

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.03.013

抑肝扶脾方对肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠组织 AKT/mTOR 通路的影响

苏婷¹, 李慧颖¹, 孙月婷², 崔松香³, 徐心田¹, 郑浩¹, 陆为民¹✉

1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市秦淮区汉中路 155 号, 210029; 2. 云南省曲靖市中医院; 3. 南京市浦口区中医院

[摘要] **目的** 从蛋白激酶 B (AKT) /雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路探究抑肝扶脾方治疗肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 的可能作用机制。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为对照组, 模型组, 抑肝扶脾方低、中、高剂量组, 匹维溴铵组, 每组 10 只。除对照组外其余各组通过夹尾刺激 21 天+番泻叶灌胃 14 天的方法建立肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠模型。造模成功后抑肝扶脾方低、中、高剂量组给药量分别为 0.96、1.93、3.87 g/(kg·d), 匹维溴铵组给药量为 13.5 mg/(kg·d), 对照组及模型组予 10 ml/(kg·d) 蒸馏水, 各组均每天灌胃 1 次, 连续 14 天。实验期间记录各组大鼠一般情况, 造模后及给药后比较大鼠体质量、Bristol 粪便评分、腹壁撤退反射实验 (AWR) 评分; HE 染色观察大鼠结肠组织病理形态; ELISA 法检测大鼠血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 水平; 免疫荧光法检测大鼠结肠组织中 AKT/mTOR 通路相关蛋白 [包括磷酸化蛋白激酶 B (p-AKT) /AKT、磷酸化雷帕霉素靶蛋白 (p-mTOR) /mTOR] 相对表达量; Western Blot 法检测大鼠结肠组织中自噬相关蛋白 [包括 UNC-51 样激酶 (ULK1)、Beclin1 (自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)] 以及紧密连接蛋白 [包括闭合蛋白 (Occludin)、闭锁小带蛋白 1 (ZO-1)] 水平。**结果** 造模后, 与对照组比较, 其余各组大鼠体质量降低, 粪便 Bristol 评分以及 20、40、60、80 mmHg 压力级别下 AWR 评分均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药后, 与对照组比较, 模型组大鼠体质量以及结肠组织中 ULK1、Beclin1、LC3 II/LC3 I、Occludin、ZO-1 蛋白水平均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 粪便 Bristol 评分, 20、40、60、80 mmHg 压力级别下 AWR 评分, 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 以及结肠组织中 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 病理形态结果显示, 结肠组织固有层腺体上部杯状细胞明显减少, 少量炎性细胞浸润; 黏膜下层胶原纤维溶解, 分界不清, 着色变淡, 微血管充血、扩张。与模型组比较, 抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组大鼠体质量, 以及结肠组织中 Beclin1、Occludin、LC3 II/LC3 I 蛋白水平均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 粪便 Bristol 评分, 40、60、80 mmHg 压力级别下 AWR 评分, 血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, 以及结肠组织中 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组病理形态有不同程度的改善。与匹维溴铵组比较, 抑肝扶脾方低、中剂量组在 20、40、60 mmHg 压力级别下 AWR 评分均升高, 抑肝扶脾方低剂量血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低, 抑肝扶脾方各剂量组结肠组织中 p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量均升高 ($P < 0.05$)。与抑肝扶脾方低剂量组比较, 抑肝扶脾方高剂量组及匹维溴铵组在各压力级别下 AWR 评分、结肠组织中 p-AKT/AKT 蛋白相对表达量降低, 抑肝扶脾方中、高剂量组血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平升高, 结肠组织中 p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)。**结论** 抑肝扶脾方可有效改善肝郁脾虚型 IBS-D 模型大鼠结肠组织病理损伤, 降低粪便 Bristol 及

基金项目:国家自然科学基金(82305135);国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作建设项目(国中医药人教发[2010]59号);江苏省中医药管理局中医重点专科建设项目重点项目(ZD202309);江苏省中医药管理局科技发展计划(苏中医科教[2023]18号);南京中医药大学“揭榜挂帅”重大项目(JBGS202405)

✉ 通讯作者:wmlu@163.com;(025)86617141

AWR 评分, 其作用机制可能与降低炎症因子水平, 抑制结肠组织中 AKT/mTOR 通路相关蛋白, 从而提高自噬相关蛋白水平有关。

[关键词] 腹泻型肠易激综合征; 肠黏膜屏障; 炎症因子; 蛋白激酶 B; 雷帕霉素靶蛋白; 自噬; 紧密连接蛋白; 抑肝扶脾方

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是以与排便或排便习惯改变有关的反复发作的腹痛为主要表现的肠道疾病, 排便习惯紊乱是其典型表现^[1]。IBS 可影响 7% 至 21% 的普通人群, 腹泻型肠易激综合征 (irritable bowel syndrome-diarrhea, IBS-D) 是最常见的 IBS 亚型, 约占 IBS 的 31.5%^[2]。近年来有研究^[3-4]指出, IBS 的发生与低度黏膜炎症、免疫激活以及肠道上皮屏障功能受损有关。其中, IBS-D 的肠道屏障功能障碍发生率高达 37%~62%^[5], 这一过程与炎症和自噬相关^[6-7]。研究^[8]表明, 自噬可阻止炎症诱导的屏障损失进而增强肠道上皮屏障功能, 而蛋白激酶 B (AKT)/雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路是自噬的关键通路。本团队临床应用抑肝扶脾方治疗肝郁脾虚型 IBS-D 疗效较好, 该方是在痛泻要方和香连丸的基础上化裁而成, 可有效改善 IBS-D 患者焦虑抑郁的慢性应激状态, 减轻肠黏膜低度炎症, 提高患者生活质量^[9]。为探讨抑肝扶脾方治疗肝郁脾虚型 IBS-D 的潜在作用机制, 本研究基于 AKT/mTOR 通路角度为抑肝扶脾方的临床应用提供实验依据。本研究已通过南京中医药大学伦理委员会审批, 批件号: 2023DW-022-01。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级成年雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 (200±10)g, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供, 动物使用许可证号: SCXK (辽) 2020-0001。大鼠饲养于南京中医药大学药理实验室, 温度 20~26℃, 湿度 40%~70%, 分笼饲养, 每 5 只 1 笼, 共 12 笼, 自由饮水, 摄食标准颗粒饲料。

