

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.12.014

实验研究

电针大肠经俞募穴对功能性便秘模型小鼠 GDNF-PI3K-Akt 信号转导通路的影响

孙路强, 张微, 魏韬, 罗芳丽, 李瑛*

(成都中医药大学, 四川省成都市十二桥路 37 号, 610075)

摘要 目的 探讨 GDNF-PI3K-Akt 信号转导通路在电针大肠经俞募穴治疗功能性便秘中的作用。方法 10 只野生型小鼠设为对照组, 13 只 GFR α 1 基因敲除小鼠随机分为模型组 7 只、针刺组 6 只。模型组和针刺组小鼠采用复方地芬诺酯混悬液以 10 mg/(kg·d) 灌胃 14 天建立功能性便秘小鼠模型。造模后针刺组小鼠第 1 天电针小鼠左侧“天枢”和左侧“大肠俞”, 第 2 天电针右侧两穴, 每日依次交替, 每次留针 30 min, 连续 5 天。对照组、模型组不接受任何治疗。观察各组小鼠胃排空率、小肠推进率, 检测远端结肠组织中胶质细胞源性神经生长因子 (GDNF)、Rai、络氨酸激酶受体 (RET) 蛋白及其 mRNA 表达, 同时检测远端结肠组织 PI3K、Akt 蛋白含量。结果 与对照组比较, 模型组小鼠胃排空率和小肠推进率降低, 远端结肠 Rai 蛋白及 mRNA 表达下调, RET 蛋白表达下调, PI3K 及 Akt 蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 针刺组小鼠胃排空率、小肠推进率, GDNF、Rai、RET 蛋白及 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), PI3K 及 Akt 蛋白表达下调 ($P < 0.05$)。结论 GDNF-PI3K-Akt 信号转导通路可能是针刺电针大肠俞募穴治疗功能性便秘的主要路径。

关键词 功能性便秘; 电针; 大肠经; 俞穴; 募穴; GDNF-PI3K-Akt 通路; 胶质细胞源性神经生长因子

功能性便秘是临床常见病, 发病率逐年升高^[1], 并可增加肠道癌变的风险^[2], 长期影响身心健康及生活质量^[3], 但其药物治疗效果不理想^[4]。功能性便秘是世界卫生组织推荐针灸治疗的优势病种之一, 并且 Meta 分析表明, 针灸治疗该病疗效确切^[5], 并常采用俞募配穴^[6]。但由于其作用机制研究少, 一定程度上影响临床使用。研究表明, 针灸治疗功能性便秘主要通过内源性神经系统发挥作用。内源性神经系统由肠神经元和肠道胶质细胞组成, 肠道胶质细胞可维护肠神经系统的完整性, 其分泌的胶质细胞源性神经生长因子 (GDNF) 是促进神经元生长、分化和修复的营养因子, 肠道胶质细胞的生物学效应由 GDNF 家族受体 1 (GFR α 1) 和络氨酸激酶受体 (RET) 介导, 并调控 PI3K-Akt 通路^[7]。前期研究已证实, GFR α 1 介导的 GDNF-PI3K-Akt 通路, 是维持肠道神经元存活的关键路径^[8]。本研究以 GFR α 1 基因

敲除小鼠为载体, 拟从反面来论证 GDNF-PI3K-Akt 信号转导通路在针刺治疗功能性便秘中的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

GFR α 1 基因敲除小鼠 13 只, 由南京大学南京生物医药研究院繁育, 其中雄性 6 只, 雌性 7 只, 体重 25 ~ 35 g, 6 ~ 12 周龄; 繁育后基因型为野生型的小鼠 10 只, 雌雄各半, 体重 25 ~ 35 g, 周龄 6 ~ 12 周。实验动物许可证号: SYXK(苏) 2014-0028。

