

枳实通降颗粒通过干预MK2磷酸化调控c-kit表达防治术后炎性肠梗阻的机制研究*

莫黎¹, 李倩², 周平兰¹, 王华帅², 李莹², 黄丽², 何永恒^{3**}

(1. 湖南中医药大学第二附属医院 长沙 410005; 2. 湖南中医药大学研究生院 长沙 410208;

3. 湖南省中医药研究院附属医院 长沙 410006)

摘要:目的 研究枳实通降颗粒对术后炎性肠梗阻模型大鼠小肠组织中MAPK激活蛋白激酶2(MAPK-activated protein kinase 2, MK2)、磷酸化MAPK激活蛋白激酶2(p-MK2)、炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 及原癌基因(c-kit)的影响,探讨其作用机制。方法 先将大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、枳实通降颗粒4.2 g·kg⁻¹、8.3 g·kg⁻¹、16.6 g·kg⁻¹组和普芦卡必利0.18 mg·kg⁻¹组,药物干预组于造模术后6 h灌胃给药1次,其余各组以生理盐水代替,术后24 h取材。ELISA法测定各组大鼠小肠组织中炎症因子的含量;Western blot检测小肠组织中MK2、p-MK2和c-kit的蛋白表达情况;RT-PCR检测MK2和c-kit mRNA的表达情况;免疫组化观察c-kit阳性细胞情况。结果 与假手术组及空白组比较,模型组大鼠肠道推进率及c-kit蛋白、阳性细胞、mRNA的表达水平均明显偏低,而胃内容物残留率及小肠组织中炎症因子含量、p-MK2蛋白的表达水平则明显偏高($P<0.01$);与模型组比较,枳实通降颗粒各剂量组及普芦卡必利组肠道推进率、c-kit蛋白及mRNA、阳性细胞的表达水平均明显升高,而胃内容物残留率及小肠组织中炎症因子含量、p-MK2蛋白表达水平则明显偏低($P<0.01$)。但各组MK2蛋白及mRNA的表达水平并无明显差异($P>0.05$)。结论 枳实通降颗粒能显著促进术后炎性肠梗阻模型大鼠的胃肠功能恢复,其作用机制是通过干预MK2磷酸化,抑制肠壁组织的炎症反应,增加c-kit表达水平来实现的。

关键词: 术后炎性肠梗阻 大鼠 枳实通降颗粒 MK2 p-MK2 c-kit

doi: 10.11842/wst.20210927012 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

术后炎性肠梗阻(Postoperative inflammatory ileus, POI)是指腹部术后早期胃肠道收缩功能恢复前的一个特殊时期,以肠麻痹和肠壁水肿渗出粘连为特点,又称为术后肠梗阻或术后早期炎性肠梗阻。POI被认为是腹部,尤其是肠道手术后无法避免的并发症,其持续时间的长短直接影响到术后患者的康复,但目前临床仍缺乏高效安全的治疗手段和药物^[1]。研究证实,神经机制与炎症机制是导致POI的发病的两种主

要机制,二者相互影响,但炎症反应在其中起着关键性作用^[2]。p38MAPK(Mitogen-activated protein kinase)信号通路是炎症反应发生的经典通路,其中MK2又是该通路中一个关键性的下游蛋白激酶,具有干预细胞因子产生、转录因子活化及影响炎症受体表达等作用,是调控炎症反应的关键分子。Cajal间质细胞(ICC)作为维持胃肠蠕动功能的关键性细胞,在各种胃肠蠕动功能障碍性疾病的发病中起着关键性作用,

收稿日期:2021-09-27

修回日期:2022-03-25

* 湖南省自然科学基金委员会面上项目(2021JJ30518):枳实通降颗粒调控TRPA1介导肥大细胞-神经轴防治术后炎性肠梗阻及其相关性肺损伤的作用机制研究,负责人:莫黎;湖南省临床医疗技术创新引导项目(2021SK51302):超低位直肠癌保肛手术的可行性及相关技术标准化研究,负责人:莫黎;湖南省中医药管理局一般课题(2021100):枳实通降颗粒调控p38-MAPK通路MK1/MK2磷酸化干预巨噬细胞-ICC-平滑肌轴防治术后炎性肠梗阻的疗效及机制研究,负责人:莫黎。

