

陈宇,施佳君,富丹婷,等. 抑肝扶脾汤调控 PKA/PKC-CREB 通路修复肠道屏障降低 IBS 敏感性的机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 512-521.

CHEN Y, SHI J J, FU D T, et al. Mechanistic study of Yigan Fupi decoction-mediated repair of the intestinal barrier and reduction of IBS sensitivity through regulation of the PKA/PKC-CREB pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 512-521.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.005

抑肝扶脾汤调控 PKA/PKC-CREB 通路修复肠道屏障降低 IBS 敏感性的机制研究

陈宇¹, 施佳君¹, 富丹婷¹, 杨钦钦¹, 傅睿¹, 朱佳杰^{1,2}, 朱明锦^{1,2},
刘忻颖^{1,2}, 陈明显^{1,2*}

(1. 浙江省中医药研究院, 杭州 310007; 2. 浙江中医药大学附属省立同德医院, 杭州 310007)

【摘要】 目的 研究抑肝扶脾汤 (Yigan Fupi decoction, YGFP) 对肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 的改善作用, 并从 PKA/PKC-CREB 通路深入研究其修复肠道屏障降低 IBS 敏感性的作用机制。**方法** 将母婴分离后的大鼠随机分为模型对照 (M) 组、抑肝扶脾汤 (YGFP) 组和未母婴分离的大鼠作为正常对照 (N) 组, YGFP 组予 YGFP 连续 4 周。腹壁撤退反射 (abdominal withdraw reflex, AWR) 评估肠道敏感性, LC-MS/MS 法检测胆汁酸代谢物浓度, ELISA 法检测 IL-6 和 CXCL1 的血清水平, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察结肠病理学变化, Western Blot 和免疫组化检测 PKA、PKC、CREB、5HT2AR、5-HT7R、ZO-1、Claudin 1 的蛋白相对表达。**结果** 与 N 组比, M 组的内脏疼痛阈值降低, 总胆汁酸代谢物、IL-6 和 CXCL1 含量明显升高, PKA、PKC、CREB、5HT2AR、5-HT7R 蛋白相对表达显著升高, ZO-1、Claudin 1 的蛋白相对表达明显下降。与 M 组相比, 抑肝扶脾汤可显著增加 IBS 大鼠的内脏疼痛阈值, 显著降低总胆汁酸代谢物、IL-6 和 CXCL1 含量, 使 PKA、PKC、CREB、5HT2AR、5-HT7R 蛋白相对表达明显降低, ZO-1、Claudin 1 的蛋白相对表达升高。**结论** 抑肝扶脾汤可有效改善 IBS, 其机制可能是通过调控 PKA/PKC-CREB 通路修复肠道屏障降低其敏感性实现的。

【关键词】 抑肝扶脾汤; 肠道屏障; IBS 敏感性; PKA/PKC; CREB

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0512-10

Mechanistic study of Yigan Fupi decoction-mediated repair of the intestinal barrier and reduction of IBS sensitivity through regulation of the PKA/PKC-CREB pathway

CHEN Yu¹, SHI Jiajun¹, FU Danting¹, YANG Qinqin¹, FU Rui¹, ZHU Jiajie^{1,2},
ZHU Mingjin^{1,2}, LIU Xinying^{1,2}, CHEN Mingxian^{1,2*}

(1. Zhejiang Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 2. Provincial Tongde Hospital Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

Corresponding author: CHEN Mingxian. E-mail: chenmingxian2005@163.com

【Abstract】 Objective To study the therapeutic effects of Yigan Fupi decoction (YGFP) on irritable bowel syndrome (IBS) and its mechanism of action in repairing the intestinal barrier and reducing IBS sensitivity through the

【基金项目】 浙江省科技厅 2024 年院所专项 (YSZX2401), 浙江省自然科学基金 (LY21H270003, ZCLMS25H2701)。

Funded by Zhejiang Provincial Department of Science and Technology Research Institute Support Program 2024 (YSZX2401), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY21H270003, ZCLMS25H2701)。

【作者简介】 陈宇, 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 动物医学。Email: blow2000@163.com

【通信作者】 陈明显, 男, 博士, 主任中医师, 研究方向: 中医脾胃病。Email: chenmingxian2005@163.com

PKA/PKC-CREB pathway. **Methods** Baby rats separated from their mother were randomly divided into a model control (M) and a YGFP group, while baby rats without maternal separation were used as a normal control (N) group. The YGFP group was given YGFP for 4 weeks. Abdominal withdrawal reflex was used to evaluate intestinal sensitivity. Liquid chromatography tandem mass spectrometry and ELISA were used to detect bile acid metabolite concentrations and serum levels of interleukin (IL)-6 and CXCL1, respectively. HE staining was used to observe pathological changes in the colon, and Western Blot and immunohistochemistry were used to analyze the relative protein expression levels of PKA, PKC, CREB, 5HT2AR, 5-HT7R, ZO-1, and Claudin 1. **Results** Compared with the normal control group, the M group showed a significantly decreased visceral pain threshold, significantly increased levels of total bile acid metabolites, IL-6, and CXCL1, significantly increased relative expression of PKA, PKC, CREB, 5HT2AR, and 5-HT7R, and significantly decreased relative expression of ZO-1 and Claudin 1. Compared with the M group, the YGFP group showed a significantly increased visceral pain threshold, significantly reduced levels of total bile acid metabolites, IL-6, and CXCL1, significantly reduced relative expression of PKA, PKC, CREB, 5HT2AR, and 5-HT7R, and increased relative expression of ZO-1 and Claudin 1. **Conclusions** YGFP effectively improved IBS through a mechanism that may involve repair of the intestinal barrier and reduced sensitivity through the PKA/PKC-CREB pathway.

