

基于 p38 MAPK/GR 信号通路探讨痛泻要方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎小鼠应激-炎症交互的影响

史文平， 蒋子寅， 韩昌鹏*
(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院，上海 200437)

摘要：目的 探究痛泻要方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎（UC）小鼠的影响。方法 将 C57BL/6 雄性小鼠随机分为空白组、模型组、美沙拉嗪组（0.4 g/kg）和痛泻要方低、高剂量组（2.5、10 g/kg），每组 6 只。采用慢性不可预测温和应激（CUMS）联合硫酸葡聚糖钠盐（DSS）诱导建立肝郁脾虚型 UC 小鼠模型。给药 2 周后，观察小鼠一般精神状态并计算疾病活动指数（DAI）；旷场实验检测旷场移动距离与中央区停留时间；悬尾实验检测挣扎时间和不动时间；采用 HE 染色观察结肠病理状态并计算组织病理学评分；ELISA 法检测垂体促肾上腺皮质激素（ACTH）、血清皮质酮（CORT）与结肠促炎因子（TNF-α、IL-6）水平；RT-qPCR 法检测结肠组织 *Occludin* 和 *ZO-1* mRNA 表达；Western blot 法检测结肠组织 p-GR 和 p-p38 MAPK 蛋白表达。结果 与模型组比较，痛泻要方高剂量组小鼠结肠 DAI 评分和组织病理学评分降低（ $P<0.05$ ）；旷场实验移动距离增加（ $P<0.05$ ），悬尾实验不动时间缩短（ $P<0.01$ ），焦虑抑郁样行为缓解；垂体 ACTH 水平、血清 CORT 水平和结肠组织 TNF-α、IL-6 水平均降低（ $P<0.01$ ）；结肠组织 p-GR 蛋白表达升高（ $P<0.01$ ），p-p38 蛋白表达降低（ $P<0.01$ ），*Occludin* mRNA 表达升高（ $P<0.05$ ）；肠道炎症微环境改善，结肠屏障恢复。结论 痛泻要方通过重建 HPA 轴负反馈并调节 p38 MAPK/GR 信号通路抑制外周炎症，从而改善 UC 症状。

关键词：痛泻要方；溃疡性结肠炎；肝郁脾虚证；HPA 轴；应激-炎症交互；p38 MAPK/GR 信号通路

中图分类号：R285.5 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2026)08-2570-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.08.010

Effect of Tongxie Yaofang on the stress-inflammation interaction in mice with liver-depression and spleen-deficiency ulcerative colitis based on the p38 MAPK/GR signaling pathway

SHI Wen-ping, JIANG Zi-yin, HAN Chang-peng*
(Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of Tongxie Yaofang on mice with liver-depression and spleen-deficiency type ulcerative colitis (UC). **METHODS** Male C57BL/6 mice were randomly divided into a blank group, a model group, a mesalazine group (0.4 g/kg), and low- and high-dose Tongxie Yaofang groups (2.5 and 10 g/kg), with 6 mice in each group. The UC mouse model with liver depression and spleen deficiency was established by combining chronic unpredictable mild stress (CUMS) with dextran sulfate sodium (DSS). After 2 weeks of administration, the general mental state of the mice was observed, and the disease activity index (DAI) was calculated. The open field test was used to detect the total distance moved and the time spent in the central area; the tail suspension test was used to detect the struggling time and immobility time. HE staining was used to observe the colonic pathological status and calculate the histopathological score. ELISA was used to detect the levels of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH), serum corticosterone (CORT), and colonic pro-inflammatory

收稿日期：2025-08-25
基金项目：国家自然科学基金项目（82174393）
作者简介：史文平（1995—），男，硕士，从事中医外科学肛肠疾病的研究。E-mail: 19128719560@163.com
* 通信作者：韩昌鹏（1981—），男，博士，主任医师，从事中医外科学肛肠疾病的研究。E-mail: 13918314533@163.com

cytokines (TNF- α , IL-6). RT-qPCR was used to detect the mRNA expressions of *Occludin* and *ZO-1* in colon tissues. Western blot was used to detect the protein expressions of p-GR and p-p38 MAPK in colon tissues.

RESULTS Compared with the model group, the high-dose Tongxie Yaofang group showed significantly decreased DAI scores and histopathological scores in the colon ($P<0.05$). In the open field test, the moving distance was increased ($P<0.05$), and in the tail suspension test, the immobility time was shortened ($P<0.01$), indicating alleviated anxiety- and depression-like behaviors. The levels of pituitary ACTH, serum CORT, and colon tissues TNF- α and IL-6 were significantly decreased ($P<0.01$). The protein expression of p-GR in colon tissues was up-regulated ($P<0.01$), while the expression of p-p38 was down-regulated ($P<0.01$), and the mRNA expression of *Occludin* was increased ($P<0.05$). Tongxie Yaofang could improve the intestinal inflammatory microenvironment and promoted the recovery of the colonic barrier.

