

- 自噬抑制大鼠蛛网膜下腔出血后神经元凋亡[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(7): 807-811; 818.
- [24] 文兰香, 覃世运, 陈丽君. 槲皮素调控 AMPK/mTOR 通路对肺癌 A549 细胞自噬的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(19): 2375-2379.
- [25] 叶婷, 马国庆, 魏明慧, 等. 黄芪多糖对糖尿病心肌病大鼠 AMPK-mTOR 通路的调控机制研究[J]. 世界中医药, 2022, 17(7): 977-982.
- [26] Su S, Wang X, Xi X N, et al. Phellodendrine promotes autophagy by regulating the AMPK/mTOR pathway and treats ulcerative colitis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(12): 5707-5720.

## 运脾通肠方对脾肾阳虚型阿片类药物所致便秘大鼠肠黏膜屏障及 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

张录梅<sup>1,2</sup>, 张志明<sup>2,3,\*</sup>, 宋忠阳<sup>2,4</sup>, 王忻<sup>2,4</sup>, 徐倩<sup>1</sup>, 杨霞<sup>5</sup>, 李欣钰<sup>1</sup>, 沈雁云<sup>1</sup>, 赵海宏<sup>1</sup>, 王志刚<sup>1,5\*</sup>

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省中西医结合肿瘤临床医学研究中心, 甘肃兰州 730000; 3. 甘肃省中医院, 甘肃兰州 730000; 4. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃兰州 730000; 5. 天水市中医医院, 甘肃天水 741000)

**摘要:** **目的** 探讨运脾通肠方对脾肾阳虚型阿片类药物所致便秘(OIC)大鼠肠黏膜屏障损伤的改善作用。**方法** 大鼠随机分为空白组(10只)和造模组(50只),造模组大鼠给予洛哌丁胺皮下注射联合活性炭冰水与白醋交替灌胃,建立脾肾阳虚型OIC模型,连续造模7d。造模成功的大鼠随机分为模型组、枸橼酸莫沙必利片组(1.35 mg/kg)及运脾通肠方高、中、低剂量组(15.12、7.56、3.78 g/kg),每组8只,连续给药14d。测定中医证候评分、粪便含水率、首粒黑便排出时间、小肠推进率,HE染色观察结肠组织病理变化,ELISA法检测血清IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平,免疫组化法检测结肠组织闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)表达,RT-qPCR法检测结肠组织MyD88、TLR4、NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达,Western blot法检测结肠组织MyD88、TLR4、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠中医证候评分升高( $P<0.01$ ),粪便含水率、小肠推进率下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),首粒黑便排出时间延长( $P<0.01$ );结肠组织黏膜水肿,炎性浸润明显,腺体紊乱;血清IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平升高( $P<0.05$ );结肠组织ZO-1、Occludin表达降低( $P<0.01$ ),TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 mRNA和蛋白表达均升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,运脾通肠方中剂量组和枸橼酸莫沙必利片组均能有效降低中医证候评分( $P<0.01$ ),提高粪便含水率与小肠推进率( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),缩短首粒黑便排出时间( $P<0.01$ );改善结肠黏膜水肿与炎性浸润;降低血清IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平( $P<0.01$ ),上调ZO-1、Occludin蛋白表达( $P<0.01$ ),下调TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 mRNA、蛋白表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 运脾通肠方可有效调节脾肾阳虚型OIC大鼠肠道炎症,维持肠上皮屏障完整性并改善便秘,其机制可能与抑制TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路活化有关。

**关键词:** 运脾通肠方;脾肾阳虚;阿片类药物所致便秘;TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路;肠黏膜屏障

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)07-2205-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.011

收稿日期: 2024-08-13

基金项目: 甘肃省科技计划项目(18JR2FA001, 24YFFA067); 兰州市青年科技人才创新项目(2023-7-49)

作者简介: 张录梅(1991—),女,博士生,从事中医药防治内分泌代谢性疾病研究。Tel: 18393811643, E-mail: 1942028272@qq.com

\*通信作者: 张志明(1965—),男,教授,主任医师,从事急危重症、肿瘤的中医药防治研究。Tel: (0931) 2687109, E-mail: zhangzhimingys@163.com

王志刚(1968—),男,教授,主任医师,从事中医药防治内分泌代谢性疾病研究。Tel: (0938) 8523819, E-mail: tsszyy@163.com

# Effects of Yunpi Tongchang Formula on intestinal mucosal barrier damage *via* TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in rats with opioid-induced constipation of Spleen-Kidney Yang Deficiency Syndrome

ZHANG Lu-mei<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhi-ming<sup>2,3\*</sup>, SONG Zhong-yang<sup>2,4</sup>, WANG Xin<sup>2,4</sup>, XU Qian<sup>1</sup>, YANG Xia<sup>5</sup>, LI Xin-yu<sup>1</sup>, SHEN Yan-yun<sup>1</sup>, ZHAO Hai-hong<sup>1</sup>, WANG Zhi-gang<sup>1,5\*</sup>

