

柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠内质网应激相关分子 IRE1 和 TRAF2 表达的影响

徐宽¹, 凌江红^{1,2}, 周洲¹, 张丽敏¹, 张钰琴¹, 谢天一¹, 王煜姣¹

摘要 目的 柴胡疏肝散对功能性消化不良(FD)大鼠胃窦组织内质网应激因子肌醇需求酶1(IRE1)、肿瘤坏死因子受体相关因子2(TRAF2)的影响。方法 将30只大鼠随机均分为5组:柴胡疏肝散组、多潘立酮组、生理盐水组、模型组、正常组。正常组大鼠正常饲养,模型组只夹尾不灌药,其余组给予对应的液体灌胃。造模过程中,记录大鼠生活状态的变化。干预1个月后,测定大鼠胃排空率,免疫组织化学法观察各组IRE1、TRAF2蛋白表达情况,用逆转录PCR测定胃窦组织IRE1、TRAF2 mRNA的表达。结果 生理盐水组、模型组胃排空率较正常组降低($P < 0.05$),柴胡疏肝散组和多潘立酮组胃排空率较模型组增高($P < 0.05$)。与正常组大鼠比较,模型组和生理盐水组IRE1、TRAF2蛋白水平明显上调;与模型组对比,各给药组的IRE1、TRAF2蛋白呈下调趋势($P < 0.05$)。RT-PCR显示柴胡疏肝散组和多潘立酮组的IRE1、TRAF2 mRNA的表达较模型组降低,而模型组IRE1、TRAF2 mRNA的表达比正常组高($P < 0.05$)。结论 柴胡疏肝散通过抑制内质网应激分子IRE1和TRAF2来促进FD大鼠的胃动力。

关键词 柴胡疏肝散;功能性消化不良;内质网应激;IRE1;TRAF2

中图分类号 R 259

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)04-0516-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.005

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)包括餐后饱胀不适、早饱、上腹痛或上腹部烧灼感等症状,是指发生在胃和十二指肠没有任何系统性、代谢性和器质性疾病的一种或多种消化不良症状^[1]。临床上关于FD的治疗还没有有效方法,对FD的防治成为亟待解决的课题。内质网应激可以通过处理内质网中未折叠蛋白或错误折叠蛋白的堆积来维持细胞的正常功能,是内质网中的自我代偿过程^[2]。

2017-12-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81560763);上海市浦东新区卫生系统重点学科建设资助(编号:PWZXK2017-02)

作者单位:¹广西医科大学第一附属医院中医科,南宁 530021

²上海健康医学院附属周浦医院,上海 201318

作者简介:徐宽,男,硕士研究生;

凌江红,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: 459183870@qq.com

疾病的发生发展与内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)有密切关系,通过调节ERS来防治疾病已成为研究热点。柴胡疏肝散源自《景岳全书》是疏肝理气法的代表方剂。本课题组既往研究^[3-4]显示柴胡疏肝散能够改善FD大鼠的胃动力,其机制可能与增强细胞活性和减少自噬有关,但是对于FD大鼠改善胃动力的深层机制尚不清楚。本研究从调控ERS角度来进一步探讨柴胡疏肝散防治FD的机制,通过观察ERS相关因子的变化,为柴胡疏肝散防治FD提供更深入的实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠30只,雌雄各半,体重(250±20)g,由广西医科大学实验动物中心提供。实验前适应性喂养1周后,按随机数字表法分为正常组、模型组、生理盐水组、柴胡疏肝散组及多潘立酮组,每组6只。SPF级环境饲养,温度(22±3)℃,湿度50%,明暗交替12h。

1.2 药物 柴胡疏肝散(组成:柴胡6g,陈皮6g,香附4.5g,川芎4.5g,枳壳4.5g,白芍4.5g,甘草1.5g)及多潘立酮(10mg/片,西安杨森制药有限公司生产,批准文号:150324778)均购于广西医科大学第一附属医院药房。柴胡疏肝散浓度参考徐叔云等主编的《药理实验方法学》第三版^[5],按照普通成人(60kg/人)临床用量的3倍,以1:5的容积比用蒸馏水泡30min,煎煮2次(30min/次),过滤,去渣取汁,合并滤液加热蒸发,制成0.32g/ml水煎浓缩液,4℃保存备用;多潘立酮按成人(60kg/人)临床用量的3倍,用蒸馏水制成浓度为0.30mg/ml。