** 通讯作者:何永恒,教授,博士研究生导师,主要研究方向:肛肠疾病的中西医结合防治研究。

也是许多药物的靶点所在^[3]。研究证实,手术操作等可损伤肠壁间神经网络、激活炎症启动细胞,激发瀑布式炎症反应,进而导致肠壁间的 ICC 受损,肠壁神经-平滑肌网络反应瘫痪,平滑肌起搏抑制,最终导致 POI 的发生^[4]。

前期多中心临床研究证实^[5],枳实通降颗粒对开腹及腹腔镜结直肠肿瘤术后 POI 的恢复有显著的促进作用,且 POI 的再发率、肺部感染等并发症的发生率均低于常规治疗组。其后的基础研究也显示:枳实通降颗粒具有较强的抗炎作用,作用强度与药物剂量在一定范围内呈正相关,但作用机制尚需进一步明确^[6]。本研究继续以术后炎性肠梗阻模型大鼠为研究对象,观察枳实通降颗粒对模型大鼠小肠肠壁组织 MK2 磷酸化、炎症反应及 c-kit 表达的影响,探讨其防治 POI 的可能机制,对该药的深入开发和中医药在围手术期快速康复领域的推广应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验药物

专利方枳实通降颗粒^[7]由枳实 10 g、乌药 10 g、大腹皮 10 g、广木香 10 g、黄柏 10 g、泽泻 12 g、三七 6 g、西洋参 6 g、川牛膝 12 g、甘草 6 g 组成。实验所用传统中药饮片均由湖南新汇制药厂生产,由湖南省中医院(湖南中医药大学第二附属医院)门诊中药房提供,经湖南中医药大学第二附属医院药剂科周平兰教授鉴定,所有药材均达到合格标准。采用传统方法水煎浓缩后,制备成含药浓度为 $0.34 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,冷藏备用。阳性对照组采用琥珀酸普芦卡必利片(Janssen Cilag S. p. A, 2 mg×7 片/盒),批号:JGL6E00,以适量纯净水溶解制备成混悬液备用,含药浓度为 $0.036 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠 84 只(合格证编号:110727191100 1708),鼠龄 6 周,雌雄各半,质量 180–220 g。采购自斯莱克景达实验动物有限公司(湖南),许可证号:SCXK(湘)2016–0002,适应性喂养于湖南中医药大学动物实验中心实验室,许可证号:SYXK(湘)2019–0009,1 周后开始实验。本实验已经该校实验动物伦理委员会批准(LL2019092005)。

1.3 试剂

肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)及白介

素-8(IL-8)试剂盒(上海晶天生物, E20200103012, E20200103011, E20200103010)、引物(上海生工, 221020117)、逆转录试剂盒(美国 Promega, A3500)、PCR 试剂盒(美国 Promega, A6001)、TRIzol(美国 Invitrogen, 15596018);G 蛋白磁珠(美国 Cell Signaling 公司, 9006S);蛋白质标志物(美国 Thermo 公司, 26634);c-kit 兔抗体(美国 ABclonal 公司, A0357); β -Action 兔抗体、羊抗兔 IgG 抗体(武汉贝茵莱生物科技有限公司, PAB36265, SAB43714)。

1.4 仪器

电泳仪、Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad);酶标仪(芬兰雷勃);全自动化学发光分析仪(上海天能)。

1.5 实验方法

1.5.1 动物分组及造模

84 只 SD 大鼠按照随机数字表法随机分为 7 组:空白组、假手术组、POI 模型组、中药(枳实通降颗粒)低、中、高剂量组和普芦卡必利组,每组各 12 只,雌雄各半,分别于术后 24 h 取材。所有大鼠于术前禁食 24 h,禁水 12 h,术后禁食不禁水。根据前期实验优化的造模方法^[8]:3% 戊巴比妥钠($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量腹腔注射)麻醉大鼠并固定,尽量按照无菌手术操作要求进行手术及取样:开腹,找到并以 4 号丝线结扎切除部分盲肠,然后用两根盐水棉签轻轻夹住肠管,由近心端小肠起始段向盲肠端轻柔摩擦肠壁,仅处理 1 次后即回纳肠管并关腹,手术时间控制在 15 min 左右;假手术组:仅单纯切开腹腔,湿盐水纱布覆盖切口后保持与手术组相同时间,不做其他任何操作,然后同法关腹。空白组不做处理。