1.2 药物及试剂

复方地芬诺酯片: 江苏常州康普制药厂, 批号: 20130708; 活性炭粉剂: 重庆茂业化学试剂有限公司, 批号: 20141020; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 南京凯基生物科技发展有限公司, 批号: KGP903; 预染蛋白 Marker, 美国 NEB 公司, 批号: 00215343; ECL 发光试剂盒, 美国 Thermo 公司, 批号: BL520A; 结肠核蛋白与结肠浆蛋白抽提试剂盒, 碧云天生物技术有限公司, 批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81273853, 81774430, 81603706)

* 通讯作者: liying@edutem.edu.cn

P0028; PI3K 鼠单克隆抗体, 英国 Abcam 公司, 批号: ab189403; 浓缩型 DAB 试剂盒, 北京中杉金桥生物有限公司, 批号: K135925C。

1.3 主要仪器

汉医牌针灸针 (0.30 mm × 25 mm, 天津华鸿医材有限公司); SDZ-II 型电针仪 (苏州医疗用品有限公司); 2016 型转轮式切片机 (德国徕卡公司); TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机 (常州市中威电子仪器有限公司); BMJ-III 型包埋机 (常州郊区中威电子仪器厂); BA400Digital 型数码三目摄像显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (美国 Media Cybernetics 公司); MK3 型全功能酶标仪 (美国 ThermoFisher 仪器有限公司); TGL-46G-A 型高速低温离心机 (上海安亭科学仪器厂); DYY-6C 型电泳仪、UVTransilluminator 型化学发光凝胶成像仪、Chemi-Doc XRS + Systems 凝胶扫描成像仪、Image Lab 凝胶分析系统, 均为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.4 动物分组及造模方法

10 只野生型小鼠设为对照组, 13 只 GFR α 1 基因敲除小鼠按随机数字表法分为模型组 7 只、针刺组 6 只。针刺组、模型组小鼠均使用复方地芬诺酯混悬液以 10 mg/(kg · d) 的剂量灌胃建立功能性便秘小鼠模型^[8]; 对照组小鼠给予等量生理盐水灌胃, 均灌胃 14 天。

1.5 针刺方法

大肠经俞募穴为大肠俞和天枢穴, 定位参照《小鼠常用针灸穴位》^[9]。造模后针刺组小鼠第 1 天电针小鼠左侧“天枢”和左侧“大肠俞”, 第 2 天则针刺右侧两穴, 依次交替针刺左右侧。进针 5 mm 左右, 捻转有紧滞感后针柄接电针仪。刺激参数: 疏密波 (疏波 4 Hz, 密波 50 Hz), 强度定为该治疗仪“1”档, 以小鼠肢体末端轻微抖动为宜。每次留针 30 min, 每日 1 次, 连续 5 天。对照组、模型组小鼠不接受任何治疗。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 排便情况 造模后每只小鼠单笼饲养禁食不禁水 12 h, 小鼠称重后按照 0.1 ml/10 g 的剂量电针干预前采用活性炭混悬液进行灌胃, 记录首粒黑

便排出时间、8h 内大便粒数和重量。

1.6.2 胃肠传输功能 干预 5 天后, 各组小鼠禁食 12 h, 活性炭混悬液以 0.1 ml/10 g 的剂量进行灌胃, 30 min 后处死小鼠, 取胃, 称重, 然后沿胃大弯剪开胃体, 用生理盐水将胃内容物洗净, 拭干后称胃净重, 计算胃排空率, 胃排空率 = $\frac{[胃全重 - (胃全重 - 胃净重)]}{胃全重} \times 100\%$ ^[10]。剪取肠管, 测小肠总长度 (幽门至回盲部), 从幽门至活性炭前沿的距离为活性炭在肠管内推进距离, 计算小肠推进率, 小肠推进率 = 活性炭黑染肠管长度/小肠全长 $\times 100\%$ ^[11]。