1.3 营养性半固体糊的制备 羧甲基纤维素2.5g溶于62.5ml蒸馏水中,分别加入4g奶粉、2g糖、2g淀粉,搅拌均匀,配制成73ml的营养半固体糊。4℃保存备用,用时恢复至室温。

1.4 试剂 内质网应激因子肌醇需求酶1(inositol-requiring enzyme 1, IRE1)一抗、肿瘤坏死因子受体相关因子2(TNF receptor associated factor 2, TRAF2)

一抗均购自 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记二抗、浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; RNAiso Plus、SYBR Premix 试剂盒购自 TaKaRa 公司; 逆转录试剂盒购自 Thermo 公司; 引物设计合成由上海生物工程有限公司负责。IRE1 上游引物: 5'-GAC CGG CAG TTG CAG TAC AT-3', 下游引物: 5'-TGG TCT GAT GAA GCA AGG TG-3', 扩增长度为 118 bp; TRAF2 上游引物: 5'-GGC TTC TCC AAG ACC CTT CT-3', 下游引物 5'-CAG GCA GAA GGA GCA GTA GC-3', 扩增长度为 123 bp; GAPDH 上游引物: 5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G-3', 下游引物: 5'-ATG GTG GTG AAG GCG CCA GTA-3', 扩增长度为 143 bp。

1.5 仪器 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), 普通 PCR 扩增仪(美国 Bio-rad 公司), 超微量样本分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司), 正置荧光相差微成像显微镜(日本 OLYMPUS 公司), 凝胶成像分析仪(美国 Bio-rad 公司)。

1.6 方法

1.6.1 动物模型制备 30 只 SD 大鼠, 随机分为正常组、模型组、生理盐水组、柴胡疏肝散组及多潘立酮组, 每组 6 只, 雌雄各半, 每 6 只一笼。参照改良夹尾刺激法^[6]制造 FD 大鼠模型, 即用纱布包裹止血钳轻度钳夹大鼠尾部中后 1/3 处, 立即放开, 每次 30 min 2 次/d 持续 4 周。除正常组、模型组外, 其余各组于造模同一天分别给予 0.9% NaCl、柴胡疏肝散煎剂及多潘立酮灌胃, 1.5 ml/100 g, 早晚各 1 次, 间隔 12 h, 连续给药 4 周。

1.6.2 标本收集 在实验第 28 天各组大鼠禁食不禁水 24 h, 第 29 天各组大鼠予以半固体糊灌胃, 30 min 后将大鼠予 10% 水合氯醛腹腔麻醉, 剖腹, 结扎贲门和幽门。迅速剪取全胃, 用滤纸拭干, 称取重量为全胃重量, 沿胃大弯剪开胃体, 观察胃残留食物情况及黏膜表面有无肿胀、潮红、糜烂、溃疡及其他器质性病变, 并用冷生理盐水洗净胃内容物, 滤纸拭干, 再次称取重量为空胃重量。最后取距幽门 0.5 cm 的胃窦组织分为两份, 一份用 4% 多聚甲醛固定, 用于免疫组化检测; 另外一份放入冻存管中快速液氮保存, 再转移到 -80 °C 冻存, 待后续 Real-time PCR 指标检测。

1.6.3 胃排空率测定 胃排空率 = 1 - (全胃重量 - 空胃重量) / 所灌固体糊重量 × 100%。

1.6.4 免疫组化检测胃窦组织 IRE1、TRAF2 蛋白的表达 取经 4% 多聚甲醛固定的胃窦组织, 制作

石蜡切片。按照免疫组化法说明书检测 IRE1 及 TRAF2 蛋白的表达, 镜检显色呈棕黄色者为阳性表达。每只大鼠观察 2 张切片, 每张切片在 400 倍显微镜下选取 5 个互不重叠视野, 采用正置荧光相差微成像显微镜及其图像采集系统采集图片, 并以 Image-ProPlus6.0 图像分析软件分析图片, 测量积分光密度(IOD) 值, 取均值作为结果。

