

· 经典名方 ·

痛泻要方对肝郁脾虚型 D-IBS 大鼠结肠组织 p38 MAPK 信号通路相关蛋白及其靶基因表达的影响

郭军雄^{1*}, 马丽¹, 康万荣², 许小敏¹, 汪斌¹, 徐生刚¹, 刘雨娟¹
(1. 河西学院 医学院, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃中医药大学, 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 探讨痛泻要方对肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征(D-IBS)大鼠模型结肠组织中 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK), 丝裂原和应激蛋白激酶 1 (MSK1), 环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB) mRNA 和蛋白表达, 白细胞介素-1 β (IL-1 β), 白细胞介素-6 (IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量的影响, 以及血清总超氧化物歧化酶(T-SOD), 丙二醛(MDA)含量的影响。**方法:** 将 60 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠用番泻叶灌胃联合慢性束缚应急法重建肝郁脾虚型 D-IBS 模型, 连续 14 d 后开始给药。痛泻要方低、中、高剂量组(2.25, 4.5, 9 g·kg⁻¹)每日灌胃, 匹维溴铵组(0.02 g·kg⁻¹)每日灌胃; 空白组和模型组每日同体积生理盐水灌胃, 共 21 d, 末次灌胃 18 h 后, 心脏采血及剖取结肠组织, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组大鼠结肠 p38 MAPK, MSK1, CREB mRNA 的表达, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠 p38 MAPK, MSK1, CREB 蛋白的表达; 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠结肠 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 的含量; 羟胺法检测大鼠血清 T-SOD 水平; 硫代巴比妥酸法(TBA)检测 MDA 的含量; 苏木素-伊红(HE)染色观察结肠病理形态学改变。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠结肠组织中 p38 MAPK, MSK1, CREB mRNA 表达及蛋白含量明显上升, 同时 IL-1 β , IL-6, TNF- α 含量明显升高($P < 0.05$); 血清 T-SOD 水平明显下降, MDA 含量明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 痛泻要方中、高剂量组可明显降低结肠组织中 p38 MAPK mRNA 表达, p38 MAPK, CREB 蛋白及 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的含量($P < 0.05$), 升高血清 SOD 水平, 降低 MDA 含量($P < 0.05$); 痛泻要方高剂量组可明显减低 MSK1, CREB mRNA 表达及 MSK1 蛋白含量($P < 0.05$); 病理组织学结果显示, 各组大鼠结肠形态结构未见明显的器质性病变, 符合 IBS 的形态学特点。**结论:** 痛泻要方对肝郁脾虚型 D-IBS 大鼠的治疗在一定范围内呈明显的剂量效应关系, 究其治疗作用可能与提高机体抗氧化应激效应和抑制 p38 MAPK 信号通路, 调节其下游炎症因子的水平有关。

[关键词] 肠易激综合征; 腹泻型; 痛泻要方; p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK) 信号通路

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5; R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200437

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191106.1400.002.html>

[网络出版时间] 2019-11-07 09:16

Effect of Tongxie Yaofang on p38 MAPK Pathway Associated Protein and Its Target Gene Expression in Colon Tissues of D-IBS Rats with Liver-stagnation and Spleen-deficiency

GUO Jun-xiong^{1*}, MA Li¹, KANG Wan-rong², XU Xiao-min¹,
WANG Bin¹, XU Sheng-gang¹, LIU Yu-juan¹
(1. Medicine College of Hexi University, Zhangye 734000, China;
2. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Tongxie Yaofang on p38 mitogen activated protease (p38 MAPK), mitogen and stress protein kinase 1 (MSK1), cyclic adenosine effector response element binding protein (CREB) mRNA and protein expression in colon tissue of diarrhea type irritable bowel syndrome (D-IBS) rat model with liver depression and spleen deficiency (GYPX), and interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6),

[收稿日期] 20190620(018)

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(81660759)