CONCLUSION Tongxie Yaofang improves UC symptoms by rebuilding the negative feedback of the HPA axis and regulating the p38 MAPK/GR signaling pathway to inhibit peripheral inflammation.

KEY WORDS: Tongxie Yaofang; ulcerative colitis; liver-depression and spleen-deficiency syndrome; HPA axis; stress-inflammation interaction; p38 MAPK/GR signaling pathway

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性复发性炎症性肠病^[1], 其发病与遗传、免疫、环境等因素密切相关^[2]。研究表明, 精神心理因素是驱动 UC 发病、迁延及复发的重要因素^[3-5], 应激通过引发下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) 轴功能紊乱, 导致神经内分泌免疫失调, 在 UC 发生发展中起关键作用^[6-7]。临床上, 糖皮质激素疗效受限及耐药问题日益突出, 这已成为治疗 UC 的重大挑战^[8-9]。

中医学将 UC 归属于“久痢”“肠癖”等范畴, 认为其核心病机为肝郁脾虚。情志不畅致肝气郁结, 横逆犯脾, 脾失健运, 水湿下注肠道, 故见腹痛、泄泻等症^[10-12]。其临床表现与现代医学中应激相关的肠道炎症及情绪障碍高度契合^[13]。痛泻要方作为调和肝脾、祛湿止泻之经典方^[14], 临床疗效确切, 但对其调节“应激-炎症”通路的具体机制尚未系统阐明。现代药理学研究表明, 痛泻要方中白芍、白术等具有抗炎、免疫调节及肠屏障保护等多重活性, 为本研究提供了理论基础^[15-17]。

本研究基于应激-炎症通路探讨痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 小鼠的改善作用, 旨在初步阐明痛泻要方是否通过调节“HPA 轴-p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) /糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 信号”网络, 改善结肠炎症并促进黏膜屏障修复, 从而为中医“疏肝健脾”治法治疗 UC 提供现代科学依据。

1 材料

1.1 实验动物 30 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,

8 周龄, 体质量 (22 $\pm$ 2) g, 购自江苏华创信诺医药科技有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2020-0009], 饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障实验室 [实验动物使用许可证号 SYXK (沪) 2025-0008], 室温 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (50 $\pm$ 10)%, 12 h/12 h 明暗交替。本实验经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理号 PZSHUTCM2508030003)。

1.2 药物 痛泻要方由炒白术 60 g、炒芍药 40 g、陈皮 30 g、防风 20 g 组成, 中药饮片购自上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 经该院韩昌鹏主任医师鉴定为正品, 委托上海万仕诚药业有限公司加工成颗粒剂 (批号 20250314ZP10961)。临用前, 用灭菌蒸馏水将颗粒剂配制成 100 mg/mL 的混悬液 (相当于生药 0.75 g/mL), 现配现用。美沙拉嗪肠溶片 (批号 H20103359) 购自黑龙江天宏药业股份有限公司。

1.3 试剂 硫酸葡聚糖钠盐 [DSS, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号 A600160-0050]; 小鼠 TNF- α 、ACTH、CORT ELISA 试剂盒 (南京博研生物科技有限公司, 货号 BY-EM220852、BY-EM220241、BY-JZF0056); 磷酸化 (phosphorylation, p-) GR 抗体 [爱必信 (上海) 生物科技有限公司, 货号 abs148796-100ul]; p-p38 MAPK 抗体 (上海优宁维生物科技股份有限公司, 货号 sc-166182); 异氟烷 (青岛欧博方医药科技有限公司, 批号 20240402); TRIzol (美国 Invitrogen 公司, 货号 15596018); 三氯甲烷 (上海试一化学试剂有限公司, 货号 2016-06-08); DEPC 水 (上海

司鼎生物科技有限公司, 货号 SD01005); RT reagent Kit、TB Green qPCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, 货号 RR047A、RR420A)。

1.4 仪器 旷场设备、悬尾设备 (上海中医药大学实验动物中心, 型号 XR-XZ301、HZ9-YLS-18A); 组织研磨仪 (上海净信科技有限公司, 型号 Tissuelyser-48); 台式冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司, 型号 5810R); 电热恒温箱 (上海一恒科学仪器有限公司, 型号 BPG-9070A); 分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 型号 NanoDrop 2000); qPCR 仪 (德国 Roche 公司, 型号 LightCycler® 480 II); 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司, 型号 DYCZ-20A); 化学发光成像系统 (杭州申花科技有限公司, 型号 SH-510SH-520); 酶标仪 [美谷分子仪器 (上海) 有限公司, 型号 SpectraMax iD5e]。

