

疏肝健脾方对腹泻型肠易激综合征 p - CaMK II、AMPK、MEF2 表达的影响

廖美华^{1,3} 张涛^{1*} 陈思羽¹ 黄晓燕² 卓少元³ 丁明健^{1,3}

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530011;

2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530011; 3. 广西中医药大学, 广西南宁 530011)

摘要:目的 观察疏肝健脾方对腹泻型肠易激综合征磷酸化的钙调素依赖性激酶(p - CaMK II)、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、肌细胞增强因子2(MEF2)表达的影响,探讨其防治IBS - D效用机制及其靶点。方法 采用束缚-应激联合辣椒素灌胃完成大鼠IBS - D模型制备后,用低、中、高不同剂量的疏肝健脾方水提液灌胃进行治疗。治疗完成后,比较中药治疗各组别大鼠与匹维溴铵治疗组、未治疗模型组及正常组中大鼠的相关指标情况。应用Power lab多导数据收集直肠球囊扩张试验所致腹部回缩反射以及大鼠腹壁紧张度改变,综合评估内脏敏感性变化;光镜下观察结肠组织病理学变化;现代分子生物学技术观察结肠p - CaMK II、AMPK、MEF2蛋白及对应mRNA变化。结果 HE染色提示结肠黏膜及黏膜上皮绒毛完整,排列正常,符合IBS改变。与治疗组比较,模型组腹壁收缩活动均显著增高($P < 0.05$),而引起大鼠腹部抬高和背部拱起的容量阈值均显著降低($P < 0.05$)。模型组中p - CaMK II、AMPK α 1、MEF2a蛋白及对应mRNA的表达较正常组升高($P < 0.05$);治疗后p - CaMK II、AMPK α 1、MEF2蛋白及对应mRNA的表达较模型组下降($P < 0.05$)。结论 疏肝健脾方降低p - CaMK II及AMPK水平,减少MEF2表达而缓解平滑肌痉挛,达到改善内脏高敏感性防治IBS - D的效用。

关键词: 腹泻型肠易激综合征; 疏肝健脾方; 钙调素依赖性激酶; 腺苷酸活化蛋白激酶; 肌细胞增强因子

DOI标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.07.24

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2021)07-1627-04

笔者导师在中医药理论指导下,结合自身多年临床经验,强调“肝郁脾虚证”为IBS - D临床主要证候,即“痛责之于肝、泻责之于脾”,由此确立疏肝健脾为IBS - D治疗大法,并在临床应用疏肝健脾方治疗IBS - D,疗效确切^[1]。课题组前期研究发现疏肝健脾方可能通过降低磷酸化后TRPV1的表达,关闭TRPV1通道,抑制Ca²⁺内流,减少SP及CGRP表达,降低内脏敏感性而发挥防治IBS - D效用^[2,3]。Ca²⁺作为最重要的第二信使,Ca²⁺相关级联反应参与IBS - D的发病是复杂的,仍需深入研究。由此,本实验通过观察疏肝健脾方对IBS大鼠Ca²⁺/CaMK II - AMPK - MEF2通路的影响,深入阐述疏肝健脾方治疗IBS - D的效用机制及其靶点。

1 材料与仪器

1.1 动物及分组 清洁级SD大鼠72只(雄性,180~220g)购自广西医科大学实验动物中心,生产许可证:SCXK(桂)2014-0002,动物合格证:No.4500030000106。实验单位使用许可证编号:SYXK桂2019-0001。各组大鼠随机数字表法可分为正常组、模型组、西药组及疏肝健脾方低、中、高剂量组6组,每组各12只。动物实验符合“3R”原则。

1.2 试剂与仪器 购自广西博仁生物试剂公司的HE染色试剂、电镜固定液、液氮,购自美国sigma公司的辣椒素(capsaicin),购自

广州蓝吉生物有限公司的醛品红-橙黄G染色液,氯仿、异丙醇、75%乙醇、RNase free水、TBE电泳缓冲液及PCR相关试剂; Anti - CaMK II delta抗体(Abcam ab181052)、Anti - AMPK alpha 1抗体(Abcam ab32047)、Anti - MEF2A + MEF2C抗体(Abcam ab64644);自动包埋机、莱卡自动切片机、倒置相差显微镜、制冰机、电热恒温水箱DK - 8D、旋涡振荡器、微型振荡器、普通PCR仪(BIO - RAD)、荧光定量仪(ABI 73000)、低温高速离心机、Power - lab多导数据采集系统等均由广西中医药大学科技实验中心提供。