1.5.2 给药方法

根据前期研究筛选的最优给药方法^[6],于造模术后 6 h,所有大鼠按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重的剂量标准灌胃给药 1 次。给药剂量根据等效剂量计算公式进行折算后确定,中药低、中、高剂量组分别按照 $4.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $8.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $16.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重的标准给予枳实通降颗粒浓缩药液,普芦卡必利组按 $0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重标准予混悬液,空白组、假手术组、模型组则给予同体积生理盐水。

1.5.3 检测肠道推进率及胃内容物残留率

术后 23.5 h 给予 0.15 mL 墨汁灌胃,30 min 后麻醉大鼠,重新打开腹腔,夹闭胃的两端及小肠末端,自然状态下分别测量已染色部分及整个幽门以下肠管的长度,肠管黑染长度/全肠道长度×100%=肠道推进率

表1 MK2及c-kit mRNA实时荧光定量PCR检测引物设计

Protein	Primer F	Primer R	Size(bps)
MK2	5'GCACCAGGAGGAAGCTCAGC3'	5'ACCGCTGTGCCAGATGTGG3'	138
β -actin	5'ACGTTGCTATCCAGGCTGT3'	5'CTCGGTGAGGATCTTCATG3'	127
c-kit	5'TCAAGGAAGGTTTCCGAATG3'	5'TCTCTGGGTTGGGGTTACAG3'	195
β -actin	5'ACAGCAACAGGCTGGTGGAC3'	5'TTTGAGGCTGCAGCGAATT3'	240

表2 各组大鼠肠道推进率、胃内容物残留率比较
($\bar{x}\pm s$, %, $n=12$)

组别	剂量	肠道推进率	胃内容物残留率
空白对照组	-	26.27 $\pm$ 3.03	26.13 $\pm$ 8.30
假手术组	-	20.43 $\pm$ 3.18	33.40 $\pm$ 5.27
模型对照组	-	1.19 $\pm$ 1.2**	82.46 $\pm$ 4.64**
中药低剂量组	4.2 g·kg ⁻¹	9.13 $\pm$ 3.00##	63.61 $\pm$ 6.03##
中药中剂量组	8.3 g·kg ⁻¹	14.29 $\pm$ 1.92##	55.58 $\pm$ 6.27##
中药高剂量组	16.6 g·kg ⁻¹	15.80 $\pm$ 2.03##	52.91 $\pm$ 3.82##
普芦卡必利组	0.18 mg·kg ⁻¹	15.02 $\pm$ 2.05##	52.95 $\pm$ 6.96##

注:与空白组及假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

(%)。完整取出胃体,分别测量全胃及胃内容物的质量,并按照(全胃质量-洗净后胃体质量)/全胃质量 $\times$ 100%的公式计算胃内容物残留率(%)。

1.5.4 ELISA法检测小肠组织中炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 的含量

术后24 h,分别取大鼠靠近幽门端1段长2 cm的小肠肠管,-80℃冰箱保存,参照试剂盒要求进行裂解后匀浆、离心,取上清液进行检测。

1.5.5 免疫组化观察小肠组织的病理学改变及c-kit阳性细胞表达情况

术后24 h,取大鼠近幽门端长约2 cm的小肠一段,将标本进行切片及DAB染色,随机挑选3张切片进行分析,每张切片随机5个互不重叠视野在显微镜下($\times 200$)观察检测,进行图像采集和分析,以胞膜出现棕黄色或褐色颗粒视为阳性表达,测定c-kit阳性细胞表达的平均光密度^[9]。

1.5.6 Western blot检测小肠组织中MK2、p-MK2、c-kit蛋白表达水平

术后24 h,取大鼠近幽门端长约2 cm的小肠组织,按照下列步骤进行检验:剪碎组织后加入适量裂解液,匀浆至完全裂解,离心后取上清液检测蛋白质含量。以定量结果为参考,取适量蛋白液与缓冲液混合,再次离心后依次加入一抗、二抗,转膜电泳,全自动化学发光分析仪检测分析,相关条带的灰度值采用TANONGIS软件读取,对比其蛋白相对表达量。

