

本文引用:周赛男, 蔺晓源, 陈思清, 周 姝, 韩运宗, 刘 琴, 符 佳. 四磨汤对功能性消化不良大鼠 CNP/NPR-B/cGMP 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(7): 1165-1172.

四磨汤对功能性消化不良大鼠 CNP/NPR-B/cGMP 信号通路的影响

周赛男¹, 蔺晓源¹, 陈思清², 周 姝², 韩运宗², 刘 琴², 符 佳^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 通过研究四磨汤对功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)模型大鼠 CNP/NPR-B/cGMP 信号通路的影响, 进一步探讨其作用机制。**方法** 将 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、低浓度四磨汤组、中浓度四磨汤组、高浓度四磨汤组以及莫沙必利组。参考文献中的方法使用夹尾刺激联合不规则饮食 14 d 制备 FD 大鼠模型。造模结束后, 四磨汤低、中、高浓度组大鼠分别灌胃 1.8、2.4、3.6 g/(kg·d)剂量的四磨汤药液, 莫沙必利组灌胃 0.305 mg/(kg·d)剂量的莫沙必利药液, 对照组和模型组给予等体积蒸馏水, 给药 14 d。观测大鼠体质量变化; 酚红法检测大鼠胃排空率; 碳粉法检测大鼠小肠推进率; ELISA 法检测血清中胃动素(motilin, MTL)、胃泌素(gastrin, GAS)、胃窦平滑肌 C 型利尿肽(C-type natriuretic peptide, CNP)、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的含量; RT-qPCR 和 Western blot 分别检测胃窦平滑肌 CNP、B 型利尿肽受体(type B urinary natriuretic peptide receptor, NPR-B)的基因和蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠体质量降低($P<0.05$), 胃排空率与小肠推进率明显减弱($P<0.05$), 血清 MTL、GAS 含量降低($P<0.05$), 胃窦平滑肌 CNP、cGMP 含量升高($P<0.05$), CNP、NPR-B 的 mRNA 和蛋白表达增加($P<0.05$)。与模型组相比, 四磨汤各剂量组大鼠体质量显著增加($P<0.05$), 胃排空率和小肠推进率显著提高($P<0.05$), 血清 MTL 和 GAS 含量显著增加($P<0.05$), 胃窦平滑肌 CNP、cGMP 含量降低($P<0.05$), CNP、NPR-B 的 mRNA 和蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** 四磨汤通过抑制 CNP/NPR-B/cGMP 信号通路以促进胃肠动力可能是其治疗 FD 的作用机制之一。

[关键词] 功能性消化不良; 四磨汤; CNP/NPR-B/cGMP 信号通路; 大鼠; 胃排空率; 小肠推进率

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.07.003

Effects of Simo Decoction on CNP/NPR-B/cGMP signaling pathway in rats with functional dyspepsia

ZHOU Sainan¹, LIN Xiaoyuan¹, CHEN Siqing², ZHOU Shu², HAN Yunzong², LIU Qin², FU Jia^{1*}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Simo Decoction on CNP/NPR-B/cGMP signaling pathway in rats of functional dyspepsia (FD) model, so as to further explore its mechanism of action. **Methods** Wistar rats were randomly divided into control group, model group, mosapride group, low-, medium-, and high-dose Simo Decoction groups. The FD rat model was established by tail-clipping stimulation combined with irregular diet for 14 d. After modeling, the rats in low-, medium-, and high-dose Simo Decoction groups were intragastrically administered with 1.8, 2.4, and 3.6 g/(kg·d) Simo Decoction, respectively. Mosapride group was received 0.305 mg/(kg·d) mosapride solution by gavage, while control and model groups were given an equal volume of

[收稿日期] 2023-01-13

[基金项目] 湖南省中医药科研计划重点项目(2021203); 湖南省自然科学基金科卫联合项目(2022JJ70031); 湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2018ZYX13); 湖南中医药大学中医学国内一流学科项目(4901-020000200205)。

[第一作者] 周赛男, 女, 副主任医师, 博士, 研究方向: 中医药防治消化系统疾病的研究。

[通信作者] * 符 佳, 女, 硕士, 主治医师, E-mail: lancyivlancyivy@163.com。

distilled water, and all the administration lasted for 14 d. The changes in body weight of the rats were observed; the gastric emptying rate was measured by the phenol red method; the small intestinal propulsive rate was measured by the carbon powder method; the levels of motilin (MTL), gastrin (GAS), C-type natriuretic peptid (CNP), and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in serum were determined by ELISA; the gene and protein expressions of CNP and Type B urinary natriuretic peptide receptor (NPR-B) in gastric antrum smooth muscle were examined by RT-qPCR and Western blot, respectively. **Results** Compared with control group, the rats in model group showed a decrease in body weight ($P<0.05$), significantly decreased gastric emptying and small intestinal propulsive rates ($P<0.05$), lower MTL and GAS levels in serum ($P<0.05$), higher CNP and cGMP levels in gastric antrum smooth muscle ($P<0.05$), and increased mRNA and protein expressions of CNP and NPR-B ($P<0.05$). Compared with model group, the body weight, gastric emptying rate, small intestinal propulsive rate, and the levels of MTL and GAS in serum in Simo Decoction groups were significantly higher ($P<0.05$), while the levels of CNP and cGMP in gastric antrum smooth muscle and mRNA and protein expressions of CNP and NPR-B were lower ($P<0.05$). **Conclusion** Simo Decoction may exert its therapeutic effects on FD by inhibiting CNP/NPR-B/cGMP signaling pathway and promoting gastrointestinal motility.