2 方法

2.1 疏肝健脾方水提液的制备 疏肝健脾方(陈皮12g,白芍12g,白术12g,防风12g,柴胡8g,炮姜6g)购自广西中医药大学附属瑞康医院。上药用蒸馏水煎煮,浓缩配制成1g原生药/1ml的药液,过滤除菌分装,4℃保存备用。

2.2 IBS大鼠模型的复制及分组处理 72只清洁级雄性SD大鼠,除外正常组其余各组均依据文献^[4]的造模及模型评价方法,采用束缚-应激联合辣椒素灌胃制备IBS - D模型。待模型成功后,按体重随机分为5组,即模型组、西药组、治疗(低、中、高剂量组)。治疗组予疏肝健脾方按3.1.6.2,12.4g/kg,蒸馏水配成310,620,1240g/L,大鼠灌胃给药体积为8ml/200g,连续灌胃2周;西药组按15mg/kg剂量予以匹维溴铵,连续灌胃2周;模型组予以等剂量生理盐水连续灌胃2周;正常组同步饲养。第5周末处死所有大鼠,取结肠组织置于10%中性甲醛、液氮及2.5%戊二醛电镜固定液中备用。

2.3 指标检测

2.3.1 结肠组织病理学观察 HE染色光镜下检测大鼠结肠组织病理学变化并摄片。

2.3.2 内脏敏感性评估 由两名课题组研究人员采集3次数据,完成内脏敏感性分析:①采取直肠球囊扩张法(colorectal disten-

收稿日期:2021-01-04; 修订日期:2021-07-15

基金项目:国家自然科学基金(81460724);

广西自然科学基金(2020GXNSFAA259060);

全国中医岐黄优才项目(J20184832009)

作者简介:廖美华(1990-),女(汉族),广西平乐人,广西中医药大学在读硕士研究生,主要从事中西医结合防治消化系统疾病研究工作。

* 通讯作者简介:张涛(1976-),男(汉族),江西井冈山人,广西中医药大学附属瑞康医院主任医师,博士研究生导师,博士学位,主要从事中西医结合防治消化系统疾病研究工作。

sion ,CRD) 观察引起大鼠背部拱起以及腹部抬起的容量阈值, 评估大鼠腹部回缩反射(Abdominal withdraw reflex ,AWR)。

②应用 Power lab 多导数据采集系统收集其腹壁收缩幅度次数,判断大鼠腹壁紧张度 综合评估内脏敏感性。

2.3.3 IBS 大鼠结肠中 CaMK II、AMPK α 1、MEF2 的 mRNA 表达水平检测 严格按照试剂盒说明,应用 qRT-PCR 技术,以 GAPDH 为内参基因,检测大鼠结肠中 CaMK II、AMPK α 1、MEF2 的 mRNA 表达水平,目的基因及内参基因引物序列由上海生工生物技术有限公司设计。引物系列和扩增片段见表 1。