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Provincial Clinical Medical Research Center for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Oncology, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 4. The Hospital Affiliated to Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 5. Tianshui Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianshui 741000, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To investigate the effects of Yunpi Tongchang Formula on intestinal mucosal barrier damage in rats with opioid-induced constipation (OIC) of Spleen-Kidney Yang Deficiency Syndrome. **METHODS** In contrast to the 10 rats of the blank group, the 50 rats of the modeling group were induced into models of OIC of Spleen-Kidney Yang Deficiency Pattern by 7 days consecutive administration of both subcutaneous loperamide injection and alternating gavage of activated carbon ice water and vinegar. Following successful modeling, rats were randomly allocated into the model group, the mosapride citrate tablet group (1.35 mg/kg), and the high-dose, medium-dose, and low-dose Yunpi Tongchang Formula groups (15.12, 7.56, 3.78 g/kg), with 8 mice in each group. Upon the completion of the 14 days treatment, the rats had their TCM Syndrome scores assessed; their fecal water content, initial black stool excretion time, and small intestine propulsion rate measured; their colon tissue morphology observed by HE staining; their serum levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  detected by ELISA; their expressions of occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) in colon tissues detected by immunohistochemistry; their mRNA expressions of MyD88, TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 in the colon tissues detected by RT-qPCR; and their protein expressions of MyD88, TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 in the colon tissues detected by Western blot. **RESULTS** Compared to the blank group, the model group had higher TCM Syndrome scores ( $P < 0.01$ ); lower fecal water content and small intestine propulsion rate ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); longer initial black stool excretion time ( $P < 0.01$ ); more mucosal edema in colon tissue, obvious inflammatory infiltration, and glandular disorder; increased serum levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ); decreased colon expressions of ZO-1 and occludin ( $P < 0.01$ ); and increased mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 ( $P < 0.01$ ). Compared to the model group, both the medium-dose Yunpi Tongchang Formula group and the mosapride citrate tablet group demonstrated effectively reduced TCM syndrome scores ( $P < 0.01$ ); increased fecal water content and small intestine propulsion rate ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); and shorter initial black stool excretion time ( $P < 0.01$ ); improved colon mucosal edema and inflammatory infiltration; decreased serum levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  ( $P < 0.01$ ); upregulated protein expressions of ZO-1 and occludin ( $P < 0.01$ ); and downregulated mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** Yunpi Tongchang Formula significantly ameliorates constipation symptoms in OIC rat models of Spleen-Kidney Yang Deficiency Syndrome because of its efficacy in attenuating intestinal inflammation and preserving the integrity of intestinal epithelial barrier structure, with its mechanistic action in downregulating TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway activation.

**KEY WORDS:** Yunpi Tongchang Formula; Spleen-Kidney Yang Deficiency; opioid-induced constipation; TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway; intestinal mucosal barrier

阿片类药物所致便秘 (opioid-induced constipation, OIC) 是使用该类药物后最普遍的不良反应, 在癌痛治疗中的发病率达 60~90%<sup>[1]</sup>, 可出现自发排便次数减少、排便费力、排便不尽感、硬便等症状, 严重影响治疗依从性<sup>[2]</sup>, 并且与胃肠道中的  $\mu$  受体结合, 抑制胃肠转运和蠕动<sup>[3-4]</sup>。由于肠道炎症参与肠道运动和屏障平衡, 故抑制炎症反应、防止肠道屏障损伤是治疗本病的有效手段<sup>[5-6]</sup>。

阿片类药物进入机体后, 不仅激活阿片受体, 还激活 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4)、TLR4 募集髓样分化因子 88 (myeloid differential protein-88, MyD88) 复合体形成, 通过信号转导激活核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), 促进炎症因子产生<sup>[7]</sup>, 加剧结肠组织损伤和肠黏膜屏障破坏<sup>[8-9]</sup>。目前, 大多采用泻药、促分泌剂、促动力药和阿片受体拮抗剂治疗 OIC, 但疗效有限, 依从性差; 中医药治疗 OIC 通过整体观念、辨证论治及个性化治疗, 副作用较少, 长期疗效良好, 具有独特优势<sup>[10-11]</sup>。全国名中医张志明教授在临床实践中总结出以温补脾肾、调气通便法为代表的运脾通肠方, 能有效改善患者便秘症状<sup>[12]</sup>, 已被甘肃省药监局批准为院内制剂 (甘药制备字 Z20210953000), 本研究以病证结合的脾肾阳虚型 OIC 模型大鼠为对象, 基于 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路进一步探讨该方对 OIC 的疗效和作用机制。