1.6.5 Real-time PCR 检测胃窦组织 IRE1、TRAF2 mRNA 的表达 应用 TRIzol 法提取胃窦组织总 RNA, 用紫外分光光度计测定各组样品纯度。按反转录试剂盒说明书操作, 以 20 μl 为体系将总 RNA 转录成单链, -20 °C 保存备用。进一步以模板(20 μl) + 上/下游引物(各 1 μl) + 无核酸酶超纯水(6 μl) 的反应体系, 上荧光定量 PCR 仪进行扩增反应, 95 °C 预变性 2 min, 继以 95 °C 变性 20 s, 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 如此反复 40 个循环后, 结束后 4 °C 保存, 每个循环结束后, 采集荧光信号。每个样品设立 3 个复孔重复。结果采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生活状态、组织学变化 大鼠在造模初期生活状态良好, 发育正常, 各组之间无明显差异。造模 1 周之后, 除正常组外, 其他组大鼠开始出现扎堆现象, 毛发杂乱, 情绪暴躁易激怒, 夹尾大鼠体质量明显低于正常组大鼠。造模结束, 解剖胃组织, 可见胃窦表面光滑, 有褶皱, 无黏膜出血、溃疡、肿胀、潮红器质性改变。

2.2 药物干预后胃排空率的比较 与模型组和生理盐水组比较, 柴胡疏肝散组和多潘立酮组胃排空率均显著升高 ($P < 0.05$), 与正常组比较, 模型组、生理盐水组胃排空率显著减低 ($P < 0.05$), 各组 F 值: 13.25。见表 1。

表 1 各组大鼠胃排空率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	胃排空率
柴胡疏肝散	52.68 ± 5.69*
多潘立酮	56.25 ± 2.54*
生理盐水	11.60 ± 3.53 [#]
模型	13.97 ± 3.39 [#]
正常	69.83 ± 2.41

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与正常组比较: [#] $P < 0.05$

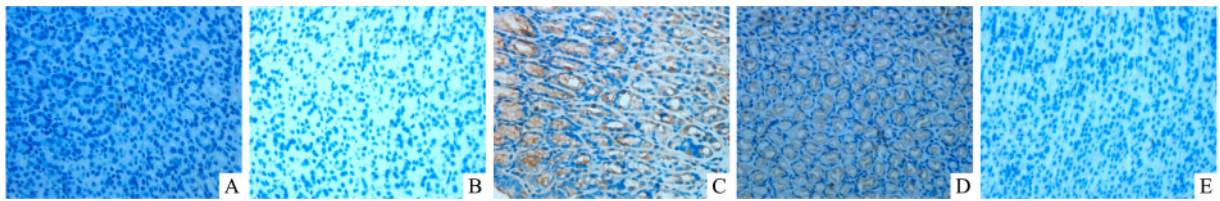


图1 IRE1 蛋白在各组大鼠胃窦的表达 免疫组织化学染色 ×400
A 柴胡疏肝散组; B 多潘立酮组; C 生理盐水组; D 模型组; E 正常组

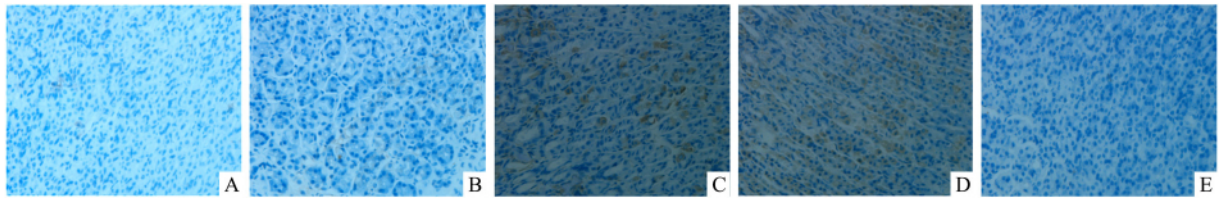


图2 TRAF2 蛋白在各组大鼠胃窦的表达 免疫组织化学染色 ×400
A 柴胡疏肝散组; B 多潘立酮组; C 生理盐水组; D 模型组; E 正常组

2.3 各组大鼠胃窦组织 IRE1 及 TRAF2 蛋白表达

IRE1、TRAF2 蛋白阳性表达为胞质染棕色,免疫组化显示 柴胡疏肝散组、多潘立酮组胞质偶见少许棕色,生理盐水组、模型组阳性染色明显,片状浓染分布于胞质,见图 1、2。与模型组相比,柴胡疏肝散组和多潘立酮组 IRE1、TRAF2 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$),IRE1 中 F 值: 10.41,TRAF2 中 F 值: 15.18。各组结果见表 2。