[**Keywords**] functional dyspepsia; Simo Decoction; CNP/NPR-B/cGMP signaling pathway; rats; gastric emptying rate; small intestinal propulsive rate

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是生活中比较常见的功能性胃肠疾病之一, 通常与食物摄入有关^[1]。有统计发现, FD 全球综合患病率为 21.8%, 近年来呈上升趋势^[2]。现阶段, 国内外对 FD 发病机制的认识还不统一, 一般认为是多种因素综合作用的结果。如胃肠动力出现功能性障碍、内脏神经敏感性升高、感染幽门螺杆菌及精神压力增大等, 导致病发核心环节脑肠轴功能发生紊乱, 胃肠激素分泌异常, 继而引起 FD 症状^[3-5]。利尿钠肽 (natriuretic peptide, NP) 家族中的 C 型利尿钠肽 (CNP) 主要存在于血管内皮细胞中, 涉及血管平滑肌的松弛以及细胞增殖和迁移的调节等功能^[6]。研究显示, CNP 通过细胞外液传递, 可以作用于胃肠道平滑肌上的 B 型利尿肽受体 (type B urinary peptide receptor, NPR-B), 并与之结合, 导致环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 含量提升, 进而激活 CNP/NPR-B/cGMP 通路, 促进平滑肌舒张^[7-9]。CNP/NPR-B/cGMP 信号通路状态的改变, 与胃肠道运动失调以及 FD 有着密切的联系^[10]。

针对 FD, 现代医学治疗多以质子泵抑制剂、组胺 2 受体拮抗剂、促动力剂和中枢神经调节剂等药物进行干预^[2], 疗效显著, 毒副作用同样明显, 如质子泵抑制剂与组胺 2 受体拮抗剂等药物, 长期使用会抑制胃酸产生, 引发维生素 B₁₂ 吸收不良^[11]。此外, 部分人会产生头痛、腹胀、恶心等现象^[12]。以辨证论治理念为主的中医学, 在治疗 FD 时有着独特的效果, 毒副作用弱, 效果明显^[13-15]。中医学上将 FD 辨证分为肝脾气滞证、肝郁脾虚证、脾胃虚寒证、肝胃不和

证、寒热错杂证和脾胃湿热证等多种证型^[16]。FD 与肝、脾密切相关, 肝气郁结会导致脾胃升降失司, 从而导致脾胃运动功能失调, 导致 FD 肝脾气滞证的发生, 因此, 肝脾气滞证是 FD 的一个重要分型^[17]。

四磨汤是治疗肝脾气滞证 FD 的一种常用中成药^[18-20], 最早出自《严氏济生方》, 由人参、乌药、槟榔、沉香组成, 有破气降逆的功效, 用于治疗 FD 作用确切, 效果明显^[14], 但机制不明。因此, 为了进一步明确四磨汤治疗 FD 的作用靶点, 本研究通过复制肝脾气滞证 FD 大鼠模型, 观察四磨汤对胃动素 (motilin, MTL)、胃泌素 (gastrin, GAS) 及 CNP/NPR-B/cGMP 信号通路的影响, 现报道如下。

1 材料

1.1 动物

从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购买 42 只 SPF 级 Wistar 大鼠 (体质量 180~220 g)。适应性饲养 1 周, 饲养条件: 温度 22 ℃、湿度 50%~60%, 所有大鼠自由饮食、饮水。本研究经湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准 (审批号: ZYFY20201015), 实验动物使用许可证号: SCXK(湘)2019-0004。

1.2 药物

四磨汤中药饮片: 人参 6 g、乌药 6 g、槟榔 9 g、沉香 6 g, 均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房, 经鉴定符合《中华人民共和国药典》标准, 按传统方法煎煮浓缩成高、中、低不同浓度的药液备用。莫沙必利: 片剂, 5 mg/片 (江苏豪森药业集团有限公司, 生产批号: 124220502)。

1.3 主要试剂与仪器

琼脂糖(西班牙 BIOWEST,批号:111860); mRNA 逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号:CW2569);NPR-B Rabbit Antibody (55113-1-AP)、山羊抗小鼠二抗(批号:SA00001-1)、山羊抗兔二抗(批号:SA00001-2)均购自美国 Proteintech 公司;胃动素 motilin, MTL,批号:CSB-E08208r)、胃泌素(gastrin, GAS,批号:CSB-E12743r)均购自武汉华美生物工程有限公司;cGMP(批号:ml003133)、NPR-B(批号:ml003270)均购自上海酶联生物科技有限公司。

2 方法

2.1 分组与模型制备

将 Wistar 大鼠随机选取 7 只作为对照组,其余实验组大鼠均参照文献^[21-22]中的方法复制肝脾气滞证 FD 模型:每天(7:00、10:00、13:00、16:00)于大鼠尾巴远端三分之一处用鼠夹夹住,力度适中,避免破皮,每次刺激大鼠约 0.5 h。实验期间,大鼠正常饮水,隔日禁食,持续 14 d。将造模处理过的大鼠随机分为模型组、低浓度四磨汤组、中浓度四磨汤组、高浓度四磨汤组、莫沙必利组,每组 7 只。通过大鼠行为学、胃排空率及小肠推进率判断是否造模成功^[21-23]。

