

· 基础研究 ·

基于“脑-肠轴”线粒体未折叠蛋白反应研究
济川煎对慢传输型便秘的作用机制梁星琛¹ 白璐璐¹ 周永学¹ 闫曙光¹ 周小燕²

摘要 **目的** 观察济川煎对慢传输型便秘 (STC) 大鼠海马神经元与结肠细胞线粒体未折叠蛋白反应 (UPRmt) 水平的影响, 结合“脑-肠轴”探讨补肾益精法治疗 STC 的作用机制。**方法** 60 只清洁级 SD 大鼠按随机数字法抽取 10 只为空白组, 余采用复方地芬诺酯 (15 mg/kg, 1 次/日) 灌胃 6 周复制 STC 模型, 造模成功后大鼠分为: 模型组、济川煎低、中、高剂量组、阳性药物组各 10 只。造模成功后空白组、模型组采用生理盐水等体积灌胃, 济川煎低 (8.64 g/kg, 1 次/日)、中 (17.28 g/kg, 1 次/日)、高 (34.56 g/kg, 1 次/日) 剂量组、阳性药物组 (莫沙必利 1.54 mg/kg, 1 次/日) 予以相应药物灌胃 2 周。观察各组大鼠首粒黑便排出时间; 取结肠组织 HE、AB-PAS 染色观察病理学变化; 取海马组织尼氏染色观察尼氏小体变化; 采用实时聚合酶链式反应 (RT-PCR)、免疫荧光法以及 Western Blot 检测结肠、海马组织中 HSP60、CLpP、CHOP、LON mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠首粒黑便排出时间延长 ($P<0.01$), 结肠组织肌层纤维断裂, 肌细胞核固缩、深染, 结缔组织疏松, 黏膜杯状细胞萎缩, 管腔内黏液大量减少, 海马组织中神经元数量减少, 结肠组织与海马组织中 HSP60、CLpP、CHOP、LON mRNA 相对表达与蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各治疗组结肠组织肌层纤维断裂、坏死减轻, 结缔组织紧密, 胞核饱满且无固缩, 黏膜杯状细胞及黏液分泌有不同程度恢复, 海马组织中神经元数量明显增多。各给药组结肠组织中 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON mRNA 相对表达显著降低 ($P<0.01$); 海马组织中 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON mRNA 相对表达有不同程度的降低 ($P<0.01$, $P<0.05$); 结肠组织中 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$)。**结论** 济川煎治疗 STC 的作用机制可能与调控结肠细胞、海马神经元的 UPRmt 以改善线粒体功能, 通过脑肠同治减轻结肠细胞的凋亡与衰老, 修复肠道平滑肌细胞损伤, 维持其对肠道动力的调节作用有关。

关键词 济川煎; 慢传输型便秘; 线粒体未折叠蛋白反应; 脑-肠轴

Mechanism of Jichuanjian for Treatment of Slow Transit Constipation Based on Brain-Gut Axis Mitochondrial Unfolded Protein Reaction LIANG Xing-chen¹, BAI Lu-lu¹, ZHOU Yong-xue¹, YAN Shu-guang¹, and ZHOU Xiao-yan² *1 Basic Medicine College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi (712046); 2 Tumor Department, Affiliated Hospital, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi (712000)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Jichuanjian (JCJ) on the levels of hippocampal neuron UPRmt and colon cell UPRmt in rats with slow transit constipation (STC), and to study the mechanism of treating STC by Shen tonifying essence replenishing method combined with "brain-gut" axis. **Methods** Ten rats were selected from 60 clean grade SD rats by random digit table, STC models were duplicated in the rest rats by intragastrically administered with Compound diphenoxylate (15 mg/kg, once per day). After successful modeling, the modeled rats were divided into model group, low dose JCJ group (8.64 g/kg), medium dose JCJ group (17.28 g/kg), high dose JCJ group (34.56 g/kg), and positive control group (Mosapride, 1.54 mg/kg), 10 in

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81273663); 陕西中医药大学校级科研课题 (No. 2020CX38)

作者单位: 1. 陕西中医药大学基础医学院 (陕西 712046); 2. 陕西中医药大学附属医院肿瘤科 (陕西 712000)

通讯作者: 周小燕, Tel: 029-32087708, E-mail: yu8108@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20211124.347

