

· 基础研究 ·

脾虚型功能性消化不良大鼠胃组织 GRP78/BiP 蛋白表达及脾虚 1 号方干预研究

吕 林¹ 王凤云¹ 唐旭东¹ 黄穗平² 王 静² 马祥雪¹ 尹晓岚³ 石啸双³

摘要 目的 探讨脾虚型功能性消化不良(FD)大鼠胃组织 GRP78/BiP 蛋白表达及脾虚 1 号方的干预作用。**方法** 70 只 10 日龄雄性 SD 大鼠随机分为正常组(10 只)、FD 模型组(10 只)、脾虚型 FD 模型组(50 只)。正常组给予 2% 蔗糖溶液灌胃,0.2 mL/d,连续 6 天;FD 模型组、脾虚型 FD 模型组给予 0.1% 蔗糖碘乙酰胺溶液灌胃,0.2 mL/d,连续 6 天。脾虚型 FD 模型组正常饲料喂养至 6 周龄后叠加改良小平台法,连续 14 天。造模结束后随机分为脾虚型 FD 模型组,西药组,中药低、中、高剂量组,每组各 10 只,连同正常组、FD 模型组,每天分别给予蒸馏水 1 mL/100 g、多潘立酮 0.3125 mg/100 g、脾虚 1 号方 0.1275、0.255、0.51 g/100 g,灌胃 14 天。采用 Western blot 和免疫组化方法检测胃窦组织 GRP78/BiP 蛋白表达量。**结果** 与正常组比较,脾虚型 FD 模型组大鼠胃窦黏膜 GRP78/BiP 蛋白光密度值和蛋白灰度值均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与脾虚型 FD 模型组比较,中药低剂量组大鼠胃窦黏膜 GRP78/BiP 蛋白表达量降低,而中药中剂量组大鼠胃窦组织 GRP78/BiP 蛋白灰度值降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 脾虚型 FD 大鼠胃窦 GRP78/BiP 蛋白表达升高,存在内质网应激现象,脾虚 1 号方能够减少 GRP78/BiP 蛋白的表达,减轻内质网应激现象的发生。

关键词 内质网应激;葡萄糖调节蛋白 78;免疫球蛋白重链结合蛋白;功能性消化不良;脾虚证;脾虚 1 号方

Protein Expression of GRP78/BiP in Gastric Tissue of Functional Dyspepsia Rats with Pi Deficiency Syndrome and Intervention Study on Pixu 1 Recipe LU Lin¹, WANG Feng-yun¹, TANG Xu-dong¹, HUANG Sui-ping², WANG Jing², MA Xiang-xue¹, YIN Xiao-lan³, and SHI Xiao-shuang³
1 Department of Digestion, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Institute of Spleen and Stomach Diseases of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100091); 2 Department of Digestion, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (501015); 3 Graduate School, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700)

ABSTRACT Objective To observe the protein expression of GRP78/BiP in gastric tissue of functional dyspepsia (FD) rats with Pi deficiency syndrome (PSD) and the intervention by Pixu 1 Recipe (PX1R). **Methods** Totally 70 ten-day-old male SD rat pups were randomly divided into the normal control group ($n=10$), the FD model group ($n=10$), the FD PSD model group ($n=50$). Rats in the normal control group were administered 2% sucrose solution (0.2 mL per day) by gastrogavage. Rats in the FD model group and the FD PSD model group were administered with 0.1% Iodoacetamide sucrose solution (0.2 mL per day) by gastrogavage. The medication lasted for all for 6 successive days. Rats in the FD PSD model group were normally fed till they were 6 weeks old, and then they received modified multiple platform method (MMPM) for 14 successive day. After modeling rats were randomly divided into FD PDS model group,

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2013CB531703);国家自然科学基金资助项目(No. 81503567);中国博士后科学基金资助项目(No. 2015M1227, 2016T90195)

作者单位:1.中国中医科学院西苑医院消化科/北京市中医脾胃病研究所(北京 100091);2.广东省中医院消化科(广州 501015);3.中国中医科学院研究生院(北京 100700)

