

# 气虚型缺血性脑卒中大鼠骨骼肌细胞呼吸代谢的内在机制研究\*

彭煜, 罗慧, 侯春英, 普海崮, 郭淑贞<sup>△</sup>

(北京中医药大学, 北京 100029)

**摘要:**目的: 通过组学方法聚焦缺血性脑卒中气虚证大鼠骨骼肌的主要通路, 并以缺血性脑卒中气虚证病证结合大鼠模型的骨骼肌细胞呼吸代谢为切入点, 探究缺血性脑卒中气虚证可能存在的机制。方法: 1. 对与缺血性脑卒中气虚证大鼠健侧骨骼肌转录组学结果的差异基因进行筛选, 进行GO及Reactome数据库的通路富集, 并分析结果。2. 动物实验: 制备线栓法(MCAO)大鼠模型, 在证候发生时间窗内通过聚类统计分析将模型大鼠分为气虚组与非气虚组, 并设置假手术组作为对照。造模成功后取健侧股四头肌与腓肠肌检测线粒体分裂(Drp1)、融合(Mfn1)蛋白的表达及丙酮酸激酶(PK)、己糖激酶(HK)、乳酸(LD)的含量检测。结果: 转录组学筛选表明缺血性脑卒中气虚证大鼠骨骼肌分析结果与各类代谢的生物学过程呈现的相关度高, 其中糖脂代谢占到重要比例。动物实验: ①股四头肌组织: 与非气虚组、假手术组相比, 气虚组的Mfn1表达降低( $P<0.05$ ), PK活性降低( $P<0.05$ ), HK活性显著升高( $P<0.01$ )。LD活性无明显改变。②腓肠肌组织: 与非气虚组、假手术组相比, 气虚组的Mfn1表达显著降低( $P<0.01$ ), HK活性显著升高( $P<0.01$ )。LD活性无明显改变。结论: 骨骼肌组织细胞呼吸方式的改变可能是缺血性脑卒中气虚证发生的机制之一。

**关键词:** 缺血性脑卒中; 转录组学; 呼吸代谢; 气虚证; 骨骼肌

\*基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1700105)。第一作者: 彭煜, 本科, 研究方向: 气虚证的生物学基础, E-mail: bucm96@163.com。  
<sup>△</sup>通讯作者: 郭淑贞, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治心血管病的应用基础研究, E-mail: guoshz@bucm.edu.cn。

会导致卵泡早熟和提前排出, 使卵泡衰竭。E2能够促进颗粒细胞增殖、分化, 调控颗粒细胞的凋亡, 对卵泡的发育及成熟进行调节<sup>[18]</sup>。LH由垂体前叶的促性腺激素细胞分泌, 可促进卵巢排卵和黄体的形成。卵巢功能衰退时, FSH、LH水平升高, E2水平降低, 雌激素与卵泡数量则减少, 遏制卵泡和卵子的生长发育。AMH则通过抑制颗粒细胞芳香化酶活性、减少LH受体数目等途径调节卵泡生长发育, 影响卵巢储备功能, 低水平AMH是卵巢储备功能不足的重要标志<sup>[19]</sup>。此外, 激素水平也影响TGF- $\beta$ 1/Smad信号通路的表达, FSH对Smad2/Smad3有激活作用, 且依赖TGF- $\beta$ 2调节TGF- $\beta$ 1/Smad信号通路调控卵巢功能<sup>[20]</sup>。TGF- $\beta$ 1也可通过对颗粒细胞的影响干预雌激素的生成, 同时提高受体对FSH的敏感性, 增强雌激素分泌效果<sup>[21]</sup>。

本研究结果显示, 肝经腧穴组大鼠的TGF- $\beta$ 1、Smad2、smad3蛋白表达水平明显升高。研究表明<sup>[22]</sup>TGF- $\beta$ /Smad信号通路参与卵巢功能衰退的内在调控, 其中主要与Smad2和Smad3的参与有关。TGF- $\beta$ 亚型中的TGF- $\beta$ 1作用于TGF- $\beta$ /Smad信号通路并在细胞的信号传导中起着决定性的作用<sup>[21]</sup>。Smad2和Smad3则可以调控卵泡的发育、颗粒细胞的凋亡等功能, 其中Smad2参与调控卵巢颗粒细胞的凋亡, Smad3可作用于较小的生长卵泡, 若出现基因缺陷时可导致胚胎致死及生育能力受损。故电针肝经腧穴可能通过TGF- $\beta$ 1/Smad信号通路能改善卵巢储备功能。

综上所述, 电针肝经腧穴治疗可调节DOR大鼠的血清性激素水平, 其可能通过TGF- $\beta$ 1/Smad信号通路中的TGF- $\beta$ 1、Smad2、smad3蛋白表达水平上调, 进一步改善卵巢储备功能。同时根据“女子以肝为先天”的中医理论, 论证了在DOR的治疗中从肝论治的有效性, 为今后进一步比较辨证和辨经疗效差异及其机制, 提供了理论基础。