2 方法

2.1 分组及造模 小鼠适应性饲养 5 d 后, 随机分成空白组、模型组、美沙拉嗪组和痛泻要方低、高剂量组, 每组 6 只。空白组常规饲养 4 周, 自由摄食标准饲料及灭菌蒸馏水, 不给予任何应激或药物干预。其余各组均采用慢性不可预测温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 联合 3% DSS 自由饮法建立肝郁脾虚型 UC 小鼠模型^[18]。造模第 1 天开始, 每天随机施加 1 种应激, ①束缚 (使用小鼠固定器束缚小鼠 2 h); ②禁食 (停止喂食 24 h); ③昼夜颠倒 (白天提供 12 h 黑暗环境, 夜晚提供 12 h 光照); ④冷刺激 (将小鼠置于水深约 15 cm 的 4 ℃冰水中 5 min); ⑤热刺激 (将小鼠放入 45 ℃恒温箱中 5 min); ⑥致痛 (将小鼠置于观察笼内, 用止血钳夹持尾尖 1 cm 处至引发尖叫, 持续 1 min), 持续 3 周。第 4 周起停止应激, 改为自由饮用 3% DSS 溶液 1 周。造模第 2 周, 模型组出现 1 例小鼠死亡。

2.2 给药 空白组和模型组灌胃给予灭菌蒸馏水; 美沙拉嗪组灌胃给予 0.4 g/kg 美沙拉嗪溶液; 痛泻要方低、高剂量组分别灌胃给予生药量 2.5、10.0 g/kg 痛泻要方混悬液 (按体表面积折算等效剂量^[19], 分别相当于 60 kg 成人临床剂量的 0.75、3.0 倍), 每天 1 次, 连续 2 周。

2.3 样本采集 给药结束后, 以 2% 异氟烷吸入麻醉小鼠, 经眼眶取血 (0.8~1.0 mL/只), 静置 30 min 后, 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min, 收集血清, 分装后保存于-80 ℃冰箱。随后解剖获取结肠

组织, 测量长度后分段处理, 近端 1 cm 固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 用于制备病理切片; 中段 0.5 cm 速冻保存。剥离垂体组织 (液氮速冻), 全程操作在冰上完成且单只动物耗时≤8 min (避免 RNA 降解)。

2.4 小鼠一般状态及疾病活动指数 (DAI) 测定 实验期间每天观察小鼠精神、饮食、大便性状等情况, 定期称定小鼠体质量, 计算疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分^[20], 公式为 DAI 总分= (体质量评分+便血评分+粪便评分)/3, 评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分标准
Tab. 1 DAI scoring criteria

评分/分	体质量下降率/%	便血程度	粪便性状
0	<1	正常	成型颗粒
1	1~5	隐血阳性	软便(保持形态)
2	5~10	肉眼血便	松散粘液便
3	10~15	显性血便	水样便
4	>15	重度血便	血性腹泻

2.5 行为学指标检测

2.5.1 旷场实验 将小鼠置于 40 cm×40 cm 旷场中央, 适应 5 min 后录制 10 min 内活动情况。使用 EthoVision XT 软件记录小鼠总运动距离及中央区停留时间 (中央区定义为场地 50% 面积区域)。每次测试后以 75% 乙醇擦拭场地消除气味干扰。

2.5.2 悬尾实验 将小鼠尾部末端固定于特制支架上, 使其头向下距离地约 30 cm, 确保其四肢无法触及任何支撑物。持续悬吊小鼠 6 min, 使用 EthoVision XT 软件记录小鼠后 4 min 内停止挣扎、呈现被动悬挂状态的总时间。

2.6 HE 染色观察结肠组织病理变化 取 0.5 cm 结肠组织, 经 4% 多聚甲醛固定后, 依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明及石蜡包埋切片。切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化后, 苏木精浸染 10 min, 1% 盐酸乙醇分化, 流水冲洗返蓝, 伊红复染 3 min。最后经梯度乙醇脱水、二甲苯透明化处理, 中性树脂胶封片, 于光学显微镜下观察组织形态结构。采用组织病理学评分^[21]量化分析肠道损伤程度 (炎症浸润严重程度及隐窝破坏程度), 评分标准见表 2。

2.7 ELISA 法检测垂体 ACTH、血清 CORT 和结肠组织 TNF-α、IL-6 水平 按照相应 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测垂体 ACTH、血清 CORT 和结肠组织匀浆上清液中 TNF-α、IL-6 水平。

表 2 组织病理学评分标准
Tab. 2 Histopathological scoring criteria

评分/分	炎症程度	腺体损伤	溃疡情况
1	固有层中罕见的炎性细胞	完整的隐窝	无溃疡
2	固有层中性粒细胞数增加	1/3 隐窝缺失	1~2 个溃疡病灶
3	汇合的炎性细胞延伸至黏膜下层	2/3 隐窝缺失	3~4 个溃疡病灶
4	炎性细胞透壁延伸	腺体完全缺失	广泛溃疡
5	—	腺体缺失引起上表皮损伤	—
6	—	上表皮完全侵蚀	—

