

# 黄芪建中汤对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道炎症的影响及机制<sup>△</sup>

孟欣茹\*, 孟娜, 赵莉, 刘惠瑾<sup>#</sup>(河北省中医院儿科, 石家庄 050033)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)18-2273-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.18.10



**摘要** **目的** 基于促分裂原活化的蛋白激酶(MAPK)/核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路探讨黄芪建中汤对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)大鼠肠道炎症的影响及潜在机制。**方法** 取雄性SD大鼠,随机选取10只作为对照组,剩余大鼠采用乙酸灌肠+束缚应激的方式制备IBS-D大鼠模型。将造模成功的大鼠随机分为IBS-D组、中药组(黄芪建中汤15 g/kg)、阳性对照药组(利福昔明片150 mg/kg)组、激活剂组(p38 MAPK激活剂anisomycin 125  $\mu$ g/kg)、中药+激活剂组(黄芪建中汤15 g/kg+anisomycin 125  $\mu$ g/kg),每组10只。各组大鼠灌胃或尾静脉注射相应药液或等体积生理盐水,每天1次,连续2周。末次给药后,收集其24 h粪便,进行粪便含水量计算及粪便性状评分评估,并检测最小容量阈值;检测血清中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6水平;观察结肠组织病理学变化;检测结肠组织中紧密连接蛋白ZO-1、闭合蛋白(occludin)mRNA及MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白的表达情况。**结果** 与对照组相比,IBS-D组大鼠结肠组织可见明显水肿和炎症细胞浸润,其粪便含水量及性状评分,血清炎症因子水平,以及结肠组织中p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65蛋白的磷酸化水平均显著升高,最小容量阈值和ZO-1、occludin mRNA的表达均显著降低或下调( $P<0.05$ );与IBS-D组相比,中药组和阳性对照药组大鼠结肠组织病理学改变有所缓解,上述指标均显著好转( $P<0.05$ ),而激活剂组上述指标均进一步恶化( $P<0.05$ );与中药组相比,中药+激活剂组大鼠各定量指标均被显著逆转( $P<0.05$ )。**结论** 黄芪建中汤可减轻IBS-D大鼠的结肠炎症,缓解内脏高敏性,对其肠道屏障功能具有一定的保护作用;上述作用可能与抑制MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路有关。

**关键词** 黄芪建中汤;腹泻型肠易激综合征;肠道炎症;MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路

## Effects and mechanism of Huangqi jianzhong decoction on intestinal inflammation in the rats of irritable bowel syndrome with diarrhea

MENG Xinru, MENG Na, ZHAO Li, LIU Huijin (Dept. of Paediatrics, Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050033, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the effects and potential mechanism of Huangqi jianzhong decoction on intestinal inflammation in the rats of irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D) based on the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. **METHODS** Male SD rats were selected. Ten rats were randomly chosen as the control group, and the remaining rats (50 rats) were used to prepare the IBS-D model by acetic acid enema+restraint stress. The rats with successful modeling were randomly divided into the IBS-D group, the traditional Chinese medicine (TCM) group (Huangqi jianzhong decoction 15 g/kg), the positive control drug group (Rifaximin tablets 150 mg/kg), the activator group (anisomycin 125  $\mu$ g/kg, the activator of p38 MAPK), and the TCM+activator group (Huangqi jianzhong decoction 15 g/kg+anisomycin 125  $\mu$ g/kg), with 10 rats in each group. Rats in each group were given a gavage or tail vein injection of the corresponding medicine liquid or the same volume of normal saline, once a day for two consecutive weeks. After the last administration, feces within 24 hours were collected for the calculation of fecal water content and fecal trait score, and the minimum volume threshold was detected. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and IL-6 in serum were detected; the pathological changes of colonic tissue were observed; the expressions of tight junction protein ZO-1, occludin mRNAs and proteins related to the MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway in colonic tissue were determined. **RESULTS** Compared with the control group, obvious edema and inflammatory cell infiltration could be observed in the colonic tissue of rats in the IBS-D group. The fecal water content and trait score, serum levels of inflammatory factors, as well as the protein phosphorylation levels of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B p65 in the colonic tissue were significantly increased, while the minimum volume threshold and the mRNA expressions of ZO-1 and occludin were significantly decreased or down-regulated ( $P<0.05$ ). Compared with the IBS-D group, the pathological changes of colonic tissue in the TCM group and positive control drug group were alleviated, and the above indicators improved significantly ( $P<0.05$ ), while the above indicators in the activator group deteriorated further ( $P<0.05$ ). Compared with the TCM group, the above indicators in the TCM+activator group were significantly reversed ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** Huangqi

<sup>△</sup>基金项目 河北省中医药管理局科研计划项目(No.2023050)