表 1 CaMK II、AMPK α 1、MEF2a、MEF2c、GAPDH 引物序列和扩增片段

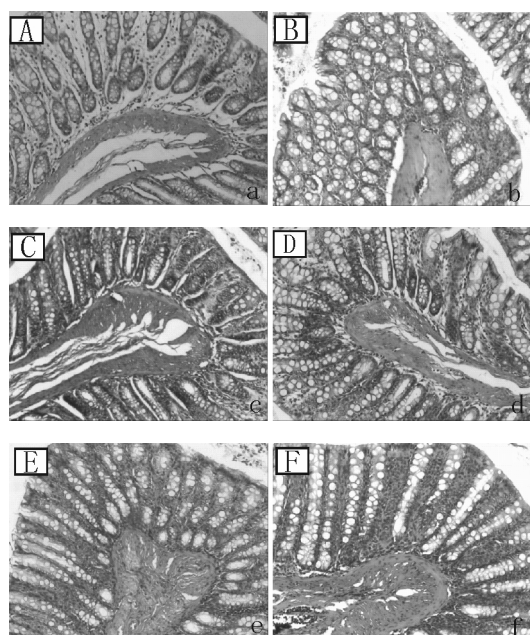
引物	上游	下游	扩增片段/bp
GAPDH	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	TTTGAGGGTGCAGCGAAGCTT	252
AMPK α 1	GTTCTGCGAGAAAGATGGCGA	TGCTTGCCACCTTCACITTC	124
MEF2a	AGAGGAACCGACAGGTGACT	TCCGAGTTCGTCCTGCTTTC	208
MEF2c	CTCTTAGGCACTACCCAC	CCACCCATCAGACCACCTGT	291
CaMKII	ACAACATATGCTGGCTACGAGAAA	TCGTGTAAGCTCGAAGTCCC	298

2.3.4 大鼠结肠组织 p-CaMK II、AMPK、MEF2 蛋白表达水平检测 采用 Western blot 技术检测大鼠结肠组织 p-CaMK II、AMPK、MEF2a + MEF2c 蛋白表达水平,具体实验步骤:组织提取总蛋白→BCA 蛋白定量→蛋白电泳→转膜→封闭→加入一抗(1:300 稀释) 孵育过夜→二抗(1:300 稀释) 孵育→ECL 化学发光显影→灰度值分析。

2.4 统计学分析 应用 SPSS 21.0 统计软件,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布资料采用单因素方差分析检验;若为非正态分布资料采用秩和检验来比较两组间差异,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 IBS 大鼠组织病理学变化 光镜下见大鼠结肠黏膜及黏膜上皮绒毛完整,排列正常,未见黏膜下血管扩张及弥漫性炎症浸润改变,符合 IBS 表现。见图 1。

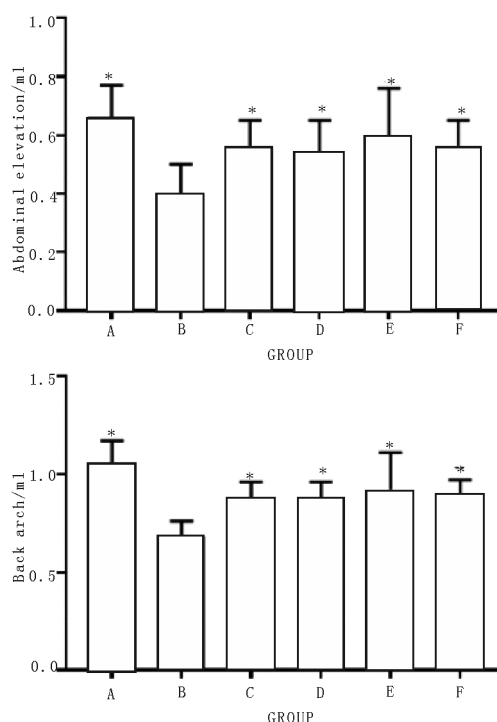


A. 低剂量组 B. 中剂量组 C. 高剂量组 D. 西药组 E. 模型组 F. 正常组
图 1 大鼠结肠组织病理学变化(HE 染色,100 \times)

3.2 IBS 大鼠内脏敏感性变化

3.2.1 大鼠腹部回缩反射 模型组引起大鼠腹部抬高和背部拱

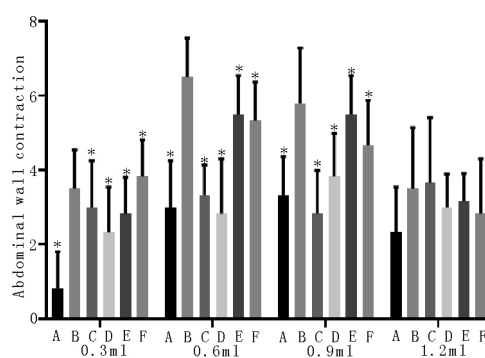
起的容量阈值均显著低于治疗组($P < 0.05$)。见图 2。



A. 正常组 B. 模型组 C. 低剂量组 D. 中剂量组
E. 高剂量组 F. 西药组;与模型组相比,* $P < 0.05$

图 2 大鼠腹部回缩反射腹部撤离反射评分比较($n = 6, \bar{x} \pm s$)