each group. Equal volum of normal saline was administered to rats in the blank group and the model group All medication was performed once per day for 2 successive weeks. The first black fecal passing time was observed in each group. The pathological changes of the colon tissue were observed by HE staining an AB-PAS. The changes of Nissl bodies were observed by taking the hippocampal tissue for Nissl staining. RT-PCR, immunofluorescence, and Western Blot were used to detect mRNA and protein expression levels of HSP60, CLpP, CHOP, and LON in the colon tissue and hippocampus. **Results** Compared with the blank group, the discharge time of the first black stool was significantly prolonged in the model group ($P<0.01$). HE staining showed muscle fiber rupture, necrosis, pyknosis and deep staining of muscle cell nuclei, loose connective tissue, and AB-PAS staining showed mucosal goblet cell atrophy, and mucus in the lumen greatly decreased. In the hippocampus, the number of Nissl bodies decreased significantly. Western Blot and mRNA test results showed HSP60, CLpP, CHOP, LON mRNA and protein expressions significantly increased in the colon tissue and the hippocampus ($P<0.01$). Compared with the model group, muscular fiber breakage, reduced necrosis, tight connective tissue, full nucleus and no pyknosis, mucosal goblet cells and mucus secretion were recovered to various degrees. In the hippocampus, the number of Nissl bodies increased significantly. The mRNA relative expressions of HSP60, CLpP, CHOP, and LON significantly decreased in the colon tissue of all medicated groups ($P<0.01$). The mRNA relative expressions of HSP60, CLpP, CHOP, and LON decreased to different degrees in the hippocampus of all medicated groups ($P<0.01$, $P<0.05$). The protein expressions of HSP60, CLpP, CHOP, and LON significantly decreased in colon tissue of all medicated groups ($P<0.01$). **Conclusions** JcJ for STC might be related with regulating the levels of hippocampal/neuron UPRmt to improve mitochondrial function. Meanwhile, it attenuated apoptosis and ageing of colon cells by treating both brain and gut, repaired intestinal SMC damage, thus maintaining its regulations of intestinal motility.

KEYWORDS Jichuanjian; slow transit constipation; mitochondrial unfolded protein response; brain-gut axis

慢传输型便秘 (slow transit constipation, STC) 属于功能性便秘之一, 主要表现为肠道内容物排出体内时间延缓, 约占便秘总发病率的 46%^[1]。该病的发生与年龄增长有一定联系, 老年人群已成为 STC 的主要发病群体^[2]。长期便秘不仅能引起大肠癌等胃肠疾病, 还会引发高血压等心脑血管疾病及老年痴呆等神经系统疾病, 是影响健康的巨大潜在危害^[3]。STC 发病机制复杂多样, 其中肠道平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 损伤引起的肠道动力紊乱是其发病的主要原因, 线粒体 (mitochondrion, MT) 功能失常导致的细胞凋亡和衰老是引起 SMC 损伤的重要因素, 而线粒体未折叠蛋白反应 (mitochondrial unfolded protein response, UPRmt) 是 MT 维持自身功能的重要通路^[4-6]。现代医学“脑-肠轴”学说的提出, 证实了大脑对肠道的调控作用, 从脑肠互动角度解释说明脑病与肠病的相关性, 这为研究济川煎通过脑肠同治治疗 STC 的作用机制提供了新的可能机制^[7]。本研究拟以脑-肠轴为基础, 通过观察补肾益精法对 STC 大鼠的组织病理改变及海马、结肠组织 UPRmt 相关基因热休克蛋白 60 (heat shock protein 60, HSP60)、酪蛋白线粒体基质缩氨酸酶蛋白水解亚基 (caseinolytic mitochondrial matrix

peptidase proteolytic subunit, CLpP)、线粒体 Lon 蛋白酶样蛋白 (mitochondrial Lon protease-like protein, LON)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP) 表达的影响, 旨在探讨其治疗 STC 新的分子机制。

材料与方法

1 动物 清洁级雄性老龄 SD 大鼠 60 只, 体重为 (400 ± 20) g, 购买于成都达硕实验动物有限公司, 合格证号: SCXK (川) 2015-030。在陕西中医药大学实验中心动物房适应性饲养 1 周, 室温 $(22 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, 昼夜交替规律, 自由饮水及摄食, 状况良好。本实验获得陕西中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准 (No. 2020DW-0308)。

2 药物 补肾益精法之代表方济川煎药物组成: 肉苁蓉 30 g 牛膝 15 g 当归 20 g 泽泻 10 g 枳壳 12 g 升麻 9 g, 统一购于陕西兴盛德中药饮片有限公司 (GMP 认证企业)。枸橼酸莫沙必利分散片, 由成都康弘药业制造, 批号: H20031110。

3 主要试剂及仪器 主要试剂: 兔源 GAPDH (武汉博士德生物, 批号: BA2913); 兔源 HSP60 抗

体(北京博奥森,批号:bs-0191R);兔源 CHOP 抗体(北京博奥森,批号:bs-20669R);兔源 CLPP 抗体(武汉博士德生物,批号:A01117-1);兔源 LON 抗体(武汉博士德生物,批号:A03808-2);

主要仪器:石蜡切片机(型号:RM2235,德国莱卡公司);匀浆仪(型号:T10basic,德国 IKA 公司);荧光定量 PCR 仪(型号:ABI PRISM7500,美国应用生物系统公司);倒置荧光数码显微镜(型号:IX73-U,日本 Olympus 公司);全湿转膜系统及 SDS-PAGE 电泳(型号:JY-ZY6,美国 Bio-Rad 公司);精微紫外分光光度计(型号 723,美国 Thermo 公司)。