2.8 RT-qPCR 法检测结肠组织 *Occludin* 和 *ZO-1* mRNA 表达 冻存结肠组织样本采用 TRIzol 法提取总 RNA，检测纯度及完整性。取 1 μg RNA，采用 PrimeScript RT 试剂盒进行逆转录，获得 cDNA 模板。针对目标基因（*Occludin*、*ZO-1*）及内参基因（*β-actin*）设计特异性引物（Primer-BLAST 验证）。采用 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒，配制 SYBR Green qPCR 反应体系，反应程序为 95 ℃ 预变性 30 s；95 ℃ 变性 5 s，60 ℃ 退火/延伸 30 s，40 个循环。设置无模板对照（NTC）及复孔。通过溶解曲线验证扩增特异性，采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目标基因相对于内参基因的相对表达量。引物序列见表 3。

表 3 引物序列
Tab. 3 Primer sequences

基因	序列
<i>Occludin</i>	正向 5'-GCAGCCTTCTGCTTCATCG-3'
	反向 5'-CGTCGGGTTCCTCCCATTA-3'
<i>ZO-1</i>	正向 5'-GAACGAGGCATCATCCCAAAT-3'
	反向 5'-CCGATCACCACCCGCTGT-3'
<i>β-actin</i>	正向 5'-AGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3'
	反向 5'-CCAAGAAGGAAGGCTGGA AAA-3'

2.9 Western blot 法检测结肠组织 p-GR 与 p-p38 蛋白表达 取结肠组织，使用含有磷酸酶抑制剂的预冷 RIPA 裂解液进行裂解，在冰浴条件下匀浆。裂解液于 4 ℃、12 000×*g* 离心 15 min 后收集上清液，采用 BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品（20~40 μg）进行 SDS-PAGE 电泳分离，随后将蛋白转移至 PVDF 膜。PVDF 膜经 5% 脱脂牛奶封闭 1 h，加一抗 p-GR、p-p38（1：1 000）、*β-actin*

（1：5 000）4 ℃ 孵育过夜，次日 TBST 洗涤后加 HRP 标记的二抗（1：5 000）室温孵育 1 h。最后使用 ECL 化学发光底物显影，通过凝胶成像系统捕获条带图像，并应用 Image J 软件分析条带灰度值，以 *β-actin* 为内参进行标准化计算。

2.10 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行处理，计量资料以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）或中位数（四分位数）[*M*（*Q*₁，*Q*₃）] 表示。若数据符合正态分布且满足方差齐性，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验；若数据符合正态性但不满足方差齐性，组间比较采用 Welch 方差分析，两两比较采用 Games-Howell 检验；若数据不符合正态分布，组间比较采用非参数检验，两两比较采用 Dunn 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 小鼠一般精神状态及 DAI 评分的影响 空白组小鼠精神活跃，毛发光泽，大便干湿适中，灌胃时挣扎剧烈；模型组小鼠精神萎靡、扎堆少动，毛发枯槁竖立，黏液血便伴肛周污秽；与模型组比较，美沙拉嗪组和痛泻要方高剂量组小鼠症状明显好转，活动增加，进食及饮水量明显增加；痛泻要方低剂量组进食及饮水量增加，但活动无明显增加。

给药前，与空白组比较，各造模组小鼠 DAI 评分均升高（*P*<0.05）。给药后，与空白组比较，模型组小鼠 DAI 评分升高（*P*<0.01）；与模型组比较，痛泻要方高剂量组和美沙拉嗪组小鼠 DAI 评分均降低（*P*<0.05），见表 4。上述结果表明，肝郁脾虚型 UC 小鼠模型构建成功。

表 4 各组小鼠给药前后 DAI 评分比较 [分，*M*（*Q*₁，*Q*₃）]

Tab. 4 Comparison of DAI scores of mice in each group before and after treatment [score, *M*（*Q*₁，*Q*₃）]

组别	动物数/只	给药前	给药后
空白组	6	0.333(0.000,0.333)	0.000(0.000,0.083)
模型组	5	2.667(1.833,2.833)**	1.667(1.333,2.167)**
美沙拉嗪组	6	2.167(1.917,2.167)**	0.333(0.250,0.750) [#]
痛泻要方低剂量组	6	1.667(1.417,2.417)*	0.833(0.667,1.250)
痛泻要方高剂量组	6	1.833(1.667,2.333)*	0.500(0.250,1.167) [#]

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

3.2 痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 小鼠行为学的影响 旷场实验结果显示,与空白组比较,模型组小鼠总移动距离减少 ($P<0.01$),中央区停留时间缩短 ($P<0.01$);与模型组比较,痛泻要方高剂量组和美沙拉嗪组小鼠总移动距离增加 ($P<0.05$),痛

