

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20241202001

基于 KEAP1/PGAM5/AIFM1 介导的氧死亡途径探讨柴胡疏肝散治疗功能性消化不良大鼠的作用机制

叶丽亚·叶尔太¹, 贾庆玲¹, 王香香², 刘雪娇¹, 贾越博¹, 凌江红¹

1. 上海中医药大学附属曙光医院(上海 201203); 2. 上海中医药大学(上海 201203)

【摘要】 目的 探讨柴胡疏肝散对功能性消化不良(FD)大鼠 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1(KEAP1)/磷酸甘油酸变位酶 5(PGAM5)/线粒体凋亡诱导因子 1(AIFM1)通路及氧死亡的影响,探索其治疗 FD 的可能机制。方法 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、柴胡疏肝散组、活性氧(ROS)抑制剂组及柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组,每组 8 只。夹尾应激法构建 FD 大鼠模型,给予相应干预后,半固体糊法检测各组大鼠胃排空率及小肠推进率;苏木精-伊红(HE)染色法观察胃窦组织病理变化;透射电子显微镜(TEM)观察胃肠 Cajal 间质细胞(ICC)超微结构;化学荧光法检测线粒体 ROS、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量;免疫荧光共定位法检测 KEAP1 与 PGAM5 表达;Western blot 法检测氧死亡通路相关蛋白 KEAP1、PGAM5、AIFM1、磷酸化 AIFM1(p-AIFM1)及核因子 E2 相关因子 2(NRF2)的表达。结果 与正常组比较,模型组胃排空率及小肠推进率明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);线粒体 ROS、MDA 含量显著升高($P<0.01$),SOD 含量显著降低($P<0.01$);KEAP1 与 PGAM5 共定位表达显著降低($P<0.01$);KEAP1、AIFM1、PGAM5 蛋白表达均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),NRF2、p-AIFM1 蛋白表达明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,柴胡疏肝散组及柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组胃排空率及小肠推进率显著提高($P<0.05$, $P<0.01$);线粒体 ROS、MDA 含量显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),SOD 含量显著升高($P<0.05$);KEAP1 与 PGAM5 共定位表达显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);KEAP1、PGAM5、AIFM1 蛋白表达均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),NRF2、p-AIFM1 蛋白表达显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 柴胡疏肝散可能通过降低 ROS 水平抑制 KEAP1/PGAM5/AIFM1 介导的 ICC 线粒体氧死亡,促进大鼠胃肠动力,从而治疗 FD。

【关键词】 功能性消化不良;柴胡疏肝散;经典名方;氧死亡;活性氧;大鼠模型

Exploration of mechanism of Chaihu Shugan Powder in treatment of functional dyspepsia in rats based on KEAP1/PGAM5/AIFM1-mediated oxeiptosis pathway

YELIYA Yeertai¹, JIA Qingling¹, WANG Xiangxiang², LIU Xuejiao¹, JIA Yuebo¹, LING Jianghong¹1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To explore the effects of Chaihu Shugan Powder on the KEAP1/PGAM5/AIFM1 signal pathway and oxeiptosis in a functional dyspepsia (FD) rat model, and to discover its potential therapeutic mechanism in treating FD. **Methods** SD rats were randomly divided into five groups: normal control group, model group, Chaihu Shugan Powder group, reactive oxygen species (ROS) inhibitor group, and a combination of Chaihu Shugan Powder + ROS inhibitor group, with 8 rats in each group. The FD rat model was established using the tail-clamping stress method. The corresponding intervention was given. Gastric emptying and small intestinal transit rates of rats in each group were assessed using the semi-solid paste method. Histopathological changes in the gastric antrum were evaluated via hematoxylin-eosin (HE) staining, while the ultrastructure of gastrointestinal Cajal interstitial cells (ICC) was observed through transmission electron microscopy (TEM). Mitochondrial ROS, malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) contents were measured by chemical fluorescence method. Immunofluorescence co-localization was used to determine the expressions of KEAP1 and PGAM5. Western blot was performed to analyze the protein expressions related to the oxeiptosis pathway

[KEAP1, PGAM5, AIFM1, phosphorylated AIFM1 (p-AIFM1) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)]. **Results** Compared with the normal control group, the model group exhibited significantly reduced gastric emptying and small intestinal transit rates ($P<0.05$, $P<0.01$), along with elevated mitochondrial ROS and MDA contents ($P<0.01$), and decreased SOD content ($P<$

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174309)

[作者简介] 叶丽亚·叶尔太,女,硕士研究生,主要从事胃肠病的中医药治疗研究工作

[通信作者] 凌江红,教授,博士研究生导师;

E-mail:ljh18817424778@163.com

0.01); KEAP1 and PGAM5 co-localization was significantly reduced ($P<0.01$); KEAP1, AIFM1, and PGAM5 protein expressions were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and NRF2 and p-AIFM1 expression were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the gastric emptying rate and intestinal propulsive rate were significantly increased in the Chaihu Shugan Powder group and the Chaihu Shugan Powder+ROS inhibitor group ($P<0.05$, $P<0.01$); The contents of mitochondrial ROS and MDA were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the content of SOD was significantly increased ($P<0.05$). The co-localization of KEAP1 and PGAM5 was significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expressions of KEAP1, PGAM5, and AIFM1 were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the protein expressions of NRF2 and p-AIFM1 were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusions** Chaihu Shugan Powder may inhibit KEAP1/PGAM5/AIFM1-mediated mitochondrial oxeiptosis in ICC by reducing ROS level, and promote gastrointestinal motility in rats, thus treating FD.

