

网络出版时间: 2023-05-30 17:16:39 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1633.012.html>

## APETx2 对感染后肠易激综合征小鼠内脏敏感性的作用及机制

肖红云<sup>1</sup> 李欢<sup>1</sup> 闫波<sup>2</sup> 潘颖<sup>2</sup> 田平平<sup>2</sup> 袁丽萍<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 探讨酸敏感离子通道 3 特异性拮抗剂 (APETx2) 对感染后肠易激综合征 (PI-IBS) 小鼠内脏敏感性的调控作用及其机制。方法 采用旋毛虫感染 NIH 小鼠建立 PI-IBS 模型。通过测量首次排黑便的时间和 6 h 内收集的粪便颗粒数评估胃肠道运输功能; 腹壁回撤反射 (AWR) 评分评估小鼠内脏敏感性; 免疫组织化学法检测结肠组织中降钙素基因相关肽 (CGRP) 蛋白表达; 通过实时定量 PCR (qRT-PCR) 法检测结肠组织中脑源性神经营养因子 (BDNF)、CGRP mRNA 表达。蛋白质印迹法 (Western blot) 检测脑组织中酸敏感离子通道 3 (ASIC3)、CGRP、瞬时受体电位香草素 1 (TRPV1) 蛋白表达。结果 与对照组比较, PI-IBS 组首次排黑便时间显著降低, 6 h 内的粪便颗粒数, AWR 评

分均显著升高, 结肠组织中 CGRP 蛋白表达显著升高, BDNF、CGRP mRNA 显著升高, 脑组织中 CGRP、ASIC3、TRPV1 的蛋白表达显著升高; 与 PI-IBS 组比较, APETx2 组首次排黑便时间显著延长, 6 h 内的粪便颗粒数, AWR 评分均显著降低, 结肠组织中 CGRP 蛋白表达显著降低, BDNF、CGRP mRNA 表达显著降低, 脑组织中 CGRP、ASIC3、TRPV1 的蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 APETx2 可通过下调 BDNF、CGRP、ASIC3、TRPV1 的表达, 减轻 PI-IBS 小鼠的内脏敏感性并调节胃肠道运动。APETx2 可能为治疗 IBS 提供一个新的治疗选择。

**关键词** 感染后肠易激综合征; APETx2; 酸敏感离子通道 3; 降钙素基因相关肽; 脑源性神经营养因子; 瞬时受体电位香草素 1

中图分类号 R 574.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0953-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.013

2023-03-02 接收

基金项目: 安徽省高校科学研究项目 (编号: KJ2020ZD67)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学附属阜阳医院儿科, 阜阳 236112

<sup>2</sup> 安徽医学高等专科学校医学技术系, 合肥 230601

<sup>3</sup> 安徽医科大学第一附属医院儿科, 合肥 230022

作者简介: 肖红云, 女, 硕士研究生;

袁丽萍, 女, 主任医师, 责任作者, E-mail: yuanliping3986@sina.com

感染后肠易激综合征 (post-infection irritable bowel syndrome, PI-IBS) 是一种常见的功能性胃肠道疾病, 其特征是在急性胃肠炎发作后出现慢性间

patients information was download from TCGA-TSCC database, the differentially expressed genes between the cancer and normal tissues were screened by NetworkAnalysed site, the key genes and clinical prognosis were identified through Kaplan-Meier analysis and Lasso regression, the functions and pathways of differentially expressed genes were gained by GO and KEGG database, the expression of DKK1 mRNA and protein in TSCC as well as its relationship with clinicopathological features were analyzed by UALCAN database and immunohistochemistry. Western blot assay was conducted to detect the protein expression of DKK1 in TSCC cells, and siRNA was used to knock down the expression of DKK1 protein in Cal27 cells. **Results** The three key genes DKK1, CYP19A1 and IRX4, which were highly expressed in tongue squamous cell carcinoma and the survival rate of TSCC patients with high expression group was poor, were screened through NetworkAnalysed, Kaplan-Meier analysis and Lasso regression method. UALCAN database showed that the mRNA level of DKK1 in TSCC tissues was higher than that in normal tissues, and its high expression was significantly correlated with clinical stage, histological grade and lymph node metastasis of TSCC patients. The immunohistochemistry assay suggested that the positive rate of DKK1 protein in clinical stage III + IV TSCC tissues was significantly higher than that in stage I + II TSCC tissues. In addition, the expression level of DKK1 protein in TSCC tissues was significantly higher than that in adjacent tissues. Western blot assay also showed that the protein expression of DKK1 in TSCC cell Cal27 was much higher than normal oral epithelial cell HOEC. When knock down the protein expression of DKK1 in Cal27, the expression of  $\beta$ -catenin, p-p65 and p65 were also reduced. **Conclusion** DKK1 is highly expressed in tongue squamous cell carcinoma tissues and cells and plays an important role. It may be a new target for early diagnosis and drug treatment of TSCC.