3.2.2 大鼠腹壁紧张度变化 在 0.3 ml 容量时,正常组未见明显腹壁收缩;0.3、0.6、0.9 ml 扩张容量下,与治疗组比较,模型组腹壁收缩活动均显著增高($P < 0.05$);1.2 ml 扩张容量下各组大鼠的腹壁收缩数日均无明显差异($P > 0.05$)。见图 3。

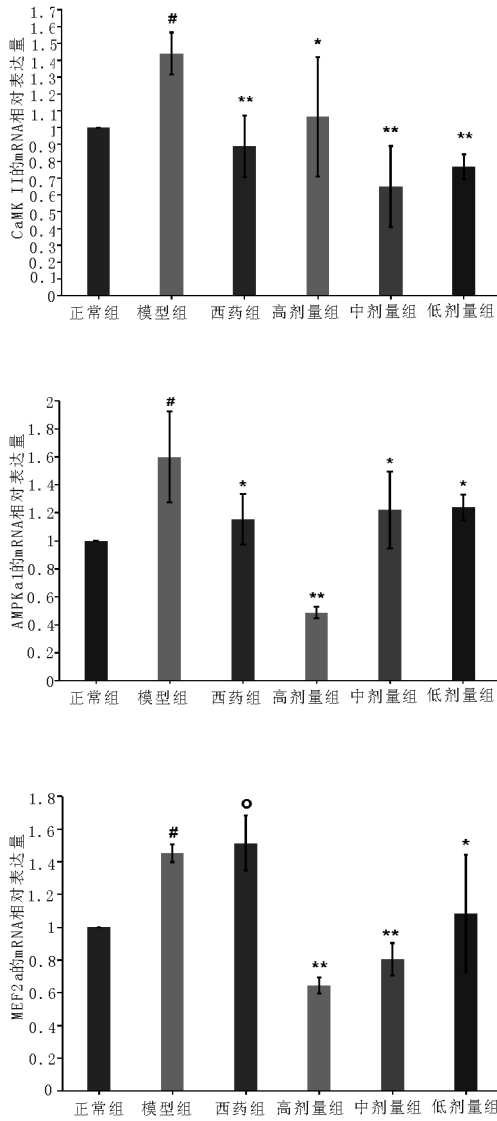


A. 正常组 B. 模型组 C. 低剂量组 D. 中剂量组
E. 高剂量组 F. 西药组;与模型组相比,* $P < 0.05$

图 3 不同扩张容量下大鼠腹壁紧张度评分比较($n = 6, \bar{x} \pm s$)

3.3 IBS 大鼠结肠中 CaMK II、AMPK α 1、MEF2a、MEF2c 的 mRNA 表达 模型组 CaMKII、AMPK α 1、MEF2a 的 mRNA 表达均明显升高,而经治疗后,治疗组 CaMKII、AMPK α 1、MEF2a mRNA 表达下降($P < 0.05$);MEF2c 在各组中均无明显表达。见图 4 及图 5。

3.4 IBS 大鼠结肠中 p-CaMK II、AMPK α 1、MEF2a + MEF2c 的蛋白表达 模型组 p-CaMK II、AMPK α 1、MEF2a + MEF2c 蛋白表达上升,治疗组 p-CaMK II、AMPK α 1、MEF2a + MEF2c 蛋白表达较模型组下降($P < 0.05$)。见图 6。



与正常组比较, # $P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, ° $P \geq 0.05$