2.2 给药与取材

从第 15 天开始动物给药,给药剂量以成人每天用量按体表面积法^[24]换算成大鼠的等效剂量,四磨汤低、中、高浓度组大鼠分别灌胃 1.8、2.4、3.6 g/(kg·d)剂量的四磨汤药液,莫沙必利组灌胃 0.305 mg/(kg·d)剂量的莫沙必利药液,每天灌胃 1 次,灌胃容积均为 1 mL/100 g 体质量。对照组和模型组予以等剂量蒸馏水灌胃,连续 14 d。禁食 24 h 后末次给药,给药 1 h 后灌胃胃排空和小肠推进试验所用溶液,0.5 h 后用 3%戊巴比妥钠 5 mL/kg 腹腔注射麻醉,麻醉完成后剖开腹腔,肝门静脉取血,将全血标本置于室温静置 2 h 后于 4 ℃ 3000 r/min 离心 15 min,离心半径为 9 cm,吸取上清液,于 -80 ℃ 条件下保存。随后进行胃排空和小肠推进试验,然后漂洗胃窦组织,一部分放入多聚甲醛中固定,另一部分生理盐水漂洗后放于液氮中速冻 5 min,随后于 -80 ℃ 冰箱中保存。

2.3 指标检测

2.3.1 一般状态观察 在整个实验期间,定期观察

大鼠状态,记录体质量变化,根据体质量计算大鼠的增重。

2.3.2 胃排空率和小肠推进率测定^[25] 每组大鼠随机挑选 3 只,使用酚红-甲基纤维素溶液 2 mL (25 mg 酚红溶入 50 mL 1.5%甲基纤维素溶液中)灌胃,0.5 h 之后麻醉大鼠,剖开腹部,捆扎幽门和胃贲门,取出完整鼠胃,然后沿胃大弯将胃剖开,使用蒸馏水对鼠胃内容物进行冲洗,并将冲洗液定容至 20 mL。再加入等体积 0.5 mol/L NaOH 溶液,混匀,放置 1 h。取 5 mL 上清液,加入 0.5 mL 20%三氯乙酸,于 3 500 r/min,离心半径为 9 cm,离心 10 min,取上清液,用分光光度计测定其吸光度(A)。另取 10%酚红-甲基纤维素溶液 2 mL,依次加入 18 mL 蒸馏水、20 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液,以及 4 mL 20%三氯乙酸混合均匀,测定吸光度(A)。大鼠胃排空率=(1-实测酚红 A/标准酚红 A 值)×100%。各组剩余的 4 只大鼠禁食 24 h 后,按照 1 mL/100 g 体质量用量,使用炭粉混悬液(10%活性炭+10%阿拉伯胶)灌胃,0.5 h 之后麻醉大鼠,剖开腹腔,用镊子取出整个小肠,于托盘上缓缓拉直,再用直尺测量幽门至回盲部的肠管的小肠推进指标,小肠推进率=炭粉前端至幽门括约肌距离(cm)/幽门括约肌至小肠末端距离(cm)×100%。

2.3.3 HE 染色 将胃黏膜组织进行石蜡包埋并切片,然后放入 60 ℃ 下烤片 12 h。在二甲苯中浸泡 3 次,每次 20 min。随后,分别在 100%、100%、95%、85%、75%乙醇溶液中浸泡 5 min,并用蒸馏水洗涤 5 min。将切片先用苏木素染色 3 min,用 PBS 洗涤再返蓝。接着再用伊红染色 3 min,再次用蒸馏水洗涤。最后将切片放入梯度乙醇(95%~100%)中进行脱水,每个梯度浓度的乙醇持续 5 min。脱水后,连续两次放入二甲苯中 10 min 清洗,最后用中性树胶包埋,并在显微镜下观察。

2.3.4 ELISA 检测血清中 MTL、GAS 和胃窦组织中 CNP、cGMP 的含量 取出 -80 ℃ 血清消融,采用 ELISA 法检测大鼠血清中 MTL、GAS 的浓度。取小部分胃窦平滑肌样本消融,用 1×PBS 将残留在样本上血污洗去,剪成小块放,再加入 1×PBS,匀浆,反复消融匀浆液,然后过夜,次日 2~8 ℃ 5 000 r/min,离心 5 min,离心半径为 9 cm,取上清液待测。采用

ELISA 检测试剂盒检测大鼠胃窦平滑肌 CNP 与 cGMP 的含量。具体步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

2.3.5 RT-qPCR 法检测各组胃窦组织 CNP、NPR-B 的 mRNA 表达 Trizol 法提取胃窦平滑肌组织 RNA, 根据 Trizol 试剂盒的指示提取组织中的总 RNA。取 5 μ L 提取的总 RNA 和 1 μ L 的 loading buffer 进行琼脂糖凝胶电泳, 以检测 RNA 质量, 以紫外分光光度计测量 RNA 浓度。根据 RNA 反转录试剂盒的指示, 将 mRNA 转录成 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 检测目的基因, 内参为 GAPDH。在 NCBI 上搜索目的基因的序列, 运用 Primer 5 软件设计引物, 并由上海生工合成, 具体引物序列如表 1 所示。RT-qPCR 扩增程序设定为: 95 $^{\circ}$ C 下预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 下变性 15 s, 65 $^{\circ}$ C 下退火延伸 30 s, 进行 40 个循环。在反应结束后, 降至 4 $^{\circ}$ C, 停止反应并保证 RT-qPCR 产物的稳定。进行 RT-qPCR 测量以获得每个样本的平均 CT 值。最后用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对表达量。