[通信作者] * 郭军雄, 硕士, 副教授, 从事中医药防治肠道疾病的基础及临床研究, E-mail: gjxiong1124@126.com

tumor necrosis factor- α (TNF- α), and the content of total superoxide dismutase (T-SOD) and malondialdehyde (MDA) in serum. **Method:** The 60 SPF Wistar rats were randomly divided into 6 groups, with 10 rats in each group. Except the normal group, rats in the other groups were given by gavage with folium sennae and chronic bondage to establish D-IBS with GYPX for 14 days. The low, medium, and high doses Tongxie Yaofang were administered to Tongxie Yaofang (2.25, 4.5, 9 g·kg⁻¹) gavage respectively. The piveronium bromide group was given piveronium bromide tablets suspension (0.02 g·kg⁻¹) gavage. The normal group group and model group were given the same volume normal saline for 21 days. After the last gavage for 18 hours, the heart blood was collected and the colon tissue was dissected. Real-time PCR was used to observe the expression of p38 MAPK, MSK1 and CREB mRNA in rat colon. Western blot was used to observe the expression of p38 MAPK, MSK1 and CREB protein. ELISA was used to observe the contents of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in colon. Hydroxylamine was used to observe the T-SOD level in serum, thiobarbituric acid (TBA) was used to observe the MDA content in serum. hematoxyl in-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of colon tissues. **Result:** Compared with normal group, the expression of p38 MAPK, MSK1, CREB mRNA and the protein content of p38 MAPK, MSK1 and CREB in the colon tissue of model group rats increased significantly, while the content of IL-1 β , IL-6 and TNF- α increased significantly ($P < 0.05$). The level of serum T-SOD decreased significantly, and the content of MDA increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the medium and high dose group of Tongxie Yaofang significantly decreased the expression of p38 MAPK mRNA, content of p38 MAPK, CREB protein and IL-1 β , IL-6, TNF- α in colon tissue ($P < 0.05$). The level of serum T-SOD increased significantly, and the content of MDA decreased significantly ($P < 0.05$). High dose group of Tongxie Yaofang can significantly decreased the expression of MSK1, CREB mRNA, content of MSK1 protein ($P < 0.05$). Histopathological observation showed that no significant organic lesions were observed in the colonic morphology of each group of rats, which was consistent with the morphological characteristics of IBS. **Conclusion:** Tongxie Yaofang has a significant dose-effect relationship in the treatment of D-IBS rats with GYPX in a certain range, which may be related to its increases antioxidant stress and inhibit activation of p38 MAPK signaling pathway and reducing the level of downstream inflammatory factors.

[**Key words**] irritable bowel syndrome; diarrhea-predominan; Tongxie Yaofang; p38 mitogen activated protease (MAPK) signaling pathway

肠易激综合征(IBS)是一种以反复腹痛,并伴有排便异常或排便习惯改变为临床特征的功能性肠病,该病缺乏可解释症状的形态学改变和生化检查异常,为消化科的常见病和多发病^[1]。近年来,随着人们生活水平的普遍提高,饮食结构和生活习惯等改变,本病就诊人数呈逐年增多趋势。根据罗马 IV 标准^[2],IBS 可分为便秘型、腹泻型、混合型、不定型 4 种亚型。有报道腹泻型 IBS 是我国临床分布最为多见的一种亚型,中医肝脾功能失调是其发病关键^[3-4]。IBS 患者存在着血液中自由基清除剂的缺乏和肠道低度炎症,而自由基的过氧化及肠道黏膜炎症又可使胃肠神经受到损害,导致神经细胞的功能障碍、细胞变性、坏死,以致出现胃肠动力和内脏感觉异常^[5-6]。同时亦有研究表明 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路在机体疼痛感知、胃肠动力功能紊乱和免疫性炎症异常激活中均有重

要的作用^[7-8]。痛泻要方首载于元·朱震亨《丹溪心法》,为主治肝脾不和之“痛泻”的常用方,亦是中医临床治疗腹泻型 IBS 的有效基础方。前期临床发现痛泻要方加味治疗肝旺脾虚腹泻型 IBS 患者,疗效显著^[9]。故本研究拟通过番泻叶灌胃联合慢性束缚建立肝郁脾虚腹泻型 IBS 大鼠模型,观察痛泻要方对模型大鼠氧化应激及 p38 MAPK 信号关键因子 p38 MAPK,丝裂原和应激蛋白激酶 1(MSK1),环腺苷效应元件结合蛋白(CREB)和下游相关细胞因子的调节作用,以探讨痛泻要方治疗肝郁脾虚型腹泻型 IBS 可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,体质量(180 ± 20) g,雌雄各半,由甘肃中医药大学科研实验中心提供,动物合格证号 SCXK(甘)2015-0002, 喂饲灭菌标准饲料和纯净水。实验动物所有操作

取得了甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号 2016-025)。

1.2 药物及试剂 痛泻要方水煎剂(参照《丹溪心法》中痛泻要方药物组成及剂量的比例确定,方中饮片炒白术-炒白芍-炒陈皮-炒防风 6:4:3:2 称取)将上述药物洗净,浸泡约 40 min,加水煎煮 2 次,合并煎液,过滤,将其分别浓缩成痛泻要方高剂量(含生药为 $1.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中剂量(含生药为 $0.9 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)以及低剂量(含生药为 $0.45 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的水煎溶液。以上药液制成后高压灭菌消毒, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。番泻叶水煎剂:将番泻叶水浸泡 5 h,煎煮 8 min,纱布过滤取上清液,浓缩至含生药 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用,以上中药饮片均购于兰州惠仁堂药店。匹维溴铵片(法国 Abbott Products 公司,批号 644465,进口药品注册证号 H20120127);总超氧化物歧化酶(T-SOD),丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20181220,20181225);大鼠白细胞介素- 1β (IL- 1β),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号分别为 MM-0047R1,MM-0190R1,MM-0180R1);p38 MAPK 抗体,MSK1 抗体,CREB 抗体(美国 GeneTex 公司,批号分别为 40100,821801334,42480);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Immuno Way 公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京 Solarbio 公司,批号 G1120);trizol(美国 Ambion 公司,批号 152104);PCR 扩增试剂盒(大连 TaKaRa 公司,批号为 AI61180A);0.2 mL PCR strips with 8 wel(上海 Kirgen 公司,批号 180666);兔 SP 试剂盒,山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号均为 K186613C);大鼠 β -肌动蛋白(β -actin),p38 MAPK,MSK1,CREB 引物由大连 TaKaRa 公司合成并经质量检测,引物序列见表 1。