【Keywords】 Yigan Fupi decoction; intestinal barrier; IBS sensitivity; PKA/PKC; CREB

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是在没有明显器质性病变的情况下,伴排便习惯或大便形态改变的慢性复发性腹部不适甚至腹痛^[1],对患者的生活质量有重大影响,影响全球 5% ~ 10% 的普通人群^[2]。其发病机制尚不十分清楚,目前的研究认为其与肠道动力异常、肠道菌群紊乱、脑肠轴异常、肠道轻度炎症、内脏高敏感和精神心理等极为相关^[3]。临床上西医治疗 IBS 主要为对症治疗,疗效不甚满意,中医药对其治疗具有一定的优势。其中抑肝扶脾汤(Yigan Fupi decoction, YGFP)是陆拯教授治疗腹泻型 IBS 的验方,临床使用已达 30 余年^[4]。前期的临床观察研究表明,YGFP 能有效缓解肠道症状,改善大便秘结和频率,改善肝气乘脾证候^[5]。在良好的临床疗效的基础上,本研究通过母婴分离建立 IBS 大鼠模型,以蛋白激酶(protein kinase, PK)A/PKC-环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)通路为切入点,进一步研究 YGFP 修复肠道屏障降低 IBS 敏感性的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雌性 SPF 级 12 周龄 SD 孕鼠 13 只,孕 17 ~

18 d, 体质量 230 ~ 250 g, 从杭州医学院购买【SCXK(浙)2024-0002】,于浙江省中医药研究院 SPF 级屏障实验室饲养【SYXK(浙)2024-0010】,环境温度:22 ~ 26 °C,湿度:40% ~ 70%,光照:12 h 明暗交替(7:00 ~ 19:00),并在实验中按实验动物“3R”原则给予人道关怀,动物伦理经浙江省中医药研究院实验动物伦理委员会审查通过(浙中研动物伦理审字第[2021]016号)。

1.1.2 实验药物

抑肝扶脾汤:按《天癸病论与临床》,由炒白芍、炒白术、炒黄连、吴茱萸、升麻炭、合欢皮组成^[6],每剂含生药 60 g,原料药主要来源于桐君堂药业有限公司、华东医药股份有限公司、英特药业有限责任公司,由中药房余平主任中药师鉴定质控,汤剂由本院制剂室通过煎煮法制备,水提 2 次,过滤,浓缩至含生药 1 g/mL,分装灭菌,冷藏备用。以芍药苷、小檗碱作为质控标准,通过薄层色谱检测含量,按《中国药典》2020 年版合剂项下相对密度、微生物、pH 值等检测保证汤剂质量^[7]。

1.1.3 主要试剂与仪器

PKA 一抗(4782)购于 CST 公司;PKC 一抗(ab181558)、CREB 一抗(ab32515)均购于 abcam 公司;5-羟色胺 2A 受体(5-hydroxytryptamine report 2A, 5-HT2AR)(PA5-95288)、5-HT7R

(MA5-37958)、闭锁小带蛋白 1(zonula occludens-1, ZO-1)(40-2200)、闭合蛋白 1(senescence-associated epithelial membrane protein 1, Claudin 1)(37-4900)均购于赛默飞公司; GAPDH(60009-1-AP)购于 proteintech 公司; 二抗购于中杉金桥公司; HPLC 级乙腈(A998-4)、HPLC 级甲醇(A452-4)、LCMS 级纯净水(W6-4)均购于 fisher 公司; 大鼠白介素(interleukins, IL)-6 酶联免疫吸附测定试剂盒(E-EL-R0016c)、大鼠趋化因子(CXC 基序)配体 1(C-X-C motif chemokine ligand 1 gene, CXCL1)(IL-8 类似物)酶联免疫吸附试剂盒(E-EL-R0003c)均购于 Elabscience 公司。电泳仪(BIO-RAD 公司), 电转仪(大连竞迈科技有限公司), 酶标仪(芬兰雷勃), 成像系统(Tanon 公司), 液相质谱联用仪(AB SCIEX 公司), 冷冻研磨仪(上海万柏生物), 切片机(徕克公司), 摊片机(徕克公司), 正置显微镜(NIKON 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药

新生 SD 乳鼠, 出生第 2 天起进行母婴分离 3 h, 每天 9:00 ~ 12:00, 连续 2 周, 第 21 天断奶(与母鼠分笼), 筛选出雄性 SD 大鼠, 随机分为模型对照组(M 组)和抑肝扶脾汤组(YGFP 组), 未母婴分离的雄性 SD 大鼠作为正常对照组(N 组), 每组 6 只。饲养至 6 周后 YGFP 组予抑肝扶脾汤 18 g/(kg·d)(相当于成人剂量的 18 倍), 连续 4 周, M 组和 N 组予等量纯水。

1.2.2 肠道敏感性评估

于造模后和治疗结束后分别评价一次肠道敏感性。参考文献^[3]采用直肠刺激法引起腹壁撤退反射(abdominal withdraw reflux, AWR)进行敏感性评估。在实验前及干预后以自制结直肠测压计对各组大鼠分别进行内脏敏感性评价。测定前大鼠禁食不禁水 18 h, 并轻触其肛门部, 使其排尽大便后, 将球囊涂抹石蜡油润滑后塞入肛门约 7 cm, 在肛门外 1 cm 处用医用胶带将其固定在大鼠尾根部, 然后将大鼠置于 18 cm × 8 cm × 6 cm 的特制小笼中, 使其不得转头; 待其完全平静后慢慢向气囊内充气, 观察大鼠腹壁对肠腔球囊扩张刺激的反应。分别记录引起大鼠腹部抬起时的压力值, 每次扩张持续 20 s, 连续测 3 次取平均值, 每次间隔至少 4 min。

1.2.3 血清学检测

ELISA 检测 IL-6 和 CXCL1 的血清学水平。

1.2.4 胆汁酸检测

将肠道内容物经专业处理后制得肠内容物样品, 采用 UPLC-QTOF-MS/MS 对样品中的目标物进行定性定量检测, 具体参数如下: 色谱条件: ExionLC AD system, Waters BEHC18(150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)液相色谱柱, 柱温 40 °C, 进样量为 5 μL。流动相 A(0.1% 甲酸-水溶液), 流动相 B(0.1% 甲酸-乙腈)。质谱条件: AB SCIEX QTRAP 6500+, 采用负模式检测, Curtain Gas(CUR)为 35, Collision Gas(CAD)为 Medium, IonSpray Voltage(IS)为 -4500, Temperature(TEM)为 500, Ion Source Gas1(GS1)为 40, Ion Source Gas2(GS2)为 50。在 AB Sciex 定量软件 OS 中采用默认参数对各离子碎片进行自动识别和积分, 并辅助人工检查。以分析物的质谱峰面积与内标峰面积比值为纵坐标(y), 以分析物的浓度为横坐标(x)绘制线性回归标准曲线, 所有指标的线性 R² 大于 0.99。各胆汁酸的线性方程如下: 甘氨酸胆酸, $y = 0.057\,03x - 9.017\,54e^{-4}$; 甘氨酸鹅脱氧胆酸, $y = 0.055\,23x + 0.127\,75$; 牛磺胆酸, $y = 0.070\,78x + 0.096\,51$; 牛磺鹅脱氧胆酸, $y = 0.080\,42x + 0.113\,08$; 甘氨酸熊脱氧胆酸, $y = 0.060\,40x + 0.006\,73$; 别胆酸, $y = 0.009\,43x - 9.041\,40e^{-4}$; 熊脱氧胆酸, $y = 0.021\,27x + 0.002\,34$; 脱氧胆酸, $y = 0.020\,12x + 5.268\,93e^{-4}$; 牛磺熊脱氧胆酸, $y = 0.109\,43x - 8.540\,28e^{-4}$; 猪脱氧胆酸, $y = 0.018\,80x + 0.001\,35$; 原胆酸, $y = 0.017\,60x - 0.002\,33$; 甘氨酸脱氧胆酸, $y = 0.058\,79x + 0.004\,11$; 甘氨酸石胆酸, $y = 0.076\,78x - 0.001\,43$; α-鼠胆酸, $y = 0.005\,83x - 0.001\,52$; β-鼠胆酸, $y = 0.001\,57x + 2.923\,87e^{-4}$; 7-酮基石胆酸, $y = 0.028\,50x + 5.045\,40e^{-4}$; 牛磺-α-鼠胆酸, $y = 0.059\,58x + 0.005\,76$; 牛磺-β-鼠胆酸, $y = 0.177\,11x - 4.024\,60e^{-4}$; ω-鼠胆酸, $y = 0.003\,54x + 2.240\,29e^{-4}$; 鼠脱氧胆酸, $y = 0.016\,96x + 0.004\,54$; 牛磺猪脱氧胆酸, $y = 0.157\,85x + 0.008\,09$; 牛磺猪胆酸, $y = 0.083\,80x + 0.007\,69$; 牛磺石胆酸, $y = 0.136\,39x + 6.640\,92e^{-4}$; 牛磺脱氧胆酸, $y = 0.113\,95x + 0.013\,35$; 石胆酸, $y = 0.071\,65x - 8.515\,17e^{-5}$; 胆酸, $y = 0.020\,24x$

