

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.13.012

实验研究

香砂六君子汤对脾胃虚弱型功能性消化不良模型大鼠胃窦组织 mTOR/ghrelin/GHSR-1a 通路的影响

李润法^{1,2}, 安耀荣¹, 白敏^{1,2}, 马秀兰^{1,2}, 赵琳娜^{1,2}, 刘梦雅^{1,2}, 成映霞³✉

1. 甘肃中医药大学, 甘肃省兰州市城关区定西东路 35 号, 730000; 2. 甘肃中医药大学实验动物中心; 3. 宁夏医科大学中医学

[摘要] 目的 探讨香砂六君子汤对脾胃虚弱型功能性消化不良 (FD) 模型大鼠胃排空的影响及可能作用机制。方法 60 只 SD 大鼠的乳鼠随机分为空白组、模型组、莫沙必利组和香砂六君子汤低、中、高剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠采用碘乙酰胺联合蔗糖溶液灌胃+隔日给食+游泳力竭复制脾胃虚弱型 FD 大鼠模型。造模成功后香砂六君子汤高、中、低剂量组分别给予香砂六君子汤 12、6、3 g/(kg·d) 灌胃; 莫沙必利组给予枸橼酸莫沙必利片 1.35 mg/(kg·d) 灌胃; 空白组和模型组大鼠给予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃。连续干预 2 周后, 测定各组大鼠体质量、胃排空率和肠推进率, HE 染色观察各组大鼠胃组织病理学改变, 检测大鼠胃窦组织中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、胃生长激素释放激素 (ghrelin)、生长激素促分泌素受体 1a (GHSR-1a)、c-kit 蛋白表达和血浆酰基化胃生长激素释放激素 (Acly-ghrelin) 水平。结果 与空白组比较, 模型组大鼠体质量、胃排空率、肠推进率降低, 胃窦组织中 ghrelin、GHSR-1a、c-kit 蛋白表达和血浆 Acly-ghrelin 水平均降低, mTOR 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 香砂六君子汤中、高剂量组和莫沙必利组大鼠体质量、胃排空率、肠推进率升高, 胃窦组织中 ghrelin、GHSR-1a、c-kit 蛋白表达及血浆 Acly-ghrelin 水平均升高, mTOR 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与莫沙必利组比较, 香砂六君子汤高剂量组大鼠胃窦组织中 ghrelin 蛋白表达升高, mTOR 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。HE 染色结果显示, 各组大鼠胃组织病理形态学正常, 腺体无萎缩, 无炎性细胞浸润。结论 香砂六君子汤中、高剂量能够显著促进脾胃虚弱型 FD 大鼠胃排空, 其作用机制可能与香砂六君子汤可正向调控 mTOR/ghrelin/GHSR-1a 信号通路相关。

[关键词] 功能性消化不良; 脾胃虚弱型; 香砂六君子汤; 胃排空; mTOR/ghrelin/GHSR-1a 信号通路

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 可分为早饱与饭后饱胀不适为临床表现的餐后窘迫综合征 (PDS)、上腹痛与上腹烧灼感为临床表现的上腹痛综合征 (EPS) 两种亚型。FD 具有复杂的病理因素包括胃动力异常、内脏高敏感性、胃酸过度分泌和幽门螺杆菌感染等, 其中最主要的病理因素为胃动力异常^[1]。西药治疗 FD 胃动力异常具有较大的局限性, 如阿考替胺在停药后具有极高的复发率^[2], 长期服用 5-羟色氨酸受体激动剂会增加心肌梗死和室性心律失常的风险^[3]。中医学将 FD 归为“胃痞”“痞满”的范畴, 脾胃虚弱、气机失和为该病的主要病机^[4]。《古今名医方论》所载香砂六君

子汤以补脾益胃见长, 临床研究显示其具有改善胃动力、促进胃排空的作用, 且不良反应少, 对 FD 患者具有良好的治疗效果^[5-6]。研究显示, Cajal 间质细胞 (ICC) 的自噬异常与 FD 密切相关, ICC 的过度自噬会导致胃动力减弱^[7]。生长激素促分泌素受体 1a (GHSR-1a) 是 ICC 细胞上的重要受体之一, 同时也是胃生长激素释放激素 (ghrelin) 的重要配体, 其与 ghrelin 结合可促进 ICC 在胃肠道产生慢波电位, 调节胃肠平滑肌的收缩舒张进而改善胃肠动力^[8-9]。而过表达的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 对 ghrelin 的产生和 ICC 的自噬均有消极影响^[10-11]。因此, 本研究从 mTOR/ghrelin/GHSR-1a 信号通路角度探讨香砂六君子汤治疗脾胃虚弱型 FD 的潜在干预机制。本研究通过甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审查, 伦理审查编号: 2021-204。

