

白术配伍木香通过调节 Cajal 间质细胞自噬改善脾虚型腹泻肠易激综合征大鼠腹泻症状

黎豫川¹, 张远哲^{2*}, 杨元凤¹, 陈礼大¹, 徐献梅¹(1.贵州中医药大学第二附属医院, 贵阳 550025; 2.贵州中医药大学, 贵阳 550025)

摘要: 目的 探究白术配伍木香对脾虚型腹泻肠易激综合征 (irritable bowel syndrome with diarrhea, IBS-D) 大鼠的作用及机制。方法 使用液相色谱检测白术配伍木香水煎液的主要成分。以 SD 大鼠为研究载体, 随机分为对照组、模型组、阳性对照组及低、中、高剂量白术配伍木香 (n=6)。通过灌胃番泻叶联合慢性应激法建立脾虚型 IBS-D 模型大鼠。记录各组大鼠的一般状况及体质量变化。检测粪便含水量, 肠道推进率并通过腹部撤退反射 (abdominal withdrawal reflex, AWR) 阈值测定评估内脏敏感性。采集大鼠结肠组织, 通过透射电镜观察 Cajal 间质细胞 (Cajal interstitial cells, ICC) 内自噬小体的形成。Western blotting 检测自噬相关蛋白表达水平。免疫荧光染色观察 ICC 自噬水平。结果 模型组大鼠腹泻严重, 肠道运动加快, 敏感性提高。与模型组对比, 白术配伍木香的治疗改善了脾虚型 IBS-D 大鼠的腹泻症状, 恢复了大鼠体质量增长趋势, 粪便含水量、肠道推进率及肠道敏感性均显著降低。治疗组大鼠结肠组织 ICC 内自噬小体形成数量大于模型组, 自噬相关蛋白表达水平高于模型组, 而干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 及酪氨酸蛋白激酶 kit (C-kit proto-oncogene protein, C-kit) 表达水平低于模型组。并且, 白术配伍木香对 IBS-D 大鼠的影响呈剂量依赖性, 中剂量及高剂量白术配伍木香的作用具有显著性。结论 白术配伍木香通过调节 ICC 自噬降低脾虚型 IBS-D 大鼠的肠道推进率及肠道敏感性, 从而改善脾虚型 IBS-D 的腹泻症状。

关键词: 腹泻型肠易激综合征; 白术; 木香; Cajal 间质细胞; 自噬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2025)13-2236-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20233076

引用本文: 黎豫川, 张远哲, 杨元凤, 等. 白术配伍木香通过调节 Cajal 间质细胞自噬改善脾虚型腹泻肠易激综合征大鼠腹泻症状[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(13): 2236-2244.

Atractylodes Macrocephala Koidz. with *Aucklandia Lappa* Decne. Improves Diarrhea Symptoms in Irritable Bowel Syndrome of Spleen Deficiency with Diarrhea Rats by Regulating Autophagy in Cajal Interstitial Cells

LI Yuchuan¹, ZHANG Yuanzhe^{2*}, YANG Yuanfeng¹, CHEN Lida¹, XU Xianmei¹(1.Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2.Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects and mechanisms of *Atractylodes macrocephala* Koidz. with *Aucklandia lappa* Decne. on irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D) with spleen deficiency type in rats. **METHODS** Liquid chromatography mass spectrometry was used to detect the main components of decoction of *Atractylodes macrocephala* Koidz. with *Aucklandia lappa* Decne. SD rats were used as the study vehicle and randomly divided into control group, model group, positive control group and low-, medium-, high-dose of *Atractylodes macrocephala* Koidz. and *Aucklandia lappa* Decne. group (n=6). The rat model of spleen deficiency type IBS-D was established by intragastric administration of *Cassia angustifolia* Vahl combined with chronic stress method. The general conditions and weights of the rats in each group were recorded. Measured stool water content, intestinal transport rate, and visceral sensitivity by assessing the abdominal withdrawal reflex (AWR) threshold. Colonic tissue was collected from rats. The formation of autophagic vesicles in Cajal interstitial cells (ICC) was observed by transmission electron microscopy. Western blotting was used to detect the expression level of autophagy-related proteins. Immunofluorescence staining was performed to observe the level of ICC autophagy. **RESULTS** Rats in the model group showed severe diarrheal symptoms, along with accelerated intestinal motility and increased intestinal sensitivity. Compared with the model group, treatment with