1.2 药物

番泻叶水煎剂: 将 45 g 番泻叶生药 (批号: 210601, 张仲景中药饮片有限责任公司), 加入沸水没过药材浸泡 30 min 后过滤取汁, 定容至 100 ml, 得到浓度为 0.45 g/ml 的番泻叶药液, 4℃保存, 灌胃前加温。抑肝扶脾方组成: 麸炒白术 10 g, 炒白芍 15 g, 炒陈皮 10 g, 炒防风 10 g, 太子参 15 g, 炙乌梅 10 g, 黄连 3 g, 煨木香 10 g, 茯苓 15 g, 炙

甘草 5 g; 颗粒剂由天江药业股份有限公司生产, 制成含生药浓度为 0.096 8、0.193 5、0.387 0 g/ml 的药液, 4℃保存, 灌胃前加温。匹维溴铵片 (50 mg/片, 批号: H20160396, 法国 Mylan Laboratories SAS 公司), 研成粉末后加蒸馏水配制成浓度为 0.001 35 g/ml 的混悬液, 4℃保存, 灌胃前加温。

1.3 主要试剂与仪器

UNC-51 样激酶 (ULK1, 货号: T56902F) 抗体、Beclin1 (自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1, 货号: T55092F) 抗体、脂质化微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3 II)/胞浆型微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3 I) 抗体 (货号: T55992F), 上海艾比玛特医药科技有限公司; 白细胞介素 1β (IL-1β, 货号: YM-01454R1)、白细胞介素 6 (IL-6, 货号: YM-01597R1)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α, 货号: YM-01587R1) ELISA 试剂盒, 南京有梦生物科技有限公司; 闭合蛋白 (Occludin, 货号: SAF009) 抗体、闭锁小带蛋白 1 (ZO-1, 货号: SAF012) 抗体、AKT 抗体 (货号: AF01510)、mTOR 抗体 (货号: AF300341)、DAB 显色试剂盒 (货号: AFIHC004)、HRP 标记山羊抗大鼠 (货号: AFSA004)、HRP 标记山羊抗兔 (货号: AFSA001), 湖南艾方生物科技有限公司; 磷酸化雷帕霉素靶蛋白 (p-mTOR, 货号: HA600094) 抗体, 华安生物技术有限公司; 磷酸化蛋白激酶 B (p-AKT, 货号: AF0016) 抗体, 美国 Affinity Biosciences 公司; β-actin 抗体 (货号: 66009-1), 武汉三鹰生物技术有限公司; 戊巴比妥钠 (货号: 20170611), 上海伊卡生物技术有限公司; 苏木素-伊红染液 (货号: S20202), 武汉赛维尔生物科技有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒 (货号: P0010)、4% 多聚甲醛 (货号: P0099), 上海碧云天生物技术有限公司。

电泳仪 (型号: 1645050), 美国伯乐公司; 化学发光仪 (型号: Tanon-5200 Multi), 上海天能科技有限公司; 正置白场显微镜 (型号: Eclipse Ci-L), 日本 Nikon 公司; 光学显微镜 (型号: AE41), 加拿大 Motic 公司; 酶标仪 (型号: RT-6100), 深圳雷杜生命科学股份有限公司; 台式高速冷冻离心机 (型号: TGL16M), 上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

司; 细胞破碎仪 (型号: JY98-IIIN), 香港 Easy-Well 公司; 电子天平 (型号: ME203E/02), 梅特勒-托利多仪器有限公司; 病理切片机 (型号: RM2016), 上海徕卡仪器有限公司。

1.4 动物分组、造模及给药

将 60 只 SD 大鼠适应性喂养 7 天后, 用随机数字表法分为对照组, 模型组, 抑肝扶脾方低、中、高剂量组, 匹维溴铵组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组均采用“夹尾刺激 21 天+番泻叶灌胃 14 天”法制备肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠病证结合模型^[10-11]: 每天以纱布包裹大鼠尾部下 1/3 处, 纱布外以 25 mm 长尾票夹夹紧纱布及尾部持续刺激 30 min, 每天 1 次, 连续 21 天; 夹尾刺激 7 天后开始以番泻叶水煎剂 4.5 g/(kg·d) 灌胃, 每天 1 次, 连续 14 天。造模结束后观察大鼠一般情况, 并计算粪便 Bristol 评分^[12]、腹壁撤退反射实验 (AWR) 评分^[13], 若大鼠出现易激惹、扎堆、少动、神态倦怠等症状, 且粪便 Bristol 评分、AWR 评分较对照组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 即为造模成功^[11]。

所有大鼠均造模成功, 根据人与大鼠体表面积折算等效剂量换算^[14], 抑肝扶脾方低、中、高剂量组给药量分别为 0.96、1.93、3.87 g/(kg·d), 匹维溴铵组给药量为 13.5 mg/(kg·d), 对照组及模型组予 10 ml/(kg·d) 蒸馏水, 各组均每天灌胃 1 次, 连续 14 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大鼠一般情况、粪便 Bristol 评分及 AWR 评分 实验期间观察并记录大鼠一般情况, 包括精神状态、饮食、活动、毛发、粪便情况。造模后、末次给药后禁食不禁水 24 h, 比较各组大鼠体质量, 并进行粪便 Bristol 评分和 AWR 评分。

粪便 Bristol 评分^[12]: 大便像香肠或蛇一样表面很光滑, 计 0 分; 断边光滑的柔软块状, 计 2 分; 粗边蓬松块, 糊状大便, 计 4 分; 水状无固体块 (完全液体), 计 6 分。

予乙醚吸入麻醉大鼠, 将导尿管以石蜡油润滑, 从大鼠肛门插入至降结肠, 导尿管开口端连接血压计、打气气囊; 将大鼠固定于无法翻转的特制的透明箱中, 限制其活动范围, 使大鼠仅能前后活动; 待大鼠苏醒并适应 30 min 后, 给气囊充气以扩张结直肠, 分别给予 20、40、60、80 mmHg 四个压力级别的压力, 每个压力级别操作 3 次, 每次持续 30 min, 观察并记录大鼠 AWR 评分, 3 次数据