## 1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 7~8 周龄, 体质量 (200±20) g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0005, 实验动物质量合格证号 No. 4100000000005588], 饲养于甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心, 室温 20~24 °C, 相对湿度 40%~60%, 光照 (12 h)/黑暗 (12 h) 交替。本实验通过甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心实验动物管理和伦理委员会审查 (伦理审查批号 SY2023-793)。

1.2 药材与药物 枸橼酸莫沙必利片 (鲁南贝特制药有限公司, 国药准字 H19990317, 批号 26221012)。附子 (批号 062204340)、红参 (批号 0622006701)、干姜 (批号 0622070191)、麸炒白术 (批号 0622074911)、酒大黄 (批号 0622024001)、厚朴 (批号 0622000901)、木香 (批号 0622006701)、焦槟榔 (批号 0622028201)、

肉苁蓉 (批号 0623007951) 及配方颗粒均由北京康仁堂药业有限公司提供, 全方含生药饮片质量共 84 g (颗粒剂质量 26 g), 根据人与大鼠等效剂量系数折算法, 大鼠等效剂量为 7.56 g/kg (中剂量), 高、低剂量分别为 15.12、3.78 g/kg。根据大鼠灌胃容积 (2 mL/只), 将配方颗粒溶于纯净水中, 制成质量浓度为 0.46 g/mL (高剂量) 的溶液, 使用时中、低剂量采用纯净水倍比稀释后进行灌胃。

1.3 试剂 盐酸洛哌丁胺 (美国 MCE 公司, 货号 HY-B0418A)。6°白醋 (江苏恒顺醋业股份有限公司, 总酸度  $\geq 6$  g/100 mL); 活性炭 (天津市光复科技发展有限公司, 批号 20210312)。高效 RIPA 裂解液、吐温 80、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 R0010、T8360、P1200); DMSO、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光超敏显色、RNA 提取、逆转录及 qPCR 试剂 (翌圣生物科技股份有限公司, 批号 20201ES86、60313ES60、S6307290、19221ES50、1141ES60、11201ES50); 大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA 检测试剂盒 (杭州联科生物技术有限公司, 批号 70-EK382/3-96、70-EK301B/3-96、EK306/3-96); TLR4 抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司, 批号 GTX64335); MyD88 抗体 (武汉三鹰生物科技有限公司, 批号 29946-1-AP); NF- $\kappa$ B p65 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab16502); 闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 抗体、闭合蛋白 (Occludin) 抗体、预染蛋白 Marker IV (8~200 kDa) (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 GB11195-100、GB111401-100、G2083-250UL);  $\beta$ -肌动蛋白 (recombinant human beta-actin,  $\beta$ -actin) 抗体、单抗辣根过氧化物酶 (HRP)-羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G (美国 ImmunoWay 公司, 批号 YM8010、RS0002)。

1.4 仪器 IX51BX43+sc50 型光学显微拍照系统 (日本 Olympus 公司); Epoch 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); CFX-96 型 PCR 仪、ChemiDoc MP 型全能型成像系统、041BR 109973 型电泳仪、Trans-Blot Turb 全能型蛋白转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); Scientz-48 型高通量组织研磨器 (宁波新芝生物科技股份有限公司); RM2016 型病理切片仪 (上海徠卡仪器有限公司); KD-P 型组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)。

## 2 方法

2.1 分组、造模与给药 48只大鼠适应性喂养1周后,随机数字表法分为空白组、枸橼酸莫沙必利片组和运脾通肠方高、中、低剂量组。参照文献[13]报道,空白组大鼠皮下注射2 mL/kg含2.5% DMSO和2.5%吐温-80的0.9%氯化钠溶液,其余各组大鼠于每日9:00和17:00后背部皮下注射4 mg/kg洛哌丁胺复制OIC模型,连续7 d。参照文献[14]报道,造模大鼠每天交替灌胃给予0.025 L/kg 4℃活性炭水(16.67 mol/L)和0.015 L/kg 6°白醋,建立脾肾阳虚证便秘模型。造模结束后,依据人与大鼠体表面积换算法确定药物

灌胃剂量<sup>[15]</sup>,运脾通肠方高、中、低剂量组给予15.12、7.56、3.78 g/kg相应溶液,枸橼酸莫沙必利片组给予1.35 mg/kg相应溶液,空白组和模型组给予等量生理盐水,连续14 d。实验过程中观察大鼠一般状况、中医证候评分及排便情况,并于末次给药30 min后灌胃给予10 mL/kg活性炭墨,记录首粒黑便排出时间,计算粪便含水率。

2.2 中医证候评分测定 实验过程中,观察大鼠活动情况、皮毛色泽、精神状态、排便状况,并参照文献[16-17]报道拟定脾肾阳虚证评分表,见表1。

表1 脾肾阳虚证OIC大鼠模型中医证候评分

Tab. 1 TCM syndrome scores for rat models of OIC with Spleen-Kidney Yang Deficiency Syndrome

