

基于 LiP-MS 探讨芍药苷减轻肠嗜铬细胞敏化的机制研究*

李红燕^{1#} 唐大东¹ 闻永¹ 占煜^{2&}

成都中医药大学附属医院肛肠科¹(610075) 成都市中西医结合医院肛肠科²(610041)

背景: 中药白芍的缓急止痛功效显著,临床常应用于肠易激综合征的治疗方剂中,可改善内脏高敏感状态。目的:探讨芍药苷对肠嗜铬细胞敏化的作用及其机制。**方法:**采用 BON-1 细胞株模拟肠嗜铬细胞,以异戊酸(ISV)构建 BON-1 细胞敏化模型。通过浓度梯度实验确定 ISV 与芍药苷的量效关系。以蛋白质印迹法检测色氨酸羟化酶 1 (TPH1)表达,ELISA 法检测 5-羟色胺(5-HT)水平,CCK-8 法检测细胞活性。采用限制性蛋白酶解-质谱联用(LiP-MS)筛选芍药苷的潜在结合靶点,并通过分子对接、表面等离子体共振(SPR)和蛋白质印迹法验证芍药苷与目标蛋白的亲合力及其调控作用。**结果:**诱导 BON-1 细胞敏化的最佳 ISV 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$,芍药苷(100~1 600 $\mu\text{mol/L}$)可剂量依赖性地降低敏化 BON-1 细胞中的 TPH1 表达和 5-HT 水平。LiP-MS 共筛选出 7 个潜在结合靶点,分别为溶质载体家族 25 成员 5 (SLC25A5)、二氢硫辛酰胺脱氢酶(DLD)、20S 蛋白酶体 $\beta 4$ 亚基(PSMB4)、X 连锁核糖体蛋白 S4 (RPS4X)、角蛋白 9(KRT9)、真核翻译起始因子 5A(EIF5A)、微管蛋白 α -1c 链(TUBA1C)。分子对接显示,SLC25A5、PSMB4 与芍药苷的结合活性最好,结合能分别为 -9.2、-10.1 kcal/mol;SPR 显示两者的亲和常数(K_D)分别为 20.2、13.7 $\mu\text{mol/L}$ 。蛋白质印迹法结果证实芍药苷可剂量依赖性地上调敏化 BON-1 细胞中的 SLC25A5、PSMB4 蛋白表达水平。**结论:**芍药苷可通过调控 SLC25A5、PSMB4 表达,减轻 ISV 诱导的 BON-1 细胞敏化。

关键词 芍药苷; 肠易激综合征; 内脏高敏感; 肠嗜铬细胞

Study on Mechanism of Paeoniflorin in Alleviating Sensitization of Enterochromaffin Cells Based on LiP-MS LI Hongyan¹, TANG Dadong¹, WEN Yong¹, ZHAN Yu². ¹Department of Anorectal Surgery, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu (610075); ²Department of Anorectal Surgery, Chengdu Integrated TCM & Western Medicine Hospital, Chengdu (610041)

Correspondence to: ZHAN Yu, Email: 277546066@qq.com

Background: *Radix Paeoniae Alba*, a traditional Chinese medicine, exerts a remarkable effect on relieving spasm and alleviating pain. It is frequently prescribed in formulas for treating irritable bowel syndrome by ameliorating visceral hypersensitivity. **Aims:** To explore the effect and its underlying mechanism of paeoniflorin on enterochromaffin cell sensitization. **Methods:** BON-1 cell line was used as an *in vitro* model of enterochromaffin cells, and isovaleric acid (ISV) was applied to establish the cell sensitization model. Dose-response relationships of ISV and paeoniflorin were determined through concentration gradient experiments. The expression of tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) was detected by Western blotting, the level of 5-hydroxytryptamine (5-HT) by ELISA, and cell viability by CCK-8 assay. Limited proteolysis-mass spectrometry (LiP-MS) was used to screen potential binding targets of paeoniflorin. Molecular docking, surface plasmon resonance (SPR) and Western blotting were further performed to verify the binding affinity of paeoniflorin to target proteins and its regulatory effects. **Results:** The optimal concentration of ISV for inducing BON-1 cell sensitization was 25 $\mu\text{mol/L}$. Paeoniflorin at concentrations ranging from 100 to 1 600 $\mu\text{mol/L}$ reduced TPH1 expression and 5-HT level in sensitized BON-1 cells in a dose-dependent manner. A total of seven potential binding targets were identified by LiP-MS, including solute carrier family 25 member 5 (SLC25A5), dihydrolipoyl dehydrogenase (DLD), proteasome 20S subunit beta 4 (PSMB4), ribosomal protein S4 X-linked (RPS4X), keratin 9 (KRT9), eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF5A),

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2025.09.003

*基金项目:四川省中医药管理局科学技术研究专项课题(2024MS183);成都市卫生健康委员会-成都中医药大学 2024 年度委校联合科技创新基金(WXLH202406007)

#Email: lihongyan.de@163.com

&本文通信作者,Email: 277546066@qq.com

and tubulin alpha-1C chain (TUBA1C). Molecular docking results revealed that SLC25A5 and PSMB4 exhibited the strongest binding activity with paeoniflorin, with binding energies of -9.2 kcal/mol and -10.1 kcal/mol, respectively. SPR assay showed that their affinity constant (K_D) values were 20.2 μ mol/L and 13.7 μ mol/L, respectively. Western blotting confirmed that paeoniflorin upregulated the protein expressions of SLC25A5 and PSMB4 in sensitized BON-1 cells in a dose-dependent manner. **Conclusions:** Paeoniflorin alleviates ISV-induced BON-1 cell sensitization by regulating the expressions of SLC25A5 and PSMB4.