通讯作者:唐旭东, Tel: 010-62835678, E-mail: txdy@sina.com.cn

DOI: 10.7661/j. cjim. 20171129. 291

Western medicine (WM) group, low, mid, and high dose PX1R group, 10 in each group. Rats in the normal group were administered with $1 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ distilled water by gastrogavage. Those in the WM group were administered with $0.3125 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Domperidone by gastrogavage. Those in low, mid, and high dose PX1R groups were administered by gastrogavage with $0.1275 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $0.255 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $0.51 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ PX1R, respectively. All medication lasted for 14 days. GRP78/BiP protein expressions in gastric antrum tissues were detected by Western blot and immunohistochemistry. Results Compared with the normal group, the optic value and gray value of GRP78/BiP protein increased in the FD PSD model group ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with the FD PSD model group, the amount of GRP78/BiP protein expressions decreased in the low dose PX1R group. But as compared with the FD PSD model group, the gray value of GRP78/BiP protein decreased in the mid dose PX1R group ($P < 0.05, P < 0.01$). Conclusions GRP78/BiP protein expression of gastric antrum tissue increased in FD PSD model rats. Endoplasmic reticulum stress (ERS) existed in the PSD FD rats. PX1R could reduce the expression of GRP78/BiP protein and attenuate ERS.

KEYWORDS endoplasmic reticulum stress; glucose regulated protein 78kD; immunoglobulin heavy chain binding protein; functional dyspepsia; Pi deficiency syndrome; Pixu Recipe

脾虚证的现代研究起于 20 世纪 70 年代末的脾虚证动物模型研究,随后涉及到消化系统、能量代谢、免疫功能、神经内分泌系统、微循环系统、血液流变学系统、微量元素含量等方面,虽然取得了很多人可喜的成果,但是对于脾虚证本质的研究仍然困扰了广大中医工作者。笔者先前从内质网功能探讨内质网与中医“脾主运化、统血”理论科学内涵,认为内质网与中医脾的藏象功能联系最大,提出了内质网应激是脾虚的本质^[1],本实验以脾虚型功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)大鼠模型为研究对象,对内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)中的分子调节蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78kD, GRP78)和健脾中药脾虚 1 号方对 GRP78 的干预进行了研究。

材料与方法

1 动物 SPF 级 Spargue-Dawley 雄性乳鼠 70 只,7 日龄,带母鼠,每只母鼠带 10 只幼鼠,为其提供母乳。购进动物先进行 3 天适应性饲养。40 W 日光灯照射(8:00—20:00),室内温度控制在 $22.0 \sim 24.0^\circ\text{C}$,保持安静。常规鼠类饲料喂养母鼠,自由饮水。实验动物均由斯贝福(北京)实验科技有限公司提供。许可证号:SYXK(京)2013-0012,合格证号:11401500004829。本实验遵守国家有关实验动物保护与使用准则。

2 试剂及仪器 兔抗 GRP78/BiP 多克隆抗体,型号:ab21685,艾博抗(上海)贸易有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG,型号:Sc-2004,圣克鲁斯生物技术公司;超纯 RNA 提取试剂盒,型号:Cat# CW0581,

CWbio.Co.Ltd;HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒,型号:Cat# CW0744, CWbio.Co.Ltd;UltraSYBR Mixture(With ROX),型号:Cat# CW0956, CWbio.Co.Ltd;DNase 1,型号:Cat# CW2090, CWbio.Co.Ltd;5x RNA Loading Buffer,型号:Cat# CW0611A, CWbio.Co.Ltd;涡旋振荡仪,型号:QL-902,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;分光光度计,型号:NANODROP 2000,赛默飞世尔科技公司;酶标仪,型号:MULTISKAN MK3,赛默飞世尔科技公司;电泳仪,型号:VE-180,上海天能科技有限公司;转膜仪,型号:VE-186,上海天能科技有限公司;凝胶成像仪,型号:6100,赛智科技(杭州)有限公司;Image-pro Plus 6 图形处理软件。

3 药物 碘乙酰胺:西奥格玛公司,批号:1001437587;蔗糖:拜尔迪公司,批号:0552C003;多潘立酮片:西安杨森制药有限公司,批号:141124263;脾虚 1 号方(香砂六君子汤加减):由中国中医科学院西苑医院药剂科制作。