Keywords: functional dyspepsia; Chaihu Shugan Powder; classic famous formula; oxeiptosis; reactive oxygen species; rat model

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是临床上常见的一种功能性胃肠道疾病,其典型症状包括上腹部疼痛、灼热感、进餐后腹胀及早饱等症状^[1]。根据FD主要症状,中医多将其归属为“痞满”“胃脘痛”范畴,《伤寒论》记载“满而不痛者,此为痞”。叶天士在《临证指南医案》中提出“肝为起病之源,胃为传病之所”,表明其主要病位在胃,涉及肝脾^[2]。情志失调,郁怒伤肝而致肝气不畅,进而扰乱气机,肝气上逆犯胃,常有腹胀、脘腹疼痛等症状,所以FD的治疗以疏肝解郁、和胃消痞为治则。FD的发病机制复杂,与胃肠动力障碍及精神心理障碍等相关^[3-5],目前对FD的治疗主要以对症治疗为主,例如使用促动力药和抗抑郁药等,然而病情易反复发作,严重影响日常生活。经典名方柴胡疏肝散主治肝郁气滞,具有疏肝解郁、行气止痛之效,对胃脘痛和胀满有明显改善作用,显示出其在FD治疗中的临床应用价值^[6]。

胃肠Cajal间质细胞(ICC)可以调节胃肠道平滑肌节律性收缩^[7]。研究^[8-9]表明,ICC线粒体发生氧化应激会引起ICC数量减少,会导致胃肠道运动障碍,活性氧(ROS)过度生成是氧化应激核心诱因^[10]。近年来,由ROS诱导的氧死亡作为一种新的非程序性细胞死亡方式,依赖Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(KEAP1)/磷酸甘油酸变位酶5(PGAM5)/线粒体凋亡诱导因子1(AIFM1)与KEAP1/核因子E2相关因子2(NRF2)等多条信号通路调控^[11],其具体表现为由高浓度ROS过度激活的KEAP1通过PGAM5去磷酸化AIFM1第116位的丝氨酸残基,自发性诱导氧死亡的发生。

本研究团队前期研究^[12-17]结果表明,柴胡疏肝散能显著促进FD大鼠胃动力,其机制与调控ICC密切相关,包括显著降低ICC线粒体ROS水平、减轻线粒体氧化应激损伤。本研究拟建立FD大鼠模型,探讨柴胡疏肝散是否通过降低ROS水平,进而调控KEAP1/PGAM5/AIFM1信号通路减少ICC线粒体氧死亡,改善胃肠道动力障碍,并揭示其可能的治疗作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 40只SPF级SD雄性大鼠,6~8周龄,体质量为(200±20)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0004。动物使用许可证号:SYXK(沪)2020-0009。大鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心,相对湿度53%~57%,温度22~24℃,且遵循12h/12h的明暗交替周期,常规进食。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审批(伦理批号:PZSHUTCM2307240006)。

1.1.2 药物与试剂 柴胡疏肝散由北柴胡12g,白芍9g,川芎9g,枳壳9g,陈皮12g,香附9g,炙甘草3g组成;中药饮片均来自上海中医药大学附属曙光医院中药药房,批号分别为20230807、20230803、20230809、20230804、20230809、20230806、20230811。首次煎煮前,药材浸于蒸馏水30min,大火煮沸15min,转小火再煎30min,双层滤网过滤;二次煎煮30min后,合并药液,水浴浓缩至0.48g/mL,冷藏于4℃以备用。

线粒体提取试剂盒(批号:SM0020),北京索莱宝科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒,放射免疫沉淀法(RIPA)蛋白强裂解液,磷酸酶抑制剂(批号分别为C0105S、P0013B、P1081),上海碧云天生物科技有限公司;蛋白酶体抑制剂、ROS抑制剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)(批号分别为HY-K0010、HY-B0215),美国MCE公司;十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)试剂盒(批号:PG004),上海雅酶生物医药科技有限公司;灵敏型电化学发光(ECL)试剂(批号:SB-WB004),上海圣尔生物有限公司;NRF2、PGAM5、KEAP1、AIFM1抗体(批号分别为80593、68116、60027、67791),武汉三鹰生物技术有限公司;磷酸化AIFM1(p-AIFM1)抗体(批号:AP5501),美国ECM公司;β-肌动蛋白(β-actin)(批号:4090T),美国Cell Signaling Technology公司。

1.1.3 主要仪器 化学发光仪(型号:Fluor Chem),美国ProteinSimple公司;激光共聚焦显微镜、超薄切片机

(型号分别为 Leica SP8、705902), 德国 Leica 公司; 全自动酶标仪(型号: ELX-800), 美国 BioTek 公司; 电泳仪(型号: 164-5050), 美国 Bio-Rad 公司; 湿转槽(型号: TanonEPS600), 上海天能科技有限公司。

1.2 分组及造模 将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、ROS 抑制剂组、柴胡疏肝散组和柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组, 每组 8 只。除正常组外, 其余各组大鼠采用改良的夹尾刺激法构建 FD 模型^[18]: 通过使用海绵夹轻夹大鼠尾部 1/3 处随即释放, 确保不造成皮肤破损, 以此激发大鼠的愤怒情绪并促使其与同类发生冲突, 每次持续 30 min, 2 次/d, 持续 4 周。模型成功的标准是胃窦组织未观察到任何器质性病变的同时胃排空率显著降低^[19]。

1.3 干预方法 每天造模结束后进行灌胃, 依据人与动物体表面积换算的等效剂量进行干预^[20]。正常组、模型组及 ROS 抑制剂组给予 0.9% 氯化钠溶液灌胃 [10 mL/(kg·d)], 柴胡疏肝散组和柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组每次给予柴胡疏肝散(4.8 g/kg)灌胃^[21](2 次/d), 连续 4 周。ROS 抑制剂组及柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组在第 21~28 天给予 140 mg/(kg·d) NAC 连续腹腔注射^[22]。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 大鼠一般情况的观察 造模期间, 监测各组大鼠进食、情绪、攻击行为、粪便形态及体质量等状况。

