

基于 p38/MLCK 信号通路探讨疏肝止泻方对肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征大鼠肠道通透性的影响

赖学倩¹, 刘俊宏^{2*}, 李亚静², 王淼蕾², 张金雪³, 王丹³, 苏李宁³, 王亮¹

[1. 甘肃省妇幼保健院(甘肃省中心医院), 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000]

摘要: **目的** 探讨疏肝止泻方对肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征(IBS-D) 大鼠肠道通透性的影响。**方法** 50只雄性Wistar大鼠随机分为空白组、模型组、匹维溴铵组(0.013 5 g/kg)及疏肝止泻方低、中、高剂量组(2.57、5.13、10.26 g/kg)。除空白组外,其余组均以饥饱失常+束缚夹尾应激+肠道灌注乙酸建立肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠模型。给药干预后,HE染色观察结肠组织形态;ELISA法检测血浆D-LA水平及血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平;Western blot、RT-qPCR法检测结肠组织GDNF、S100 β 、iNOS、ZO-1蛋白及mRNA表达;免疫组织化学法检测结肠组织p38、MLCK蛋白表达。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠结肠黏膜中有少量炎性细胞浸润,体质量降低($P<0.01$);血浆D-LA水平及血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平升高($P<0.01$);结肠组织p38、MLCK蛋白表达升高($P<0.01$),GDNF、S100 β 、ZO-1蛋白和mRNA表达降低($P<0.01$),iNOS蛋白和mRNA表达升高($P<0.01$)。与模型组比较,疏肝止泻方中、高剂量组大鼠结肠黏膜中炎性细胞浸润减轻,体质量升高($P<0.01$);血浆D-LA水平及血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平降低($P<0.01$);结肠组织p38、MLCK蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),GDNF、S100 β 、ZO-1蛋白和mRNA表达升高($P<0.05$, $P<0.01$),iNOS蛋白和mRNA表达降低($P<0.01$)。**结论** 疏肝止泻方可以降低IBS-D大鼠肠道通透性,维持肠黏膜屏障正常功能,缓解肠道炎症状态,其作用与抑制p38/MLCK信号通路活化,减少炎性因子分泌有关。

关键词: 疏肝止泻方;腹泻型肠易激综合征;肝郁脾虚证;肠道通透性;肠道炎症;p38/MLCK信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)04-1156-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.04.012

Effects of Shugan Zhixie Formula on intestinal permeability of diarrheal irritable bowel syndrome rats with Liver Depression and Spleen Deficiency based on p38/MLCK signaling pathway

LAI Xue-qian¹, LIU Jun-hong^{2*}, LI Ya-jing², WANG Miao-lei², ZHANG Jin-xue³, WANG Dan³, SU Li-ning³, WANG Liang¹

[1. Gansu Provincial Maternal and Child Health Hospital (Gansu Provincial Central Hospital), Lanzhou 730000, China; 2. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China]

ABSTRACT: AIM To investigate the effect of Shugan Zhixie Formula on intestinal permeability of diarrheal irritable bowel syndrome (IBS-D) rats with Liver Depression and Spleen Deficiency. **METHODS** Fifty male Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, pinaverium bromide group (0.013 5 g/kg) and

收稿日期: 2025-03-27

基金项目: 国家自然科学基金(81660773); 2022年青年岐黄学者基金项目(国中医药人教函[2022]256号); 甘肃省科学技术厅重点研发计划项目(22YFTFA100); 甘肃省卫生健康委员会项目(21JR7RA682); 中共甘肃省委组织部省级重点人才项目(2022RCXM020); 甘肃省中医药管理局重点项目(GZKZ-2021-6); 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSQN2022-01); 兰州市科技计划项目(2021-1-98); 甘肃中医药大学附属医院院内课题(gzfy-2021-14)

作者简介: 赖学倩(1996—),女,硕士,住院医师,从事中西医结合防治消化系统疾病的研究。E-mail: hilaiXueqian@163.com

* **通信作者:** 刘俊宏(1976—),男,博士,主任医师,博士生导师,从事中西医结合防治消化系统疾病的研究。E-mail: lhz8686@163.com