基金项目: 贵州省省级科技计划项目资助 (黔科合基础-ZK[2022] 一般 467); 贵州省教育厅高等学校科学研究项目-青年项目 (黔教技[2022]217 号); 贵州中医药大学学术新苗项目 (贵科合学术新苗 [2023]-37 号)

作者简介: 黎豫川, 男, 博士, 副主任药师 E-mail: 531533319@qq.com *通信作者: 张远哲, 女, 博士, 副教授 E-mail: 357984356@qq.com

Atractylodes macrocephala Koidz. and *Aucklandia lappa* Decne. improved the diarrheal symptoms, restored the body weight gain trend, and reduced fecal water content, intestinal transport rate, and visceral sensitivity in IBS-D rats with spleen deficiency syndrome. The number of autophagic vesicles formed in the ICC of colonic tissue in the treated rats was greater than that in the model group, and the expression levels of autophagy-related proteins were higher than those in the model group, while the expression levels of stem cell factor(SCF) and C-kit proto-oncogene protein(C-kit) were significantly lower than those in the model group. Moreover, the effects of *Atractylodes macrocephala* Koidz. and *Aucklandia lappa* Decne. on IBS-D rats were dose-dependent, and the effects of medium and high doses of *Atractylodes macrocephala* Koidz. and *Aucklandia lappa* Decne. were significant. **CONCLUSION** *Atractylodes macrocephala* Koidz. and *Aucklandia lappa* Decne. reduce the intestinal transport rate and intestinal sensitivity of IBS-D rats by regulating autophagy of ICC, thereby alleviating diarrhea symptoms in IBS-D with spleen deficiency syndrome.

KEYWORDS: irritable bowel syndrome with diarrhea; *Atractylodes macrocephala* Koidz.; *Aucklandia lappa* Decne.; Cajal interstitial cells; autophagy

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的功能性胃肠病,临床表现主要为腹部疼痛伴随排便次数增多,大便性状稀溏或带有黏液^[1]。IBS分为腹泻型肠易激综合征(IBS with diarrhea, IBS-D)、便秘型肠易激综合征(IBS with constipation, IBS-C)、混合型肠易激综合征(IBS mixed type, IBS-M)以及未定型肠易激综合征(IBS unsubtyped, IBS-U)肠易激综合征^[2]。其中IBS-D最为常见,发病率较高且易反复,严重影响着患者的生活质量及身体健康。在中医学中,IBS-D属于“脾虚”“泄泻”等范畴,并认为IBS病位在肠,脾虚湿盛是IBS-D的重要病机^[3-4]。近年来,通过中医药治疗IBS-D显示出良好的疗效和前景。多项统计研究发现,目前治疗IBS-D使用到的高频药物包括白术、木香及茯苓等^[5]。白术具有燥湿利水、健脾益气的功效。木香具有理气行气、健脾止痛的功效。张全文等^[6]发现以人参、白术、茯苓为君药的参芪白术散具有治疗IBS患者的功效;笔者所在课题组前期研究^[7]也发现香砂六君子汤(方中含白术6g,木香2g)可通过降低血清及结肠中5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)的水平,达到降低肠道敏感性及肠动力等作用来治疗脾虚型IBS-D,还从香砂六君子汤中分离鉴定出9个有效部位化学成分的化合物,发现白术内酯I、白术内酯II、白术内酯III、去氢木香内酯为治疗脾虚型肠IBS-D的药效物质之一,说明方中白术和木香可能是主要的药效物质基础来源。虽然有学者发现以白术、木香等药材组方可以用于治疗IBS,但是未能更进一步探讨其作用机制,不利于白术与木香在临床上的扩大应用,因此本研究探讨了白术配伍木香(简称白术-木香)对脾虚型IBS-D大鼠腹泻症状的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物