1.5.7 RT-PCR检测小肠组织中MK2、c-kit mRNA的相对表达水平

术后24 h,取大鼠近幽门端2段长约2 cm的小肠组织,首先从NCBI中下载基因序列,采用Primer 5.0软件设计引物,见表1。取组织20~50 mg,采用TRIzol法提取总RNA,即每个样本加入600 μ L TRIzol,反复进行吹打、室温静置、离心等处理后,提取小肠组织中总的RNA,然后加入含有上下游引物、荧光染料反应体系中,合成cDNA,接着配置反应体系、按照94℃ 4 min、94℃ 40 sec、60℃ 30 sec, $\times 50$ cycle完成扩增程序后行Real-time PCR检测,得到目的蛋白的CT值后,再以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算其mRNA的相对表达水平(RQ值)。

1.6 统计学方法

统计学处理采用SPSS 21.0软件进行分析。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,符合正态分布和方差齐性,多组比较则采用单因素方差分析,否则采用Kruskal-Wallis H 检验。以 $\alpha=0.05$ 的标准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 比较各组大鼠肠道推进率、胃内容物残留率

与空白组及假手术组比较,模型组肠道推进率明显偏低,胃内容物残留率明显偏高($P<0.01$);与模型组比较,中药各剂量组及普芦卡必利组能明显增加肠道推进率及降低胃内容物残留率($P<0.01$),以枳实通降颗粒高剂量组疗效最好,但与中剂量组和普芦卡必利组比较,差异并无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.2 比较各组大鼠小肠组织中炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 的含量

模型组小肠组织中IL-6、IL-8、TNF- α 含量均明显高于空白组和假手术组($P<0.01$);与模型组比较,药物治疗组炎症因子水平均明显低于模型组($P<0.01$),以中药高剂量组效果最好,但与中剂量组及普芦卡必利组差异无统计学意义($P>0.05$),优于中药低剂量组($P<0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠小肠组织中炎症因子含量比较($\bar{x}\pm s, \text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}, n=12$)

组别	剂量	IL-6	IL-8	TNF- α
空白对照组	—	33.08 $\pm$ 4.06	79.04 $\pm$ 15.34	64.89 $\pm$ 4.54
假手术组	—	41.54 $\pm$ 8.88	90.40 $\pm$ 12.47	86.36 $\pm$ 3.17
模型对照组	—	120.66 $\pm$ 15.96**	295.12 $\pm$ 21.58**	307.45 $\pm$ 34.53**
中药低剂量组	4.2 g $\cdot$ kg $^{-1}$	89.81 $\pm$ 4.71 [#]	191.45 $\pm$ 13.98 [#]	211.46 $\pm$ 15.75 [#]
中药中剂量组	8.3 g $\cdot$ kg $^{-1}$	64.93 $\pm$ 10.29 [#]	125.67 $\pm$ 18.01 [#]	133.91 $\pm$ 21.33 [#]
中药高剂量组	16.6 g $\cdot$ kg $^{-1}$	57.05 $\pm$ 9.46 [#]	114.15 $\pm$ 11.27 [#]	116.26 $\pm$ 12.42 [#]
普芦卡必利组	0.18 mg $\cdot$ kg $^{-1}$	67.78 $\pm$ 11.28 [#]	138.31 $\pm$ 23.18 [#]	141.49 $\pm$ 28.54 [#]