low, medium and high dose groups of Shugan Zhixie Formula (2.57, 5.13, 10.26 g/kg). Except the blank group, the IBS-D rat models of Liver Depression and Spleen Deficiency were established by starvation disorder+ restraint tail-clamping stress+ intestinal perfusion of acetic acid in the other groups. After the intervention, the morphology of colon tissue was observed by HE staining. The levels of plasma D-LA and serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 were detected by ELISA. The protein and mRNA expressions of GDNF, S100 β , iNOS, ZO-1 in colon tissue were detected by Western blot and RT-qPCR. The protein expressions of p38 and MLCK in colon tissue were detected by immunohistochemistry. **RESULTS** Compared with the blank group, the rats in the model group had a small amount of inflammatory cell infiltration in the mucosa, and the body weight decreased ($P<0.01$). The levels of plasma D-LA and serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 increased ($P<0.01$). The protein expressions of p38 and MLCK in colon tissue increased ($P<0.01$), the protein and mRNA expressions of GDNF, S100 β , ZO-1 decreased ($P<0.01$), while the protein and mRNA expression of iNOS increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the infiltration of inflammatory cells in the colon mucosa of rats in the middle and high dose groups of Shugan Zhixie Formula were reduced, and the body weight was increased ($P<0.01$). The levels of plasma D-LA and serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 decreased ($P<0.01$). The protein expressions of p38 and MLCK in colon tissue decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), the protein and mRNA expressions of GDNF, S100 β , ZO-1 increased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the protein and mRNA expression of iNOS decreased ($P<0.01$). **CONCLUSION** Shugan Zhixie Formula can reduce the intestinal permeability of IBS-D rats, maintain the normal function of intestinal mucosal barrier, and relieve the intestinal inflammatory state, which is related to inhibiting the activation of p38/MLCK signaling pathway and reducing the secretion of inflammatory factors.

KEY WORDS: Shugan Zhixie Formula; diarrhea irritable bowel syndrome; Liver Depression and Spleen Deficiency; intestinal permeability; intestinal inflammation; p38/MLCK signaling pathway

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是一种以腹痛、腹胀和排便改变为主要表现的肠道功能紊乱性疾病^[1], 常见类型包括腹泻型、便秘型、混合型和不定型, 我国最常见的为腹泻型肠易激综合征 (diarrheal irritable bowel syndrome, IBS-D)^[2]。流行病学调查显示, IBS 全球患病率 3.8%~10.1%, 其发病机制复杂, 与肠道通透性改变、内脏高敏性、脑肠轴紊乱、肠道菌群紊乱等因素相关^[3]。正常情况下, 肠胶质细胞 (enteric glial cell, EGC) 通过释放胶质源性神经营养因子 (glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)、钙结合蛋白 (S calcium binding protein β , S100 β) 等^[4], 促进紧密连接 (tight junction, TJ) 的表达, 修复肠黏膜屏障^[5]。当 EGC 被白介素 (interleukin, IL) -1 β 、IL-6 病理性激活时, 分泌 S100 β , S100 β 诱导一氧化氮合酶 (inducible isoform of nitric oxide synthase, iNOS) 的释放, 激活 p38 信号通路, p38 进一步磷酸化, 促进肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 和 IL-6 分泌增加, 诱导肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 转录, 促进肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 特异性磷酸化, 破

坏闭锁小带蛋白-1 (Zonula occluden-1, ZO-1) 表达, 导致肠道通透性增加, 加剧炎性浸润, 使得肠黏膜屏障进一步受损, 引起 IBS-D 的发生^[6-8]。传统中药治疗 IBS 具有多靶点、多层次、价廉、个体化等独特优势, 是当前研究的热点。疏肝止泻方是国医大师周信有在《丹溪心法》记载的痛泻要方的基础上加减化裁所得, 是治疗 IBS-D 的经验方, 具有疏肝健脾、燥湿止泻之效。故本实验以肠道通透性为切入点, 探讨疏肝止泻方对肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠肠道通透性及 p38/MLCK 信号通路的影响, 以期为今后疏肝止泻方的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物 50 只 SPF 级 Wistar 雄性大鼠, 体质量 (200 \pm 20) g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010], 饲养于甘肃中医药大学实验中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2021-0004], SPF 级环境, 温度 (23 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (50 \pm 10)%, 12 h/12 h 昼夜循环, 分笼给予普通饲料喂养, 动物饲料及垫料由甘肃中医药大学实验中心提供。本动物实验取得甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理审批号 2023-598)。

1.2 药物 疏肝止泻方由焦白术 18 g、炒白芍 12 g、炒陈皮 9 g、姜石 9 g、防风 6 g、花椒 3 g 组成,中药配方颗粒由甘肃中医药大学附属医院中药配方颗粒药房提供。匹维溴铵片(得舒特),规格 50 mg/片,国药准字 HJ20160396,由法国 Mylan Laboratories SAS 公司生产,购于甘肃中医药大学附属医院西药房。

1.3 试剂 D-乳酸(D-Lactic acid, D-LA)、TNF- α 、IL-6、IL-1 β ELISA 检测试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,批号 2305R35、2305R36、2305R37、2305R33);GDNF 抗体(美国 Santa Cruz 公司,货号 SC-13147);ZO-1、S100 β 抗体(美国 Gene Tex 公司,货号 GTX108627、GTX129573);iNOS 抗体(英国 Abcam 公司,批号 GR3367142-2);GAPDH 抗体(美国 ImmunoWay 公司,货号 YM3215)。