**Key words** tongue squamous cell carcinoma; DKK1;  $\beta$ -catenin; p-p65; p65

歇性腹痛、结肠运动障碍和肠道习惯改变<sup>[1]</sup>。据报道,约3.7%~36.0%的IBS患者有急性胃肠炎或寄生虫感染病史。IBS的病理生理机制尚未完全阐明,大量研究<sup>[2]</sup>表明,肠道黏膜的低度炎症、肠道黏膜屏障的功能障碍和内脏高敏感在介导PI-IBS的发病机制中起着重要作用。目前IBS的治疗方法主要是暂时缓解症状,药物治疗对腹痛和腹胀等症状疗效不确切。

酸敏感离子通道(acid sensing ion channels, ASICs)主要是由细胞外酸化激活的质子门控阳离子通道,可以检测因组织损伤、炎症、缺血等发生的组织酸中毒,从而激活周围的痛觉神经并将疼痛信号传输到中枢<sup>[3]</sup>。ASICs在整个疼痛通路中广泛表达,特别是酸敏感离子通道3(acid sensing ion channel 3, ASIC3)在周围神经系统中广泛分布。研究表明抑制ASIC3在胃肠道的表达,可以降低IBS的结肠扩张压力和内脏超敏反应。该研究旨在探讨一种强效的ASIC3选择性阻断剂APETx2对PI-IBS小鼠内脏超敏反应的调节作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF级成年NIH雄性小鼠18只,4~6周龄,体质量20~25 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号为SCXK(京)2016-0011。小鼠饲养于安徽医科大学实验动物中心,分笼饲养、自由饮食,12 h光照、黑暗交替节律。所有小鼠实验前在同一环境中适应性喂养7 d。

**1.2 主要试剂** APETx2(上海信裕生物科技有限公司);印度墨汁(上海源叶生物科技有限公司);兔抗小鼠瞬时受体电位香草素1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)(BS60454,美国Bioworld公司);兔抗小鼠降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)(DF7386,美国Affinity公司);兔抗小鼠ASIC3(bs-42132R,北京博奥森生物技术有限公司);TRIzol试剂(15596018,美国Thermo公司);逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司);HRP-羊抗兔IgG(ZB-2301,北京中杉金桥生物技术有限公司);RIPA细胞裂解液(P0013B,上海碧云天生物技术有限公司);PVDF膜(IPVH00010,上海密理博贸易有限公司)。

**1.3 PI-IBS模型制备及给药** NIH小鼠采用含400~500条旋毛虫幼虫的0.2 ml生理盐水灌胃,构建PI-IBS模型;根据腹壁回撤反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)结果评估内脏敏感性,选择造模

成功小鼠进行实验。将这些小鼠随机分为PI-IBS组、APETx2组,同时设立对照组,每组6只。对照组给予等体积生理盐水灌胃。饲养8周后,APETx2组给予120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  APETx2,每天腹腔注射1次,连续7 d;对照组和PI-IBS组则给予等体积生理盐水,每天腹腔注射1次,连续7 d。幼虫从先前感染的旋毛虫的雄性昆明小鼠中获得。