泻要方高剂量组小鼠中央区停留时间延长 ($P<0.05$),见表 5、图 1。上述结果表明,痛泻要方可有效改善肝郁脾虚型 UC 小鼠自发活动能力,且低剂量与高剂量均显示出良好疗效,而美沙拉嗪对该指标改善作用不明显。

表 5 各组小鼠旷场实验结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 5 Comparison of open field test results of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	中央区停留时间/s	总移动距离/mm
空白组	6	39.273±10.280	2 531.532±322.754
模型组	5	14.338±6.751 **	1 322.160±582.764 **
美沙拉嗪组	6	21.477±15.335	1 887.031±274.900 #
痛泻要方低剂量组	6	22.267±11.696	1 747.123±552.600
痛泻要方高剂量组	6	32.900±15.852 #	1 982.866±385.089 #

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

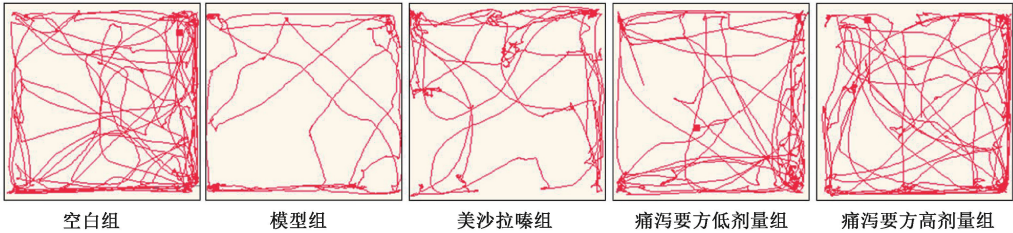


图 1 各组小鼠旷场实验行动轨迹热图

Fig. 1 Heat map of movement trajectories of mice in open field test in each group

悬尾实验结果显示,与空白组比较,模型组小鼠不动时间延长 ($P<0.01$),挣扎时间缩短 ($P<0.01$);与模型组比较,痛泻要方高剂量组和美沙拉嗪组小鼠不动时间缩短 ($P<0.05$, $P<0.01$),

痛泻要方高剂量组小鼠挣扎时间延长 ($P<0.05$),见表 6。上述结果表明,痛泻要方高剂量可有效改善肝郁脾虚型 UC 小鼠抑郁样行为,而美沙拉嗪对该指标未见明显改善作用。

表 6 各组小鼠悬尾实验结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 6 Comparison of tail suspension test results of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	不动时间/s	挣扎时间/s
空白组	6	110.660±19.317	87.660±21.639
模型组	5	200.008±29.833 **	26.800±23.235 **
美沙拉嗪组	6	169.093±15.307 #	50.360±14.581
痛泻要方低剂量组	6	193.400±8.053	28.913±3.942
痛泻要方高剂量组	6	152.920±35.759 ##	59.253±34.897 #

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

3.3 痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响 HE 染色显示,模型组小鼠结肠组织呈现严重黏膜溃疡、隐窝破坏及炎性浸润;痛泻要方高剂量组和美沙拉嗪组结肠组织炎症浸润减轻,隐窝结构修复和溃疡愈合。与空白组比较,模型组小鼠结肠组织病理学评分升高 ($P<0.01$);与模型组比较,痛泻要方高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织病理学评分降低 ($P<0.05$),见表 7、图 2。上述结果表明,美沙拉嗪及痛泻要方高剂量均可有效减轻肝郁脾虚型 UC 小鼠结肠组织病理损伤,而痛泻要方低剂量对该指标未见明显改善作用。

表 7 各组小鼠结肠组织病理学评分比较 [分, $M(Q_1,Q_3)$]

Tab. 7 Comparison of colon histopathological scores of mice in each group [score, $M(Q_1,Q_3)$]

组别	动物数/只	病理学评分
空白组	6	1.000(0.000,1.000)
模型组	5	7.000(7.000,9.000) **
美沙拉嗪组	6	2.000(2.000,2.500) #
痛泻要方低剂量组	6	6.000(5.750,7.000)
痛泻要方高剂量组	6	3.000(1.670,4.000) #

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

3.4 痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 小鼠垂体 ACTH、血清 CORT 及结肠组织 TNF- α 、IL-6 水平的影

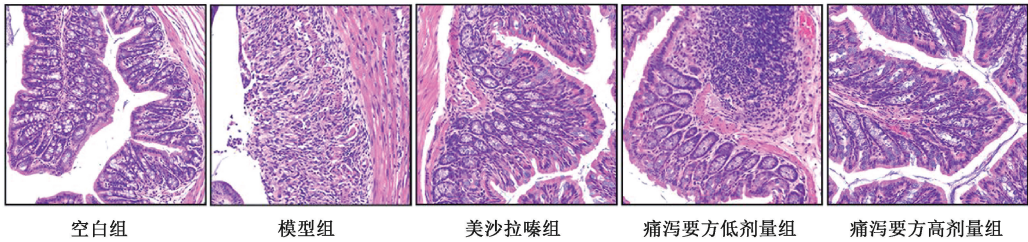


图 2 各组小鼠结肠组织 HE 染色 (×100)