1.4 仪器 6 Fr 导尿管(江苏凯寿医用器材有限公司,批号 20230105);WD-9423C 全自动化学发光成像系统(北京六一生物科技有限公司);HBS-1096A 酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);K5800 微量核酸测定仪(北京凯奥科技发展有限公司);A300PCR 扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司);荧光定量 PCR 仪[鲲鹏基因(北京)科学仪器有限公司]。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 50 只 Wistar 雄性大鼠适应性喂养 1 周后,按照随机数字表法分为空白组和造模组。造模组大鼠禁食不禁水 12 h,用固定器固定后,将石蜡润滑过的 6 Fr 导尿管缓慢轻柔地送入大鼠肛门近端结肠 6~8 cm 处,导尿管另一端连接注射器,注入 1 mL 4% 乙酸,提尾等待 30 s 后灌入等剂量 PBS 缓冲液。第 2 周开始,造模组大鼠在肠道灌注乙酸的基础上同时进行束缚夹尾应激,每日用塑料夹夹住尾巴近 1/3 处 1 h,饮食予以饱食 1 d,禁食 1 d,2 d 为 1 个周期,正常饮水,共造模 3 周^[9-10]。空白组(8 只)大鼠不予以干预,正常进食和饮水。造模 21 d 后,将造模组大鼠分为模型组(10 只)、匹维溴铵组(8 只)和疏肝止泻方低、中、高剂量组(各 8 只)。实验过程中共有 1 只大鼠出现血便后死亡。每日束缚夹尾应激前,观察大鼠精神状态、皮毛色泽、活动度、对束缚的反应性等情况。于造模前后及给药后的上午 9:00 称定大鼠体质量^[11]。

参考《实验药理学方法学》中成人与大鼠体表面等效剂量换算公式^[12],大鼠剂量=人临床剂量/

体质量 $\times 6.3$,以每天给药剂量 5.13 g/kg 作为疏肝止泻方中剂量,分别以其 0.5、2 倍剂量作为疏肝止泻方低(2.57 g/kg)、高(10.26 g/kg)剂量,将中药颗粒倒入灭菌后的研钵中充分研磨,加蒸馏水配制成相应的给药剂量,于 4℃ 冰箱保存。匹维溴铵片成人 1 天用量为 0.15 g,根据成人与大鼠体表面等效剂量换算公式^[12],大鼠匹维溴铵每天给药剂量为 0.013 5 g/kg。造模后各组大鼠灌胃给药,连续 14 d。

2.2 大鼠一般状态观察 每日观察并记录各组大鼠体质量、精神状态、嗜睡程度、毛发等情况,计算体质量增长率。

2.3 腹泻指标评价 分别于造模前后及给药结束后,收取各组大鼠 4 h 新鲜粪便,称定质量记为湿重,随后放入烘箱中烘干(75℃,2.5 h)至质量不再变化,称定质量记为干重,计算粪便含水量,公式为粪便含水量 = [(湿重 - 干重) / 湿重] $\times 100\%$ ^[13]。

2.4 ELISA 法检测血浆 D-LA 水平及血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平 将麻醉后的大鼠仰卧固定于动物台上,操作者右手持针头注射器,在大鼠左侧心尖搏动最强处进针,刺入心内,迅速采血 4 mL,分别置于红管(无添加剂采血管)和紫管(含抗凝剂采血管)中。收集好的血液室温静置 2 h 后,3 000 r/min 离心 15 min,取血清、血浆分别收集至 EP 管内并做好标记,按照试剂盒说明书步骤加样、显色,通过酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(A)值,代入标准曲线方程计算样品浓度。

2.5 结肠黏膜组织病理学观察 心脏采血结束后颈椎脱臼处死大鼠,沿腹正中线剖开腹腔后,分离出结肠组织,取距肛缘 6~8 cm 处截取结肠组织 2~3 cm,用 0.9% 生理盐水冲洗结肠组织肠腔及肠壁。结肠组织于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,取出修剪并用流水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制备切片。切片用二甲苯脱蜡,无水乙醇、95% 乙醇、75% 乙醇分别浸泡 5 min,蒸馏水冲洗,于苏木素染液中染色,1% 盐酸乙醇分化,氢氧化铵溶液返蓝,流水冲洗后,于伊红染液中染色,梯度乙醇脱水处理,二甲苯透明,自然风干后用中性树胶封片,于显微镜下观察结肠黏膜组织病理变化。