取平均值。AWR 评分^[13]标准如下: 给予刺激时变得不稳定, 偶尔扭动头部, 计 1 分; 腹背部肌肉轻微收缩但腹部未抬离地面, 计 2 分; 腹背部肌肉较强烈收缩并把腹部抬离地面, 计 3 分; 腹部肌肉强烈收缩, 腹部呈弓形并把腹部、会阴部抬离地面, 计 4 分。分别记录 20、40、60、80 mmHg 压力级别下 AWR 评分。

1.5.2 ELISA 法检测大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平 粪便 Bristol 评分及 AWR 评分完成后, 用 3% 戊巴比妥钠 5 g/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 采用随机数字表法各组选取 6 只大鼠采集腹主动脉血 5 ml, 室温静置 2 h, 再室温、3500 r/min 离心 5 min (离心半径 5.1 cm), 取上层血清。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平。

1.5.3 HE 染色观察大鼠结肠组织病理形态 腹主动脉采血完成后, 开腹取出大鼠全部结肠 (回盲瓣下 2 cm 至肛门口 1.5 cm), 生理盐水冲洗, 将其平均分为三段, 两段分别放入冻存管内置于 -80 °C 冰箱冻存, 一段放入 4% 多聚甲醛中固定。采用随机数字表法各组选取 4 只大鼠于 4% 多聚甲醛中固定的结肠组织 4 mm×4 mm×2 mm, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片, 经二甲苯脱蜡, HE 染色, 乙醇脱水, 二甲苯洗脱, 于光学显微镜下观察结肠组织病理形态。

1.5.4 Western Blot 法检测大鼠结肠组织中 ULK1、Beclin1、Occludin、ZO-1、LC3 蛋白水平 采用随机数字表法各组选取 5 只大鼠经冻存的一段结肠组织 20 mg 并将其剪成小块, 用组织研磨仪研磨, 冰上样品裂解 60 min, 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min (离心半径 10 cm) 后取上清, 进行 BCA 蛋白定量, 100 °C 水浴变性。采用凝胶电泳, 转膜, 放置摇床封闭, 加入一抗 (ULK1、Beclin1、Occludin、ZO-1、LC3 II/LC3 I 稀释比例均为 1:2000), 4 °C 冰箱孵育过夜。随后 TBST 洗涤, 加入二抗 (稀释比例为 1:10 000) 室温孵育 30 min, TBST 洗涤, 曝光显影。用 Image J 1.8.0 软件对蛋白条带进行分析, 除 LC3 蛋白外其余蛋白以 β -actin 为内参, 以目的蛋白与内参灰度值的比值表示目的蛋白水平, LC3 蛋白水平以 LC3 II/LC3 I 表示。

1.5.5 免疫荧光法检测大鼠结肠组织中 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量 采用随机数字表法各组选取 4 只大鼠经冻存的结肠组织 4 mm×4 mm×2 mm, 石蜡包埋, 切片 (厚度为 3~5 μ m),

二甲苯、乙醇脱蜡。浸泡于柠檬酸钠缓冲液，自然冷却后 PBS 缓冲液洗涤 3 次，将 H₂O₂ 均匀覆盖于组织表面，室温孵育 10 min，洗涤，加入一抗（AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 稀释比例均为 1：100），4℃孵育过夜。滴加二抗，37℃孵育 15 min，DAB 检测试剂盒显色，苏木精复染，封片，荧光显微镜观察并留取图像，用 Image J 1.8.0 软件对各组图像进行荧光强度分析，检测 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较方差齐者采用 LSD 检验，方差不齐者采用 Tamhane *T*² 检验。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

实验期间各组大鼠未出现意外死亡情况。对照组大鼠精神活跃、好动、毛发光亮、饮食正常，肛周干洁，大便成形，情绪稳定。造模后，模型组大鼠出现进食量减少、易激惹、扎堆、倦怠不喜活动、毛发杂乱失去光泽，且大便稀溏、肛门周围及尾部有粪便附着。与模型组比较，抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组大鼠大便渐趋正常且呈颗粒状，情绪稳定、行为活跃、毛发光亮、饮食正常，未见明显异常表现。表 1 示，造模后，与对照组比较，其余各组大鼠体质量均降低 (*P*<0.01)。给药后，与对照组比较，模型组大鼠体质量降低 (*P*<0.01)；与模型组比较，抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组大鼠体质量均升高 (*P*<0.05 或 *P*<0.01)；抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组大鼠体质量两两比较差异均无统计学意义 (*P*>0.05)。

表 1 各组大鼠不同时间体质量比较
Table 1 Table 1 Comparison of body weight at different time points in each group of rats (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模后	给药后
对照组	10	341.20±11.72	419.00±17.29
模型组	10	300.10±18.13 ^{a)}	350.50±20.34 ^{a)}
匹维溴铵组	10	291.80±19.32 ^{a)}	377.10±23.11 ^{b)}
抑肝扶脾方低剂量组	10	287.10±13.78 ^{a)}	371.20±13.61 ^{c)}
抑肝扶脾方中剂量组	10	291.40±17.55 ^{a)}	374.70±19.29 ^{b)}
抑肝扶脾方高剂量组	10	302.20±20.07 ^{a)}	385.00±21.34 ^{b)}

注：a) 与对照组同时间比较，*P*<0.01；b) 与模型组同时间比较，*P*<0.01；c) 与模型组同时间比较，*P*<0.05。

2.2 各组大鼠不同时间粪便 Bristol 评分比较

表 2 示，造模后，与对照组比较，其余各组大鼠粪便 Bristol 评分均升高 (*P*<0.01)。给药后，与对照组比较，模型组大鼠粪便 Bristol 评分升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组大鼠粪便 Bristol 评分均降低 (*P*<0.05 或 *P*<0.01)；抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组大鼠粪便 Bristol 评分两两比较差异均无统计学意义 (*P*>0.05)。

表 2 各组大鼠不同时间粪便 Bristol 评分比较
Table 2 Comparison of bristol stool scores at different time points in each group of rats (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模后	给药后
对照组	10	3.90±0.74	4.10±0.32
模型组	10	6.10±0.74 ^{a)}	5.90±0.88 ^{a)}
匹维溴铵组	10	5.90±0.74 ^{a)}	4.40±0.52 ^{b)}
抑肝扶脾方低剂量组	10	5.90±0.88 ^{a)}	4.20±0.63 ^{c)}
抑肝扶脾方中剂量组	10	5.80±0.79 ^{a)}	4.20±0.79 ^{b)}
抑肝扶脾方高剂量组	10	6.00±0.94 ^{a)}	4.10±0.57 ^{b)}

