

·针灸推拿·

本文引用:李跃兵,王焕梅,孙柳青,陈佳怡,侯培媚,李 箐,余 艳,彭 艳.电针调节功能性消化不良大鼠胃肠动力障碍及对胃窦组织铁死亡相关因子的影响[J].湖南中医药大学学报,2022,42(8):1329-1334.

电针调节功能性消化不良大鼠胃肠动力障碍 及对胃窦组织铁死亡相关因子的影响

李跃兵¹,王焕梅^{2*},孙柳青¹,陈佳怡¹,侯培媚¹,李 箐¹,余 艳¹,彭 艳¹

(1.湖南中医药大学针灸推拿与康复学院,湖南 长沙 410208;2.武汉市第九医院康复科,湖北 武汉 430010)

[摘要] **目的** 观察电针调节功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)大鼠胃肠动力障碍及对胃窦组织铁死亡相关因子的影响。**方法** 将40只SD大鼠随机分为空白组、模型组、电针组、西药组,每组10只。除空白组外,其余各组采用多因素干预法制造FD大鼠模型。造模成功后,模型组不采用干预措施,电针组采用电针足三里穴治疗21d,西药组采用多潘立酮灌胃21d。干预结束后,观察大鼠胃排空率、小肠推进率、胃窦组织亚铁离子(Fe^{2+})含量、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)浓度、丙二醛(malondialdehyde, MDA)浓度、细胞脂质活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)含量,谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)mRNA、胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白(cystine/glutamate reverse transporter, system Xc⁻)mRNA、GPX4蛋白、system Xc⁻蛋白表达。**结果** 与空白组相比,模型组大鼠胃排空率、小肠推进率、GSH浓度、GPX4mRNA、system Xc⁻mRNA、GPX4蛋白、system Xc⁻蛋白表达水平均降低,胃窦组织 Fe^{2+} 含量、MDA浓度、细胞脂质ROS含量均升高($P<0.05$);与模型组相比,电针组、西药组大鼠胃排空率、小肠推进率、GSH浓度、GPX4mRNA、system Xc⁻mRNA、GPX4蛋白、system Xc⁻蛋白表达水平均升高,胃窦组织 Fe^{2+} 含量、MDA浓度、细胞脂质ROS含量均降低($P<0.05$);与西药组相比,电针组大鼠胃排空率、小肠推进率、胃窦组织GSH浓度、GPX4mRNA、system Xc⁻mRNA、GPX4蛋白、system Xc⁻蛋白表达水平升高,胃窦组织 Fe^{2+} 含量、MDA浓度、细胞脂质ROS含量降低($P<0.05$)。相关性分析结果显示:各组大鼠胃排空率、小肠推进率与胃窦组织 Fe^{2+} 含量、MDA浓度、细胞脂质ROS含量成正相关($r=0.50, P<0.05$),与GSH、GPX4mRNA、system Xc⁻mRNA、GPX4蛋白、system Xc⁻蛋白呈负相关($r=-0.51, P<0.05$)。**结论** 电针对FD大鼠胃肠动力障碍有良性调节作用,其作用机制可能是通过抑制胃窦组织细胞铁死亡来实现的。

[关键词] 电针;功能性消化不良;胃肠动力障碍;胃窦组织;铁死亡;胃排空率;小肠推进率;MDA浓度;ROS含量

[中图分类号]R245 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.08.015

Effect of electroacupuncture on regulating gastrointestinal motility disorder in functional dyspepsia and iron death related factors in gastric antrum in rats with functional dyspepsia

LI Yuebing¹, WANG Huanmei^{2*}, SUN Liuqing¹, CHEN Jiayi¹, HOU Peimei¹, LI Zheng¹, SHE Yan¹, PENG Yan¹

(1. College of Acupuncture, Massage and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Rehabilitation Department of Wuhan Ninth Hospital, Wuhan, Hubei 430010, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of electroacupuncture on regulating gastrointestinal motility disorder and iron death related factors in gastric antrum in rats with functional dyspepsia (FD). **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into blank group, model group, electroacupuncture group and western medicine group, with 10 rats in each group. Except for the blank group, the other groups used multifactor intervention to create the rat model of FD. After successful

