

☆ XXXX ☆

电针对功能性便秘小鼠结肠线粒体未折叠蛋白反应相关蛋白的影响

王雯¹, 李艳秋¹, 曾伟健¹, 鄢香芸¹, 何昭璇¹, 肖显俊², 李瑛¹, 姚俊鹏^{1,3}
(¹成都中医药大学针灸推拿学院, 成都610075; ²成都中医药大学养生康复学院, 成都610075;
³针灸防治老年疾病教育部重点实验室, 成都610075)

【摘要】 目的:观察电针“天枢”“上巨虚”对功能性便秘(FC)模型小鼠结肠线粒体未折叠蛋白反应(UPR^m)相关蛋白表达的影响,探讨电针改善FC症状的潜在机制。方法:18只雄性C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组、电针组,每组6只。采用洛哌丁胺灌胃14d构建FC小鼠模型。电针组采用电针交替干预单侧“天枢”和“上巨虚”(疏密波,3 Hz/15 Hz),每周连续治疗5次,共干预10次,空白组和模型组仅同等固定。采用首粒蓝便排出时间、6 h排便颗粒数、粪便性状评分、粪便含水率和小肠推进率评估小鼠胃肠传输功能,HE染色观察结肠组织病理改变,透射电子显微镜观察结肠组织线粒体超微结构,流式细胞术检测结肠组织线粒体膜电位和活性氧(mtROS)水平,比色法测定结肠组织线粒体ATP含量,免疫组织化学法检测UPR^m关键标志分子热休克蛋白60(HSP60)和LON蛋白酶1(LONP1)在结肠组织的表达情况。结果:与空白组相比,模型组小鼠首粒蓝便排出时间延长($P<0.01$),6 h内排便颗粒数减少($P<0.01$),粪便性状评分、粪便含水率及小肠推进率降低($P<0.01, P<0.05$),结肠组织线粒体明显肿胀,膜破损、嵴断裂严重,线粒体膜电位降低($P<0.01$),ATP含量下降($P<0.01$),mtROS水平升高($P<0.01$),结肠平滑肌细胞(SMC)中HSP60、LONP1蛋白阳性表达减少($P<0.01$)。干预后,与模型组比较,电针组首粒蓝便排出时间缩短($P<0.01$),6 h排便颗粒数增加($P<0.01$),粪便性状评分、粪便含水率及小肠推进率升高($P<0.01, P<0.05$),结肠组织线粒体轻度肿胀,膜、嵴损伤明显改善,线粒体膜电位升高($P<0.01$),ATP水平升高($P<0.01$),mtROS水平降低($P<0.01$),SMC中HSP60、LONP1阳性表达升高($P<0.05$)。结论:电针“天枢”“上巨虚”能有效促进FC小鼠肠道传输功能,修复结肠SMC线粒体结构和功能,其机制可能与上调SMC中HSP60和LONP1的表达,进而激活UPR^m相关。

【关键词】 电针;功能性便秘;线粒体;未折叠蛋白反应;热休克蛋白60;LON蛋白酶1

Effect of electroacupuncture on mitochondrial unfolded protein response-associated proteins in the colon tissue of mice with functional constipation

WANG Wen¹, LI Yan-qiu¹, ZENG Wei-jian¹, YAN Xiang-yun¹, HE Zhao-xuan¹, XIAO Xian-jun², LI Ying¹, YAO Jun-peng^{1,3}
(¹School of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;
²College of Health and Rehabilitation, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075; ³Key Laboratory of Acupuncture for Senile Disease, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education of the People's Republic of China, Chengdu 610075)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) at “Tianshu” (ST26) and “Shangjuxu” (ST37) acupoints on the expressions of mitochondrial unfolded protein response (UPR^m) - related proteins in the colon tissue of functional constipation (FC) model mice, so as to explore its potential mechanisms underlying improvement of FC. **Methods** Eighteen male C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups: normal

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250883

引用格式:王雯,李艳秋,曾伟健,等.电针对功能性便秘小鼠结肠线粒体未折叠蛋白反应相关蛋白的影响[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-9.

项目来源:国家自然科学基金青年科学基金项目(No.82405582);中国博士后科学基金面上项目(No.2024M750285);国资计划项目(No.GZB20240087);四川省自然科学基金青年基金项目(No.2023NSFSC1820);国家自然科学基金项目(No.82274652)

通信作者:姚俊鹏,E-mail: yjpcdtcm@163.com

control (NC), FC model (M), and EA ($n=6$ per group). The FC model was established by gavage of loperamide suspension (1 mg/mL, 0.1 mL/10 g), twice daily for 14 d. The EA group received alternating unilateral EA stimulation of ST26 and ST37 (3 Hz/15 Hz, an electric current intensity being able to induce slight tremor of the mouse's limbs) for 20 min, once daily, 5 d a week for 2 weeks. The mice in the NC and M groups underwent equivalent restraint. Gastrointestinal transit function was assessed by measuring the first blue stool discharge time, 6-hour fecal pellet count, stool character score, rate of water content, and intestinal propulsion rate. Histopathological changes of the colon tissue were examined by H.E. staining, and the mitochondrial ultrastructure of colonic smooth muscle cells (SMCs) was observed by using a transmission electron microscopy (TEM). The mitochondrial function was comprehensively evaluated by measuring the mitochondrial membrane potential (MMP) and the mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) levels were assayed using flow cytometry, and the mitochondrial ATP content in the colon tissue was measured using colorimetric assay. The immunohistochemistry stain was employed to detect the expressions of key UPR^{mt} markers heat shock protein-60 (HSP60) and LON protease 1 (LONP1) in the colon tissue. **Results** Compared with the NC group, the M group exhibited a significant increase in the first blue stool discharge time and average immunofluorescence intensity of mtROS ($P<0.01$), and a considerable reduction in the 6-hour fecal pellet count, stool character score, rate of water content, small intestine propulsion rate, MMP level, ATP content, and the expressions of HSP60 and LONP1 proteins in the colon tissue ($P<0.01$, $P<0.05$). Following EA intervention, compared to the M group, the EA group showed a marked decrease in the first blue stool discharge time and average immunofluorescence intensity of mtROS ($P<0.01$), and a notable increase in the 6-hour fecal pellet count, stool character score, rate of water content, intestine propulsion rate, MMP, ATP content, and the expression of HSP60 and LONP1 proteins in the colon tissue ($P<0.01$, $P<0.05$). The results of morphological structure showed that the mitochondria in the colon tissue were significantly swollen, with membrane damage and severe cristae rupture in the model group, while in the EA group, the mitochondrial swelling was mild, with significant improvement in the membrane and cristae integrity of the SMCs. **Conclusion** EA at ST26 and ST37 can effectively ameliorate gastrointestinal dysfunction and restore mitochondrial integrity in colonic SMCs of FC mice, which may be associated with its functions in up-regulating the expressions of HSP60 and LONP1 proteins to activate UPR^{mt}.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Functional constipation; Mitochondria; Unfolded protein response; Heat shock protein 60; LON protease 1