4 分组及 STC 大鼠模型建立 60 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 6 组,分别为:空白组、模型组、济川煎低剂量组(济川煎低组)、济川煎中剂量组(济川煎中组)、济川煎高剂量组(济川煎高组)、阳性药物组,每组各 10 只。空白组大鼠予以生理盐水等体积灌胃,其余 5 组大鼠每日予以复方地芬诺酯灌胃(15 mg/kg),6 周后给每组大鼠灌墨汁,模型组大鼠便粒小、便质干、数量较少,首粒黑便排出时间均显著延长($P<0.01$),提示已成功复制老年 STC 大鼠模型^[8]。

5 给药方法 济川煎水煎剂的制备:水煎后浓缩至(3.456 g/mL)保存备用。按照成人 70 kg 体重等倍剂量(低剂量:8.64 g/kg)、2 倍剂量(中剂量:17.28 g/kg)、4 倍剂量(高剂量:34.56 g/kg)分别进行灌胃,每日 1 剂。莫沙必利混悬液制备:阳性药物选用枸橼酸莫沙必利分散片,粉碎后加入蒸馏水配制为 0.154 mg/mL 混悬液,保存备用。造模结束后,空白组和模型组大鼠予以生理盐水灌胃(10 mL/kg,1 次/日);阳性药物组予以莫沙必利灌胃(1.54 mg/kg,1 次/日);济川煎低、中、高剂量组分别予以济川煎低剂量灌胃(8.64 g/kg,1 次/日)、济川煎中剂量灌胃(17.28 g/kg,1 次/日)、济川煎高剂量灌胃(34.56 g/kg,1 次/日)。共给药 2 周。造模过程中大鼠死亡 8 只(其中空白组死亡 1 只,模型组死亡 2 只,济川煎低剂量组死亡 1 只、济川煎中剂量组死亡 2 只、济川煎高剂量组死亡 1 只、阳性药物组死亡 1 只),为方便统计,每组取 8 只进行后续实验。造模成功后,后续实验过程中,大鼠死亡 7 只(其中模型组死亡 2 只,济川煎低剂量组死亡 2 只、济川煎中剂量组死亡 1 只、济川煎高剂量组死亡 1 只、阳性药物组死亡 1 只),每组取 6 只进行实验取材以及数据统计。

6 标本采集及处理 给药结束后,大鼠禁食不

禁水 24 h,称重,用 10%水合氯醛 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉。开胸后在心尖部位插入灌注针,连接注射器,在右心耳处剪开放血,用生理盐水经左心室快速灌注。约 5 min 后,观察到肝脏呈灰黄色,停止灌注。于冰上快速断头开颅取脑,每组 5 只大鼠取出全脑放入 4%多聚甲醛固定,预备包埋切片,剩余 5 只大鼠用玻璃分针小心剥离海马组织置于预冷无酶 EP 管,置于 -80 ℃冰箱备用,预备蛋白水平检测。打开腹腔后从肛门往上捋出整个结肠,剪下结肠,立即用 PBS 缓冲液漂洗掉污物。剪取中间约 3 cm 后分 3 段,其中近肛门端 1 cm 直接固定,预备包埋切片。将其余结肠组织置于预冷无酶 EP 管,置于 -80 ℃冰箱备用,预备 mRNA 及蛋白水平检测。

7 检测指标及方法

7.1 首粒黑便观测 在造模末次给药后,隔日用 2 mL 墨汁灌胃并将灌胃大鼠单独放在代谢笼内,从灌入墨汁后立刻记录其首粒黑便排出时间以判断模型是否复制成功。

7.2 组织病理形态学观察 结肠组织样本固定、脱水、包埋、切片后,进行 HE、AB-PAS 染色,在显微镜下观察并照相。海马组织样本固定、脱水、包埋、切片后,进行尼氏染色,在显微镜下观察并照相。

7.3 免疫荧光染色检测 UPRmt 相关基因表达 结肠组织固定、脱水、包埋、切片后进行荧光染色,经脱蜡、抗原修复、封闭后滴加一抗(稀释比例均为 1:200,抗体稀释液稀释),置于 4 ℃冰箱过夜,滴加绿荧光二抗 FITC(稀释比例为 1:100, PBS 稀释),室温孵育 1 h,滴加 DAPI 染色液,室温孵育 10 min,抗荧光衰减剂封片,荧光显微镜下观察结肠组织的 UPRmt 相关基因的表达变化情况。

7.4 采用 RT-PCR 检测 UPRmt 相关基因表达 在放入 100 mg 组织样本的 2 mL 无 RNA 酶 EP 管中加入 700 μ L Trizol,进行匀浆,匀浆后补加 300 μ L Trizol,用 Trizol 法提取总 RNA,测定其浓度,引物:由上海生工生物工程有限公司设计合成,引物序列见表 1。

逆转录 cDNA 反应体系为 50 μ L,根据试剂盒说明书进行操作,逆转录反应条件为:37 ℃,15 min;85 ℃,5 s;4 ℃,10 min。RT-PCR 反应体系为 20 μ L,反应条件为:Step 1:95 ℃,30 s;Step 2:PCR 反应;GOTO:39(40 Cycles);95 ℃,5 s;60 ℃,34 s。以 GAPDH 为内参照,所有反应体系均为 3 复孔。计算标准化后的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值来表示 UPRmt 相关基因表达含量。