1.6.3 GDNF-PI3K-Akt 信号通路分析 干预 5 天后, 采用免疫组织化学法检测远端结肠内 GDNF、Rai 蛋白表达水平, 原位杂交结合计算机图像分析技术检测远端结肠内 GDNF、Rai mRNA 表达水平。RET mRNA 采用实时定量 PCR 技术进行检测, RET 蛋白表达水平采用免疫组织化学法进行检测。PI3K、Akt 蛋白采用 Western blot 法和 Fluorchem 图像分析系统进行检测。均按照试剂盒说明书步骤进行, 结果均以比值 (OA) 表示。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量数据经正态检验和方差齐性分析, 符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析。两两比较方差齐选用 LSD 检验, 方差不齐用 T2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后各组小鼠排便情况比较

表 1 示, 造模后, 模型组 + 针刺组小鼠首粒黑便排出时间较对照组延迟, 8h 大便粒数减少, 大便重量减轻 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示造模成功。

2.2 各组小鼠胃排空率及小肠推进率比较

表 2 示, 与对照组比较, 模型组和针刺组小鼠

表 2 各组小鼠胃排空率及小肠推进率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	胃排空率	小肠推进率
对照组	10	0.736 $\pm$ 0.072	0.799 $\pm$ 0.049
模型组	7	0.563 $\pm$ 0.132 **	0.703 $\pm$ 0.110 *
针刺组	6	0.532 $\pm$ 0.087 **	0.688 $\pm$ 0.058 **

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 1 各组小鼠造模后排便情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	首粒黑便排出时间 (min)	8h 粪便粒数 (粒)	8h 粪便重量 (mg)
对照组	10	106.20 $\pm$ 17.31	45.60 $\pm$ 13.50	517.59 $\pm$ 94.03
模型组 + 针刺组	13	127.64 $\pm$ 25.16 *	35.79 $\pm$ 8.72 *	397.06 $\pm$ 24.61 **

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 各组小鼠远端结肠 GDNF、Rai、RET 蛋白及 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GDNF 蛋白	GDNF mRNA	Rai 蛋白	Rai mRNA	RET 蛋白	RET mRNA
对照组	10	0.290 ± 0.015	0.184 ± 0.016	0.285 ± 0.016	0.135 ± 0.007	0.280 ± 0.018	1.021 ± 0.235
模型组	7	0.278 ± 0.012	0.175 ± 0.006	0.263 ± 0.008 **	0.123 ± 0.004 **	0.258 ± 0.012 **	0.877 ± 0.215
针刺组	6	0.284 ± 0.016	0.175 ± 0.007	0.277 ± 0.007	0.126 ± 0.008 *	0.261 ± 0.007 *	0.980 ± 0.328

注: GDNF, 胶质细胞源性神经营养因子; RET, 酪氨酸激酶受体; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

胃排空率和小肠推进率都降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 针刺组胃排空率、小肠推进率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组小鼠远端结肠 GDNF、Rai、RET 蛋白及 mRNA 表达比较

表 3 示, 与对照组比较, 模型组小鼠远端结肠 Rai 蛋白及 mRNA 表达下调, RET 蛋白表达下调 ($P < 0.01$), 针刺组小鼠远端结肠 Rai mRNA 和 RET 蛋白表达下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 针刺组小鼠远端结肠 GDNF、Rai、RET 蛋白及 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组小鼠远端结肠 PI3K、AKT 蛋白表达比较

表 4 示, 与对照组比较, 模型组小鼠远端结肠 PI3K 及 Akt 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 针刺组 PI3K 蛋白表达亦升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 针刺组小鼠远端结肠 PI3K 及 Akt 蛋白表达下调 ($P < 0.05$)。

表 4 各组小鼠远端结肠 PI3K、AKT 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PI3K 蛋白	Akt 蛋白
对照组	10	1.023 ± 0.100	1.370 ± 0.401
模型组	7	1.413 ± 0.118 *	1.978 ± 0.405 *
针刺组	6	1.264 ± 0.061 *△	1.442 ± 0.245 △