功能性便秘(FC)是临床常见且多发的功能性胃肠病,全球发病率高达10%~15%^[1]。其核心病理生理基础在于肠道动力障碍,直接导致持续性排便困难、排便频率降低及粪便干硬等症状^[2]。研究表明,线粒体作为细胞能量代谢的核心调控器,其功能异常可导致结肠平滑肌细胞(SMC)收缩功能受损,进而引发肠道动力障碍,最终参与FC的发生^[3]。病理条件下,线粒体未折叠蛋白反应(UPR^{mt})失活是介导线粒体功能障碍的核心机制^[4]。研究证实,在应激损伤后,UPR^{mt}通过核信号转导激活启动应激基因表达,上调关键伴侣如热休克蛋白60(HSP60)及蛋白酶如LON蛋白酶1(LONP1),从而清除线粒体内异常蓄积的错误折叠蛋白及线粒体活性氧(mtROS),维持线粒体稳态^[5]。然而,在慢性应激状态下,UPR^{mt}代偿机制失效、功能失活,进而引发持续的线粒体功能障碍^[6]。鉴于UPR^{mt}在维持线粒体功能和肠道动力中的核心调控作用,其作为恢复肠道动力、治疗FC的潜在靶点具有重要的研究价值。

近年来多项高质量临床研究已证实,针刺治疗FC疗效确切^[7-8]。本课题组前期研究表明针刺可通过重塑肠神经系统-Cajal间质细胞-SMC功能网络^[9]、调节肠道菌群组成及microRNA网络结构^[10-11]等有效改善FC症状。然而,针刺促进肠道动力的亚细胞器机制尚不明晰。同时,团队前期研究亦表明,针刺可有效修复FC小鼠受损的线粒体结构^[9],但针刺是否通过调控UPR^{mt}功能失衡发挥治疗作用,其机制尚未阐明。因此,本研究由组织至细胞器,通过观察电针对FC小鼠线粒体功能及UPR^{mt}相关蛋白表达的影响,进一步探讨针刺改善FC症状的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级C57BL/6J雄性小鼠18只,6~8周龄,体质量20~25 g,购自成都达硕实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(川)2025-0030。小鼠饲养在成都中医药大学 SPF级动物实验室[使用许可证号:

SYXK(川)2024-0049],饲养条件如下:温度(25±0.5)℃,湿度(55±5)%,12 h/12 h恒定明暗交替,自由摄食、饮水。本研究实验过程严格遵守科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定,并经成都中医药大学动物伦理委员会批准,伦理批号为:2025119。适应性喂养7 d后,依据随机数字表将小鼠随机分为空白组、模型组、电针组,共3组,每组6只。

1.2 主要试剂与仪器

洛哌丁胺胶囊(西安杨森制药),伊文思蓝染色液(北京索莱宝),异氟烷(深圳瑞沃德),伊红染色液(合肥博美),苏木精染液(北京 Leagene),电镜固定液(成都 Scientist),线粒体膜电位检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(武汉 Elabscience),PBS缓冲液、枸橼酸抗原修复液(武汉 Seveicebio),线粒体超氧化物检测试剂盒(上海碧云天),三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒(南京建成),HSP60抗体、LONP1抗体(武汉三鹰),HRP标记山羊抗小鼠IgG二抗(北京博奥森),山羊血清、RIPA裂解液(安徽 Biosharp),免疫组织化学DAB显色剂试剂盒(北京 Solarbio)。

一次性无菌针灸针(0.18 mm × 13 mm)、SDZ-V型华佗牌电子针疗仪(苏州医疗用品厂),小动物专用吸入麻醉机(R500,深圳瑞沃德),高精度电子秤(22047,徐州古麦仕),超薄切片机(UC7,德国 Leica),钻石切片刀(Ultra 45°,瑞士戴通),透射电子显微镜(HT7800,日本日立),流式细胞仪(CytoFLEX,美国 Beckman coulter),低速离心机、涡旋混合器(DM0412S、MX-F,美国 SCILOGEX),超声细胞粉碎机(JY92-Iin,宁波新芝),酶标仪(Epoch,美国 Biotek),包埋机(JB-P5,武汉俊杰),病理切片扫描仪(Pannoramic SCAN II,匈牙利 3DHISTECH Kft),化学发光成像系统(上海勤翔)。

1.3 造模方法

采用洛哌丁胺灌胃法^[12]构建FC小鼠模型。具体操作如下:使用0.9%氯化钠溶液配制浓度为1 mg/mL的洛哌丁胺混悬液,模型组及电针组以0.1 mL/10 g剂量灌胃,每日2次,连续14 d。空白组仅予等体积0.9%氯化钠溶液灌胃。以模型组小鼠首粒蓝便排出时间长于空白组判定为造模成功^[13]。

1.4 干预方法

治疗期间,空白组小鼠继续给予0.9%氯化钠

溶液灌胃,模型组及电针组小鼠继续给予洛哌丁胺灌胃以维持模型稳定,剂量同造模期,每日1次,连续12 d。灌胃后30 min,实施相应干预措施。

电针组操作:参照《实验针灸学》^[14]中取穴标准,选取小鼠的双侧“天枢”(小鼠腹部正中旁开5 mm)和“上巨虚”(小鼠后肢“足三里”偏下方约6 mm)。采用自制束缚架束缚小鼠,75%乙醇消毒穴位局部后,交替针刺同侧“天枢”“上巨虚”,进针深度约为5 mm。两穴分别连接电针仪正负极,电针参数参考团队前期研究,设置如下:疏密波,频率3 Hz/15 Hz,电流强度以小鼠肢体轻微颤动为度。每次留针20 min,1次/d,连续5 d,休息2 d,共治疗10次^[11]。