2.3.6 Western blot 法检测各组胃窦组织 CNP、NPR-B 蛋白的表达 首先, 将胃窦平滑肌组织置于 EP 管中, 用 RIPA 裂解液提取样本中的总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性后电泳, 转膜, 封闭。使用一抗 CNP(1:5 000)、NPR-B(1:1 000) 孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日洗 3 次, 每次 15 min。GAPDH (1:2 000) 为内参。紧接着, 使用二抗 HRP-goat anti-mouse IgG(1:5 000) 或者 HRP goat anti-rabbit IgG

(1:6 000) 对样本进行孵育。80 min 后, 孵育结束, 将样本洗 3 次, 每次 10 min。将样本置入化学发光成像系统成像, 之后用 Quantity One 软件对条带进行灰度分析。

2.4 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析处理, 本研究数据均符合正态分布则以 " $\bar{x}\pm s$ " 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。P<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 四磨汤对 FD 大鼠增重、胃排空及小肠推进的影响

模型组大鼠第 14 天的增重、胃排空率以及小肠推进率相对于对照组大鼠均显著下降 (P<0.05); 与模型组相比, 四磨汤各剂量组大鼠体质量增加明显 (P<0.05), 胃排空率与小肠推进率明显增加 (P<0.05), 其中以高浓度四磨汤组最为显著。莫沙必利组与高浓度四磨汤组的作用效果相似。详见图 1。

3.2 HE 染色对 FD 大鼠胃黏膜组织形态的影响

对照组细胞排列整齐, 组织平整。与对照组相比, 模型组大鼠的绒毛上皮糜烂, 有炎性细胞浸润, 黏膜增厚。四磨汤各剂量组大鼠胃黏膜组织形态有所恢复。随着四磨汤浓度增加, 胃黏膜层的上皮细胞逐渐恢复正常形态, 绒毛上皮糜烂程度减小, 炎性细

表 1 引物序列

基因	正向序列	反向序列	长度/bp
CNP	ATATGCCCAACAGGATGTGCT	CTCTCGGAGGATGAGGGCTT	165
NPR-B	ATCTTTGCCAACACCGGTCA	AAACAGAAGCTTGCCGGGTCA	93
GAPDH	ACAGCAACAGGCTGCTGGAC	TTTACGGTGCAGCGAAGCTT	252

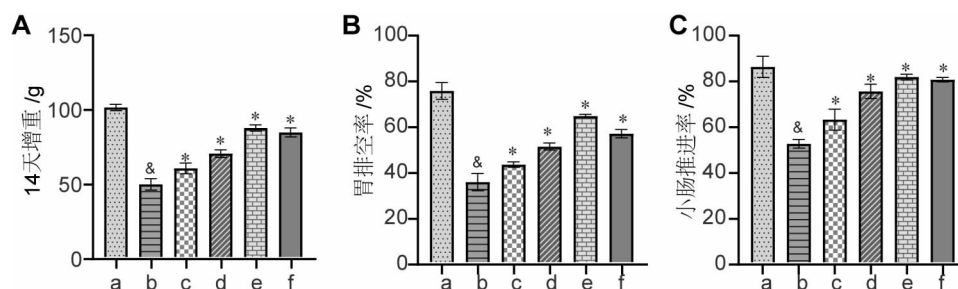


图 1 四磨汤对肝脾气滞证 FD 大鼠增重、胃排空率与小肠推进运动的影响

注: A. 第 14 天大鼠增重; B. 大鼠胃排空率; C. 大鼠小肠推进率; a. 对照组; b. 模型组; c. 低浓度四磨汤组; d. 中浓度四磨汤组; e. 高浓度四磨汤组; f. 莫沙必利组。与对照组相比, $^{\&}P<0.05$; 与模型组相比, $^*P<0.05$ 。

胞浸润减少,黏膜厚度有所恢复。详见图2。

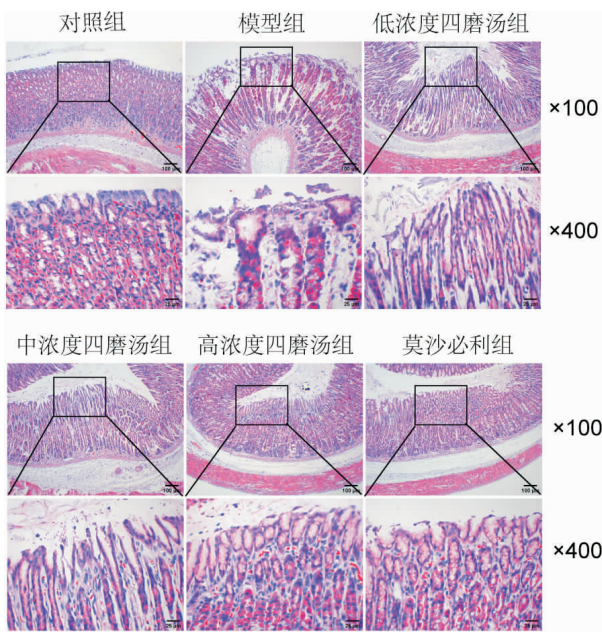


图2 HE染色检测大鼠胃黏膜组织形态

3.3 四磨汤对FD大鼠血清中MTL、GAS和胃窦组织中CNP、cGMP含量的影响

与对照组相比,模型组大鼠血清MTL与GAS的含量降低($P<0.05$)、CNP与cGMP含量升高($P<0.05$);与模型组相比,四磨汤各剂量组大鼠血清MTL与GAS含量上升($P<0.05$)、CNP与cGMP含量降低,均为高浓度四磨汤组变化最为显著,且莫沙必利组与高浓度四磨汤组的作用效果接近。详见图3。