+ 0.002 37; 鹅脱氧胆酸, $y = 0.031\ 60x + 0.005\ 21$; 猪胆酸, $y = 0.007\ 25x + 0.002\ 48$; 23-脱甲胆酸, $y = 0.017\ 42x - 5.336\ 26e^{-4}$; 甘氨猪胆酸, $y = 0.037\ 13x - 0.002\ 17$; 23-脱甲脱氧胆酸, $y = 0.014\ 46x - 0.001\ 64$; 异石胆酸, $y = 0.023\ 88x + 0.001\ 63$; 12-酮基石胆酸, $y = 0.025\ 57x + 0.001\ 64$; 脱氢石胆酸, $y = 2.001\ 28x + 0.117\ 12$; 石胆酸-3-硫酸, $y = 0.116\ 72x - 0.004\ 69$; 鹅去氧胆酸-3 β -葡萄糖醛酸, $y = 0.023\ 97x - 0.001\ 72$; 3 β -熊脱氧胆酸, $y = 0.019\ 67x - 0.002\ 09$; 3-脱氢胆酸, $y = 0.036\ 45x + 0.001\ 83$; 鹅去氧胆酸-24-酰基- β -D-葡萄糖醛酸, $y = 0.018\ 37x + 0.002\ 69$; 12-氧代鹅去氧胆酸, $y = 0.003\ 60x - 1.291\ 66e^{-4}$; 7,12-二酮基石胆酸, $y = 0.001\ 76x + 2.154\ 05e^{-4}$; 脱氢胆酸, $y = 0.013\ 90x + 8.738\ 55e^{-4}$; 熊果胆酸, $y = 0.012\ 08x + 3.284\ 91e^{-4}$; 7-酮基脱氧胆酸, $y = 0.018\ 40x + 4.446\ 72e^{-4}$; 异脱氧胆酸, $y = 0.016\ 09x + 0.010\ 10$; 3 β -胆酸, $y = 0.016\ 16x + 0.004\ 54$; 牛磺- ω -鼠胆酸, $y = 0.070\ 89x + 0.004\ 13$ 。样本浓度计算:将样品分析物的质谱峰面积与内标峰面积比值,代入线性方程中,计算浓度结果。

1.2.5 大鼠结肠病理学观察

取大鼠结肠部分置于 10% 中性甲醛溶液中固定后,经脱水、透明、浸蜡、包埋后制成蜡块后,用切片机切成 4 μm 薄片,行苏木素-伊红(HE)染色,观察结肠组织的病理改变。

1.2.6 大鼠回肠、结肠的蛋白定量检测

提取回肠、结肠总蛋白并蛋白定量,于制备好的 PAGE 胶上每孔上样约 20 μg 蛋白,经电泳、转膜、染色、封闭、抗体孵育、显色后将其放入成像系统中进行扫描分析。

1.2.7 大鼠回肠、结肠的免疫组化染色

切片经烤片、脱蜡、水化、抗原修复、阻断、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、苏木素染色、透明和封片,采集样本相关部位,计算阳性面积比例。

1.3 统计学分析

所有数据用平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,使用 SPSS 22.0、Image-Pro Plus 6.0 对数据和图片统计分析,运用 ANOVA 单因素方差分析以及多组间数据比较,组间比较采用 LSD 分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 肠道敏感性评价

与 N 组相比, M 组内脏疼痛阈值均显著降低 ($P < 0.01$), 予抑肝扶脾汤后, 大鼠的内脏疼痛阈值较 M 组明显升高 ($P < 0.05$), 提示抑肝扶脾汤给药后可显著降低大鼠的内脏敏感性(见表 1)。

表 1 各组大鼠造模后 AWR 阈值 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$, mmHg)

组别 Groups	内脏疼痛阈值 Visceral pain threshold prior to dosing	给药后内脏疼痛阈值 Visceral pain threshold after dosing
N 组 N group	75.33 $\pm$ 3.15	76.33 $\pm$ 2.69
M 组 M group	60.17 $\pm$ 2.23 **	60.33 $\pm$ 2.97 **
YGFP 组 YGFP group	60.33 $\pm$ 2.13 **	70.00 $\pm$ 2.36 #

注:与 N 组相比, ** $P < 0.01$; 与 M 组相比, # $P < 0.05$ 。(下图同)

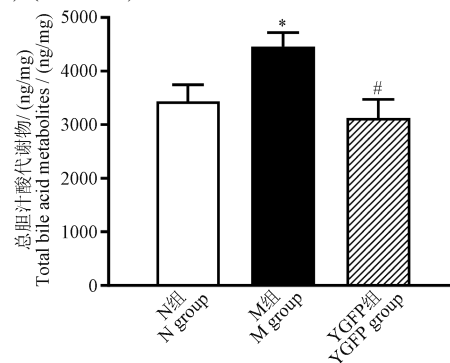
Note. Compared with N group, ** $P < 0.01$. Compared with M group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

2.2 胆汁酸检测

如图 1, M 组的总胆汁酸代谢物浓度较 N 组明显增加 ($P < 0.05$), YGFP 组较 M 组显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 血清中 IL-6 和 CXCL1 含量变化