1.5 观察指标及检测方法

行为学检测小鼠肠道传输功能:(1)首粒蓝便排出时间:针刺干预结束后禁食12 h,予以伊文思蓝染色液灌胃(0.1 mL/10 g)。记录从灌胃到首粒蓝便排出所用时间,即首粒蓝便排出时间。(2)排便情况评估:观察每只小鼠6 h内排便情况,每2 h收集1次粪便并立即称重,记录其粪便颗粒数、湿重及性状。粪便性状采用布里斯托大便性状量表^[7, 15]进行评分(见表1)。收集完3次(即6 h)后,将所有粪便置于200℃烤箱中烘干30 min,取出称干重,计算粪便含水率,粪便含水率(%)=[(湿重-干重)÷湿重]×100%。

表1 粪便性状评分标准

Table 1 Scoring criteria for fecal consistency

分型	性状
1型	分离的硬块,状如坚果
2型	香肠状,但成块
3型	似香肠,但表面有裂纹
4型	似香肠或蛇,光滑且柔软
5型	软团块,边缘清晰
6型	绒状物,边缘不规则,糊状便
7型	水样,无固体成分,完全液体

取材:行为学观察结束后禁食不禁水12 h取材。取材当日,各组小鼠经伊文思蓝染色液灌胃20 min后,立即予以异氟烷麻醉处死。迅速取出全部小肠(从幽门至回盲部)及结肠。小肠用于计算小肠推进率:小肠推进率(%)=蓝染长度÷小肠全长×100%。用0.9%氯化钠溶液注入结肠以冲洗残留物,并将其分为4部分,第1部分放入4%多聚甲醛中固定,用于HE染色及免疫组织化学检测;第

2部分放置在电镜液中,用于透射电子显微镜下观察线粒体结构;第3部分放入预冷的PBS缓冲液中,用于流式细胞术以检测线粒体膜电位及mtROS含量;第4部分放入液氮中,用于比色法检测。

HE染色法观察小鼠结肠病理形态变化:取上述多聚甲醛固定48h的结肠组织,经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后制备4 μ m切片。切片经烤片、脱蜡及水化后,依次进行以下步骤:苏木精染色3min,盐酸乙醇分化,水洗,返蓝液处理,再水洗,伊红染色3min,水洗,脱水,透明,中性树胶封片,最后于光学显微镜下观察结肠组织病理形态。

透射电子显微镜观察结肠组织线粒体结构:将固定在电镜液中的结肠组织取出,用1%的锇酸·0.1mol/L磷酸缓冲液(pH=7.4)室温固定2h后漂洗3次,按浓度梯度使用乙醇、丙酮脱水,使用包埋剂进行渗透、包埋并烘烤,切片(60~80nm)后用铀铅双染色,干燥后采用透射电子显微镜观察线粒体超微结构。

流式细胞术检测结肠组织线粒体膜电位和mtROS平均荧光强度:取PBS中固定的结肠组织样本,每份约20mg,剪碎至1mm \times 1mm \times 1mm左右,置于gentleMACS C管中,加入37 $^{\circ}$ C预温的酶解液。于组织解离仪中运行解离程序30min,重复1次并旋转30min。弃上清,用RPMI1640重悬细胞并过滤,同培养基洗涤离心后制备单细胞悬液,用于后续检测。(1)线粒体膜电位:取(5~10) \times 10⁵个细胞,离心后弃上清,加入JC-1工作液孵育20min,离心后弃上清,再用预冷且稀释过的JC-1染料洗细胞1次,相同染料重悬后上流式细胞仪检测。以红/绿平均荧光强度比值表示线粒体膜电位水平。(2)mtROS平均荧光强度:取约(1~10) \times 10⁵个细胞,离心后弃上清,加入MitoSO Red染色工作液重悬细胞,使细胞密度为(1~10) \times 10⁶个/mL,于37 $^{\circ}$ C孵育15min,离心弃上清,用PBS洗涤2次后重悬,用流式细胞仪进行分析。使用510nm激发波长,580nm发射波长,检测样品的荧光强度。

比色法测定结肠组织线粒体ATP水平:取10~20mg结肠组织并研磨,将研磨液离心取上清制备成组织匀浆,置于沸水浴中煮10min后离心并提取上清液,按照试剂盒说明书操作,进行标准溶液及样品溶液的显色反应,使用酶标仪测定636nm波长下样品的吸光度值,计算样本ATP水平。

免疫组织化学法检测结肠组织SMC中HSP60、LONP1阳性表达:将石蜡切片脱蜡至水,加入柠檬

酸缓冲液煮沸以修复抗原,后放入3%过氧化氢溶液孵育以阻断内源性过氧化物酶,经PBS洗涤后用山羊血清封闭,分别滴加HSP60(1:500)、LONP1(1:400)一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。滴加二抗(1:200)于室温下孵育30min,随后加入DAB显色,经过苏木精复染、盐酸乙醇分化、氨水反蓝后用中性树胶封片。于光学显微镜下观察,苏木精染细胞核为蓝色,DAB阳性表达为棕黄色。使用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统计算SMC中HSP60、LONP1平均吸光度值。

1.6 统计学方法

采用SPSS26.0统计软件包进行数据统计分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较时,若数据符合正态检验、方差齐,采用单因素方差分析并选用LSD法进行事后检验;若不符合正态分布或方差不齐时,采用Kruskal-Wallis秩和检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组小鼠肠道传输功能比较

与空白组相比,模型组小鼠首粒蓝便排出时间显著延长($P<0.01$),6h内排便颗粒数明显减少($P<0.01$),粪便性状评分、含水率及小肠推进率明显降低($P<0.01$, $P<0.05$);电针治疗后,与模型组比较,电针组首粒蓝便排出时间显著缩短($P<0.01$),6h排便颗粒数显著增加($P<0.01$),粪便性状评分、粪便含水率及小肠推进率明显升高($P<0.01$, $P<0.05$)。见图1。