Fig. 2 HE staining of colon tissues of mice in each group (×100)

响 与空白组比较,模型组小鼠垂体 ACTH、血清 CORT 及结肠组织 TNF-α、IL-6 水平均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,痛泻要方高剂量组小鼠垂体 ACTH、血清 CORT 及结肠组织 TNF-α、IL-6 水平均降低 ($P<0.01$),美沙拉嗪组小鼠结肠组织

TNF-α、IL-6 水平均降低 ($P<0.01$),痛泻要方低剂量组小鼠结肠组织 IL-6 水平降低 ($P<0.05$),见表 8。上述结果表明,美沙拉嗪及痛泻要方高剂量均可抑制肝郁脾虚型 UC 小鼠结肠组织促炎因子水平,而痛泻要方低剂量未见明显改善作用。

表 8 各组小鼠垂体 ACTH、血清 CORT 及结肠组织 TNF-α、IL-6 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 8 Comparison of pituitary ACTH, serum CORT, and colon tissues TNF-α and IL-6 levels of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)					
组别	动物数/只	ACTH/(ng·g ⁻¹)	CORT/(ng·mL ⁻¹)	TNF-α/(ng·g ⁻¹)	IL-6/(ng·g ⁻¹)
空白组	6	106.798±16.258	136.843±25.603	59.209±15.032	16.724±1.505
模型组	5	173.652±30.744 ^{**}	215.675±50.059 ^{**}	95.449±7.767 ^{**}	23.383±1.061 ^{**}
美沙拉嗪组	6	179.945±22.969	183.894±49.392	62.491±9.004 ^{##}	19.321±1.451 ^{##}
痛泻要方低剂量组	6	151.296±15.220	186.865±25.884	84.268±14.086	21.302±1.376 [#]
痛泻要方高剂量组	6	119.821±7.745 ^{##}	139.125±13.191 ^{##}	67.334±18.634 ^{##}	18.789±1.769 ^{##}

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

3.5 痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 小鼠结肠组织 Occludin 和 ZO-1 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠组织 Occludin 和 ZO-1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$);与模型组比较,美沙拉嗪组和痛泻要方高剂量组小鼠结肠组织 Occludin mRNA 表达升高 ($P<0.05$),见表 9。上述结果表明,美沙拉嗪组和痛泻要方高剂量可有效恢复肝郁脾虚型 UC 小鼠结肠黏膜屏障功能。

表 9 各组小鼠结肠组织 Occludin 和 ZO-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 9 Comparison of colon tissues Occludin and ZO-1 mRNA expressions of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	Occludin	ZO-1
空白组	6	1.031±0.269	1.039±0.325
模型组	5	0.379±0.079 ^{**}	0.515±0.143 ^{**}
美沙拉嗪组	6	0.706±0.253 [#]	0.793±0.248
痛泻要方低剂量组	6	0.543±0.108	0.690±0.078
痛泻要方高剂量组	6	0.696±0.079 [#]	0.793±0.370

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

3.6 痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 小鼠结肠组织 p-GR 和 p-p38 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠组织 p-GR 蛋白表达降低 ($P<0.05$),p-p38 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,痛泻要方各剂量组小鼠结肠组织 p-GR 蛋

白表达升高 ($P<0.01$),p-p38 蛋白表达降低 ($P<0.01$),见表 10、图 3。上述结果表明,痛泻要方高剂量激活了结肠 GR 通路,抑制下游促炎信号通路。

表 10 各组小鼠结肠组织 p-GR 和 p-p38 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 10 Comparison of colon tissues p-GR and p-p38 protein expressions of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	p-GR	p-p38
空白组	6	1.000±0.272	1.000±0.121
模型组	5	0.506±0.230 [*]	1.252±0.165 [*]
美沙拉嗪组	6	0.862±0.382	1.090±0.210
痛泻要方低剂量组	6	1.206±0.414 ^{##}	0.902±0.095 ^{##}
痛泻要方高剂量组	6	1.665±0.371 ^{##}	0.580±0.136 ^{##}

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

4 讨论

本实验结果表明,模型组小鼠表现出 HPA 轴功能亢进,体现为垂体 ACTH 和血清 CORT 水平升高;同时伴有结肠组织促炎细胞因子 (TNF-α、IL-6) 水平上调,紧密连接蛋白 Occludin mRNA 表达下调,p-GR 蛋白表达降低和 p-p38 蛋白表达升高。痛泻要方干预后,上述异常指标均得到逆转,提示其可能通过协同调节中枢 HPA 轴应激反应与肠道局部炎症及屏障功能,发挥治疗作用,初步印