\*第一作者 主治医师,硕士。研究方向:中医儿科学、小儿脾胃病。E-mail:15383188235@163.com

<sup>#</sup>通信作者 副主任医师,硕士。研究方向:小儿脾胃病。E-mail:892855976@qq.com

jianzhong decoction can alleviate colonic inflammation in IBS-D rats, relieve visceral hypersensitivity, and has a certain protective effect on their intestinal barrier function. The above-mentioned effects may be related to the inhibition of the MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**KEYWORDS** Huangqi jianzhong decoction; irritable bowel syndrome with diarrhea; intestinal inflammation; MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是临床常见胃肠道疾病之一,其中腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome with diarrhea, IBS-D)占IBS患者总数的45%以上,且患病率持续上升<sup>[1]</sup>。尽管IBS-D的发病机制尚未完全阐明,但研究证实,炎症反应贯穿于IBS-D发生发展的全过程,故抑制炎症反应可有助于阻止IBS-D的进展<sup>[2]</sup>。目前,化学药治疗IBS-D的副作用较多,且存在停药后易复发等不足<sup>[3]</sup>;而中医草药疗法具有多组分、多靶点、多途径、低成本等作用特点,已被广泛用于缓解IBS-D相关症状<sup>[4]</sup>。

黄芪建中汤出自《金匮要略》,由小建中汤(桂枝、白芍、甘草、生姜、大枣、饴糖)加黄芪组成,具有温中健脾、止泻、柔肝止痛等功效,用于临床治疗IBS-D的效果较好,但具体机制有待完善<sup>[5]</sup>。促分裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)被认为是炎症反应和先天免疫的重要调节因子,与核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通路密切相关,可参与NF- $\kappa$ B的活化,因此药物可通过抑制MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路来发挥炎症抑制作用<sup>[6]</sup>。已有研究表明,减少MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路及相关炎症介质的相互作用,可有效预防和治疗大肠杆菌引起的腹泻<sup>[7]</sup>;此外,叶坤等<sup>[8]</sup>的网络药理学研究结果显示,MAPK、NF- $\kappa$ B可能是黄芪建中汤干预IBS-D的潜在靶点,但尚未在实验动物体内得到验证。基于此,本研究拟从MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路出发,通过构建IBS-D大鼠模型,初步探讨黄芪建中汤对IBS-D大鼠肠道炎症的影响及潜在机制,以期阐明黄芪建中汤干预IBS-D的具体机制及其进一步应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括IX51型倒置显微镜(日本Olympus公司)、ABI 7500型定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems公司)、DYCZ-40型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、Elx808型多功能酶标仪(美国BioTek公司)、ChemiScope 6100型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

白芍(批号B4116613)、黄芪(批号B4116613)、甘草(批号B4116613)、桂枝(批号B4116613)均购自广东省药材公司中药饮片厂,生姜(批号2020063)、大枣(批号20210510)均购自广州保健堂大药房,饴糖(批号SS26615)购自上海三抒生物科技有限公司;上述饮片经

南方医科大学中医药学院中药鉴定教研室刘传明教授鉴定,均为真品。

利福昔明片(阳性对照药,批号22081,规格0.2 g)由意大利ALFASIGMA S. p. A.提供; p38 MAPK激活剂anisomycin的对照品(批号SC0132,纯度>98%)购自上海碧云天生物技术有限公司;肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为ELK1396、ELK1272、ELK1158)均购自科鹿(武汉)生物科技有限责任公司; PrimeScript<sup>TM</sup>逆转录试剂盒(批号RR047A)购自日本Takara公司; 兔抗p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK(phosphorylated p38 MAPK, p-p38 MAPK)、NF- $\kappa$ B p65、磷酸化NF- $\kappa$ B p65(phosphorylated NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65)抗体,鼠抗 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G二抗(批号分别为ab308333、ab47363、ab207297、ab239882、ab8224、ab205719)均购自英国Abcam公司; HRP标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号BST16A04A16A54)购自武汉博士德生物工程有限公司; PCR所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成。

### 1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体重190~220 g,由张家口信信生物科技有限责任公司提供,动物生产许可证号为SCXK(冀)2024-003。所有大鼠均饲养于相对湿度(65 $\pm$ 5)%、温度(23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、每12 h光照/黑暗循环的动物房内,自由摄食、饮水。本研究实验操作均按照动物护理和使用委员会的相关要求进行,方案经河北省中医院医学伦理委员会审批通过,批件号为HBZY2024-02-09。