## 参考文献

[1] 康华, 马建新, 王旭初, 等. 疏肝滋肾方治疗肝郁肾虚型卵巢储备功能减退临床研究[J]. 河北中医, 2023, 45(10): 1627-1630.  
[2] Reserve Expert Group Of Consensus, Association Reproductive Endocrinology Fertility Preservation. 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(04): 425-434.  
[3] 王伟明, 王扬, 吴佳霓, 等. 电针“中髻”“天枢”改善早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢功能的实验研究[J]. 中国针灸, 2018, 38(05): 519-526.  
[4] 董文佳, 吴兆利, 白云. 针刺对卵巢储备功能下降模型大鼠的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(09): 206-209.  
[5] Pangas S A, Li X, Robertson E J, et al. Premature luteinization and cu-

mulus cell defects in ovarian-specific Smad4 knockout mice [J]. Molecular endocrinology, 2006, 20(6): 1406-1422.  
[6] 李丽美, 陶莉莉, 和秀魁, 等. 环磷酸腺苷建立SD大鼠卵巢功能减退模型的研究[J]. 重庆医学, 2019, 48(13): 2180-2183+2188.  
[7] 陆樱瑜, 沈明洁, 李佳慧, 等. 卵巢储备功能下降动物模型研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(12): 996-999.  
[8] 王频等副主编郭义主编. 实验针灸学实验指导[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016.  
[9] 程觅, 张雪, 史阳琳, 等. 实验大鼠和小鼠穴位定位的研究概况[J]. 上海针灸杂志, 2021, 40(05): 640-646.  
[10] 实验动物常用穴位名称与定位第2部分: 大鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(04): 351-352.  
[11] 袁丽芳, 黄伟育, 覃爱平, 等. 免疫抑制剂在卵巢功能保护应用中的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(01): 131-135.  
[12] 王敏, 张斐, 王洋, 等. 基于“女子以肝为先天”思想浅议卵巢早衰之论治[J]. 中医药通报, 2023, 22(02): 53-55.  
[13] 归雯佳, 王月娇, 李盛楠, 等. 浅析“女子以肝为先天”理论及其临床应用[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(08): 45-49.  
[14] 段浩然, 曹煜, 李凌香, 等. 蠱沟穴循经刺法为主治疗湿热下注型霉菌性阴道炎30例[J]. 中国针灸, 2018, 38(01): 75-76.  
[15] 李傲. 足厥阴肝经腧穴主治文献溯源研究[D]. 安徽中医药大学, 2022.  
[16] 黄天红. 生长激素改善卵巢储备功能下降小鼠模型卵巢生殖功能的研究及作用机制探索[D]. 成都医学院, 2023.  
[17] 张亚萍, 蒋珊珊, 庞俏燕, 等. 当归芍药散对制动应激复合半乳糖诱导的卵巢储备功能下降模型小鼠的干预作用[J]. 广西医学, 2023, 45(04): 429-434.  
[18] 闫丽, 王恺悦, 王喜良, 等. 戊酸雌二醇片/雌二醇环丙孕酮片对卵巢早衰小鼠激素水平和肠道菌群的调节作用[J]. 中国医科大学学报, 2023, 52(10): 898-903.  
[19] 赵井苓, 王娟, 萧闵, 等. 补肾活血方调节卵巢储备功能下降大鼠生殖激素水平的实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(07): 1031-1036.  
[20] 卫晓红, 祁雨花, 迟晓春, 等. Smad2/Smad3蛋白在大鼠卵巢颗粒细胞中的表达及FSH对其活化的影响[J]. 解剖学报, 2007(02): 205-208.  
[21] 赵锐, 刘宴君, 高步婵, 等. 转化生长因子 $\beta$ 1/Smad信号通路与早发性卵巢功能不全相关性研究[J]. 中国生育健康杂志, 2019, 30(03): 288-290.  
[22] 丁艳. TGF- $\beta$ 1/Smad信号通路在卵巢功能衰退中的表达及意义[D]. 河北北方学院, 2018.

(收稿日期 2023-12-21)

中图分类号: R 743.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-3649 (2024) 12-0053-05

脑卒中是目前我国致死率排行第二的高发疾病<sup>[1]</sup>, 其中, 缺血性脑卒中占 88%<sup>[2]</sup>, 这也是脑卒中导致死亡的首位原因<sup>[3]</sup>。气虚证与大脑神经缺损严重程度及远期预后密切相关,<sup>[4]</sup>探究气虚证的内在机制, 对深化中医证候的临床认识, 启发个体化精准的治疗策略具有重要的意义。团队前期经多年探索, 创立了“三维病证结合动物模型”的建立方法, 通过对疾病动物进行持续、动态、全面的观察, 动态评价疾病不同阶段动物表现出的证候特征, 在心血管方面有相对成熟的应用<sup>[5-8]</sup>, 并采用该方法成功建立了缺血性脑卒中气虚证病证结合动物模型<sup>[9]</sup>。转录组学包含了基因表达时间与空间的限定<sup>[10]</sup>, 更适合对中医证候的生物学基础进行研究, 故本研究通过转录组学筛选验证方法, 通过先对与缺血性脑卒中气虚证组织的转录组学检测, 再进行关键靶点的筛选进行 GO 及通路功能富集, 最后结合缺血性脑卒中气虚证大鼠模型, 对转录组学的结果进行实验验证, 从骨骼肌代谢为切入点, 以探究中医气虚证可能存在的内在生物学机制, 深化临床认识, 丰富气虚证的生物学基础内涵。