2.2 各组小鼠结肠组织病理形态比较

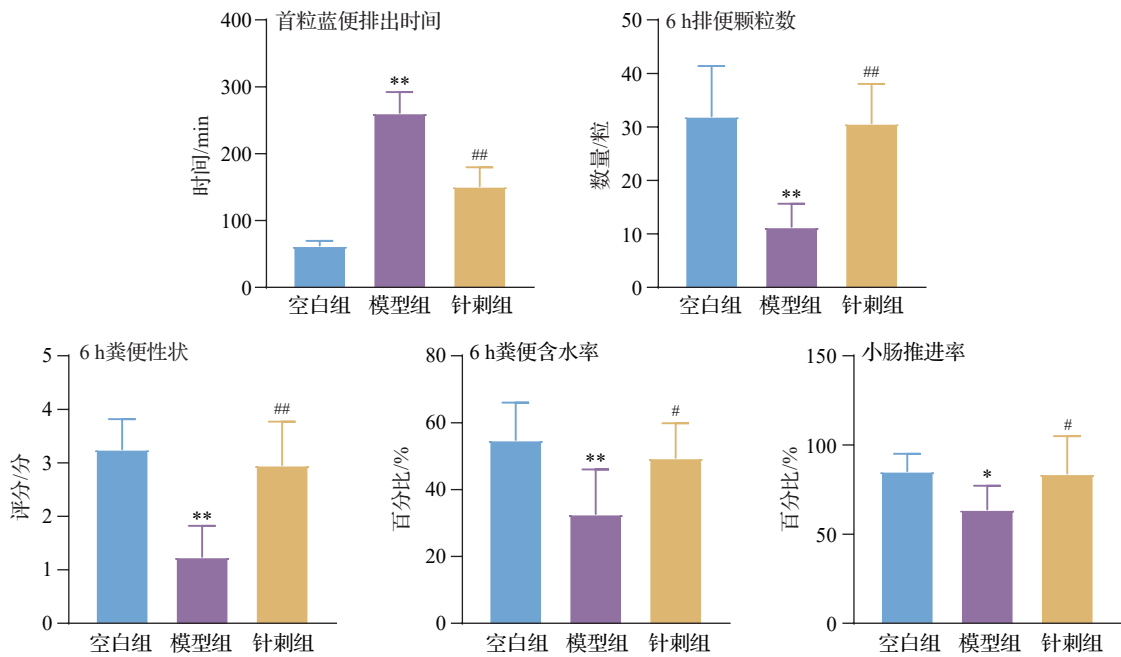
各组小鼠结肠组织均未见明显病理改变,可见黏膜层结构完整,上皮细胞排列紧密有序,腺体分布均匀丰富,黏膜下层、肌层及浆膜层结构清晰完整,提示各组小鼠结肠组织无器质性改变。见图2。

2.3 各组小鼠结肠SMC线粒体超微结构比较

空白组小鼠结肠SMC线粒体超微结构正常,无肿胀变形,嵴清晰;模型组线粒体明显肿胀,膜破损、嵴断裂严重,呈空泡变性;电针组线粒体轻度肿胀,少数出现变形或空泡,嵴间隙增宽,较模型组改善明显。见图3。

2.4 各组小鼠结肠组织线粒体膜电位水平、ATP含量比较

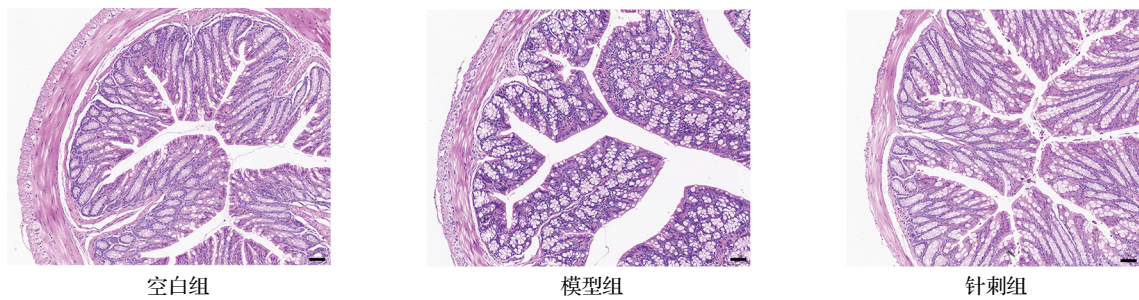
与空白组相比,模型组JC-1聚合物比例减少,线粒体膜电位显著下降($P<0.01$),ATP含量显著



注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠肠道传输功能比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

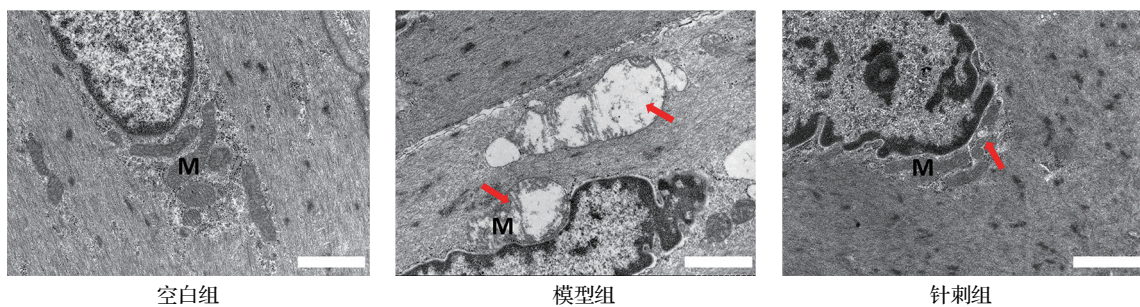
Fig. 1 Comparison of intestinal transport function of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)



注:标尺=50 μm 。

图2 各组小鼠结肠组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 2 Comparison of pathological morphology of colonic tissue of mice in the 3 groups (HE staining)