评分/分	精神状态	眼	耳	皮毛
1	精神状态良好	眼光红亮有神、灵活	红润光泽	光滑柔顺,均匀白色
2	反应稍迟钝,自主活动减少	眼光乏神	淡红少泽	无光泽,白中少有黄色
3	倦怠乏力,四肢蜷缩,行动迟缓	眼光呆滞	淡白少泽	毛发毛躁,无光质硬,白中有黄
4	精神萎靡,攻击及对抗行为消失	眼光无神	苍白或透青色	毛发干枯,无华如针,稀疏色黄
评分/分	身体蜷缩	腹胀	扎堆抱团	粪便
1	无蜷缩	无腹胀	自主活动,无扎堆抱团	湿润有形,灰黄圆润
2	偶见蜷缩	略有腹胀	偶有抱团扎堆	暗黄圆整
3	蜷缩明显	腹胀明显	常有抱团扎堆	暗灰干燥
4	蜷缩发颤	腹胀如鼓	明显抱团扎堆	暗黑干枯

2.3 粪便含水率、首粒黑便排出时间及小肠推进率测定 实验结束前24 h内收集大鼠粪便,称定湿重,干燥后称定干重,计算粪便含水率,公式为粪便含水率 = [(粪便湿重-粪便干重)/粪便湿重] × 100%。将50 g阿拉伯胶与400 mL纯水煮沸至透明,加入25 g活性炭粉,冷却,加入500 mL纯水,混合均匀,制备活性炭混悬液,大鼠禁食不禁水24 h后灌胃1 mL/100 g上述混悬液,记录首粒黑便排出的时间,30 min后用异氟烷麻醉,迅速解剖,分离小肠,测量小肠总长度(幽门至回盲部),从幽门至活性炭前沿的距离为活性炭在肠管内推进距离,计算小肠推进率,公式为小肠推进率 = (碳墨在小肠推进的距离/小肠总长度) × 100%。

2.4 HE染色观察结肠组织病理形态 于回盲部向远心端1 cm处切取大鼠结肠组织,10%中性甲醛溶液固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,连续切片,常规HE染色,于光学显微镜下观察病理形态。

2.5 ELISA法检测血清TNF-α、IL-6、IL-1β水平 大鼠麻醉后心脏采血,血液室温静置2 h,

3 000 r/min离心10 min,取上层血清,置于-80℃冰箱中保存,按照ELISA试剂盒说明书检测TNF-α、IL-6、IL-1β水平。

2.6 RT-qPCR法检测结肠组织TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA表达 取大鼠结肠组织20 mg,严格按照试剂盒说明书提取RNA,分光光度计法检测浓度和纯度,再进行cDNA反转录和扩增。以β-actin为内参,采用2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算mRNA相对表达量,引物由北京志超伟业生物技术有限公司合成,序列见表2。

表2 引物序列

Tab. 2 Primer sequences

基因	引物序列
TLR4	正向 5'-TAGCTAAACATCACCCATA-3'
	反向 5'-TAGCCATCTTATGGACTTACGT-3'
MyD88	正向 5'-GAACTACGATGCACGTGCTAGA-3'
	反向 5'-CTAATGTAACTGTCATTTCATCT-3'
NF-κB p65	正向 5'-TGATGTGCATCGGCAACTG-3'
	反向 5'-AGAAGTTGAGTTTCGGCTAG-3'
β-actin	正向 5'-CCAAAGAAGATCAATCATGGTCA-3'
	反向 5'-GTCTTAATTTTCAGCTTGACCAT-3'

2.7 免疫组化法 (IHC) 检测结肠组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达 取大鼠结肠组织切片, 常规脱蜡, 水化, 高压热修复, 封闭, 分别加入 ZO-1、Occludin 抗体 (1:1 000) 及相应二抗 (1:400), 37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 于显微镜下观察。ZO-1、Occludin 阳性反应呈棕色时, 随机选取 7 个 200 倍视野对切片进行图像分析, 通过 Image J 软件计算阳性细胞面积。

2.8 Western blot 法检测结肠组织 TLR4、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达 取大鼠结肠组织 100 mg, 提取蛋白, BCA 法检测浓度, 加入 5×loading buffer 后 95 °C 加热变性, 制备 10% 聚丙烯酰胺凝胶, 蛋白上样, 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 分别加一抗 β-actin (1:8 000)、TLR4 (1:1 000)、MyD88 (1:1 000)、NF-κB p65 (1:1 000), 4 °C 摇床孵育过夜, 次日加二抗 (1:8 000), 孵育 2 h, ECL 发光显色, 凝胶成像系统曝光, 采用 Image J 软件对图像进行灰度分析。以 β-actin 为内参, 计算蛋白相对表达。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理, 满足正态性和方差齐性的计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较使用 LSD 法。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 运脾通肠方对脾肾阳虚型 OIC 大鼠一般情况及中医证候评分的影响 空白组大鼠反应敏捷,