## 1 材料

1.1 动物 斯贝福无特定病原体 (Specific pathogen free, SPF) 级 SD 大鼠, 雄性, 体重 230~250g。购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号: SYXK (京) 2023~0011; 合格证号: SCXK (京) 2019~0010, 伦理批号: BUCM-2023060103~2192。于北京中医药大学良乡校区动物房 IVC (individual ventilated cages, IVC) 系统, 分笼饲养, 每笼 4~6 只。

1.2 主要试剂及耗材 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P1511, 北京普利莱基因技术有限公司), ECL 超敏化学发光液 (P1050~100, 北京普利莱基因技术有限公司), 兔二抗 (DE060, 北京拜尔迪生物技术有限公司), 膜再生液 (P1650 北京普利莱基因技术有限公司), Marker (26616, 赛默飞世尔科技公司), 鼠抗 Mfn1 抗体 (ab126575, Abcam), 鼠抗 Drp1 抗体 (ab56788, Abcam), 兔抗 GAPDH 抗体 (2118, Proteintech), 鼠二抗 (PR3009, Proteintech), 丙酮酸测定试剂盒 (A081-1-1, 南京建成生物工程研究所), 丙酮酸激酶测定试剂盒 (A076-1-1, 南京建成生物工程研究所), 己糖激酶测定试剂盒 (A077-3, 南京建成生物工程研究所), 乳酸测定试剂盒 (A019-2-1, 南京建成生物工程研究所)。

1.3 仪器 电热恒温水槽 (SSW-420~2S, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂), 超纯水仪 (Mini-Q, Millipore 公司), 电泳仪 (164~5050, Bio-Rad), 分析天平 (124S, Sartorius), 凝胶成像系统 (ChemiDocXRS, Bio-Rad), 全自动酶标仪 (IX5, Molecular Devices), 组织破碎仪 (TissueLyser II, QIAGEN), 离心机 (1~15PK, Sigma), 旋涡混合器 (QT-1, 上海琪特分析仪器有限公司), 电热恒温鼓风干燥箱 (DGX-9073B-1, 上海福玛实验设备有限公司), 摇床 (TS-2, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 制冰机 (SIM-F14, SANYO) 等。

1.4 转录组学数据分析 由北京博奥典晶生物技术有限公司完成。

## 2 方法

2.1 造模及分组 健康雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 采用改良的线栓法构建缺血性脑卒中动物模型<sup>[9, 11]</sup>, 根据临床诊断指标等效转化确立动物气虚证的评价指标。正常组不做处理, 假手术组仅破皮分离颈总动脉后缝合。造模术后, 对动物进行动态观察, 采集宏观表征, 旷场、抓力与体重数据进行统计学聚类分析等评价方法, 判断缺血性脑卒中气虚大鼠模型造模成功。

2.2 气虚证转录组学基因的筛选 将转录组学的原始数据通过气虚的时间窗进行筛选, 将气虚时间窗内的健侧骨骼肌大鼠组织与非气虚组对比筛选差异基因, 进行 GO 和 Reactome 数据库的<sup>[12]</sup>通路分析。

2.3 WesternBlot 法检测骨骼肌 Drp1 及 Mfn1 表达 将研磨后的骨骼肌组织充分裂解后, 4℃, 12000r/min 离心 15min, 取上清液, 根据 BCA 蛋白定量结果, 经上样, 电泳, 转膜, 封闭, 一抗 (1:2500)、二抗 (1:5000) 孵育, 显影成像, 利用 ImageJ 分析目的条带灰度值。

2.4 酶学比色法测定丙酮酸激酶及己糖激酶的活性测定 测定样本蛋白浓度并按照试剂盒说明书对样品进行处理, 快速放进酶标仪中, 选取波长 340nm 根据说明书要求间隔时间测定两次吸光值并带入样品蛋白浓度进行计算。

2.5 骨骼肌乳酸含量测定 测定样本蛋白浓度并按照试剂盒说明书对样品进行处理, 配置工作液; 将加好工作液的 96 孔板放入酶标仪中, 选定波长 530nm, 测定空白孔、标准孔及样品测定孔的吸光值并带入蛋白浓度公式进行计算。

2.6 统计学方法 采用 SAS8.4 软件分析数据, 数据以均值±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。统计方法采用多组方差分析及非参数检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

3.1 气虚证健侧骨骼肌 GO 富集结果 如图 1 所示, 气虚证健侧腓肠肌中, 按基因的校正后 p 值 (qvalue) 排列, 以富集因子 (Rich Factor) 为可靠性标志, 并以点图展示基因数量, 综合多方面的数值。从分析结果波点图可以直观看出, 在气虚证大鼠健侧腓肠肌的多项生物过程中, 横纹肌收缩、肌肉器官的发育、肌肉结构发育等肌肉的系统调节过程发生了显著的改变, 细胞组分方面, 胞外空间体现出了一定的差异。如图 2 气虚证大鼠健侧比目鱼肌中, 血红蛋白复合体产生了显著的富集差异, 其中氧气运输、氧转运蛋白的活性出现了可靠性高并显著的富集差异。