4 动物分组 取 SPF 级雄性 SD 乳鼠 70 只,根据体重随机分成正常组(10 只)、FD 模型组(单模型组,10 只)、脾虚型 FD 模型组(双模型组,50 只)。造模结束后,将脾虚型 FD 大鼠又随机分为双模型组(10 只)、多潘立酮组(10 只)、脾虚 1 号方低剂量组(10 只)、脾虚 1 号方中剂量组(10 只)、脾虚 1 号方高剂量组(10 只)。

5 动物造模 参照参考文献[2]方法,出生 10 日 FD 模型组和脾虚型 FD 模型组乳鼠,每天给予 0.1% 蔗糖碘乙酰胺溶液灌胃,0.2 mL/只,连续灌胃 6 天;大鼠 3 周龄时,剔除母鼠,分笼,每笼 5 只,正常鼠

饲料喂养。出生 43 天脾虚型 FD 模型组大鼠叠加改良小平台法。

改良小平台法^[3]:向小平台站立箱水槽中注水,水温控制在 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,注水量以水面达到小平台台面下 2.0 cm 为宜。大鼠在小平台上可以自由活动,一旦进入睡眠状态就会因为肌肉舒张、松弛而落入水中,不能休息,以此造成大鼠劳倦。每天 17:00–7:00 进行小平台站立,持续 14 h,连续 14 天。

6 给药方法 脾虚 1 号方高、中、低剂量组按照大鼠用药剂量 = $\text{g}/60 \text{ kg} \times 6.25$ 公式计算,60 kg 成人使用脾虚 1 号方的原生药量为 125 g,对应大鼠生药用量为: $125 \text{ g}/60 \text{ kg} \times 6.25 = 1.3 \text{ g}/100 \text{ g}$,按照 1 g 颗粒剂含有 5.1 g 生药计算,每只大鼠灌胃给药量为 0.255 g/100 g,按照每只大鼠 100 g 灌胃 1 mL 溶液计算,中剂量每天每只大鼠灌胃 0.255 g/100 g、低剂量为 0.1275 g/100 g、高剂量为 0.51 g/100 g,每天 1 次;按照多潘立酮成人每次 10 mg,每天 3 次,60 kg 成人使用量是 30 mg/60 kg,SD 大鼠使用量为: $30 \text{ mg}/60 \text{ kg} \times 6.25 = 0.3125 \text{ mg}/100 \text{ g}$;正常组、单模型组、双模型组灌服蒸馏水量为 1 mL/100 g,每天上午灌胃给药 1 次,药物干预自小平台站立结束后,即出生第 56 天开始,连续用药 14 天。

7 取材 每组取 6 只大鼠,在末次给药禁食不禁水 12 h,麻醉前 1 h 称重,7% 水合氯醛(0.5 mL/100 g)麻醉开腹,剪取胃窦组织约 1.0 cm × 1.0 cm 大小,4 °C 生理盐水冲洗,滤纸吸干,放入液氮中,然后转移到 -80 °C 冰箱中保存待测。另剪取胃窦组织约 1.0 cm × 1.0 cm,以 4 °C 生理盐水冲洗,滤纸吸干后,置入 4% 多聚甲醛固定液中,脱水,石蜡包埋,切片,备用。

8 检测指标及方法

8.1 Western blot 检测 GRP78/BiP 蛋白表达 将胃窦样本低温研磨,加入 RIPA 裂解液,碧云天 BCA 工作液于紫外分光光度仪上测定蛋白浓度。样品上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),半干电转膜仪转膜。封闭后按照一抗:封闭液 = 1:10 000 比例配置一抗孵育液,4 °C 过夜。洗膜 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗兔抗体,振荡。将 PVDF 膜于室温下振荡温育。ECL 显色,X 线胶片曝光,经显影、定影、扫描后观察结果。应用 Quantity one 软件对扫描图像的目的条带进行吸光度分析,各目的条带与 GAPDH 的吸光度比值为目的蛋白的相对表达量。