Key words Paeoniflorin; Irritable Bowel Syndrome; Visceral Hypersensitivity; Enterochromaffin Cells

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的功能性肠病,属于肠-脑互动异常范畴,临床表现为反复发作的腹痛,且腹痛与排便相关或伴随排便习惯改变。根据排便习惯异常的类型,IBS可分为4个亚型:腹泻型(diarrhea-predominant IBS, IBS-D)、便秘型(constipation-predominant IBS, IBS-C)、混合型和不定型^[1]。我国IBS总体患病率为1.4%~11.5%,好发于30~59岁人群,女性患病率略高于男性^[2]。IBS是一种具有复杂病理生理机制的多因素疾病,遗传易感性、肠道感染、食物不耐受、慢性应激等诱因共同导致胃肠动力紊乱、内脏高敏感、肠道通透性增加等病理改变^[3]。大部分IBS患者需接受药物治疗,临床通常依据症状和亚型采用解痉剂、止泻剂/泻剂、微生态制剂等。然而,现有药物多为对症治疗或仅针对单一靶点,难以全面改善IBS多维度症状^[2]。腹痛、腹胀、腹部不适是IBS核心症状群,亦是患者就医的主要原因,但目前临床的重视程度和有效干预仍不足。

本课题组在临床以痛泻要方、四逆散等作为基础方剂进行加减,治疗IBS具有较好的疗效,对腹部症状改善效果显著。上述方剂均包含白芍,其味苦、酸,性微寒,具有养血、柔肝、缓急止痛等功效,为历代治疗疼痛的要药。《本草纲目》言之:“止下痢腹痛后重”,《本草备要》谓其“补血,泻肝,益脾,敛肝阴,治血虚之腹痛”。在白芍的入血活性成分白芍总苷中,芍药苷(paeoniflorin, PAE)占比达90%,具有良好的抗炎、解痉、镇痛、免疫调节等作用。近年研究发现,肠嗜铬细胞(enterochromaffin cell, EC细胞)介导了机械-化学信号转导以及内脏敏感性,可能是内脏高敏感的关键靶细胞^[4]。本研究通过采用限制性蛋白酶解-质谱联用(limited proteolysis-mass spectrometry, LiP-MS)和表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR),同时联合细胞实验、分子对接等方法,旨在探讨PAE改善IBS内脏高敏感的作用及其机制。

材料与方法

一、细胞和主要试剂

人胰腺神经内分泌瘤细胞BON-1购自青旗(上海)生物科技发展有限公司,用于模拟EC细胞。异戊酸(isovaleric acid, ISV)购自上海易恩化学技术有限公司(纯度99%),PAE(纯度 $\geq 98\%$)购自北京索莱宝科技有限公司,色氨酸羟化酶1(tryptophan hydroxylase 1, TPH1)、溶质载体家族25成员5(solute carrier family 25 member 5, SLC25A5)、20S蛋白酶体 $\beta 4$ 亚基(proteasome 20S subunit beta 4, PSMB4)抗体购自爱博泰克生物科技有限公司, β -actin抗体购自上海强耀生物科技有限公司,人5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)ELISA试剂盒购自武汉贝茵莱生物科技有限公司,增强型CCK-8试剂盒购自北京兰杰柯科技有限公司。

二、研究方法

1. BON-1细胞敏化模型的构建和PAE干预:取对数生长期BON-1细胞,胰酶消化制备单细胞悬液,调整细胞密度为 5×10^5 /孔,接种于12孔板,置于 37°C 、5% CO_2 环境下培养。

参考Bayrer等^[4]的方法,采用ISV诱导BON-1细胞敏化,ISV浓度梯度(0~800 μ mol/L)处理24、48 h,采用CCK-8法筛选安全浓度范围;再通过ISV浓度梯度(0~200 μ mol/L)处理48 h,结合表型检测,确定ISV诱导BON-1细胞敏化的量效关系,并明确最佳造模浓度。

采用DMSO溶解PAE配制储备液,浓度梯度为0~1 600 μ mol/L,孵育24、48 h,采用CCK-8法筛选出安全剂量范围;再通过PAE浓度梯度(0~1 600 μ mol/L)处理48 h,结合表型检测,筛选出PAE改善敏化BON-1细胞的量效关系。

2. 表型检测

①蛋白质印迹法检测TPH1蛋白表达水平:主

要实验流程包括蛋白提取→蛋白溶液变性→制胶→灌胶→上样和电泳→转膜→封闭→一抗孵育→二抗孵育→显影和发光检测。TPH1 抗体稀释浓度为 1:1 000, 内参 β -actin 抗体稀释浓度为 1:10 000。

②ELISA 法检测 5-HT 水平: 收集细胞上清液, 离心后取上清液, BCA 法检测蛋白浓度; 严格按照 ELISA 试剂盒步骤, 经标准品稀释、加样、加酶、孵育、配液、洗涤、显色、终止等步骤, 最终于 450 nm 波长处测量各孔吸光度值。

3. CCK-8 法检测细胞活性: BON-1 细胞经消化后制成单细胞悬液, 以每孔 3 000 个细胞、100 μ L 的密度接种于 96 孔板。每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 轻轻摇动以避免产生气泡, 培养箱培养 4 h。酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值。检测 ISV、PAE 处理 24、48 h 的 BON-1 细胞增殖活性。

4. LiP-MS 方法: 主要实验步骤为蛋白提取→药物孵育→限制性酶解→肽段制备→DIA 质谱检测→生物信息学分析。

①蛋白提取和酶解: 收集经 PAE 处理的 BON-1 细胞, 加入预冷的 1×PBS 进行匀浆, BCA 法进行蛋白定量。以 PAE 处理样本后, 采用蛋白酶 K 进行预处理, 取 15 μ g 蛋白行 SDS-PAGE 电泳。向其余样本中加入 UA/DOC 裂解液, 加入 DTT 调节至终浓度为 20 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 反应 2 h, 室温冷却备用。加入适量 IAA 至终浓度为 25 mmol/L, 600 r/min 振荡 1 min, 避光室温孵育 30 min, 完成半胱氨酸烷基化。加入适量 50 mmol/L NH_4HCO_3 缓冲液稀释样本, 使 UA 终浓度低于 1.5 mol/L。随后向稀释后的样品中加入 2 μ g 胰蛋白酶, 37 $^{\circ}$ C 酶解 16 h。酶解产物进行脱盐、冻干处理, 最后采用 0.1% 甲酸溶液复溶。采用紫外分光光度法于 280 nm 波长处检测吸光度值, 测定肽段浓度。取 2 μ g 肽段溶液, 掺入适量 iRT 标准肽段, 进行 DIA 质谱检测。

②质谱方法: DIA 分析采用纳升流速 Vanquish Neo UHPLC 系统 (Thermo Fisher Scientific Inc.) 进行色谱分离, 分离后的样品采用 Astral 高分辨质谱仪进行 DIA 质谱分析。质谱检测参数: 正离子检测模式, 母离子扫描范围为 380~980 m/z , 一级质谱分辨率为 240 000 (FWHM at m/z 200), 标准化自动增益控制目标值为 500%, 最大离子注入时间为 5 ms。二级质谱采用 DIA 数据采集模式, 设置 299 个扫描窗口, 离子隔离窗口为 2 m/z , 高能碰撞解离能量为 25 eV, 标准化自动增益控制目标值为 500%, 最大离