1.3 仪器 S1000 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪,iMark 型酶标仪,PowerPoc Basic 型凝胶电泳仪,ChemiDocTM XRS+型凝胶成像分析仪,JY-SPAT 型电泳槽,PowerPacTM Universal Power Supply 型电泳及转印电源(美国 Bio-Rad 公司);VELOCITY 18R 型台式冷冻离心机(澳大利亚 Dynamica 公司);FA2004 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);HH-4 型数显恒温水浴箱(江苏省金坛市友联仪器研究所);DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一生物技术有限公司);P100/P100⁺型

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	171
	下游 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'	
p38 MAPK	上游 5'-TTACCGATGACCACGTTTCAGTTTC-3'	279
	下游 5'-AGCGAGGTTGCTGGGCTTTA-3'	
MSK1	上游 5'-GAGCGTTTCACAGACGACGAAG-3'	119
	下游 5'-CACCCATGCCCATTAGAATCAA-3'	
CREB	上游 5'-ACAGTTCAAGCCAGCCACAG-3'	160
	下游 5'-GCACTAAGGTTACAGTGGGAGCAGA-3'	

微体积分光光度计(美国 Pultton 公司);N2/N2S 型紫外可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);BX43 型显微镜(日本 Olympus 公司);RM2125 型切片机,ASP200S 型自动真空组织脱水机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 模型制备及给药 将 60 只大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、匹维溴铵组和痛泻要方低、中、高剂量组,每组 10 只。除空白组外其余各组大鼠采用番泻叶灌胃联合慢性束缚法复建肝郁脾虚腹泻型 IBS 模型^[10-11],造模大鼠实验前 10 h 禁食不禁水,予以番泻叶水煎剂 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌服,每日 1 次,连续灌胃 14 d。番泻叶水煎剂灌服后用宽透明胶带束缚大鼠肩部及前肢和胸腹部,使大鼠无法用前肢抓搔头面,每天定时约 1 h。连续造模 14 d 后开始给药治疗,痛泻要方低剂量组 $2.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,中剂量组 $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,高剂量组 $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,相当于人体日用体质量剂量的 3,6,12 倍^[12];匹维溴铵组给予匹维溴铵片混悬液 $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于人日用剂量的 6 倍;灌胃空白组和模型组给予 2 mL 生理盐水灌胃。每日给药 1 次,连续灌胃治疗 21 d。每 7 d 大鼠称体质量 1 次以调整药量。

2.2 标本采集 末次治疗给药后,各组大鼠禁食不禁水 18 h,使用 2% 戊巴比妥钠($2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)剂量腹腔麻醉大鼠,心脏采血约 5 mL,血样放置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用。采血后剖腹截取距肛门 5~8 cm 处结肠组织,选取生理盐水洗净肠管内容物,一部分 4% 多聚甲醛固定,一部分 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装冷冻备用。

2.3 HE 染色观察结肠组织病理学变化 选取大鼠新鲜结肠管组织,迅速置于 4% 多聚甲醛均匀固定后,冲洗,并依次通过不同浓度的乙醇脱水及二甲

苯脱蜡透明,放入石蜡中浸渍,包埋,行石蜡切片,二甲苯脱蜡水化,苏木素染色,盐酸乙醇分化、伊红染色、行脱水透明、中性树胶封固等步骤,在显微镜下观察拍照。

2.4 羟胺法检测血清 T-SOD 含量 取出冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的血清,置于室温下融解。活性测定方法经预实验和给定的参考值,确定本实验血清取样量为 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。设置测定管和对照管,分别加入试剂一应用液 1 mL ,测定管加入血清 $50\text{ }\mu\text{L}$,对照管加入蒸馏水 $50\text{ }\mu\text{L}$,再分别加入试剂二、三、四应用液各 $100\text{ }\mu\text{L}$,用旋涡混悬器混匀,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 40 min ,加入显色剂 2 mL 混匀,室温放置 10 min ,于波长 550 nm 处, 1 cm 光径比色皿比色,计算活性。