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$

3 讨论

中医理论认为, 大肠传导失司是功能性便秘的主要发病机理, 大肠俞募穴相配, 即天枢穴和大肠俞合用能疏泄阳明腑气。背俞穴是脏腑之气输注于背腰部的腧穴, 募穴是脏腑之气结聚于胸腹的腧穴。《素问·阴阳应象大论》曰“从阴引阳, 从阳引阴”, 所以俞募配穴是针灸治疗脏腑疾病的经典配穴方法。在胃肠道疾病中, 俞募配伍是临床最常用的经典配穴方法^[13-15]。有研究显示, 引起功能性便秘发病的关键在肠神经系统, 其主要由肠神经元和肠道胶质细胞组成, 成熟的肠道胶质细胞可以产生 GDNF, 其生物学效应由 GFRα1 和 RET 介导^[16]。GDNF 首先与 GFRα1 形成复合物, 此复合物与 RET 分子相互作用, 使 RET 同源二聚化和自

身胞内端的酪氨酸激酶磷酸化, 并诱导其与 Rai 结合激活 PI3K。活化的 PI3K 又与 Akt 结合, 磷酸化 Thr308 和 Ser473 两个位点, 最终彻底激活 Akt, 进而作用于 Forhead 蛋白家族^[17]。因此, GFRα1 和 RET 是启动这一过程的关键受体。

本研究表明, GFRα1 基因敲除小鼠造模后, 其结肠内 Rai 和 RET 蛋白及其 mRNA 的含量有不同程度降低, PI3K 和 Akt 蛋白含量升高, 胃排空率和小肠推进率降低, 而针刺不能上调其表达及改善胃肠传输功能。一方面说明电针大肠俞募穴不能提高 GFRα1 基因敲除功能性便秘小鼠结肠组织中的肠道胶质细胞分泌 GDNF, 使其与 GFRα1 形成复合物的数量减少, 直接降低 RET 的同源二聚化和磷酸化功能, 导致与 Rai 的结合受影响, 最终影响 PI3K 和 Akt。另一方面提示 GDNF-PI3K-Akt 信号转导通路在针刺治疗功能性便秘中起到重要作用。综上所述, GFRα1 基因敲除后, 功能性便秘小鼠结肠内 PI3K 和 Akt 蛋白表达升高, 这可能跟激活 GDNF-PI3K-Akt 通路有关, 而针刺俞募穴对功能性便秘小鼠 PI3K 和 Akt 蛋白具有下调的作用, 这可能跟 PI3K 通路负反馈有关, 需进一步研究。

参考文献

- [1] 翁剑锋, 邱啸臣, 李元新. 功能性便秘的治疗进展 [J]. 中国临床研究, 2016, 29(3): 409-412.
- [2] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- [3] BELSEY J, GREENFIELD S, CANDY D, et al. Systematic review: impact of constipation on quality of life in adults and children [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2010, 31(9): 938-949.
- [4] 孙健, 林晖. 功能性便秘的非药物治疗进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(2): 207-209.
- [5] 杜文菲, 于璐, 严兴科, 等. 针灸治疗便秘随机对照临床研究文献 Meta 分析 [J]. 中国针灸, 2012, 32(1): 92-96.
- [6] 邱学梅, 杜帅, 陈少宗. 针灸治疗便秘取穴规律文献分析 [J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(2): 113-115.
- [7] 袁媛, 范一宏, 张烁, 等. 肠神经胶质细胞及胶质细胞源性神经营养因子在肠道功能中的作用 [J]. 中华内科杂志, 2013, 52(11): 995-996.
- [8] 张微. 针刺俞募穴改善 FC 小鼠胃肠传输功能的 GDNF-