[收稿日期]2022-01-05

[基金项目]国家自然科学基金项目(81774431);武汉市卫健委科研项目(WZ21Q21);湖南中医药大学中西医结合国内一流学科建设开放基金项目(2020ZXY16)。

[第一作者]李跃兵,男,硕士,讲师,研究方向:针灸治病机理的研究。

[通信作者]*王焕梅,女,硕士,副主任医师,E-mail:873087947@qq.com。

modeling, the model group did not use intervention measures. The electroacupuncture group was treated with electroacupuncture at Zusanli ("ST36") for 21 d, and the western medicine group was treated with domperidone by gavage for 21 d. After the intervention, the gastric emptying rate, intestinal propulsion rate, ferrous ion (Fe^{2+}) content in gastric antrum, reduced glutathione (GSH) concentration, malondialdehyde (MDA) concentration, cellular lipid reactive oxygen species (ROS) content, glutathione peroxidase4 (GPX4) mRNA, cystine/glutamate reverse transporter (system Xc⁻) mRNA, GPX4 protein, system XC protein expression were observed. **Results** Compared with the blank group, the gastric emptying rate, intestinal propulsion rate, GSH concentration, GPX4mRNA, system Xc⁻mRNA, GPX4 protein, system XC-protein expression levels decreased in the model group, while Fe^{2+} content, MDA concentration and cellular lipid ROS content increased in the gastric antrum tissue ($P<0.05$); compared with the model group, the gastric emptying rate, intestinal propulsion rate, GSH concentration, GPX4mRNA, system Xc⁻mRNA, GPX4 protein, system Xc⁻protein expression levels increased in the electroacupuncture group and western medicine group, while Fe^{2+} content, MDA concentration and cellular lipid ROS content decreased in the gastric antrum ($P<0.05$); compared with the western medicine group, the gastric emptying rate, intestinal propulsion rate, GSH concentration, GPX4mRNA, system Xc⁻mRNA, GPX4 protein, system Xc⁻protein expression levels in gastric antrum tissue of electroacupuncture group increased, while Fe^{2+} content, MDA concentration and cellular lipid ROS content in gastric antrum tissue decreased ($P<0.05$). The results of correlation analysis showed that the gastric emptying rate and intestinal propulsion rate of rats in each group were positively correlated with Fe^{2+} content, MDA concentration and cellular lipid ROS content in gastric antrum ($r=0.50$, $P<0.05$), and negatively correlated with GSH, GPX4mRNA, system Xc⁻mRNA, GPX4 protein and system Xc⁻protein ($r=-0.51$, $P<0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture has a benign regulatory effect on gastrointestinal motility disorder in FD rats, and its mechanism may be achieved by inhibiting iron death in gastric antrum tissue.

[**Keywords**] electroacupuncture; functional dyspepsia; gastrointestinal motility disorder; gastric antrum; ferroptosis; gastric emptying rate; intestinal propulsion rate; MDA concentration; ROS content

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是一组以上腹痛、腹胀、腹泻、反酸、嗝气等为主要表现的非器质性胃肠病,流行病学调查显示,FD发病率为18%~38%,我国发病率为19.8%^[1]。FD发病机制至今尚不清楚,胃肠动力障碍被认为是FD发生最主要的生理机制之一^[2]。本课题组前期研究表明,电针能够有效改善FD大鼠运动功能,降低FD大鼠肠道敏感性,提高FD大鼠胃排空率及小肠推进率,能够良性调节FD大鼠胃肠动力功能^[3]。铁死亡是一种以铁依赖性、细胞脂质活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)积累为特征的新型细胞死亡方式。研究发现,铁死亡与多种胃肠道疾病发生有密切关系^[4]。谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)是公认的铁死亡关键物质之一,胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白(cystine/glutamate reverse transporter, system Xc⁻)负责将还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)的合成原料半胱氨酸转运至胞内,GPX4在GSH的辅助下,降解脂质过氧化物,避免细胞发生氧化性损伤,从而降低铁死亡的发生^[5]。本研究以FD大鼠为研究对象,采用电针FD大鼠足三里为干预手段,通过观察电针对FD大鼠胃肠动力调节情况、对铁死亡相关因子表达的影响以及二者的相关性分析,从铁死亡途径探讨电针调节FD大鼠胃肠动力功能的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物来源