2.5 TBA 法检测血清 MDA 含量 取 2.4 项血清,设置空白管、标准管、测定管。空白管加入无水乙醇 $100\text{ }\mu\text{L}$,标准管加入 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准品 $100\text{ }\mu\text{L}$,测定管加入血清 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。以上各管均加入试剂一 $100\text{ }\mu\text{L}$,混匀,再加入试剂二 3 mL ,试剂三 1 mL ,摇匀,旋涡混悬器混匀, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min 后,流水冷却, $3\text{ }500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,取上清液,于波长 532 nm 处, 1 cm 光径比色皿比色,计算 MDA 含量。

2.6 Real-time PCR 检测结肠组织 p38 MAPK, MSK1, CREB mRNA 的表达 取结肠组织 $50\sim 100\text{ mg}$,加入 trizol 裂解液 1 mL ,研磨混匀,室温静置 5 min ,预冷离心机后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $1\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,取上清液,加入三氯甲烷 $200\text{ }\mu\text{L}$,混匀静置, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,吸取上清液,加入异丙醇,混匀静置, $1\text{ }2000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,弃上清,加 75% 乙醇 1 mL ,混匀, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,弃上液后,测 mRNA 浓度,计算加样量。逆转录 cDNA,退火 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min ,延伸 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h ,孵育 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min 。将逆转录后的 cDNA,按 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min , 1 循环。 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , 40 循环。以 β -actin 内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的 mRNA 相对表达量。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测结肠组织 p38 MAPK, MSK1, CREB 的表达 取少量大鼠结肠组织,加入预冷的含 PMSF 的 RIPA 裂解液 $500\text{ }\mu\text{L}$,置于冰面研碎至匀浆后,预冷离心机后 $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,取部分上清,行 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,部分上清加入 $4\times$ 上样缓冲液, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min ,置于 4% 电泳浓缩胶浓缩, 10% 蛋白电泳分离胶分离,再经转膜、封闭、加入 p38 MAPK 一抗 ($1:1\text{ }000$), MSK1 一抗 ($1:1\text{ }000$), CREB 一抗 ($1:1\text{ }000$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育、摇床洗膜,室温孵育二抗

($1:1\text{ }000$), ECL 法显色, X 医用胶片显影,定影, Bio-Rad Quantity one 图像分析软件扫描分析。

2.8 ELISA 检测结肠组织 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 的含量 取大鼠结肠组织约 1 g 研碎后加入 9 倍组织质量的预冷 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 后于冰上研碎匀浆,取上清液,测定蛋白浓度。并于抗体包被的 96 孔板中,分别将不同浓度标准品和待测样本各 $50\text{ }\mu\text{L}$ 加入检测孔,除空白孔外,每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体 $100\text{ }\mu\text{L}$,封膜, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min ,洗板 5 次,加入酶标试剂, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min ,洗板 5 次,加入显色液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 显色 10 min ,加入终止液, 15 min 内测定吸光度 A ,计算各指标含量。

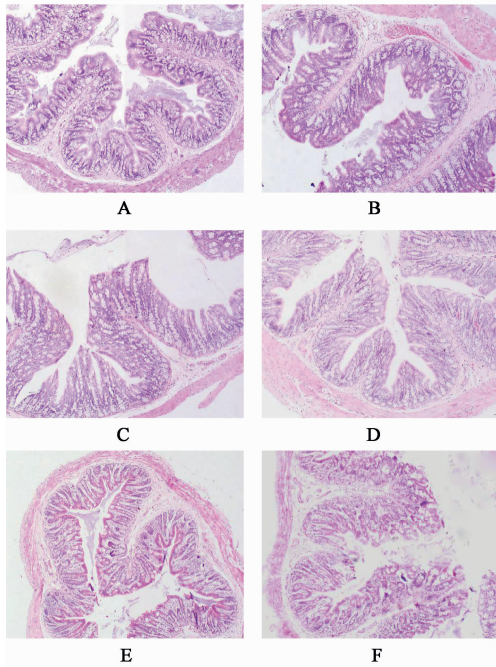
2.9 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间整体均数比较用单因素方差分析,进一步多重比较用 LSD 检验分析,方差不齐时用 Dunnett's 方法分析,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对各组大鼠结肠组织病理形态学的影响 空白组大鼠结肠切片显微镜下观察可以看到结肠黏膜上皮形态较完好,细胞排列规整,黏膜下未见充血、水肿和炎性细胞浸润;模型组大鼠结肠黏膜上皮细胞部分坏死脱落,固有层腺体萎缩,可见血管充血,间质水肿,有少量炎性细胞浸润,结肠组织结构完整,形态结构未见明显异常,符合 IBS 的形态学特点。痛泻要方低、中、高剂量组及匹维溴铵组大鼠结肠形态完好,组织结构完整,形态结构未见明显病变。见图 1。