表 1 引物序列

引物	序列 (5' -3')	引物长度 (bp)
HSP60-F	GCAGAGTTCCTCAGAGGTTGGC	22
HSP60-R	CCCCAGCAGCATCCAGTAAAGC	22
CLpP-F	TCTTGGTCCACCCGCTCAG	20
CLpP-R	AGGGTCCGCTGGTGTCTGTG	19
CHOP-F	GTCACAAGCACCTCCCAAAGCC	22
CHOP-R	CGCACTGACCACTCTGTTTCCG	22
LON-F	GAGGGCGGCGTGGAGGAC	18
LON-R	GATGAGCGGCAGGTGAGGAAAC	22

7.5 采用 Western Blot 检测 UPRmt 相关基因表达 1.5 mL EP 管中称取约 100 mg 大鼠结肠组织, 加入组织高效 RIPA 裂解液进行匀浆, 将样品放入 4 ℃离心机 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液即提取组织总蛋白, 测定其浓度, 蛋白变性后保存备用。根据试剂盒说明书配胶, 进行电泳、转膜、封闭和抗体孵育操作后, 将新鲜配置好的 ECL 超敏发光液 (A 液与 B 液等比例配制), 均匀滴加于膜上, 采用全自动凝胶成像系统曝光拍照。用 ImageJ 图像分析系统对蛋白灰度值进行分析。

8 统计学方法 数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计处理, 定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析, 当满足方差齐时使用 Bonferroni 检验, 方差不齐使用 Tamhane T2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠首粒黑便排出时间比较 (表 2) 空白组大鼠粪便颗粒饱满较大、质地较软且有光泽, 数量适中, 与空白组比较, 各造模组大鼠便粒小、便质干、数量较少, 首粒黑便排出时间均延长 (P<0.01)。

表 2 各组大鼠首粒黑便排出时间比较 (min, $\bar{x} \pm s$)

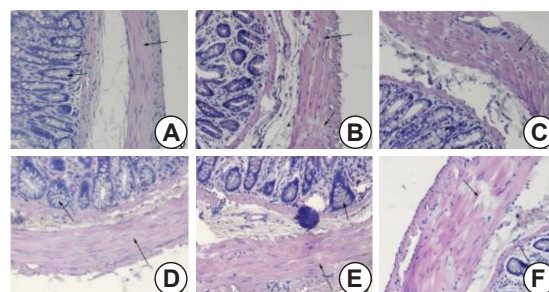
组别	n	首粒黑便排出时间
空白	8	270.00 ± 19.27
模型	8	402.50 ± 34.12*
济川煎低	8	398.75 ± 33.99*
济川煎中	8	417.50 ± 40.27*
济川煎高	8	401.25 ± 37.96*
阳性药物	8	408.75 ± 39.07*

注: 与空白组比较, *P<0.01

2 各组大鼠组织病理形态学变化

2.1 各组结肠组织 HE 染色比较 (图 1) 与空白组比较, 模型组出现肌层纤维断裂、坏死, 肌细胞核固缩、深染, 结缔组织疏松, 有较多炎性细胞浸润, 黏膜层内可见淋巴小结, 隐窝变形、减少或消失; 与

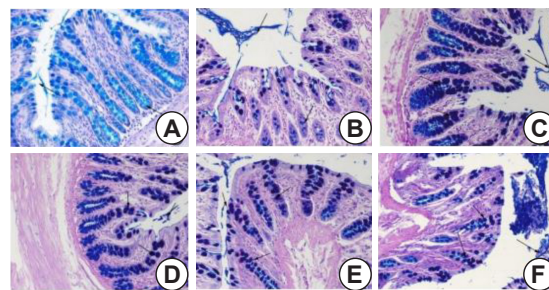
模型组比较, 各治疗组的肌层纤维断裂、坏死恢复, 结缔组织紧密, 炎性细胞减少, 胞核饱满且无固缩, 隐窝明显增多。



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为济川煎低组; D 为济川煎中组; E 为济川煎高组; F 为阳性药物组; 箭头示肌纤维断裂, 结缔组织疏松和炎性细胞浸润

图 1 各组大鼠结肠 HE 染色 (×200)

2.2 结肠组织 AB-PAS 染色 (图 2) 与空白组比较, 模型组黏膜杯状细胞出现萎缩, 管腔内黏液大量减少; 与模型组比较, 各治疗组黏膜杯状细胞及黏液分泌较模型组均见不同程度恢复。