SPF级功能性消化不良大鼠40只,雌雄各半,体质量200~250 g,由湖南中医药大学动物实验中心提供(大鼠订购编码:DWDG-202111150005)。饲养温度为20~25℃,湿度为55%~65%,12 h:12 h明暗光线交替照射。本实验经湖南中医药大学伦理委员会评审批准实施,动物实验过程及对实验动物的处理符合国家科技部《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]。

1.2 主要试剂与仪器

多潘立酮片(10 mg×30 s,批号:国药准字H10910003,西安杨森制药有限公司);0.9%氯化钠注射液(250 mL,批号:H20033973,湖南比扬医疗科技有限公司);伊利脱脂纯牛奶(批号:66115271050,内蒙古伊利实业集团股份有限公司);墨汁(250 g,批号:BR-987975,上海晨光文化用品有限责任公司);亚铁比色法测试盒、GSH比色法测试盒、MDA比色法测试盒(批号:国械注进20162401765/CB75771065、FS-E9710,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);荧光染料PCR检测试剂盒、反转录试剂盒(批号:KL14-49500、KL14-49600,江苏科惟生物技术有限公司);大鼠GPX4抗体、System Xc⁻抗体、GAPDH

(批号:BM5231、Bs-6883、BM1623,武汉博士德生物科技有限责任公司)。酶标仪、荧光酶标仪、流式细胞仪(型号:A51119500C、A51119600C、A51119700C,湖南比扬医疗科技有限公司);微量高速离心机、隔水式恒温培养箱(型号:TG16W、GNP-9080,湖南比扬医疗科技有限公司);华佗牌无菌针灸针(0.25 mm×25 mm,批号:津械注准 20172270152,苏州医疗用品有限公司);电子针灸治疗仪(型号:HANS100A,苏州医疗用品有限公司)。

1.3 造模方法

将40只SD大鼠分为空白组、模型组、电针组、西药组,每组10只。除空白组外,其余30只大鼠按复合病因造模法造模,具体方法如下:将大鼠隔日禁食,隔日进食,进食时足量喂食,将大鼠置于(0±1)℃冰水中游泳20 min,之后用(-4±2)℃冰板刺激大鼠腹部,每日2次,上午、下午各1次,连续21 d。在造模过程中,大鼠出现便溏、体质量减轻、运动迟缓、运动量少等症状,则视为造模成功^[6]。

1.4 干预方法

1.4.1 空白组 正常饲养,足量喂食。

1.4.2 模型组 造模成功后正常饲养,足量喂食。

1.4.3 电针组 (1)足三里穴定位^[7]:位于小腿外侧,膝关节后外侧,腓骨小头下约5 mm。(2)电针方法^[8]:FD大鼠清醒固定,直刺,深度0.2~0.3寸,进针后,接电针仪,疏密波(2 Hz,波频率100 Hz),强度以针柄轻微抖动为度,每次留针20 min。于造模成功后第3天开始针刺,每天1次,连续治疗21 d。

1.4.4 西药组 将多潘立酮片研成细粉末,溶于蒸馏水中,制备浓度为0.27 mg/mL的多潘立酮溶液,置于冰箱,4℃恒温保存备用,用时充分摇匀,多潘立酮(10 mg/kg)采用灌胃给药,每日1次,连续给药21 d,治疗时间与电针组一致^[9]。

1.5 观察指标及检测方法

于实验第22天,各组大鼠禁食24 h后,解剖取胃窦组织进行检测。胃窦组织取材方法:剪取一部分取胃窦组织,冰生理盐水冲洗,然后放入4%多聚甲醛中4℃固定24 h时,石蜡包埋备用,用于免疫组化检测。

1.5.1 胃内残留率的测定^[10] 治疗结束后,各组大鼠禁食24 h后,给予每只大鼠按1 mL/100 g灌胃容积灌服营养性半固体糊(羧甲基纤维素钠5 g,奶粉8 g,糖4 g,淀粉4 g,活性炭3 g,蒸馏水约150 mL),30 min后处死动物,打开腹腔,分离出胃。沿胃幽门处剪取胃,拭干,称全重(M1);再沿胃大弯处剪开胃,