与 N 组相比, M 组的 IL-6 和 CXCL1 含量显著升高 ($P < 0.01$), YGFP 组较 M 组显著降低 ($P < 0.01$) (见图 2)。



注:与 N 组相比, * $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 总胆汁酸代谢物浓度 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

Note. Compared with N group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Total bile acid metabolite concentration ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

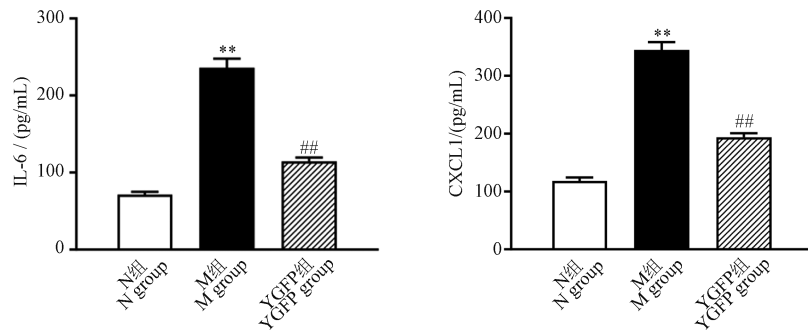


图2 血清中 IL-6 和 CXCL1 含量($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

Figure 2 Serum levels of IL-6 and CXCL1($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

2.4 大鼠结肠病理学观察

HE 染色显示, M 组大鼠结肠黏膜组织少量炎症细胞浸润, 未见结构损伤; YGFP 组炎症细胞浸润较 M 组明显降低, 未见形态损伤(见图 3)。

2.5 大鼠回肠、结肠 PKA 和 PKC 的蛋白表达

与 N 组相比, M 组大鼠结肠的 PKA 蛋白表达明显增加($P < 0.05$), 回肠的 PKA 蛋白表达有

增加趋势($P > 0.05$), 回肠和结肠的 PKC 蛋白表达均显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$), 予 YGFP 后大鼠结肠和回肠的 PKA 及结肠的 PKC 蛋白表达均有降低趋势($P > 0.05$), 回肠的 PKC 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)(见图 4)。

通过对回肠、结肠的免疫组化图分析可知, M 组较 N 组回肠、结肠的 PKA、PKC 的表达明显升

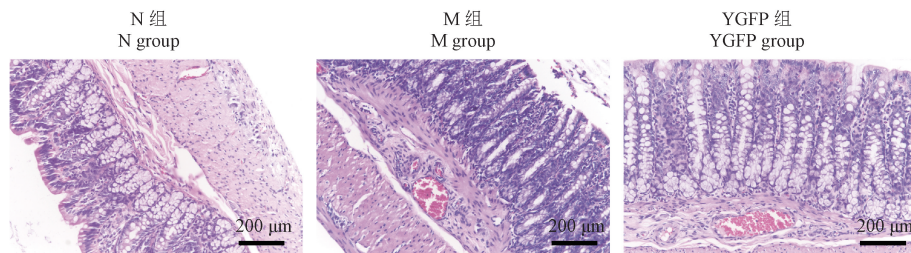


图3 结肠 HE 染色

Figure 3 HE staining of colon

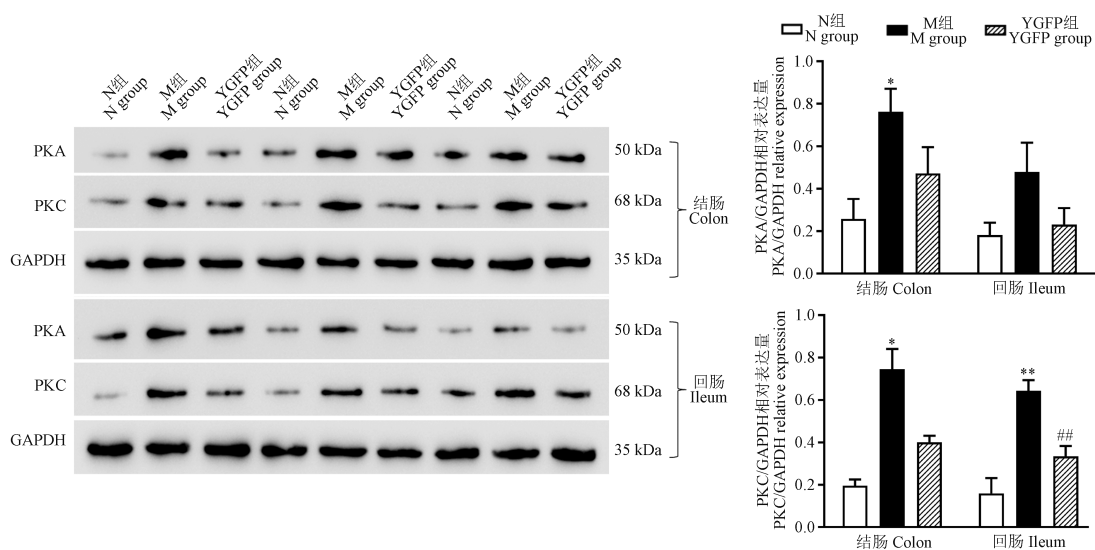


图4 回肠、结肠 PKA 和 PKC 的蛋白相对表达($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

Figure 4 Relative protein expression of PKA and PKC in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

高($P < 0.01$), 予 YGFP 后表达明显降低($P < 0.01, P < 0.05$), (见图 5)。

2.6 大鼠回肠、结肠 CREB 的蛋白表达

如 Western Blot 结果所示, 与 N 组相比, M 组大鼠回肠、结肠的 CREB 蛋白表达明显增加($P < 0.05$), YGFP 组大鼠回肠的 CREB 蛋白表达显著降低($P < 0.05$) (图 6)。

如免疫组化分析所示, 与 N 组相比, M 组大鼠回肠、结肠的 CREB 蛋白表达明显增加($P < 0.01$), YGFP 组大鼠结肠的 CREB 蛋白表达显著

降低($P < 0.05, P < 0.01$) (图 7)。

2.7 大鼠回肠、结肠 5HT2AR 和 5-HT7R 的蛋白表达

与 N 组相比, M 组大鼠回肠、结肠的 5-HT2AR 和 5-HT7R 蛋白表达明显增加($P < 0.01$), 予 YGFP 后大鼠结肠和回肠的 5-HT2AR 和 5-HT7R 蛋白表达显著降低($P < 0.01, P < 0.05$) (见图 8)。