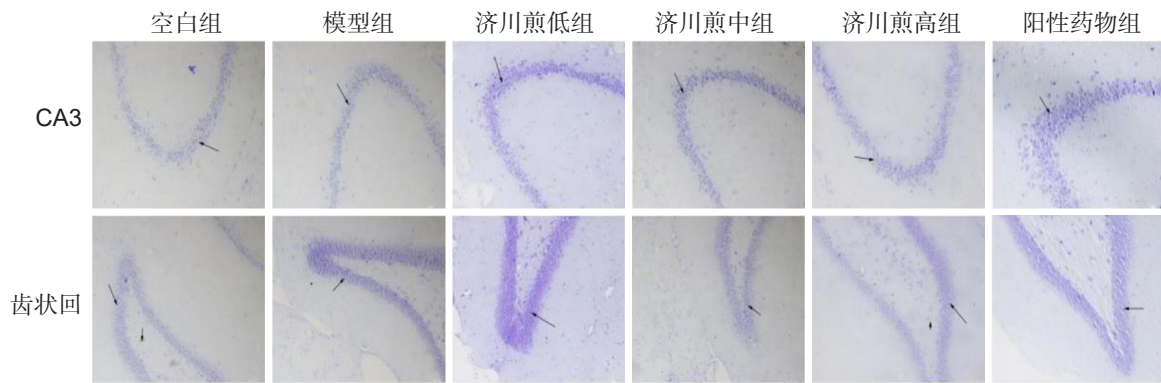


注: A 为空白组; B 为模型组; C 为济川煎低组; D 为济川煎中组; E 为济川煎高组; F 为阳性药物组; 箭头示结肠黏膜杯状细胞

图 2 各组大鼠结肠 AB-PAS 染色 (×200)

2.3 各组海马组织尼氏染色比较 (图 3) 与空白组比较, 模型组海马 CA3 区和齿状回神经元数量明显减少, 形态不规则, 胞体萎缩, 细胞核深染、固缩, 尼氏小体数量减少; 与模型组比较, 各治疗组海马 CA3 区和齿状回神经元数量明显增多, 形态规则, 排列整齐, 胞体饱满, 细胞核大而圆, 尼氏小体数量明显增多。

3 各组大鼠结肠组织 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON 表达比较 (表 3, 图 4) 结肠组织中 HSP60 主要表达在浆膜层、纵行肌层及黏膜层, CHOP 主要表达在环行肌、纵行肌、肌间神经丛及黏膜层, CLpP 主要表达在浆膜层、肌层、肌间神经丛及黏膜层内细胞的细胞膜和细胞浆, LON 主要表达在黏膜层及黏膜下层内细胞的细胞膜和细胞浆。与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织中 HSP60、CLpP、CHOP



注：箭头示海马 CA3 区和齿状回神经元

图 3 各组大鼠海马尼氏染色 (×100)

表 3 大鼠结肠组织 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HSP60	CLpP	CHOP	LON
空白	5	4.34 ± 0.40	5.10 ± 0.60	5.12 ± 0.75	4.07 ± 0.57
模型	5	20.64 ± 1.76*	21.04 ± 1.48*	19.80 ± 1.01*	21.31 ± 1.66*
济川煎低	5	6.11 ± 0.64 [△]	3.58 ± 0.65 [△]	3.61 ± 0.81 [△]	7.71 ± 1.05 [△]
济川煎中	5	8.55 ± 0.58 [△]	10.47 ± 0.89 [△]	5.22 ± 0.38 [△]	7.92 ± 0.43 [△]
济川煎高	5	12.74 ± 0.60 [△]	5.89 ± 0.65 [△]	4.99 ± 0.47 [△]	7.94 ± 1.07 [△]
阳性药物	5	12.04 ± 0.98 [△]	4.22 ± 0.83 [△]	5.53 ± 0.88 [△]	14.79 ± 0.76 [△]

注：与空白组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.01$

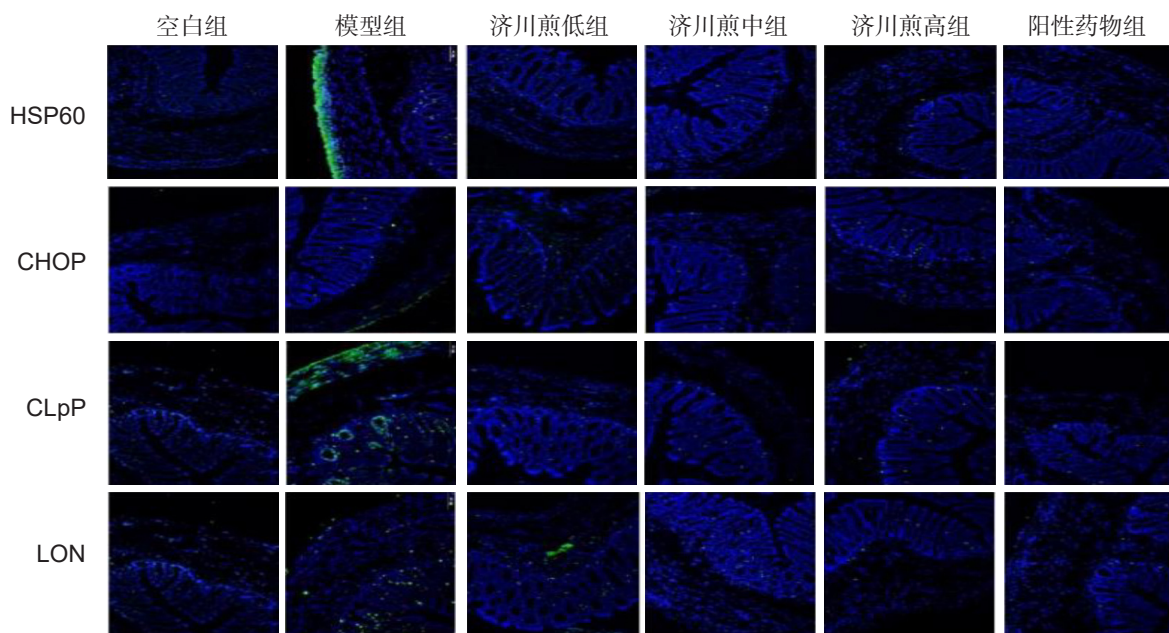


图 4 各组大鼠结肠组织 HSP60、CLpP、CHOP、LON 含量表达 (免疫荧光法 ×200)