基金项目: 甘肃中医药大学研究生创新创业基金 (2022CX30); 宁夏回族自治区科技厅重点研发引才专项 (2022BSB030080)

✉ 通讯作者: 1289018353@qq.com

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠的乳鼠60只,体质量(25 ± 3)g,10日龄,由甘肃中医药大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:SCXK[甘]2020-0001。饲养于SPF级实验室,相对湿度45%~55%,室温(23 ± 2)℃,每12h明暗循环。

1.2 药物

香砂六君子汤组成参考《方剂学》^[12]:木香6g,砂仁6g,陈皮9g,姜半夏12g,麸炒白术9g,人参10g,茯苓9g,炙甘草6g。药材均采购自甘肃省中医院中药房。将中药浸泡1h,然后煎煮1h,获得第一遍药液;再用温水浸泡40min,再煎煮1h,获得第二遍药液。将两次煎煮出的药液混合后进行浓缩,分别制备成浓度为2、1、0.5g/ml的溶液。枸橼酸莫沙必利片(货号:10102A01,成都康弘药业集团股份有限公司),配制成浓度为0.2mg/ml的溶液。

1.3 主要试剂及仪器

碘乙酰胺(货号:604E037)、羟甲基纤维素钠(货号:1228A021),北京索莱宝生物科技有限公司;mTOR抗体(货号:GB111839)、ghrelin抗体(货号:GB11548)、抗mTOR二抗(货号:GB23303/GB253039)、Alexa Fluor 488二抗(货号:GB253039)、自发荧光淬灭剂(货号:G1221)、EDTA抗原修复液(货号:G1206)、DAPI(货号:G1012)、抗荧光淬灭封片剂(货号:G1401)、HE染色液(货号:G1005),武汉塞维尔生物科技有限公司;GHS-R1a抗体(货号:GTX108171)、c-kit抗体(货号:GTX33947),GeneTex公司;GAPDH抗体(货号:YM3215)、羊抗兔二抗(货号:RS0001),Immunoway公司;总RNA提取试剂盒(货号:W9727),天根生化科技有限公司;逆转录试剂盒(货号:G7106010)、实时qPCR Mix(货号:H914010),Yeasen公司;酰基化胃生长激素释放激素(Acly-ghrelin)ELISA试剂盒(货号:2203R27),江苏菲亚科技有限公司。

RM2016型病理切片机,上海徕卡仪器有限公司;KD-P型组织摊片机,浙江金华市科迪仪器设备有限公司;WG1066-1型组化笔,武汉塞维尔生物科技有限公司;Nikon Eclipse C1型正置荧光显微镜、Nikon DS-U3型成像系统,日本尼康公司;VE-180型垂直板电泳装置、Mini-PROTEA Tetra型电泳仪、T100型梯度PCR仪、iMark型酶标仪,

伯乐生命医学产品(上海)有限公司;GelView 6000 plus型凝胶成像系统,广州博鹭腾生物科技有限公司;CG-05型实时荧光定量PCR仪,杭州晶格科学仪器有限公司。

1.4 模型复制、分组及给药

将60只SD乳鼠采用随机数字表法分为空白组10只和造模组50只。造模组乳鼠参照文献[13-15]复制脾胃虚弱型FD大鼠模型:乳鼠10日龄时每只给予0.2ml/d的含0.1%碘乙酰胺、2%蔗糖溶液灌胃,每天1次,连续干预6天后正常饲养至6周龄,随后采用隔日给食和游泳力竭(每日上午9:00于大鼠尾部缠绕重量为该大鼠体质量10%的保险丝,放入水深50cm、水温20℃的水槽中,使大鼠负重游泳,以大鼠鼻尖没入水面10s为度,每日1次)的综合造模方法连续干预14天至8周龄。空白组乳鼠10日龄时每只给予0.2ml/d的2%蔗糖溶液灌胃,连续干预6天后正常饲养至8周龄。当造模组大鼠出现行动倦怠,大便略溏,毛发不荣并枯乱,饮食量减少,肠推进率和胃排空率较空白组大鼠明显降低,HE染色显示胃组织无明显改变,判定为脾胃虚弱型FD大鼠造模成功^[15]。