8.2 免疫组化法(免疫酶细胞化学技术)测定大鼠胃窦组织中 GRP78/BiP 表达量 取胃窦组织石蜡切

片常规脱蜡水化,PBS(pH 7.4)冲洗 3 min × 3 次;滴加 50 μL 过氧化酶阻断溶液,室温孵育 10 min;PBS 冲洗 3 min × 3 次;滴加 50 μL 一抗,4 °C 过夜,PBS 冲洗 3 min × 3 次;滴加 50 μL 生物素标记的二抗,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 min × 3 次;滴加 5 μL 链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 min × 3 次;DAB 显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Image-pro Plus 6 图形处理软件分析,高倍显微镜(40 × 10)下观察结胃窦组织横断面固有层单位面积上 GRP78/BiP 的表达量,每张切片随机观察 5 个视野,分别统计,然后求取每组大鼠 GRP78/BiP 表达量的平均光密度值。

9 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析时先进行正态性检验,然后进行单因素方差分析。若满足方差齐性,用 LSD 法和 Dunnett 进行分析;若方差不齐,则用 Tamhane's T2 进行分析。不符合正态分布,用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 胃窦黏膜 GRP78/BiP 蛋白免疫组化检测结果(表 1,图 1) 各组胃窦黏膜层细胞胞浆可见棕黄色颗粒,与正常组比较,双模型组大鼠胃窦黏膜 GRP78/BiP 蛋白平均光密度值明显增加($P < 0.01$);给予药物干预后,与双模型组比较,各组胃黏膜 GRP78/BiP 蛋白平均光密度值均有所降低,其中单模型组、多潘立酮组和脾虚 1 号方低剂量组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与多潘立酮组比较,脾虚 1 号方低剂量组和单模型组胃黏膜 GRP78/BiP 蛋白平均光密度值降低,而脾虚 1 号方中、高剂量组则升高,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2 胃窦组织 GRP78/BiP 蛋白 Western blot 检测结果(图 2,表 2) 与正常组比较,双模型组大鼠胃窦组织 GRP78/BiP 蛋白表达量升高($P < 0.05$);给予

表 1 各组大鼠胃窦组织 GRP78/BiP 蛋白平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GRP78/BiP 蛋白平均光密度值
正常	6	0.008 5 ± 0.008 0
双模型	6	0.035 7 ± 0.022 9 [*]
多潘立酮	6	0.017 9 ± 0.005 3 [△]
脾虚 1 号方低剂量	6	0.015 8 ± 0.005 2 [△]
脾虚 1 号方中剂量	6	0.021 7 ± 0.022 1
脾虚 1 号方高剂量	6	0.022 8 ± 0.008 0
单模型	6	0.017 6 ± 0.006 4 [△]

注:与正常组比较, $P < 0.01$;与双模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

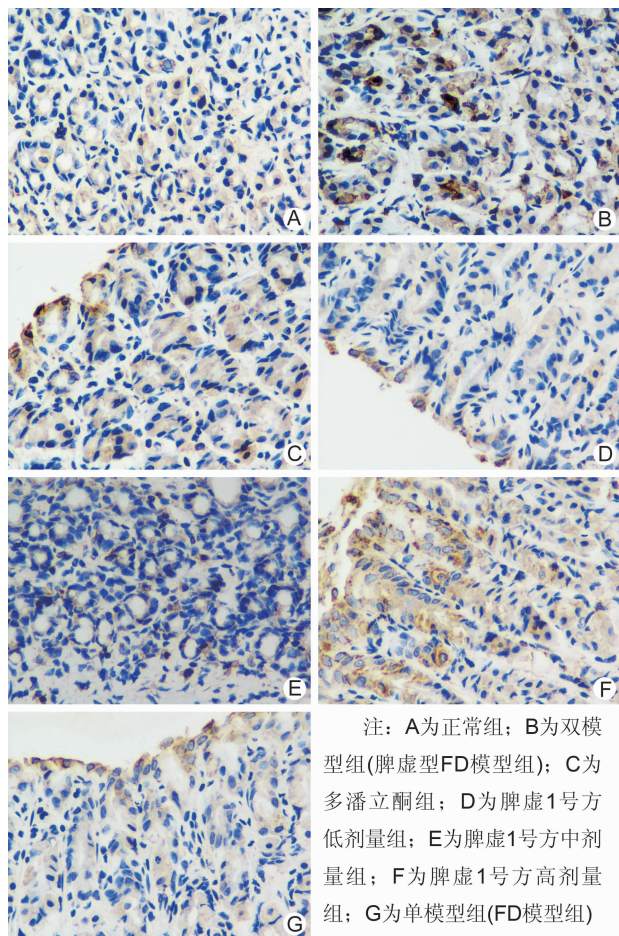
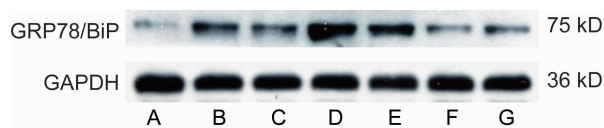