表 2 各组大鼠胃窦组织 IRE1、TRAF2 蛋白表达量的比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	IRE1(IOD 值)	TRAF2(IOD 值)
柴胡疏肝散	2 803.11 ± 966.67*	1 000.27 ± 163.50*
多潘立酮	3 818.90 ± 820.86*	1 064.98 ± 119.52*
生理盐水	99 920.40 ± 1 569.99 Δ	53 031.22 ± 9 954.09 Δ
模型	71 437.32 ± 14 458.74 Δ	34 268.24 ± 9 806.26 Δ
正常	227.72 ± 111.42	258.34 ± 64.16

与正常组比较: $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

2.4 各组大鼠胃窦组织 IRE1 及 TRAF2 的 mRNA 表达

如图 3 所示,RT-PCR 检测结果显示,在 143 bp 处可见 GAPDH 的条带。生理盐水组、模型组在 118 bp 和 123 bp 处分别可见 IRE1 和 TRAF2 扩增条带,其余组只有微量的表达。相比正常组,模型组和生理盐水组的 IRE1、TRAF2 mRNA 的表达均升高 ($P < 0.05$);相比模型组,治疗组 IRE1、TRAF2 mRNA 表达下降的更为明显,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

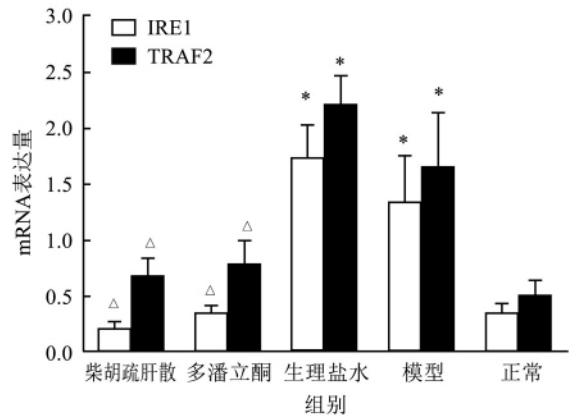
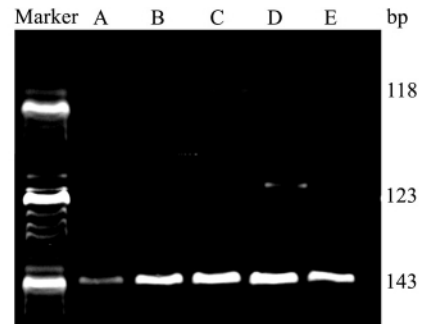


图3 各组大鼠胃窦组织 IRE1、TRAF2 mRNA 的实时定量 PCR 电泳结果及相对表达量

A 柴胡疏肝散组; B 多潘立酮组; C 生理盐水组; D 模型组; E 正常组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

3 讨论

FD 作为消化系统常见疾病,严重影响着人类正常的生活和健康。在对 1 016 个健康中国人的随机调查中显示: 239 例患有 FD,其中有 93 例被不同程

度的抑郁和焦虑困扰^[7]。怎样有效地预防与治疗该疾病越来越受到医学界的关注。中医在防治 FD 方面有其独特的优势,临床上应用柴胡疏肝散治疗 FD 取得了不错的效果^[8]。

ERS 是把双刃剑,它可以通过自己的代偿作用消除对机体不利的影 响,但是当自身代偿不足以维持内质网稳态时,通过细胞凋亡或细胞自噬途径,细胞会发生损伤甚至死亡^[9]。内质网腔中蓄积的或错误折叠的蛋白可通过自噬或凋亡被清除。这个过程的发生离不开内质网应激分子 IRE1 的参与,ERS 促使 IRE1 与 GRP78 分离,通过二聚化和转磷酸化使 IRE1 的核酸内切酶活性被激活,可招募接头分子 TRAF2,并可后续引起细胞自噬或凋亡等其他变化,造成 FD 的发生^[10-11]。本研究显示,与正常组大鼠比较,模型组胃窦的 IRE1 和 TRAF2 蛋白与 mRNA 表达明显增高,说明 FD 大鼠的 IRE1 信号通路被激活。