用生理盐水洗净内容物,用滤纸拭干,称胃净重(M2)。计算胃残留率:胃残留率=(M1-M2)/灌胃量×100%。

1.5.2 小肠推进率的测定^[11] 治疗结束后,各组大鼠禁食、灌胃方法同前,30 min后处死动物,打开腹腔,分离出肠。用镊子轻轻提取上端至幽门、下端至回盲部的肠管,平铺于试验台上,不牵扯,轻轻将小肠拉成直线,用直尺测量小肠全长(L1)以及幽门至炭末所达最前端的长度(L2),计算肠推进率:小肠推进率=(L2/L1)×100%。

1.5.3 胃窦组织Fe²⁺含量检测^[12] 将采集各组FD大鼠胃窦组织离心(4℃,3000 r/min,半径10 cm,离心10 min),取上层清液200 μL加入酶标板相应孔中,混匀,37℃孵育10 min,在酶标仪593 nm处测定各孔OD值,依据OD值测定血清中Fe²⁺含量。

1.5.4 胃窦组织GSH含量、MDA含量测定^[13] 取离心后的上清液0.1 mL,设置标准孔、测定孔、空白孔,酶标仪波长405 nm振板1 min,静置5 min,严格按照试剂盒说明书进行操作,测定各孔吸光度并计算GSH含量。

1.5.5 胃窦组织ROS含量检测^[14] 将胃窦组织离心(4℃,3000 r/min,半径10 cm,离心10 min),取40 μL细胞悬液加入试管内,再加50 μL(1:20,用DPBS稀释)灭活正常兔血清,用洗涤液洗涤2次(4℃,30 min),加入适量荧光标记物,充分振摇(4℃,30 min),加入1 mL固定液制备标本,用流式细胞仪检测胃窦组织ROS含量。

1.5.6 胃窦组织GPX4mRNA、system Xc-mRNA表达检测^[15] 用RT-PCR法检测胃窦组织GPX4mRNA表达水平。具体方法如下:收集各组胃窦组织细胞,用Trizol法提取细胞总RNA,紫外分光光度计检测RNA浓度及纯度,并将RNA逆转录为cDNA,严格按照说明书进行RT-PCR反应,并计算GPX4mRNA、system Xc-mRNA相对表达量。

1.5.7 胃窦组织GPX4蛋白、system Xc-蛋白表达检测^[16] 用Western blot法检测胃窦组织GPX4蛋白表达水平。具体方法如下:取适量冻存的胃窦组织,研磨后于冰山裂解,混匀,30 min后置于离心机上离心(4℃,10 000 r/min,半径15 cm,离心10 min),取适量上清液与PBS混匀,用BCA法测定蛋白浓度,严格按照说明书进行电泳、转膜、封闭、稀释,加入稀释后的GPX4抗体、system Xc-抗体,4℃孵育过夜、TBST、加入HRP二抗,恒温37℃下继续孵育1 h,ECL化学液化显影,凝胶成像系统进行分析,计算目标蛋白条带的相对表达量。

1.6 统计学方法

所有数据均用 SPSS 22.0 进行数据处理,各检测指标统计数据均用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。计量资料符合正态分布、方差齐性者,组间比较用单因素方差分析,若存在差异,进一步的组间两两比较采用 LSD 检验,方差不齐则选用 Tamhane's T2 检验, Pearson 检验描述组间比较的相关性。均以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠胃内残留率、小肠推进率比较

与空白组相比,模型组大鼠的胃内残留率明显升高、小肠推进率明显降低($P<0.05$);与模型组相比,电针组、西药组的胃内残留率下降、小肠推进率升高($P<0.05$);与西药组相比,电针组的胃内残留率明显下降、小肠推进率明显升高($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠胃内残留率、小肠推进率比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	胃内残留率	小肠推进率
空白组	10	40.28±13.78	64.11±10.33
模型组	10	46.91±13.41 [▲]	57.69±7.76 [▲]
电针组	10	42.35±12.84 ^{▼▽}	62.23±7.43 ^{▼▽}
西药组	10	43.71±13.43 [▼]	61.25±7.55 [▼]

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$;与模型组比较,▼ $P<0.05$;与西药组比较,▽ $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠胃窦组织 Fe²⁺浓度比较