2.6 免疫组化法检测结肠组织 p38、MLCK 蛋白表达 取结肠组织石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇浸泡后蒸馏水冲洗,枸橼酸钠缓冲液抗原修复,

3%双氧水灭活，PBS冲洗后，加入3%BSA进行封闭，滴加p38、MLCK一抗（抗体浓度按照说明书配制）4℃孵育过夜，滴加二抗室温孵育，DAB显色，于显微镜下观察到阳性信号表达呈棕黄色后，蒸馏水冲洗终止显色，苏木素复染细胞核，1%盐酸乙醇溶液返蓝，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，自然风干后用中性树脂胶封片。采集图片后通过Image J软件测定结肠组织p38、MLCK蛋白表达阳性区域光密度值。

2.7 Western blot法检测结肠组织GDNF、S100β、iNOS、ZO-1蛋白表达 每组随机选取3只大鼠，称取100 mg结肠组织，冰盐水冲洗后，加入裂解液和不锈钢研磨珠，充分匀浆，离心后收集上清液，即为总蛋白，加入5×上样缓冲液金属浴煮沸10 min进行变性。蛋白上样，经电泳、转膜后加5%脱脂奶粉封闭液封闭，加入稀释后的一抗GDNF、S100β、iNOS、ZO-1、GAPDH 4℃孵育过夜，加入稀释后的二抗室温孵育1 h，于PVDF膜上滴加ECL发光液，避光静置3 min后进行曝光，通过Image J软件分析蛋白条带灰度值，以目的蛋白条带灰度值与内参GAPDH条带灰度值的比值表示相对表达量。

2.8 RT-qPCR法检测结肠组织GDNF、S100β、iNOS、ZO-1 mRNA表达 每组随机选取3只大鼠，称取100 mg结肠组织，采用TRIzol法提取组织RNA，按照试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA，反应体系20 μL，反应条件25℃ 5 min，55℃ 15 min，85℃ 5 min。随后进行扩增反应，反应体系20 μL，反应条件95℃预变性5 min，1个循环；95℃变性10 s，55~60℃退火20 s，40个循环。以β-actin为内参，采用2^{-ΔΔCT}法计算目的基因mRNA相对表达。引物由博迈德生物科技公司合成，序列见表1。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列	产物长度/bp
GDNF	正向 5'-ACACTCGAGGAGGAAGGACA-3'	114
	反向 5'-CAATCGCAACTGGTGACG-3'	
S100β	正向 5'-GAGCTTCTCTGTCTACCCTCC-3'	157
	反向 5'-TGTCACCTCTCTCCCTGAAT-3'	
iNOS	正向 5'- TTCAGGACACCCTTACCAC-3'	103
	反向 5'- CTGGGTCCTCTGGTCAAATC-3'	
ZO-1	正向 5'-GATCCGAATTACCTTGTTGG-3'	211
	反向 5'-GGCATGCTCACTAACCTT-3'	
β-actin	正向 5'- ACCCGCGAGTACAACCTTCT-3'	260
	反向 5'- GTCAGGATGCCTCTTGGCT-3'	

2.9 统计学分析 通过SPSS 26.0软件进行处理，符合正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示，2组间比较采用双样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐时，两两比较采用LSD法，方差不齐则采用Dunnett检验；计量资料不符合正态分布时，组间比较采用非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 疏肝止泻方对肝郁脾虚型IBS-D大鼠一般情况的影响 造模前，各组大鼠精神状态良好，活动灵敏，饮食、饮水正常，毛发光泽顺滑，大便次数正常，大便成形且呈颗粒状。造模第1天，有1只大鼠出现血便后单独喂养，第2天死亡，随机挑选1只备用鼠继续造模。造模后，空白组大鼠整体健康状况良好，无异常体征；造模组大鼠精神倦怠，喜扎堆蜷卧，食欲不振，烦躁易怒，毛发干枯粗糙，毛色暗淡且易脱落，形体消瘦，进食减少，大便次数增多，粪质稀溏且气味臭秽，肛周毛发附着稀便等表现。给药后，各给药组大鼠精神状态、活动量、饮食、饮水、毛发、情绪、大便、体质量较模型组大鼠均明显好转，肛周毛发干净，无粪便附着。

3.2 疏肝止泻方对肝郁脾虚型IBS-D大鼠体质量和粪便含水量的影响 造模前，各组大鼠体质量比较无显著差异 ($P > 0.05$)；造模21 d后，与空白组比较，造模组大鼠体质量降低 ($P < 0.01$)，粪便含水量增加 ($P < 0.01$)；给药14 d后，与模型组比较，疏肝止泻方各剂量组大鼠体质量升高 ($P < 0.01$)，匹维溴铵组和疏肝止泻方各剂量组大鼠粪便含水量均减少 ($P < 0.01$)，见表2~3。