图 1 各组大鼠胃窦黏膜 GRP78/BiP 蛋白表达 (×400)



注:A 为脾虚 1 号方中剂量组;B 为脾虚 1 号方低剂量组;C 为正常组;D 为双模型组;E 为脾虚 1 号方高剂量组;F 为多潘立酮组;G 为单模型组

图 2 各组大鼠胃窦组织 GRP78/BiP 蛋白电泳图

表 2 各组大鼠胃窦组织 GRP78/BiP 蛋白灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GRP78/BiP 蛋白灰度值
正常	6	0.216 7 ± 0.010 33
双模型	6	0.610 0 ± 0.015 49*
多潘立酮	6	0.200 0 ± 0.015 49 [△]
脾虚 1 号方低剂量	6	0.320 0 ± 0.015 49
脾虚 1 号方中剂量	6	0.080 0 ± 0.017 89 [△]
脾虚 1 号方高剂量	6	0.383 3 ± 0.021 60 [▲]
单模型	6	0.248 3 ± 0.060 14

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与双模型组比较,[△] $P < 0.01$;与多潘立酮组比较,[▲] $P < 0.05$

药物干预后,与双模型组比较,各组大鼠胃窦组织 GRP78/BiP 蛋白表达量均降低,其中多潘立酮组、脾虚 1 号方中剂量组显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与多潘立酮组比较,脾虚 1 号方低、高剂量组升高,其中脾虚 1 号方高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$),而脾虚 1 号方中剂量组则降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

内质网是分泌性蛋白及膜蛋白合成和折叠的场所。蛋白质经过正确折叠和翻译后修饰才能运输到高尔基体进行加工并转运到细胞外。多种应激因素如紫外线照射、营养物质缺乏(氨基酸、葡萄糖或胆固醇缺乏)、缺氧、氧化应激、高浓度同型半胱氨酸、病毒、毒性物质(如重金属)等,以及内质网 Ca^{2+} 强烈释放剂、内质网 Ca^{2+} 三磷酸腺苷酶抑制剂、 Ca^{2+} 载体、蛋白质糖基化均可造成未折叠或错误折叠蛋白在内质网内蓄积以及 Ca^{2+} 平衡紊乱,引发 ERS^[4]。ERS 可分为 3 种类型:(1)未折叠或错误折叠蛋白质在内质网蓄积引发的未折叠蛋白质反应(unfolded protein response, UPR);(2)正确折叠的蛋白质在内质网过度蓄积激活细胞核因子 κB (NF- κB)引发的内质网过度负荷反应(ER-overload response, EOR);(3)胆固醇缺乏引发的固醇调节元件结合蛋白质(sterol regulatory element binding protein, SREBP)通路调节的反应^[5]。其中 UPR 可由 3 条独立的信号通路所诱导,包括活化转录因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)、肌醇需酶(inositol-requiring enzyme 1, IRE1)和蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)^[6]。这一系列信号网络转导途径,能提高蛋白质正确折叠能力、抑制蛋白质的产生和积聚、加速非功能性和隐含毒性蛋白降解,引发 ERS 相关基因的转录和加强内质网的自我修复能力。ERS 过强或持续时间过久,这些反应不足以恢复内质网稳态,则最终引起细胞凋亡^[7]。

GRP78 又称免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip),是位于内质网上重要的分子伴侣,属热休克蛋白 70 家族的一员,GRP78 分子及其 DNA 分子序列结构在许多生物物种中高度保守^[8]。它在蛋白质的折叠和转运过程及 ERS 反应中大量表达以维持内质网的稳定从而保护细胞发挥重要作用。在正常生理状态下,内质网腔区域的 3 个跨膜受体蛋白 PERK、IRE1 和 ATF6 与 GRP78/BiP 处于结合状态,形成稳定复合物,使它们