注:与空白组及假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

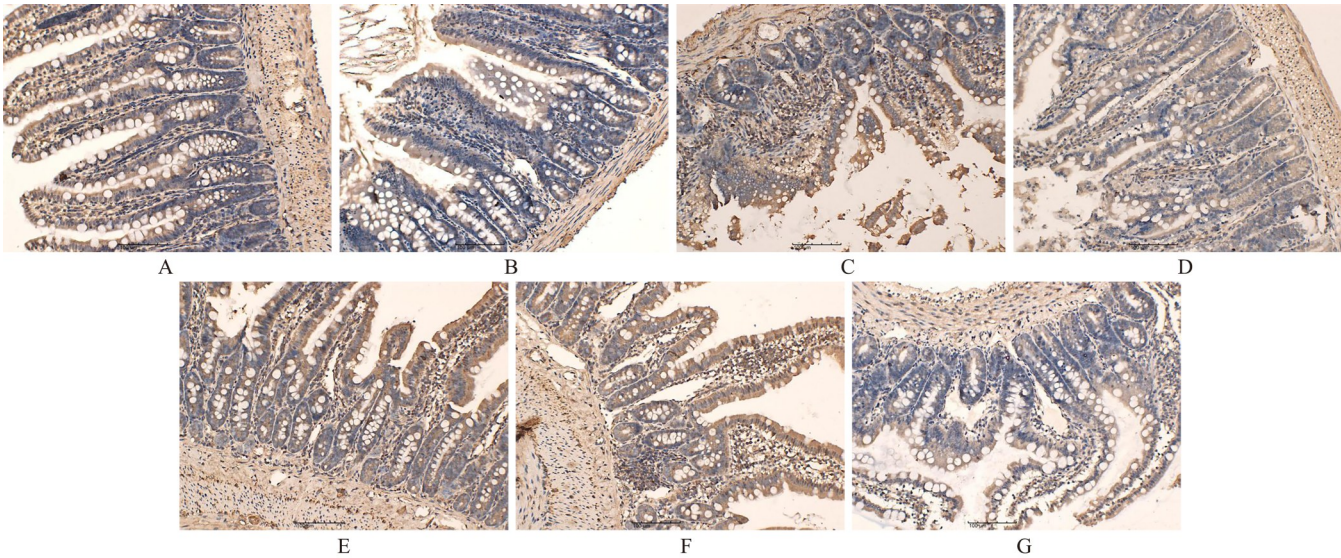


图1 各组大鼠小肠病理形态学改变及c-kit阳性细胞表达情况($\times 200$)

注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:中药低剂量组;E:中药中剂量组;F:中药高剂量组;G:普芦卡必利组。

表4 各组大鼠小肠组织中c-kit蛋白表达[WB(相对灰度)、免疫组化(平均光密度)]及m-RNA表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量	相对灰度	c-kit mRNA	平均光密度
空白对照组	—	1.08 $\pm$ 0.18	1.14 $\pm$ 0.21	0.37 $\pm$ 0.05
假手术组	—	1.02 $\pm$ 0.10	1.05 $\pm$ 0.13	0.32 $\pm$ 0.04
模型对照组	—	0.30 $\pm$ 0.10**	0.31 $\pm$ 0.09**	0.16 $\pm$ 0.02**
中药低剂量组	4.2 g $\cdot$ kg $^{-1}$	0.52 $\pm$ 0.14 [#]	0.50 $\pm$ 0.15 [#]	0.22 $\pm$ 0.03 [#]
中药中剂量组	8.3 g $\cdot$ kg $^{-1}$	0.80 $\pm$ 0.16 [#]	0.82 $\pm$ 0.14 [#]	0.29 $\pm$ 0.03 [#]
中药高剂量组	16.6 g $\cdot$ kg $^{-1}$	0.89 $\pm$ 0.22 [#]	0.89 $\pm$ 0.17 [#]	0.31 $\pm$ 0.03 [#]
普芦卡必利组	0.18 mg $\cdot$ kg $^{-1}$	0.78 $\pm$ 0.14 [#]	0.79 $\pm$ 0.10 [#]	0.27 $\pm$ 0.02 [#]

注:与空白组及假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠小肠组织病理形态改变及c-kit阳性细胞表达情况比较

与空白组及假手术组比较,模型组小肠组织可见明显水肿、炎症细胞浸润及组织坏死脱落,c-kit阳性细胞表达水平明显低于其他各组($P<0.01$);药物治疗组病理组织结构改变较轻,c-kit阳性细胞($P<0.01$),中药高剂量组效果最好,但与中剂量组及普芦卡必利