## 2 方法

### 2.1 药液的制备

取饴糖40 g、黄芪5 g、甘草6 g、大枣12 g、桂枝9 g、生姜9 g、白芍18 g,混合,加10倍量水浸泡2 h后,煎煮1.5 h,过滤;药渣加8倍量水,煎煮1.5 h,过滤;合并两次滤液,浓缩,得质量浓度为1.5 g/mL(以生药总量计)的药液,备用。

### 2.2 分组、造模与给药

随机选取10只大鼠作为对照组,剩余大鼠(50只)以乙酸灌肠+束缚应激制备IBS-D大鼠模型<sup>[9]</sup>:大鼠禁食过夜后,分别在实验第1、4天麻醉后于肛门近端8 cm处

结肠内滴注4%乙酸溶液1 mL(抬高尾巴的同时按压其肛门,以保证溶液充分进入大鼠体内,持续60 s);与此同时,大鼠每天进行束缚应激,即将其置于自制的束缚笼中限制活动1 h后再进行5 min的夹尾操作,随后再将大鼠置于饲养笼中自由活动,共持续8 d。若大鼠腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分(包括无反应的正常行为、腹肌收缩、腹壁抬高、背弓和骨盆结构抬高评分)不低于3分,且粪便性状评分、粪便含水量均显著高于对照组,则表示IBS-D模型构建成功<sup>[9-10]</sup>。对照组大鼠以生理盐水替代乙酸溶液灌肠,且不进行束缚应激。

将造模成功的大鼠随机分为IBS-D组、中药组、阳性对照药组、激活剂组、中药+激活剂组,每组10只。其中,中药组大鼠灌胃15 g/kg(以生药总量计)的黄芪建中汤<sup>[11]</sup>,并同时尾静脉注射等体积生理盐水;阳性对照药组大鼠灌胃150 mg/kg的利福昔明片药液(以水为溶剂)<sup>[12]</sup>,并同时尾静脉注射等体积生理盐水;激活剂组大鼠尾静脉注射125 μg/kg的anisomycin<sup>[13]</sup>,并同时灌胃等体积生理盐水;中药+激活剂组大鼠灌胃15 g/kg的黄芪建中汤,并同时尾静脉注射125 μg/kg的anisomycin;对照组和IBS-D组大鼠灌胃并同时尾静脉注射等体积生理盐水。所有大鼠每天灌胃/尾静脉注射1次,连续2周。

### 2.3 粪便含水量计算及粪便性状评分评估

末次给药后,收集各组大鼠的24 h粪便,立即称重,得湿重;随后,于80 °C下干燥10 h,再次称重,得干重;以“(粪便湿重-粪便干重)/粪便湿重×100%”计算粪便含水量。

末次给药后的当天,观察各组大鼠的排便情况并进行粪便性状评分,具体标准为:大便干硬,排出较为困难,记1分;大便成形,呈团状块,记2分;大便表面有裂缝,呈香肠状,记3分;大便柔软,呈香肠状,记4分;大便容易排出,呈软团状块,记5分;大便为糊状,边缘毛躁,记6分;水样便,无固定形状,记7分<sup>[8]</sup>。

### 2.4 最小容量阈值检测

收集粪便后,各组大鼠均禁食18 h,以戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将经石蜡油润滑的球囊导管轻轻插入其肛门,并将连接的管子用胶带固定在大鼠的尾巴上,待大鼠适应30 min后将其放入透明容器中,通过导管将水注射至球囊中,每次注射持续30 s。当大鼠腹肌强烈收缩、腹部明显抬高平面、AWR评分为3分时,记录对应的注水量,即为最小容量阈值,以评估大鼠的内脏敏感性(两者成反比)<sup>[12]</sup>。

### 2.5 血清中炎症因子水平检测

上述检测完成后,各组大鼠同法麻醉后,以仰卧位固定,打开其腹腔,经腹主动脉取血(5 mL)。血样以4 500 r/min离心5 min,分离上层血清,按相应试剂盒说明书操作,采用酶标仪检测其血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平。

### 2.6 结肠组织病理学变化观察

采血完成后,各组大鼠以颈椎脱位法处死,分离其结肠,取一部分冻存,备用。取另一部分,用生理盐水洗涤后固定在4%多聚甲醛溶液中,经脱水后以石蜡包埋,切片(厚约5 μm)。取切片,经干燥、脱蜡后,依次用苏木精、伊红染色,经脱水、封片后,使用倒置显微镜观察其结肠组织病理学变化。