子注入时间为 3 ms。DIA 原始数据采用 Spectronaut 软件进行处理, 过滤参数设定为 $Q < 0.01$ (相当于错误发现率 $< 1\%$)。基于蛋白和肽段定性和定量结果, 进一步完成蛋白鉴定数目统计、肽段丰度差异分析、功能富集与信号通路分析、特征序列分析。

5. 分子对接: 使用分子对接预测 PAE 与候选靶点之间的结合活性。配体三维结构以 SDF 文件格式从 PubChem 数据库下载, 靶蛋白的三维结构主要从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取。筛选条件: ①来源物种为智人 (*Homo sapiens*)。②采用 X 线晶体衍射法解析。③分辨率为 1~2.5 $\text{\AA}$ 的蛋白质晶体。④优先选择含有独特配体 (即有抑制剂或复合物) 的共晶结构。⑤优先选择版本最新的结构。此外, 以 AlphaFold 蛋白结构数据库 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) 作为补充来源。收集蛋白质受体和配体的结构, 使用在线平台 CB-Dock2 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php>) 进行分子对接计算和可视化展示^[5]。结合能 < -6 kcal/mol 判定为具有结合活性。

6. SPR 检测 PAE 与目标蛋白的亲合性: SPR 传感器通过测量芯片表面折射率变化来确定分子之间是否存在相互作用, 具有实时、无标记等优点。SPR 的主要实验步骤: ①配制缓冲液 (激活、封闭、固定、配体、分析物)。②芯片准备: 将 400 mmol/L EDC 与 100 mmol/L NHS 混合后制备成激活剂。以 10 μ L/min 的流速将该激活缓冲液注入 CM5 传感器芯片, 持续激活 420 s。③配体固载: 将目标蛋白 SLC25A5、PSMB4 使用固定缓冲液稀释至 50 μ g/mL, 然后以 10 μ L/min 的流速注入样本通道 (Fc2), 记录固载水平为 17 700 RU。参考通道 (Fc1) 不进行配体固载, 作为空白对照。以 10 μ L/min 的流速注入 1 mol/L 乙醇胺盐酸盐溶液, 持续 420 s, 封闭并去活化芯片。④多循环动力学方法下分析物的运行: 以分析物缓冲液将 PAE 稀释至 7 个浓度 (分别为 200、100、50、25、12.5、6.25、0 μ mol/L) 或 5 个浓度 (分别为 50、25、12.5、6.25、3.125 μ mol/L)。以 30 μ L/min 的流速, 将各浓度 PAE 依次注入 Fc1 和 Fc2 通道, 结合时间为 120 s, 解离时间为 200 s。整个结合和解离过程均在分析物缓冲液中进行。按浓度从高到低的顺序, 重复进样 7 次。根据运行结果, 进行动力学拟合, 获得 PAE 与靶蛋白相互作用的亲和常数 (K_D)。

三、统计学分析

采用 SPSS 28.0 统计学软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表

示,满足正态分布和方差齐性的多组间比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用LSD法;方差不齐者采用Dunnett's T3检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。部分结果采用GraphPad Prism 10.0绘制图形。

结 果

一、ISV 和 PAE 对 BON-1 细胞活性的影响

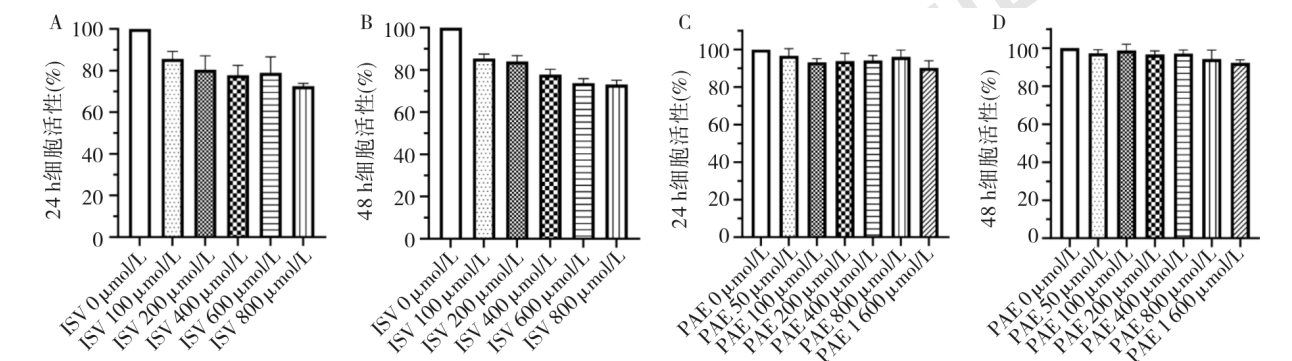
CCK-8法结果显示,ISV $\leq 200\ \mu\text{mol/L}$ 时,24、48 h细胞存活率 $>80\%$;浓度达 $400\ \mu\text{mol/L}$ 时,存活率降至 $70\%\sim 80\%$ (图1A、1B),提示存在潜在细胞毒性风险。相对而言,PAE为 $0\sim 1\ 600\ \mu\text{mol/L}$ 时,对BON-1细胞的毒性较小,24、48 h细胞存活率均 $>90\%$ (图

1C、1D)。

二、PAE 改善 ISV 诱导的 BON-1 细胞敏化

细胞表型实验结果显示,BON-1细胞分泌5-HT的基线水平为 $(137.7\pm 2.8)\ \text{ng/mL}$;采用 $25\ \mu\text{mol/L}$ ISV处理BON-1细胞48 h后,5-HT水平升至 $(170.4\pm 9.1)\ \text{ng/mL}$ ($P<0.000\ 1$);ISV $>25\ \mu\text{mol/L}$ 时,5-HT水平呈浓度依赖性下降($P<0.05$),可能与细胞活性降低相关。故确定 $25\ \mu\text{mol/L}$ 为ISV诱导BON-1细胞敏化的最佳浓度(图2A)。