皮毛光亮, 饮食排便正常; 模型组大鼠反应冷漠, 皮毛暗淡, 喜扎堆抱团, 腹部饱满, 大便减少、质干; 运脾通肠方各剂量组大鼠在对外界反应、活动度、腹部外形、大便干燥量少等方面均有不同程度的改善。与空白组比较, 模型组中医证候评分升高 (P<0.05, P<0.01); 与模型组比较, 运脾通肠方高、中剂量组和枸橼酸莫沙必利片组中医证候评分均降低 (P<0.01), 以中剂量组更明显, 见表 3。

表 3 各组大鼠中医证候评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

Tab. 3 Comparison of TCM syndrome score of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

组别	中医证候评分/分
空白组	9.38±2.07
模型组	23.00±2.57**
运脾通肠方高剂量组	13.25±3.20##
运脾通肠方中剂量组	10.38±1.77##
运脾通肠方低剂量组	15.38±3.51##
枸橼酸莫沙必利片组	14.88±3.40##

注: 与空白组比较, \*\*P<0.01; 与模型组比较, ##P<0.01。

3.2 运脾通肠方对脾肾阳虚型 OIC 大鼠排便情况的影响 与空白组比较, 模型组大鼠粪便含水率、小肠推进率均降低 (P<0.05, P<0.01), 首粒黑便排出时间延长 (P<0.01)。与模型组比较, 运脾通肠方中剂量组和枸橼酸莫沙必利片组大鼠粪便含水率、小肠推进率均升高 (P<0.05, P<0.01), 首粒黑便排出时间缩短 (P<0.01); 运脾通肠方高剂量组大鼠粪便含水率升高 (P<0.05); 运脾通肠方高、低剂量组大鼠首粒黑便排出时间均缩短 (P<0.01)。见表 4。

表 4 各组大鼠排便情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

Tab. 4 Comparison of defecation condition of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

组别	粪便含水率/%	首粒黑便排出时间/min	小肠推进率/%
空白组	65.92±7.17	290.38±9.94	65.07±3.48
模型组	54.92±4.51**	316.13±8.64**	51.66±2.32*
运脾通肠方高剂量组	63.58±9.52#	296.00±6.97##	53.19±3.74
运脾通肠方中剂量组	65.14±4.45##	292.63±7.19##	64.29±8.78#
运脾通肠方低剂量组	58.32±5.48	301.38±9.19##	54.48±10.56
枸橼酸莫沙必利片组	68.17±6.56##	287.25±7.98##	68.38±7.99#

注: 与空白组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01; 与模型组比较, #P<0.05, ##P<0.01。

3.3 运脾通肠方对脾肾阳虚型 OIC 大鼠结肠组织病理学的影响 空白组大鼠结肠黏膜完整, 无水腫, 炎性浸润较少, 上皮细胞形态正常, 杯状细胞排列规整, 腺体数目未减少; 模型组大鼠可见黏膜及黏膜下层水肿、炎性浸润, 上皮细胞脱落、缺失, 腺体数目和杯状细胞减少, 结构稍有紊乱; 枸

橼酸莫沙必利片组和运脾通肠方各剂量组大鼠黏膜水肿和炎性浸润均有不同程度的减轻, 其中运脾通肠方中剂量组上皮细胞、杯状细胞、腺体排列均较规整, 枸橼酸莫沙必利片组和运脾通肠方高、低剂量组次之, 见图 1。

3.4 运脾通肠方对脾肾阳虚型 OIC 大鼠血清 TNF-

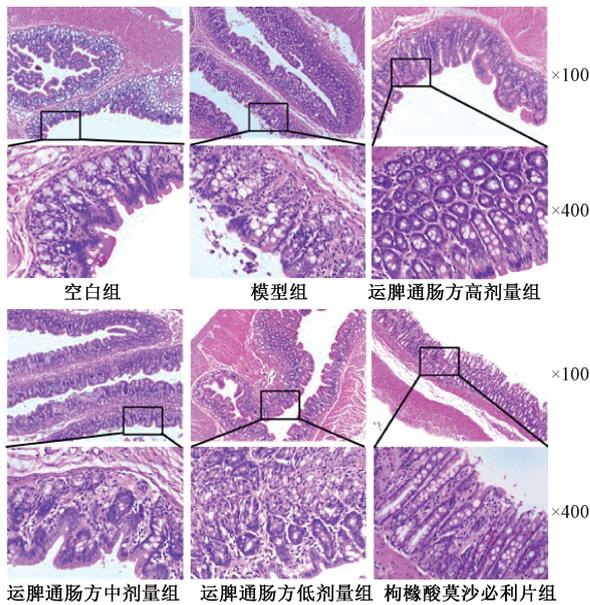


图1 各组大鼠结肠组织病理学变化 (HE 染色)