1.4.2 半固体糊法检测胃排空率与小肠推进率 造模结束后, 半固体米糊(羧甲基纤维素钠 5 g, 脱脂奶粉 8 g, 淀粉 4 g, 糖 4 g)灌胃 30 min 后处理大鼠并取出全胃, 剥离肠管, 称量全胃、空胃以及剩余糊料的质量, 并用直尺分别测量小肠的总长度以及碳粉末推进的长度。胃排空率计算公式^[23]: 胃排空率=[1-(全胃质量-空胃质量)/半固体糊质量]×100%。小肠推进率的计算公式^[24]: 小肠推进率=碳粉末推进长度/小肠总长度×100%。

1.4.3 胃窦组织病理学分析 取各组大鼠的胃窦组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 经乙醇梯度脱水后石蜡固定, 制备厚约 4 μm 的切片, 脱蜡后染色, 封片后用光学显微镜对各组大鼠的胃窦组织形态观察并记录。

1.4.4 胃窦组织 ICC 超微结构分析 观察各组大鼠的

胃窦组织样本经体积分数 2.5% 戊二醛固定后, 不同浓度乙醇脱水并包埋切片, 透射电子显微镜(TEM)观察 ICC 线粒体形态及细胞核特征并记录。

1.4.5 胃窦组织免疫荧光共定位分析 将各组胃窦组织切片进行脱蜡处理后, 采用柠檬酸缓冲液进行抗原修复并用体积分数 10% 牛血清蛋白封闭, 加入一抗(KEAP1 与 PGAM5, 1:800)并于 4 °C 下过夜孵育, 荧光二抗稀释至 1:200, 暗室常温孵育 1 h 后, 抗猝灭剂封片, 用共聚焦显微镜检测 KEAP1 与 PGAM5 的共定位表达, 记录荧光信号强度并计算皮尔逊系数。

1.4.6 化学荧光法检测胃窦组织线粒体 ROS、MDA、SOD 含量 取胃窦组织线粒体, 研磨匀浆, 按试剂盒说明书操作采用化学荧光法测定 ROS、MDA、SOD 含量, 记录数据用于后续统计分析。

1.4.7 Western blot 法检测胃窦组织线粒体 NRF2、AIFM1、PGAM5 及 KEAP1 蛋白表达 提取各组大鼠胃窦组织线粒体蛋白, 通过双缩脲法(BCA)测定蛋白浓度。蛋白样品变性后, 采用 SDS-PAGE 分离并转膜, 封闭后加入一抗(AIFM1、p-AIFM1 及 NRF2 稀释比例为 1:1 000; PGAM5 及 β-actin 为 1:5 000; KEAP1 为 1:500), 4 °C 摇床过夜, 次日孵育对应二抗(1:2 000), 采用 ImageJ 软件分析。

1.5 统计学分析 本研究采用 GraphPad Prism 10 和 SPSS 26.0 软件进行数据分析及绘图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较运用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FD 大鼠一般情况 正常组大鼠状态良好, 表现为食欲旺盛, 精神状态饱满, 动作敏捷, 被毛光亮健康, 粪便性状正常。与正常组相比, 模型组大鼠则食欲减退, 精神萎靡, 常于笼边扎堆, 好静少动, 攻击性较前减退, 粪便较软且水分增多, 对外界刺激敏感, 第 21 天起体质量增长减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。ROS 抑制剂组大鼠状态同模型组比较无明显差异($P > 0.05$), 柴胡疏肝散组及柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组大鼠与正常组比较无明显差异($P > 0.05$), 与模型组相比第 21 天起体质量增长明显增加($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠体质量比较($n=8, \bar{x} \pm s, g$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
正常组	241.68±7.21	275.68±8.40	308.91±3.50	339.28±2.29
模型组	239.80±6.78	269.63±3.97	300.54±4.89*	319.71±4.83**
柴胡疏肝散组	237.75±2.76	276.13±6.05	314.09±5.63##	351.11±9.00##
活性氧(ROS)抑制剂组	238.00±2.53	257.75±3.73	301.69±6.00	321.53±5.82
柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组	235.19±4.22	274.31±9.86	312.86±8.17##	357.93±7.70##

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

2.2 FD大鼠胃排空率与小肠推进率的比较 与正常组相比,模型组大鼠小肠推进率及胃排空率下降($P<0.05, P<0.01$)。与模型组大鼠相比,柴胡疏肝散组及柴胡疏肝散+ROS抑制剂组小肠推进率和胃排空率均升高($P<0.05, P<0.01$), ROS抑制剂组无明显差异($P>0.05$),见表2。

2.3 FD大鼠胃窦组织病理观察 各组大鼠胃窦组织的结构层次分明,腺体排列规则且整齐,胃黏膜表面平滑,未观察到有糜烂、溃疡等病理性改变的出现。见图1。

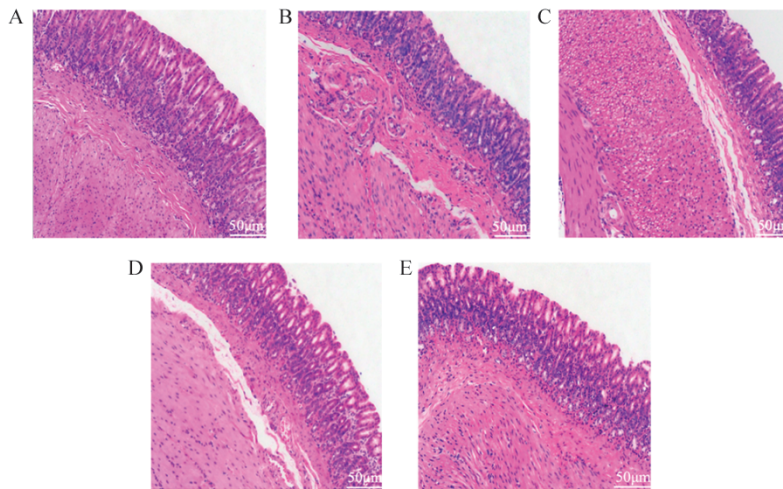
2.4 对FD大鼠胃窦组织ICC超微结构的影响 正常组大鼠ICC细胞器结构未见异常,线粒体内膜的嵴结构分明;模型组大鼠ICC则出现核皱缩、线粒体肿胀、嵴结构破坏及凋亡小体等类似凋亡的现象;与模型组