3.3 疏肝止泻方对肝郁脾虚型IBS-D大鼠血浆D-LA水平及血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平的影响 与空白组比较，模型组大鼠血浆D-LA水平和血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平均升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，匹维溴铵组和疏肝止泻方各剂量组大鼠血浆D-LA水平和血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平均降低 ($P < 0.01$)，见表4。

3.4 疏肝止泻方对肝郁脾虚型IBS-D大鼠结肠黏膜组织病理学的影响 与空白组比较，模型组大鼠可见黏膜及黏膜下层少量炎性细胞浸润；与模型组比较，疏肝止泻方低剂量组大鼠黏膜下层极少量炎性细胞浸润，疏肝止泻方中剂量组黏膜下层疏松水肿，匹维溴铵组和疏肝止泻方高剂量组黏膜结构完整，上皮细胞排列有序，腺体结构规整，未见毛细血管明显充血、水肿，肌层完整，见图1。

表2 各组大鼠体质量比较 (g, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 2 Comparison of body weight of rats in each group (g, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	0 d	21 d	35 d
空白组	197.71±8.99	220.22±10.44	240.53±9.11
模型组	207.76±9.25	174.88±6.74**	200.45±9.87**
匹维溴铵组	198.21±9.27	186.88±11.42**	208.51±7.15
疏肝止泻方低剂量组	197.79±11.62	175.55±9.21**	217.88±12.42##
疏肝止泻方中剂量组	201.16±9.94	181.40±5.71**	235.55±8.73##
疏肝止泻方高剂量组	206.67±11.22	176.42±9.22**	239.49±5.20##

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

表3 各组大鼠粪便含水量比较 (% , $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 3 Comparison of fecal water content of rats in each group (% , $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	0 d	21 d	35 d
空白组	38.96±1.40	38.78±1.05	42.28±2.45
模型组	32.16±1.67	66.85±2.14**	67.23±2.42**
匹维溴铵组	35.25±1.95	66.92±1.91**	39.19±1.99##
疏肝止泻方低剂量组	34.87±1.05	69.13±1.45**	56.55±1.84##
疏肝止泻方中剂量组	36.86±1.53	70.54±2.93**	48.37±1.72##
疏肝止泻方高剂量组	37.62±2.02	68.54±2.34**	35.66±1.57##

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

表4 各组大鼠血浆 D-LA 水平及血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 4 Comparison of plasma D-LA levels and serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in rats of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	D-LA/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	TNF- α /($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-1 β /($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白组	405.45±40.04	139.05±9.20	10.22±1.38	48.79±5.02
模型组	1 047.17±41.36**	296.52±32.91**	28.96±3.03**	114.24±10.58**
匹维溴铵组	657.57±48.51##	214.65±7.48##	22.62±0.82##	79.71±2.16##
疏肝止泻方低剂量组	729.41±34.54##	243.65±9.15##	25.15±0.91##	91.67±3.04##
疏肝止泻方中剂量组	615.73±62.38##	190.65±24.81##	18.16±1.12##	78.57±4.10##
疏肝止泻方高剂量组	510.54±25.17##	163.24±21.88##	14.11±1.00##	60.07±3.43##

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

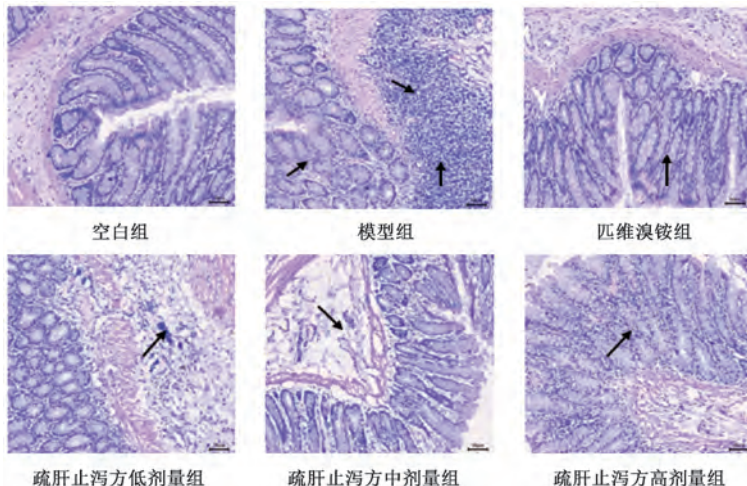


图1 各组大鼠结肠黏膜组织 HE 染色 ($\times 200$)

Fig. 1 HE staining of colonic mucosa of rats in each group ($\times 200$)