**1.4 各组小鼠一般情况** 观察各组小鼠毛色、活动情况、对外界反应情况、粪便性状。

**1.5 各组小鼠肠道动力检测** 给药结束后,小鼠均用0.2 ml的印度墨汁灌胃。各组小鼠单笼饲养。记录每只小鼠首次排黑便的时间并收集粪便颗粒数,每2 h一次,持续6 h。该实验用于评估小鼠胃肠道功能情况。

**1.6 AWR测试评估小鼠内脏敏感性** 实验前将小鼠禁食24 h,自由饮水后,轻轻麻醉小鼠,将8 F导尿管插入肛门6~8 cm并固定在尾部。之后将小鼠放在透明盒上,保证小鼠只能一个方向运动且不能翻转。在小鼠从麻醉中完全恢复后,向气囊内注入水。水容量依次为0.25、0.35、0.50、0.65 ml。球囊扩张每次持续30 s,并评估腹部退缩反射后休息20 s,重复3次,进行下一梯度时间间隔5 min。观察小鼠对不同程度扩张压力的行为反应。操作者和观察者采取双盲的方法进行AWR评分,取3次数据的平均值作为结果。AWR评分标准:0分,对刺激无反应;1分,仅出轻微的头运动;2分,腹部肌肉轻度收缩但腹部未抬起;3分,腹部肌肉强烈收缩且腹部抬起;4分,腹部肌肉收缩更强烈,背部拱起,腹部、骨盆和会阴部抬离地面。

**1.7 免疫组织化学法检测小鼠结肠组织中CGRP蛋白表达** 将小鼠结肠组织,于PBS溶液中冲洗,石蜡包埋,4%多聚甲醛固定后切成5  $\mu\text{m}$ 厚切片。脱蜡、水化和抗原高压修复后。将切片与一抗CGRP(1:300)在37  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1 h。滴加二抗孵育30 min后,滴加DAB显色剂,复染、脱水后封片,在光学显微镜下观察。使用Image-Pro Plus图像分析系统采集并分析每张切片的平均吸光度值(mean optical density, MOD)。MOD值越大意味阳性表达越高。每张切片随机读取200倍视野进行观察。

**1.8 qRT-PCR法检测小鼠结肠组织中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BD-NF)、CGRP mRNA表达水平** 使用TRIzol试剂从结肠组织中提取总RNA。按照逆转录试剂盒说明书,将RNA逆转录成cDNA。使用SYBR Green PCR

Kit 进行 PCR 扩增, 加入上、下游引物。所有引物均由上海生工生物工程构建。具体步骤: 95 ℃ 60 s, 1 个循环进行预变性; 95 ℃ 20 s 60 ℃ 60 s 40 个循环为 PCR 反应条件。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式分析目的基因的相对表达量, 其中  $\Delta Ct$  值 = 目的基因 Ct 值 -  $\beta$ -actin Ct 值。以  $\beta$ -actin 作为内参, 所有基因引物序列信息见表 1。

表 1 基因的引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
$\beta$ -actin	F: ACTGTGACGTTGACATCCGT
	R: TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA
BDNF	F: TTAATCTCTCTGGGTTCTCTGA
	R: ACGTCCACTTCTGTTTCCTT
CGRP	F: GATCAAGAGTCACCGCTTC
	R: TGATGCCTTCCTGCTGAG

**1.9 Western blot 法检测小鼠脑组织中 ASIC3、CGRP 和 TRPV1 蛋白表达** 用 RIPA 裂解液提取总蛋白 5~10  $\mu$ l 蛋白样品电泳, 转移并封闭, 然后用一抗 ASIC3 (1:1 000)、CGRP (1:1 000) 和 TRPV1 (1:1 000) 在 4 ℃ 下孵育过夜。然后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:20 000) 在室温下孵育 1 h。之后使用 ECL 发光试剂盒检测蛋白。用 Image J 软件读取目标条带的灰度值, 以 GAPDH 为内参, 对目的蛋白进行半定量分析。