组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图1、表3。

2.4 比较各组大鼠小肠组织中MK2、p-MK2、c-kit蛋白及c-kit、MK2 mRNA的表达水平

与空白组及假手术组比较,模型组小肠组织中c-kit、p-MK2蛋白及c-kit mRNA的表达水平明显低于其他各组($P<0.01$);药物治疗组c-kit、p-MK2蛋白的表达明显高于模型组($P<0.01$),以中药高剂量组最

表5 各组大鼠小肠组织中MK2、p-MK2蛋白及MK2 mRNA表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量	MK2 蛋白	p-MK2 蛋白	p-MK2/MK2	MK2 mRNA
空白对照组	-	1.0±0.01	1.0±0.01	1.0±0.02	1.04±0.24
假手术组	-	0.99±0.05	1.28±0.11	1.30±0.13	1.04±0.08
模型对照组	-	0.99±0.09	3.41±0.28**	3.45±0.34**	1.09±0.35
中药低剂量组	4.2 g·kg ⁻¹	0.99±0.08	1.97±0.43 [#]	2.0±0.34 [#]	0.94±0.17
中药中剂量组	8.3 g·kg ⁻¹	1.0±0.06	1.68±0.40 [#]	1.97±0.33 [#]	0.93±0.14
中药高剂量组	16.6 g·kg ⁻¹	1.02±0.08	1.40±0.15 [#]	1.39±0.24 [#]	0.92±0.25
普芦卡必利组	0.18 mg·kg ⁻¹	1.0±0.09	2.01±0.44 [#]	2.05±0.58 [#]	1.05±0.31

注:与空白组及假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

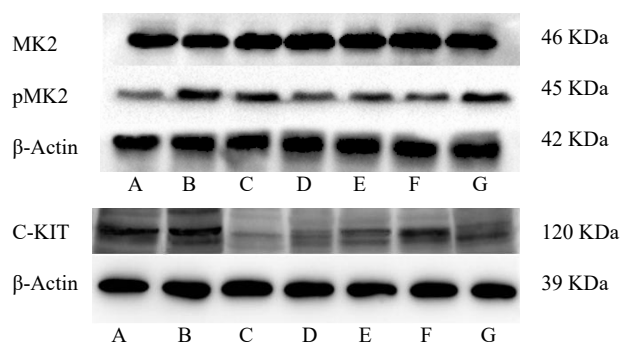


图2 各组大鼠小肠组织中MK2、p-MK2、c-kit蛋白表达条带图
注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:中药低剂量组;E:中药中剂量组;F:中药高剂量组;G:普芦卡必利组。

低,但与中剂量组及普芦卡必利组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。各组MK2蛋白及mRNA的表达水平无明显差异($P>0.05$)。见表4、5,图2。

3 讨论

炎症是导致POI的主要原因,炎症反应在手术后3-4 h开始逐渐明显,并于24 h左右达到最高峰,随后逐步下降。研究证实,术后早期若采取药物等措施抑制炎症反应的产生,可有效的促进POI的恢复及预防其相关并发症的发生^[10]。ICC是一种连接于肠壁神经末梢和平滑肌细胞之间的网络状结构,可产生慢波电活动起搏肠壁平滑肌细胞产生收缩,是保障肠道蠕动功能的关键所在炎症等各种病理损害造成的胃肠功能障碍均与ICC细胞缺失/异常以及网络受损等密切相关^[4],而胃肠蠕动功能障碍正是POI的主要特征之一,二者之间存在着密切的联系。c-kit是ICC的特异性标志物,观察c-kit在胃肠道的分布和表达,可准确的评估ICC细胞的活性及受损状态^[11]。MK2作为调控炎症反应的关键分子^[12-15],可因腹腔手术操作刺激而磷酸化,进而激活肠壁浆膜及平滑肌肌间神经丛处的

常驻巨噬细胞^[16],诱发IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症因子和细胞趋化因子的释放,诱导大量白细胞聚集并浸润于肠壁组织间,导致肠壁水肿、渗出、粘连,并使原癌基因c-kit表达受到抑制而无法促进肠壁ICC的分化成熟,最终导致肠壁平滑肌细胞电生理活动被抑制,起搏功能丧失,肠壁平滑肌麻痹,形成POI^[17]。