和 LON 表达均升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，济川煎低、中、高组及阳性药物组结肠组织中 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON 表达均降低 ($P < 0.01$)。

4 各组大鼠结肠组织中 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON mRNA 相对表达比较 (表 4) 与空白组比较，模型组大鼠结肠组织中 HSP60、

CLpP、CHOP 和 LON mRNA 相对表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较，济川煎低、中、高组及阳性药物组结肠组织中 HSP60、CLpP 和 CHOP mRNA 相对表达均降低 ($P < 0.01$)；济川煎高组与阳性药物组结肠组织中 LON mRNA 相对表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 4 各组大鼠结肠 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON mRNA 相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HSP60 mRNA	CLpP mRNA	CHOP mRNA	LON mRNA
空白	6	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	6	12.11 ± 3.54**	39.25 ± 10.24**	33.82 ± 5.40**	2.47 ± 0.65*
济川煎低	6	0.20 ± 0.10 ^{△△}	0.37 ± 0.07 ^{△△}	1.17 ± 0.23 ^{△△}	1.82 ± 0.41
济川煎中	6	1.26 ± 0.93 ^{△△}	2.19 ± 0.58 ^{△△}	2.73 ± 0.71 ^{△△}	1.37 ± 0.31
济川煎高	6	0.10 ± 0.03 ^{△△}	1.11 ± 0.27 ^{△△}	0.49 ± 0.09 ^{△△}	1.10 ± 0.53 [△]
阳性药物	6	0.11 ± 0.87 ^{△△}	0.71 ± 0.21 ^{△△}	0.24 ± 0.05 ^{△△}	0.22 ± 0.05 ^{△△}

注: 与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$

5 各组大鼠海马组织中 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON mRNA 相对表达比较 (表 5) 与空白组比较, 模型组大鼠海马组织中 HSP60 相对表达升高 ($P<0.05$), CLpP 和 CHOP mRNA 相对表达均升高 ($P<0.01$); LON mRNA 相对表达降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 济川煎低、高组中海马组织 HSP60 mRNA 相对表达降低 ($P<0.05$), 阳性药物组差异无统计学意义 ($P>0.05$); 济川煎低、中、高组中 CLpP mRNA 相对表达均降低 ($P<0.01$), 阳性药物组变化差异无统计学意义 ($P>0.05$); 济川煎低、中、高组及阳性药物组中 CHOP mRNA 相对表达降低 ($P<0.01$); 济川煎低、中、高剂量组中 LON mRNA 相对表达升高 ($P<0.01$), 阳性药物组变化差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

6 各组大鼠结肠组织中 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON 受体蛋白表达比较 (表 6, 图 5) 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织中 HSP60、CLpP、CHOP、LON 受体蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$)。

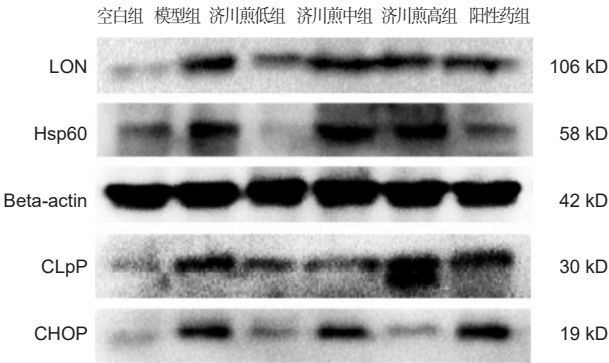


图 5 各组大鼠结肠组织 HSP60、CLpP、CHOP、LON 受体蛋白表达

与模型组比较, 济川煎低组、阳性药物组结肠组织中 HSP60 受体蛋白表达显著降低 ($P<0.01$), 济川煎中、高组变化差异无统计学意义 ($P>0.05$); 济川煎低、中剂量组 CLpP 受体蛋白表达显著降低, 高剂量组与阳性药物组显著升高 ($P<0.01$); 济川煎低、中、高组 CHOP、LON 受体蛋白表达均降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 阳性药物组结肠组织中 CHOP 与 LON