### 2.7 结肠组织中紧密连接蛋白、闭合蛋白mRNA表达检测

采用实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)法检测。取“2.6”项下各组大鼠冻存的结肠组织适量,以TRIzol试剂提取总RNA,待测定浓度和纯度后,将其逆转录为cDNA,然后以此cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系包括cDNA模板(2 μL), SYBR Premix Ex Taq II聚合酶(9 μL),正、反向引物(各0.3 μL), ddH<sub>2</sub>O(8.4 μL)。PCR反应条件为:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,62 °C退火、延伸20 s,共40个循环。以β-actin为内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算紧密连接蛋白ZO-1、闭合蛋白(occludin)mRNA的表达水平。β-actin的正向引物为5'-GAAGTGTGACGTTGACATCCG-3',反向引物为5'-GATCCACATCTGCTGGAAG-3',产物长度为94 bp;ZO-1的正向引物为5'-ATTCAGGTCGCTCGCATGAC-3',反向引物为5'-ACTGCGTGGAATGATCGGAG-3',产物长度为114 bp;occludin的正向引物为5'-CTCGGTACAGCAGCAATGGT-3',反向引物为5'-GGCTTCCTGTTGGTGATGTC-3',产物长度为105 bp。

### 2.8 结肠组织中MAPK/NF-κB信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.6”项下各组大鼠冻存的结肠组织适量,经裂解、匀浆后,于冰上超声,提取结肠组织中的总蛋白,以BCA法测定蛋白浓度后,于100 °C下煮沸、变性。取变性蛋白,进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再转移至聚偏二氟乙烯膜上,封闭;洗膜后,加入p-p38 MAPK、p-NF-κB p65、p38 MAPK、NF-κB p65、β-actin一抗(稀释比例均为1:1 000),于4 °C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为1:2 000),于室温下孵育2 h;洗膜后,加入电化学发光试剂显影、成像。使用Image J软件分析和量化图像,以β-actin为内参,以各目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值作为目的蛋白的表达水平,再以p-p38 MAPK与p38 MAPK、p-NF-κB p65与NF-κB p65的表达水平比值作为p38 MAPK、NF-κB p65蛋白的磷酸化水平。

### 2.9 统计学方法

采用SPSS 27.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-q检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

### 3 结果

#### 3.1 黄芪建中汤对大鼠粪便含水量及性状评分的影响

与对照组相比,IBS-D组大鼠的粪便含水量及性状评分均显著升高( $P<0.05$ );与IBS-D组相比,中药组、阳性对照药组大鼠的粪便含水量及性状评分均显著降低,而激活剂组大鼠的粪便含水量及性状评分均显著升高( $P<0.05$ );与中药组相比,中药+激活剂组大鼠的粪便含水量及性状评分均显著升高( $P<0.05$ );与激活剂组相比,中药+激活剂组大鼠的粪便含水量及性状评分均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表1。

表1 各组大鼠的粪便含水量、性状评分、最小容量阈值比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别      | 粪便含水量/%                  | 粪便性状评分/分                | 最小容量阈值/mL               |
|---------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组     | 31.05±3.11               | 3.05±0.31               | 1.25±0.13               |
| IBS-D组  | 62.03±6.25 <sup>a</sup>  | 4.98±0.51 <sup>a</sup>  | 0.88±0.09 <sup>a</sup>  |
| 中药组     | 42.06±4.23 <sup>b</sup>  | 3.17±0.32 <sup>b</sup>  | 1.11±0.12 <sup>b</sup>  |
| 阳性对照药组  | 43.06±4.35 <sup>b</sup>  | 3.21±0.33 <sup>b</sup>  | 1.17±0.12 <sup>b</sup>  |
| 激活剂组    | 78.65±7.91 <sup>c</sup>  | 6.25±0.61 <sup>c</sup>  | 0.64±0.07 <sup>b</sup>  |
| 中药+激活剂组 | 61.08±6.18 <sup>cd</sup> | 5.01±0.52 <sup>cd</sup> | 0.84±0.09 <sup>cd</sup> |

a: 与对照组相比,  $P<0.05$ ; b: 与IBS-D组相比,  $P<0.05$ ; c: 与中药组相比,  $P<0.05$ ; d: 与激活剂组相比,  $P<0.05$ 。

#### 3.2 黄芪建中汤对大鼠最小容量阈值的影响

与对照组相比,IBS-D组大鼠的最小容量阈值显著降低( $P<0.05$ );与IBS-D组相比,中药组、阳性对照药组大鼠的最小容量阈值均显著升高,而激活剂组大鼠的最小容量阈值显著降低( $P<0.05$ );与中药组相比,中药+激活剂组大鼠的最小容量阈值显著降低( $P<0.05$ );与激活剂组相比,中药+激活剂组大鼠的最小容量阈值显著升高( $P<0.05$ )。结果见表1。

#### 3.3 黄芪建中汤对大鼠血清中炎症因子水平的影响

与对照组相比,IBS-D组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平均显著升高( $P<0.05$ );与IBS-D组相比,中药组、阳性对照药组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平均显著降低,而激活剂组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平均显著升高( $P<0.05$ );与中药组相比,中药+激活剂组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平均显著升高( $P<0.05$ );与激活剂组相比,中药+激活剂组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表2。