与空白组相比,模型组大鼠的胃窦组织 Fe²⁺浓度升高($P<0.05$);与模型组相比,电针组、西药组大鼠胃窦组织 Fe²⁺浓度降低($P<0.05$);与西药组相比,电针组大鼠的胃窦组织 Fe²⁺浓度降低($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠胃窦组织 Fe²⁺含量比较($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/g}$)

组别	n	Fe ²⁺
空白组	10	12.51±0.59
模型组	10	14.01±0.61 [▲]
电针组	10	13.27±0.65 ^{▼▽}
西药组	10	13.83±0.69 [▼]

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$;与模型组比较,▼ $P<0.05$;与西药组比较,▽ $P<0.05$ 。

2.3 胃窦组织 GSH、MDA 含量比较

与空白组相比,模型组大鼠胃窦组织 MDA 含量增高、GSH 含量降低($P<0.05$);与模型组相比,电针组、西药组大鼠胃窦组织 MDA 含量降低、GSH 含量升高($P<0.05$);与西药组相比,电针组大鼠胃窦组

织 MDA 含量降低、GSH 含量升高($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠胃窦组织 GSH、MDA 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDA/(ng/mL)	GSH/(g/mL)
空白组	10	178.35±17.27	30.03±1.71
模型组	10	191.27±18.19 [▲]	24.94±1.61 [▲]
电针组	10	181.97±17.75 ^{▼▽}	27.91±1.69 ^{▼▽}
西药组	10	185.31±18.05 [▼]	26.83±1.67 [▼]

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$;与模型组比较,▼ $P<0.05$;与西药组比较,▽ $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠胃窦组织细胞脂质 ROS 含量比较

与空白组相比,模型组大鼠胃窦组织脂质 ROS 含量明显升高($P<0.05$);与模型组相比,电针组、西药组大鼠胃窦组织脂质 ROS 含量降低($P<0.05$);与西药组相比,电针组大鼠胃窦组织脂质 ROS 含量降低($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 各组大鼠胃窦组织细胞脂质 ROS 含量比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	ROS
空白组	10	3.01±0.01
模型组	10	3.93±0.07 [▲]
电针组	10	3.11±0.03 ^{▼▽}
西药组	10	3.57±0.05 [▼]

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$;与模型组比较,▼ $P<0.05$;与西药组比较,▽ $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠胃窦组织 GPX4mRNA、system Xc-mRNA 表达水平的比较

与空白组相比,模型组大鼠胃窦组织 GPX4mRNA、system Xc-mRNA 表达降低($P<0.05$);与模型组相比,电针组、西药组大鼠胃窦组织 GPX4mRNA、system Xc-mRNA 表达增强($P<0.05$);与西药组相比,电针组大鼠胃窦组织 GPX4mRNA、system Xc-mRNA 表达增强($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 各组大鼠胃窦组织 GPX4mRNA、system Xc-mRNA 表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	GPX4mRNA	system Xc-mRNA
空白组	10	0.96±0.03	1.05±0.03
模型组	10	0.82±0.02 [▲]	0.83±0.02 [▲]
电针组	10	0.89±0.01 ^{▼▽}	0.89±0.03 ^{▼▽}
西药组	10	0.85±0.03 [▼]	0.85±0.01 [▼]

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$;与模型组比较,▼ $P<0.05$;与西药组比较,▽ $P<0.05$ 。

2.6 各组大鼠胃窦组织 GPX4 蛋白、system Xc-蛋白表达水平的比较

与空白组相比,模型组大鼠胃窦组织 GPX4 蛋

白、system Xc-蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组相比,电针组、西药组大鼠胃窦组织 GPX4 蛋白、system Xc-蛋白表达增强($P<0.05$);与西药组相比,电针组大鼠胃窦组织 GPX4 蛋白、system Xc-蛋白表达增强($P<0.05$)。详见表6。

表6 各组大鼠胃窦组织 GPX4 蛋白、system Xc-蛋白表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	GPX4/ β -actin	system Xc-/ β -actin
空白组	10	1.17 \pm 0.09	1.13 \pm 0.11
模型组	10	0.81 \pm 0.05 [▲]	0.85 \pm 0.03 [▲]
电针组	10	0.93 \pm 0.07 ^{▼▽}	0.97 \pm 0.07 ^{▼▽}
西药组	10	0.88 \pm 0.03 [▼]	0.91 \pm 0.05 [▼]