如图 9 通过对回肠、结肠的免疫组化图分析可知, M 组较 N 组回肠、结肠的 5-HT2AR、5-HT7R

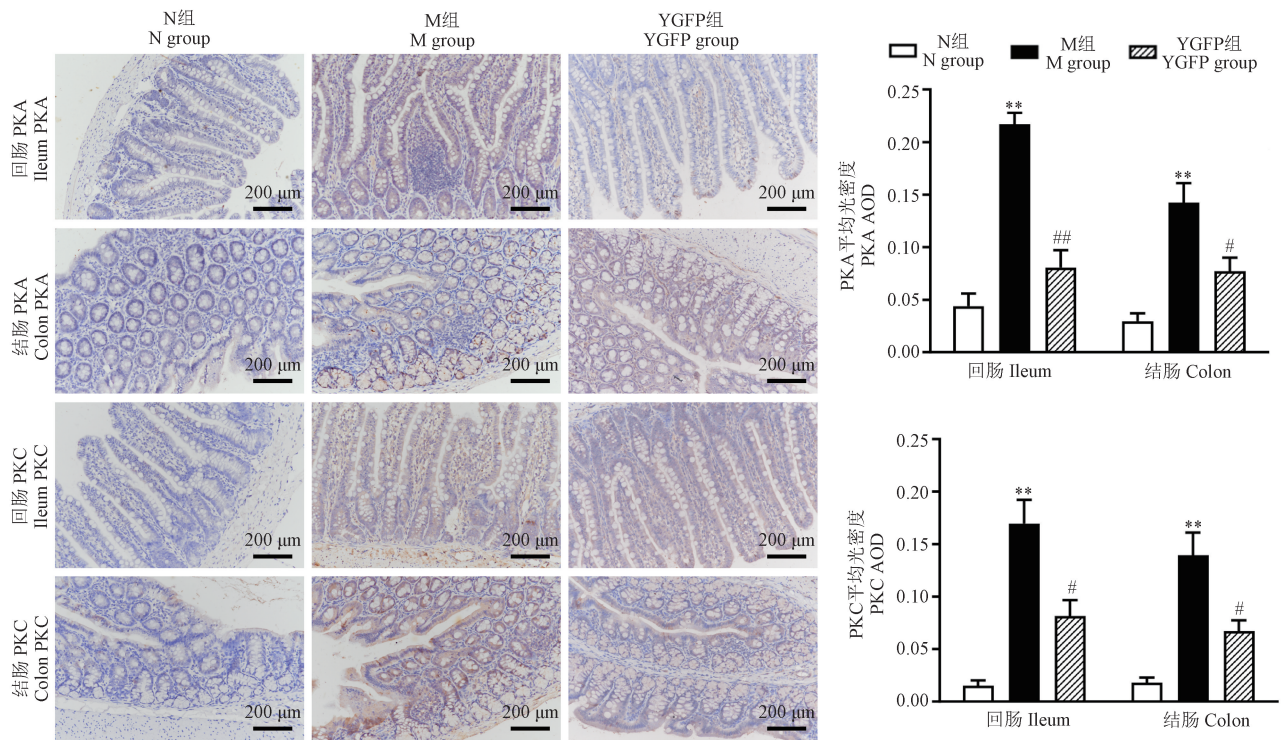


图 5 回肠、结肠 PKA 和 PKC 的免疫组化染色及分析($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

Figure 5 Immunohistochemical staining and analysis of PKA and PKC in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

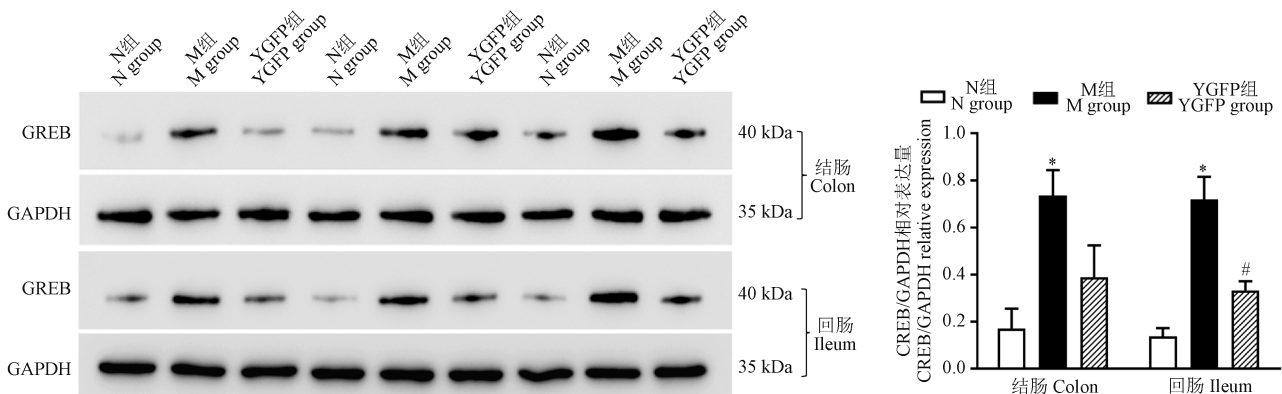


图 6 回肠、结肠 CREB 的蛋白相对表达($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

Figure 6 Relative protein expression of CREB in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

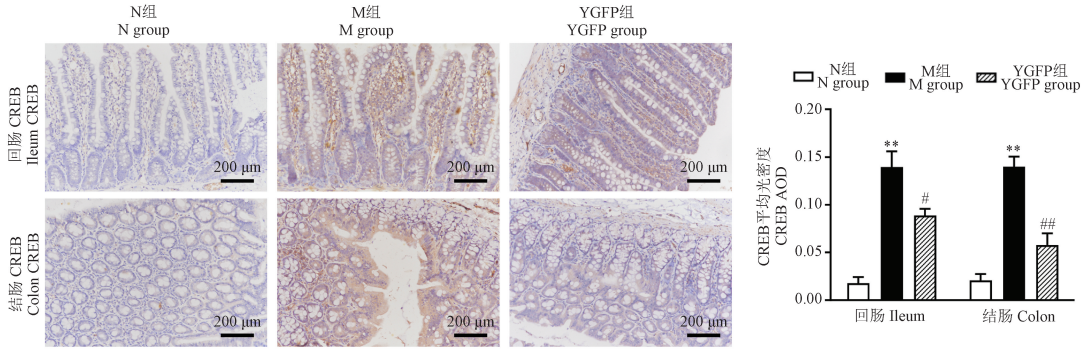


图 7 回肠、结肠 CREB 的免疫组化染色及分析($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

Figure 7 Immunohistochemical staining and analysis of CREB in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