枳实通降颗粒由经典方五磨饮子及三妙散加减而成,药理学研究证实,其所含有效成分具有较好的抗炎、抗感染、调节免疫、促进平滑肌收缩等作用^[18-19]。方中枳实、广木香、乌药及大腹皮可促进胃肠道平滑肌蠕动;西洋参可调节机体免疫力,预防感染等作用;三七提取物能促进血液循环,保护小鼠缺血再灌注导致的肠道粘膜损害,促进肠道蠕动功能障碍恢复;黄柏具有较强的抗炎及抗感染作用,对多种致病细菌有较强的抑制作用;牛膝不仅可抗炎、镇痛,还能促进肠管收缩;泽泻具有较强的利尿和调节免疫力的作用;甘草具有解毒、抗炎抑菌、抗病毒及调节免疫作用。全方行气活血、益气养血、清热利湿,行而不峻,补而不腻,清利而不伤津液,具有较强的抗炎、促进血液循环、增强免疫力和促进胃肠蠕动功能,切合于腹部术后本虚标实,气血亏虚,瘀血湿热内停的病机特点。

本实验研究结果证实:枳实通降颗粒能有效的抑制POI大鼠模型肠壁组织中MK2磷酸化,降低IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症因子的水平,促进术后胃排空及肠道蠕动,其作用强度与用药时间和剂量存在一定的正相关性,证实该方具有较强的抗炎和促进术后胃肠功能恢复的作用,这种作用主要是通过抑制MK2磷酸化来实现的。枳实通降颗粒各剂量组c-kit的表达明显高于模型组,从而提示其具有保护ICC细胞的功能。基于以上研究表明:枳实通降颗粒可通过抑制MK2磷酸化,有效的抑制因手术等原因导致的肠壁炎症反应,调控c-kit的表达水平,保护和恢复ICC细胞功能,

从而达到防治术后炎性肠梗阻的目的。本次研究虽然从 MK2, p-MK2 及 c-kit 的表达作为研究的切入点论证了其作用机制,但中药复方的成分及作用机制非

常复杂,是多靶点、多通路作用,其关键性启动点和各条通路之间的是否具有相互作用仍未明了,需待进一步的研究。

参考文献

- 1 丁杰,许硕贵.外科术后小肠梗阻的研究进展.中国急救医学, 2018, 38(8):681-683.
- 2 杨秀荣,赵晓红,陈慧,等.厚朴三物汤对术后肠梗阻大鼠小肠 Cajal 细胞及 iNOS 表达的影响.中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5):57-62.
- 3 Drumm B T, Sung T S, Zheng H F, et al. The effects of mitochondrial inhibitors on Ca^{2+} signalling and electrical conductances required for pacemaking in interstitial cells of Cajal in the mouse small intestine. *Cell Calcium*, 2018, 72:1-17.
- 4 陈峭,谢胜,周晓玲,等.“以俞调枢”法对胃肠动力障碍大鼠 SCF、c-kit 蛋白及 mRNA 表达的影响.中华中医药杂志, 2019, 34(3): 1174-1177.
- 5 莫黎,何永恒,康安定,等.枳实通降颗粒对结肠肿瘤患者术后胃肠功能恢复及术后早期炎性肠梗阻防治作用的双中心前瞻性研究.中医杂志, 2017, 58(20):1760-1763.
- 6 莫黎,李倩,谢彪,等.枳实通降颗粒不同给药方法和剂量对术后炎性肠梗阻大鼠模型的影响.时珍国医国药, 2021, 32(2):312-314.
- 7 何永恒,莫黎.一种促进术后胃肠功能恢复及防治术后肠梗阻的中药组合物及其制备方法.湖南省:CN106668389B, 2020-01-14.
- 8 李倩,莫黎,何永恒.建立术后肠梗阻大鼠模型的新方法及评价.浙江医学, 2022, 44(3):231-235.
- 9 林仁敬,鲁海燕,何永恒,等.白术七物颗粒剂对气阴两虚型慢传输型便秘模型大鼠结肠组织 c-kit 的影响及其作用机制.中国全科医学, 2017, 20(21):2640-2643.
- 10 Sun Y F, Shi H, Hong Z, et al. Inhibition of JAK1 mitigates postoperative ileus in mice. *Surgery*, 2019, 166(6):1048-1054.
- 11 陈健海,仲婕,王凡,等.胃肠道 Cajal 间质细胞起搏功能的研究进展.中国病理生理杂志, 2017, 33(1):184-188.
- 12 Wu Y X, He H Q, Ding Y H, et al. MK2 mediates macrophage activation and acute lung injury by regulating let-7e miRNA. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 315(3):L371-L381.
- 13 Beamer E, Corrêa S A L. The p38MAPK-MK2 signaling axis as a critical link between inflammation and synaptic transmission. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:635636.
- 14 Singh R K, Diwan M, Dastidar S G, et al. Differential effect of p38 and MK2 kinase inhibitors on the inflammatory and toxicity biomarkers *in vitro*. *Hum Exp Toxicol*, 2018, 37(5):521-531.
- 15 周琦,刘晓瑜,刘树民.中药调控 MAPK 信号通路在疾病治疗中的研究进展.中药药理与临床, 2019, 35(6):176-180.
- 16 Xiong Y D, Rong L X, Pan C. Regulation of postoperative ileus by *Lentivirus*-mediated HuR RNA interference via the p38/MK2 signaling pathway. *J Gastrointest Surg*, 2017, 21(2):389-397.
- 17 Schneider S, Wright C M, Heuckeroth R O. Unexpected roles for the second brain: Enteric nervous system as master regulator of bowel function. *Annu Rev Physiol*, 2019, 81:235-259.
- 18 王梁凤,柳小莉,李慧婷,等.基于网络药理学的枳实挥发油治疗慢性传输型便秘的机制研究.中国中药杂志, 2020, 45(8):1909-1917.
- 19 王远,凌江红,张丽敏,等.枳实含药血清对大鼠胃 Cajal 间质细胞内质网应激损伤的影响及机制.山东医药, 2018, 58(41):34-37.