处于未激活状态。当细胞内质网中蛋白质折叠紊乱、积累大量未折叠或错误折叠蛋白质,发生 ERS 时,GRP78/BiP 作为内质网稳态感受器,与 3 种 UPR 效应器 PERK、IRE1 和 ATF6 解离,转而结合新生的未折叠蛋白。游离的 IRE-1、PERK 分别通过各自细胞质内结构域的二聚化和自身磷酸化而被激活;解离后的 ATF6 则转入高尔基体被蛋白酶水解成活性转录因子,继而诱导 ERS 下游信息的传递与相关基因的表达^[9,10]。GRP78/BiP 目前被认为是 ERS 和 UPR 的标志性蛋白^[11]。

GRP78/BiP 目前研究主要是针对器质性疾病,例如前列腺癌、乳腺癌、肺癌、黑色素瘤和结肠癌细胞等疾病中都是高表达^[12-14]以及糖尿病^[15]、肝损伤^[16]等疾病,而对于功能性疾病尚未涉及。中医脾是一个多系统的综合功能单位,涉及现代医学的消化吸收、水盐代谢、能量转化、血液、免疫及神经内分泌等多系统的综合功能单位。从 20 世纪 70 年代末开始,广大中医研究工作者进行大量的实验和临床研究,已发现至少 80 多种与脾虚证的相关指标,但有特异性且阳性率高的不多。脾虚证不会仅存在某一项指标的异常,起初表现为功能性疾病,但是随着脾虚证程度的加重,逐渐转变成器质性疾病。如何通过指标的量化来更准确地反映脾虚证的不同程度,真正反映脾虚证的本质值得我们去思考。

GRP78/BiP 蛋白作为一种保护性蛋白,其表达量增加能够减少内质网内未折叠或错误折叠蛋白的不断堆积,改善细胞环境,避免 ERS 进一步加重,最终导致细胞凋亡的发生;其表达量减少,提示 ERS 现象降低。为了进一步探讨中医脾虚证本质与 ERS 的关系,本研究在既往 FD 模型的基础上叠加了小平台站立,制作成脾虚型 FD 模型^[17]。研究结果显示 FD 模型组(单模型组),Western blot 和免疫组化法均出现 GRP78/BiP 蛋白表达较正常组增加,叠加小平台后脾虚证 FD 模型组(双模型组)GRP78/BiP 蛋白出现了更高水平的增加,并且与正常组比较均差异有统计学意义,提示功能性疾病也出现了 ESR 现象,并且中医脾虚证会进一步加重 ESR。GRP78/BiP 蛋白在 UPR 应激状态下大量表达以起到维持内质网的稳定和保护细胞的作用。在单模型组和双模型组均出现 GRP78/BiP 蛋白表达,是自身的一种调节机制。在这个过程中,功能性疾病由于应激因素导致了 ERS 发生,但是 GRP78 蛋白能够起到阻止 ERS 进一步向器质性疾病发展的关键作用。提示脾虚证存在不同轻重程度的区别,起初表现为功能性疾病,在功能性疾病阶段能够自身修复,

也就是减少发生 UPR,但是随着脾虚证程度的加重,细胞环境进一步受到应激作用刺激,ERS 持续或进一步加重,则启动细胞凋亡程序,逐渐转变成器质性疾病。脾虚 1 号方是西苑医院唐旭东教授在香砂六君子汤的基础上加川芎、延胡索、神曲、枳壳等药物组成,临床上治疗脾虚气滞证 FD 治疗有很好的疗效^[18,19]。给予药物干预后,结果显示各组 GRP78/BiP 蛋白表达量均较双模型组有不同程度的下降,其中在胃黏膜 GRP78/BiP 蛋白定位表达检测方面,与双模型组比较,多潘立酮组、脾虚 1 号方低剂量组差异有统计学意义;在 Western blot 检测方面,多潘立酮组、脾虚 1 号方中剂量组差异有统计意义。此外,多潘立酮组也存在 GRP78/BiP 蛋白表达量有所降低的现象,但是脾虚 1 号方中剂量组降低地程度更大,尽管两者之间差异无统计学意义,这提示中药健脾方能够改善细胞 ERS 程度,进而引起保护蛋白 GRP78/BiP 的减少。既往也有研究发现滋补脾阴方药能够增加脾阴虚痴呆大鼠模型脑组织 GRP78/BiP 蛋白表达量,增强内质网应激介导的未折叠蛋白反应的存活途径、抑制凋亡途径,改善大鼠的学习记忆能力^[20]。益气除痰方能够使肺癌移植瘤小鼠内质网应激蛋白 GRP78/BiP 表达下降,进而诱导肺癌细胞发生凋亡发挥抗癌作用^[21]。