造模后将50只造模成功的大鼠采用随机数字表法分为模型组、莫沙必利组和香砂六君子汤低、中、高剂量组,每组10只。空白组和模型组大鼠给予生理盐水10ml/(kg·d)灌胃;香砂六君子汤高、中、低剂量组分别给予浓度为2、1、0.5g/ml的香砂六君子汤12、6、3g/(kg·d)灌胃;莫沙必利组给予枸橼酸莫沙必利片1.35mg/(kg·d)灌胃。药物按照人与动物体表系数折算等效剂量^[16],其中香砂六君子汤中剂量组和莫沙必利组剂量为临床等效剂量。各组均连续干预2周。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 大鼠体质量、胃排空率和肠推进率^[17] 最后一次给药24h后测量各组大鼠体质量、胃排空率和肠推进率。胃排空率和肠推进率检测方法:提前制备半固体营养糊(玉米淀粉8g、蔗糖8g、奶粉16g、活性炭粉2g、羧甲基纤维素钠10g、蒸馏水250ml),给药结束后各组大鼠24h禁食完成后给予每只大鼠2ml灌胃,30min后使用3%戊巴比妥钠5ml/kg腹腔注射进行麻醉,麻醉完成后打开胸腔,腹主动脉取血,剖取全胃使用滤纸拭干并称重,后沿胃大弯剪开,称取胃内容物重量和胃净重;剖取小肠全肠,铺于白纸之上,测量幽门至回盲肠部的长度(S)和幽门至半固体营养糊前沿的

长度 (L), 按照公式计算胃排空率和肠推进率。胃排空率= [1- (胃总重-胃净重) ÷所给半固体营养糊总重] ×100%; 肠推进率=L/S×100%。

1.5.2 ELISA 法检测各组大鼠血浆中 Acly-ghrelin 水平 各组采用随机数字表选取 6 只大鼠并抽取血浆, 严格按照 ELISA 试剂盒操作说明检测各组大鼠血浆中 Acly-ghrelin 水平。

1.5.3 HE 染色观察各组大鼠胃组织形态 各组采用随机数字表选取 3 只大鼠并剪取胃窦组织, 固定 24 h 后将组织进行梯度脱水处理, 石蜡包埋, 切片后使用二甲苯和无水乙醇进行脱蜡, 使用 HE 染色液进行染色, 染色完成后将切片透明处理和中性树胶封片, 于显微镜下观察各组大鼠胃窦组织病理形态学变化。

1.5.4 免疫荧光双染检测各组大鼠胃窦组织中 mTOR、ghrelin 蛋白表达 胃窦组织石蜡切片脱蜡后, EDTA 进行抗原修复, 使用组化笔圈住组织, 使用双氧水室温避光封闭 25 min, 封闭完成加入 mTOR 一抗(1:1000) 4℃孵育过夜, 抗 mTOR 二抗(1:400) 避光孵育 50 min, TSA 避光孵育 10 min, 微波处理 (中火 8 min 停火 8 min 转中低火 7 min), 加入 ghrelin 一抗 (1:1000) 4℃孵育过夜, Alexa Fluor 488 二抗 (1:400) 避光孵育 50 min, 使用 DAPI 复染细胞核, 抗荧光淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下扫描拍照, 使用 Image J 1.44 软件统计分析荧光面积。

1.5.5 Western Blot 法检测各组大鼠胃窦组织中 GHSR-1a、c-kit 蛋白表达 各组将剩余 7 只大鼠采用随机数字表选取 3 只, 剪取大鼠胃窦组织进行蛋白提取, 使用 BCA 测定各组总蛋白浓度, 使用双蒸水将各组大鼠胃窦组织总蛋白提取液配制成同一浓度, 进行变性处理, 根据目的蛋白分子量制胶, 蛋白上样电泳, PVDF 膜转模, 4℃摇床封闭, 分别使用 GHS-R1α (1:1000)、c-kit (1:1000)、GAPDH (1:5000) 一抗孵育过夜 (4℃摇床), 二

抗 (1:10 000) 孵育 2 h (4℃摇床), 洗涤后 4℃冰箱静置 1 h, 进行曝光, 使用 Image J 1.44 软件对条带进行测量和分析。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 本研究数据均符合正态分布以($\bar{x}\pm s$)表示, 方差齐时多组间数据比较用方差分析, 两两比较使用 LSD 检验, 方差不齐则使用 Tamhane's 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量、胃排空率和肠推进率比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组大鼠体质量、胃排空率、肠推进率均降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 香砂六君子汤高、中剂量组和莫沙必利组大鼠体质量、胃排空率和肠推进率升高 ($P<0.05$)。与香砂六君子汤低剂量组比较, 香砂六君子汤高、中剂量组和莫沙必利组胃排空率和肠推进率均升高 ($P<0.05$)。香砂六君子汤高、中剂量组和莫沙必利组各指标组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠血浆中 Acly-ghrelin 水平比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组大鼠血浆中 Acly-ghrelin 水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组和