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$;与模型组比较,▼ $P<0.05$;与西药组比较,▽ $P<0.05$ 。

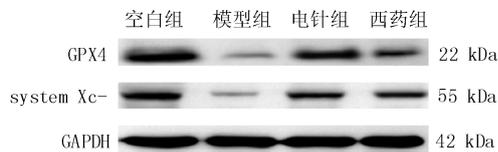


图1 各组大鼠胃窦组织 GPX4 蛋白、system Xc-蛋白相对表达情况

2.7 各组大鼠胃内残留率、小肠推进率与胃窦组织铁死亡相关因子相关性的比较

各组大鼠胃内残留率与胃窦组织 Fe^{2+} 、MDA、ROS 成正相关($r=0.50, P<0.05$),与 GSH、GPX4mRNA、system Xc-mRNA、GPX4 蛋白、system Xc-蛋白成负相关($r=-0.51, P<0.05$);各组大鼠小肠推进率与胃窦组织与 Fe^{2+} 、MDA、ROS 成负相关($r=-0.49, P<0.05$),与 GSH、GPX4mRNA、system Xc-mRNA、GPX4 蛋白、system Xc-蛋白成正相关($r=0.51, P<0.05$)。详见表7。

表7 各组大鼠胃内残留率、小肠推进率与胃窦组织铁死亡相关因子相关性的比较

铁死亡相关因子	胃内残留率		小肠推进率	
	r 值	P 值	r 值	P 值
Fe^{2+}	0.51	0.00	-0.48	0.00
MDA	0.48	0.00	-0.51	0.00
ROS	0.52	0.00	-0.48	0.00
GSH	-0.51	0.00	0.54	0.00
GPX4mRNA	-0.49	0.00	0.51	0.00
system Xc-mRNA	-0.51	0.00	0.54	0.00
GPX4 蛋白	-0.52	0.00	0.48	0.00
system Xc-蛋白	-0.50	0.00	0.51	0.00

3 讨论

FD 属于中医学“痞满”的范畴,中医认为情绪紧张、饮食不洁等因素致使脾失健运,运化精微无力,

从而诱发病[17]。足三里穴为胃经合穴、下合穴,能健脾燥湿、生发胃气,主治消化不良等胃肠病。《灵枢·四时气》有云:“着痹不去,久寒不已,卒取其三里。骨为干。肠中不便,取三里,盛泻之,虚补之。……取三里以下。胃气逆,则刺少阳血络以闭胆逆,却调其虚实,以去其邪[18]。”本研究常用多因素造模,运用电针足三里调节 FD 胃动力水平,研究结果显示,与空白组相比,模型组大鼠的胃内残留率升高、小肠推进率降低($P<0.05$),造模后食物在胃肠道内停留时间延长,说明胃肠道消化功能出现障碍,结合大鼠便溏、体质量减轻等症状,说明造模成功。与模型组相比,电针组、西药组 FD 大鼠胃内残留率降低、小肠推进率升高($P<0.05$),说明电针与西药对 FD 大鼠胃肠功能具有良性调节作用;与西药组相比,电针组 FD 大鼠胃内残留率降低、小肠推进率升高($P<0.05$),说明电针较西药更能良性调节 FD 大鼠胃肠动力功能,经过电针治疗,FD 大鼠胃肠功能障碍情况有所缓解。