注：a) 与对照组同时间比较，*P*<0.01；b) 与模型组同时间比较，*P*<0.01；c) 与模型组同时间比较，*P*<0.05。

2.3 各组大鼠不同时间各压力级别下 AWR 评分比较

表 3 示，造模后，与对照组比较，其余各组大鼠在 20、40、60、80 mmHg 压力级别下 AWR 评分均升高 (*P*<0.05)。给药后，与对照组比较，模型组大鼠在各压力级别下 AWR 评分均升高 (*P*<0.05)；与模型组比较，除抑肝扶脾方低剂量组在 20 mmHg 压力级别下外，其余各组大鼠在各压力级别下 AWR 评分均降低 (*P*<0.05 或 *P*<0.01)；与匹维溴铵组比较，抑肝扶脾方低剂量组在各压力级别下、抑肝扶脾方中剂量组在 20、40、60 mmHg 压力级别下 AWR 评分均升高 (*P*<0.05)，抑肝扶脾方高剂量组在各压力级别下 AWR 评分差异无统计学意义 (*P*>0.05)；与抑肝扶脾方低剂量组比较，抑肝扶脾方高剂量组及匹维溴铵组在各压力级别下 AWR 评分均降低 (*P*<0.05)；与抑肝扶脾方中剂量组比较，抑肝扶脾方高剂量组在 20 mmHg 压力级别下 AWR 评分降低 (*P*<0.05)。

2.4 各组大鼠结肠组织病理形态比较

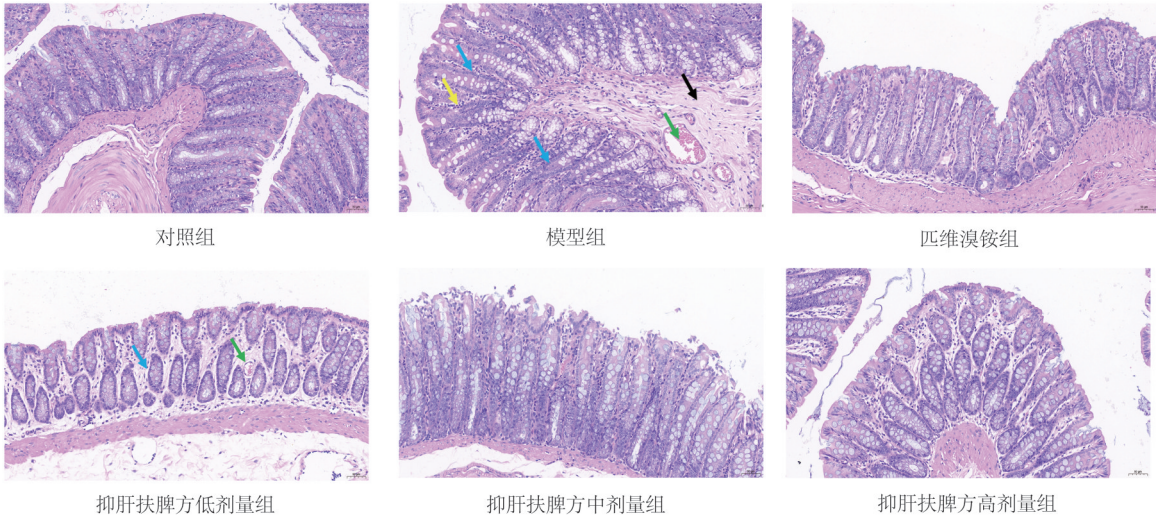
图 1 示，对照组大鼠结肠组织黏膜上皮完整，未见明显上皮细胞变性、坏死和脱落，固有层腺体排列紧密，杯状细胞丰富，未见明显损伤，未见明显炎症细胞浸润。与对照组比较，模型组结肠组织

表 3 各组大鼠不同时间各压力级别下 AWR 评分比较

Table 3 Comparison of AWR scores of rats at different pressure levels and time points in each group of rats (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	时间	鼠数	20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
对照组	造模后	10	0.27±0.21	0.30±0.25	0.77±0.32	1.40±0.44
	给药后	10	0.37±0.25	0.70±0.33	1.17±0.45	1.79±0.48
模型组	造模后	10	2.70±0.76 ^{a)}	3.40±0.70 ^{a)}	3.83±0.36 ^{a)}	4.00±0.00 ^{a)}
	给药后	10	2.33±0.50 ^{a)}	2.93±0.34 ^{a)}	3.60±0.26 ^{a)}	3.97±0.10 ^{a)}
匹维溴铵组	造模后	10	2.77±1.02 ^{a)}	3.23±0.70 ^{a)}	3.60±0.47 ^{a)}	3.83±0.36 ^{a)}
	给药后	10	0.90±0.44 ^{c) e)}	1.20±0.50 ^{c) e)}	1.86±0.48 ^{c) e)}	2.57±0.50 ^{c) e)}
抑肝扶脾方低剂量组	造模后	10	2.87±0.86 ^{a)}	3.37±0.58 ^{a)}	3.67±0.47 ^{a)}	3.90±0.32 ^{a)}
	给药后	10	1.73±0.60 ^{d)}	2.23±0.64 ^{b) d)}	2.83±0.65 ^{c) d)}	3.40±0.47 ^{c) d)}
抑肝扶脾方中剂量组	造模后	10	2.53±0.67 ^{a)}	3.00±0.67 ^{a)}	3.80±0.42 ^{a)}	4.00±0.00 ^{a)}
	给药后	10	1.60±0.50 ^{c) d)}	1.93±0.60 ^{c) d)}	2.60±0.54 ^{c) d)}	3.03±0.53 ^{c)}
抑肝扶脾方高剂量组	造模后	10	2.50±0.76 ^{a)}	3.07±0.68 ^{a)}	3.37±0.43 ^{a)}	3.87±0.23 ^{a)}
	给药后	10	0.94±0.64 ^{c) e) f)}	1.37±0.58 ^{c) e)}	1.93±0.65 ^{c) e)}	2.50±0.48 ^{c) e)}