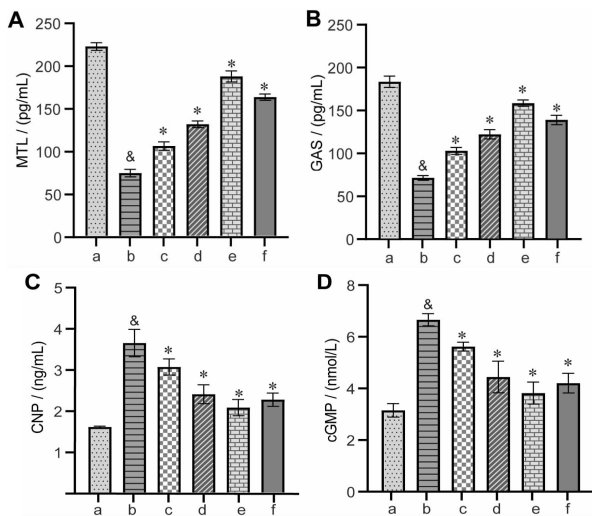


图3 四磨汤对肝脾气滞证FD大鼠血清中MTL、GAS及胃窦组织中CNP、cGMP含量的影响

注:A.大鼠血清MTL的含量;B.大鼠血清GAS的含量;C.大鼠胃窦平滑肌组织CNP的含量;D.大鼠胃窦平滑肌组织cGMP的含量;a.对照组;b.模型组;c.低浓度四磨汤组;d.中浓度四磨汤组;e.高浓度四磨汤组;f.莫沙必利组。与对照组相比, $^{\&}P<0.05$;与模型组相比, $^*P<0.05$ 。

3.4 四磨汤对FD大鼠胃窦组织CNP、NPR-B mRNA表达的影响

与对照组相比,模型组CNP及NPR-B的mRNA表达升高($P<0.05$);与模型组相比,四磨汤各剂量组CNP及NPR-B mRNA表达降低($P<0.05$),其中高浓度四磨汤组CNP及NPR-B mRNA含量最低,趋近于莫沙必利组。详见图4—6。

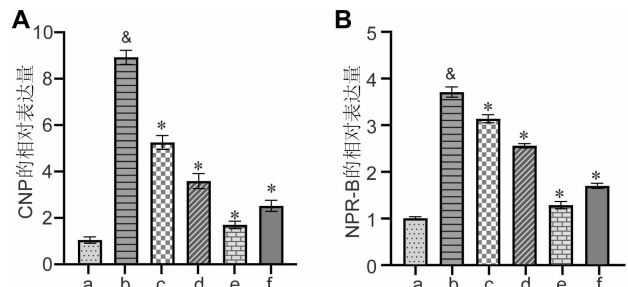


图4 四磨汤对肝脾气滞证FD大鼠胃窦组织CNP、NPR-B的mRNA表达的影响

注:A. RT-qPCR检测大鼠胃窦平滑肌组织CNP mRNA的表达;B. RT-qPCR检测大鼠胃窦平滑肌组织NPR-B mRNA的表达;a.对照组;b.模型组;c.低浓度四磨汤组;d.中浓度四磨汤组;e.高浓度四磨汤组;f.莫沙必利组。与对照组相比, $^{\&}P<0.05$;与模型组相比, $^*P<0.05$ 。

3.5 四磨汤对FD大鼠胃窦组织CNP、NPR-B蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组的CNP、NPR-B蛋白的表达升高($P<0.05$);与模型组比较,四磨汤各剂量组CNP、NPR-B蛋白的表达降低($P<0.05$),其中高浓度四磨汤组CNP、NPR-B蛋白的表达最低,干预效果趋近莫沙必利。详见图7。

4 讨论

FD是一种慢性胃肠道疾病,目前暂无有效的治愈方法,只能通过药物治疗、饮食疗法、定期锻炼等手段缓解FD的症状^[26]。FD极大地影响了人们的生活质量和社会功能,因此,通过治病求本的传统中医药方式治疗FD极其重要。近年来,西医将FD按症状分类为胃脘痛综合征和餐后窘迫综合征^[27]。目前,FD中医证型分类有多种,肝脾气滞证是其主要证型之一,临床上常用四磨汤治疗肝脾气滞证FD,效果明显^[6,18,20],但其具体作用机制仍不明确,因此,进一步研究肝脾气滞证FD的发病机制具有重要意义。经典方剂四磨汤治疗胃肠道疾病已有数百年历史,全方消补并用,以恢复气机和谐有序为本^[28-29]。