白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)、木香(*Aucklandia lappa* Decne.)、番泻叶(*Cassia angustifolia* Vahl)药材均来自贵州中医药大学第二附属医院药剂科,经贵州中医药大学第二附属医院药学部主任中药师赵海鉴定为正品。番泻叶水煎液的制备:称取番泻叶300g,加90℃左右纯净水1500mL,浸泡2h,武火煮沸,文火煎煮10min,过滤浓缩至1000mL,即得药物浓度为0.3g·mL⁻¹的番泻叶水煎液供试品,4℃保存,给药前于37℃温育10min后摇匀。白术-木香水煎液的制备:白术12g,木香4g。以上药物混合,煎煮2次,第1次加8倍量纯化水武火煮开后文火煎30min滤出滤液,第2次加6倍量纯化水武火煮开后文火煎20min滤出滤液,合并2次滤液,100℃水浴后制备浓缩药液。每毫升药液含生药1.4g(另外稀释为0.7、0.35g·mL⁻¹的药液),4℃保存备用。匹维溴铵(Abbott Healthcare SAS公司,货号:630698),通过研钵碾碎成细粉后,使用蒸馏水配至所需浓度。

1.2 动物

8周龄SPF级雌性SD大鼠共36只,体质量为(200±20)g。实验动物购自成都达硕生物科技有限公司,生产许可证号为SCXK(川)2020-030。所有大鼠经适应性饲养1周后用于实验。本研究经贵州中医药大学动物伦理委员会审查及批准(批准号为20220104),实验动物使用许可证号为SYXK(黔)2021-0005。

1.3 试剂与仪器

DAPI染色试剂(北京中杉金桥生物有限公司,货号:ZLI-9557);二抗(FITC标记山羊抗

兔)(Servicebio 公司, 货号: GB22303); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: P0009); 自噬微管相关蛋白轻链 3 β (microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta, LC3B) 抗体 (货号: A11282)、酪氨酸蛋白激酶 kit(C-kitproto-oncogene protein, C-kit) 抗体 (货号: A0357)、 β -actin 抗体 (货号: AC026)、自噬效应蛋白 Beclin 1 抗体 (货号: A7353)、LC3B 抗体 (货号: A19665)、螯合体 1(P62/SQSTM1) 抗体 (货号: A19700) 购自 Abclonal 公司; C-kit 抗体 (货号: ab256345)、干细胞因子 (Stem Cell Factor, SCF) 抗体 (货号: ab64677) 购自 Abcam 公司。

JEM-1400FLASH 透射电子显微镜 (日本电子 JEOL); VS200 数字切片扫描仪 (麦克奥迪实业有限公司); Vanquish 液相色谱仪、Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer 电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific)。

1.4 方法

1.4.1 造模及分组 将 SD 大鼠随机分为 6 组, 包括对照组、模型组、阳性对照组和低、中、高剂量白术-木香组 ($n=6$)。除对照组外, 其余组均采用“番泻叶灌胃联合慢性束缚应激”法建立脾虚型 IBS-D 模型^[8]。采用 100% 番泻叶浸液以 10 mL·kg⁻¹ 大鼠体积灌胃 (20 g·kg⁻¹), 每日 2 次, 连续 14 d。每次灌服完番泻叶水煎剂后, 采取弹力绷带束缚大鼠的两前肢和肩背部, 限制其上半身活动, 时长为 2 h, 束缚期间联合给予夹尾刺激, 每天 2 次。造模期间观察大鼠症状是否满足脾虚型 IBS-D 动物模型鉴定标准^[9], 从而判断造模是否成功。判断标准: 大鼠脾虚证 IBS-D 的表现为体质量增长缓慢, 体温降低, 食物摄取量和水的消耗量减少, 毛变稀疏、缺乏光泽, 倦怠、喜扎堆、反应迟钝, 大便稀溏等。实验期间观察记录大鼠状态及粪便情况, 实验结束后采集各组大鼠的结肠组织用于后续检测。

1.4.2 白术-木香成分分析 (液相-质谱) 用移液器吸取 1 000 μ L 煎煮完毕的白术-木香药液转移至 1.5 mL 离心管中, 于 4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g 离心 10 min, 收集上层清液, 使用 0.45 μ m 滤膜进行过滤, 然后进行上机检测。采用 HSS T3 色谱柱 C₁₈ 柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m); 流动相为 0.1% 甲酸 (A)-甲醇