图 4 IBS 大鼠结肠中 CaMK II、AMPKα1、MEF2a 的 mRNA 表达

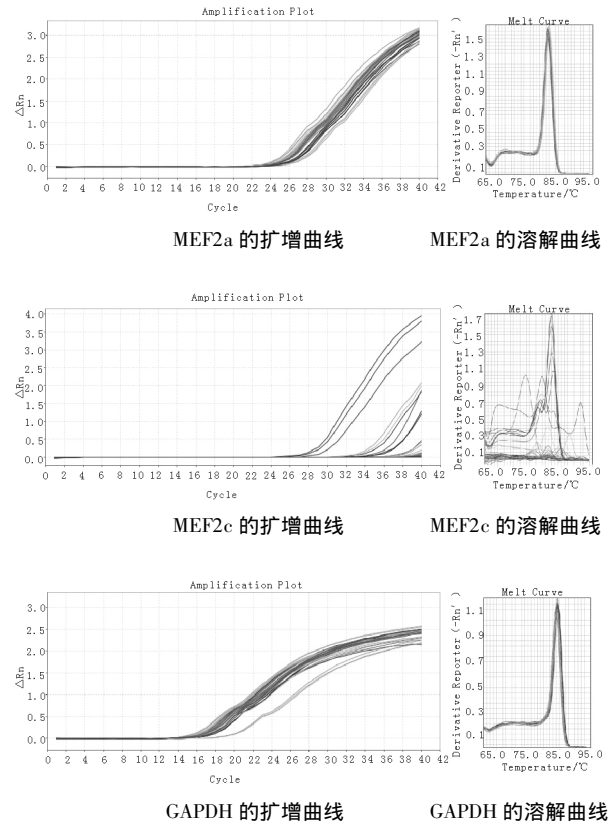
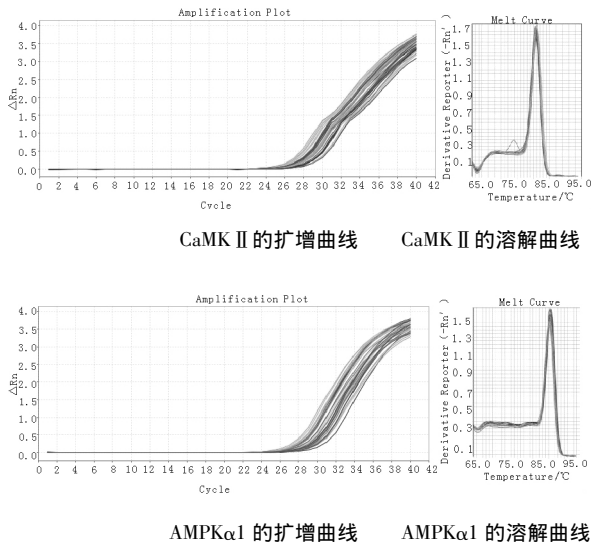
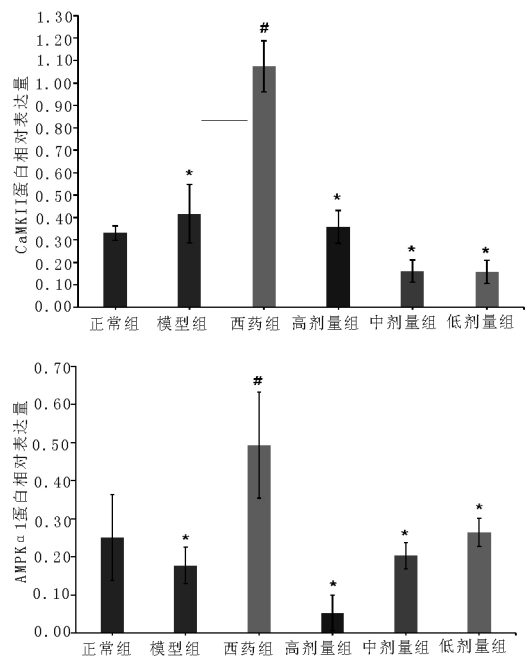
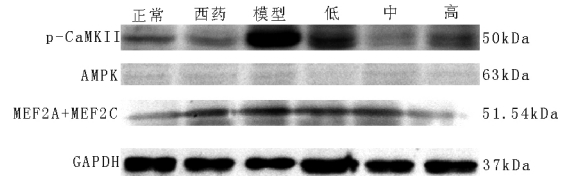
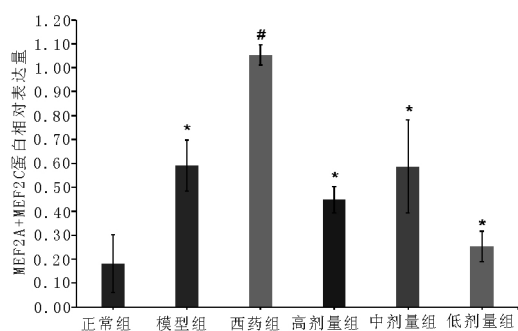