3.2 对各组大鼠血清中相关氧化应激指标 SOD, MDA 的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 SOD 水平明显降低 ($P<0.05$),MDA 水平明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,痛泻要方中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠血清 SOD 水平升高,MDA 水平明显降低 ($P<0.05$);痛泻要方中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠血清 SOD 水平明显高于痛泻要方低剂量组 ($P<0.05$)。见表 2。

3.3 对各组大鼠结肠相关细胞因子 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,痛泻要方中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠结肠 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平明显降低 ($P<0.05$),痛泻要方低剂量组降低不明显;且痛泻要方各剂量组两两比较,以痛泻要方高剂量组 IL-1 β ,



A. 空白组; B. 模型组; C. 痛泻要方低剂量组; D. 痛泻要方中剂量组; E. 痛泻要方高剂量组; F. 匹维溴铵组(图 2 同)

图 1 痛泻要方对腹泻型 IBS 大鼠结肠组织病理学影响(HE, ×100)
Fig. 1 Effect of Tongxie Yaofang on colon histopathology in diarrhea-predominant IBS rats (HE, ×100)

表 3 痛泻要方对腹泻型 IBS 大鼠结肠组织 IL-1β, IL-6, TNF-α 含量的影响(̄x ± s, n = 10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β	IL-6	TNF-α
空白	-	180.48 ± 19.79	341.40 ± 36.02	407.65 ± 48.28
模型	-	253.80 ± 30.75 ¹⁾	407.28 ± 42.44 ¹⁾	522.88 ± 64.92 ¹⁾
痛泻要方	2.25	230.55 ± 27.77	390.76 ± 41.05	485.67 ± 58.76
	4.50	205.70 ± 26.95 ²⁾	364.95 ± 36.89 ²⁾	457.73 ± 50.32 ²⁾
	9.00	184.04 ± 22.05 ^{2,3)}	357.99 ± 33.24 ²⁾	424.36 ± 45.09 ^{2,3)}
匹维溴铵	0.02	196.70 ± 23.47 ^{2,3)}	351.07 ± 35.69 ^{2,3)}	431.55 ± 48.86 ^{2,3)}

与模型组比较,痛泻要方高剂量组和匹维溴铵组 p38 MAPK, MSK1, CREB mRNA 表达均明显下调 (P < 0.05),痛泻要方中剂量组 p38 MAPK mRNA 表达明显下调(P < 0.05)。痛泻要方高剂量组与匹

表 4 痛泻要方对腹泻型 IBS 大鼠结肠组织 p38 MAPK, MSK1, CREB mRNA 表达的影响(̄x ± s, n = 3)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p38 MAPK	MSK1	CREB
模型	-	1.577 ± 0.076	1.600 ± 0.073	1.555 ± 0.023
痛泻要方	2.25	1.527 ± 0.052 ¹⁾	1.523 ± 0.072 ¹⁾	1.513 ± 0.096 ¹⁾
	4.50	1.350 ± 0.031 ^{2,3)}	1.478 ± 0.022	1.492 ± 0.034
	9.00	1.130 ± 0.041 ^{2,3,4)}	1.197 ± 0.029 ^{2,3,4)}	1.200 ± 0.062 ^{2,3,4)}
匹维溴铵	0.02	1.107 ± 0.036 ^{2,3,4)}	1.150 ± 0.018 ^{2,3,4)}	1.167 ± 0.046 ^{2,3,4)}

注:空白组各 mRNA 含量设为 1。

表 2 痛泻要方对腹泻型 IBS 大鼠血清 T-SOD, MDA 含量的影响(̄x ± s, n = 10)

Table 2 Effect of Tongxie Yaofang on T-SOD and MDA levels in serum of diarrhea-predominant IBS rats(̄x ± s, n = 10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	T-SOD/U·mL ⁻¹	MDA/mmol·L ⁻¹
空白	-	216.51 ± 19.80	4.69 ± 1.57
模型	-	164.53 ± 15.98 ¹⁾	7.64 ± 1.98 ¹⁾
痛泻要方	2.25	174.18 ± 15.48	6.16 ± 1.88
	4.50	194.63 ± 14.41 ^{2,3)}	5.76 ± 1.64 ²⁾
	9.00	197.72 ± 13.44 ^{2,3)}	5.31 ± 1.48 ²⁾
匹维溴铵	0.02	199.21 ± 14.90 ^{2,3)}	5.48 ± 1.36 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05;与痛泻要方低剂量组比较³⁾P < 0.05;与痛泻要方中剂量组比较⁴⁾P < 0.05;与痛泻要方高剂量组比较⁵⁾P < 0.05(表 3 ~ 5 同)。

TNF-α 水平明显低于低剂量组(P < 0.05),匹维溴铵组 IL-1β, IL-6, TNF-α 水平明显低于痛泻要方低剂量组(P < 0.05)。见表 3。