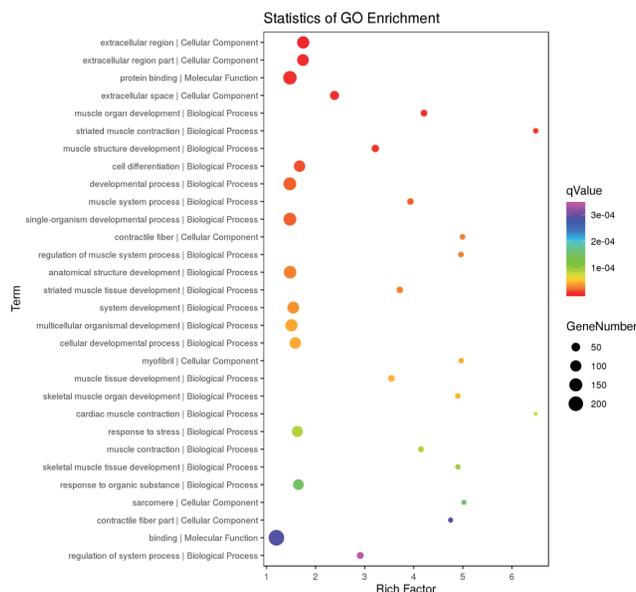


图 1 健侧腓肠肌 GO 富集结果

3.2 健侧骨骼肌 Reactome 通路富集结果 如图 3 所示, 气虚证健侧比目鱼肌中, 按 qvalue 排列, 以 Rich Factor 为可靠性标志, 并以点图展示基因数量, 在气虚证的健侧腓肠肌中, 血浆中血红素的清除、红细胞吸收氧气释放二氧化碳、横纹肌收缩、清道夫受体与配体的结合通路出现了非常显著的富集差异, 代谢的相关通路出现了基因数较多的富集。如图 4 气虚证健侧比目鱼肌中, 红细胞吸收氧气释放二氧化碳的三项通路出现了非常显著的富集差异, 清道夫受体与配体的结合出现了较为显著的富集差异, 其中代谢的相关通路出现了基因数较多的富集。在气虚证与非气虚证的对比中, 两种肌纤维在通路富集的结果上整体表现较为相似。