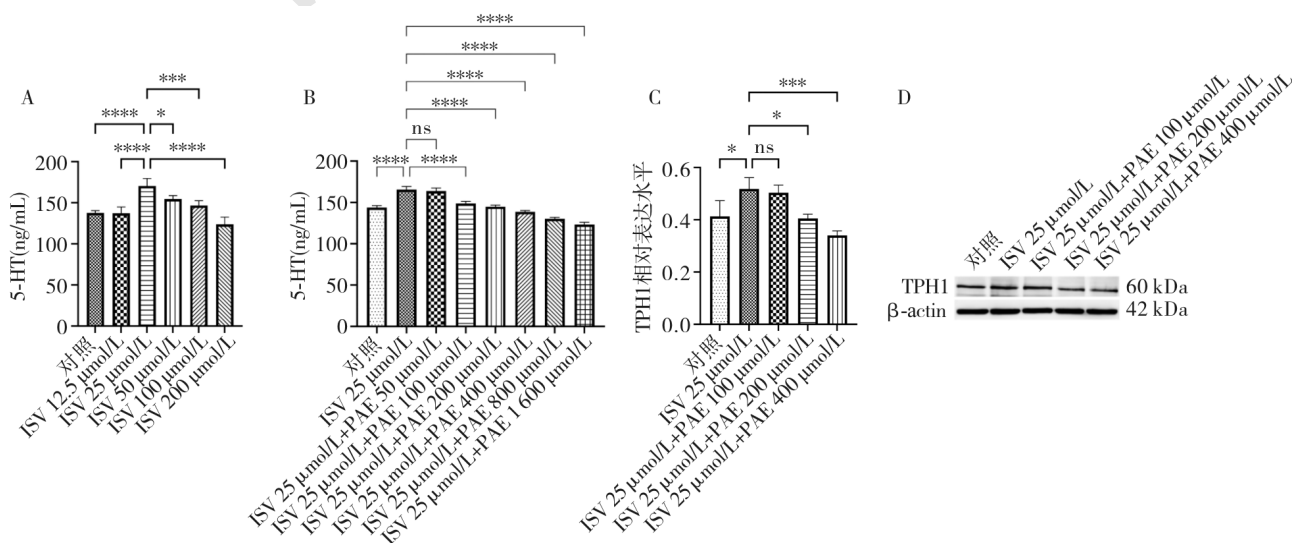
以 $25\ \mu\text{mol/L}$ ISV诱导BON-1细胞敏化后,再给予 $0\sim 1\ 600\ \mu\text{mol/L}$ PAE处理48 h,PAE呈浓度依赖性降低5-HT水平(图2B),同时显著下调TPH1蛋白表达水平(图2C、2D)。上述结果提示PAE可有效改善ISV诱导的BON-1细胞敏化表型。



注:ISV为异戊酸;PAE为芍药苷

A:ISV处理24 h;B:ISV处理48 h;C:PAE处理24 h;D:PAE处理48 h

图1 不同浓度ISV和PAE对BON-1细胞活性的影响(CCK-8法)



注:5-HT为5-羟色胺;ISV为异戊酸;PAE为芍药苷;TPH1为色氨酸羟化酶1

A:不同浓度ISV对5-HT分泌的影响;B:不同浓度PAE改善ISV诱导的敏化BON-1细胞的5-HT分泌;C-D:不同浓度PAE改善ISV诱导的敏化BON-1细胞的TPH1蛋白表达;两组间比较, $^{\#}P>0.05$, $^*P<0.05$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.000\ 1$

图2 PAE对ISV诱导的BON-1细胞敏化的改善作用

三、敏化BON-1细胞的结合靶点

根据细胞表型实验结果,选取200、800 $\mu\text{mol/L}$ PAE作为低、高剂量干预敏化BON-1细胞,行LiP-MS分析。以显著性差异肽段表达倍数 >1.5 倍或 <0.67 倍且 $P<0.05$ 为筛选标准,结果显示低、高剂量组上调肽段分别为2 989、6 471个,下调肽段分别为2 917、6 292个(图3),对应蛋白分别为1 679个和2 546个。

基于LiP-MS寻找小分子结合靶点的原理,如同时检测到某序列较长肽段的丰度升高,且其对应的较短肽段的丰度下降,说明该序列可能由于药物的结合而被封闭了序列上的酶切位点,则该(特征)序列可能为靶点序列。结果显示低、高剂量组分别筛选到39、20个蛋白可能是PAE的结合靶点(表1),两组交集得到7个候选靶点,分别为SLC25A5、二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoyl dehydrogenase, DLD)、PSMB4、X连锁核糖体蛋白S4(ribosomal protein S4 X-linked, RPS4X)、角蛋白9(keratin 9, KRT9)、真核翻译起始因子5A(eukaryotic trans-

lation initiation factor 5A, EIF5A)和微管蛋白 α -1C链(tubulin α -1C chain, TUBA1C;图4)。

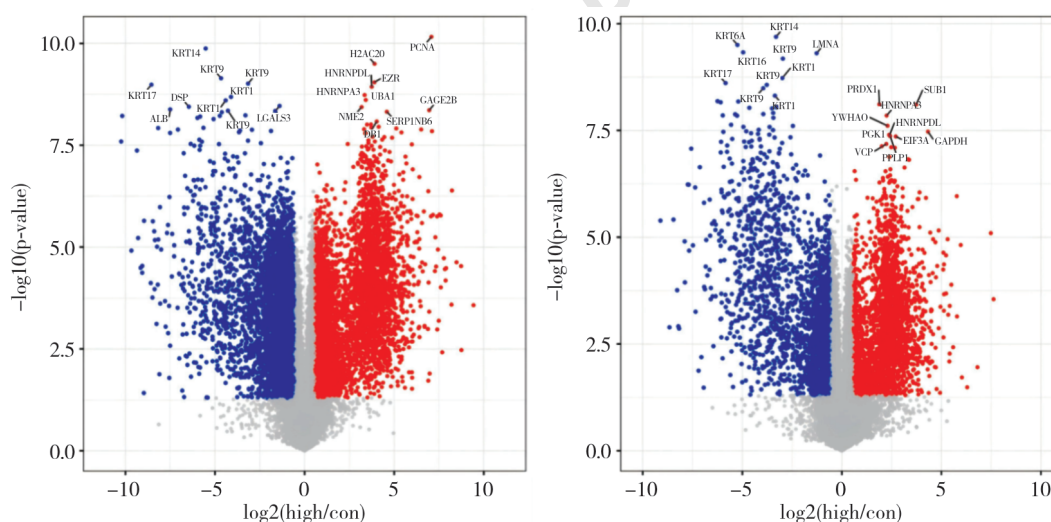
四、PAE与潜在结合靶点的亲和力

将PAE与上述筛选出的7个潜在结合靶点进行分子对接,结果显示均存在结合活性(结合能 <-6 kcal/mol),其中PSMB4与PAE的结合活性最好(结合能为 -10.1 kcal/mol),其次为SLC25A5(结合能为 -9.2 kcal/mol;图5)。