表 5 各组大鼠海马组织 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON mRNA 相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HSP60 mRNA	CLpP mRNA	CHOP mRNA	LON mRNA
空白	6	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	6	4.48 ± 1.48*	9.91 ± 2.15**	14.02 ± 1.96**	0.12 ± 0.04**
济川煎低	6	1.45 ± 0.56 [△]	2.18 ± 0.13 ^{△△}	1.75 ± 0.22 ^{△△}	0.29 ± 0.06 ^{△△}
济川煎中	6	2.27 ± 0.92	3.12 ± 0.49 ^{△△}	2.81 ± 0.52 ^{△△}	0.30 ± 0.06 ^{△△}
济川煎高	6	1.00 ± 0.55 [△]	2.91 ± 0.44 ^{△△}	2.05 ± 0.30 ^{△△}	0.42 ± 0.09 ^{△△}
阳性药	6	5.72 ± 2.03	9.00 ± 1.07	2.44 ± 0.33 ^{△△}	0.19 ± 0.03

注: 与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$

表 6 各组大鼠结肠组织 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON 受体蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HSP60 (U/mL)	CLpP (nmol/mL)	CHOP (U/mL)	LON (nmol/mL)
空白	6	0.28 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.14 ± 0.01
模型	6	0.36 ± 0.01*	0.36 ± 0.01*	0.31 ± 0.01*	0.54 ± 0.01*
济川煎低	6	0.19 ± 0.00 [△]	0.24 ± 0.01 ^{△△}	0.19 ± 0.01 [△]	0.32 ± 0.01 [△]
济川煎中	6	0.37 ± 0.01	0.34 ± 0.01 [△]	0.19 ± 0.00	0.39 ± 0.01 [△]
济川煎高	6	0.35 ± 0.02	0.88 ± 0.02 [△]	0.20 ± 0.01 [△]	0.36 ± 0.01 [△]
阳性药	6	0.21 ± 0.00 [△]	0.48 ± 0.01 [△]	0.31 ± 0.01	0.56 ± 0.01

注: 与空白组相较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.01$

受体蛋白表达变化差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

讨 论

中医学将 STC 归属于“便秘”“大便难”范畴，多发于老年人群，其病标在大肠，病本却多与肾有关。肾藏精司二便，肾精充足，肠腑滋润，则肠道通，但老年人多肾精亏虚，无力推动肾之阴阳濡养大肠，肾阴虚则肠道水亏燥烈，“无水舟停”致秘，肾阳虚则肠道虚寒凝滞，津液不化，“釜底无薪”致秘。此肾虚精亏型便秘，多以补肾益精法治疗，济川煎作为补肾益精法的代表方已成为临床治疗的主要方药^[9]。方中肉苁蓉温肾益精，当归养血益精，牛膝补肾益精，泽泻甘淡渗泻，枳壳宽肠下气，升麻升清降浊，全方升降同用，补中寓泻，共奏补肾益精、润肠通便之效。课题组前期实验研究已证实补肾益精法通过调节肠道动力治疗功能性便秘作用显著^[10-12]。肾主藏精、主骨、生髓、通于脑，由此衍生的“肾-髓-脑”生物轴已被现代医学明确证实^[13]。老年人多肾虚精亏，髓减脑消，而脑部退行性疾病常与髓减脑消密切相关，故补肾益精法可直接充养脑髓治疗脑部退行性病变，如帕金森病、阿尔茨海默病与抑郁症等^[14-16]。

STC 的发病因素复杂多样，其中各种原因引起的肠道动力紊乱最为关键。现代医学“脑-肠轴”的提出更加明确了脑肠之间的紧密联系。脑-肠轴是已经被现代医学证实存在于大脑和肠道之间的双向信号调节系统，大脑是人类神经系统的中枢，其中海马区是大脑接受并处理外界信息的主要脑功能区，因此海马区又被认为是“大脑的心脏”^[17]。我国学者田焯研究组^[18]在 *Cell* 杂志在线发表的文章研究结果证实海马与肠道间通过“脑-肠轴”的物质基础 Wnt/Retromer 信号通路进行联系，进一步研究表明 Wnt/Retromer 信号通路是两种细胞线粒体之间的“传令兵”，当神经细胞线粒体功能损伤时，细胞内的线粒体 UPRmt 将启动，使线粒体分子伴侣、蛋白酶、代谢相关基因等表达水平上调，重建线粒体稳态平衡，维持细胞正常功能，与此同时，神经细胞线粒体会通过 Wnt/Retromer 信号通路将其所遭受的损伤传递给肠道细胞线粒体，同时肠道细胞线粒体 UPRmt 也会启动，重建肠道细胞线粒体的稳态平衡，维持肠道细胞的正常功能。这也为揭示脑肠间海马区神经系统与肠道神经系统“对话”的具体分子机制提供了线索。既然济川煎能益精润肠治疗 STC，又能填精益髓治疗退行性脑病（帕金森病、阿尔茨海默病、抑郁症），而脑肠之间又通过“脑-肠轴”紧密相连，