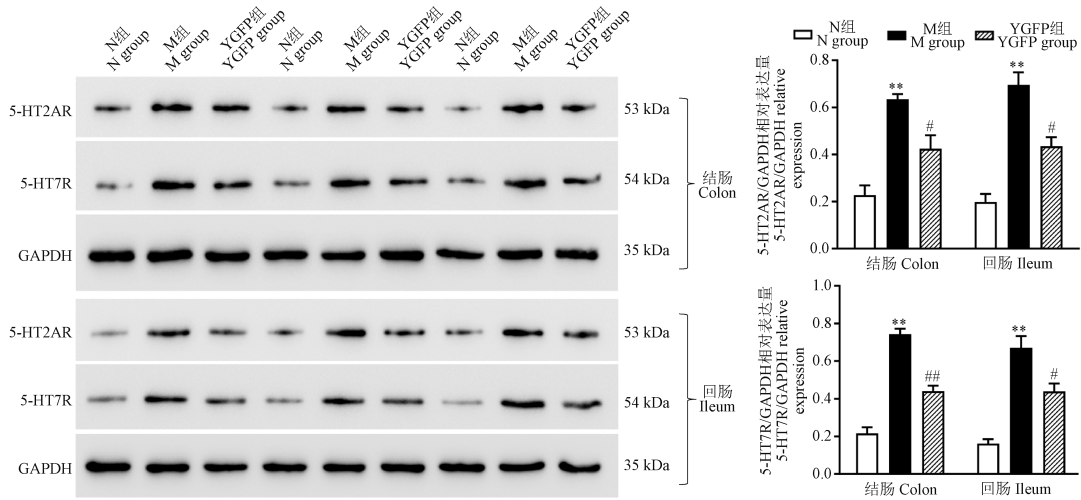


图 8 回肠、结肠 5-HT2AR 和 5-HT7R 的蛋白相对表达($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

Figure 8 Relative protein expression of 5-HT2AR and 5-HT7R in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

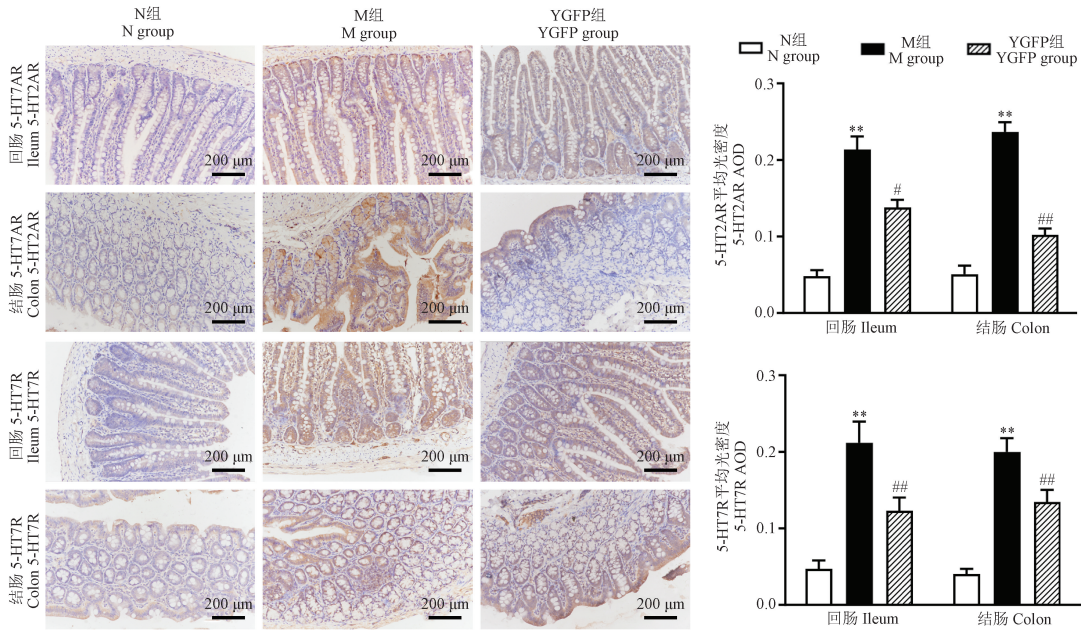


图 9 回肠、结肠 5-HT2AR 和 5-HT7R 的免疫组化染色及分析($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

Figure 9 Immunohistochemical staining and analysis of 5-HT2AR and 5-HT7R in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

的表达明显升高($P < 0.01$), 给与 YGFP 后表达显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

2.8 大鼠回肠、结肠 ZO-1 和 Claudin 1 的蛋白表达

与 N 相比, M 组大鼠回肠、结肠的 ZO-1 及回肠 Claudin 1 的蛋白表达明显降低($P < 0.01, P <$

0.05), 予 YGFP 后大鼠结肠和回肠的 ZO-1 和 Claudin 1 蛋白表达均有升高趋势($P > 0.05$) (见图 10)。通过对回肠、结肠的免疫组化图分析知, M 组较 N 组回肠、结肠的 ZO-1、Claudin 1 的表达明显降低($P < 0.01$), 给与 YGFP 后表达显著升高($P < 0.01, P < 0.05$) (见图 11)。

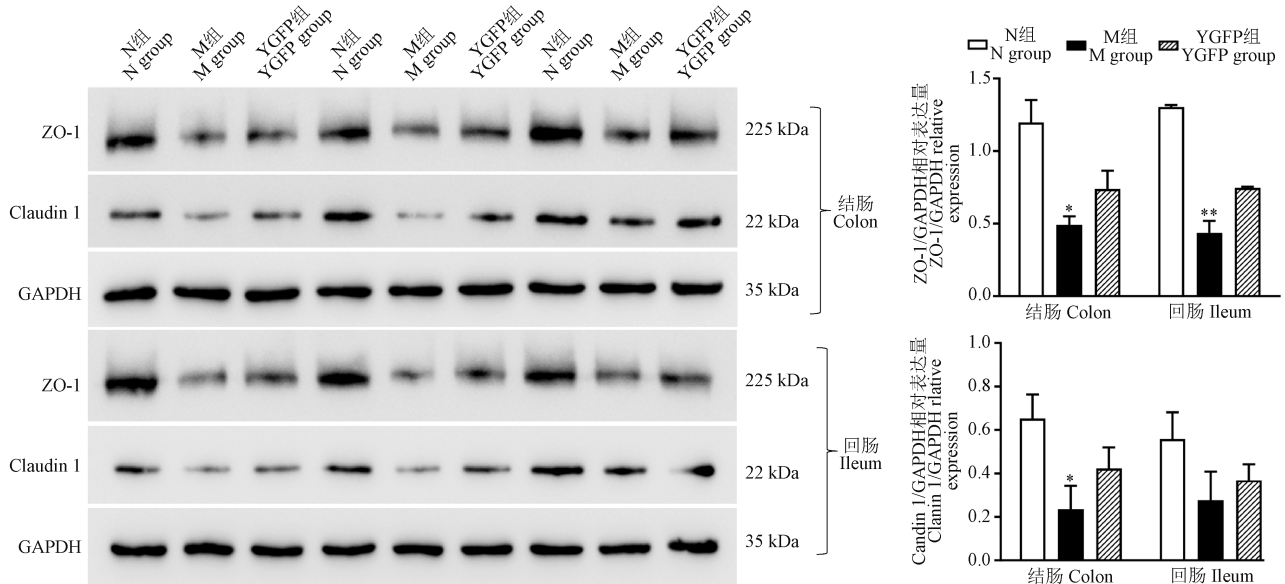


图 10 回肠、结肠 ZO-1 和 Claudin 1 的蛋白相对表达($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