Fig. 1 Histopathological change of rat colon in each group (HE staining)

表5 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平比较 (pg/mL,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Tab. 5 Comparison of serum TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  levels in rats in each group (pg/mL,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
空白组	30.76 $\pm$ 4.33	86.25 $\pm$ 14.65	329.80 $\pm$ 69.50
模型组	142.40 $\pm$ 17.25**	293.30 $\pm$ 17.21**	805.00 $\pm$ 98.15**
运脾通肠方高剂量组	48.14 $\pm$ 7.31##	141.00 $\pm$ 10.08##	230.60 $\pm$ 83.93##
运脾通肠方中剂量组	28.34 $\pm$ 4.86##	97.69 $\pm$ 36.00##	207.50 $\pm$ 74.06##
运脾通肠方低剂量组	28.34 $\pm$ 4.86##	161.50 $\pm$ 10.28##	297.00 $\pm$ 44.40##
枸橼酸莫沙必利片组	42.60 $\pm$ 7.62##	135.10 $\pm$ 8.88##	203.20 $\pm$ 60.65##

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

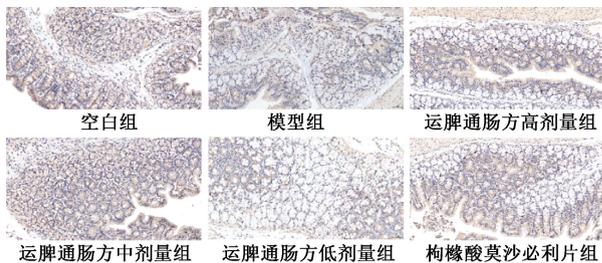


图2 各组大鼠结肠组织 ZO-1 表达 (IHC,  $\times 200$ )

Fig. 2 Expression of ZO-1 in rat colon tissue in each group (IHC,  $\times 200$ )

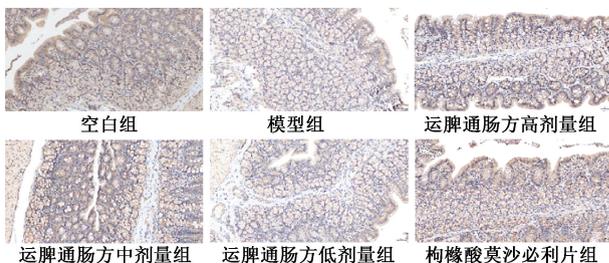


图3 各组大鼠结肠组织 Occludin 表达 (IHC,  $\times 200$ )

Fig. 3 Expression of Occludin in rat colon tissue in each group (IHC,  $\times 200$ )

$\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平均升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,运脾通肠方各剂量组及枸橼酸莫沙必利片组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平均降低 ( $P<0.01$ ),见表5。

3.5 运脾通肠方对脾肾阳虚型 OIC 大鼠结肠组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达均降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,运脾通肠方高、中剂量组及枸橼酸莫沙必利片组 ZO-1、Occludin 蛋白表达均升高 ( $P<0.01$ ),运脾通肠方低剂量组 Occludin 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ ),见图2~3、表6。

3.6 运脾通肠方对脾肾阳虚型 OIC 大鼠结肠组织 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达均升高 ( $P<0.01$ );与模型

表6 各组大鼠结肠组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Tab. 6 Comparison of ZO-1 and Occludin protein expressions in rat colon tissue in each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	ZO-1/%	Occludin/%
空白组	14.28 $\pm$ 1.64	24.35 $\pm$ 5.32
模型组	6.11 $\pm$ 0.92**	6.43 $\pm$ 1.23**
运脾通肠方高剂量组	10.34 $\pm$ 1.41##	16.11 $\pm$ 3.13##
运脾通肠方中剂量组	15.20 $\pm$ 1.04##	20.37 $\pm$ 2.34##
运脾通肠方低剂量组	7.77 $\pm$ 1.82	17.45 $\pm$ 8.69##
枸橼酸莫沙必利片组	13.83 $\pm$ 2.94##	18.90 $\pm$ 3.09##

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

组比较,运脾通肠方高剂量组 TLR4 mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ ),中剂量组 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),低剂量组 MyD88 mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ ),枸橼酸莫沙必利片组 TLR4、MyD88 mRNA 表达均降低 ( $P<0.05$ ),见表7。

3.7 运脾通肠方对脾肾阳虚型 OIC 大鼠结肠组织

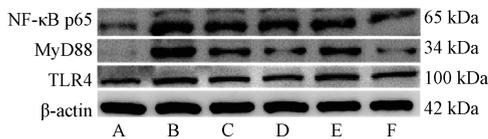
TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达均升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,运脾通肠方高、中剂量组及枸橼酸莫沙必利片组大鼠结肠组织 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达均降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),运脾通肠方低量组 MyD88、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达均降低 ( $P < 0.05$ ),见图 4、表 8。