表 2 各组大鼠血浆中 Acly-ghrelin 水平比较
Table 2 Comparison of plasma Acly-ghrelin levels of rats in each group (pg/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Acly-ghrelin
空白组	6	51.49±6.09
模型组	6	28.15±6.43 ^{a)}
香砂六君子汤高剂量组	6	43.96±2.15 ^{b) c)}
香砂六君子汤中剂量组	6	39.69±6.73 ^{b) c)}
香砂六君子汤低剂量组	6	34.44±10.69
莫沙必利组	6	40.27±6.19 ^{b) c)}

注: Acly-ghrelin, 酰基化胃生长激素释放激素。
a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;
c) 与香砂六君子汤低剂量组比较, $P<0.05$ 。

表 1 各组大鼠体质量、胃排空率和肠推进率比较
Table 1 Comparison of body weight, gastric emptying rate and intestinal propulsion rate of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体质量/g	胃排空率/%	肠推进率/%
空白组	10	390.50±34.30	56.75±5.05	86.66±12.56
模型组	10	305.20±33.10 ^{a)}	29.50±5.02 ^{a)}	35.38±11.53 ^{a)}
香砂六君子汤高剂量组	10	352.40±33.40 ^{b)}	47.30±9.00 ^{b) c)}	75.09±10.10 ^{b) c)}
香砂六君子汤中剂量组	10	338.30±34.84 ^{b)}	46.40±6.83 ^{b) c)}	60.29±13.26 ^{b) c)}
香砂六君子汤低剂量组	10	326.10±33.70	36.60±4.32	45.64±10.98
莫沙必利组	10	344.30±34.10 ^{b)}	47.05±8.89 ^{b) c)}	64.07±14.79 ^{b) c)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与香砂六君子汤低剂量组比较, $P<0.05$ 。

香砂六君子汤低剂量组比较, 香砂六君子汤高、中剂量组和莫沙必利组大鼠血浆 Acly-ghrelin 水平显著升高($P<0.05$)。香砂六君子汤高、中剂量组和莫沙必利组各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠胃组织病理形态学改变