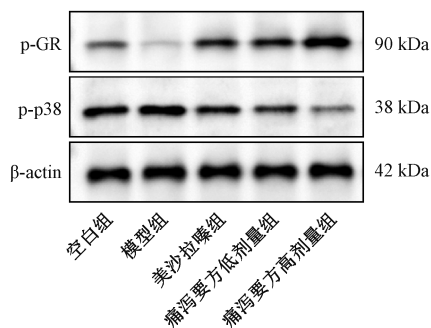


图 3 各组小鼠结肠组织 p-GR 和 p-p38 蛋白条带图
Fig. 3 Protein bands of p-GR and p-p38 in colon tissues of mice in each group

证了“应激-炎症交互”在肝郁脾虚型 UC 中的重要地位。

进一步研究发现，痛泻要方能有效改善结肠局部病理状态，其作用涉及抗炎、屏障修复及信号通路调控。痛泻要方降低结肠 TNF-α 和 IL-6 水平，与经典抗 UC 药物一致^[22-24]，体现了其清热祛湿、健脾止泻功效的现代生物学基础。同时，痛泻要方上调 Occludin mRNA 表达，修复肠道屏障，为“健脾固护”提供了分子依据^[25-26]。痛泻要方干预后结肠 p-p38 蛋白表达降低，p-GR 蛋白表达升高。p38 MAPK 是应激与炎症信号枢纽，其激活促进炎症并破坏屏障^[27-28]；p-GR 对于糖皮质激素（GC）的抗炎转录活性至关重要^[29-30]。痛泻要方对 p38 MAPK/p-GR 平衡的调节表明其通过抑制促炎信号，增强抗炎信号重塑结肠稳态。

中医“肝郁”与现代医学“慢性应激”高度相关。本研究中 HPA 轴亢进（ACTH、CORT 水平升高）是“肝失疏泄、情志不畅”的神经内分泌表征。但矛盾的是，在 HPA 高度激活及 CORT 大量分泌时，结肠炎症却持续加剧。这一悖论可由结肠 p-p38 升高和 p-GR 降低解释：肠道局部出现了 GC 不敏感状态^[31]。p38 MAPK 持续活化可通过磷酸化 GR 使其失活，是 GC 不敏感的重要机制^[32-33]。痛泻要方在降低 p-p38 的同时逆转 p-GR 下调，提示其可能通过抑制 p38 MAPK 活化，恢复 GR 功能，从而解除 GC 不敏感。这不仅解释了痛泻要方的抗炎效果，也阐明了一种“疏肝”新机制：并非单纯抑制 HPA 轴，而是修复应激信号在肠道的“接收器”（提升 p-GR），确保“脑-肠”对话通畅。

本研究为痛泻要方治疗肝郁脾虚型 UC 提供了跨学科机制注解。中医认为本病病机为“肝木乘

脾土”，导致泄泻。本研究结果显示，“肝郁”可部分解释为 HPA 轴紊乱介导的慢性应激，“脾虚”对应肠黏膜屏障损伤及免疫失衡。痛泻要方中白术健脾燥湿（扶土），白芍柔肝缓急（抑木），陈皮理气醒脾，防风散肝舒脾，全方共奏疏肝解郁、健脾祛湿之效，在现代生物学层面体现为双向调节脑-肠轴：从中枢平复 HPA 轴亢进，从外周抗炎、固屏障、上调 p-GR 恢复对话。这揭示了“方证相应”的科学内涵，凸显应激-炎症交互作为肝郁脾虚型 UC 核心病理环节的价值。

综上所述，痛泻要方可能通过恢复 HPA 轴负反馈调节改善“肝郁”相关症状，同时调节 p38 MAPK/GR 信号通路减轻肠道炎症，修复黏膜屏障，从而治疗肝郁脾虚型 UC。这为阐释“疏肝健脾”治法的现代科学内涵提供了实验依据。

参考文献：

[1] Voelker R. What is ulcerative colitis? [J]. JAMA, 2024, 331(8): 716.

[2] Seyed T N, Madgwick M, Sudhakar P, et al. Big data in IBD: big progress for clinical practice[J]. Gut, 2020, 69 (8): 1520-1532.

[3] Israeli E, Hershcovici T, Berenshtein E, et al. The effect of restraint stress on the normal colon and on intestinal inflammation in a model of experimental colitis[J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(1): 88-94.

[4] Brzozowski B, Mazur-Bialy A, Pajdo R, et al. Mechanisms by which stress affects the experimental and clinical inflammatory bowel disease (IBD): role of brain-gut axis[J]. Curr Neuroparmacol, 2016, 14(8): 892-900.

[5] Oligschlaeger Y, Yadati T, Houben T, et al. Inflammatory bowel disease: a stressed “gut/feeling” [J]. Cells, 2019, 8(7): 659.

[6] Luo K, Zhang M, Tu Q, et al. From gut inflammation to psychiatric comorbidity: mechanisms and therapies for anxiety and depression in inflammatory bowel disease[J]. J Neuroinflammation, 2025, 22(1): 149.