3.5 疏肝止泻方对肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠结肠组织 p38、MLCK 蛋白表达的影响 p38 和 MLCK 主要在黏液细胞的胞浆中表达, 在胞膜上少量表达。如图 2~3、表 5 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织 p38、MLCK 蛋白阳性表达增加 ($P<$

0.01); 与模型组比较, 匹维溴铵组和疏肝止泻方中、高剂量组大鼠结肠组织 p38、MLCK 蛋白阳性表达减少 ($P<0.05$, $P<0.01$), 疏肝止泻方低剂量组大鼠结肠组织 MLCK 蛋白阳性表达减少 ($P<0.05$)。

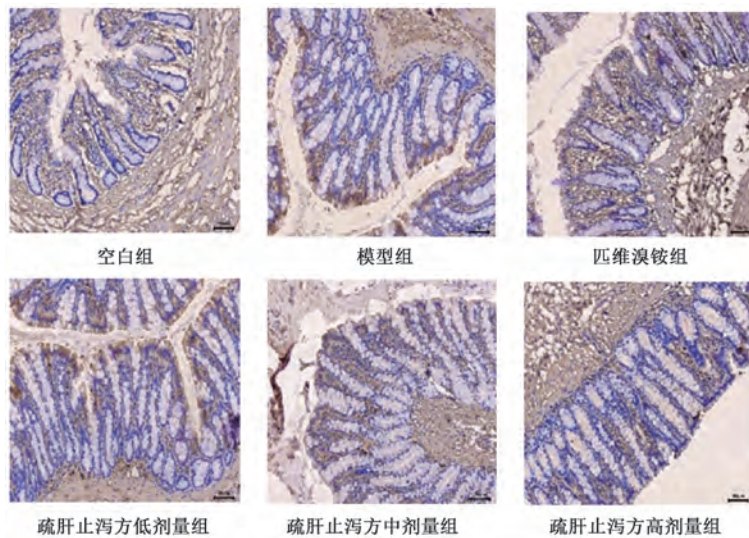


图2 各组大鼠结肠组织 p38 蛋白免疫组化染色 (×200)

Fig. 2 Immunohistochemistry of p38 protein in colon tissue of rats in each group (×200)

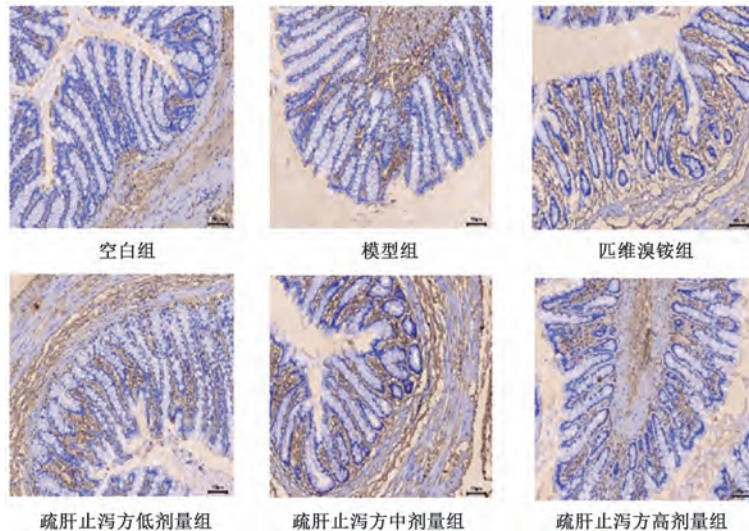


图3 各组大鼠结肠组织 MLCK 蛋白免疫组化结果 (×200)

Fig. 3 Immunohistochemistry of MLCK protein in colon tissue of rats in each group (×200)

表5 各组大鼠结肠组织 p38、MLCK 蛋白免疫组化平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

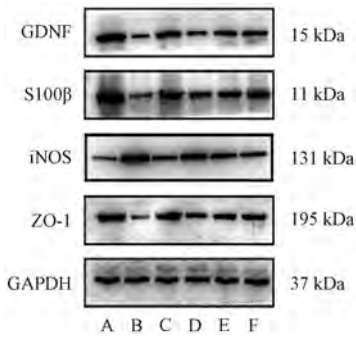
Tab. 5 Comparison of immunohistochemical average optical density of p38 and MLCK proteins in colon tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	p38	MLCK
空白组	6.61±1.26	4.53±1.25
模型组	12.35±1.14**	16.55±1.08**
匹维溴铵组	7.79±0.51##	7.72±1.08##
疏肝止泻方低剂量组	11.74±0.92	14.45±0.47#
疏肝止泻方中剂量组	10.06±0.96#	11.27±1.23##
疏肝止泻方高剂量组	9.31±0.94#	10.58±0.78##