铁死亡是一种铁依赖性的,区别于细胞凋亡、细胞坏死、细胞自噬的新型细胞程序性死亡方式[19],主要表现为细胞内铁离子积累、GSH 耗竭和脂质过氧化。在 Fe^{2+} 的作用下,通过芬顿反应可启动细胞膜脂质过氧化,产生羟自由基和过氧自由基,活化的自由基通过损伤细胞膜系统造成细胞死亡[20]。GSH 主要发挥抗氧化、清除自由基作用,与多种生理、病理代谢产物结合,将其转化为无害物质排出体外;system Xc-是调节细胞内外 GSH 平衡状态的主要蛋白,system Xc-将细胞外胱氨酸转运到细胞,转化为半胱氨酸用于 GSH 的合成,同时将细胞内谷氨酸转运到细胞外,调节细胞内外氨基酸水平来影响 GSH 合成[21]。研究发现,抑制 system Xc-时,导致细胞内 GSH 的合成减少,氧自由基堆积,诱导细胞铁死亡[22]。GPX4 是谷胱甘肽过氧化物酶家族成员之一,是一种富含硒元素的蛋白酶,能够特异性降解细胞膜脂质过氧化物,GPX4 在 GSH 的作用下,使得脂质过氧化的过氧键转变为羟基,失去其过氧化物的活性,降低铁死亡的发生[23]。研究表明,GPX4 与铁死亡发生密切相关,如果 GPX4 活性受到抑制,启动脂质过氧化,导致细胞内脂质 ROS 堆积,脂质 ROS 是脂质过氧化的产物,在铁的参与下产生氧自由基,引起细胞损伤[24]。生物体内自由基作用于脂质发生过氧化反应,氧化终产物为丙二醛(malondialdehyde, MDA),MDA 会引起蛋白质、核酸等生命大分子交联聚合,且具有细胞毒性。因此,脂质氧化终产物 MDA 在体

外影响线粒体呼吸链复合物及线粒体内关键酶活性,它的产生还能加剧细胞膜的损伤,因而测试MDA的量可反映机体脂质过氧化程度,间接反应出细胞损伤的程度^[25]。

研究结果显示:与空白组相比,模型组大鼠胃窦组织 Fe²⁺含量、MDA 浓度、细胞脂质 ROS 含量升高,GSH 浓度、GPX4mRNA、system Xc-mRNA、GPX4 蛋白、system Xc-蛋白表达降低($P<0.05$),上述结果表明造模后 FD 大鼠胃窦细胞铁死亡发生频率提高;与模型组相比,电针组、西药组 FD 大鼠胃窦组织 Fe²⁺含量、MDA 浓度、脂质 ROS 含量降低,GSH 浓度、GPX4mRNA、system Xc-mRNA、GPX4 蛋白、system Xc-蛋白表达升高($P<0.05$),说明电针和多潘立酮均能抑制 FD 大鼠胃窦组织细胞铁死亡的发生;与西药组相比,电针组 FD 大鼠胃窦组织胃窦组织 Fe²⁺含量、MDA 浓度、脂质 ROS 含量降低,GSH 浓度、GPX4mRNA、system Xc-mRNA、GPX4 蛋白、system Xc-蛋白表达升高($P<0.05$),说明电针较多潘立酮更能抑制 FD 大鼠胃窦组织铁死亡的发生。相关性分析结果显示:各组大鼠胃内残留率与胃窦组织 Fe²⁺含量、MDA 浓度、脂质 ROS 含量成正相关($r=0.50, P<0.05$),与 GSH、GPX4mRNA、system Xc-mRNA、GPX4 蛋白、system Xc-蛋白成负相关($r=-0.51, P<0.05$);各组大鼠小肠推进率与胃窦组织与 Fe²⁺、MDA、脂质 ROS 含量成负相关($r=-0.49, P<0.05$),与 GSH、GPX4mRNA、system Xc-mRNA、GPX4 蛋白、system Xc-蛋白成正相关($r=0.51, P<0.05$),说明铁死亡的发生与 FD 大鼠胃肠动力障碍密切相关。

综上所述,胃窦组织细胞铁死亡的发生与 FD 大鼠胃肠动力障碍密切相关,本研究进一步揭示电针可能是通过抑制 FD 大鼠胃窦组织铁死亡,来实现缓解 FD 大鼠胃肠动力障碍,良性调节 FD 大鼠胃肠动力功能。本研究为认识 FD 提供了新途径,为探索针灸治疗 FD 提供了新靶点,为今后进一步研究针灸治疗 FD 提供了参考的试验依据。

参考文献

- [1] 范建超,徐派的,韩永丽,等.电针足三里对功能性消化不良模型大鼠内脏高敏感性的影响[J].中国组织工程研究,2022,26(5):663-668.
- [2] 邹孟龙,黄晓燕,陈雅璐,等.基于 CiteSpace 的中医药治疗功能性消化不良知识图谱可视化研究[J].时珍国医国药,2021,32(9):2285-2288.
- [3] 李跃兵,贺子毅,刘奕君,等.电针足三里对功能性消化不良大鼠胃肠动力调节机制研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(6):928-933.