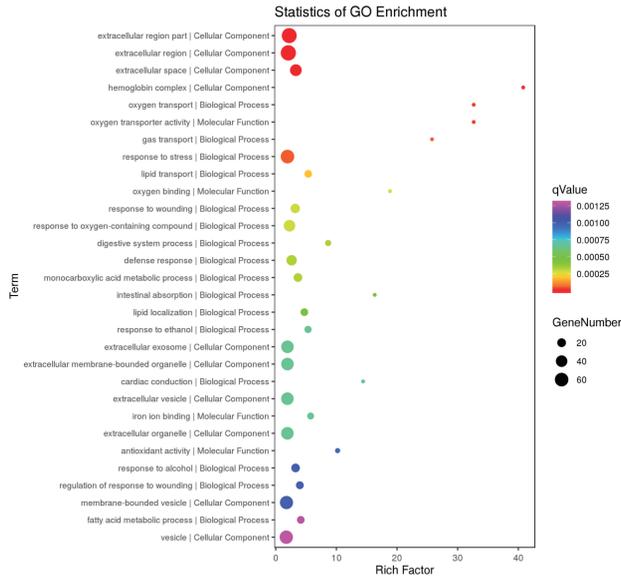


图2 健侧比目鱼肌GO富集结果

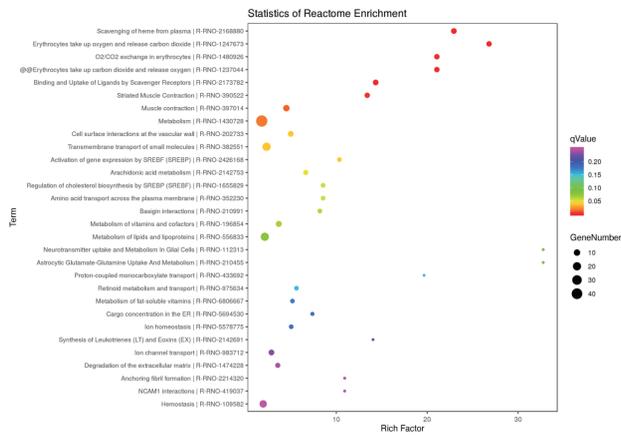


图3 健侧腓肠肌通路富集结果

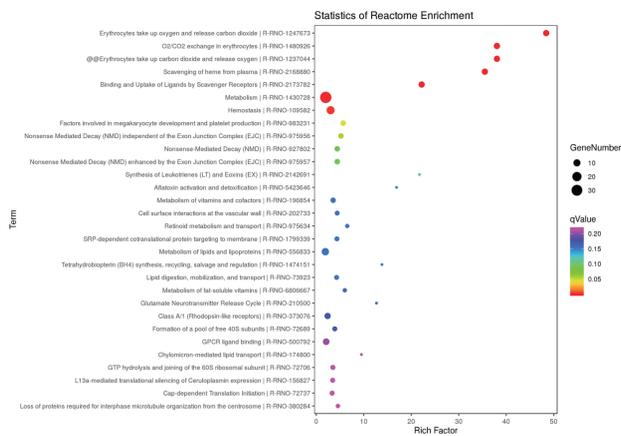


图4 健侧比目鱼肌通路富集结果

从实验结果我们可以初步分析，在气虚组大鼠骨骼肌的转录组学差异基因分析表现中，血氧代谢的异常是一个值得关注的研究点。氧是能量产生过程中不可或缺的物质，体内氧气水平的变化，将直接导致细胞呼吸方式的改变。体内能量产生的过程包括有氧呼吸及无氧呼吸。线粒体作为体内有氧呼吸的主要场所，在能量代谢过程中起着不可或缺的作用。线粒体数量及功能失调会严重影响体内的能量代谢。线粒体功能的调控依赖于线粒体动力学，包括线粒体的融合和分裂。此外，与有氧呼吸及无氧呼吸相关的酶活性也影响着能量代谢的过程。我们便从与能量代谢相关的线粒体平衡及与呼吸作用相关的氧化代谢相关指标出发，对缺血性脑卒中气虚证大鼠健侧的骨骼肌进行

研究。但由于模型组大鼠比目鱼肌样品较少，不能够满足检测各项呼吸关键酶指标所需样本量，故后续实验我们采取混合肌型股四头肌与腓肠肌进行线粒体呼吸机制的探索。

3.3 健侧骨骼肌的线粒体动力学特征 从WesternBlot气虚组较非气虚组相比，在股四头肌线粒体融合蛋白Mfn1含量显著下降，线粒体分裂蛋白Drp1有下降趋势，但无统计学差异。见图5。在腓肠肌中，线粒体融合蛋白Mfn1含量显著下降，线粒体分裂蛋白Drp1含量无显著变化。见图6。

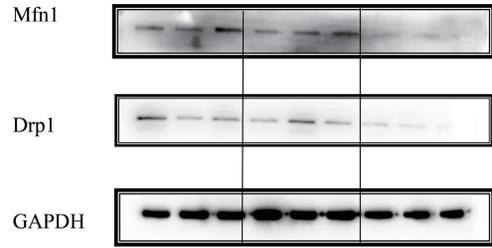


图5 股四头肌Mfn1、Drp1蛋白含量  
注：与非气虚组相比，\*P<0.05

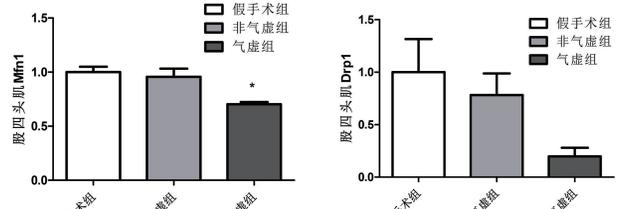


图6 腓肠肌Mfn1、Drp1蛋白含量  
注：与非气虚组相比，\*P<0.05，与假手术组相比，\*\*P<0.01

3.4 丙酮酸激酶活性 在股四头肌中，气虚组较非气虚组及假手术组相比，丙酮酸激酶活性显著下降；在腓肠肌中，气虚组较非气虚组丙酮酸激酶活性无明显变化。结果见图7。

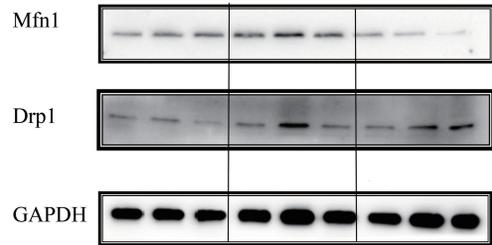


图7 各组股四头肌及腓肠肌丙酮酸激酶活性（假手术组n=6、气虚组n=6、非气虚组n=6）  
注：与非气虚组相比，\*P<0.05；与假手术组相比，#P<0.05。

3.5 己糖激酶活性 各组股四头肌中，气虚组较非气虚组及假手术组的己糖激酶活性显著升高；在各组腓肠肌中，气虚组较非气虚组及假手术组的己糖激酶活性显著升高。结果见图8。

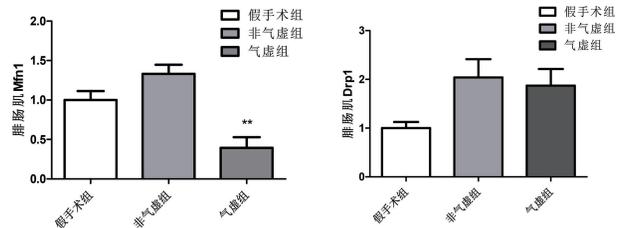


图8 各组股四头肌及腓肠肌己糖激酶活性（假手术组n=6、气虚组n=6、非气虚组n=6）  
注：与非气虚组相比，\*\*P<0.01，与假手术组相比，##P<0.01