图 5 大鼠结肠 CaMK II、AMPKα1、MEF2a、MEF2c 扩增曲线和溶解曲线





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

图 6 大鼠结肠 p - CaMK II、AMPKα1、MEF2a + MEF2c 蛋白电泳

4 讨论

负面情绪等不良事件的长期刺激引起胃肠运动功能紊乱及内脏感觉的失调是 IBS 的发病关键^[5,6]。其中脑肠互动起了重要的桥梁作用,而内脏高敏感性(VHS)是 IBS - D 的重要生理病理特征。目前为止尚无完整的机制解释 VHS,它是涉及脑 - 脊髓 - 结肠信号回路的复杂进程^[7,8],包括内脏感觉可塑性改变和中枢神经敏化。生理状态下,内脏的“静息”伤害性感受器即使对高强度刺激也无反应,但炎症、化学或物理等慢性应激的刺激可造成“静息”感受器致敏,导致传入的信号放大,产生外周致敏或初级传入神经超敏。各种外周致敏的信号通过兴奋性神经递质的释放增加 II 级神经元的兴奋性,导致内脏感觉神经可塑性改变,这种变化使得脊髓背根神经节(DRG)的兴奋性持续存在,造成中枢感觉敏化产生记忆,使得 VHS 持续发生^[9]。这一复杂的生理过程是涉及多信号、多因素的共同参与^[10-12]。课题组前期研究证实香草酸受体亚型 1 (TRPV1) 敏化及其通道开放,使得 Ca^{2+} 通过该通道渗入细胞内,引起结肠平滑肌收缩达到内脏感觉的阈值,在 IBS - D 的内脏疼痛持续中居重要地位^[13-15]。但是 Ca^{2+} 作为重要的第二信使,由它所导致的细胞兴奋性增加,结肠平滑肌收缩的具体机制尚未完全明晰。尽管 Ca^{2+} 拮抗剂尼维溴铵问世多年,但是并未完全解决 IBS 的临床问题。 Ca^{2+} /钙调素(CAM) - 依赖性激酶(CaMKII)级联反应,以及当缺失 Ca^{2+} 内流,钙调素(CAM) - 依赖性激酶(CaMKII)记忆后产生的磷酸化级联反应被认为是介导 VHS 参与 IBS - D 的重要补充机制^[16,17]。

CaMK II 的功能是复杂多向的,大量研究结果已证实其与 AMPK、MEF2 的信号网络和心肌及骨骼肌的兴奋性密切相关^[18,19]。而本研究结果显示,IBS 模型组结肠组织中 p - CaMK II、AMPKα1、MEF2a 表达也明显升高,且该变化与内脏敏感性变化呈正相关,因此笔者认为,上述指标的表达与结肠平滑肌的兴奋性亦密切相关。综合课题组前期研究结果,笔者分析认为 Ca^{2+} 通过 TRPV1 通道开放渗透入细胞内,细胞内 Ca^{2+} 水平升高,通过 Ca^{2+} /CAM - CaMK II 的级联反应 → 腺苷酸活化蛋白激酶活化(AMPK) ↑ → 细胞内 NAD⁺ 水平 ↑ → 促进肌细胞增强因子 2 (MEF2) 的转录活性 ↑ → 平滑肌细胞收缩兴奋性 ↑ → 肠道平滑肌过度收缩 → 出现 VHS ↑,使得 IBS 的慢性内脏疼痛持续发生。在使用疏肝健脾方进行干预后,治疗组结肠组织中 p - CaMK II、AMPKα1 及 MEF2 表达下降,大鼠内脏敏感性 & 腹壁收缩活动等明显降低,表明疏肝健脾方可通过下调 p - CaMK II 表达,减少 AMPKα1 活性,降低 MEF2 表达,以抑制平滑肌细胞收缩而减少结肠平滑肌痉挛,降低内脏高敏感性,达到防治 IBS 效用。本次研究结果既是对前期课题研究的有力补充,亦为疏肝健脾方多环节、多靶点治疗 IBS - D 提供新的证据。