表 7 各组大鼠结肠组织 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Tab. 7 Comparison of mRNA expressions of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 in rat colon tissue in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	TLR4	MyD88	NF- $\kappa$ B p65
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	4.70±1.37**	3.69±0.75**	6.44±1.96**
运脾通肠方高剂量组	2.18±0.23#	2.65±0.64	3.50±0.32
运脾通肠方中剂量组	1.77±0.39#	1.57±0.16##	2.76±0.58#
运脾通肠方低剂量组	3.12±0.97	2.03±0.30#	4.80±1.78
枸橼酸莫沙必利片组	1.97±0.52#	2.33±0.34#	3.93±0.98

注:与空白组比较,\*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ 。



注: A 为空白组, B 为模型组, C~E 分别为运脾通肠方高、中、低剂量组, F 为枸橼酸莫沙必利片组。

图 4 各组大鼠结肠组织 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 蛋白条带

Fig. 4 Protein bands of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 in rat colon tissue in each group

表 8 各组大鼠结肠组织 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Tab. 8 Comparison of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 protein expressions in rat colon tissue in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	TLR4	MyD88	NF- $\kappa$ B p65
空白组	0.61±0.06	0.15±0.11	0.37±0.02
模型组	1.05±0.05**	0.99±0.07**	0.98±0.09**
运脾通肠方高剂量组	0.84±0.11#	0.63±0.02##	0.78±0.05##
运脾通肠方中剂量组	0.75±0.15##	0.47±0.09##	0.74±0.08##
运脾通肠方低剂量组	0.93±0.10	0.83±0.09#	0.85±0.07#
枸橼酸莫沙必利片组	0.78±0.10##	0.48±0.14##	0.49±0.07##

注:与空白组比较,\*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

OIC 在中医中属“便秘”范畴<sup>[18]</sup>,其病机可

归纳为气阴两虚、津亏肠燥、肺脾气虚、脾肾阳虚等 6 类<sup>[19-20]</sup>。全国名中医张志明结合临床实践,指出 OIC 核心病机为脾肾阳虚,其形成与癌痛患者正气虚损有关,以气虚、阳虚为主,加之阿片类药物性味酸涩寒凝,导致机体气机升降失调、腑气壅滞,最终脾失运化、肾失温煦,肠腑传导失司而发病,基于此提出“温补脾肾、调气通便”治法,创制运脾通肠方。方中附子、干姜温补脾肾之阳,红参、白术健脾益气,酒大黄清热通便而不伤正,木香、厚朴、槟榔理气导滞,肉苁蓉润肠通便,全方通补兼施,契合脾肾阳虚型 OIC 的病机特点。

莫沙必利作为选择性 5-HT<sub>4</sub> 受体激动剂,通过增强胃肠动力改善黏膜 5-HT 信号传导障碍,同时可能间接缓解炎症相关病理状态<sup>[21]</sup>。本研究以阿片受体激动剂盐酸洛哌丁胺,联合活性炭冰水和白醋交替灌胃来建立病证结合的脾肾阳虚型 OIC 大鼠模型,以运脾通肠方和枸橼酸莫沙必利灌胃给药,结果显示造模后大鼠出现精神萎靡、毛发干枯、身体蜷缩、扎堆抱团、粪便干燥、排便时间延长等脾肾阳虚便秘体征,而运脾通肠方干预后可改善便秘与上述体征,以中剂量效果较佳。

阿片类药物不仅激活阿片受体,还激活 TLR4,并且 TLR4 募集 MyD88 复合体形成,通过信号转导激活核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B),促进促炎细胞因子产生<sup>[7]</sup>。肠道炎症是便秘病程中的相互作用因素,过度炎症浸润会破坏肠道屏障完整性和肠道内环境稳态,影响肠道分泌和蠕动<sup>[22-23]</sup>。Occludin、ZO-1 等是构成肠道上皮细胞紧密连接的重要结构蛋白,低表达会影响肠黏膜上皮屏障完整性,造成肠道低渗环境,肠内水分流失,从而引起便秘<sup>[24]</sup>。本研究发现,模型组大鼠结肠病理组织炎症明显,血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症因子水平升高,而运脾通肠方干预后可降低结肠组织炎症和三者水平;模型组大鼠结肠组织中 Occludin、ZO-1 蛋白表达降低,而运脾通肠方干预后两者蛋白表达升高;模型组大鼠结肠组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 mRNA、蛋白表达升高,而运脾通肠方干预后能降低三者表达。

综上所述,运脾通肠方可能是通过调控 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 信号通路,降低肠黏膜炎症损伤与改善肠黏膜屏障,从而改善脾肾阳虚型 OIC 大鼠便秘症状。随着研究的深入,该方更多的生物学关联机制将被发掘,炎症通路可能成为治疗 OIC 的新靶向。