3.4 对各组大鼠结肠组织 p38 MAPK 信号相关基因 p38 MAPK, MSK1, CREB mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织 p38 MAPK, MSK1, CREB mRNA 表达均明显上调(P < 0.05);

维溴铵组 p38 MAPK, MSK1, CREB mRNA 明显低于痛泻要方中、低剂量组(P < 0.05)。痛泻要方中剂量组 p38 MAPK mRNA 低于痛泻要方低剂量组(P < 0.05)。见表 4。

3.5 对各组大鼠结肠组织 p38 MAPK, MSK1, CREB 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织 p38 MAPK, MSK1, CREB 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,痛泻要方高剂量组和匹维溴铵组 p38 MAPK, MSK1, CREB 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$),痛泻要方中剂量组 p38 MAPK 和 CREB 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$);痛泻要方各剂量组 p38 MAPK 和 CREB 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),且痛泻要方高剂量组结肠组织 MSK1 与痛泻要方低、中剂量组比较差异均有统计

学意义 ($P < 0.05$)。见图 2,表 5。

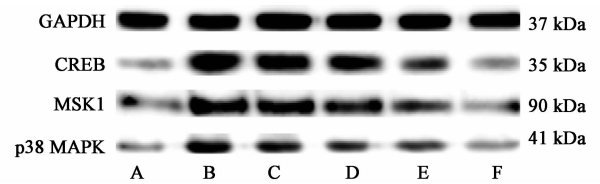


图 2 大鼠结肠组织 p38 MAPK, MSK1, CREB 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of p38 MAPK, MSK1 and CREB proteins in colonic of rats

表 5 痛泻要方对腹泻型 IBS 大鼠结肠组织 p38 MAPK, MSK1, CREB 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Tongxie Yaofang on expression of p38 MAPK, MSK1 and CREB in colonic of diarrhea-predominant IBS rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	p38 MAPK/GAPDH	MSK1/GAPDH	CREB/GAPDH
空白	-	0.443 ± 0.362	0.493 ± 0.055	0.430 ± 0.036
模型	-	0.677 ± 0.014 ¹⁾	0.790 ± 0.071 ¹⁾	1.223 ± 0.072 ¹⁾
痛泻要方	2.25	0.643 ± 0.019	0.737 ± 0.096	1.127 ± 0.086
	4.50	0.563 ± 0.036 ^{2,3)}	0.647 ± 0.090	0.897 ± 0.112 ^{2,3)}
	9.00	0.497 ± 0.037 ^{2,3,4)}	0.487 ± 0.054 ^{2,3)}	0.517 ± 0.040 ^{2,3,4)}
匹维溴铵	0.02	0.457 ± 0.029 ^{2,3,4,5)}	0.463 ± 0.040 ^{2,3,4)}	0.450 ± 0.032 ^{2,3,4)}

4 讨论

腹泻型 IBS 究其病因病机以及临床表现,常以情志不遂为诱因,以“痛”“泻”为其临床特征,可归属于中医学“泄泻”“腹痛”“郁病”等范畴。中医认为该病多由外邪侵袭、情志失调、饮食失宜等导致肝气不疏,脾虚失运,木郁伤土,升降失常,清浊不分而发,肝气横逆则腹痛,脾气虚弱则泄泻,故肝失疏泄和脾气虚弱常是本病发作的主要病机^[13]。本实验“痛泻要方”中炒白术苦甘而温,补脾燥湿以治脾虚,同时炒用燥湿之力大增,为君药;白芍酸苦微凉,柔肝缓急而止痛,与白术相配,土中泻木以治肝旺,为臣药;陈皮辛苦而温,理气燥湿而醒脾和胃,为佐药;方中防风辛散香润,疏肝达木,兼有佐制之用,又香能舒脾,且为脾经引药,其性升浮,祛风胜湿止泻,兼俱佐使之用;四药合用,共奏敛肝健脾、燥湿理气、缓痛止泻,使脾健肝和,痛泻自止。临床以痛泻要方为基础衍生的中医复方对腹泻型 IBS 的治疗获得较好的效果。匹维溴铵作为治疗 IBS 最为常用的解痉剂,可直接作用于平滑肌细胞,抑制钙离子内流,缓解胃肠平滑肌痉挛,缓解腹痛的药理学作用,但长期疗效证据不足,常选其作为阳性药。IBS 是一种缺乏胃肠道结构和生化异常的肠道功能紊乱性疾病。