- [4] 刘 静,刘文天.铁死亡在消化系统肿瘤中的研究进展[J].临床与实验病理学杂志,2022,38(3):331-333.
- [5] 张 新,陈文娜,宋 囡,等.丹萎片通过铁死亡途径减轻非酒精性脂肪性肝病模型小鼠肝脏氧化损伤[J].中国病理生理杂志,2021,37(12):2180-2188.
- [6] 刘伟伟,丁 麟,王秀艳,等.电针联合理线治疗对功能性消化不良大鼠 NLRP3 水平及肠道运动功能的影响[J].针灸临床杂志,2022,38(1):64-69.
- [7] 郭 义.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2016:38.
- [8] 潘小丽,周 丽,王 丹,等.电针“足三里”对功能性消化不良大鼠胃排空及自噬信号通路的影响[J].针刺研究,2019,44(7):486-491.
- [9] 孙忠人,王承斌,尹洪娜,等.针刺改善功能性消化不良胃肠动力的机制研究[J].中医药学报,2021,49(9):67-70.
- [10] 侯理伟,荣培晶,李 亮,等.经皮耳穴迷走神经刺激对功能性消化不良大鼠自主神经功能的影响[J].针刺研究,2021,46(8):663-670.
- [11] 陈 媛,张璞玥,龙 涛,等.胃俞募配穴对脑岛味觉皮层损毁功能性消化不良大鼠脑功能网络连接的影响[J].成都中医药大学学报,2021,44(2):37-41.
- [12] 李艳伟,徐枝芳,王松涛,等.自主神经介导针灸治疗功能性消化不良的作用及机制研究[J].针灸临床杂志,2021,37(4):84-88.
- [13] 范建超,冯小剑,徐派的,等.电针对功能性消化不良大鼠内脏敏感性及其精神状态的影响[J].华南国防医学杂志,2021,35(1):1-6.
- [14] 高珊杉,付晨瑜,李春雨,等.偶刺法针刺配合电针治疗功能性消化不良上腹痛综合征临床研究[J].针灸临床杂志,2021,37(1):8-12.
- [15] 王 丹,张红星,荣培晶,等.电针对功能性消化不良肝郁脾虚大鼠十二指肠黏膜机械屏障及其调节蛋白的影响[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(12):1843-1845,1882.
- [16] 拱佳焯.揸针埋针与电针疗法治疗功能性消化不良的临床疗效比较[J].中国社区医师,2020,36(29):101-102.
- [17] 王 丹,张红星,荣培晶,等.电针对功能性消化不良肝郁脾虚模型大鼠十二指肠 TLR4、NF- κ B p65 的影响[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(9):1337-1340.
- [18] 王 丹,张红星,荣培晶,等.电针对功能性消化不良大鼠十二指肠紧密连接蛋白及浆细胞的影响[J].中医杂志,2020,61(16):1439-1441.
- [19] 耿慧君,张 佩,王国艳,等.铁死亡及其研究进展[J].生命的化学,2021,41(11):2376-2382.
- [20] 张 亮,廖勇群,夏秦川,等.铁死亡调控信号通路以及在相关疾病中的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2022,27(2):227-234.
- [21] 陈璐瑶,饶小珍.铁死亡的发生机制及相关疾病研究进展[J].生物学教学,2022,47(2):2-5.
- [22] 米海潮,史 敏,崔 芳.铁自噬与铁死亡及其相关疾病的研究[J].中国生物化学与分子生物学报,2021,49(12):1-17.
- [23] 曾江辉,梁秀云,赖春慧,等.铁死亡相关机制与结直肠癌的研究进展[J].肿瘤学杂志,2022,28(2):93-98.
- [24] 史梦琳,张会禄,罗忠光,等.诱导铁死亡:肿瘤治疗的新途径[J].上海医药,2021,42(23):16-20,24.
- [25] 高丽珍,王俊青,陈俊林,等.miR-223 靶向 ALOX12 对胃癌细胞铁死亡影响的研究[J].中华肿瘤防治杂志,2021,28(23):1805-1811,1825.