**1.10 统计学处理** 采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行分析和作图。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。数据均进行正态性检验及方差齐性检验。多组间比较采用单因素方差分析, 其中组间多重比较方差齐则采用 LSD 检验, 方差不齐则采用塔姆黑尼 T2(M) 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠一般情况比较** 对照组小鼠皮毛整齐有光泽, 粪便呈颗粒状硬度适中, 活动量正常。PI-IBS 组小鼠活动减少, 皮毛光泽变暗, 形体未见明显消瘦, 有不同程度的稀便, 粪便不成型。与 PI-IBS 组比较, APETx2 组小鼠活动增加, 较前温顺, 皮毛恢复光泽, 粪便多成型, 硬度适中。

**2.2 各组小鼠首次排黑便时间及 6 h 粪便颗粒数的比较** 对照组、PI-IBS 组和 APETx2 组的小鼠首次排黑便的时间分别为 (387.10  $\pm$  47.81)、(110.00  $\pm$  17.35)、(337.80  $\pm$  76.02) min。与对照组相比, PI-IBS 组的小鼠首次排黑便的时间显著降低 (P <

0.01); 与 PI-IBS 组相比, APETx2 组的小鼠首次排黑便的时间显著延长 (P < 0.01)。与对照组相比, PI-IBS 组小鼠在 2、4、6 h 的粪便颗粒数明显增加 (P < 0.01)。与 PI-IBS 组相比, APETx2 组的小鼠 2、4、6 h 的粪便颗粒数明显减少 (P < 0.01)。结果表明, APETx2 治疗改善了 PI-IBS 小鼠的胃肠道运动能力。见表 2。

表 2 各组小鼠首次排黑便时间及 6 h 粪便颗粒数 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

组别	首次排黑便	2 h 排便	4 h 排便	6 h 排便
	时间 (min)	数量 (粒)	数量 (粒)	数量 (粒)
对照	387.10 $\pm$ 47.81	2.00 $\pm$ 1.34	2.92 $\pm$ 0.49	4.58 $\pm$ 2.06
PI-IBS	110.00 $\pm$ 17.35 **	11.92 $\pm$ 5.08 **	16.83 $\pm$ 5.81 **	18.33 $\pm$ 5.54 **
APETx2	337.80 $\pm$ 76.02 ##	3.83 $\pm$ 3.30 ##	6.50 $\pm$ 3.58 ##	8.83 $\pm$ 5.22 ##
F 值	99.433	10.159	18.112	15.624
P 值	<0.001	0.006	0.002	0.002

与对照组比较: \*\*P < 0.01; 与 PI-IBS 组比较: ##P < 0.01

**2.3 各组小鼠 AWR 评分比较** 与对照组比较, 当结直肠扩张的水容量依次为 0.25~0.65 ml 时, PI-IBS 组 AWR 评分均显著升高 (P < 0.01)。与 PI-IBS 组比较, APETx2 组在结直肠扩张的水容量依次为 0.25~0.65 ml 时, APETx2 组与 PI-IBS 相比 AWR 评分均显著降低 (P < 0.05)。见表 3。

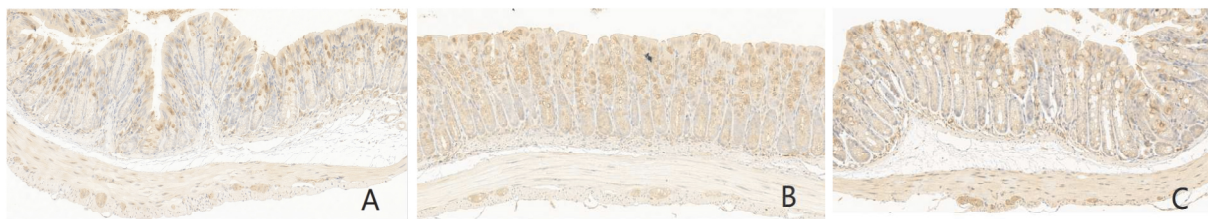
表 3 各组小鼠 AWR 评分 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