注: a) 与对照组同时时间比较, $P<0.05$; b) 与模型组同时时间比较, $P<0.05$; c) 与模型组同时时间比较, $P<0.01$; d) 与匹维溴铵组同时时间比较, $P<0.05$; e) 与抑肝扶脾方低剂量组同时时间比较, $P<0.05$; f) 与抑肝扶脾方中剂量组同时时间比较, $P<0.05$ 。



注: 蓝色箭头指杯状细胞; 黄色箭头指炎症细胞; 黑色箭头指黏膜下层胶原纤维; 绿色箭头指微血管。

图 1 各组大鼠结肠组织病理形态 (HE 染色, $\times 100$)

Figure 1 Histopathology morphology of colon tissue in each group of rats (HE staining, $\times 100$)

固有层腺体上部杯状细胞明显减少, 少量炎症细胞浸润, 黏膜下层胶原纤维溶解, 分界不清且着色变淡, 微血管充血、扩张。与模型组比较, 抑肝扶脾方低剂量组结肠组织固有层腺体杯状细胞略减少, 微血管充血、扩张; 抑肝扶脾方中、高剂量组及匹维溴铵组结肠组织黏膜上皮完整, 未见明显上皮细胞变性、坏死和脱落, 固有层腺体数量丰富且排列紧密, 杯状细胞丰富, 未见明显损伤, 未见明显炎症细胞浸润, 黏膜下层和肌层未见明显异常。

2.5 各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较

表 4 示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组 IL-1 β 、

IL-6、TNF- α 水平均降低 ($P<0.01$)。与匹维溴铵组比较, 抑肝扶脾方低剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 均水平降低, 抑肝扶脾方中剂量组 IL-1 β 水平降低, 抑肝扶脾方高剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均升高 ($P<0.05$)。与抑肝扶脾方低剂量组比较, 抑肝扶脾方中、高剂量组 TNF- α 、IL-1 β 水平均升高, 抑肝扶脾方高剂量组 IL-6 水平升高 ($P<0.05$)。与抑肝扶脾方中剂量组比较, 抑肝扶脾方高剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均升高 ($P<0.05$)。

2.6 各组大鼠结肠组织中 ULK1、Beclin1、Occludin、ZO-1、LC3 蛋白水平比较

表 5 示, 与对照组比较, 模型组大鼠结肠组织中 ULK1、Beclin1、Occludin、ZO-1、LC3 II/LC3 I

表 4 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平比较
Table 4 Comparison of TNF-α, IL-1β, and IL-6 in serum of rats in each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组	6	181.84±7.62	237.64±14.54	29.73±3.36
模型组	6	325.48±23.37 ^{a)}	561.35±77.52 ^{a)}	53.48±2.35 ^{a)}
匹维溴铵组	6	196.64±11.59 ^{b)}	454.84±12.91 ^{b)}	39.41±2.72 ^{b)}
抑肝扶脾方低剂量组	6	145.44±8.59 ^{b) c)}	364.47±15.06 ^{b) c)}	33.72±5.61 ^{b) c)}
抑肝扶脾方中剂量组	6	200.36±22.30 ^{b) d)}	368.92±49.22 ^{b) c) d)}	28.55±2.27 ^{b)}
抑肝扶脾方高剂量组	6	260.42±25.87 ^{b) c) d) e)}	486.67±13.50 ^{b) c) d) e)}	42.45±5.56 ^{b) c) d) e)}

注：IL-1β，白细胞介素 1β；IL-6，白细胞介素 6；TNF-α，肿瘤坏死因子 α。
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与匹维溴铵组比较， $P<0.05$ ；d) 与抑肝扶脾方低剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与抑肝扶脾方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

表 5 各组大鼠结肠组织中 ULK1、Beclin1、Occludin、ZO-1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平比较
Table 5 Comparison of ULK1, Beclin1, LC3II/I, Occludin, and ZO-1 protein levels in colonic tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

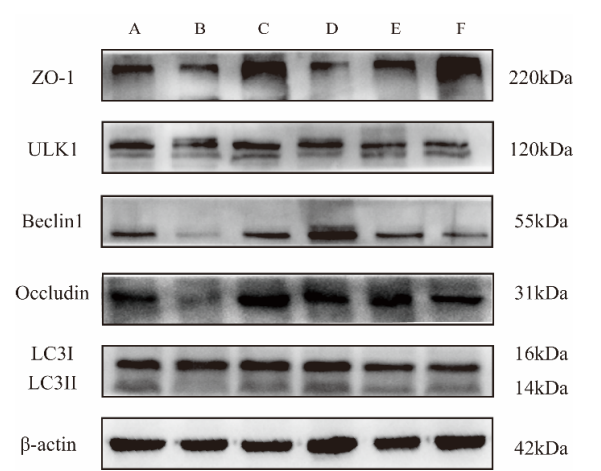
组别	鼠数	ULK1/β-actin	Beclin1/β-actin	Occludin/β-actin	ZO-1/β-actin	LC3 II/LC3 I
对照组	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	5	0.56±0.15 ^{a)}	0.53±0.11 ^{a)}	0.55±0.2 ^{b)}	0.44±0.17 ^{a)}	0.77±0.04 ^{a)}
匹维溴铵组	5	0.99±0.28 ^{c)}	1.00±0.07 ^{c)}	1.06±0.32 ^{d)}	0.89±0.19 ^{c) e)}	1.16±0.14 ^{d)}
抑肝扶脾方低剂量组	5	0.88±0.07	1.20±0.37 ^{d)}	1.09±0.19 ^{d)}	0.99±0.23 ^{d) e)}	1.01±0.11 ^{c)}
抑肝扶脾方中剂量组	5	1.02±0.18 ^{d)}	1.41±0.45 ^{d)}	1.22±0.20 ^{d)}	0.29±0.14	1.07±0.14 ^{d)}
抑肝扶脾方高剂量组	5	1.33±0.54 ^{d)}	1.17±0.18 ^{d)}	1.26±0.18 ^{d)}	0.99±0.23 ^{d) e)}	1.04±0.12 ^{c)}

注：ULK1，UNC-51 样激酶；Beclin1，自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1；Occludin，闭合蛋白；ZO-1，闭锁小带蛋白 1；LC3，微管相关蛋白 1 轻链 3，LC3 蛋白水平以 LC3 II/LC3 I 表示。
a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组比较， $P<0.01$ ；e) 与抑肝扶脾方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