本研究各组大鼠结肠组织病理形态学观察,大鼠结肠形态完好,组织结构完整,形态结构未见明显的器质性病变。

近年来 SOD, MDA 在很多系统的疾病研究中得到了重视,而且在探寻疾病病因和治疗方面起到了重大作用。肠道作为人体最大的内分泌和免疫器官,肠管内含有丰富的微生物群,对氧化应激较为敏感。一旦细胞内活性氧的产生超过了细胞内抗氧化系统的防御能力则产生氧化应激反应,产生大量的自由基,促使大量的氧化产物产生,损伤机体组织,因此,氧化应激反应是机体内炎症发生、发展的重要病理环节。SOD 是机体内的抗氧化酶,对机体的氧化/抗氧化平衡起着重要作用,其活性被认为是一种评估抗氧化能力直接的指标。MDA 是在组织细胞氧化应激反应过程中产生的氧化应激产物,可反映机体的脂质过氧化及组织损伤的程度^[14-15]。本研究中,番泻叶灌胃联合慢性束缚法复建的腹泻型 IBS 模型大鼠血清中氧化应激水平明显低于正常组,经药物干预后,痛泻要方中、高剂量可升高大鼠血清中 SOD 的活性,降低 MDA 的含量,且效果等同于匹维溴铵片。推测痛泻要方可提高机体抗氧化应激效应,维持细胞内环境的稳定和机体的功能状态,

达到对腹泻型 IBS 的治疗作用。

有研究亦表明,社会心理和肠道生理改变相互作用的生理—心理—社会模式,在腹泻型 IBS 发病中起到重要作用^[16]。而免疫系统作为腹泻型 IBS 精神-肠道因素互动的关键纽带,其平衡对腹泻型 IBS 内脏敏感性有重要影响^[17]。MAPK 级联激活是多种信号通路的中心,广泛存在于人体细胞内,其作为主要的炎性信号蛋白,可将细胞产生的具有广泛生物活性的低分子量可溶性蛋白质、激素、神经递质、细胞黏附及物理应激等细胞外刺激转化为增殖、分化、迁移、凋亡等不同的细胞进程^[18-19]。p38 MAPK 信号通路是 MAPK 家族中重要的成员之一,其与炎症和应激反应的调控密切相关,目前 p38 MAPK 已成为抗炎疗法中重要的潜在靶点^[20]。研究表明,p38 MAPK 主要位于细胞浆内,其活性在生理情况下是很低的,可被特定细胞因子 TNF- α , IL-6, IL-1 β 等刺激而活化,活化后的 p38 MAPK 通过级联磷酸化激活丝裂原和应激激活的蛋白激酶 (MSK) 蛋白,活化的 MSK 介导转录因子磷酸化活化和组蛋白 H3 的 10 位丝氨酸磷酸化修饰。MSK 表达极其广泛,家族有 MSK1 和 MSK2,MSK1 还有多个位点可被磷酸化修饰,如 Ser647,657,695,但对 MSK1 的活性影响不大;据推测,MSK2 的激活方式与 MSK1 类似,但研究程度远不如 MSK1 清楚。MSK 可直接磷酸化下游底物 CREB 的 Ser133,磷酸化的 CREB 其转录活性会增加 10 ~ 20 倍^[21]。p38 MAPK 信号通路被活化后,可通过调控机体下游一系列靶基因的转录与表达,来介导 IBS 或腹泻型 IBS 的发生、发展及变化。细胞因子参与机体免疫及炎症反应的调节。白细胞介素类细胞因子在炎症过程中起着关键作用,其通常由协同刺激 T 淋巴细胞以及诱导抗体分泌和急性期蛋白质产生(在清除病原菌时发挥重要作用)等引起,已证实,肠黏膜屏障的损伤贯穿了整个肠道炎症反应的过程^[22]。本课题组前期研究发现,番泻叶灌胃联合慢性束缚法复建的腹泻型 IBS 大鼠 Th1 促炎因子 IL-12 的含量升高,Th2 抑炎因子 IL-10 的含量降低,可能存在 Th1/Th2 平衡漂移^[11]。IL-1 β 首先在细胞质内合成无活性的前体 pro-IL-1 β ,经半胱氨酸蛋白酶 (Caspase)-1 酶切后产生成熟有活性的 IL-1 β ,协同引发一系列的肠道炎症和黏膜损伤^[23]。IL-6 是一种被认为具有促炎和抑炎双重生物学效应的多功能复杂细胞因子,IL-6 可促进中性粒细胞和单核细胞在炎症及感染部位的聚集,防止局部的过度损伤,又

可通过神经内分泌调节肠道神经元和平滑肌细胞,引发胃肠道动力系统的变化。TNF- α 被认为是肠黏膜屏障损伤的重要启动因子,可通过激活 NF- κ B,诱导产生多种炎性因子如 IL-1 β ,IL-6 等,进而加重对肠黏膜屏障的损伤。同时,p38 MAPK 信号通路活化后可显著上调下游细胞因子 TNF- α ,IL-1,IL-6 等的表达,越来越多的证据支持 IBS 患者存在免疫激活和 IL-1,IL-6 和 TNF- α 水平等炎症因子增加^[24]。