组别	扩张水容量 (ml)			
	0.25	0.35	0.50	0.65
对照	0.94 $\pm$ 0.39	1.39 $\pm$ 0.25	1.89 $\pm$ 0.17	2.33 $\pm$ 0.30
PI-IBS	2.50 $\pm$ 0.46 **	3.00 $\pm$ 0.47 **	3.28 $\pm$ 0.61 **	3.39 $\pm$ 0.44 **
APETx2	1.90 $\pm$ 0.40 #	2.17 $\pm$ 0.62 #	2.28 $\pm$ 0.77 #	2.50 $\pm$ 0.81 #
F 值	21.100	17.276	9.235	6.141
P 值	<0.001	<0.001	0.002	0.011

与对照组比较: \*\*P < 0.01; 与 PI-IBS 组比较: #P < 0.05

**2.4 各组小鼠结肠组织中 CGRP 蛋白表达比较** 免疫组织化学染色显示: CGRP 在结肠中主要表达于黏膜层及黏膜下层的细胞质中, 阳性细胞呈棕黄色。与对照组比较, PI-IBS 组结肠中的 CGRP 阳性表达水平明显升高 (P < 0.01)。与 PI-IBS 组比较, APETx2 组中 CGRP 的阳性表达水平明显降低 (P < 0.01)。见图 1 和表 4。

**2.5 各组小鼠结肠组织 BDNF、CGRP mRNA 表达比较** 与对照组比较, PI-IBS 组小鼠结肠组织中 BDNF、CGRP mRNA 表达明显增加 (P < 0.01)。与 PI-IBS 组比较, APETx2 组小鼠结肠组织中的 BDNF、CGRP mRNA 表达水平明显降低 (P < 0.01)。见图 2。

图1 免疫组化测定各组小鼠结肠组织中 CGRP 表达  $\times 200$ 

A: 对照组; B: PI-IBS 组; C: APETx2 组

表4 各组小鼠结肠组织中 CGRP 平均吸光度值( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	CGRP( pg/ml)
对照	0.24 $\pm$ 0.02
PI-IBS	0.32 $\pm$ 0.01 **
APETx2	0.28 $\pm$ 0.02 ##
F 值	30.449
P 值	<0.001

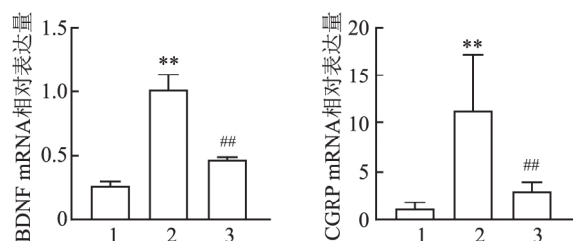
与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 PI-IBS 组比较: ##  $P < 0.01$ 

图2 各组小鼠结肠组织 BDNF、CGRP mRNA 表达水平

1: 对照组; 2: PI-IBS 组; 3: APETx2 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 PI-IBS 组比较: ##  $P < 0.01$ 

**2.6 各组小鼠脑组织中 ASIC3、CGRP 和 TRPV1 蛋白表达比较** 与对照组比较, PI-IBS 组脑组织中 ASIC3、CGRP 和 TRPV1 蛋白的表达显著增多 ( $P < 0.01$ )。与 PI-IBS 组比较, APETx2 组脑组织 ASIC3、CGRP 和 TRPV1 蛋白的表达显著减少 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

### 3 讨论

IBS 的是一种多因素导致的疾病, 其中内脏超敏反应是导致 IBS 症状的主要原因。IBS 慢性内脏超敏反应的机制尚不清楚, 但是 ASIC3 作为酸性和原发性炎症疼痛的传感器, 参与内脏超敏反应的信号转导。因此, 假设抑制 ASIC3 通道可以缓解 IBS 的内脏超敏反应。实验结果显示 APETx2, 一种特异性的 ASIC3 通道阻断剂, 可以明显改善 PI-IBS 小鼠因感染旋毛虫而引起的内脏超敏反应以及胃肠道传