Figure 10 Relative protein expression of ZO-1 and Claudin 1 in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

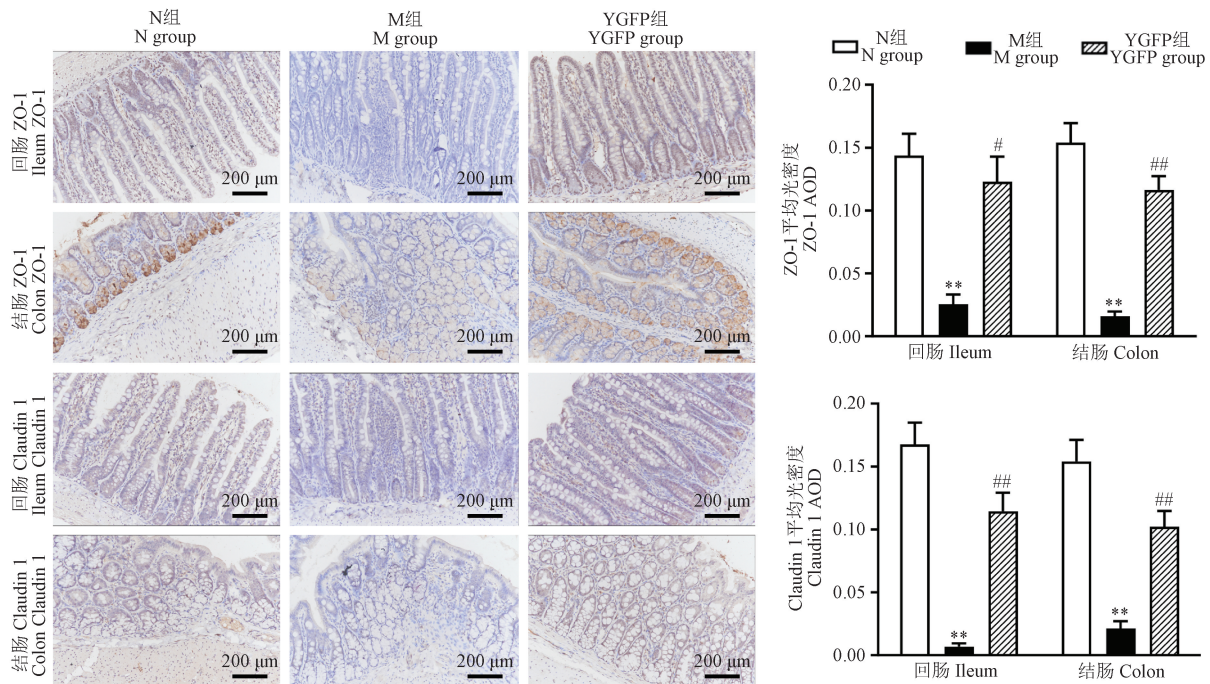


图 11 回肠、结肠 ZO-1 和 Claudin 1 的免疫组化染色及分析($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

Figure 11 Immunohistochemical staining and analysis of ZO-1 and Claudin 1 in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

3 讨论

中医学多从肝脾失调来探讨内脏高敏感性在 IBS 发病中的机制,IBS 内脏痛觉敏感的症状与中医之“痛泻”极为相似,历代医家多认为是土虚木乘,肝脾不和,脾受肝制,运化失常所致,总结出“木旺克土”是其发病基础,从肝脾论治是治疗本病的主要方法。抑肝扶脾汤,应用抑肝扶脾、肝脾并重之法配伍而成。本方以白芍缓急止痛,白术健脾燥湿,黄连清胃理肠,吴茱萸温肝开郁,升麻升发清阳,合欢皮调气和血。六药共奏抑肝扶脾、缓急止痛、祛湿止泻之功效,可使肝脾健,气行湿祛,肝脾和调。本研究采用新生大鼠母婴分离进行造模后^[8],模型大鼠的内脏敏感性较正常组明显升高,抑肝扶脾汤干预后,大鼠的内脏疼痛阈值明显升高,敏感性降低。

胆汁酸具有调节肠蠕动的的作用,且影响肠道敏感性^[9-10]。胆汁酸代谢改变和 IBS 生态失调之间存在相关性^[11]。本研究 M 组的总胆汁酸代谢物浓度高于 N 组,抑肝扶脾汤干预后总胆汁酸代谢物较 M 组显著下降,表明抑肝扶脾汤可能通过调节 IBS 肠道微生态来降低胆汁酸的分泌。

有研究表明,PKA、PI3K/Akt 和 PKC 级联反应能促进下游促炎因子转录,诱发内脏高敏感性而导致 IBS 的发生^[12]。本研究 IBS 模型大鼠较 N 组回肠、结肠的 PKA、PKC 的表达明显升高,PKA、PKC 的表达减少。环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号传导的改变与胃肠道功能障碍有关^[13],这已被认为是治疗 IBS 样症状的潜在目标。cAMP 诱导 cAMP 依赖性 PKA 的敏化,进而触发下游 cAMP 信号传导,如 CREB。本研究通过对回肠、结肠的蛋白相对表达分析发现,M 组较 N 组回肠、结肠的 CREB 的表达显著升高,YGFP 组的 CREB 的表达显著降低。

另有研究发现,IBS 与炎症和疼痛敏化密切相关^[14]。有研究发现,腹泻型 IBS 小鼠血清中 IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 和 CXCR3 等炎症相关因子浓度升高^[15]。IL-6 和 IL-8 是 IBS 主要的炎症因子,是炎性反应的促发剂,