表2 各组大鼠的胃排空率与小肠推进率比较
($n=8, \bar{x}\pm s, \%$)

组别	胃排空率	小肠推进率
正常组	65.22±10.42	60.61±4.69
模型组	38.03±13.08*	49.35±3.85**
柴胡疏肝散组	59.85±8.74#	64.73±5.50##
活性氧(ROS)抑制剂组	54.21±9.53	48.74±3.90
柴胡疏肝散+ROS抑制剂组	56.54±5.28#	56.04±3.62#

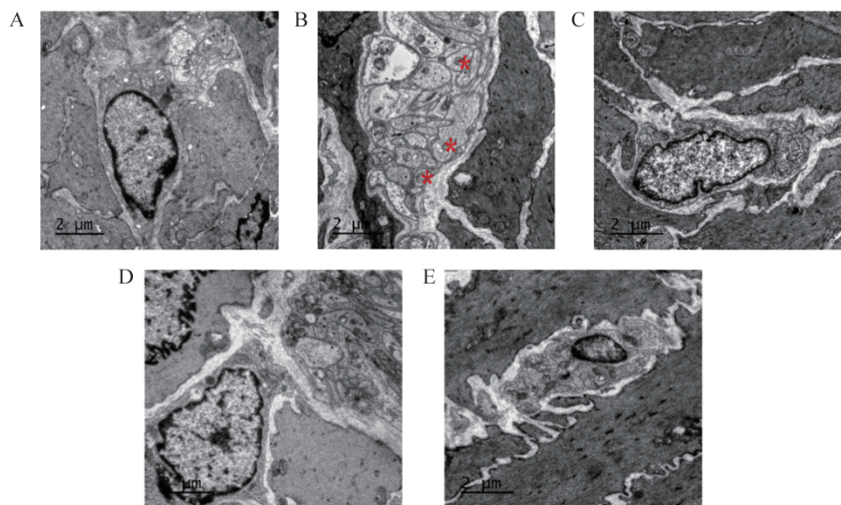
注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

比较,ROS抑制剂组、柴胡疏肝散组及柴胡疏肝散+ROS抑制剂组ICC细胞核形态显著改善,线粒体肿胀程度减轻,嵴的破坏现象明显减少,未见凋亡小体。见图2。



注:A为正常组,B为模型组,C为柴胡疏肝散组,D为活性氧(ROS)抑制剂组,E为柴胡疏肝散+ROS抑制剂组。

图1 各组大鼠胃窦组织病理变化(苏木精-伊红染色,×200)



注:A为正常组,B为模型组,C为柴胡疏肝散组,D为活性氧(ROS)抑制剂组,E为柴胡疏肝散+ROS抑制剂组。*表示凋亡小体。

图2 各组大鼠胃肠Cajal间质细胞超微结构的情况(透射电子显微镜,×6 000)

2.5 对FD大鼠胃窦组织KEAP1与PGAM5荧光共定位表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠胃窦组织

KEAP1与PGAM5共定位表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,ROS抑制剂组、柴胡疏肝散组及柴胡疏肝散+

ROS 抑制剂组大鼠胃窦组织 KEAP1 与 PGAM5 共定位表达显著升高 ($P<0.01, P<0.05$), 见表 3、图 3。

表 3 柴胡疏肝散对 FD 大鼠胃窦组织 KEAP1 与 PGAM5 荧光共定位表达的影响 ($n=8$)

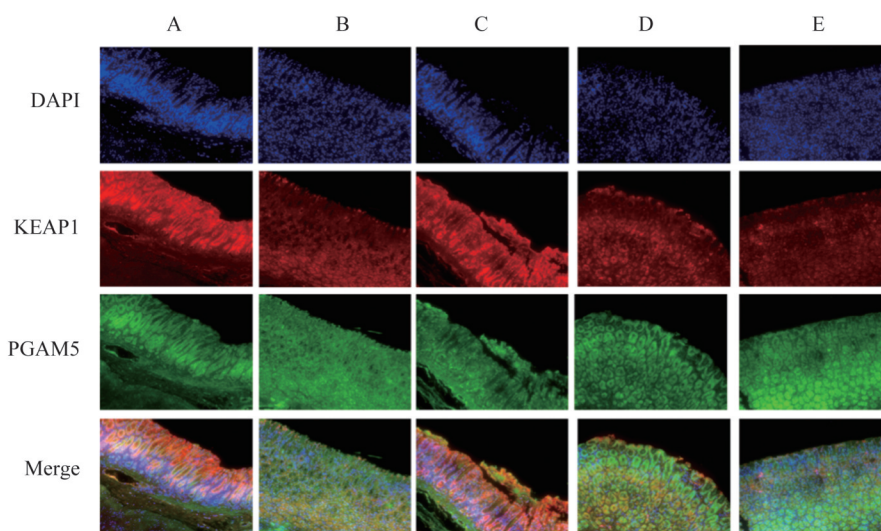
组别	皮尔逊系数	标准差
正常组	0.41	0.06
模型组	-0.19**	0.25
柴胡疏肝散组	0.39##	0.22
ROS 抑制剂组	0.30#	0.03
柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组	0.30#	0.07