图 1 示, 各组大鼠胃组织病理形态学正常, 腺

体无萎缩, 无炎性细胞浸润。

2.4 各组大鼠胃窦组织中 mTOR、ghrelin 蛋白表达比较

图 2 示, DAPI 为核染图片, 红色为胃窦组织中 mTOR 蛋白表达, 绿色为 ghrelin 蛋白表达, Merge 为 3 张图片的融合图。

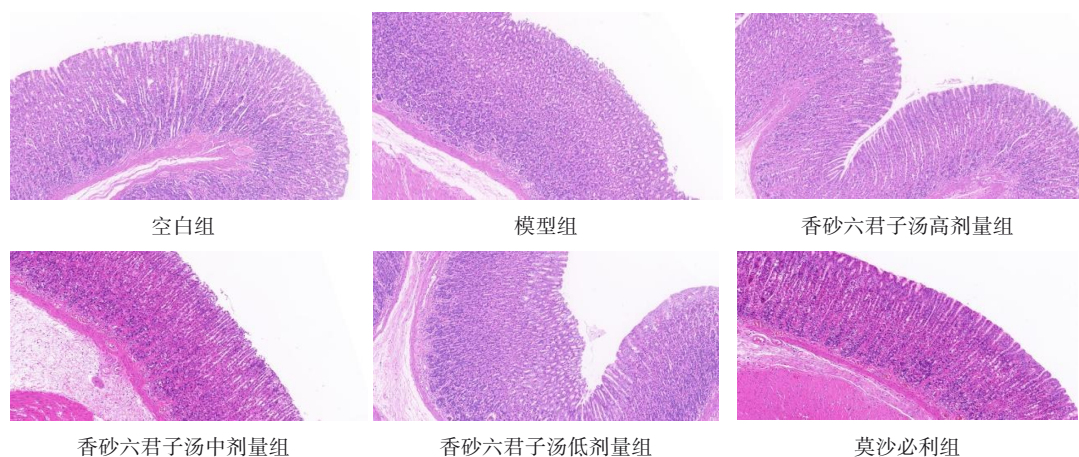
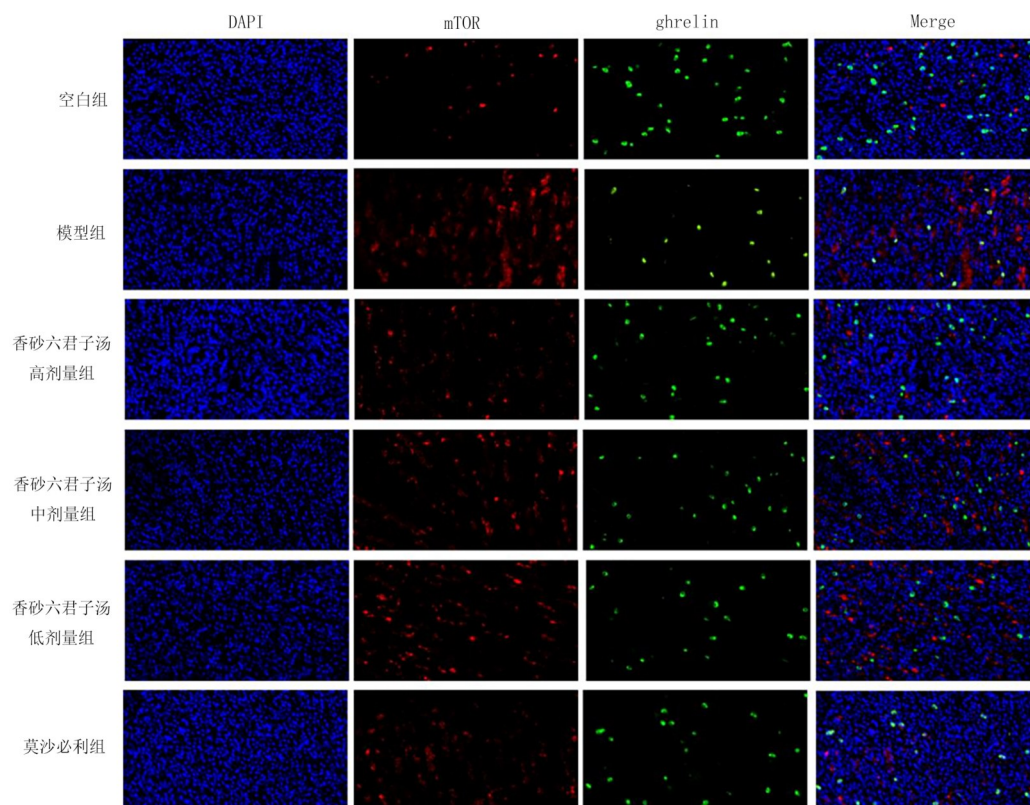


图 1 各组大鼠胃组织病理学形态 (HE, ×100)

Figure 1 Gastric histopathological morphology of rats in each group



注: mTOR, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; ghrelin, 胃生长激素释放激素。

图 2 各组大鼠胃窦组织中 mTOR、ghrelin 蛋白表达 (免疫荧光双染, ×400)

Figure 2 Expression of mTOR and ghrelin proteins in gastric antrum tissues of rats in each group

表 3 示, 与空白组比较, 模型组大鼠胃窦组织中 mTOR 蛋白表达升高, ghrelin 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与模型组和香砂六君子汤低剂量组比较, 香砂六君子汤高、中剂量组和莫沙必利组大鼠胃窦组织中 mTOR 蛋白表达降低, ghrelin 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与莫沙必利组比较, 香砂六君子汤高剂量组大鼠胃窦组织 mTOR 蛋白表达降低, ghrelin 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠胃窦组织中 mTOR、ghrelin 蛋白表达荧光面积比较
Table 3 Comparison of mTOR and ghrelin protein expression fluorescent area in gastric antrum tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	mTOR	ghrelin
空白组	3	7.28±0.87	6.38±0.61
模型组	3	14.69±1.04 ^{a)}	3.03±0.32 ^{a)}
香砂六君子汤高剂量组	3	8.75±0.81 ^{b) c) d)}	5.77±0.86 ^{b) c) d)}
香砂六君子汤中剂量组	3	10.01±0.60 ^{b) c)}	4.63±0.40 ^{b) c)}
香砂六君子汤低剂量组	3	12.83±1.16	3.52±0.46
莫沙必利组	3	9.61±0.73 ^{b) c)}	4.97±0.51 ^{b) c)}

注: mTOR, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; ghrelin, 胃生长激素释放激素。
a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与香砂六君子汤低剂量组比较, $P<0.05$; d) 与莫沙必利组比较, $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠胃窦组织中 GHSR-1a、c-kit 蛋白表达