研究表明,与正常组比较,模型组大鼠的胃排空率偏低,说明造模使大鼠发生了胃肠动力障碍,大鼠胃窦无溃疡、肿胀、潮红改变,伴有情绪暴躁易怒、体重减轻,说明 FD 造模成功。柴胡疏肝散立足肝脾胃,常用于治疗合并有胁肋疼痛、情志抑郁易怒、胸闷喜太息、或噎气、腹胀痞满等症状的患者。柴胡疏肝散在临床上已广泛应用于治疗 FD、肠易激综合征等胃肠动力障碍疾病,对这类疾病有明显的改善作用^[12-14]。关于柴胡疏肝散对 FD 大鼠内质网应激相关分子 IRE1 和 TRAF2 表达的影响,相关文献报道较少。该研究在 FD 造模成功基础上,发现复方柴胡疏肝散可以提高 FD 大鼠的胃排空率,同时 RT-PCR 和免疫组化结果显示该药物可以降低大鼠胃窦组织中 IRE1、TRAF2 基因和蛋白的表达,说明其可以抑制 IRE1、TRAF2 的过度表达,改善内质网应激,从而提高胃肠道细胞活力,来达到缓解 FD 的

作用。

参考文献

- [1] Tack J, Talley N J, Camilleri M, et al. Functional gastroduodenal disorders [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(5): 1466-79.
- [2] Breckenridge D G, Germain M, Mathai J P, et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8608-18.
- [3] 张智, 凌江红, 宁海恩, 等. 柴胡疏肝散含药血清对大鼠胃间质细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(30): 4792-9.
- [4] 邓静, 凌江红, 曾丽君, 等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃间质细胞增殖及其超微结构的影响 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(4): 1410-7.
- [5] 徐叔云, 卞如瀛, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-4.
- [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): 210-4.
- [7] 吴柏瑶, 张法灿, 梁列新. 功能性消化不良的流行病学 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2013, 22(1): 85-92.
- [8] 杨建军, 赵广利, 柯彤. 柴胡疏肝散对功能性消化不良患者胃动力及胃肠激素的影响 [J]. *吉林中医药*, 2013, 33(8): 801-3.
- [9] 马光斌, 陆伦根. 内质网应激的细胞效应分子机制 [J]. *生命科学*, 2012, 24(3): 287-91.
- [10] Han D, Lerner A G, Vande W L, et al. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates [J]. *Cell*, 2009, 138(3): 562-75.
- [11] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor [J]. *Cell*, 2002, 107(7): 881-91.
- [12] 金连宁, 甘淳, 何丽华. 柴胡疏肝散加减治功能性消化不良肝胃不和证 36 例 [J]. *江西中医药*, 2012, 43(1): 19-20.
- [13] 郭庆广. 柴胡疏肝散加减治疗功能性消化不良 110 例 [J]. *中医临床研究*, 2016, 8(5): 88-9.
- [14] 朱丹薇. 中医药治疗功能性消化不良研究进展 [J]. *河南中医*, 2014, 34(12): 2504-5.

Effect of Chaihushugansan decoction on expression of endoplasmic reticulum stress-related molecules IRE1 and TRAF2 in functional dyspepsia rats

Xu Kuan¹, Ling Jianghong^{1,2}, Zhou Zhou¹, et al

¹Dept of Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021;

²The Affiliated Zhoupu Hospital, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318)