蛋白水平均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，抑肝扶脾方中、高剂量组及匹维溴铵组 ULK1 蛋白水平均升高，抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组 Beclin1、Occludin、LC3 II/LC3 I 蛋白水平均升高，抑肝扶脾方低、高剂量组及匹维溴铵组 ZO-1 蛋白水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与抑肝扶脾方中剂量组比较，抑肝扶脾方低、高剂量组及匹维溴铵组 ZO-1 蛋白水平均升高 ($P<0.05$)。各组大鼠结肠组织中 ULK1、Beclin1、Occludin、ZO-1、LC3 II/LC3 I 蛋白电泳图见图 2。

2.7 各组大鼠结肠组织中 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量比较

表 6 示，与对照组比较，模型组大鼠结肠组织中 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与匹维溴铵组比较，抑肝扶脾方高剂量组 p-AKT/AKT 蛋白相对表达量降低，抑肝扶脾方各剂量组 p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量均升高 ($P<0.05$)。与抑肝



注：A，对照组；B，模型组；C，抑肝扶脾方低剂量组；D，抑肝扶脾方中剂量组；E，抑肝扶脾方高剂量组；F，匹维溴铵组；ULK1，UNC-51 样激酶；Beclin1，自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1；LC3，微管相关蛋白 1 轻链 3；Occludin，闭合蛋白；ZO-1，闭锁小带蛋白 1。

图 2 各组大鼠结肠组织中 ULK1、Beclin1、LC3 II/LC3 I、Occludin、ZO-1 蛋白电泳图
Figure 2 Electrophoresis images of ULK1, Beclin1, LC3II/I, Occludin, and ZO-1 in colonic tissue of rats in each group

扶脾方低剂量组比较,抑肝扶脾方高剂量组 p-AKT/AKT 蛋白相对表达量降低,抑肝扶脾方中、高剂量组 p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$)。

表 6 各组大鼠结肠组织中 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量比较

Table 6 Comparison of the relative expression levels of p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR proteins in colon tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR
对照组	4	0.82±0.07	0.80±0.04
模型组	4	1.21±0.05 ^{a)}	1.16±0.02 ^{a)}
匹维溴铵组	4	1.08±0.04 ^{b)}	0.83±0.06 ^{c)}
抑肝扶脾方低剂量组	4	1.06±0.03 ^{c)}	1.08±0.01 ^{c) d)}
抑肝扶脾方中剂量组	4	0.98±0.02 ^{b)}	0.95±0.02 ^{b) d) e)}
抑肝扶脾方高剂量组	4	0.93±0.05 ^{b) d) e)}	0.95±0.02 ^{b) d) e)}

注: p-AKT, 磷酸化蛋白激酶 B; AKT, 蛋白激酶 B; p-mTOR, 磷酸化雷帕霉素靶蛋白; mTOR, 雷帕霉素靶蛋白。

a) 与对照组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与匹维溴铵组比较, $P<0.05$; e) 与抑肝扶脾方低剂量组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

中医学认为 IBS-D 归属于“泄泻”范畴,肝郁脾虚型是其临床常见类型,其形成多与情志不畅、饮食内伤有关^[15]。徐景藩认为 IBS-D 病机与肝脾密切相关^[16]。木郁失其条达,升降出入失调,则气机滞而不通,而成腹痛、腹胀;木郁横克中土,水津输布障碍,清浊混杂不分,而成腹胀、便溏。抑肝扶脾方是在痛泻要方和香连丸基础上化裁而成,方中白术、太子参、茯苓、炙甘草共奏健脾益气、祛湿止泻之功;脾虚生湿,日久则化热,故以香连丸取其清热燥湿、行气止痛、厚肠止泻之功,助缓解痛泻之症;白芍柔肝止痛,陈皮疏肝理气;防风增强止泻之功,同时为防止风药伤阴,配伍乌梅以敛阴,润燥相济,以防阴伤过度。全方肝脾同治、升清降浊、消补兼施、润燥相济,使肝用充实,脾运有节,则水谷得运,诸症自除。临床研究发现,抑肝扶脾方可有效改善 IBS-D 患者临床症状,提高生活质量^[9, 17]。

匹维溴铵是临床治疗 IBS-D 的常用药物,故本研究将其作为对照药物。本研究结果显示,模型组大鼠易激惹、扎堆、倦怠不喜活动,毛发杂乱失去光泽,大便稀溏,体质量降低,粪便 Bristol 评分和不同压力级别下 AWR 评分升高,且 HE 染色未见肠道器质性病理表现,证明肝郁脾虚型 IBS-D 病证结合模型制备成功。抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴

铵组大鼠情绪正常、行为活跃、毛发光亮、饮食正常、粪便成形呈颗粒状,体质量增长,粪便 Bristol 评分降低,且抑肝扶脾方各剂量组与匹维溴铵组大鼠粪便 Bristol 评分无明显差异,提示在改善粪便性状上抑肝扶脾方与匹维溴铵疗效一致。AWR 评分用于评估内脏敏感性,研究中仅抑肝扶脾方低剂量组在 20 mmHg 压力级别下 AWR 评分较模型组无明显差异,其余各组大鼠在各压力级别下 AWR 评分较模型组均降低,表明抑肝扶脾方低剂量可能无法降低大鼠的轻度内脏高敏感性,抑肝扶脾方中、高剂量具有降低大鼠内脏高敏感性的作用。抑肝扶脾方高剂量组与匹维溴铵组在不同压力级别下 AWR 评分无明显差异,且均低于抑肝扶脾方低剂量组,提示抑肝扶脾方高剂量与匹维溴铵在不同压力级别下降低内脏敏感性的疗效一致,均优于抑肝扶脾方低剂量。