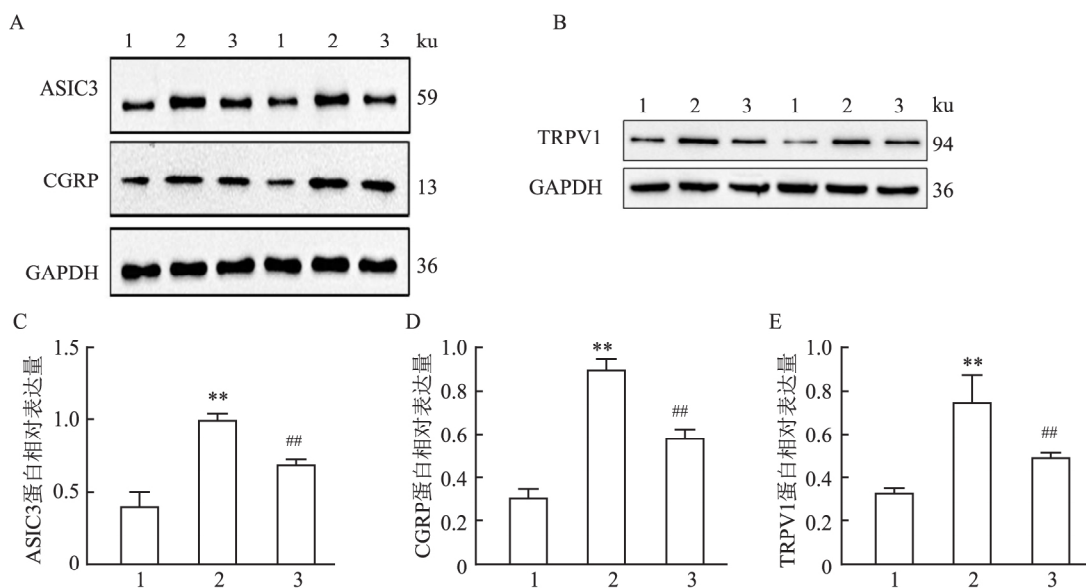


图3 各组小鼠脑组织中 ASIC3、CGRP 和 TRPV1 蛋白表达

A、B: Western blot 检测结果; C - E: 相对表达量统计分析结果; 1: 对照组; 2: PI-IBS 组; 3: APETx2 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 PI-IBS 组比较: ##  $P < 0.01$

输功能。

内脏敏感性增高涉及复杂的超敏反应过程,主要包括外周和中枢神经系统的异常相互作用以及脑肠肽异常分泌等<sup>[4]</sup>。其中,TRPV1、CGRP、BDNF作为相关神经肽参与IBS的发展过程并对肠神经系统具有调节作用。ASIC3在周围神经系统和伤害感受器中广泛表达,用于检测与组织酸中毒相关的疼痛。胃肠道的慢性炎症、癌症和缺血往往伴随着组织酸化,这激活了周围感觉神经细胞上的ASIC3蛋白,从而介导胃肠道疾病的慢性腹痛<sup>[5]</sup>。同时,ASIC3也参与结肠对机械刺激的过敏反应,这些功能影响及其炎症和非炎症病理的上调使ASIC3成为管理与功能性胃肠道疾病相关的内脏过敏和疼痛的潜在目标<sup>[6]</sup>。该研究显示,与PI-IBS组比较,APETx2显著降低PI-IBS小鼠脑组织ASIC3含量。同时,小鼠胃肠道传输功能测定结果表明,给药后,小鼠首次排黑便时间与6 h内粪便颗粒数均显著降低( $P < 0.01$ )并且小鼠直肠扩张的疼痛阈值明显增加。结果提示,APETx2可以通过下调脑组织ASIC3含量从而调节PI-IBS内脏敏感性、改善IBS的结肠运输功能。

TRPV1属于瞬时受体电位(TRP)通道家族,是一种钙渗透性的离子通道,在胃肠道中广泛表达<sup>[7]</sup>。TRPV1可以感知病理性疼痛,从而产生痛觉过敏,整合疼痛信号<sup>[8]</sup>。TRPV1通过辣椒素的激活促进 $Ca^{2+}$ 内流,作用于初级传入纤维CGRP和其他脑肠肽,从而调节内脏感觉和胃肠道运动<sup>[9]</sup>。CGRP是一种胃肠肽,广泛存在于胃肠道壁内的神经丛中,具有调节胃肠道运动和肠道疼痛传入中枢作用,并作用于辣椒素敏感的感觉神经末梢<sup>[10-11]</sup>。CGRP调节肠道感觉和运动功能,增强肠道运动,并与肠道感觉异常和内脏超敏反应有关<sup>[12]</sup>。该研究APETx2组TRPV1和CGRP的表达水平显著低于PI-IBS组。结果提示,APETx2可以通过下调TRPV1和CGRP的表达从而改善PI-IBS症状。