根据上述分子对接结果,进一步选取SLC25A5、PSMB4分别与PAE进行SPR验证,结果显示SLC25A5与PAE的 K_D 为20.2 $\mu\text{mol/L}$,PSMB4与PAE的 K_D 为13.7 $\mu\text{mol/L}$,说明PAE可能与SLC25A5、PSMB4有较强的结合能力(图6)。

五、PAE调控SLC25A5、PSMB4表达改善BON-1细胞敏化

根据LiP-MS、分子对接、SPR验证结果,采用25 $\mu\text{mol/L}$ ISV诱导BON-1细胞敏化,SLC25A5和PSMB4蛋白表达水平显著降低(P 均 <0.0001);再以低、中、高剂量(100、200、400 $\mu\text{mol/L}$)PAE处理,可



注:PAE为芍药苷;蓝色为显著下调的肽段;红色为显著上调的肽段;灰色为无差异肽段;对上、下调肽段对应的前10位差异最显著的蛋白进行标注

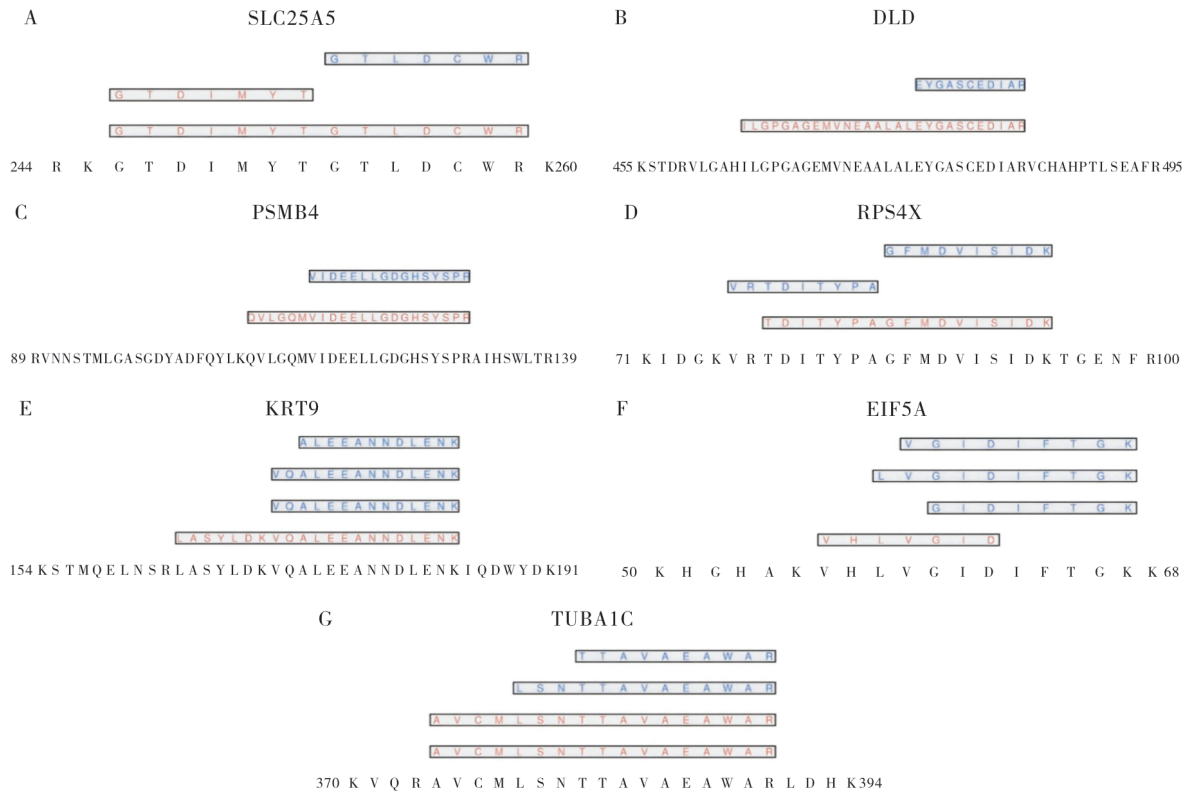
A:高剂量PAE/对照;B:低剂量PAE/对照

图3 PAE干预后差异肽段火山图

表1 PAE结合靶点的基因

高剂量组	低剂量组	高剂量组∩低剂量组
EIF3G, EIF3J, HPRT1, TFRC, KRT1, RPN2, SLC25A5, ENO1, NPM1, ZNF207, SNX3, SLC25A5, SLC3A2, VIM, DLD, SLC25A5, DLD, PSMB4, ANXA5, DLD, HNRNP33, EZR, UQCRC2, AHCY, ATP5F1A, PSMB4, CALR, PSMB4, EEF1D, PRDX6, DNAJA1, RPS4X, KRT9, EIF5A, PSMB5, TSPO, STIP1, KRT9, PSMC4, RPS9, RPS5, PSMB3, CCT4, KRT9, PPP1CC, RPS4X, RAN, RPL10A, EIF5A, TUBA1C, RARS1, RPL37A, RPS4X, RPS24, EIF5A, H3C1, PPA1, ADRM1, PSMD6, PDIA6, TUBA1C, ALYREF, TUBA1C, MYOF, SEPTIN9, EIF3L		

注:PAE为芍药苷;SLC25A5为溶质载体家族25成员5;DLD为二氢硫辛酰胺脱氢酶;PSMB4为20S蛋白酶体 β 4亚基;RPS4X为X连锁核糖体蛋白S4;KRT9为角蛋白9;EIF5A为真核翻译起始因子5A;TUBA1C为微管蛋白 α -1c链



注:SLC25A5 为溶质载体家族 25 成员 5;DLD 为二氢硫辛酰胺脱氢酶;PSMB4 为 20S 蛋白酶体 $\beta 4$ 亚基;RPS4X 为 X 连锁核糖体蛋白 S4;KRT9 为角蛋白 9;EIF5A 为真核翻译起始因子 5A;TUBA1C 为微管蛋白 α -1c 链