3.6 乳酸含量测定结果 在股四头肌中，气虚证组较非气虚证组乳酸含量有升高趋势，但结果无统计学差异；在腓肠肌中，

气虚组较非气虚组乳酸含量无明显改变。结果见表1。

表1 各组股四头肌及腓肠肌乳酸含量

组别	股四头肌 LD 含量 (mmol/L)	腓肠肌 LD 含量 (mmol/L)
假手术组(n=10)	0.895±0.874	0.667±0.342
气虚组(n=12)	0.872±0.442	0.557±0.342
非气虚组(n=12)	0.716±0.358	0.513±0.152

#### 4 讨论

中医认为,人体脏腑筋肉的强弱与气的盛衰有密切关系,气盛则机能旺盛,气衰则机能活动减退,元气亏虚,则脏腑筋肉机能减退,气少懒言,神疲乏力。在中医理论中,脑为元神之腑,在人体中有不可替代的功能:《灵枢·大惑论》中记载“五藏六府之精气,皆上注于目而为之精”,“裹擷筋骨血气之精,而与脉并为系,上属于脑,后出于项中”。若脑部直接受损,则意味着筋骨血气等诸多方面的生理功能受损,骨骼肌的运动功能障碍是缺血性脑卒中预后常见的后遗症<sup>[13-15]</sup>。“气”是中医学理论中最为重要的概念之一,在中医学理论中,气是宇宙的本源,是构成万物的物质基础。而在人体中,气更是发挥着极为重要的作用。《难经·八难》有言:“气者,人之根本也。”而《类经·摄生类》中也说到:“人之有生,全赖此气。”“气”是生命构成的本原,是物质与能量、物质性与运动性的统一体<sup>[16]</sup>。“气”在体内有着诸多功能,其中最重要的作用之一便是发挥营养作用,作为维持人体生命活动、产生热量的物质基础,可以为机体脏腑功能活动提供营养物质。而人体之气包括先天之气与后天之气,先天之气来源于先天之精所化生,后天之气则包括水谷之精所化生的水谷之气以及自然界的清气,《灵枢·营卫生会》有言:“人受气于谷,谷入于胃,以传于肺,五脏六腑皆以受气。”可见古人早就意识到依靠呼吸作用吸纳来源于自然界的清气是体内“气”的重要来源之一。

本研究通过对转录组学进行结果的筛选和通路富集,也明确了气虚证大鼠的骨骼肌存在肌肉收缩和血氧交换的变化,以及能量代谢的多方面激活。已有诸多研究证实气虚的产生与能量代谢相关<sup>[17-21]</sup>,在缺血性脑卒中气虚证中也有所体现<sup>[22-23]</sup>。能量的产生有赖于细胞内线粒体呼吸链的完整,其形态调节、数量、亚细胞分布和功能都要受到分裂及融合过程的调控。当线粒体融合减少时,将导致严重的细胞缺陷,包括不良的细胞生长,线粒体膜电位的广泛异质性,以及细胞呼吸的减少<sup>[24]</sup>。Mfn1作为线粒体融合蛋白可调控线粒体的融合,有研究表明线粒体融合蛋白的去除将导致线粒体融合的完全丧失,使得小鼠组织中呼吸链功能的降低,同时线粒体蛋白Mfn1缺失会导致严重的线粒体肌病,包括肌肉质量下降,运动耐受性下降和乳酸性酸中毒<sup>[25-26]</sup>。线粒体的分裂由动力相关蛋白1(Drp1)介导,Drp1的抑制会导致线粒体管的增强,从而促进线粒体ATP的产生,并使细胞器免于降解<sup>[25]</sup>。细胞有氧呼吸及无氧呼吸第一阶段是葡萄糖等主要己糖的糖酵解过程,在其过程中己糖激酶和丙酮酸激酶作为限速酶,其活性大小直接影响着整个代谢途径的速度和方向。

骨骼肌纤维大致分为两种,快肌纤维和慢肌纤维。慢肌纤维的能量产生主要依靠氧化代谢,它们的特点是线粒体含量高,毛细血管密度高,主要表达葡萄糖和脂肪酸氧化酶,富含肌红蛋白,呈红色,它们产生缓慢的收缩力并且抗疲劳。快肌纤维主要通过糖酵解代谢葡萄糖,其线粒体含量低和毛细血管密度均低,肌红蛋白表达较差,外观为白色,骨骼肌中的线粒体状态将影响骨骼肌纤维类型。我们发现虽然缺血性脑卒中气虚状态下健侧骨骼肌呼吸过程发生变化,但股四头肌及腓肠肌所产生的病理反应结果并不一致;与非气虚组相比,股四头肌的Mfn1蛋白大于Drp1分裂蛋白,说明线粒体的活性增加,而腓肠肌的融合和分裂没有出现显著的统计学差异。在股四头肌中,非气虚组丙酮酸激酶与假手术组相比即有较大的升高趋势,意味着缺血

性脑卒中疾病本身就会造成丙酮酸激酶升高的改变,而气虚组的大鼠则与正常组和非气虚组都出现了明显的降低,该变化在腓肠肌中则不明显。己糖激酶是糖酵解产生丙酮酸的第一步,在细胞呼吸限速酶中,股四头肌及腓肠肌中己糖激酶活性显著升高,与此同时腓肠肌的线粒体融合蛋白Mfn1含量也显著下降,但腓肠肌乳酸含量并无显著的差异,此结果说明Mfn1含量下降导致的酸中毒表现不明显。