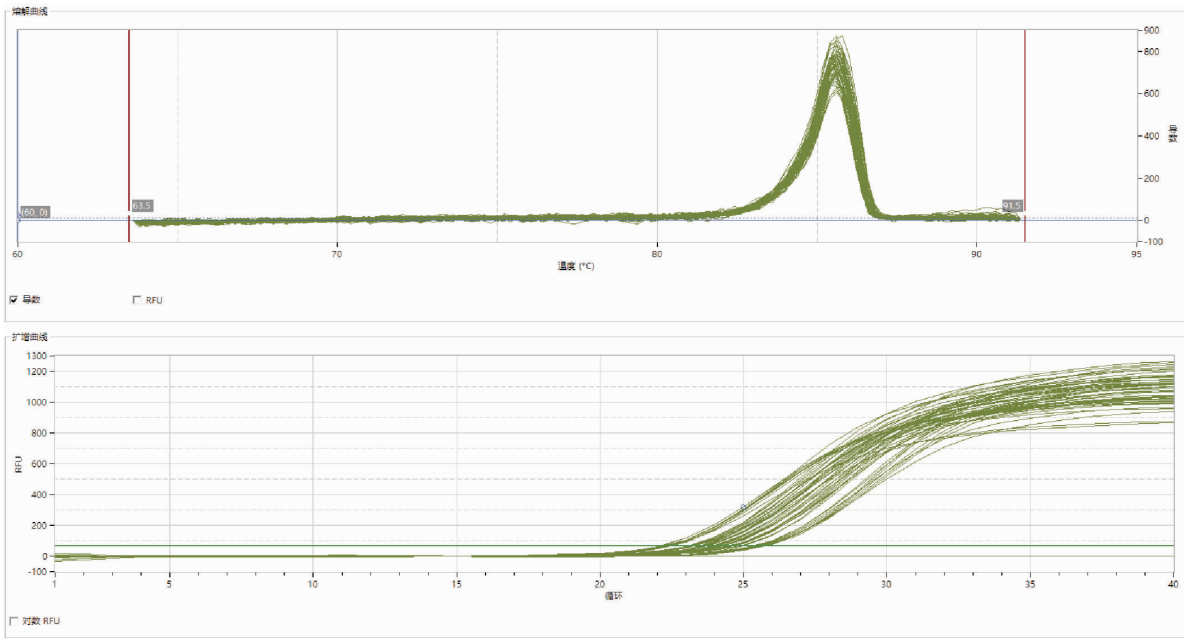


图 5 CNP 熔解及扩增曲线

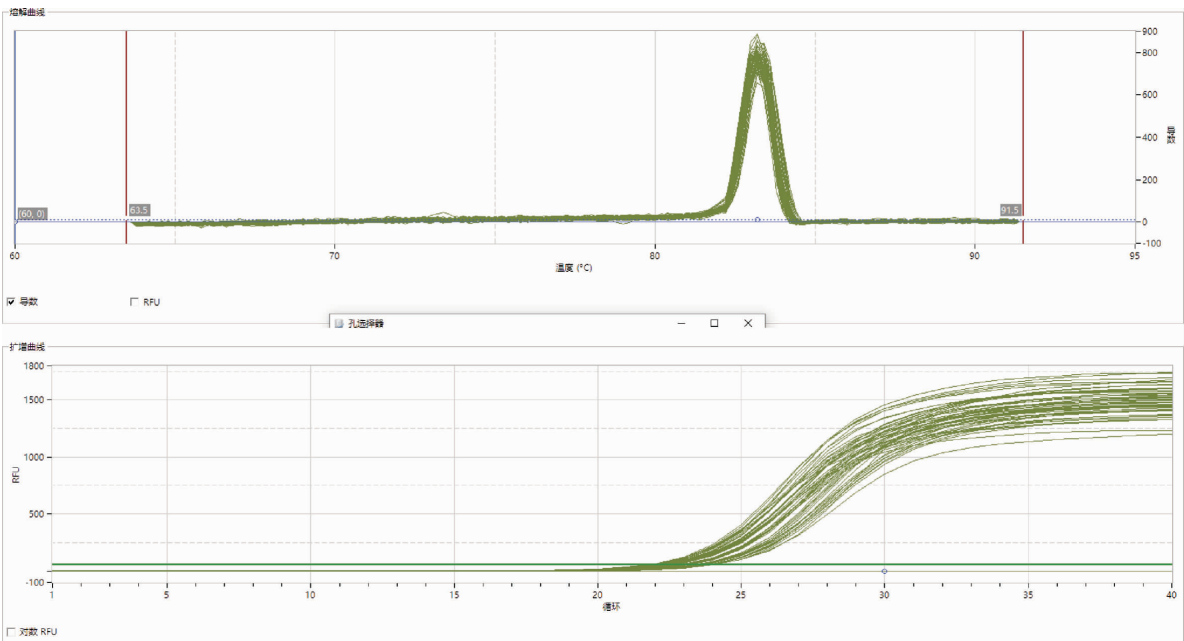


图 6 CNP、NPR-B 熔解及扩增曲线

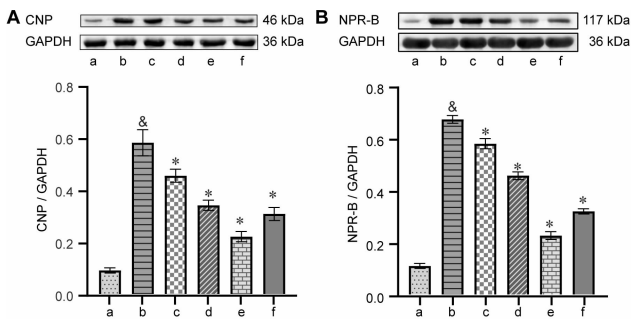


图 7 四磨汤对肝脾气滞证 FD 大鼠胃窦组织 CNP、NPR-B 蛋白表达的影响

注:A.大鼠胃窦平滑肌组织 CNP 蛋白的表达;B.大鼠胃窦平滑肌 NPR-B 蛋白的表达;a.对照组;b.模型组;c.低浓度四磨汤组;d.中浓度四磨汤组;e.高浓度四磨汤组;f.莫沙必利组。与对照组相比, $P < 0.05$;与模型组相比, $*P < 0.05$ 。