IBS-D 的发病与肠道上皮屏障功能障碍、免疫激活以及自噬功能障碍有关^[18-20]。IBS-D 比其他亚型 IBS 肠道通透性明显增高,主要体现在减少肠道紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的相互作用上^[21]。IBS 存在全身低度炎症的病理基础,炎症因子 TNF- α 在肠道屏障功能障碍中起核心作用,会引起肠道损伤并导致 Occludin 相关紧密连接屏障功能的丧失^[22]。mTOR 抑制剂雷帕霉素可阻止 TNF- α 诱导的体内肠道损伤^[19],这与 AKT/mTOR 通路对肠道上皮细胞自噬产生负调控作用有关^[23]。AKT/mTOR 通路作为自噬的关键调节因子通路,其下游可形成 AKT-mTOR 蛋白复合体 1(mTORC1)-ULK1 复合体调控自噬过程^[24]。Beclin1 是自噬的核心蛋白,其通过参与自噬体的形成和调控,帮助细胞进行自我修复和适应应激状态^[25]。在 IBS 中 Beclin1 可以与 Occludin 之间存在相互作用,并且与膜上的 Occludin 共定位,参与肠道黏膜屏障的自噬^[20]。微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)亦是自噬的核心蛋白,可参与自噬小体形成的不同阶段,在自噬体形成过程中,LC3 I 转化为 LC3 II,因此 LC3 II 与 LC3 I 的比值可以很好地反映自噬状态,同时 LC3 可与紧密连接蛋白相互作用以改善肠道屏障功能^[26-27]。因此,推测 IBS-D 可以通过干预 AKT/mTOR 信号通路,影响肠道上皮细胞自噬,修复因炎症导致的肠道上皮屏障功能障碍,从而降低肠道通透性。

本研究结果显示,与对照组比较,模型组大鼠结肠组织中 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对

表达量升高,提示 IBS-D 大鼠 AKT/mTOR 通路信号活性强;结肠组织中自噬蛋白 ULK1、Beclin1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平降低,提示发生了肠道自噬功能的异常;结肠组织中 Occludin、ZO-1 蛋白水平亦降低,提示肠道屏障功能异常;血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高,且 HE 染色显示结肠组织有少量的炎症细胞浸润,提示 IBS-D 大鼠存在全身低度炎症。以上结果表明,血清炎症因子增加后激活 AKT/mTOR 通路,导致紧密连接蛋白断裂,肠道屏障损伤,进而肠道通透性增加。与模型组比较,抑肝扶脾方各剂量组及匹维溴铵组血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均降低,其中以抑肝扶脾方低剂量组降低最明显;抑肝扶脾方各剂量组 Beclin1、LC3 II/LC3 I、Occludin 蛋白水平均升高,抑肝扶脾方高剂量组 ULK1、ZO-1 蛋白水平升高,表明抑肝扶脾方各剂量均可减轻炎症反应,以低剂量效果最佳,而在减轻肠道自噬功能及屏障功能异常方面,以高剂量效果更佳。此外,抑肝扶脾方各剂量组 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量均低于模型组, p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量高于匹维溴铵组,且抑肝扶脾方高剂量组 p-AKT/AKT 蛋白相对表达量低于匹维溴铵组, p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量低于抑肝扶脾方低剂量组,提示抑肝扶脾方各剂量均可不同程度地抑制 AKT/mTOR 通路,且以高剂量效果更佳,其可能通过抑制 AKT/mTOR 通路形成 AKT-mTORC1-ULK1 复合体调控自噬,从而增强 Occludin、ZO-1 蛋白的紧密连接来改善肠道上皮屏障功能障碍,并降低肠道通透性来发挥治疗 IBS-D 的作用。

综上所述,抑肝扶脾方可能通过降低炎症因子水平,抑制 AKT/mTOR 通路相关蛋白,提高自噬相关蛋白水平,促进肠道紧密连接蛋白上调,从而改善肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠相关症状。然而自噬存在多种调节机制,本研究仅从 AKT/mTOR 信号通路进行验证,未对抑肝扶脾方是否还通过其他自噬途径进行调控而展开研究。因此,未来将进一步研究抑肝扶脾方对 IBS-D 的其他自噬途径的作用机制。

参考文献

- [1] LACY BE, MEARIN F, CHANG L, et al. Bowel disorders [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(6): 1393-1407.
- [2] OKA P, PARR H, BARBERIO B, et al. Global prevalence of irritable bowel syndrome according to Rome III or IV criteria: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(10): 908-917.
- [3] FORD AC, SPERBER AD, CORSETTI M, et al. Irritable bowel syndrome [J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1675-1688.
- [4] JOVANI M, FIORINO G, DANESE S. Commentary: associations between immune activation, intestinal permeability and irritable bowel syndrome [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013, 37(2): 277-278.
- [5] HANNING N, EDWINSON AL, CEULEERS H, et al. Intestinal barrier dysfunction in irritable bowel syndrome: a systematic review [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2021, 14: 1-31. doi: 10.1177/1756284821993586.
- [6] FENG Y, TEITELBAUM DH. Tumour necrosis factor-induced loss of intestinal barrier function requires TNFR1 and TNFR2 signalling in a mouse model of total parenteral nutrition [J]. *J Physiol*, 2013, 591(15): 3709-3723.
- [7] AL-SADI R, YE D, SAID HM, et al. IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF- κ B pathway [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(5): 2310-2322.
- [8] ZHU ML, ZHANG PM, JIANG M, et al. Myricetin induces apoptosis and autophagy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signalling in human colon cancer cells [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 209.
- [9] 赵旦娅, 郑浩, 宋昌娟, 等. 抑肝扶脾方治疗肝郁脾虚证腹泻型肠易激综合征的临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(12): 7491-7494.
- [10] 赵双梅, 李慧臻, 孔祥茹, 等. 肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠模型的建立及评价 [J]. *湖南中医杂志*, 2015, 31(10): 137-139.
- [11] 赵妍, 罗丹妮, 陈颖, 等. 慢性束缚应激联合番泻叶灌胃法制备 IBS-D 大鼠模型的量效及时效关系评价 [J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(15): 1360-1367.
- [12] LEWIS SJ, HEATON KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1997, 32(9): 920-924.
- [13] AL-CHAER ED, KAWASAKI M, PASRICHA PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [14] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1861.
- [15] 中华中医药学会脾胃病分会. 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): 1614-1620.
- [16] 徐景藩. 徐景藩脾胃病临证经验集粹 [M]. 陆为民, 徐丹华, 罗斐和, 整理. 北京: 科学技术出版社, 2015:

- 40–42.
- [17]曹正龙, 何斌, 潘军, 等. 国医大师徐景藩抑肝扶脾法治疗腹泻型肠易激综合征经验应用的研究[J]. 中医临床杂志, 2013, 25(7): 604–606.
- [18]MARTÍNEZ C, LOBO B, PIGRAU M, et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier[J]. Gut, 2013, 62(8): 1160–1168.
- [19]SAHA K, SUBRAMENIUM GANAPATHY A, WANG A, et al. Autophagy reduces the degradation and promotes membrane localization of Occludin to enhance the intestinal epithelial tight junction barrier against paracellular macromolecule flux[J]. J Crohns Colitis, 2023, 17(3): 433–449.
- [20]WONG M, GANAPATHY AS, SUCHANEC E, et al. Intestinal epithelial tight junction barrier regulation by autophagy-related protein ATG6/beclin 1[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2019, 316(5): C753–C765.
- [21]PETERSON LW, ARTIS D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(3): 141–153.
- [22]OHMAN L, SIMRÉN M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(3): 163–173.
- [23]POLIVKA J JR, JANKU F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Pharmacol Ther, 2014, 142(2): 164–175.
- [24]YU X, LONG YC, SHEN HM. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy[J]. Autophagy, 2015, 11(10): 1711–1728.
- [25]CHEN Y, KLIONSKY DJ. The regulation of autophagy-unanswered questions[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 2): 161–170.
- [26]KLIONSKY DJ, ABDELMOHSEN K, ABE A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)[J]. Autophagy, 2016, 12(1): 1–222.
- [27]MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728–741.

Effect of *Yigan Fupi Prescription* (抑肝扶脾方) on the AKT/mTOR Pathway in the Colon Tissue of Diarrhea-Type Irritable Bowel Syndrome Model Rats with Liver Stagnation and Spleen Deficiency Pattern

JIU Suting¹, LI Huiying¹, SUN Yueting², CUI Songxiang³, XU Xintian¹, ZHENG Hao¹, LU Weimin¹

1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029; 2. Qujing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yunnan Province; 3. Pukou District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yigan Fupi Prescription* (抑肝扶脾方, YFP) in treating diarrhea-type irritable bowel syndrome (IBS-D) by investigating the AKT/mTOR signaling pathway. **Methods**

Sixty SD rats were randomly divided into control group, model group, YFP low-, medium-, and high-dose group, and pinaverium bromide group, with 10 rats in each group. All groups but the control group, were subjected to 21 days of tail-clamping stimulation and 14 days of senna leaf gavage to establish a liver stagnation and spleen deficiency-type IBS-D rat model. After successful modeling, the YFP low-, medium-, and high-dose group were administered 0.96, 1.93, and 3.87 g/(kg·d) of the prescription, respectively. The pinaverium bromide group was given 13.5 mg/(kg·d), while the control and model groups were given 10 ml/(kg·d) distilled water. All groups were administered once daily for 14 consecutive days. General conditions of the rats were recorded during the experiment, and after modeling and drug administration, body weight, Bristol stool score, abdominal withdrawal reflex (AWR) score, and histopathology of colon tissue were observed under HE staining. ELISA was used to detect serum levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6). Immunofluorescence was employed to detect the levels of AKT/mTOR pathway-related proteins including phosphorylated AKT (p-AKT)/AKT and phosphorylated mTOR (p-mTOR)/mTOR in the colon tissue. Western Blotting was used to detect the levels of autophagy-related proteins, including UNC-51-like kinase 1 (ULK1), Beclin1 and LC3, and tight junction proteins including Occludin and ZO-1 in the colon tissue. **Results** After modeling, compared to the control group, the body weight of rats in the other groups decreased, and Bristol stool scores, as well as AWR scores under 20, 40, 60, and 80 mmHg increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After drug administration, compared to the control group, the model group showed reduced body weight, decreased ULK1, Beclin1, LC3 II/LC3 I, Occludin, and ZO-1 protein levels in the colon tissue ($P <$

0.05 or $P < 0.01$), and increased Bristol stool scores, AWR scores, serum TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels, as well as p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR protein relative expression levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Pathological results showed a significant reduction in goblet cells in the upper part of the glandular layer of the colon, with mild inflammatory cell infiltration. The submucosal collagen fibers were dissolved, with unclear boundaries, pale staining, and microvascular congestion and dilation. Compared with the model group, the YFP low-, medium-, and high-dose group and the pinaverium bromide group showed increased body weight, Beclin1, Occludin, and LC3 II/LC3I protein levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and decreased Bristol stool scores, AWR scores under 40, 60, and 80 mmHg, serum IL-1 β , IL-6, TNF- α levels, and p-AKT/AKT, p-mTOR/mTOR protein relative expression levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The pathological morphology of the rats in the YFP groups and pinaverium bromide group showed varying degrees of improvement. Compared with the pinaverium bromide group, the YFP low- and medium-dose group showed increased AWR scores under 20, 40, and 60 mmHg ($P < 0.05$). The YFP low-dose group had reduced TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels, and increased p-mTOR/mTOR protein relative expression levels occurred in all YFP groups ($P < 0.05$). Compared with the YFP low-dose group, the YFP high-dose group and pinaverium bromide group showed decreased AWR scores under different pressure levels and reduced p-AKT/AKT protein relative expression levels, while the YFP medium- and high-dose group had elevated serum TNF- α , IL-1 β levels and reduced p-mTOR/mTOR protein relative expression levels ($P < 0.05$). **Conclusion** YFP can effectively improve the pathological injury of colon tissue in IBS-D model rats with liver stagnation and spleen deficiency, reduce Bristol stool and AWR scores, and its mechanism may be related to reducing level of inflammatory factors and inhibiting AKT/mTOR pathway-related proteins in colon tissue, thereby enhancing the expression of autophagy-related proteins in the colon tissue.

Keywords diarrhea-type irritable bowel syndrome; intestinal mucosal barrier; inflammatory factor; serine kinase; mammalian target of rapamycin; autophagy; tight junction proteins; *Yigan Fupi Prescription* (抑肝扶脾方)

(收稿日期: 2024-09-30; 修回日期: 2024-12-02)

[编辑: 王利芬]

广告

欢迎订阅 2025 年《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R)是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 中医药科技期刊分级目录 T1 级期刊。荣获第五届中国出版政府奖期刊奖, 第二届、第三届、第四届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、循证中医药、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 40.00 元, 全年 960 元。国内读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: (010) 64035632, (010) 64089195。国外发行: 中国国际图书贸易集团有限公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: SM140)。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。

网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

