScript RT试剂盒按步骤进行逆转录反应,在PIKORed 96 Real-Time PCR System上扩增所得cDNA。PCR反应参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,在延伸过程中采集荧光,共45个循环。IRE1、GRP78、JNK mRNA的表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算。

所用引物见表1。由图4可知:与空白组比较,模型组大鼠胃组织中IRE1、GRP78、JNK mRNA的表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,给药组大鼠胃组织中IRE1、GRP78、JNK mRNA的表达显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与枳实生品组比较,枳实麸炒品组大鼠胃组织中IRE1、GRP78、JNK mRNA的表达降低($P > 0.05$)。

1.2.7 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的检测 将于 -80°C 下保存的大鼠胃窦样品,加入RIPA裂解

表1 引物核苷酸的序列

Table 1 Sequences of primer nucleotides

引物名称	上游	下游
β -actin	GAAGATCAAGATCATTGCTCC	TACTCCTGCTTGCTGATCCA
GRP78	CGCCTCATCGGACGCACTTGAAT	CATCCTTGGTTGCTTGCCGCTGTG
IRE1	ATGGCGATGGACTGCTGTAAGTCTG	GCGAGGCATAGAGGCTGCTGGAGTA
JNK	CCACCACCAAAGATCCCTGACAAGCA	ACGCCATTCTTAGTTCGCTCCTCCAA

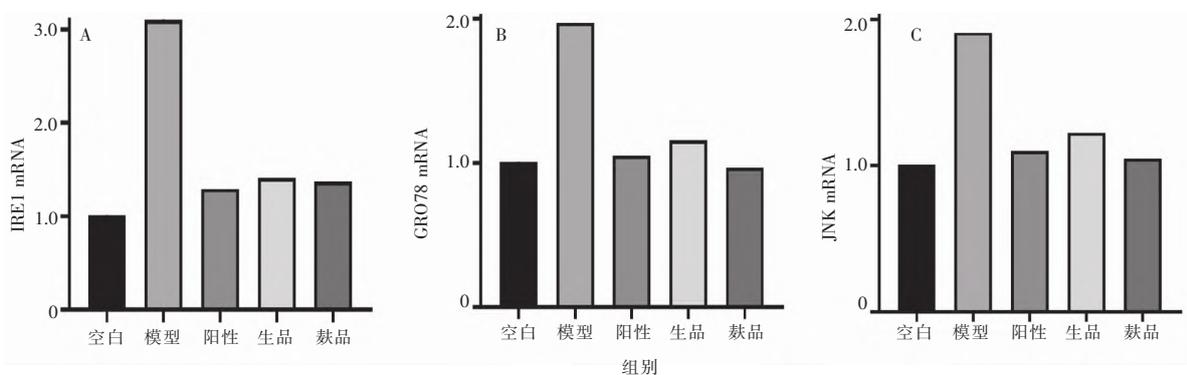


图4 大鼠胃窦组织中 IRE1 (A)、GRP78 (B)、JNK Mrna (C) 的表达

Figure 4 Expression of IRE1 (A), GRP78 (B) and JNK Mrna (C) in rat gastric sinus tissue

液,剪碎组织,置碎冰上裂解 10 min;收集裂解液,离心后,取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白的浓度。在 Loding buffer 中变性 15 min,经 SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂牛奶室温孵育 2 h 后。在 4 °C 下与一抗 β -actin (1 : 100000)、Bcl-2 (1 : 2000)、Bax (1 : 5000) 孵育过夜,然后与生物素化山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 5000) 在室温下孵育 2 ~ 3 h。将 PVDF 膜平铺于曝光板,滴加 ECL 显影液,反应 1 min 后,将曝光板移入化学发光凝胶成像仪暗室,适当调整曝光

时间。用凝胶图像分析成像系统进行扫描分析,结果以目的蛋白 (β -actin) 的相对表达量表示。由图 5 可知:与空白组比较,模型组大鼠胃窦组织中 Bcl-2 蛋白的表达显著下降 ($P < 0.01$),给药后,阳性组、枳实生品组和枳实麸炒品组的 Bcl-2 蛋白表达均有所上升,但仅枳实麸炒品组具有显著性 ($P < 0.05$);与空白组比较,模型组大鼠的 Bax 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,阳性组和枳实麸炒品组大鼠的 Bax 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$)。

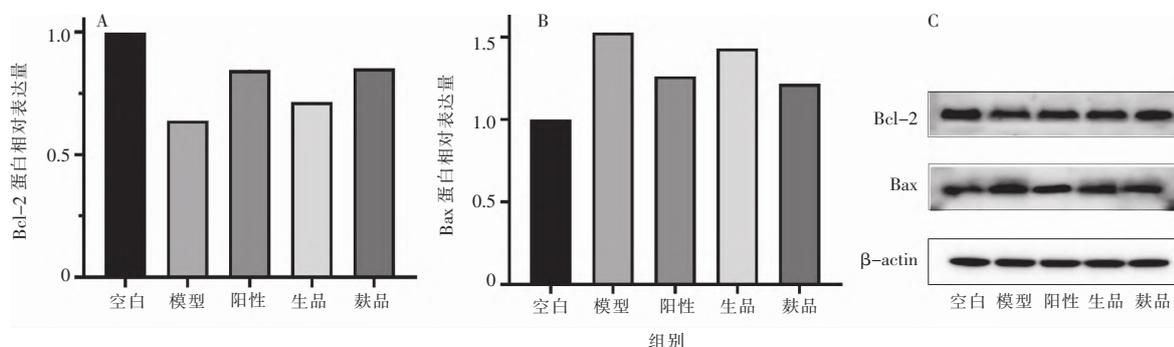


图5 大鼠胃窦组织中 Bcl-2 (A)、Bax (B) 蛋白的表达和蛋白条带图 (C)