我们考虑这些结果的变化可能因腓肠肌及股四头肌肌纤维类型并不相同导致的。股四头肌属于混合肌,其纤维类型中慢肌纤维及快肌纤维均占较大的百分比,而腓肠肌以快肌纤维类型为主,气虚动物健侧腓肠肌线粒体融合减少,仅影响肌肉中少量依赖有氧呼吸产能的纤维能量产生方式转变成无氧呼吸,肌肉的无氧呼吸运动也会抑制丙酮酸激酶的活性<sup>[27]</sup>,最终反而导致股四头肌丙酮酸激酶活性下降。所以我们推测,腓肠肌线粒体的改变不会导致肌肉供能需以无氧呼吸来补充,仍是以糖酵解为主,机体可代偿性的增加糖酵解途径弥补有氧呼吸受损所减少的能量产生。

所以我们推测在线粒体含量较多以氧化磷酸化为主要功能方式的慢肌中,骨骼肌的生物改变更加明显,但本实验仅从转录组学差异基因的分析 and 动物实验角度进行了实验,具体的代谢机制链条发生了何种变化,仍需后续进行进一步挖掘探索和临床验证。综上,我们初步认为骨骼肌组织细胞呼吸方式的改变可能是缺血性脑卒中气虚证发生的机制之一。

#### 参考文献

- 秦莉花,黄娟,李晟,等. 脑卒中流行病学及与性激素的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(20): 5099-5103.
- Casals J B, Pieri N C G, Feitosa M L T, et al. The Use of Animal Models for Stroke Research: A Review [J]. COMPARATIVE MEDICINE, 2011, 61(4): 305-313.
- 涂雪松. 缺血性脑卒中的流行病学研究 [J]. 中国临床神经科学, 2016, 24(05): 594-599.
- 张健,聂志玲,张腾. 缺血性中风急性期气虚证与神经功能缺损程度及预后关系研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4856-4860.
- 吴晏,韩静,黄黎明,等. 2型糖尿病模型大鼠表征及其证候动态演变 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(11): 2533-2537.
- 刘涛,王伟,赵明镜,等. 心肌缺血动物模型气虚血瘀证的评价 [J]. 辽宁中医杂志, 2007(04): 530-531.
- 冯宏超,郭淑贞,武志黔,等. 慢性心力衰竭模型大鼠气虚血瘀证相关信息的评价 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(05): 1563-1567.
- 仇琪,王勇,李春,等. 心肌缺血模型大鼠气虚证相关信息的评价 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(02): 210-213.
- 罗慧,焦文超,唐家杨,等. 缺血性脑卒中气虚证动物模型的建立 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(01): 420-424.
- 王开,钟佩玲,王昌铭. 缺血性脑卒中相关生物标志物多组学研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2023, 40(06): 587-591.
- Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- Haw R A, Croft D, Yung C K, et al. The Reactome BioMart [J]. Database (Oxford), 2011, 2011: bar31.
- 吴登宠,邵湘芝,朱烈烈. 骨骼肌质量和肌肉力量对缺血性脑卒中患者神经功能的预测效能评价 [J]. 全科医学临床与教育, 2024, 22(02): 128-132.
- 李艳雨,穆斌,杨文杰. 早期肌少症筛查对脑卒中患者预后康复的影响 [J]. 河北医科大学学报, 2023, 44(06): 635-639.
- 黎丹. 单中心急性及亚急性期卒中相关性肌少症的患病率及危险因素: 一项病例对照研究 [D]. 吉林大学, 2023.
- 张玳玮,朱少铭,李国臣. 气、气机、病机说略 [J]. 中医学报, 2020, 35(12): 2564-2567.
- 屈小虎,陈慧,黄玲,等. 脾气虚证和脾不统血证模型大鼠脾脏能量代谢的比较研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(06): 1355-1358.

# 榆芩方对大肠湿热型溃疡性结肠炎大鼠肠道微生态及血清VIP、CCK、IL-17、IL-23、IL-10表达的影响\*

王庆娜, 杨振斌<sup>△</sup>, 刘乐, 杨超, 陈莉丽

(扬州市中医院脾胃病科, 江苏扬州 225002)

**摘要:** 目的: 观察榆芩方对大肠湿热型溃疡性结肠炎大鼠肠道微生态及血清VIP、CCK、IL-17、IL-23、IL-10表达的影响, 探讨其治疗溃疡性结肠炎可能的作用机制。方法: 将48只健康SD大鼠随机分为6组: 空白组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组及柳氮磺嘧啶组, 每组各8只。空白组不造模, 造模组通过三硝基苯磺酸(TNBS)法制备溃疡性结肠炎大鼠模型。造模成功后, 空白组、模型组给予以生理盐水直肠内给药; 小剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组分别使用榆芩方不同剂量药物保留灌肠, 柳氮磺嘧啶组予柳氮磺吡啶灌肠, 均连续直肠内给药14d。采用菌群培养观察各组肠道微生态情况(双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、肠杆菌), 气相色谱法检测各组大鼠结肠肠道中乙酸、丙酸、丁酸水平, ELISA法测定大鼠血清VIP、CCK、IL-17、IL-23、IL-10含量的变化。结果: 与空白对照组比较, 模型组、榆芩方组及柳氮磺嘧啶组双歧杆菌、乳酸杆菌、乙酸、丙酸、VIP、CCK、IL-10均降低, IL-17、IL-23表达升高, 经榆芩方治疗后, 随着给药浓度的增加, 双歧杆菌、乳酸杆菌、乙酸、丙酸、VIP、CCK、IL-10均明显升高( $P < 0.05$ ), IL-17、IL-23表达均明显降低( $P < 0.05$ )。结论: 榆芩方对大肠湿热型溃疡性结肠炎大鼠的肠道微生态、短链脂肪酸及脑肠肽有较好的调节作用。