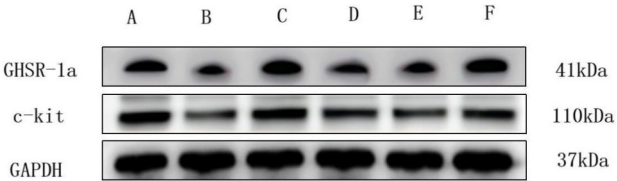
表 4 示, 与空白组比较, 模型组大鼠胃窦组织中 GHSR-1a 和 c-kit 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 香砂六君子汤高、中剂量组和莫沙必利组 GHSR-1a 和 c-kit 蛋白表达均升高 ($P<0.05$)。与香砂六君子汤低剂量组比较, 香砂六君子汤高剂量组和莫沙必利组 GHSR-1a 和 c-kit 蛋白表达均升高, 香砂六君子汤中剂量组 c-kit 蛋白表达升高 ($P<$

表 4 各组大鼠胃窦组织中 GHSR-1a、c-kit 蛋白表达比较
Table 4 Comparison of GHSR-1a and c-kit protein expression in gastric antrum tissues of rats in each group (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GHSR-1a	c-kit
空白组	3	1.00±0.07	1.00±0.03
模型组	3	0.69±0.02 ^{a)}	0.71±0.03 ^{a)}
香砂六君子汤高剂量组	3	0.95±0.04 ^{b) c)}	0.96±0.04 ^{b) c)}
香砂六君子汤中剂量组	3	0.81±0.03 ^{b)}	0.88±0.03 ^{b) c)}
香砂六君子汤低剂量组	3	0.75±0.05	0.76±0.04
莫沙必利组	3	0.88±0.03 ^{b) c)}	0.90±0.02 ^{b) c)}

注: GHSR-1a, 生长激素分泌素受体 1a。
a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与香砂六君子汤低剂量组比较, $P<0.05$ 。

0.05)。各组大鼠胃窦组织中 GHSR-1a、c-kit 蛋白表达电泳图见图 3。



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 香砂六君子汤高剂量组; D, 香砂六君子汤中剂量组; E, 香砂六君子汤低剂量组; F, 莫沙必利组; GHSR-1a, 生长激素分泌素受体 1a。

图 3 各组大鼠胃窦组织中 GHSR-1a、c-kit 蛋白表达电泳图
Figure 3 Electrophoresis of GHSR-1a and c-kit protein expression in gastric antrum tissue of rats in each group

3 讨论

根据调查约有 30% 的 FD 患者和 66% 的 PDS 患者出现胃排空延迟, 导致餐后饱胀、早饱、恶心等症状, 而胃动力抑制是导致胃排空延迟的原因, 同时也是 FD 发病的基本病因之一^[1,3]。中医学认为, 脾胃虚弱是功能性消化不良产生的重要原因之一^[18]。脾胃为后天之本, 气血生化之源, 脾虚则运化水谷不利, 气血生化乏源, 脏腑失于水谷精微濡养, 出现恶心、乏力等症状; 胃弱则受纳和腐熟能力不足, 饮食水谷无法转化为水谷精微, 积滞于肠道, 导致饱胀、早饱等症状。香砂六君子汤方中人参、白术、茯苓、炙甘草组成的四君子汤为健脾益胃之专方; 木香、砂仁相伍温化中州之湿浊, 行瘀滞之气; 陈皮与姜半夏相配燥化中州之湿浊, 理中州之气。诸药行补相和、虚实相兼, 共奏燥湿化浊之功。枸橼酸莫沙必利片临床治疗 FD 效果良好, 可以全面改善 FD 患者的胃肠动力, 提高胃肠的推动性运动^[19], 故本研究选择其为对照药物。

胃排空率和肠推进率作为反映 FD 模型大鼠胃肠动力最直接的指标, 同时也能反映 FD 的改善情况^[20]。本研究结果发现, 脾胃虚弱型 FD 模型大鼠较正常大鼠出现了体质量的减轻, 胃排空率和肠推进率的降低, 而香砂六君子汤高、中剂量和莫沙必利干预后均可增加大鼠体质量、胃排空率和肠推进率, 且香砂六君子汤中、高剂量效果并不劣于枸橼酸莫沙必利片。各组大鼠胃组织病理形态学正常, 腺体无萎缩, 无炎性细胞浸润, 说明各组大鼠胃组织并未出现病理改变, 处于胃功能性改变状态。