- PI3K-AKT 信号转导机制研究 [J]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [1] 刘丽莎, 张微, 赵敏, 等. 功能性便秘动物造模方法研究概况 [J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29(2): 169-172.
- [2] 李辞蓉, 宋大鲁. 小鼠常用针灸穴位 [J]. 实验动物与动物实验, 1992(2): 85-87.
- [3] ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome [J]. Nature, 2011, 473(7345): 174-180.
- [4] SCALDAFERRI F, GERARDI V, LOPETUSO LR, et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 307-315. doi: 10.1155/2013/435268.
- [5] 谢惺, 朱欢, 吴曦, 等. 针灸治疗功能性消化不良临床对照文献用穴规律评析 [J]. 成都中医药大学学报, 2008, 31(1): 1-3.
- [6] 卢松, 胡幼平. 针刺治疗慢性萎缩性胃炎取穴规律探究 [J]. 江西中医药, 2005, 36(12): 61-62.
- [7] 黄史乐, 马婷婷, 胡玲香. 针灸治疗肠易激综合征古代处方分析 [J]. 成都中医药大学学报, 2009, 32(2): 95.
- [8] VILLANACCI V, BASSOTTI G, ORTENSIO B, et al. Expression of the Rai (Shc C) adaptor protein in the human enteric nervous system [J]. Neurogastroenterol Motil, 2008, 20(3): 206-212.
- [9] PELICCI G, TROGLIO F, BODINI A, et al. The neuron-specific Rai (Shc) adaptor protein inhibits apoptosis by coupling Ret to the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(20): 7351-7363.

Effects of Electroacupuncture at Shu (俞) Acupoints and Mu (募) Acupoints of Large Intestine Meridian on GDNF-PI3K-Akt Signal Transduction Pathway in Functional Constipation Model Mice

SUN Luqiang, ZHANG Wei, WEI Tao, LUO Fangli, LI Ying

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

ABSTRACT Objective To investigate the role of GDNF-PI3K-Akt signal transduction pathway in the treatment of functional constipation with electroacupuncture at large intestine Shu and Mu acupoint. **Methods** Ten wild mice were used as control group. Thirteen GFR α 1 knockout mice were randomly divided into model group and acupuncture group. The model group and the acupuncture group mice were treated with 10 mg/(kg·d) 10 mg/(kg·d) for 14 days to establish a functional constipation mouse model. After acupuncture, acupuncture mice were given the left side Tianshu (ST25) and left Dachangshu (BL25) on the first day of electroacupuncture. On the 2nd day, the electroacupuncture points of the right side were alternated, and the needles were alternated for 30 minutes each time for 5 consecutive days. The control group and model group did not receive any treatment. The gastric emptying rate and small intestine advancing rate were observed in mice in each group. The expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), Rai, tyrosine kinase receptor (RET) protein and its mRNA in distal colon tissue were detected. The content of PI3K and Akt protein in the distal colon tissue was detected. **Results** Compared with the control group, the gastric emptying rate and intestinal propulsion rate in the model group decreased, and the expression of Rai protein and mRNA in the distal colon decreased. The expression of RET protein decreased, and the expression of PI3K and Akt protein increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, there was no significant difference in gastric emptying rate, small intestine advancing rate, GDNF, Rai, RET protein and mRNA expression in the acupuncture group ($P > 0.05$), and PI3K and Akt protein expression was down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** The GDNF-PI3K-Akt signal transduction pathway may be the main route of electroacupuncture at the point of large intestine shu to treat functional constipation.

Keywords Functional constipation; electroacupuncture; large intestine meridian; Shu points; Mu point; GDNF-PI3K-Akt pathway; glial cell-derived neurotrophic factor

(收稿日期: 2017-11-06; 修回日期: 2018-02-04)

编辑: 邓 媛

更正

《中医杂志》2018 年第 59 卷第 10 期《益气活血方联合恩替卡韦片治疗乙型肝炎病毒相关肝硬化失代偿期气虚血瘀证患者 35 例临床观察》一文, 第 858 页“2.2.1 中医证候积分”内容应为“参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[1]制定, 症状包括倦怠乏力、食欲不振、脘闷腹胀、胁肋疼痛、小便色黄, 所有症状均分正常、轻度、中度、重度, 分别计 0、2、4、6 分。于治疗前及治疗 3、6、12、24 个月时分别记录 1 次”, 特此更正, 并向读者和作者致歉。

本刊编辑部