参考文献:

- [1] 张涛,谢建群. 谢建群从肝脾论治肠易激综合征经验拾萃[J]. 上海中医药杂志,2007,41(2):17.
- [2] 张涛,邱燕婷,徐卓妮,等. 疏肝健脾方对小鼠脊髓背根神经元 TRPV1 电流通道及 p - TRPV1、SP、CGRP 受体表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2020,38(2):80.
- [3] 黄适,张涛,陈远能. TRPV1、TRPV2 在腹泻型肠易激综合征大鼠中的表达及其与内脏敏感性的关系[J]. 世界华人消化杂志,2013,21(36):4133.
- [4] 张涛,方健松,黄晓燕,等. 束缚 - 应激联合辣素灌胃建立大鼠腹泻型肠易激综合征模型及评价[J]. 中国比较医学杂志,2017,27(3):1.
- [5] Zvolensky M, Jardin C, Farris S G, et al. Gut interpretations: how difficulties in emotion regulation may help explain the relation of visceral sensitivity with depression and anxiety among young adults with gastrointestinal symptoms[J]. Psychology, Health & Medicine, 2018:1.
- [6] De R C, Messlinger K, Hoffmann T. Differential conduction and CGRP release in visceral versus cutaneous peripheral nerves in the mouse[J]. Journal of Neuroscience Research, 2018, 96(8):1398.
- [7] Botschuijver S, Roeselers G, Levin E, et al. Intestinal Fungal Dysbiosis Is Associated With Visceral Hypersensitivity in Patients With Irritable Bowel Syndrome and Rats. Gastroenterology. 2017, 153(4):1026.
- [8] 李夏,王凤云,吴皓萌,等. 基于脑 - 肠互动功能探讨痛泻要方治疗腹泻型肠易激综合征机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(20):229.
- [9] Simrén M, Törnblom H, Palsson OS, et al. Visceral hypersensitivity is associated with GI symptom severity in functional GI disorders: consistent findings from five different patient cohorts. Gut. 2018, 67(2):255.
- [10] Wouters MM, Balemans D, Van Wanrooy S, et al. Histamine Receptor H1 - Mediated Sensitization of TRPV1 Mediates Visceral Hypersensitivity and Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome. Gastroenterology. 2016, 150(4):875.
- [11] Li YJ, Dai C, Jiang M. Mechanisms of Probiotic VSL#3 in a Rat Model of Visceral Hypersensitivity Involves the Mast Cell - PAR2 - TRPV1 Pathway. Dig Dis Sci. 2019, 64(5):1182.
- [12] Zhou Q, Yang L, Larson S, et al. Decreased miR - 199 augments visceral pain in patients with IBS through translational upregulation of TRPV1. Gut. 2016, 65(5):797.
- [13] 方健松,马媛萍,刘畅,等. PKA 调控 TRPV1 敏化介导 CGRP 表达探讨疏肝健脾方防治肠易激综合征研究[J]. 中华中医药学刊,2017,35(3):601.
- [14] 马媛萍,黄晓燕,陈远能,等. PKA 依赖 cAMP 信号介导 SP 调节内脏敏感性 & 疏肝健脾方防治肠易激综合征研究[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(1):180.
- [15] 张涛,方健松,潘锋,等. PKA/PKC 介导 TRPV1 敏化在肠易激综合征中的作用[J]. 实用医学杂志,2017,33(2):319.
- [16] Takemoto - Kimura S, Suzuki K, Horigane SI, et al. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease[J]. J Neurochem. 2017, 141(6):808 - 818.
- [17] Li J, Yu Z, Xu J, Feng R, et al. The Effect of Ca^{2+} , Lobe - Specificity, and CaMKII on CaM Binding to NaV1.1[J]. Int J Mol Sci. 2018, 19(9):E2495.
- [18] Jason Tallis, Rob S. James, Frank Seebacher. The effects of obesity on skeletal muscle contractile function[J]. Journal of Experimental Biology, 2018, 221(Pt 13).
- [19] Nakayama H, Fujio Y, Yamaguchi O. Calcium dependent signaling in cardiac hypertrophy and cell death[J]. Clin Calcium, 2013, 23(4):505.