**关键词:** 榆芩方; 大肠湿热型; 溃疡性结肠炎; 肠道微生态; 短链脂肪酸; 脑肠肽

**中图分类号:** R 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2024) 12-0057-04

**Effect of Yuxian Decoction on intestinal microecology and serum VIP, CCK, IL-17, IL-23 and IL-10 expression in rats with ulcerative colitis of damp-heat type in large intestine/WANG Qingna, YANG Zhenbin, LIU Le, et al// (Department of Spleen and Stomach Diseases, Yangzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Yangzhou Jiangsu 225002, China)**

**Abstract:** Objective: To investigate the effects of Yuxian Decoction on the intestinal microecology and the expression of VIP, CCK, IL-17, IL-23, IL-10 in serum of rats with large intestine damp heat type ulcerative colitis to explore its possible mechanism of action of colitis. Methods: Forty-eight healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups (blank control group, model group, low dose treatment group, medium dose treatment group, high dose treatment group and Salazosulfadimidine group, eight rats in each group). The blank control group did not model, the rats in model group were used to prepare a rat model of ulcerative colitis by trinitro benzenesulfonic acid (TNBS). After successful modeling, the blank control group, the model group were given an equal dose of physiological saline, and each administration group was given low dose, medium dose and high dose Yuxian decoction and the sulfasalazine suspension rectally continuous rectally for 14d. The intestinal microecology in each group was observed by microflora culture, including Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus and Enterobacter. The levels of acetic acid, propionic acid and butyric acid in intestinal tract of colon of mice in each group were detected by gas chromatography method. The contents of serum brain-gut peptide such as VIP, CCK, IL-17, IL-23, IL-10 were detected by ELISA. Results: Compared with the blank control group, the contents of Bifidobacterium, Lactobacillus, acetic acid, propionic acid, VIP, CCK, IL-10 were reduced in the model group, SASP group and each dose groups of Yuxian Decoction, and the level of IL-17, IL-23 were increased, after treating with Yuxian Decoction, with the gradual increase of the administered dose, the contents of Bifidobacterium, Lactobacillus, acetic acid, propionic acid, VIP, CCK, IL-10 was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the IL-17, IL-23 level was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Conclusion: Yuxian Decoction shows good regulation on the intestinal microecology and short-chain fatty acids and brain-gut peptide in large intestine damp heat type ulcerative colitis.

**Keywords:** Yuxian Decoction; Large intestine damp heat type; Ulcerative colitis; Intestinal microecology; Short-chain fatty acids; Brain-gut peptide

\* 基金项目: 江苏省中医药管理局科技项目(编号: JD2022SZ20)。第一作者: 王庆娜, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 消化内科疾病, E-mail: baiyijiaojie@163.com。△ 通讯作者: 杨振斌, 硕士, 主任中医师, 研究方向: 脾胃病内科疾病。

- [18] 龙专, 欧阳过, 王敏, 等. 基于“气虚-能量代谢重塑”探讨马王堆导引术在慢性心力衰竭中的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(11): 1350-1354.
- [19] 王臻. 益气活血法改善心源性营养不良大鼠心肌能量代谢及中医证候研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [20] 吴昱杰, 刘建勋. 益气活血中药改善慢性心衰气虚证作用机制研究进展[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(01): 234-239.
- [21] 倪菲, 于睿, 崔家鹏, 等. 香砂六君子汤对脾气虚证浅表性胃炎大鼠线粒体能量代谢影响研究[J]. 陕西中医, 2020, 41(02): 152-155.
- [22] 古金晓. 缺血性脑卒中始发态气虚证临床特点、判别模型构建及基于代谢组学的生物学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2022.
- [23] 杨璐平. 基于线粒体能量代谢探讨补阳还五汤及拆方治疗缺血性中风的机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2022.
- [24] Chen H, Chomyn A, Chan D C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction [J]. J Biol Chem, 2005, 280(28): 26185-26192.
- [25] Mishra P, Chan D C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics [J]. J Cell Biol, 2016, 212(4): 379-387.
- [26] Chen H, Vermulst M, Wang Y E, et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations [J]. Cell, 2010, 141(2): 280-289.
- [27] 张敏, 陈立军, 靳秋月, 等. 大鼠骨骼肌糖酵解限速酶在不同训练负荷过程中的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41): 7649-7652.

(收稿日期 2024-06-26)