A:SLC25A5;B:DLD;C:PSMB4;D:RPS4X;E:KRT9;F:EIF5A;G:TUBA1C

图 4 交叉的特征序列/肽段分布及其对应蛋白

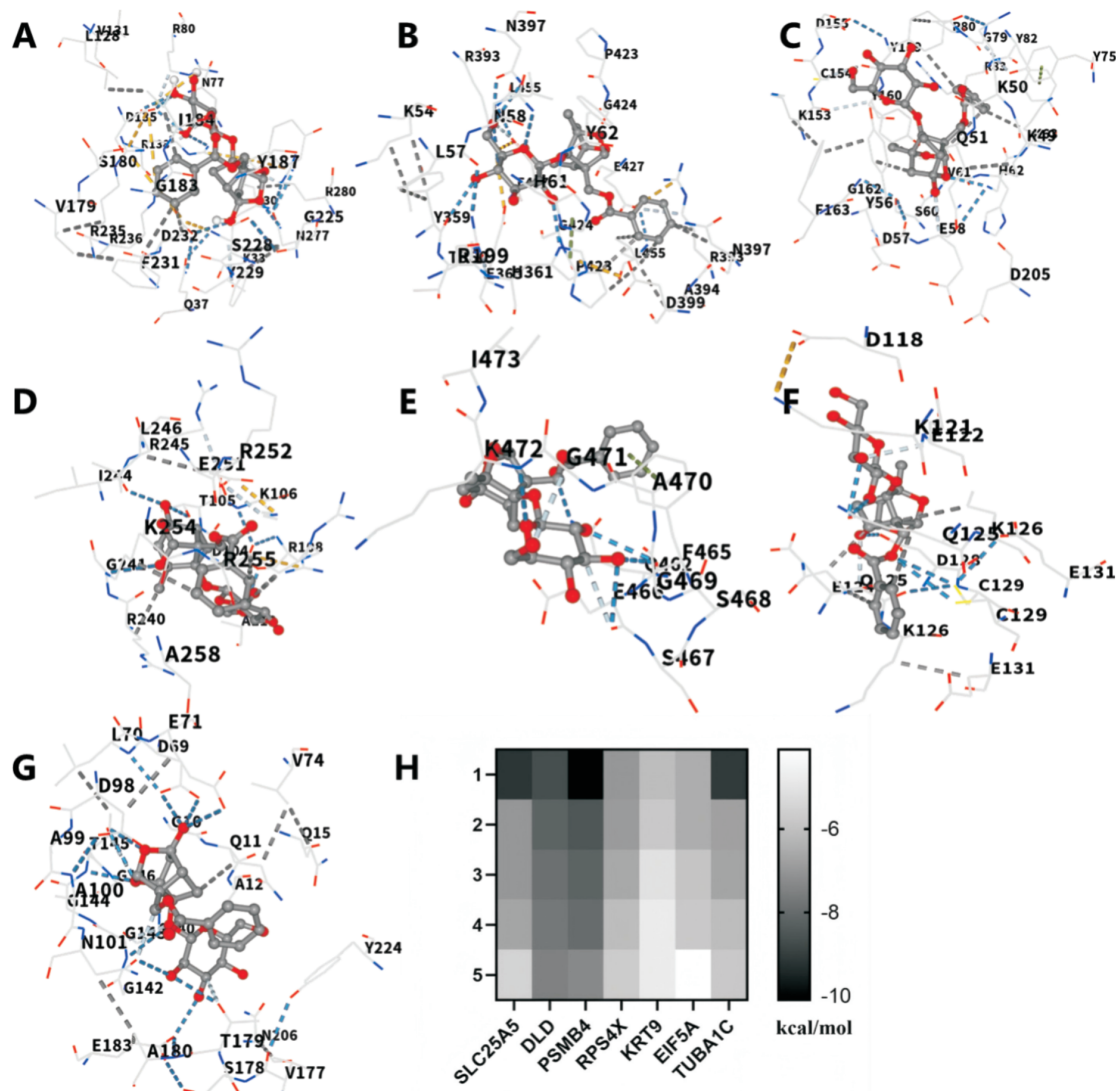
呈剂量依赖性地提高 SLC25A5 和 PSMB4 蛋白表达水平(图 7)。

讨 论

内脏高敏感是 IBS 腹部症状的核心病理机制,表现为内脏组织对刺激的敏感性异常升高,包括痛觉过敏和痛觉异常,是 IBS 内脏痛觉敏化的根本原因^[6]。流行病学研究发现,内脏高敏感在 IBS 中的发生率为 33%~90%^[7]。然而,目前内脏高敏感和内脏痛敏尚缺乏有效的干预或疗法。临床上仅约 26.2% 的患者接受解痉剂或镇痛剂对症治疗^[8]。解痉剂的不良反应较多,如口干、视觉障碍、头晕等,且停药后极易复发;常用于治疗 IBS-C 的渗透性泻剂则可能加重腹痛、腹胀。对于腹痛较为严重者,需考虑神经调节剂(如三环抗抑郁药)作为二线选择,然而研究表明约 44% 的患者因不良事件而停药^[9]。因此,改善内脏高敏感是治疗 IBS 的重点和难点。

IBS 内脏高敏感的神经信号转导始于内脏传入神经,其胞体位于背根神经节。肠道组织损伤和炎

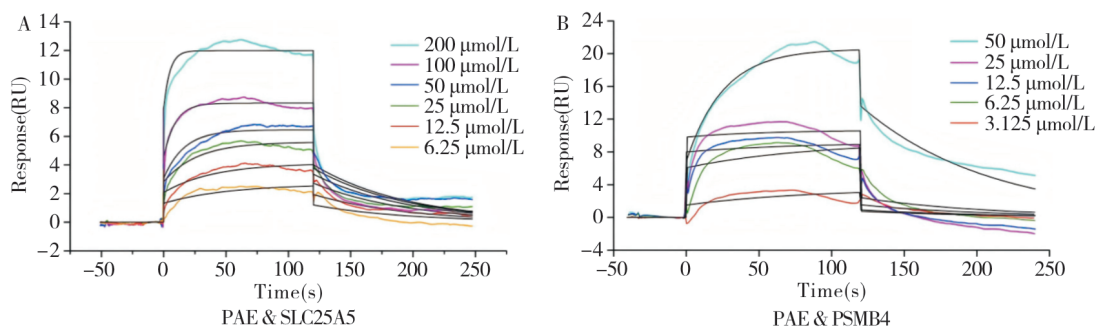
症可激活并致敏这些传入神经,引起局部痛觉感受器持续放电和随后的中枢敏化,从而介导急性疼痛向慢性疼痛转化。在炎症性或功能性胃肠道疾病中,不同类型细胞上的多种感受器均受到动态调节,并与疼痛症状相关。促伤害性感受器如瞬时受体电位通道[以瞬时受体电位通道锚蛋白亚型 1 (transient receptor potential ankyrin 1, TRPA1) 为代表]及其相关介质(如 5-HT、组胺、类胰蛋白酶等)在此过程中发挥重要作用^[10]。EC 细胞中由 TPH1 催化合成的 5-HT 是关键的肠神经递质之一,通过多种受体亚型广泛参与胃肠道运动、分泌、感觉等功能,并与内脏高敏感密切相关(主要由 5-HT₃ 受体介导)。TRPA1 高表达于小肠和结肠的 EC 细胞^[11],可被肠道内亲电性化学刺激物(如丙烯醛、异硫氰酸烯丙酯)触发,引起 5-HT 大量释放,进而激活感觉神经纤维上的 5-HT₃ 受体,诱发疼痛和神经系统炎症反应^[11-12]。更重要的是,EC 细胞特异性高表达机械力敏感通道蛋白 Piezo1 和 Piezo2,因此具有机械敏感性,并通过 5-HT 实现机械-化学信号转导^[13]。近年有研究表明,EC 细胞主导了肠道扩张相关的内脏高