Figure 5 Protein expression of Bcl-2 (A) and Bax (B) and protein bands (C) in rat gastric sinus tissue

1.2.8 统计分析 实验数据用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间采用单因素方差分析,方差齐用 LSD 检验,方差不齐用 Tamhane T2 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 讨论

胃肠动力障碍是功能性消化不良 (FD) 的重要发病机制之一,改善胃肠动力是针对 FD 治疗的有效方法之一,胃肠激素的分泌是影响胃肠动

力的重要因素^[4]。胃泌素由胃窦及十二指肠近端空肠中G细胞分泌,对胃肠道黏膜有一定的保护作用,还可促进幽门舒张,刺激胃肠道平滑肌收缩,进而增加胃肠道运动。FD患者血清中胃泌素水平较正常人低,而使用促胃泌素分泌药可缓解FD的相关症状^[5]。由于“郭海军夹尾刺激法”的单一夹尾刺激造模周期长且不稳定,故课题组对其加以改进(夹尾、禁食禁水、强迫游泳)复制FD大鼠模型。造模21d后,模型组大鼠的胃排空率、小肠推进率、血清中胃泌素的含量较空白组的显著下降,HE染色表明:大鼠的胃窦无明显器质性病理变化,与文献记载相似^[6],表明FD大鼠模型复制成功,大鼠有明显的胃肠动力障碍。给药14d后,枳实麸炒前后给药对FD大鼠均有较好的治疗效果,麸品效果更佳。内质网是负责蛋白质加工、合成及转运的细胞器。当内质网内蛋白质出现错误折叠、大量堆叠时会引起内质网应激,此时细胞会启动未折叠蛋白反应(UPR),清除错误蛋白,使机体恢复平衡,当错误蛋白质过多或应激程度过重时,机体通过UPR无法完全清除错误蛋白质,细胞会启动自动凋亡,避免错误蛋白表达,诱发疾病^[7]。IRE1是内质网膜表面的糖蛋白,生理状态下与内质网信号分子GRP78紧密结合成非活性化合物,在UPR发生时,其与GRP78解离,使细胞内游离的GRP78表达增加。持续内质网应激状态下,IRE1分子的酶结构域肿瘤坏死因子受体相关因子2(TRAF2)及凋亡信号调节激酶1(ASK1)共同形成IRE1-TRAF2-ASK1复合物,从而激活下游JNK通路,调控Bcl-2及Bax的表达,介导细胞凋亡^[8]。文中结果显示:模型组大鼠IRE1、GRP78、JNK的表达显著增加,表明FD大鼠胃窦出现内质网应激现象,且其持续时间过长或程度严重,进一步活化下游的JNK通路;且FD大鼠胃窦中Bcl-2蛋白表达下降,Bax蛋白表达增加,结合前期相关文献研究,推测FD大鼠胃窦出现了细胞凋亡现象。给予枳实生品及麸品治疗后,发现FD大鼠内质网应激现象显著减轻;Bcl-2蛋白分泌增加,Bax

蛋白分泌减少,可一定程度抑制细胞凋亡,且麸品效果更佳。综上,枳实麸炒前后均能提高FD大鼠的肠推进率、胃排空率及血清中胃泌素的含量,显著改善FD大鼠胃肠动力,与中医记载的枳实功效一致,其作用机制可能与抑制IRE1/GRP78/JNK通路的过度激活,调节Bcl-2、Bax蛋白的表达,从而抑制细胞凋亡有关。与模型组比较,Bcl-2、Bax蛋白的表达,生品枳实无统计学差异,麸品枳实有显著差异($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),且整体来看,麸品枳实对于FD大鼠的治疗效果更优,这可能与枳实麸炒前后化学成分的变化相关。因此,研究拟进一步探究枳实麸炒前后产生药效差异的物质基础,为枳实治疗FD大鼠作用机制的深入研究及其在功能性消化不良中的应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 朱滢,孙超,陈洁,等. 功能性消化不良发病机制及治疗的研究进展[J]. 中华消化病与影像杂志,2020,10(6):272-278.
- [2] 彭芳芳,林桂梅,臧彬如. 基于UPLC-Q-TOF-MS^E技术分析麸炒前后枳实及其辅料麦麸化学成分的差异[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(24):144-152.
- [3] 陶睿智,顾任钧,夏雅雯,等. 功能性消化不良动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报,2022,30(2):283-290.
- [4] 孙静莹,王婷,徐瑶,等. 焦山楂及其焦香气味协同对食积大鼠消化液及脑肠肽的影响[J]. 华西药学杂志,2022,37(1):32-36.
- [5] 周丽,王丹,潘小丽,等. 电针治疗肝胃不和型功能性消化不良的临床疗效及对血清胃泌素、胃动素水平的影响[J]. 实用医学杂志,2020,36(4):538-542.
- [6] 王煜姣,凌江红,张钰琴,等. 复合病因造模法制备功能性消化不良大鼠模型[J]. 世界华人消化杂志,2014,22(2):210-214.
- [7] 吴震宇,张声生,张恒玉,等. 简述功能性消化不良动物模型的建立与评价方法[J]. 世界华人消化杂志,2015,23(32):5190-5195.
- [8] 夏元平,王立花,樊燕蓉. 细胞凋亡与内质网应激机制[J]. 药学与临床研究,2010,18(3):291-293.

收稿日期:2022-04-21