加剧炎症反应。CXCL1 与 IL-8 具有潜在相似的作用,CXCL1 在炎症反应期间会有较高的表达,从而促进炎症过程。本实验结果显示,IBS 模型大鼠的炎症相关因子 IL-6 和 CXCL1 含量显著升高,抑肝扶脾汤灌胃后又明显下降,表明抑肝扶脾汤可降低 IBS 大鼠的炎症反应。5-HT_{2A}R 是神经源性疼痛相关的 5-HT 受体亚型,5-HT_{2A}R 激动剂介导着人体的结肠黏膜分泌反应,5-HT_{2A}R 激动剂应增加 IBS 等胃肠易激障碍患者的转运^[16]。5-HT₇R 是 G 蛋白偶联受体家族中研究最多的成员之一,其在调节平滑肌松弛和内脏感觉方面起重要作用,与 IBS 等疾病有关^[17]。抑制 5-HT₇R 导致压力阈值升高,从而阻断刺激肠蠕动,降低肠顺应性^[18]。本研究结果显示 M 组大鼠回肠、结肠的 5HT_{2A}R 和 5-HT₇R 蛋白相对表达较 N 组明显增加,加用抑肝扶脾汤之后大鼠结肠和回肠的 5HT_{2A}R 和 5-HT₇R 蛋白相对表达显著降低,抑肝扶脾汤可调节 5-HT 受体亚型的表达。这些结果均提示抑肝扶脾汤可降低肠道炎症和疼痛敏感性。

此外,IBS 中内脏过敏的起源和严重程度与肠屏障功能障碍有关^[19]。肠道屏障由上皮细胞和紧密连接蛋白(tight junction proteins, TJ)组成,可调节细胞旁通透性,以防止管腔内的有害物质通过肠黏膜进入其他组织^[20]。ZO-1、Claudin 1 和 occludin 是最重要的 TJ 成分,在维持肠道屏障功能发挥重要作用^[21]。Western Blot 和免疫组化结果均显示 IBS 模型大鼠的回肠、结肠的 ZO-1 及回肠 Claudin 1 的蛋白相对表达较 N 组明显降低,抑肝扶脾汤干预后大鼠结肠和回肠的 ZO-1 和 Claudin 1 蛋白表达均有所增加,表明 IBS 大鼠存在肠道屏障功能障碍,抑肝扶脾汤对其有修复作用。

因此,抑肝扶脾汤可能通过调控 PKA/PKC-CREB 通路,抑制促炎因子,促进肠道紧密连接蛋白,修复 IBS 大鼠的肠道屏障功能,从而降低内脏高敏感性而改善 IBS 症状。

参 考 文 献(References)

- [1] BERTIN L, ZANCONATO M, CREPALDI M, et al. The role of the FODMAP diet in IBS [J]. *Nutrients*, 2024, 16 (3): 370.
- [2] MAYER E A, RYU H J, BHATT R R. The neurobiology of

- irritable bowel syndrome [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28 (4): 1451–1465.
- [3] 张佳河, 祝旺, 沈丹婷, 等. 腹泻型肠易激综合征动物模型评价的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32 (2): 238–247.
- ZHANG J H, ZHU W, SHEN D T, et al. Research progress on animal models for the evaluation of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(2): 238–247.
- [4] 傅睿, 陈明显, 李亚平, 等. 抑肝扶脾汤治疗腹泻型肠易激综合征的临床应用 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2018, 42(6): 426–431.
- FU R, CHEN M X, LI Y P, et al. Clinical application of Yigan fupi decoction for treating irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2018, 42 (6): 426–431.
- [5] 陈明显, 陈军贤, 夏亮, 等. 抑肝扶脾汤治疗腹泻型肠易激综合征的随机对照临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(6): 656–660.
- CHEN M X, CHEN J X, XIA L, et al. Treating irritable bowel syndrome with diarrhea patients by Yigan fupi decoction: a randomized controlled trial [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2014, 34(6): 656–660.
- [6] 陆拯. 天癸病论与临床 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2011.
- LU Z. Theory and clinical practice of Tianqi disease [M]. Beijing: People's Medical Publishing House Co., Ltd; 2011.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; 2020 edition volume I [S]. Beijing: China Medical Science Press; 2020.
- [8] COUTINHO S V, PLOTSKY P M, SABLAD M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282 (2): G307–G316.
- [9] ZHAO J, TIAN L, XIA B, et al. Cholecystectomy is associated with a higher risk of irritable bowel syndrome in the UK Biobank: a prospective cohort study [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1244563.
- [10] MIN Y W, REZAIE A, PIMENTEL M. Bile acid and gut microbiota in irritable bowel syndrome [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2022, 28(4): 549–561.
- [11] DENG X, XIAO L, LUO M, et al. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota in irritable bowel syndrome [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2023, 38 (7): 1072–1082.
- [12] GUO Y, LU Q, YANG X J, et al. Efficacy of Shu-Yi-Ning-Chang decoction on IBS-D: modulating Nr4a3 pathway to reduce visceral hypersensitivity [J]. *PLoS One*, 2024, 19 (4): e0299376.
- [13] ZHANG Y, LI X, LU S, et al. Stress triggers gut dysbiosis via CRH-CRHR1-mitochondria pathway [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2024, 10(1): 93.
- [14] YUAN Y, WANG X, HUANG S, et al. Low-level inflammation, immunity, and brain-gut axis in IBS: unraveling the complex relationships [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(2): 2263209.
- [15] JANG J H, JANG S Y, AHN S, et al. Chronic gut inflammation and dysbiosis in IBS: unraveling their contribution to atopic dermatitis progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5): 2753.
- [16] HOLDCROFT A, SAPSED-BYRNE S, MA D, et al. Sex and oestrous cycle differences in visceromotor responses and vasopressin release in response to colonic distension in male and female rats anaesthetized with halothane [J]. *Br J Anaesth*, 2000, 85(6): 907–910.
- [17] ZHANG S, TIAN D, XIA Z, et al. Chang-Kang-Fang alleviates diarrhea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) through inhibiting TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 330: 118236.
- [18] WU Y, LI S, LV L, et al. Protective effect of *Pediococcus pentosaceus* Li05 on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in rats [J]. *Food Funct*, 2024, 15 (7): 3692–3708.
- [19] NOZU T, MIYAGISHI S, NOZU R, et al. Losartan improves visceral sensation and gut barrier in a rat model of irritable bowel syndrome [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2020, 32(6): e13819.
- [20] VANCAMELBEKE M, VERMEIRE S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 11(9): 821–834.
- [21] WEI Y, FAN Y, HUANG S, et al. Baizhu Shaoyao decoction restores the intestinal barrier and brain-gut axis balance to alleviate diarrhea-predominant irritable bowel syndrome via FoxO1/FoxO3a [J]. *Phytomedicine*, 2024, 122: 155163.

[收稿日期] 2024–09–30