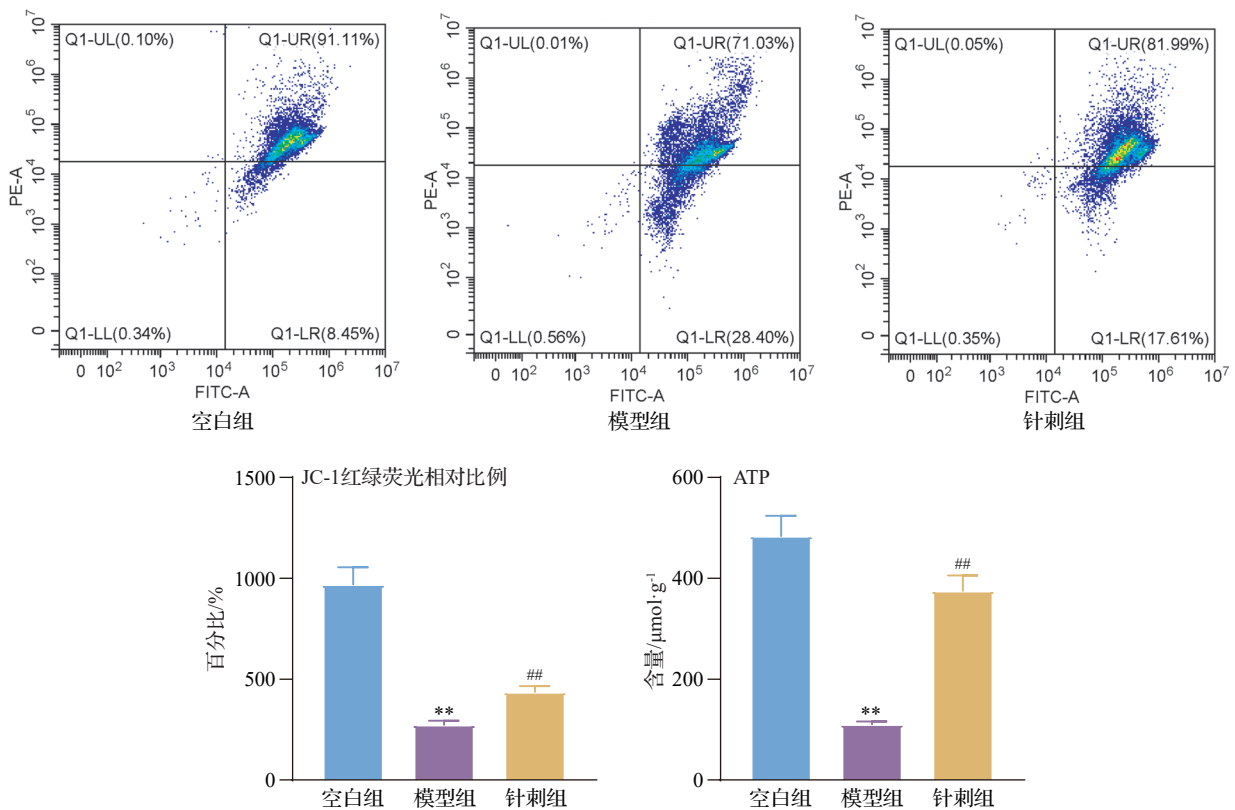
注:标尺=1 μm ;M示线粒体;红色箭头示线粒体肿胀、膜破损、嵴断裂。

图3 各组小鼠结肠平滑肌细胞线粒体超微结构比较(透射电子显微镜)

Fig. 3 Comparison of mitochondrial ultrastructure in colonic smooth muscle cells of mice in the 3 groups (transmission electron microscope)

降低($P < 0.01$);与模型组相比,电针组JC-1聚合物比例增加,膜电位升高($P < 0.01$),ATP水平显著升高($P < 0.01$)。见图4。

2.5 各组小鼠结肠组织mtROS平均荧光强度比较
与空白组相比,模型组小鼠结肠组织mtROS平均荧光强度增高($P < 0.01$);与模型组相比,电针组



注:ATP为三磷酸腺苷。与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。
图4 各组小鼠结肠组织线粒体膜电位水平、ATP含量比较($\bar{x}\pm s$,4-5只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of mitochondrial membrane potential levels and ATP content in colonic tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 4—5 mice/group)

mtROS 平均荧光强度显著降低 ($P<0.01$)。见图5。

2.6 各组小鼠结肠组织 HSP60、LONP1 阳性表达的比较

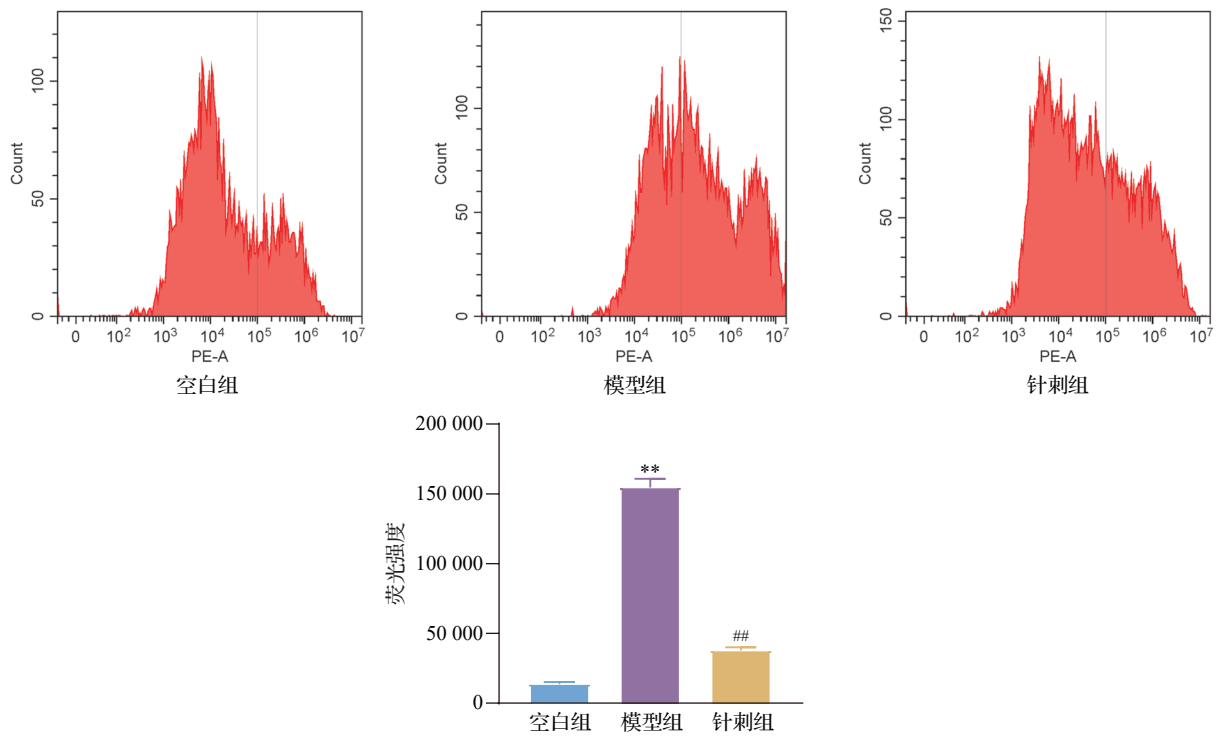
小鼠结肠组织内 HSP60、LONP1 蛋白阳性信号主要位于结肠 SMC, 表达呈棕褐色或棕黄色颗粒。与空白组相比, 模型组 SMC 中 HSP60、LONP1 蛋白阳性表达显著减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 电针组 SMC 中 HSP60、LONP1 蛋白阳性表达显著增多 ($P<0.05$)。见图6。