Abstract Objective To investigate the effects of Chaihushugansan decoction on the expression of endoplasmic reticulum stress-related molecules inositol-requiring enzyme 1(IRE1) and TNF receptor associated factor 2(TRAF2)

miR-155-5p 慢病毒载体的构建及其对正常胃上皮增殖的影响

宋乐, 任海风, 刘亚坤, 姜玉, 赵荣荣, 魏道严, 汪思应

摘要 目的 构建过表达 miR-155-5p 慢病毒表达载体, 建立稳定过表达 miR-155-5p 的 GES-1 胃上皮细胞株。在细胞水平上观察细胞增殖能力的变化。方法 第一部分: PCR 扩增获得 miR-155-5p 基因片段; 将该基因片段与已线性化的病毒载体连接; 将重组质粒转化到 DH5 α 细胞, 进行克隆分离、质粒 DNA 提取和 DNA 测序。第二部分: 序列证实了的 GV-369-has-miR-155-5p 载体和 pHelper 1.0 以及 pHelper 2.0 载体共同转染到 293-T 细胞, 用于慢病毒的包装, 然后进行慢病毒收获、浓缩与纯化。将纯化的 miR-155-5p 慢病毒用来感染细胞, 经过嘌呤霉素筛选后建立稳定过表达 miR-155-5p 的 GES-1 细胞株。qRT-PCR 检测细胞株中 miR-155 表达; Western blot 检测 KLF4 蛋白表达及 MTT 法检测稳定表达 miR-155-5p 细胞的增殖。结果 过表达 miR-155-5p 的重组慢病毒构建成功; miR-155 在恶性程度较高的 SGC-7901 胃癌细胞株中高表达 ($P < 0.05$); 建立了 miR-155-5p 稳定过

表达的 GES-1 细胞株; 过表达 miR-155-5p 抑制 GES-1 细胞中 KLF4 蛋白表达 ($P < 0.05$), 且促进细胞增殖。结论 miR-155 可能通过负向调控 KLF4 表达, 参与调控胃癌发生发展。

关键词 慢病毒载体; 聚合酶链式反应技术; 微小 RNA; 胃癌细胞

中图分类号 R 363.2+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)04-0520-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.006

在我国, 胃癌高发是疾病致死的主要原因之一。据 2015 年我国癌症统计报告, 癌症发病达到 429.2 万/年, 死亡病例高达 281.4 万^[1]。胃癌的发生是环境与宿主基因等多种因素共同作用的结果^[2]。慢性胃炎是胃癌形成最危险的因素。miRNA 是宿主基因表观遗传学重要的调控因素。据报道 miR-155 是介导炎症和肿瘤的重要桥梁之一, 在白血病细胞和实体瘤中高表达^[3]。但胃肿瘤中 miR-155 如何与宿主基因相互作用, 需要进一步探讨。

Kruppel 样因子 (kruppel-like factor, KLF) 家族是含有代表性的三个 C2H2 锌指样转录区域的锌指蛋白类转录因子, 包括 SP1 样和 KLF 样家族在内的 25 个家庭成员。KLF4 又称为胃肠富集 KLF

2018-01-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81472330)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院病理学与病理生理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 宋乐, 女, 硕士研究生;

魏道严, 男, 副教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: daoyan_wei@yahoo.com;

汪思应, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

in the antrum of rats with functional dyspepsia. **Methods** Thirty rats were randomly divided into the groups of Chaihushugansan, domperidone group, saline group, model group, normal control group. Rats in the normal control group were administrated with normal breeding, model group only clip tail without intragastric administration, while the others were gavaged with corresponding drugs. Life state of the rats were observed in the process of building. After 4 weeks of intervention, gastric emptying rate of rats were recorded. The mRNA level and protein level of IRE1, TRAF2 in the gastric antrum were detected with RT-PCR and immunohistochemistry respectively. **Results** The gastric emptying of model group, saline group decreased compared with that of normal control group ($P < 0.05$); the gastric emptying rate of domperidone group and Chaihushugansan group increased significantly compared with that of model group ($P < 0.05$). The mRNA level of IRE1, TRAF2 and protein levels of IRE1, TRAF2 in model group and saline group significantly increased compared with that of normal control group; The mRNA level of IRE1, TRAF2 and protein levels of IRE1, TRAF2 in domperidone group, the group of Chaihushugansan decreased compared with that of model group. **Conclusion** Chaihushugansan can promote the functional dyspepsia rats stomach power, which may be related to the inhibition of endoplasmic reticulum stress-related molecules IRE1 and TRAF2.

Key words Chaihushugansan; functional dyspepsia; endoplasmic reticulum stress; IRE1; TRAF2