注:PAE为芍药苷;SLC25A5为溶质载体家族25成员5;DLD为二氢硫辛酰胺脱氢酶;PSMB4为20S蛋白酶体β4亚基;RPS4X为X连锁核糖体蛋白S4;KRT9为角蛋白9;EIF5A为真核翻译起始因子5A;TUBA1C为微管蛋白α-1c链

A:PAE-SLC25A5;B:PAE-DLD;C:PAE-PSMB4;D:PAE-RPS4X;E:PAE-KRT9;F:PAE-EIF5A;G:PAE-TUBA1C;H:结合能热图,纵轴为5个候选“口袋”

图5 PAE与潜在结合蛋白的分子对接可视化图



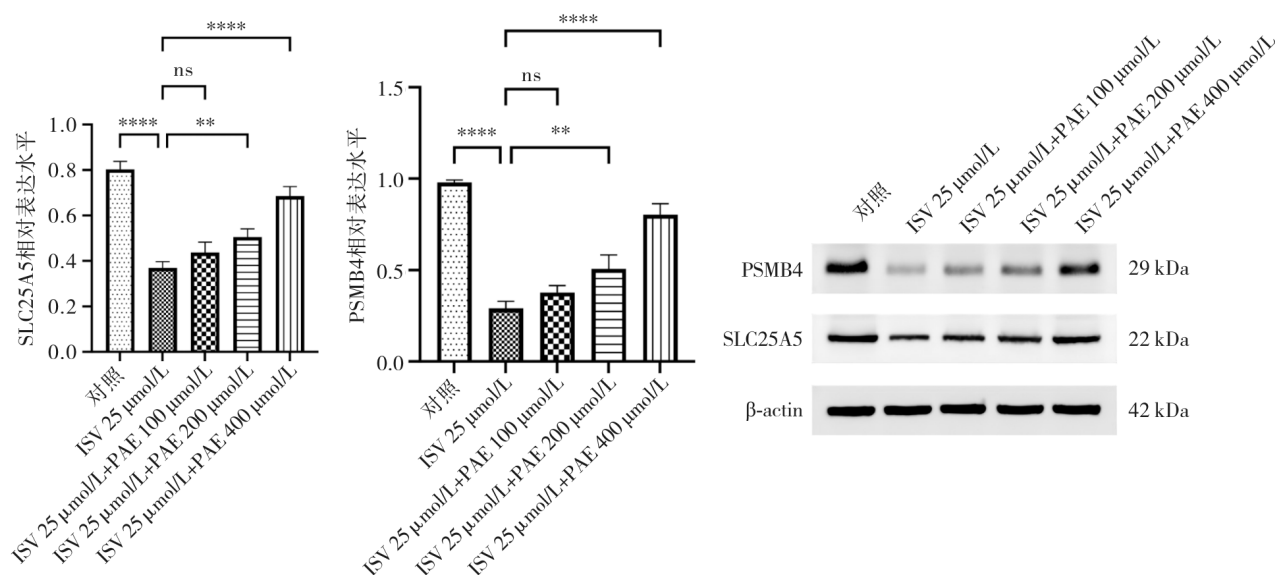
注:PAE为芍药苷;SLC25A5为溶质载体家族25成员5;PSMB4为20S蛋白酶体β4亚基;SPR为表面等离子体共振

A:PAE与SLC25A5;B:PAE与PSMB4

图6 SPR检测PAE与SLC25A5、PSMB4的结合动力学曲线

敏感和焦虑样行为,并介导了ISV的神经致敏作用^[4]。因此,肠道EC细胞敏化所引发的TPH1/5-HT

信号激活是IBS和内脏高敏感病理生理机制中的关键环节之一。



注: SLC25A5 为溶质载体家族 25 成员 5; ISV 为异戊酸; PAE 为芍药苷; PSMB4 为 20S 蛋白酶体 β 4 亚基; 两组间比较, $^{ns}P>0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$

图 7 PAE 对敏化 BON-1 细胞 SLC25A5 和 PSMB4 蛋白的调控作用

本研究通过细胞活性和表型实验证实, PAE 可显著减轻 ISV 诱导的 BON-1 细胞敏化。BON-1 细胞表达 TPH1, 具有与 EC 细胞相近的 5-HT 合成功能^[14], 且两者对化学或机械刺激的 5-HT 释放模式亦十分相似^[15], 因此 BON-1 细胞能够较好地模拟 EC 细胞。随后, 本研究采用 LiP-MS 筛选 PAE 改善 BON-1 细胞敏化的潜在结合靶点, 并通过分子对接和 SPR 进一步验证结合强度, 结果表明 PAE 与 SLC25A5、PSMB4 均有一定强度的结合活性 (K_D 分别为 20.2、13.7 $\mu\text{mol/L}$)。根据受体占有率公式[占有率(%)=给药浓度/(给药浓度 + K_D) $\times 100\%$], 当 PAE 给药浓度为 100~400 $\mu\text{mol/L}$, SLC25A5、PSMB4 的占有率分别为 83.2%~95.2%、88.0%~96.7%, 理论上足以实现大量位点占有。进一步的细胞实验结果证实, PAE 可调控 SLC25A5、PSMB4 蛋白表达水平。SLC25A5 是一种 ADP/ATP 转位酶, 位于线粒体内膜, 负责将 ATP 从线粒体基质转运至胞质, 同时将 ADP 转运入线粒体基质, 是细胞能量代谢的核心分子^[16]。内质网和质膜上的钙泵均依赖 ATP 将胞质钙离子泵回钙库或泵出细胞, 如肌浆网/内质网钙 ATP 酶 (sarco-/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases, SERCAs) 的泵钙能力直接取决于 ATP 水平^[17]。EC 细胞中 5-HT 的合成、释放与钙信号级联密切相关^[18], 而 SERCAs 介导的钙摄取主导了负反馈调节^[14]。因此, PAE 可能通过上调 SLC25A5, 调节线粒体功能和钙稳态, 恢复负反馈环路, 从而减轻细胞敏化。PSMB4 是 20S