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.6 对 FD 大鼠胃窦组织线粒体 ROS、MDA、SOD 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠胃窦组织线粒体 ROS、MDA 含量显著增加 ($P<0.01$), 而 SOD 含量显著下

降 ($P<0.01$); 与模型组比较,ROS 抑制剂组、柴胡疏肝散组及柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组大鼠胃窦组织线粒体 ROS、MDA 含量均明显降低 ($P<0.05, P<0.01$), SOD 含量明显升高 ($P<0.05$)。见表 4。

2.7 对 FD 大鼠胃窦组织线粒体 NRF2、AIFM1、PGAM5 及 KEAP1 蛋白表达的影响 与正常组相比,模型组大鼠胃窦组织线粒体中 AIFM1、PGAM5 和 KEAP1 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01, P<0.05$), NRF2、p-AIFM1 表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组相比,柴胡疏肝散组、ROS 抑制剂组及柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组大鼠胃窦组织线粒体 KEAP1、PGAM5、AIFM1 表达水平明显下降 ($P<0.05, P<0.01$), NRF2、p-AIFM1 表达水平明显升高 ($P<0.05, P<0.01$)。见图 4、表 5。



注:DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶,KEAP1 为 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1,PGAM5 为磷酸甘油酸变位酶 5, Merge 为合并。A 为正常组,B 为模型组,C 为柴胡疏肝散组,D 为活性氧(ROS)抑制剂组,E 为柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组。

图 3 各组大鼠胃窦组织 KEAP1 与 PGAM5 荧光共定位比较(免疫荧光染色,×200)

表 4 各组大鼠胃窦组织线粒体 ROS、MDA、SOD 含量比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

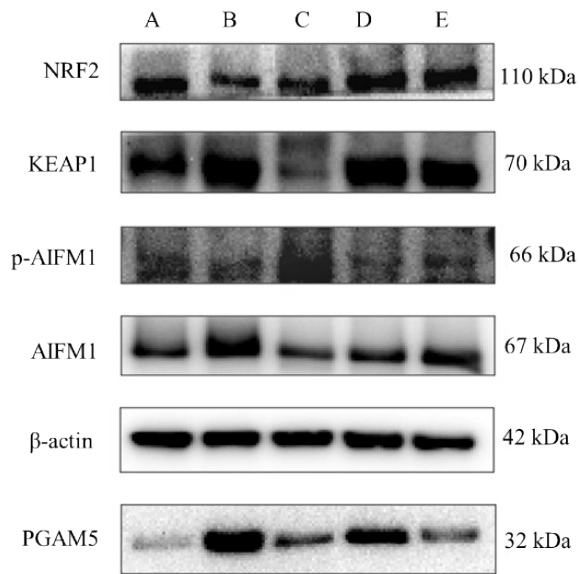
组别	SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)	ROS/(RFU/mg)
正常组	70.70±4.19	24.12±1.21	10 632.50±1245.40
模型组	30.55±3.75**	38.38±3.03**	17 062.80±914.10**
柴胡疏肝散组	58.57±2.48#	27.22±1.47##	12 163±713.08##
ROS 抑制剂组	62.58±5.69#	27.68±3.81##	10 894±1175.50##
柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组	61.94±4.59#	29.42±2.15#	11 266±317.50#

注:SOD 为超氧化物歧化酶,MDA 为丙二醛,ROS 为活性氧。与正常组比较** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3 讨论

FD 的病位主要在胃腑,但与肝、脾的关系尤为密切。肝主疏泄,调畅气机,有助于脾胃的运化功能;脾主运化,将水谷精微输布全身,为胃行其津液。因此,脾胃功能的正常发挥,离不开肝的疏泄作用。例如,《血证论》中所述“木之性主于疏泄,食气入胃,全赖肝木之气以疏泄之,而水谷乃化;设肝之清阳不升,则不

能疏泄水谷,渗泄中满之症,在所难免”。柴胡为柴胡疏肝散的君药,疏肝解郁,辅以香附、川芎加强疏肝活血,枳壳、陈皮理气,白芍、甘草滋血柔肝,共奏疏肝健脾、行气消胀之功。本研究结果显示,各组大鼠胃窦组织无器质性病变,模型组小肠推进率及胃排空率明显降低,证实 FD 大鼠模型构建成功。经柴胡疏肝散治疗后,FD 大鼠的小肠推进功能及胃排空功能显著提升,



注:PGAM5 为磷酸甘油酸变位酶 5, KEAP1 为 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1, AIFM1 为线粒体凋亡诱导因子 1, NRF2 为核因子 E2 相关因子 2, p-AIFM1 为磷酸化 AIFM1, β -actin 为 β -肌动蛋白。A 为正常组, B 为模型组, C 为柴胡疏肝散组, D 为活性氧(ROS)抑制剂组, E 为柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组。

图 4 各组大鼠胃窦组织线粒体 KEAP1、PGAM5、AIFM1、p-AIFM1 及 NRF2 蛋白表达电泳图

提示柴胡疏肝散对 FD 大鼠胃肠动力障碍有改善作用。

氧死亡是由 ROS 介导的胱天蛋白酶(caspase)非依赖性的凋亡样细胞死亡,不同于坏死、凋亡、焦亡等其他细胞死亡方式^[25]。目前,氧死亡与疾病间的关联尚未完全阐释清楚^[26]。作为参与多种生理及病理过程的关键因素,ROS 很可能在多种疾病的发展进程中扮演重要角色^[27-30],在正常生理条件下,ROS 产生和清除之间存在着平衡调控机制。不同程度的氧化应激可以诱发多种细胞应答反应,包括激活细胞保护性的信号转导通路、协调启动线粒体分裂以及自噬过程,以优化异常线粒体和细胞的清除,从而保护相邻线粒体和细胞免受损伤^[31]。NAC 作为 ROS 抑制剂,能够抑制 ROS 异常升高,从而减轻机体氧化应激损伤^[22]。本研究结果显示,FD 大鼠胃窦组织线粒体 ROS、MDA 含量增加, SOD 活性降低;柴胡疏肝散及 ROS 抑制剂作用后, ROS、MDA 含量减少, SOD 活性增强,表明柴胡疏肝散可改善 FD 大鼠胃窦组织线粒体氧化应激。同时,透射