方剂中的一些单体成分,如槟榔碱、橙皮苷等已被证实为影响胃肠功能的高效成分^[30-31]。本实验采用夹尾刺激法造模,造成大鼠进食减少,不思饮食,甚至厌食等消化不良状态;加以不规则饮食干预,使大鼠胃肠道功能失常,出现对外来刺激反应迟钝,不活跃,粪便松软,被毛枯黄、发暗、蓬松,体质量增长速度较对照组明显下降等症状,与肝脾气滞证 FD 的疾病状态一致,很好地模拟了中医肝脾气滞证 FD 疾病状态。研究表明,四磨汤在增强慢性应激小鼠的胃肠动力、MTL 和胆囊收缩素的表达上有很好的效果^[32]。因此,采用低、中、高浓度的四磨汤对模型大

鼠进行灌胃处理,并且将莫沙必利作为阳性对照品。

CNP 属于 NP 的重要成员之一,属于最早于猪脑组织中被分离出来的、有活性的多肽类激素^[33]。人们在软骨细胞和内皮细胞中发现了高表达的 CNP,心血管系统内的其他细胞,包括心肌细胞和成纤维细胞也产生 CNP^[34]。人们对 CNP 的关注点主要在于其作为心脏和心血管的旁分泌介质来发挥调节作用^[34-35]。近年来,发现胃肠道等器官也有一定量表达^[36-37]。利尿钠肽受体(natriuretic peptide receptor, NPR)是一种酶联受体,对细胞内第二信使 cGMP 的活性有调节作用^[9]。有文献报道,CNP 可以通过结合 NPR-B,促进 cGMP 的表达,以高度复杂的方式进一步激活下游通路,促进平滑肌舒张松弛^[7-8,38]。据此本研究提出假设,肝脾气滞证 FD 发病机制与 CNP/NPR-B/cGMP 信号通路发生改变有关。在本研究中,与对照组比较肝脾气滞证 FD 模型组大鼠体质量增加受到了抑制,并且小肠推进能力和胃排空能力也明显减弱,表明 FD 大鼠模型造模成功。此外,大鼠血清中 MTL、GAS 含量降低,胃窦平滑肌组织中 CNP、cGMP、NPR-B 的表达水平升高,结果佐证提出的假设:肝脾气滞证 FD 的发病机制与 CNP/NPR-B/cGMP 信号通路有关,调节该通路可能是改善肝脾气滞证 FD 的有效方法之一。

本研究结果显示,与模型组比较,四磨汤各组大鼠增重明显,其中高浓度四磨汤组增重最为显著。与模型组大鼠相比,四磨汤各组大鼠胃排空及小肠推进能力均明显提升,而血清中 MTL、GAS 含量升高,胃窦平滑肌组织中 CNP、cGMP、NPR-B 的水平降低,且所有检测中,以高浓度四磨汤效果最为显著,与莫沙必利的作用效果类似。说明四磨汤可能通过调节 CNP/NPR-B/cGMP 信号通路使肝脾气滞证 FD 基本恢复正常。

综上所述,使用四磨汤干预,能抑制 CNP 表达,影响 NPR-B 翻译,从而降低 cGMP 水平,表明四磨汤可能通过 CNP/NPR-B/cGMP 信号通路缓解大鼠的肝脾气滞证 FD。