参考文献:

- [ 1 ] 王 玥, 蒋 葵. 阿片类药物引起的便秘病理机制及治疗进展[J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48(16): 852-857.
- [ 2 ] 张 廷, 查安生. 中西医疗阿片类药物相关性便秘研究进展[J]. 中国中医药图书情报杂志, 2024, 48(3): 249-253.
- [ 3 ] Farmer A D, Drewes A M, Chiarioni G, et al. Pathophysiology and management of opioid-induced constipation: European expert consensus statement[J]. *United European Gastroenterol J*, 2019, 7(1): 7-20.
- [ 4 ] 倪嘉淳, 蔡增进, 江 琼, 等. 药物治疗阿片类药物所致便秘的研究进展[J]. 中国全科医学, 2022, 25(12): 1499-1505.
- [ 5 ] Arbolea S, Watkins C, Stanton C, et al. Gut bifidobacteria populations in human health and aging[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1204.
- [ 6 ] Zhang X, Yang H, Zheng J, et al. Chitosan oligosaccharides attenuate loperamide-induced constipation through regulation of gut microbiota in mice[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 253: 117218.
- [ 7 ] Zare N, Pourhadi M, Vaseghi G, et al. The potential interplay between opioid and the toll-like receptor 4 (TLR-4) [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2023, 45(2): 240-252.
- [ 8 ] 蒋宛瑾, 谢 聪, 喻 嵘, 等. 白虎加人参汤对转基因2型糖尿病 MKR 小鼠肠道 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路及肠道屏障功能的影响[J]. 中草药, 2020, 51(11): 3005-3012.
- [ 9 ] He Q, Han C, Huang L, et al. Astragaloside IV alleviates mouse slow transit constipation by modulating gut microbiota profile and promoting butyric acid generation[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(16): 9349-9361.
- [ 10 ] Wang W, Liu Y, Yang X, et al. Effects of electroacupuncture for opioid-induced constipation in patients with cancer in China: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Netw Open*, 2023, 6(2): e230310.
- [ 11 ] Zhang J, Mao L, Wang L, et al. Pharmacological and non-pharmacological treatments for opioid-induced constipation: a protocol for systematic review and network meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(4): e14161.
- [ 12 ] 赵海宏, 张录梅, 宋忠阳, 等. 张志明基于运脾法治疗慢性便秘经验[J]. 吉林中医药, 2024, 44(10): 1171-1175.
- [ 13 ] Hou M L, Chang L W, Lin C H, et al. Comparative pharmacokinetics of rhein in normal and loperamide-induced constipated rats and microarray analysis of drug-metabolizing genes[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1291-1299.
- [ 14 ] 岳 奇, 刘 聪, 王玉娥, 等. 阳虚便秘大鼠模型的建立及评价[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(45): 143-145; 153.
- [ 15 ] 徐叔云, 卞如谦, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [ 16 ] 张声生, 沈 洪, 张 露, 等. 便秘中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. 中医杂志, 2017, 58(15): 1345-1350.
- [ 17 ] 王 婷, 刘志勇, 罗黎明, 等. 当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 37-48.
- [ 18 ] 周稼荣, 张铁军, 刘 毅, 等. 中医药治疗阿片类药物所致便秘的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(4): 1220-1229.
- [ 19 ] 孙少华, 高 宏, 唐广义. 阿片药物性便秘的中医证型分布规律及相关因素分析[J]. 云南中医中药杂志, 2019, 40(12): 31-32.
- [ 20 ] 陈 冬, 俞森权, 朱红叶, 等. 阿片类药物诱导便秘的中医证型研究[J]. 陕西中医药大学学报, 2019, 42(5): 89-91; 108.
- [ 21 ] Tack J, Masuy I, van Den Houste K, et al. Drugs under development for the treatment of functional dyspepsia and related disorders[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28(10): 871-889.
- [ 22 ] Dong L, Xu Z, Huang G, et al. Lychee pulp-derived dietary fiber-bound phenolic complex upregulates the SCFAs-GPRs-ENS pathway and aquaporins in loperamide-induced constipated mice by reshaping gut microbiome[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(41): 15087-15096.
- [ 23 ] Lin L, Jiang Y, Lin P, et al. Classical famous prescription of Jichuan decoction improved loperamide-induced slow transit constipation in rats through the cAMP/PKA/AQPs signaling pathway and maintained inflammatory/intestinal flora homeostasis[J]. *Heliyon*, 2023, 10(1): e21870.
- [ 24 ] Wen Y, Zhan Y, Tang S Y, et al. Zhizhu Decoction alleviates intestinal barrier damage via regulating SIRT1/FoxO1 signaling pathway in slow transit constipation model mice[J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(9): 809-817.