电子显微镜显示模型组大鼠 ICC 细胞出现核皱缩、线粒体肿胀、线粒体嵴被破坏,并出现凋亡小体等类似凋亡的现象,提示模型组 ROS 升高可能介导 ICC 细胞的结构和形态发生类似凋亡的氧死亡改变,柴胡疏肝散和 ROS 抑制剂干预后 FD 大鼠 ICC 细胞核形态改善且未见凋亡小体,表明柴胡疏肝散可抑制 FD 大鼠胃窦组织 ICC 氧死亡。

研究表明,ROS 的过度升高是触发涉及 KEAP1/PGAM5/AIFM1 信号轴的氧死亡途径的关键因素^[11,32],当细胞中的 ROS 含量超过 KEAP1/NRF2/ARE 通路临界值时,其可能异常激活 KEAP1,进而触发 KEAP1/PGAM5/AIFM1 通路引起器官实质细胞(神经元细胞、肌细胞等)氧死亡,进而导致器官功能减退^[33]。目前关于 KEAP1/PGAM5/AIFM1 氧死亡通路研究报道集中在肿瘤和高脂血症疾病。例如,人参皂苷 Rb1 能抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖、迁移与集落形成能力,其可能与 KEAP1/PGAM5/AIFM1 通路介导的氧死亡有关^[34];香砂六君子汤可通过 ROS/KEAP1/PGAM5 通路干预氧化应激调节蛋白的表达,进而改善脾虚高脂血症大鼠血脂异常^[35];健脾益气化痰祛痰法可能通过调控 KEAP1/PGAM5/AIFM1 介导的氧死亡相关通路,降低高脂血症大鼠脂质过氧化水平,进而改善血脂异常情况,保护大鼠肝脏^[36]。NRF2 在氧化应激调控中起主要作用,受体蛋白 KEAP1 能够感知内源性 ROS。在正常生理状况下,KEAP1 位于细胞质中,可与 NRF2 及 PGAM5 结合,形成 NRF2-KEAP1-PGAM5 三聚体复合物^[37-38];在病理状况下,当 ROS(如 0.1 ~ 0.5 mmol/L 较低浓度 ROS 干预时)或其他因素刺激时,KEAP1 蛋白的半胱氨酸残基会发生氧化修饰并发生构象改变,NRF2 磷酸化并与 KEAP1 解离,游离的 NRF2 转位到细胞核中,从而调节编码细胞保护分子的基因表达,这一过程能够抵消氧化应激的影响,启动下游抗氧化基因的表达,发挥抗氧化作用^[39]。高浓度(>0.5 mmol/L)ROS 诱导氧化应激损伤,PGAM5 与 KEAP1 分离并从线粒体外膜上脱落。PGAM5 依赖下游的 AIFM1 参与调节氧死亡,其通过线粒体内膜蛋白质转运体与组装蛋白 40 进入线粒体,并与 AIFM1 发生相互作用^[40],PGAM5 酶催化 AIFM1 蛋白

表 5 各组大鼠胃窦组织线粒体 KEAP1、PGAM5、AIFM1、NRF2、p-AIFM1/AIFM1 蛋白表达水平比较(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	PGAM5/ β -actin	KEAP1/ β -actin	AIFM1/ β -actin	NRF2/ β -actin	p-AIFM1/AIFM1
正常组	0.27±0.06	0.97±0.24	0.92±0.06	1.22±0.21	0.84±0.16
模型组	1.17±0.13**	1.80±0.22**	1.31±0.17*	0.45±0.12**	0.31±0.08**
柴胡疏肝散组	0.71±0.07###	0.83±0.15###	0.82±0.07#	0.87±0.06###	1.06±0.10###
ROS 抑制剂组	1.00±0.28	1.35±0.21	1.04±0.07	0.89±0.10#	0.68±0.03#
柴胡疏肝散+ROS 抑制剂组	0.58±0.16###	0.59±0.28###	1.21±0.23	0.73±0.11	0.54±0.10

注:PGAM5 为磷酸甘油酸变位酶 5, KEAP1 为 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1, AIFM1 为线粒体凋亡诱导因子 1, NRF2 为核因子 E2 相关因子 2, p-AIFM1 为磷酸化 AIFM1, β -actin 为 β -肌动蛋白。与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$ 。

在第 116 位丝氨酸残基上发生去磷酸化反应^[25]。而且,这一位点的丝氨酸具有高度的保守性,当发生突变时,会导致 AIFM1 自发激活,进而诱导细胞发生氧死亡^[33]。本研究结果显示,FD 大鼠胃窦组织中 KEAP1 与 PGAM5 共定位皮尔逊系数降低,KEAP1、PGAM5、AIFM1 蛋白表达明显增加,p-AIFM1、NRF2 蛋白表达显著减少,表明 KEAP1/PGAM5/AIFM1 信号通路被激活,PGAM5 与 KEAP1 解离转移至线粒体内膜,有部分线粒体可能发生 AIFM1 去磷酸化,导致 FD 大鼠胃窦组织 ICC 线粒体出现氧死亡;相反的,柴胡疏肝散及 ROS 抑制剂干预后,KEAP1 与 PGAM5 共定位皮尔逊系数显著升高,线粒体 ROS、MDA 含量下降,SOD 活性增强,KEAP1、PGAM5、AIFM1 蛋白表达减少,且 p-AIFM1、NRF2 蛋白表达显著增加,表明柴胡疏肝散可以显著减少 FD 模型大鼠胃窦组织 ICC 线粒体氧死亡。因此,柴胡疏肝散可能通过降低 ROS 水平抑制 KEAP1/PGAM5/AIFM1 氧死亡通路的激活,上调 SOD 水平,下调 MDA 水平,减轻大鼠 ICC 线粒体损伤,减少氧死亡,从而发挥促胃动力效应。