mTOR 广泛分布于哺乳动物体内, 参与细胞代谢、凋亡、自噬等各种生命活动, 过表达的 mTOR 会反向影响 ghrelin 的产生和活化, 进而降低大鼠的

食欲和胃动力^[10]。研究^[21-22]表明, ghrelin 在 X/A 样细胞内以去酰基化的形式产生, 由 ghrelin O-酰基转移酶 (GOAT) 活化为 Acly-ghrelin 释放到血液中并与其天然配体 GHSR-1a 结合而发挥作用。ICCs 在胃肠道产生电慢波并传递给平滑肌细胞使胃肠道发生节段性和蠕动性收缩舒张运动, 而 c-kit 是 ICCs 的标志性蛋白, 可以反映 ICCs 在胃组织中的活力^[23]。而 ghrelin 可与 ICCs 上的 GHSR-1a 受体结合, 并激活 ICCs 衍生胃肌电慢波^[8-9]。本研究结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠胃窦组织中 ghrelin、GHSR-1a、c-kit 蛋白表达及血浆 Acly-ghrelin 水平均显著降低, mTOR 蛋白表达升高; 而香砂六君子汤中、高剂量组和莫沙必利组胃窦组织中 ghrelin、GHSR-1a 和 c-kit 蛋白表达及血浆 Acly-ghrelin 水平均升高, mTOR 蛋白表达降低, 且香砂六君子汤高剂量在降低 mTOR 蛋白表达、升高 ghrelin 蛋白表达方面优于莫沙必利片。以上结果说明调节 mTOR/ghrelin/GHSR-1a 信号通路可能是香砂六君子汤治疗 FD 的作用机制之一。

综上所述, 香砂六君子汤可能通过正向调控脾胃虚弱型 FD 大鼠胃窦组织中 mTOR/ghrelin/GHSR-1a 信号通路, 活化胃窦组织中的 ICCs 细胞促进胃肠道节段性和蠕动性收缩与松弛, 改善脾胃虚弱型 FD 大鼠的胃动力进而促进胃排空, 且以中、高剂量效果更优。但是本研究也存在局限性, 如未对 ICCs 细胞进行相关研究, 其潜在生物学机制仍难以阐明, 需要进一步的研究来解决此问题。

参考文献

- [1] ENCK P, AZPIROZ F, BOECKXSTAENS G, et al. Functional dyspepsia [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17081. doi: 10.1038/nrdp.2017.81.
- [2] SHINOZAKI S, OSAWA H, SAKAMOTO H, et al. Timing and predictors of recurrence of dyspepsia symptoms after cessation of acotiamide therapy for functional dyspepsia: a long-term observational study [J]. Digestion, 2020, 101(4): 382-390.
- [3] FORD AC, MAHADEVA S, CARBONE MF, et al. Functional dyspepsia [J]. Lancet, 2020, 396(10263): 1689-1702.
- [4] 刘嘉彬, 王静, 叶振昊, 等. 从“脾虚”论治功能性消化不良机制的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(5): 827-830, 838.
- [5] 奚锦要, 朱永钦, 朱永苹, 等. 香砂六君子汤联合针刺疗法治疗功能性消化不良临床疗效观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 157-162.
- [6] 丁洪汇. 香砂六君子汤治疗功能性消化不良疗效观察 [J]. 医学信息, 2013(29): 478.
- [7] KIM JN, KIM BJ. The mechanism of action of ghrelin and motilin in the pacemaker potentials of interstitial cells of cajal from the murine small intestine [J]. Mol Cells, 2019, 42(6): 470-479.
- [8] YANG CG, LIAO ZF, QIU WC, et al. Function of ghrelin and ghrelin receptors in the network regulation of gastric motility [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(5): 2453-2458.
- [9] SANDERS KM. Spontaneous electrical activity and rhythmicity in gastrointestinal smooth muscles [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1124: 3-46. doi: 10.1007/978-981-13-5895-1_1.
- [10] XU G, LI Y, AN W, et al. Gastric mammalian target of rapamycin signaling regulates ghrelin production and food intake [J]. Endocrinology, 2009, 150(8): 3637-3644.
- [11] 张天华, 赵莎彤, 黎晓宇, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨电针对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦部 Cajal 间质细胞自噬的影响 [J]. 针刺研究, 2022, 47(12): 1060-1067.
- [12] 邓中甲. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 94.
- [13] 龙涛, 郭保君, 赵映, 等. 基于复合因素诱导功能性消化不良大鼠模型的研究评述 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 102-106.
- [14] YE Y, WANG XR, ZHENG Y, et al. Choosing an animal model for the study of functional dyspepsia [J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2018, 2018: 1531958. doi: 10.1155/2018/1531958.
- [15] 吕林, 唐旭东, 王风云, 等. 胃动力障碍型功能性消化不良动物模型的建立 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(8): 944-949.
- [16] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 202-203.
- [17] 邢建峰, 封卫毅, 侯家玉. 小鼠胃排空及小肠推进实验方法的探讨 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(4): 50-52.
- [18] 付郁, 单国顺, 尹爱凝, 等. 中西医治疗功能性消化不良研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(10): 82-85, 270.
- [19] 李兆申, 邹多武, 许国铭, 等. 枸橼酸莫沙必利片治疗功能性消化不良的临床研究 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(4): 387-390.
- [20] 杨少军, 刘建鸿, 汪亚莉, 等. 平胃消导胶囊对功能性消化不良模型大鼠胃动力的影响 [J]. 中医杂志, 2010, 51(6): 551-553.
- [21] HWANG SJ, WANG JH, LEE JS, et al. Yeokwisan, a