BDNF是一种广泛表达在神经系统和外周组织中的神经营养因子,参与调节由不同刺激引起的疼痛超敏反应并在介导肠道感觉和运动方面起着重要作用<sup>[13-14]</sup>。在IBS患者中,BDNF的过度表达导致肠道黏膜神经结构的改变(增加黏膜神经纤维总数和超微结构损伤),从而导致肠道运动障碍。此外,BDNF升高的程度与腹痛的程度和频率显著相关,其异常升高可导致多种疼痛相关感觉,例如慢性疼痛、炎症性疼痛和内脏疼痛。近年来,研究表明BD-

NF与许多慢性疼痛疾病有关,并且在胃肠道中也大量表达。BDNF不仅与一种或多种神经递质联合作用,还能增加P物质和CGRP等因子的释放。结果显示,PI-IBS组脑组织中BDNF和CGRP的表达水平以及结肠组织中CGRP的表达水平都显著升高。APETx2治疗明显降低了脑组织中BDNF和CGRP的表达水平以及结肠组织中CGRP的表达。研究表明,APETx2可以通过降低BDNF表达水平进而通过下调CGRP表达来降低IBS的内脏超敏反应并改善结肠转运功能。

综上所述,ASIC3可能在旋毛虫诱导的IBS的发展中起作用,在体内阻断ASIC3的激活可以改善IBS的内脏敏感性和肠道传输功能。APETx2对PI-IBS小鼠内脏敏感性的调节作用包括脑肠肽的多个环节、水平和表达作用,对单一脑肠肽水平的变化或某一途径的单一研究不能完全揭示APETx2调节IBS症状的复杂机制。ASIC3有可能成为IBS治疗的一个潜在靶标。

## 参考文献

- [1] Ng Q X, Soh A Y S, Loke W, et al. The role of inflammation in irritable bowel syndrome (IBS) [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 345-9.
- [2] Zhao Q, Yang W R, Wang X H, et al. Clostridium butyricum alleviates intestinal low-grade inflammation in TNBS-induced irritable bowel syndrome in mice by regulating functional status of lamina propria dendritic cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(36): 5469-82.
- [3] Cristofori-Armstrong B, Rash L D. Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: insights from spider, snake and sea anemone venoms [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 127: 173-84.
- [4] Paine P. Review article: current and future treatment approaches for pain in IBS [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2021, 54 Suppl 1: S75-88.
- [5] Ruan N, Tribble J, Peterson A M, et al. Acid-sensing ion channels and mechanosensation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4810.
- [6] Cheng Y R, Jiang B Y, Chen C C. Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 46.
- [7] Shuba Y M. Beyond neuronal heat sensing: diversity of TRPV1 heat-capsaicin receptor-channel functions [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 612480.
- [8] Beckers A B, Weerts Z, Helyes Z, et al. Review article: transient receptor potential channels as possible therapeutic targets in irritable bowel syndrome [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 46(10): 938-52.
- [9] Sun C, Yang X, Xie S, et al. A comparison study of the effect on