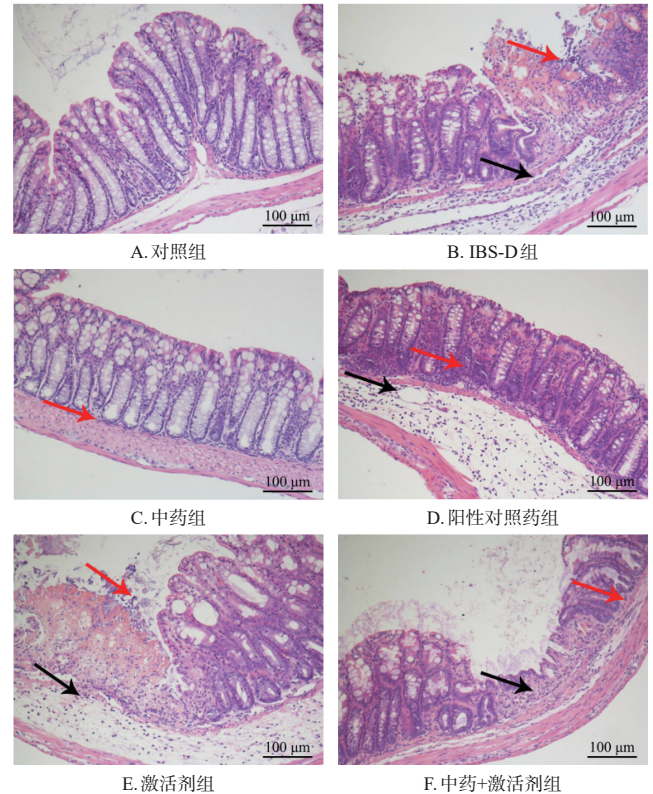
表2 各组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平比较( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$ )

| 组别      | TNF- $\alpha$            | IL-1 $\beta$             | IL-6                     |
|---------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组     | 15.06±1.53               | 8.19±0.82                | 11.34±1.18               |
| IBS-D组  | 58.62±5.93 <sup>a</sup>  | 30.20±3.11 <sup>a</sup>  | 38.51±3.91 <sup>a</sup>  |
| 中药组     | 28.46±2.91 <sup>b</sup>  | 15.62±1.64 <sup>b</sup>  | 20.53±2.11 <sup>b</sup>  |
| 阳性对照药组  | 27.64±2.82 <sup>b</sup>  | 15.86±1.68 <sup>b</sup>  | 21.07±2.18 <sup>b</sup>  |
| 激活剂组    | 78.62±7.92 <sup>c</sup>  | 42.67±4.36 <sup>c</sup>  | 53.64±5.42 <sup>c</sup>  |
| 中药+激活剂组 | 57.42±5.81 <sup>cd</sup> | 29.85±3.05 <sup>cd</sup> | 36.85±3.72 <sup>cd</sup> |

a: 与对照组相比,  $P<0.05$ ; b: 与IBS-D组相比,  $P<0.05$ ; c: 与中药组相比,  $P<0.05$ ; d: 与激活剂组相比,  $P<0.05$ 。

#### 3.4 黄芪建中汤对大鼠结肠组织病理学损伤的影响

对照组大鼠结肠组织结构正常,无炎症细胞浸润;IBS-D组大鼠结肠组织存在明显的水肿和炎症细胞浸润;经中药、阳性对照药干预后,大鼠结肠组织水肿及炎症细胞浸润较IBS-D组有所减轻,而激活剂组大鼠结肠组织的上述病理损伤则较IBS-D组加重;中药+激活剂组大鼠结肠组织的上述病理损伤较激活剂组有所改善,但较中药组明显加重。结果见图1。



黑色箭头:组织水肿;红色箭头:炎症细胞浸润。

图1 各组大鼠结肠组织病理学变化的显微图(苏木精-伊红染色)

#### 3.5 黄芪建中汤对大鼠结肠组织中ZO-1、occludin mRNA表达的影响

与对照组相比,IBS-D组大鼠结肠组织中ZO-1、occludin mRNA的表达均显著下调( $P<0.05$ );与IBS-D组相比,中药组、阳性对照药组大鼠结肠组织中ZO-1、occludin mRNA的表达均显著上调,而激活剂组大鼠结肠组织中ZO-1、occludin mRNA的表达均显著下调( $P<0.05$ );与中药组相比,中药+激活剂组大鼠结肠组织中ZO-1、occludin mRNA的表达均显著下调( $P<0.05$ );与激活剂组相比,中药+激活剂组大鼠结肠组织中ZO-1、occludin mRNA的表达均显著上调( $P<0.05$ )。结果见表3。