standardized herbal formula, enhances gastric emptying via modulation of the ghrelin pathway in a loperamide-induced functional dyspepsia mouse model [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 753153. doi: 10.3389/fphar.2021.753153.

[22] YAGI T, ASAKAWA A, UEDA H, et al. The role of

ghrelin in patients with functional dyspepsia and its potential clinical relevance (Review) [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(3):523-531.

[23] SANDERS KM, WARD SM, KOH SD. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function [J]. Physiol Rev, 2014, 94(3):859-907.

The Effect of *Xiangsha Liujunzi Decoction* (香砂六君子汤) on Regulating mTOR/ ghrelin/ GHSR-1a Pathway in Gastric Antrum Tissue of Functional Dyspepsia Rats with Spleen-stomach Weakness Syndrome

LI Runfa^{1,2}, AN Yaorong¹, BAI Min^{1,2}, MA Xiulan^{1,2}, ZHAO Linna^{1,2}, LIU Mengya^{1,2}, CHENG Yingxia³

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000; 2. Gansu University of Chinese Medicine Laboratory Animal Center; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University

ABSTRACT **Objective** To explore the intervention effect and possible mechanism of *Xiangsha Liujunzi Decoction* (香砂六君子汤, XLD) in promoting gastric emptying in rats with functional dyspepsia (FD) of spleen-stomach weakness syndrome. **Methods** Sixty suckling SD rats were randomly divided into blank group, model group, mosapride group, low-, medium- and high-dose XLD groups, with 10 rats in each group. Except for the blank group, the rats in the other groups were gavaged with iodoacetamide (IA) and sucrose solution and administered with hunger diet plus swimming exhaustion to replicate the FD rat model of spleen-stomach weakness. After the model was successfully replicated, 12, 6 and 3 g/(kg·d) of XLD and 1.35 mg/(kg·d) of mosapride citrate tablets were given to the corresponding high-, medium and low-dose XLD groups and mosapride group by gavage, respectively, while 10 ml/(kg·d) of normal saline was administered by gavage in the blank group and model group. After two weeks of continuous intervention, the body weight of rats, gastric emptying rate and intestinal propulsion rate in each group were measured. The pathological changes of gastric tissue in each group were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. The levels of mammalian target of rapamycin (mTOR), gastric growth hormone releasing hormone (ghrelin), growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR-1a), and c-kit protein expression in gastric antrum and plasma acylated gastric growth hormone-releasing hormone (Acly-ghrelin) were detected. **Results** Compared to those in the blank group, the body weight of rats, gastric emptying rate, intestinal propulsion rate, the levels of ghrelin, GHSR-1a and c-kit protein expression in the gastric antrum tissue, and plasma Acly-ghrelin level significantly decreased, while the mTOR protein expression increased in the model group ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the body weight, gastric emptying rate, intestinal propulsion rate and the levels of ghrelin, GHSR-1a and c-kit protein expression in gastric antrum tissue and plasma Acly-ghrelin of rats in the high- and medium-dose XLD group and mosapride group significantly increased, while the level of mTOR protein significantly decreased ($P < 0.05$). Compared to the mosapride group, the high-dose XLD group had increased ghrelin protein expression in the gastric antrum tissue and decreased mTOR protein expression ($P < 0.05$). HE staining showed that the pathological morphology of the gastric tissues of rats in each group was normal, and the glands did not atrophy, with no inflammatory cell infiltration. **Conclusion** Medium- and high-dose XLD can significantly improve gastric emptying in FD rats with spleen-stomach weakness. The mechanism may be related to the positive regulation of mTOR/ ghrelin/ GHSR-1a signaling pathway by XLD.

Keywords functional dyspepsia; spleen-stomach weakness; *Xiangsha Liujunzi Decoction* (香砂六君子汤); gastric emptying; mTOR/ ghrelin/ GHSR-1a signaling pathway

(收稿日期: 2022-10-12; 修回日期: 2023-01-31)

[编辑: 邓媛]