[7] Anand N, Gorantla V R, Chidambaram S B. The role of gut dysbiosis in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders[J]. Cells, 2022, 12(1): 54.

[8] Farrell R J, Kelleher D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease[J]. J Endocrinol, 2003, 178(3): 339-346.

[9] Chen H L, Li L R. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease: a meta-analysis[J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(12): 3065-3075.

[10] 陶丽芬, 彭卓崙, 李桂贤, 等. 疏肝健脾法在溃疡性结肠炎治疗中的应用[J]. 世界中医药, 2022, 17(11): 1600-1602; 1606.

[11] 覃靖桑, 张馨月, 朱梓铭, 等. 溃疡性结肠炎中医证候要素及其辨证分型评述[J]. 陕西中医药大学学报, 2024, 47(4): 7-11.

[12] 牛少娟, 张晓艳, 丁晓坤, 等. 溃疡性结肠炎病因病机述评[J]. 河南中医, 2019, 39(5): 799-801.

[13] 李小燕, 卢雨蓓, 董洪克, 等. 基于脑-肠轴论治肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征的研究进展[J]. 中医临床研究, 2023, 15(21): 97-101.

[14] 李合鹏, 胡运莲. 痛泻要方治疗腹泻型肠易激综合征研究进展[J]. 亚太传统医药, 2024, 20(9): 240-244.

[15] Han J, Li W, Shi G, *et al.* Atractylenolide III improves mitochondrial function and protects against ulcerative colitis by activating AMPK/SIRT1/PGC-1 α [J]. *Mediators Inflamm*, 2022, 2022: 9129984.

[16] Wu X X, Huang X L, Chen R R, *et al.* Paeoniflorin prevents intestinal barrier disruption and inhibits lipopolysaccharide (lps) -induced inflammation in Caco-2 cell monolayers[J]. *Inflammation*, 2019, 42(6): 2215-2225.

[17] Wu F, Shao Q, Cheng Z, *et al.* Traditional herbal formula Wu-Mei-Wan alleviates TNBS-induced colitis in mice by inhibiting necroptosis through increasing RIPK3 O-GlcNAcylation [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 78.

[18] 王晓鸽, 李泽伦, 康丽杰, 等. 基于中西医病证特点的肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征大鼠模型的建立与评价[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2025, 33(2): 106-111; 116.

[19] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.

[20] 樊俐慧, 朱向东, 王志刚, 等. 痛泻要方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜的保护作用[J]. 中成药, 2024, 46(7): 2189-2195.

[21] Laroui H, Ingersoll S A, Liu H C, *et al.* Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32084.

[22] 胡旭光, 利红宇. 痛泻要方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎动物模型的治疗作用[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(1): 40-41; 51.

[23] 史先芳, 刘铁梅, 何桂钧. 痛泻要方对腹泻型肠易激综合征患者炎症因子表达的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2024, 58(1): 15-19.

[24] 王秋香, 李刘英, 杨 洋, 等. 痛泻要方对 IBS-D 大鼠 FXR、NF- κ B 及血清炎症因子的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2025, 27(6): 1709-1720.

[25] Górecka A, Jura-Póltorak A, Kó z ma E M, *et al.* Biochemical modulators of tight junctions (TJs): Occludin, Claudin-2 and Zonulin as biomarkers of intestinal barrier leakage in the diagnosis and assessment of inflammatory bowel disease progression[J]. *Molecules*, 2024, 29(19): 4577.

[26] Niu C, Hu X L, Yuan Z W, *et al.* Pulsatilla decoction improves DSS-induced colitis *via* modulation of fecal-bacteria-related short-chain fatty acids and intestinal barrier integrity[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 300: 115741.

[27] Yong H Y, Koh M S, Moon A. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009, 18(12): 1893-1905.

[28] Zhang P, Jiang H. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid confers protection in dss-induced colitis *via* the JNK-p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. *Adv Biol (Weinh)*, 2023, 7(6): e2200247.

[29] He L X, Yang L, Liu T, *et al.* Group 3 innate lymphoid cells secrete neutrophil chemoattractants and are insensitive to glucocorticoid *via* aberrant GR phosphorylation[J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 90.

[30] Wang B, Palomares K, Parobchak N, *et al.* Glucocorticoid receptor signaling contributes to constitutive activation of the noncanonical NF- κ B pathway in term human placenta[J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(2): 203-211.

[31] Feng B, Lin L, Li L, *et al.* Glucocorticoid induced group 2 innate lymphoid cell overactivation exacerbates experimental colitis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 863034.

[32] Irusen E, Matthews J G, Takahashi A, *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 109(4): 649-657.

[33] Zeyen L, Seternes O M, Mikkola I. Crosstalk between p38 MAPK and GR signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3322.