3 讨论

FC 属于中医学“脾约”“便秘”范畴。本病属阳明腑病, 基本病机为大肠传导失司, 并与饮食、情志、外邪等因素密切相关。《素问·阴阳应象大论》言“阳病行阴, 当从阴引阳, 其治在募”, 意指阳明腑病可通过胸腹部属阴之募穴进行治疗, 而天枢为大肠募穴;《灵枢·邪气藏府病形》云“合治内府”, 意为下合穴对腑病具有较好的治疗功效, 故大肠腑病可选用其下合穴上巨虚进行治疗; 此外,《灵枢·本输篇》

言“大肠、小肠皆属于胃”, 而天枢、上巨虚均同属足阳明胃经。故本研究选择“天枢”“上巨虚”两穴合募相配, 通降腑气、理肠通便, 以达治疗 FC 之效。本研究结果显示, 电针干预可以缩短 FC 小鼠首粒蓝便时间、增加 6 h 排便颗粒数、改善粪便性状评分、提高粪便含水率及小肠推进率, 表明电针可以有效增强 FC 小鼠胃肠传输功能, 缓解肠道动力障碍, 改善 FC 症状, 这与既往的研究^[16-17]一致。

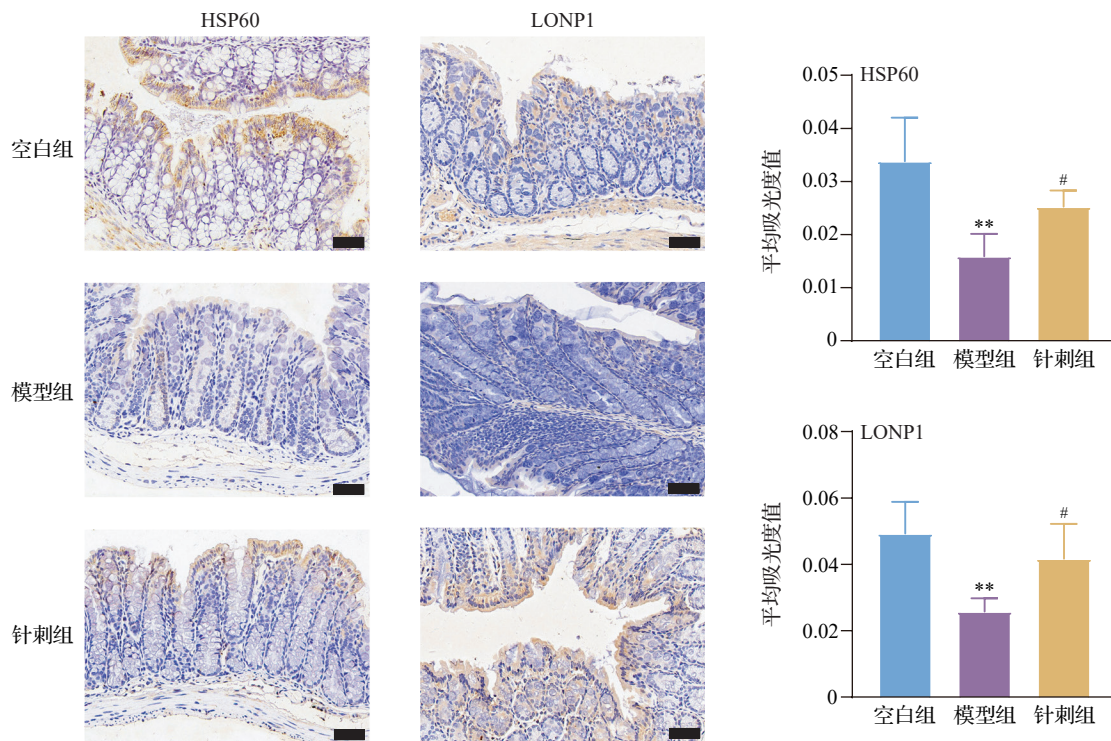
近年来, 多项研究已明确肠道动力障碍是 FC 的核心病理机制, 而进一步研究表明, 结肠 SMC 线粒体供能不足是导致此种肠道动力障碍的关键病理因素^[3,18-19]。SMC 作为结肠运动的最终效应器, 其正常的收缩和舒张功能是维持肠道动力的重要基础。其中, 线粒体作为细胞能量工厂, 为 SMC 舒缩活动提供必需的 ATP^[20]。因此, 线粒体功能障碍会导致 SMC 舒缩乏力, 进而引发肠道功能障碍, 最终促成 FC 的发生。研究证实, FC 发病过程中, 结肠线粒体出现数量减少、形态结构异常、能量代谢低下、呼吸功能障碍及 mtDNA 序列变异等多种形式的损伤^[21]。本研究结果显示, FC 小鼠结肠 SMC 线