#### 3.6 黄芪建中汤对大鼠结肠组织中MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白表达的影响

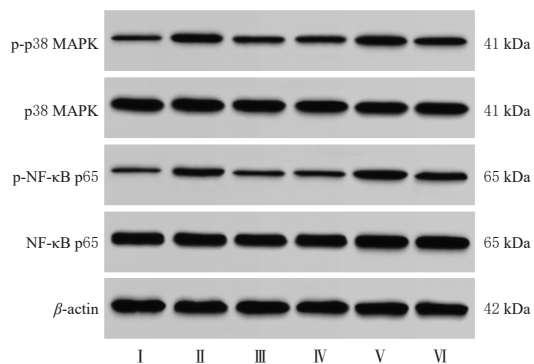
与对照组相比,IBS-D组大鼠结肠组织中p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65蛋白的磷酸化水平均显著升高( $P<$

表3 各组大鼠结肠组织中相关 mRNA 及蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别      | ZO-1 mRNA                 | occludin mRNA             | p-p38 MAPK/p38 MAPK       | p-NF-κB p65/NF-κB p65     |
|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组     | 1.02 ± 0.11               | 0.92 ± 0.10               | 0.24 ± 0.03               | 0.19 ± 0.02               |
| IBS-D组  | 0.55 ± 0.06 <sup>a</sup>  | 0.47 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.67 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 0.52 ± 0.06 <sup>a</sup>  |
| 中药组     | 0.75 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 0.81 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 0.32 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.23 ± 0.03 <sup>b</sup>  |
| 阳性对照药组  | 0.79 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 0.78 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 0.38 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.29 ± 0.03 <sup>b</sup>  |
| 激活剂组    | 0.22 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.17 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.85 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 0.79 ± 0.08 <sup>b</sup>  |
| 中药+激活剂组 | 0.49 ± 0.05 <sup>cd</sup> | 0.42 ± 0.05 <sup>cd</sup> | 0.58 ± 0.06 <sup>cd</sup> | 0.49 ± 0.05 <sup>cd</sup> |

a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与IBS-D组相比,  $P < 0.05$ ; c: 与中药组相比,  $P < 0.05$ ; d: 与激活剂组相比,  $P < 0.05$ 。

0.05); 与IBS-D组相比, 中药组、阳性对照药组大鼠结肠组织中 p38 MAPK、NF-κB p65 蛋白的磷酸化水平均显著降低, 而激活剂组大鼠结肠组织中 p38 MAPK、NF-κB p65 蛋白的磷酸化水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与中药组相比, 中药+激活剂组大鼠结肠组织中 p38 MAPK、NF-κB p65 蛋白的磷酸化水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与激活剂组相比, 中药+激活剂组大鼠结肠组织中 p38 MAPK、NF-κB p65 蛋白的磷酸化水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。结果见表3、图2。



I: 对照组; II: IBS-D组; III: 中药组; IV: 阳性对照药组; V: 激活剂组; VI: 中药+激活剂组。

图2 各组小鼠结肠组织中 MAPK/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的电泳图

#### 4 讨论

IBS是临床上常见的消化系统疾病, IBS-D是最常见的亚型。IBS-D的发病机制尚不清楚, 但学界普遍认为认为是结肠炎症反应、超敏反应、肠道微生物群紊乱、胃肠动力异常和心理异常等多种因素共同作用的结果<sup>[14]</sup>。本研究通过乙酸灌肠+束缚应激的方式构建了IBS-D大鼠模型, 结果显示, 与对照组相比, IBS-D组大鼠的粪便含水量、性状评分均显著升高, 结肠组织水肿及炎症细胞浸润明显增多, 提示IBS-D大鼠模型构建成功。

IBS-D发展的影响因素较多, 其中内脏敏感性的异常增加可引发肠道动力障碍和腹泻, 是该病关键的病理生理机制之一, 故缓解内脏敏感性可有助于IBS-D相关症状的改善<sup>[15]</sup>。此外, 炎症可能是IBS-D发展的另一因素, 有研究者在IBS-D患者体内发现了低度炎症的存在, 推测可能与感染、肠道微生物群改变或肠道通透性