综上,柴胡疏肝散可能通过降低 ROS 水平抑制 KEAP1/PGAM5/AIFM1 信号通路激活,减少胃窦组织中 ICC 线粒体氧死亡,提高胃肠动力,从而发挥治疗 FD 的作用。本研究也存在一定的不足,除 KEAP1/PGAM5/AIFM1 通路外,ICC 线粒体氧死亡可能还涉及其他调控机制,柴胡疏肝散是否通过其他通路抑制细胞氧死亡,进而影响 FD 氧化应激仍需进一步深入研究。本研究未设立 ROS 激动剂组进行反向验证,将在今后进一步深入研究相关机制,以期更全面地阐释柴胡疏肝散在 FD 中的作用。

参考文献:

- [1] FORD A C, MAHADEVA S, CARBONE M F, et al. Functional dyspepsia[J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1689-1702.
- [2] 陈婷,唐旭东,王风云,等.功能性消化不良中西医临床诊断分型的思考[J].*中医杂志*,2016, 57(7): 563-566.
- [3] WAUTERS L, TALLEY N J, WALKER M M, et al. Novel concepts in the pathophysiology and treatment of functional dyspepsia [J]. *Gut*, 2020, 69(3): 591-600.
- [4] BLACK C J, DROSSMAN D A, TALLEY N J, et al. Functional gastrointestinal disorders: advances in understanding and management [J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1664-1674.
- [5] SARNELLI G, CAENEPEEL P, GEYSENS B, et al. Symptoms associated with impaired gastric emptying of solids and liquids in functional dyspepsia[J]. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98(4): 783-788.
- [6] 钱舒乐,俞赞丰,张尉勤,等.柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的 Meta 分析和试验序贯分析[J].*中医临床研究*,2021, 13(8): 142-148.
- [7] MIN K W, LEABU M. Interstitial Cells of Cajal (ICC) and Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): facts, speculations, and myths[J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(4): 995-1013.
- [8] LI L, JIA Q, WANG X, et al. Chaihu Shugan Powder promotes gastric motility in rats with functional dyspepsia by regulating Drp-1-mediated ICC mitophagy[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 249-258.
- [9] 刘雪娇,贾越博,杨珂鸣,等.基于气学理论与线粒体能量学关系探讨胃肠动力障碍疾病的病理机制[J].*上海中医药杂志*,2024, 58(5): 14-18, 32.
- [10] LI R, JIA Z, TRUSH M A. Defining ROS in biology and medicine[J]. *React Oxyg Species (Apex)*, 2016, 1(1): 9-21.
- [11] HOLZE C, MICHAUDEL C, MACKOWIAK C, et al. Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(2): 130-140.
- [12] 李莉,贾庆玲,王煜姣,等.柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃组织线粒体功能及线粒体自噬的影响[J].*中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(23): 26-34.
- [13] ZHANG L M, ZENG L J, DENG J, et al. Investigation of autophagy and differentiation of myenteric interstitial cells of Cajal in the pathogenesis of gastric motility disorders in rats with functional dyspepsia[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, 65(4): 533-539.
- [14] 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 Cajal 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): 1410-1417.
- [15] 王香香,王煜姣,李莉,等.基于线粒体自噬及 Pink1/Parkin 信号通路探讨柴胡疏肝散治疗功能性消化不良大鼠的作用机制[J].*中国实验方剂学杂志*,2023, 29(2): 45-51.
- [16] WANG X, LIU X, WANG Y, et al. Chaihu Shugan Powder inhibits interstitial cells of cajal mitophagy through USP30 in the treatment of functional dyspepsia[J]. *J Ethnopharmacology*, 2023, 323: 117695.
- [17] 王煜姣,王香香,杨珂鸣,等.柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠 AMPK/SIRT3 信号通路的影响[J].*上海中医药杂志*,2023, 57(11): 5-11.
- [18] 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): 210-214.
- [19] 卢鹏飞,左艇,苗明三.基于中西医临床病证特点的功能性消化不良动物模型分析[J].*中国实验方剂学杂志*,2020, 26(18): 210-215.
- [20] 徐叔云,汴如濂,陈修.药理学实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002: 202-204.
- [21] 罗高标,凌江红.柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃窦组织中 GRP78 和 c-JNK 表达的影响[J].*山西中医*,2019, 35(5): 56-58.
- [22] BAO M, HUA X, MO H, et al. N-acetylcysteine, an ROS inhibitor, alleviates the pathophysiology of hyperthyroidism-induced cardiomyopathy via the ROS/Ca²⁺ pathway[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(9): 1195.
- [23] 周洲,凌江红,徐宽,等.柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃排空的促进作用及机制[J].*山东医药*,2017, 57(37): 5-8.
- [24] 黄爱华,迟玉广,曾元儿,等.枳实黄酮对功能性消化不良大鼠胃肠动力的影响[J].*中药新药与临床药理*,2012, 23(6): 612-615.
- [25] SCATURRO P, PICHLMAIR A. Oxeiptosis—a cell death pathway to mitigate damage caused by radicals[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(7): 1191-1193.
- [26] TANG D, KANG R, BERGHE T V, et al. The molecular machinery of regulated cell death[J]. *Cell Res*, 2019, 29(5): 347-364.
- [27] CHEN Y, HUA Y, LI X, et al. Distinct types of cell death and the