那么济川煎治疗 STC 的分子机制是否与脑肠同治有关？

本研究结果发现，与空白组比较，模型组大鼠结肠组织 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON 蛋白及 mRNA 含量均明显升高，提示结肠 MT 功能受损，UPRmt 被激活；与模型组比较，各治疗组大鼠 HSP60、CLpP、CHOP 和 LON 蛋白及 mRNA 含量有不同程度的降低，提示结肠 MT 功能恢复，UPRmt 终止。与空白组比较，模型组大鼠海马组织 HSP60、CLpP、CHOP mRNA 含量均明显升高，提示海马 MT 功能受损；与模型组比较，各治疗组大鼠 HSP60、CLpP、CHOP mRNA 含量有不同程度的降低，提示海马 MT 功能恢复，UPRmt 终止。与空白组比较，模型组大鼠海马组织 LON mRNA 含量明显降低，各济川煎低、中、高组大鼠海马组织 LON mRNA 含量呈递增收序升高，阳性药物组海马组织 LON mRNA 含量升高不明显，这可能是由于在 UPRmt 信号通路中，海马组织 LON mRNA 的激活需要更大剂量或更长时间的药物干预，但这需进一步实验研究来证实。以上实验结果说明，济川煎既能通过调控海马神经元 UPRmt 水平以改善海马线粒体功能，又能通过调控结肠细胞 UPRmt 水平以改善结肠线粒体功能，而海马神经元与结肠细胞通过“脑-肠轴”紧密相连，说明济川煎治疗 STC 的作用机制可能与调控海马神经元 UPRmt 与结肠细胞 UPRmt 水平，减轻细胞凋亡与衰老，进而修复肠神经系统（enteric nervous system, ENS）Cajal 间质细胞（interstitial cells of Cajal, ICC）结肠平滑肌（smooth muscle cell, SMC）网络结构，促进肠道动力有关。

综上，济川煎治疗 STC 的作用机制可能是通过调控结肠细胞、海马神经元 UPRmt 以改善线粒体功能，通过脑肠同治减轻结肠细胞的凋亡与衰老，修复肠道 SMC 损伤，维持其对肠道动力的调节作用而达到治疗效果，目前脑肠同治治疗肠病研究尚少，其具体涉及的脑-肠轴相关基因还需进一步探索。

利益冲突：无。

参 考 文 献

- [1] Tack J, Müller-Lissner S, Stanghellini V, et al. Diagnosis and treatment of chronic constipation—a European perspective[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 23 (8): 697-710
- [2] Mugie SM, Benninga MA, Lorenzo CD.

- Epidemiology of constipation in children and adults[J]. *Gastroenterology*, 2011, 25 (1): 3–18.
- [3] 刘海婷, 常华, 吴雨静, 等. 关于老年慢性功能性便秘的相关因素分析 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2016, 10 (14): 2163–2166.
- [4] Roucou X, Antonsson B, Martinou JC. Involvement of mitochondria in apoptosis[J]. *Cardiol Clin*, 2001, 19 (1): 45–55.
- [5] Garcaíprat L, MartnÍezvicente M, Perdiguero E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence[J]. *Nature*, 2016, 529 (7584): 37–42.
- [6] Jovaisaite V, Auwerx J. The mitochondrial unfolded protein response-synchronizing genomes[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 74–81.
- [7] Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain[J]. *Nature Rev Microbiol*, 2012, 10 (11): 735–742.
- [8] 谢培, 周永学. 大鼠功能性便秘模型建立方法的研究 [J]. *陕西中医*, 2014, 35 (3): 377–379.
- [9] 张喻然, 王波. 济川煎加味联合腹针对于慢传输型便秘 (脾肾阳虚型) 疗效及对血清 SP 和 NO 水平的干预影响 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26 (3): 238–242.
- [10] 周永学, 王郁金, 闫曙光, 等. 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP-cAMP-PKA-AQP3 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22 (24): 99–104.
- [11] 王郁金, 周永学, 张红, 等. 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP 及 AQP3 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (9): 108–111.
- [12] 王郁金, 周永学, 谢培, 等. 硝菴通结方对功能性便秘大鼠排便及胃肠动力的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20 (17): 146–149.
- [13] 李林, 魏海峰, 张兰, 等. 中医 “肾生髓, 脑为髓海” 现代生物学基础探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2006 (17): 1397–1400, 1417.
- [14] 陈路, 陈志刚, 侯月. 滋肾益髓方治疗帕金森病运动及非运动症状的疗效观察 [J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37 (3): 209–212.
- [15] 许玉珉, 章时杰, 王馨晨, 等. 补肾益智方对 A β 25–35 致阿尔茨海默病小鼠空间学习记忆及细胞凋亡机制的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34 (1): 127–130.
- [16] 周虹, 张伦忠, 李晓凤. 填精补肾法治卒中后抑郁的理论探讨 [J]. *光明中医*, 2018, 33 (19): 2808–2810.
- [17] Chan R, Leong T, Ho C, et al. Low frequency hippocampal-cortical activity contributes to brain-wide connectivity as measured by resting-state fMRI[J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2017, 114 (33): E6972–E6981.
- [18] Zhang Q, Wang XY, Chen P, et al. The mitochondrial unfolded protein response is mediated cell-non-autonomously by retromer-dependent Wnt signaling[J]. *Cell*, 2018, 174 (4): 870–883.

(收稿: 2021–09–16 在线: 2021–12–28)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