参考文献

- [1] ENCK P, AZPIROZ F, BOECKSTAENS G, et al. Functional dyspepsia[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3: 17081.
- [2] FORD A C, MAHADEVA S, CARBONE M F, et al. Functional dyspepsia[J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1689-1702.
- [3] 谭树慧,任卫琼,夏伯候,等. 醋炙乌药-木香对肝郁气滞型功能性消化不良模型大鼠胃排空及胃肠激素的影响[J]. *中国药房*, 2019, 30(5): 684-688.
- [4] 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.
- [5] SAYUK G S, GYAWALI C P. Functional dyspepsia: Diagnostic and therapeutic approaches[J]. *Drugs*, 2020, 80(13): 1319-1336.
- [6] 王艺颖,邱娟娟,熊永建,等. 四磨汤治疗功能性消化不良的研究进展[J]. *河北中医*, 2021, 43(12): 2094-2097.
- [7] 钟子劭,黄穗平,张望,等. 脾虚证功能性消化不良大鼠胃窦平滑肌 CNP-NPRB-cGMP 通路改变及四君子汤的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(13): 133-137.
- [8] BORDICCHIA M, LIU D X, AMRI E Z, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(3): 1022-1036.
- [9] YU Y J, CHEN Y, MEI C L, et al. C-type natriuretic peptide stimulates function of the murine Sertoli cells via activation of the NPR-B/cGMP/PKG signaling pathway[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2021, 68(4): 603-609.
- [10] AN J, LI Y L, SONG S N, et al. Electroacupuncture promotes the gastrointestinal motility of diabetic mice by CNP/NPR-B-cGMP and PDE3A-cGMP signaling[J]. *Neurogastroenterology and Motility*, 2019, 31(4): e13539.
- [11] LAM J R, SCHNEIDER J L, ZHAO W, et al. Proton pump inhibitor and histamine 2 receptor antagonist use and vitamin B12 deficiency[J]. *JAMA*, 2013, 310(22): 2435-2442.
- [12] PINTO-SANCHEZ M I, YUAN Y H, HASSAN A, et al. Proton pump inhibitors for functional dyspepsia[J]. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017, 11(11): CD011194.
- [13] 陈丽娟,王向群,吴嘉,等. 旋覆代赭汤加减治疗功能性消化不良临床研究[J]. *新中医*, 2023, 55(1): 28-31.
- [14] 易志忠. 小柴胡汤加减治疗肝胃不和型功能性消化不良的临床研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.
- [15] 王晓飞. 四磨汤联合枸橼酸莫沙必利片治疗功能性消化不良的疗效分析[J]. *浙江中医杂志*, 2022, 57(12): 888-889.
- [16] 张声生,赵鲁卿. 功能性消化不良中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(6): 2595-2598.
- [17] 刘辉. 功能性消化不良中医证型分布及肝脾气滞证胃肠激素 VIP、CCK 的客观化研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [18] 周赛男,蔡光先,万胜. 四磨汤对肝脾气滞证功能性消化不良患者血清、胃底、胃窦及十二指肠中 NO、AChE、CCK、SP 的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2015, 23(1): 17-20.

- [19] 李玉洁. 四磨汤治疗功能性消化不良的 Meta 分析及对肝脾气滞证功能性消化不良患者的临床疗效观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [20] 李玉洁, 刘柏炎, 蔡光先, 等. 四磨汤对肝脾气滞型功能性消化不良患者的临床疗效及对血清中生长抑素及 P 物质的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(11): 2622-2624.
- [21] 高盈竹. 柴芍胃炎颗粒对功能性消化不良模型大鼠胃窦 Cajal 间质细胞表达的影响[D]. 泸州: 泸州医学院, 2012.
- [22] 李会影, 王增玲, 刘建璇, 等. 升阳益胃汤对功能性消化不良模型大鼠的作用机制研究[J]. 中国中医药科技, 2023, 30(2): 219-221.
- [23] 周 妹, 周赛男, 韩运宗, 等. 四磨汤对肝脾气滞证功能性消化不良大鼠胃肠运动及血清 GAS、MTL 的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(1): 55-58, 132.
- [24] 李 才. 人类疾病动物模型的复制[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 57-59.
- [25] 黄琳桂. 基于 CNP-cGMP 信号通路研究舒胃汤对 FD 肝郁脾虚证大鼠胃窦平滑肌及 ICC 的干预机制[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [26] BLACK C J, PAINE P A, AGRAWAL A, et al. British Society of Gastroenterology guidelines on the management of functional dyspepsia[J]. Gut, 2022, 71(9): 1697-1723.
- [27] MOUNSEY A, BARZIN A, RIETZ A. Functional dyspepsia: Evaluation and management[J]. American Family Physician, 2020, 101(2): 84-88.
- [28] HU Y X, BAI Y, HUA Z Y, et al. Effect of Chinese patent medicine Si-Mo-Tang oral liquid for functional dyspepsia: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171878.
- [29] 刘玉芳, 阳国彬, 王文龙. 基于数据挖掘的国医大师梅国强治疗痞满用药规律研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(10): 1574-1581.
- [30] JIA Q L, LI L, WANG X X, et al. Hesperidin promotes gastric motility in rats with functional dyspepsia by regulating Drp1-mediated ICC mitophagy[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 945624.
- [31] PENG W, LIU Y J, HU M B, et al. Using the "target constituent removal combined with bioactivity assay" strategy to investigate the optimum arecoline content in charred Areca nut[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40278.
- [32] CAI G X, LIU B Y, YI J, et al. Simotang enhances gastrointestinal motility, motilin and cholecystokinin expression in chronically stressed mice[J]. World Journal of Gastroenterology, 2011, 17(12): 1594-1599.
- [33] TETSUJI, SUDOH. C-type natriuretic peptide (CNP): A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990, 168(2): 863-870.
- [34] MOYES A J, HOBBS A J. C-type natriuretic peptide: A multifaceted paracrine regulator in the heart and vasculature[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(9): 2281.
- [35] MOYES A J, CHU S M, AUBDOOL A A, et al. C-type natriuretic peptide co-ordinates cardiac structure and function[J]. European Heart Journal, 2020, 41(9): 1006-1020.
- [36] PEREZ-TERNERO C, PALLIER P N, TREMOLEDA J L, et al. C-type natriuretic peptide preserves central neurological function by maintaining blood-brain barrier integrity[J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2022, 15: 991112.
- [37] LIAN H M, GUO J Y, SUN Y, et al. Mechanism of CNP-mediated DG-PKC and IP4 signaling pathway in diabetic rats with gastric motility disorder[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(1): 141-149.
- [38] YONESHIO T, AITA S, MATSUSHITA M, et al. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans[J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(8): 3404-3408.

(本文编辑 苏 维)