Study on the Mechanism of Zhishitongjiang Granule Regulating c-kit Expression by Inhibiting MK2 Phosphorylation to Prevent Postoperative Inflammatory Ileus

Mo Li¹, Li Qian², Zhou Pinglan¹, Wang Huashuai², Li Ying², Huang Li², He Yongheng³

(1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410005, China; 2. Graduate School of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

Abstract: Objective To study the effect of Zhishi Tongjiang Granule on MK2, p-MK2, inflammatory factors IL-6, IL-8, TNF- α and c-kit in small intestine tissue of rats with postoperative inflammatory ileus (POI), and to explore its mechanism. Methods The rats were randomly divided into blank group, sham operation group, model group, Zhishi Tongjiang granule 0.85 g·kg⁻¹, 1.7 g·kg⁻¹, 3.4 g·kg⁻¹ group and Prucapride 0.18 g·kg⁻¹ group. The protein expressions of

MK2, P-Mk2 and C-kit in small intestine were detected by Western blot. The mRNA expression of MK2 and C-kit was detected by RT-PCR. The c-kit positive cells were observed by immunohistochemistry. Results Compared with the sham operation group and the blank group, the intestinal propulsion rate and the expression levels of c-kit protein, positive cells and mRNA in the model group were significantly lower, while the residual rate of gastric contents, the content of inflammatory factors in small intestine tissue, and the expression levels of p-MK2 protein were significantly higher ($P<0.01$). Compared with the model group, the intestinal propulsion rate and the expression levels of c-kit protein, positive cells and mRNA in the model group were significantly lower than those in the control group ($P<0.01$). However, the residual rate of gastric contents, the content of inflammatory factors in small intestine and the expression of p-MK2 protein were significantly lower ($P<0.01$). No significant difference were be found among the three groups in the expression levels of MK2 protein and Mrna ($P>0.05$). Conclusion Zhishi Tongjiang granule can significantly promote the recovery of gastrointestinal function in rats with postoperative inflammatory intestinal obstruction. The mechanism of action is to intervene MK2 phosphorylation, inhibit the inflammatory reaction of intestinal wall tissue, and increase the expression level of c-kit.

Keywords: Postoperative inflammatory ileus(POI), Rats, Zhishitongjiang Granule, MK2, p-MK2, C-Kit

(责任编辑: 刘玥辰, 审稿人: 王瑀、张志华)