增加, 进而引起腹痛或排便习惯改变等有关<sup>[16]</sup>。TNF-α、IL-1β、IL-6是典型的促炎性细胞因子, 主要由活化的巨噬细胞产生, 可介导炎症反应的上调<sup>[16]</sup>。紧密连接蛋白是构成细胞间紧密连接的关键组分, 包括ZO-1等胞质支架蛋白和occludin等跨膜蛋白。研究指出, ZO-1、occludin是肠黏膜机械屏障形成的重要蛋白, 可调节和维持肠道通透性和细胞极性, 选择性吸收营养和水分, 并阻止细菌和病毒等病原体的入侵<sup>[10]</sup>。本研究结果显示, IBS-D组大鼠的粪便含水量和血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均较对照组显著升高, 最小容量阈值和ZO-1、occludin mRNA的表达均较对照组显著降低或下调, 提示IBS-D大鼠腹泻及炎症反应明显, 肠黏膜机械屏障受损, 肠道通透性增加。

中医治疗具有多靶点协同作用, 在IBS-D治疗领域中独具优势。中医认为, IBS-D所致腹泻、腹痛的基本发病机制是“肝郁脾虚”, 其中肝郁指气机不畅、疏泄失职, 脾虚指运化无权、湿浊内生, 两者相互影响。黄茂建中汤由多味药材组成, 被广泛用于临床IBS-D的治疗。方中, 桂枝、生姜可温中散寒; 黄芪、大枣可补益脾胃, 增强脾脏的运化功能, 改善脾虚导致的腹泻; 甘草与芍药配伍, 可缓急止痛、调和肝脾; 饴糖可温中补虚, 缓急止痛; 诸药合用, 共奏温中健脾、止泻、柔肝止痛之效<sup>[17-18]</sup>。此外, 研究指出, 方中含有槲皮素、山柰酚、β-胡萝卜素、β-谷甾醇等活性成分, 具有抗炎、抗氧化等广泛的药理作用, 可能是该方发挥药效的物质基础<sup>[19]</sup>。本研究结果显示, 经黄茂建中汤干预后, IBS-D大鼠的粪便含水量、性状评分和血清炎症因子水平均显著降低, 最小容量阈值显著升高, 结肠组织水肿及炎症细胞浸润均有所改善, 结肠组织中ZO-1、occludin mRNA的表达均显著上调, 提示该方可改善IBS-D大鼠的腹泻症状, 缓解内脏高敏感性, 抑制炎症反应, 改善肠黏膜机械屏障功能。

MAPK信号通路在肠道屏障功能调节、炎症激活以及机体疼痛感知中具有重要作用, p38 MAPK是该家族的重要成员, 可被炎症因子、应激刺激等激活, 通过调控多种mRNA的表达来改变肠道屏障功能及内脏敏感性, 从而诱发IBS<sup>[20-21]</sup>。NF-κB被证实可通过调控多条细胞信号通路来发挥关键作用, 其中p65作为NF-κB异源二聚体的关键亚基, 在静息状态下存在于细胞质中; 当肠道受到炎症刺激后, NF-κB p65将被释放入核, 从而启动炎症相关基因的表达, 导致肠道炎症和内脏高敏性的发生, 是IBS-D发展过程中的关键通路<sup>[22-23]</sup>。参考现有网络药理学挖掘结果<sup>[5]</sup>, 本研究基于MAPK/NF-κB信号通路对黄茂建中汤干预IBS-D的潜在机制进行了验证。结果显示, IBS-D大鼠结肠组织中p38 MAPK、NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均较正常大鼠显著升高, 提示激活的MAPK/NF-κB信号通路可能参与了IBS-D的发展; 经黄茂建中汤干预后, 大鼠结肠组织中p38 MAPK、

NF- $\kappa$ B p65 蛋白的磷酸化水平均显著降低,其炎症反应、内脏高敏性及肠道屏障功能障碍均得到一定的改善,推断黄芪建中汤的抗 IBS-D 作用可能与抑制 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。随后,本研究通过 p38 MAPK 激活剂来进一步验证,结果显示,单用激活剂对各指标的影响与黄芪建中汤相反;而联用黄芪建中汤+激活剂后,该方对上述指标的改善作用被激活剂显著逆转,表明黄芪建中汤可通过抑制 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路来减轻 IBS-D 大鼠的肠道炎症。

综上所述,黄芪建中汤可减轻 IBS-D 大鼠的结肠炎症,缓解内脏高敏性,对其肠道屏障功能具有一定的保护作用;上述作用可能与抑制 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。但 IBS-D 发病机制复杂,后续将继续开展相关体内研究进一步探索。

### 参考文献

[1] ZHANG M, ZHENG Y J, LI X, et al. Tong-xie-yao-fang alleviates diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in rats via the GCN2/PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 107: 154350.

[2] 邱宇驰, 韩红伟, 张家玮, 等. 基于代谢组学技术探究针灸抑制腹泻型肠易激综合征模型大鼠肠道炎症反应的作用机制[J]. *环球中医药*, 2024, 17(3): 384-392.