本次实验中,番泻叶灌胃联合慢性束缚法复建的腹泻型 IBS 模型大鼠结肠中 p38 MAPK 信号通路的关键因子和下游细胞因子明显高于正常组,而经痛泻要方中、高剂量干预后其结肠组织中 p38 MAPK mRNA 表达及 p38 MAPK,CREB 蛋白含量降低,高剂量组 MSK1,CREB mRNA 表达及 MSK1 蛋白含量降低,炎症因子 IL-1 β ,IL-6 和 TNF- α 的含量也随之降低。提示痛泻要方在一定范围内呈明显的剂量—效应关系,能抑制 p38 MAPK 的活化,减少 MSK1 的磷酸化,降解 CREB 的分泌水平,并能有效降低腹泻型 IBS 大鼠结肠的炎症反应,且痛泻要方高剂量组效果等同于匹维溴铵片。推测痛泻要方能通过抑制 p38 MAPK 信号通路的活化,减少相关性因子的表达,降低炎症反应,来达到对腹泻型 IBS 的治疗作用。

[参考文献]

- [1] 张声生,魏玮,杨俭勤. 肠易激综合征中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中医杂志,2017,58(18): 1614-1619.
- [2] Brian E A, Fermin M, LIN C, et al. Bowel disorders [J]. Gastroenterology,2016,150(5):1393-1407.
- [3] 张星星,吴坚,裴丽霞,等. 健脾疏肝法对腹泻型肠易激综合征患者疗效观察及对肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(13):79-86.
- [4] 郭军雄,马丽. 肝脾同调法在腹泻型肠易激综合征中的应用体会[J]. 甘肃中医药大学学报,2017,34(3): 56-58.
- [5] 李珊,方秀才. 肠道炎症在肠易激综合征发病中的作用[J]. 中华消化杂志,2010,30(10):788-790.
- [6] 唐丽明,宋宁,袁红霞. 中药复方治疗肠易激综合征的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(19):355-360.
- [7] 张涛,杨承祥,王汉兵. p38 MAPK 信号通路疼痛的关系[J]. 中国疼痛医学杂志,2012,18(3):177-180.
- [8] 伍宁波,孙宏翔,杨晓东,等. MAPK 信号通路肠道疾病靶点应用前景[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(3):299-306.

- [9] 郭军雄,汪斌. 痛泻要方加味治疗腹泻型肠易激综合征临床观察[J]. 新中医,2016,48(12):42-44.
- [10] 唐洪梅,廖小红,房财富,等. 肝郁脾虚型大鼠肠易激综合征模型的建立及评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):138-140.
- [11] 郭军雄,许小敏,刘雨娟,等. 腹泻型肠易激综合征“肝郁脾虚证”病证结合大鼠模型的动态评估[J]. 中华中医药学刊,2018,36(11):2590-2592.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:33-34.
- [13] 吕林,唐旭东,王凤云,等. 肠易激综合征从脾论治理论探讨[J]. 中华中医药杂志,2017,32(3):943-946.
- [14] 张玮,褚永果,李伟,等. 参附注射液对脓毒症肠黏膜屏障功能障碍患者血清肠型脂肪酸结合蛋白、可溶性 CD14 亚型及氧化应激水平的影响[J]. 中医杂志,2018,59(6):494-497.
- [15] 王海云. 宁肠汤对肠易激综合征大鼠抗氧化能力的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2008,32(7):32-34.
- [16] Hausteiner W C, Henningsen P. Irritable bowel syndrome: relations with functional, mental, and somatoform disorders[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(20):6024-6030.
- [17] 柴玉娜,唐洪梅,黄育生,等. 腹泻型肠易激综合征大鼠 SCF/C-kit 信号的变化及其与免疫功能的关系[J]. 中国药理学通报,2018,34(1):68-72.
- [18] XIAO Y Q, Malcolm B C, Worthen G S, et al. Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta[J]. J Biol Chem, 2002, 277(17):14884-14893.
- [19] Rincón M, Davis R J. Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases [J]. Immunol Rev, 2009, 228(1):212-224.
- [20] 陈英,冯淬灵,李根茂,等. 清金化痰汤对慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌模型大鼠表皮生长因子受体/MAPK 信号通路的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2016,23(10):56-62.
- [21] Wiggin G R, Soloaga A, Foster J M, et al. MSK1 and MSK2 are required for the mitogen-and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(8):2871-2881.
- [22] XIA C, ZHAO Y, JIANG L, et al. Schistosoma japonicum ova maintains epithelial barrier function during experimental colitis[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(43):4810-4816.
- [23] Böni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, et al. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I [J]. Endocrinology, 2009, 150(12):5218-29.
- [24] Liebrechts T, Adam B, Bredack C, et al. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome[J]. Gastroenterology, 2007, 132(3):913-920.

[责任编辑 孙丛丛]