脾虚证本质研究是中医脾胃学说理论体系中的一个热点。既往研究取得了不少令人瞩目成果,但也存在一些问题,尚未对脾虚证本质达成一致认识。本次研究从 ERS 角度探讨中医脾虚证本质,以 ERS 保护蛋白 GRP78/BiP 为研究对象,观察 FD 大鼠模型、脾虚型 FD 大鼠模型 GRP78/BiP 蛋白的表达及脾虚 1 号方的干预情况,发现中医脾虚证能够加重 ERS 现象,但是在功能性疾病阶段,机体能够通过升高 GRP78/BiP 蛋白表达量,减少未折叠或错误折叠蛋白在内质网内蓄积,以避免 ERS 进一步加重,引起细胞凋亡,导致器质性疾病的发生。健脾中药能够直接减少 ERS 发生,进而引起 GRP78/BiP 蛋白表达量降低,恢复细胞环境。这一研究结果丰富了脾胃学说的现代认识,为后续临床与基础研究提供了新方向。

参 考 文 献

- [1] 吕林,王风云,唐旭东,等.基于内质网功能探讨“脾主运化”“脾主统血”的科学内涵[J].中医杂志,2015,56(14):1174-1177.
- [2] Liu LS, Winston JH, Shenoy MM, et al. A rat model of chronic gastric sensorimotor dysfunction resulting from transient neonatal gastric irritation [J].

- Gastroenterology, 2008, 134(7): 2070–2079.
- [3] Suchecki D, Tufk S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat [J]. *Physiol Behav*, 2000, 68(3): 309–316.
 - [4] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2656–2664.
 - [5] Pahl HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(3): 683–701.
 - [6] Davenport EL, Morgan GJ, Davies FE. Untangling the unfolded protein response [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(7): 865–869.
 - [7] Volmer R, van der Ploeg K, Ron D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(12): 4628–4633.
 - [8] Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(19): 3702–3710.
 - [9] Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response [J]. *Mutat Res*, 2005, 569(1–2): 29–63.
 - [10] Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(3): 349–355.
 - [11] Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(8): 504–510.
 - [12] Daneshmand S, Quek ML, Un E, et al. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(10): 1547–1552.
 - [13] Zheng HC, Takahashi H, Li XH, et al. Over-expression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas [J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(7): 1042–1049.
 - [14] Dong D, Ni M, Li J, et al. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 498–505.
 - [15] Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(17): 3905–3915.
 - [16] Tamaki N, Hatano E, Taura K, et al. CHOP deficiency attenuates cholestasis induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(2): G498–G505.
 - [17] 刘晶, 李峰, 唐旭东, 等. 功能性消化不良脾虚证动物模型的制作及评价 [J]. *环球中医药*, 2015, 8(6): 701–705.
 - [18] 吕林, 唐旭东, 王静, 等. 四君子汤对功能性消化不良餐后不适综合征患者胃中液体食物分布的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(12): 4318–4323.
 - [19] Lv L, Wang FY, Ma XX, et al. Efficacy and safety of Xiangsha Liujuanzi Granules for functional dyspepsia: A multi-center randomized double blind placebo-controlled clinical study [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(30): 5589–5601.
 - [20] 战丽彬, 林海燕, 宫晓洋, 等. 滋补脾阴方药对脾阴虚痴呆大鼠脑组织内质网应激影响的研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2011, 13(6): 993–998.
 - [21] 李元滨, 杨建猛, 方若鸣, 等. 益气除痰方对肺癌移植瘤小鼠内质网应激蛋白 GRP78/BiP、caspase-12 的影响 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(11): 955–958.

(收稿: 2016–08–18 修回: 2017–11–15)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