[3] 吴心悦, 丁可欣, 吴飞, 等. 中药治疗腹泻型肠易激综合征的生物靶标研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(10): 1820-1831.

[4] YANG S L, LIU H Q, LI K W, et al. Research in revealing the effects on *Cuscuta chinensis* to diarrhea type irritable bowel syndrome based on network pharmacology and molecular docking potential mechanism[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103(19): e38113.

[5] 叶坤, 雷敏, 谢欣, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨黄芪建中汤治疗腹泻型肠易激综合征的作用机制研究[J]. *中国全科医学*, 2022, 25(15): 1814-1824.

[6] XIAO J, HAN Q G, YU Z C, et al. Morroniside inhibits inflammatory bone loss through the TRAF6-mediated NF- $\kappa$ B/MAPK signalling pathway[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(10): 1438.

[7] IZADPARAST F, RIAHI-ZAJANI B, YARMOHAMMADI F, et al. Protective effect of berberine against LPS-induced injury in the intestine: a review[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(22): 2365-2378.

[8] 赖碧玉, 洪梦颖, 何永嘉, 等. 基于 16S rDNA 技术探讨针灸对腹泻型肠易激综合征模型大鼠肠道菌群的影响[J]. *中国针灸*, 2023, 43(12): 1411-1421.

[9] 丁晓洁, 孙喜灵, 于晓飞, 等. 乌梅丸对腹泻型肠易激综合征模型大鼠肠道菌群和炎症因子的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(6): 1296-1299, 1345.

[10] 杨敏, 辛欢, 邹燃, 等. 针灸通过阻断 BDNF/TrkB 信号通

路改善肠易激综合征大鼠的肠道屏障功能和内脏疼痛[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(6): 1234-1239.

[11] 王明丽, 赵卫国, 宋鹏程, 等. 黄芪建中汤通过 PPAR $\gamma$  信号对脾胃虚寒大鼠结肠屏障的影响及机制[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(8): 1911-1917.

[12] 张儒奇, 方志安, 韩文庆, 等. 葛根芩连汤对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群的影响[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(24): 6709-6719.

[13] 沈钦华, 李素娟, 董苏, 等. 紫草素对肺结核大鼠肺部炎症及 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(7): 1689-1694.

[14] ZHENG C H, ZHONG Y C, ZHANG W M, et al. Chlorogenic acid ameliorates post-infectious irritable bowel syndrome by regulating extracellular vesicles of gut microbes[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(28): e2302798.

[15] SHEN J, ZHANG B M, CHEN J J, et al. SAHA alleviates diarrhea-predominant irritable bowel syndrome through regulation of the p-STAT3/SERT/5-HT signaling pathway[J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 1745-1756.

[16] QU Y Y, PARK S H, DALLAS D C. The role of bovine kappa-casein glycomacropeptide in modulating the microbiome and inflammatory responses of irritable bowel syndrome[J]. *Nutrients*, 2023, 15(18): 3991.

[17] 王翠连. 加味黄芪建中汤治疗腹泻型肠易激综合征的临床疗效[J]. *全科口腔医学电子杂志*, 2019, 6(32): 183.

[18] 屈红军, 吉文龙, 杨君, 等. 加味黄芪建中汤治疗腹泻型肠易激综合征的临床疗效[J]. *西藏医药*, 2018, 39(4): 141-142.

[19] HU J N, HE T, LIU J F, et al. Pharmacological and molecular analysis of the effects of Huangqi jianzhong decoction on proliferation and apoptosis in GES-1 cells infected with *H. pylori*[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1009705.

[20] MAHURKAR-JOSHI S, RANKIN C R, VIDELOCK E J, et al. The colonic mucosal microRNAs, microRNA-219a-5p, and microRNA-338-3p are downregulated in irritable bowel syndrome and are associated with barrier function and MAPK signaling[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(7): 2409-2422.e19.

[21] 郭军雄, 汪斌, 马丽, 等. p38 MAPK 在腹泻型肠易激综合征大鼠中的变化及其免疫调控作用[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 709-715.

[22] WANG Y F, KE W, GAN J F, et al. microRNA-29b-3p promotes intestinal permeability in IBS-D via targeting TRAF3 to regulate the NF- $\kappa$ B-MLCK signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2023, 18(7): e0287597.

[23] 黄华, 王永通, 丁旭枫, 等. 基于 Nrf2/HO-1 和 NF- $\kappa$ B 信号通路探讨清化止泻方对腹泻型肠易激综合征大鼠巨噬细胞极化的影响[J]. *中成药*, 2025, 47(2): 438-445.

(收稿日期: 2025-03-07 修回日期: 2025-06-08)

(编辑: 张元媛)