注:mtROS为线粒体活性氧。前3个小图分别为各组 mtROS水平直方图。与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

图5 各组小鼠结肠组织 mtROS 平均荧光强度的比较 ($\bar{x} \pm s$, 5 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of the average fluorescence intensity of mtROS in colonic tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 5 mice/group)



注:HSP60为热休克蛋白60,LONP1为LON蛋白酶1。标尺=50 μm ,阳性表达为棕褐色或棕黄色。与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图6 各组小鼠结肠组织 HSP60、LONP1 阳性表达的比较 (免疫组织化学法, $\bar{x} \pm s$, 5 只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of HSP60 and LONP1 positive expressions in colonic tissue of mice in the 3 groups (immunohistochemistry, $\bar{x} \pm s$, 5 mice/group)

粒体超微结构破坏严重,呈明显肿胀、膜不完整、嵴断裂、空泡变性,线粒体膜电位降低,ATP水平下降,mtROS水平升高,进一步说明FC小鼠存在结肠线粒体形态受损及功能障碍。电针干预能减轻线粒体结构的损伤,且提高线粒体膜电位、ATP水平,并降低mtROS含量,进而改善FC症状。此外,本团队前期研究亦显示,针刺可有效修复FC小鼠结肠SMC的线粒体形态结构^[9]。因此,电针对FC的治疗作用可能与修复线粒体结构、改善线粒体功能有关。

UPR^{mt}是维持线粒体生理功能的关键机制之一,其通过保障线粒体蛋白的正确折叠和组装,确保线粒体稳态^[5]。当线粒体遭受应激损伤时,UPR^{mt}被激活并将损伤信号传递至细胞核,启动应激相关转录因子(如热休克因子1、活化转录因子5、C/EBP同源蛋白等)的表达,进而上调UPR^{mt}所需关键分子伴侣(如HSP60、HSP10、mtHSP70)和蛋白酶(如酪蛋白水解蛋白酶P、LONP1),以清除异常积累的的错误折叠蛋白及mtROS,从而维持或恢复线粒体功能^[22]。其中,HSP60是一类线粒体分子伴侣蛋白,属于热休克蛋白家族,主要协助新合成的线粒体蛋白质正确折叠和组装。当线粒体蛋白质错误折叠或损伤时,HSP60被激活以修复异常蛋白^[23]。LONP1是一种ATP依赖的线粒体蛋白酶,负责降解受损、氧化或错误折叠的线粒体蛋白质。作为UPR^{mt}的核心蛋白,LONP1直接分解不可修复的异常蛋白,减少毒性聚集物,同时通过降解特定调控蛋白如转录因子,激活UPR^{mt}信号通路,促进线粒体修复基因的表达^[4]。HSP60与LONP1协同作用,构成UPR^{mt}中蛋白质质量监控的核心防线。

在急性应激或疾病初期,UPR^{mt}可有效响应损伤并修复线粒体功能;但慢性持续性应激刺激则会导致UPR^{mt}代偿失效并失活,引发线粒体功能障碍和细胞损伤^[6]。因此,UPR^{mt}失活导致的线粒体功能障碍进而造成结肠SMC收缩乏力、肠道动力失调,可能是致使FC发生的重要病理环节之一。既往研究支持这一观点:FC大鼠的结肠SMC中,UPR^{mt}关键分子HSP60和LONP1的蛋白及mRNA表达显著异常,伴线粒体蛋白折叠和降解能力受损以及线粒体肿胀、功能失调^[24];此外,肠上皮特异性敲除HSP60可诱发线粒体功能障碍,包括线粒体呼吸能力减弱、膜电位丢失及ATP含量减少等,显著破坏细胞功能及肠稳态^[25]。本研究亦观察到,FC小鼠SMC中UPR^{mt}关键分子HSP60和LONP1的蛋白

表达阳性信号显著减弱,进一步明确FC存在UPR^{mt}功能失活及其介导的线粒体功能障碍。

研究表明,针刺已被证实可通过调节线粒体蛋白稳态来重塑线粒体功能,如王飞等^[26]观察到,针刺能够清除帕金森病模型小鼠脑黑质中 α -突触核蛋白的异常聚集并改善线粒体结构和功能障碍;余致韵等^[27]研究显示,电针可通过上调抑郁症小鼠HSP60等线粒体标志蛋白,修复损伤线粒体,改善小鼠海马神经元功能;吴阳阳等^[28]观察到针刺能够激活溃疡性结肠炎大鼠结肠内质网未折叠蛋白反应/PKR样内质网激酶/真核翻译起始因子2 α 信号通路以减轻炎症反应。本研究聚焦于电针对FC小鼠SMC中UPR^{mt}的影响,结果与以往研究一致,即电针干预后HSP60和LONP1阳性信号增强,表明电针能有效激活UPR^{mt},改善线粒体功能,与其促进FC小鼠肠道传输功能恢复的效应相符。

综上所述,电针“天枢”“上巨虚”能有效促进FC小鼠肠道传输功能,修复结肠SMC线粒体结构和功能,从而改善FC症状,其机制可能与上调SMC中HSP60和LONP1的表达,进而激活UPR^{mt}相关。但本研究未阻断UPR^{mt}信号,缺乏对UPR^{mt}信号与针刺效应变化的因果关系的探讨。此外,未来研究还可进一步探讨电针对FC小鼠其他UPR^{mt}相关分子及通路的调节作用。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Barberio B, Judge C, Savarino E V, et al. Global prevalence of functional constipation according to the Rome criteria: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2021, 6(8): 638-648.
- [2] Black C J, Drossman D A, Talley N J, et al. Functional gastrointestinal disorders: advances in understanding and management[J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1664-1674.
- [3] Hao W S, Cha R T, Wang M Z, et al. Ligand-modified gold nanoparticles as mitochondrial modulators: regulation of intestinal barrier and therapy for constipation[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(14): 13377-13392.
- [4] Reymond Sutandy F X, Gößner I, Tascher G, et al. A cytosolic surveillance mechanism activates the mitochondrial UPR[J]. *Nature*, 2023, 618(7966): 849-854.
- [5] Uoselis L, Lindblom R, Lam W K, et al. Temporal landscape of mitochondrial proteostasis governed by the UPR (mt)[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(38): eadh8228.
- [6] Lu H D, Wang X L, Li M, et al. Mitochondrial unfolded protein response and integrated stress response as promising therapeutic targets for mitochondrial diseases[J]. *Cells*, 2023, 12(1): 20.
- [7] Liu B Y, Wu J N, Yan S Y, et al. Electroacupuncture vs