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

3.6 疏肝止泻方对肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠结肠组织 GDNF、S100 β 、iNOS、ZO-1 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织 GDNF、S100 β 、ZO-1 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), iNOS 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 匹维溴铵组和疏肝止泻方各剂量组大鼠结肠组织 GDNF、S100 β 、ZO-1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), iNOS 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 见图4、表6。

3.7 疏肝止泻方对肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠结肠组织 GDNF、S100 β 、iNOS、ZO-1 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织 GDNF、S100 β 、ZO-1 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), iNOS mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 匹维



注：A为空白组，B为模型组，C为匹维溴铵组，D~F分别为疏肝止泻方低、中、高剂量组。

图4 各组大鼠结肠组织 GDNF、S100β、iNOS、ZO-1 蛋白条带图

Fig. 4 Protein bands of GDNF, S100β, iNOS and ZO-1 in colon tissue of rats in each group

表6 各组大鼠结肠组织 GDNF、S100β、iNOS、ZO-1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 6 Comparison of GDNF, S100β, iNOS and ZO-1 protein expressions in colon tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	GDNF	S100β	iNOS	ZO-1
空白组	1.59±0.03	1.46±0.03	0.49±0.04	1.37±0.02
模型组	0.47±0.04**	0.48±0.04**	2.06±0.09**	0.45±0.04**
匹维溴铵组	1.31±0.02###	1.23±0.03###	1.11±0.02###	1.16±0.01###
疏肝止泻方低剂量组	0.59±0.04#	0.64±0.06###	1.82±0.06###	0.58±0.04###
疏肝止泻方中剂量组	0.83±0.01###	0.77±0.04###	1.50±0.03###	0.82±0.01###
疏肝止泻方高剂量组	1.21±0.02###	1.10±0.01###	1.36±0.05###	1.02±0.01###

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

表7 各组大鼠结肠组织 GDNF、S100β、iNOS、ZO-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 7 Comparison of GDNF, S100β, iNOS and ZO-1 mRNA expressions in colon tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	GDNF	S100β	iNOS	ZO-1
空白组	1.00±0.06	1.00±0.03	1.00±0.04	1.00±0.03
模型组	0.41±0.03**	0.24±0.04**	2.17±0.02**	0.44±0.02**
匹维溴铵组	0.76±0.03###	0.93±0.05###	1.17±0.04###	0.90±0.01###
疏肝止泻方低剂量组	0.49±0.04#	0.33±0.02###	1.93±0.07###	0.49±0.01#
疏肝止泻方中剂量组	0.53±0.03###	0.48±0.02###	1.73±0.09###	0.58±0.03###
疏肝止泻方高剂量组	0.73±0.01###	0.55±0.02###	1.48±0.04###	0.68±0.03###

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

助疏散肝郁，合焦白术以鼓舞脾之清阳，并可祛湿以助止泻，又为脾经引经药，花椒温中散寒，止泻安肠，二药合用，兼具佐使之用。

MLCK 是肠黏膜屏障的重要效应因子和潜在治疗靶点，EGC 促进 GDNF 分泌，进入肠上皮细胞中，诱导细胞内 MLCK 激活，MLCK 催化 MLC 发生磷酸化，磷酸化的 MLC 促进肌球蛋白与肌动蛋白相互作用，肌动蛋白进一步收缩，牵拉 ZO-1 蛋白，黏膜屏障被破坏，肠道通透性升高，引起腹泻的发生。而阻断 MLCK 的表达可降低肠道通透性^[14-16]。另有研究表明，p38 MAPK 是炎症信号传导的焦点，其可被炎症因子、活性氧、生理应激等因素激活后进入细胞核，调控下游多种蛋白表达和

基因转录，参与炎症反应、细胞增殖等多种生物学过程^[17]。p38 MAPK 活化后释放 IL-1、TNF-α 等炎症因子，参与肠道炎症反应^[18]。此外，p38 MAPK 可以促进 MLCK 表达，降低 Occludin 及 ZO-1 蛋白表达，损伤肠黏膜屏障正常结构^[19]。

4 讨论

根据 IBS-D 的临床表现，可将其归属于中医学“泄泻”“腹痛”等范畴，脾胃虚弱、肝失疏泄是基本病机，调理肝脾为中医治疗泄泻的根本所在。疏肝止泻方由焦白术、炒白芍、炒陈皮、姜石、防风、花椒 6 味中药组成，方中焦白术补脾燥湿以培土，为君药；炒白芍缓急止痛，与焦白术相伍，调和肝脾，可于土中泻木，体现“抑木扶土”之义，为臣药；炒陈皮理气燥湿、醒脾和胃，姜石涩肠止泻，两者共为佐药；防风具升散之性，合炒白芍以