- IBS-D rats among ginger-partitioned moxibustion , mild moxibustion , and laser Moxibustion [J]. *Evid Based Complement Alternat Med* ,2021 ,2021: 4296216.
- [10] Noor-Mohammadi E , Ligon C O , Mackenzie K , et al. A monoclonal anti-calcitonin gene-related peptide antibody decreases stress-induced colonic hypersensitivity [J]. *J Pharmacol Exp Ther* ,2021 ,379( 3) : 270 –9.
- [11] Kwiecien S , Magierowska K , Magierowski M , et al. Role of sensory afferent nerves , lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the carbon monoxide-induced gastroprotection against stress ulcerogenesis [J]. *J Physiol Pharmacol* ,2016 ,67( 5) : 717 –29.
- [12] Wang X , Lan Y , Zeng Z , et al. Therapeutic mechanism of steam-  
ing umbilical cord therapy with Chinese herbal medicine on a rat model of IBS-D *via* the PAR-2/TRPV1 pathway [J]. *Am J Transl Res* ,2021 ,13( 6) : 6288 –96.
- [13] Yu Z C , Cen Y X , Wu B H , et al. Berberine prevents stress-induced gut inflammation and visceral hypersensitivity and reduces intestinal motility in rats [J]. *World J Gastroenterol* ,2019 ,25( 29) : 3956 –71.
- [14] Orlando A , Chimienti G , Notarnicola M , et al. The ketogenic diet improves gut-brain axis in a rat model of irritable bowel syndrome: impact on 5-HT and BDNF systems [J]. *Int J Mol Sci* ,2022 ,23( 3) : 1098.

## Effects and mechanisms of APETx2 on visceral sensitivity in mice with post-infectious irritable bowel syndrome

Xiao Hongyun<sup>1</sup> , Li Huan<sup>1</sup> , Yan Bo<sup>2</sup> , Pan Ying<sup>2</sup> , Tian Pingping<sup>2</sup> , Yuan Liping<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Pediatrics , Fuyang Hospital of Anhui Medical University , Fuyang 236112;

<sup>2</sup>Dept of Medical Technology , Anhui Medical College , Hefei 230601;

<sup>3</sup>Dept of Pediatrics , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the regulatory effect and mechanism of specific antagonist of acid-sensitive ion channel 3( APETx2) on visceral sensitivity in mice with post-infectious irritable bowel syndrome ( PI-IBS) . **Methods** The PI-IBS model was established by National Institutes of Health ( NIH) mice infected with *Trichinella spiralis*. Gastrointestinal transport function was assessed by measuring the time to first black stool and the number of fecal pellets collected for 6 hours; abdominal wall withdrawal reflex ( AWR) was used to assess visceral sensitivity; the expression of calcitonin gene-related peptide ( CGRP) in the colon tissue was detected by immunohistochemistry; the expression of brain-derived neurotrophic factor ( BDNF) and CGRP mRNA in the colon tissues was detected by quantitative real time polymerase chain reaction ( qRT-PCR) . The expression levels of acid sensing ion channel 3 ( ASIC3) , CGRP , and transient receptor potential vanilloid 1 ( TRPV1) protein in brain tissue were detected by Western blot analysis. **Results** Compared with the control group , the PI-IBS group significantly reduced the time of first black stool , the number of fecal particles and AWR score within 6 hours significantly increased , the protein expression of CGRP in colon tissue , BDNF and CGRP mRNA significantly increased , and the protein expression of CGRP , ASIC3 and TRPV1 in brain tissue significantly increased. Compared with the control group , the PI-IBS group significantly reduced the time to first black stool , the number of fecal particles and AWR score within 6 hours significantly increased , the expression of CGRP protein in colon tissue , the expression of BDNF and CGRP mRNA significantly increased , and the protein expression of CGRP , ASIC3 and TRPV1 in brain tissue significantly increased; compared with the PI-IBS group , the first time of black stool clearance in the APETx2 group was significantly prolonged , the number of fecal particles and AWR score within 6 hours were significantly reduced , the expression of CGRP protein in colon tissue , the expression of BDNF and CGRP mRNA was significantly reduced , the protein expression of CGRP , ASIC3 and TRPV1 in brain tissue was significantly reduced , and the difference was statistically significant (  $P < 0.05$  ) . **Conclusion** APETx2 can alleviate visceral sensitivity and regulate gastrointestinal motility in PI-IBS mice by downregulating the expression of BDNF , CGRP , ASIC3 and TRPV1. APETx2 may provide a new therapeutic option for the treatment of IBS.

**Key words** post-infectious irritable bowel syndrome; APETx2; acid sensing ion channel 3; calcitonin gene-related peptide; brain-derived neurotrophic factor; transient receptor potential vanilloid 1