蛋白酶体核心颗粒中 β 亚家族的成员, 负责蛋白酶体的催化活性^[19], 目前尚无证据表明 PSMB4 直接参与 5-HT 的合成过程, 但 TPH1 含有 PEST 序列即“优先降解”标签, 可能因 PSMB4 上调而被加速降解。LiP-MS 是一种基于结构依赖的化学蛋白质组学技术, 其优点在于无需制备化学探针、可操作性强, 且能精准定位靶标序列; 但特异性较低, 部分构象变化或非特异性片段切割也可能被捕获。此外, 低丰度蛋白和膜蛋白的检出率均较低, 可能导致高亲和力但低表达量或难溶的膜相关靶点未被有效识别, 难以完全避免药物靶点的遗漏^[20]。后续研究可采用分子动力学模拟、细胞热迁移实验或基于化学探针的靶标富集策略等方法, 进一步挖掘并验证 PAE 减轻 ISV 诱导的 BON-1 细胞敏化的靶点和机制, 为中医药干预内脏高敏感和 IBS 的研发提供思路。

总之, PAE 可能通过调控 SLC25A5 和 PSMB4 表达, 减轻 ISV 诱导的 BON-1 细胞敏化, 这可能是芍药干预内脏高敏感、治疗 IBS 的机制之一。

参考文献

- [1] CHANG L, SULTAN S, LEMBO A, et al. AGA Clinical Practice Guideline on the pharmacological management of irritable bowel syndrome with constipation[J]. Gastroenterology, 2022, 163 (1): 118-136.
- [2] 卞立群, 黄绍刚, 魏玮, 等. 肠易激综合征中医诊疗专家

- 共识(2024)[J]. 中医杂志, 2024, 65 (18): 1948-1956.
- [3] BLACK C J, FORD A C. An evidence-based update on the diagnosis and management of irritable bowel syndrome [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2025, 19 (1): 1-16.
- [4] BAYRER J R, CASTRO J, VENKATARAMAN A, et al. Gut enterochromaffin cells drive visceral pain and anxiety [J]. *Nature*, 2023, 616 (7955): 137-142.
- [5] LIU Y, YANG X, GAN J, et al. CB - Dock2: improved protein - ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50 (W1): W159-W164.
- [6] FORD A C, VANNER S, KASHYAP P C, et al. Chronic visceral pain: new peripheral mechanistic insights and resulting treatments[J]. *Gastroenterology*, 2024, 166 (6): 976-994.
- [7] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组, 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 2020年中国肠易激综合征专家共识意见[J]. *中华消化杂志*, 2020, 40 (12): 803-818.
- [8] LEBRETT W G, CHANG L. Prescription pain medications for disorders of gut - brain interaction: comparing usage patterns with clinical practice recommendations[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2023, 35 (8): e14645.
- [9] GLISSEN BROWN J R, SANAYEI A, PROCTOR S, et al. Examining the placebo effect in trials of neuromodulators for use in disorders of gut - brain interaction[J]. *Am J Gastroenterol*, 2023, 118 (4): 692-701.
- [10] VANUVTSEL T, BERCIK P, BOECKXSTAENS G. Understanding neuroimmune interactions in disorders of gut-brain interaction: from functional to immune-mediated disorders[J]. *Gut*, 2023, 72 (4): 787-798.
- [11] YANG Y, WANG S, KOBAYASHI K, et al. TRPA1 - expressing lamina propria mesenchymal cells regulate colonic motility[J]. *JCI Insight*, 2019, 4 (9): e122402.
- [12] TOUHARA K K, ROSSEN N D, DENG F, et al. Topological segregation of stress sensors along the gut crypt-villus axis[J]. *Nature*, 2025, 640 (8059): 732-742.
- [13] TREICHEL A J, FINHOLM I, KNUTSON K R, et al. Specialized mechanosensory epithelial cells in mouse gut intrinsic tactile sensitivity[J]. *Gastroenterology*, 2022, 162 (2): 535-547. e13.
- [14] LIÑÁN - RICO A, OCHOA - CORTES F, ZULETA - ALARCON A, et al. UTP-gated signaling pathways of 5-HT release from BON cells as a model of human enterochromaffin cells[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 429.
- [15] LINAN-RICO A, OCHOA-CORTES F, BEYDER A, et al. Mechanosensory signaling in enterochromaffin cells and 5-HT release: potential implications for gut inflammation[J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 564.
- [16] JIANG L, HE H, TANG Y, et al. Activation of BK channels prevents diabetes - induced osteopenia by regulating mitochondrial Ca^{2+} and SLC25A5/ANT2 - PINK1 - PRKN-mediated mitophagy[J]. *Autophagy*, 2024, 20 (11): 2388-2404.
- [17] GU H O, NOH S W, KIM O H, et al. Crucial roles of calcium ATPases and phosphoinositides: insights into pathophysiology and therapeutic strategies[J]. *Mol Cells*, 2025, 48 (9): 100254.
- [18] KNUTSON K R, WHITEMAN S T, ALCAINO C, et al. Intestinal enteroendocrine cells rely on ryanodine and IP3 calcium store receptors for mechanotransduction[J]. *J Physiol*, 2023, 601 (2): 287-305.
- [19] DESHMUKH F K, BEN-NISSAN G, OLSHINA M A, et al. Allosteric regulation of the 20S proteasome by the Catalytic Core Regulators (CCRs) family[J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 3126.
- [20] VAN LEENE C, VAN MOORTELE L, DE BOSSCHER K, et al. Exploring protein conformations with limited proteolysis coupled to mass spectrometry[J]. *Trends Biochem Sci*, 2025, 50 (2): 143-155.
- (2025-07-22收稿;2025-09-08修回)
(本文编辑:袁春英)