本研究结果显示，模型组大鼠血浆 D-LA 水平和血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平升高，同时结肠黏膜及黏膜下层呈现炎性细胞浸润，组织 GDNF、S100β、ZO-1 蛋白及 mRNA 表达下调，iNOS 蛋白及 mRNA 表达上调，证实了肠道通透性在 IBS-D 病理进程中的作用。D-LA 是肠道细菌的代谢产物，当屏障破坏时，通透性会增加，使 D-LA 进入血液，其水平升高引起肠道通透性改变^[20]。而疏肝

止泻方给药可降低 IBS-D 大鼠血浆 D-LA 水平和血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,下调结肠组织 GDNF、S100 β 、ZO-1 蛋白及 mRNA 表达,上调 iNOS 蛋白及 mRNA 表达;同时, p38、MLCK 蛋白阳性表达呈降低趋势,结肠黏膜炎性细胞浸润程度减轻。

综上所述,疏肝止泻方可缓解 IBS-D 腹泻症状,改善肠道通透性,其作用可能与干预 EGC 抑制 p38/MLCK 信号通路,减少炎性因子释放,上调 GDNF、S100 β 、ZO-1 表达及下调 iNOS 表达相关。

参考文献:

[1] Canakis A, Haroon M, Weber H C. Irritable bowel syndrome and gut microbiota[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2020, 27(1): 28-35.

[2] Camilleri M. Diagnosis and treatment of irritable bowel syndrome a review[J]. *JAMA*, 2021, 325(9): 865-877.

[3] Vasant D H, Paine P A, Black C J, et al. British society of gastroenterology guidelines on the management of irritable bowel syndrome[J]. *Gut*, 2021, 70(7): 1214-1240.

[4] Savidge T C, Newman P, Pothoulakis C, et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(4): 1344-1358.

[5] Meir M, Flemming S, Burkard N, et al. The glial cell-line derived neurotrophic factor: a novel regulator of intestinal barrier function in health and disease[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 310(11): G1118-G1123.

[6] 毕殿勇, 贾育新, 成映霞, 等. 参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎模型大鼠 IL-1 β 、IL-4 及 p38MAPK 基因蛋白表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(1): 7-11.

[7] Huang S, Fu Y, Xu B, et al. Wogonoside alleviates colitis by improving intestinal epithelial barrier function via the MLCK/pMLC2 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153179.

[8] Deng J, Zeng L, Lai X, et al. Metformin protects against

intestinal barrier dysfunction via AMPK α 1-dependent inhibition of JNK signalling activation[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1): 546-557.

[9] 张萍, 任培培, 毛兰芳, 等. 基于 CGRP、VIP 及 SP 研究平胃胶囊对肝郁脾虚型 IBS-D 模型大鼠脑肠肽的影响[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(7): 1552-1555.

[10] Wang M L, Ren P P, Zhao L, et al. Effect of soothing liver and invigorating spleen on intestinal permeability and intestinal flora in IBS-D rats[J]. *J Gastroenterol Hepatol Res*, 2021, 10(1): 3417-342.

[11] 赵迎盼, 唐旭东, 卞兆祥, 等. IBS-D 肝郁脾虚型病证证结合大鼠模型的建立与评价的初步研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(11): 1507-1514.

[12] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1721.

[13] Ferreira A I, Garrido M, Castro-Poças F. Irritable bowel syndrome: news from an old disorder[J]. *GE Port J Gastroenterol*, 2020, 27(4): 255-268.

[14] Graham W V, He W, Marchiando A M, et al. Intracellular MLCK1 diversion reverses barrier loss to restore mucosal homeostasis[J]. *Nat Med*, 2019, 25(4): 690-700.

[15] Bauman B D, Meng J, Zhang L, et al. Enteric glial-mediated enhancement of intestinal barrier integrity is compromised by morphine[J]. *J Surg Res*, 2017, 219: 214-221.

[16] 李林蔓, 刘俊宏, 王淼蕾, 等. 肠胶质细胞在腹泻型肠易激综合征发病中的研究[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2022, 31(11): 1207-1211.

[17] Martin-Vega A, Cobb M H. Navigating the ERK1/2 MAPK cascade[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(10): 1555.

[18] Feng Y J, Li Y Y. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *J Dig Dis*, 2011, 12(5): 327-332.

[19] Elamin E, Masclee A, Troost F, et al. Ethanol impairs intestinal barrier function in humans through mitogen activated protein kinase signaling: a combined *in vivo* and *in vitro* approach[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107421.

[20] 赵丽. 腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群和肠道屏障功能的变化及相关分子机制的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.