- implication in diabetic cardiomyopathy [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 42.
- [28] ZHONG F, XIONG L, WU J, et al. The KEAP1/PGAM5/AIFM1-mediated oxeiptosis pathway in Alzheimer's disease [J]. *Brain Res*, 2024, 1845: 149173.
- [29] TSUI K H, LI C J. Mitoquinone shifts energy metabolism to reduce ROS-induced oxeiptosis in female granulosa cells and mouse oocytes [J]. *Aging*, 2023, 15(1): 246-260.
- [30] PALLICHANKANDY S, THAYYULLATHIL F, CHERATTA A R, et al. Targeting oxeiptosis-mediated tumor suppression: a novel approach to treat colorectal cancers by sanguinarine [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 94.
- [31] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3): 909-950.
- [32] WANG C X, CHEN L H, ZHUANG H B, et al. Auricularin enhances ROS generation to regulate colorectal cancer cell apoptosis, ferroptosis, oxeiptosis, invasion and colony formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 587: 99-106.
- [33] SCATURRO P, PICHLMAIR A. Oxeiptosis: a discreet way to respond to radicals [J]. *Curr Opin Immunol*, 2019, 56: 37-43.
- [34] 朱敬轩, 宋囡, 杨莹, 等. 人参皂苷 Rb1 通过 KEAP1/PGAM5/AIFM1 通路促进肝细胞癌 HepG2 细胞发生氧死亡 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(5): 445-451.
- [35] 王嘉鑫, 王杰, 宋囡, 等. 香砂六君子汤对脾虚高脂血症大鼠 ROS/KEAP1/PGAM5 通路及氧死亡的影响及机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(10): 2353-2357.
- [36] 裘雪莹, 贾连群, 宋囡, 等. 基于 Keap1/PGAM5/AIFM1 介导的氧死亡途径探讨健脾益气化痰祛痰法对高脂血症大鼠的影响与机制 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(12): 2848-2851.
- [37] O'MEALEY G B, PLAFKER K S, BERRY W L, et al. A PGAM5-KEAP1-Nrf2 complex is required for stress-induced mitochondrial retrograde trafficking [J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(20): 3467-3480.
- [38] ZEB A, CHOUBEY V, GUPTA R, et al. Negative feedback system to maintain cell ROS homeostasis: KEAP1 PGAM5 complex senses mitochondrially generated ROS to induce mitophagy [J]. *Autophagy*, 2022, 18(9): 2249-2251.
- [39] ABED D A, GOLDSTEIN M, ALBANYAN H, et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(4): 285-299.
- [40] CHACINSKA A, PFANNSCHMIDT S, WIEDEMANN N, et al. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins [J]. *EMBO J*, 2004, 23(19): 3735-3746.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2024-12-02

(上接第 27 页)

- [11] LIU Z, WANG M, WANG X, et al. XBP1 deficiency promotes hepatocyte pyroptosis by impairing mitophagy to activate mtDNA-cGAS-STING signaling in macrophages during acute liver injury [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102305.
- [12] MAO Y, LUO W, ZHANG L, et al. STING-IRF3 triggers endothelial inflammation in response to free fatty acid-induced mitochondrial damage in diet-induced obesity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(5): 920-929.
- [13] AN C, SUN F, LIU C, et al. IQGAP1 promotes mitochondrial damage and activation of the mtDNA sensor cGAS-STING pathway to induce endothelial cell pyroptosis leading to atherosclerosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123: 110795.
- [14] 曹玉, 周永明, 何梦铎, 等. 基于线粒体功能障碍探讨阳和汤治疗射血分数保留心力衰竭机制 [J]. *中医学报*, 2024, 39(10): 2060-2063.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版):一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [16] SCHIATTARELLA G G, ALTAMIRANO F, TONG D, et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Nature*, 2019, 568(7752): 351-356.
- [17] 汤家铭, 陈民利. 医学实验动物学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2012.
- [18] ARMSTRONG P W, LAM C S P, ANSTROM K J, et al. Effect of vericiguat vs placebo on quality of life in patients with heart failure and preserved ejection fraction: the VITALITY-HFpEF randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2020, 324(15): 1512-1521.
- [19] RAMAN S V, CHANDRASHEKHAR Y. Myocardial fibrosis: A viable imaging target in diastolic dysfunction and heart failure? [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2023, 16(6): 870-872.
- [20] KREMASTIOTIS G, HANDA I, JACKSON C, et al. Disparate effects of MMP and TIMP modulation on coronary atherosclerosis and associated myocardial fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23081.
- [21] CAO J W, DUAN S Y, ZHANG H X, et al. Zinc deficiency promoted fibrosis via ROS and TIMP/MMPs in the myocardium of mice [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2020, 196(1): 145-152.
- [22] DE MARCO C, CLAGGETT B L, DE DENUS S, et al. Impact of diabetes on serum biomarkers in heart failure with preserved ejection fraction: insights from the TOPCAT trial [J]. *Esc Heart Fail*, 2021, 8(2): 1130-1138.
- [23] LOZHKIN A, VENDROV A E, RAMOS-MONDRAGÓN R, et al. Mitochondrial oxidative stress contributes to diastolic dysfunction through impaired mitochondrial dynamics [J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102474.
- [24] JIANG A, LIU J, WANG Y, et al. cGAS-STING signaling pathway promotes hypoxia-induced renal fibrosis by regulating PFKFB3-mediated glycolysis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 208: 516-529.

编辑:季春来

收稿日期:2024-10-15