- prucalopride for severe chronic constipation: a multicenter, randomized, controlled, noninferiority trial [J]. *Am J Gastroenterol*, 2021, 116(5): 1024-1035.
- [8] Zheng H, Liu Z S, Zhang W, et al. Acupuncture for patients with chronic functional constipation: a randomized controlled trial[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2018, 30(7): e13307.
- [9] 张微. 针刺俞募穴改善FC小鼠胃肠传输功能的GDNF-PI₃K-AKT信号转导机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- Zhang W. Research on GDNF-PI3K-AKT signal pathway in FC mice with acupuncture back-Shu and front-mu points improving gastrointestinal transmitting function (in Chinese) [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2016.
- [10] Yao J P, Yan X Y, Li Y Q, et al. Altered gut microbial profile is associated with differentially expressed fecal microRNAs in patients with functional constipation[J]. *Front Microbiol*, 2024, 14: 1323877.
- [11] Wang L, Xi M H, Cao W, et al. Electroacupuncture alleviates functional constipation by upregulating host-derived miR-205-5p to modulate gut microbiota and tryptophan metabolism[J]. *Front Microbiol*, 2025, 16: 1517018.
- [12] Zhang Q, Zhong D, Sun R, et al. Prevention of loperamide induced constipation in mice by KGM and the mechanisms of different gastrointestinal tract microbiota regulation [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 256: 117418.
- [13] Yan X Y, Ma P T, Wang W, et al. Piezo knockdown reduces 5-hydroxytryptamine release from enterochromaffin cells and exacerbates intestinal dyskinesia in mice with functional constipation[J]. *Int J Mol Med*, 2025, 56(5): 1-17.
- [14] 余曙光, 徐斌. 实验针灸学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 269-277.
- Yu S G, Xu B. Experimental acupuncture (in Chinese) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012: 269-277.
- [15] Lewis S J, Heaton K W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1997, 32(9): 920-924.
- [16] 王路, 席梦含, 张微, 等. 基于机械敏感离子通道探讨电针改善功能性便秘小鼠胃肠动力的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(11): 5237-5243.
- Wang L, Xi M H, Zhang W, et al. Mechanism research of electroacupuncture improving gastrointestinal motility in functional constipation mice based on mechanosensitive ion channels (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2023, 38(11): 5237-5243.
- [17] 席梦含, 王路, 张微, 等. 电针对功能性便秘小鼠肠道神经元自噬水平的影响[J]. *中国针灸*, 2023, 43(11): 1279-1286.
- Xi M H, Wang L, Zhang W, et al. Effect of electroacupuncture on enteric neuronal autophagy in functional constipation mice (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2023, 43(11): 1279-1286.
- [18] Bhardwaj J, Wan D Q, Koenig M K, et al. Impaired gastric emptying and small bowel transit in children with mitochondrial disorders [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012, 55(2): 194-199.
- [19] Finsterer J, Frank M. Gastrointestinal manifestations of mitochondrial disorders: a systematic review [J]. *Ther Adv Gastroenterol*, 2017, 10(1): 142-154.
- [20] Martin-Cano F E, Camello-Almaraz C, Acuña-Castroviejo D, et al. Age-related changes in mitochondrial function of mouse colonic smooth muscle: beneficial effects of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2014, 56(2): 163-174.
- [21] Camilleri M, Carlson P, Zinsmeister A R, et al. Mitochondrial DNA and gastrointestinal motor and sensory functions in health and functional gastrointestinal disorders[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(3): G510-G516.
- [22] Inigo J R, Chandra D. The mitochondrial unfolded protein response (UPR^m): shielding against toxicity to mitochondria in cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 98.
- [23] Katiyar A, Fujimoto M, Tan K, et al. HSF1 is required for induction of mitochondrial chaperones during the mitochondrial unfolded protein response [J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(6): 1135-1148.
- [24] 梁星琛, 白璐璐, 周永学, 等. 基于“脑-肠轴”线粒体未折叠蛋白反应研究济川煎对慢传输型便秘的作用机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(1): 75-82.
- Liang X C, Bai L L, Zhou Y X, et al. Mechanism of jichuanjian for treatment of slow transit constipation based on brain-gut axis mitochondrial unfolded protein reaction (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2022, 42(1): 75-82.
- [25] Berger E, Rath E, Yuan D T, et al. Mitochondrial function controls intestinal epithelial stemness and proliferation[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13171.
- [26] 王飞, 李亚楠, 张小蕾, 等. 电针调节PI3K/AKT/mTOR信号通路激活帕金森大鼠脑组织自噬改善行为学反应机制[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2023, 41(6): 709-715.
- Wang F, Li Y N, Zhang X L, et al. Electroacupuncture activates autophagy and improves behavioral responses mechanism in Parkinson's rats brain by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Clinical Anatomy*, 2023, 41(6): 709-715.
- [27] 余致韵, 杨文森, 许明敏, 等. 电针对抑郁模型小鼠海马神经元线粒体自噬的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2025, 48(9): 1310-1323.
- Yu Z Y, Yang W M, Xu M M, et al. Effects of electroacupuncture on mitophagy in hippocampal neurons of mouse depression model (in Chinese) [J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2025, 48(9): 1310-1323.
- [28] 吴阳阳, 刘明江, 殷韶杰, 等. 针刺对溃疡性结肠炎大鼠氧化应激和内质网应激的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(1): 8-14.
- Wu Y Y, Liu M J, Yin S J, et al. Acupuncture reduce colonic inflammation by suppressing oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in rats with ulcerative colitis (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2020, 45(1): 8-14.