(B), 梯度洗脱 (0~1 min, 2%B; 1~5.5 min, 2% \rightarrow 100%B; 5.5~14 min, 100%B; 14~14.1 min, 100% \rightarrow 2%B; 14.1~16 min, 2%B); 流速为 0.3 mL·min⁻¹; 进样体积为 10 μ L, 柱温 45 $^{\circ}$ C。每个分析周期为 16 min。一级质谱参数: 分辨率为 70 000, 自动增益控制目标值为 1 \times 10⁶, 最大离子注入时间为 50 ms, 扫描范围为 150~1 500 m/z ; 二级质谱参数: 分辨率为 17 500, 自动增益控制目标值为 1 \times 10⁵, 最大离子注入时间为 50 ms, 母离子选择策略为 10, 碰撞能量 (NCE/阶梯式 NCE) 为 10、30、55。将质谱分析的结果使用软件 MS-DIAL 4.70 进行预处理, 将提取的峰信息与 MassBank、Respect、GNPS 数据库进行比对, 得出物质名称、保留时间、质核比和质谱响应强度 (峰面积)。

1.4.3 干预方法 对照组大鼠及模型组大鼠每日通过灌胃给予 2 mL 体积蒸馏水。低剂量、中剂量及高剂量白术-木香组每日分别灌胃给予 2 mL 0.7、1.4、2.8 g·kg⁻¹ 的白术-木香水煎液浓缩液 (按人临床用量根据体表面积换算成大鼠剂量)。阳性对照组大鼠在治疗期间灌胃给予匹维溴胺 (1.5 mg·kg⁻¹)^[10]。各组大鼠给药干预频次均为每日 1 次, 连续干预 14 d。

1.4.4 一般状态、粪便含水量、胃肠动力检测 观察治疗期间各组大鼠的精神状态、进食状况、腹泻程度及粪便性状等。采集第 14 天各组大鼠的粪便并称量记录。将粪便置入 90 $^{\circ}$ C 恒温箱内烘烤 3 h, 烘干后再次称重。粪便含水率 (%)=(湿粪质量-干粪质量)/湿粪质量 \times 100%。在最后一次给药结束后, 各组随机选取 3 只大鼠禁食不禁水 18 h 后, 进行碳末推进试验测定肠道推进率^[11]。每只大鼠灌胃 0.5 mL 含 5% 黑色活性炭、半固体糊灌胃。30 min 后, 通过腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉, 脱颈法处死大鼠。立即打开腹腔, 分离肠系膜, 截取从幽门到结肠末端的整段大小肠平铺于白纸上, 立即用直尺测量出幽门至黑色半固体糊前沿的距离以及至结肠末端的距离, 并计算肠道推进率。肠道推进率 (%)=幽门至黑色半固体糊前沿的距离/幽门至结肠末端全长的距离 \times 100%。其余小鼠于第 2 天进行腹壁撤退反射 (abdominal withdrawal reflex, AWR) 阈值测量^[12]。采用球囊扩张大鼠的直肠, 并记录引起大鼠出现腹部抬起和背部弓起的最小容量阈值。AWR 最小

容量的阈值越低，则大鼠内脏敏感性越高。试验结束后进行颈椎脱臼处死，解剖并采集结肠组织用于后续试验。

1.4.5 透射电镜试验 采集的结肠组织样品经3%戊二醛及1%四氧化锇固定。通过梯度丙酮进行逐级脱水后，使用脱水剂和Epin812包埋剂进行渗透和包埋。采用超薄切片机制备切片。醋酸铀染色后再用柠檬酸铅于室温下染色切片。采用透射电子显微镜对切片进行图像采集，观察结肠组织的病变情况。

1.4.6 Western blotting 试验 采集各组大鼠结肠组织，加入RIPA裂解液进行匀浆裂解。4℃条件下12 000×g离心10 min，取上清液，使用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。样品加入上样缓冲液进行混合后，沸水浴使蛋白质变性，分装冻存待用。蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后，将蛋白质电转移至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶封闭后，4℃下以Beclin-1(1 : 2 000)、LC3B(1 : 2 000)、p62(1 : 2 000)、C-kit(1 : 1 000)、SCF(1 : 1 000)及β-actin(1 : 50 000)一抗孵育过夜。经TBST清洗后，加入二抗(1 : 5 000)，常温孵育后，分别进行显影，拍照。使用Image J软件进行蛋白条带灰度值比较，以β-actin为内参，对目的蛋白进行半定量分析。

1.4.7 免疫荧光染色试验 大鼠结肠组织的石蜡切片经脱蜡至水及抗原修复后，滴加山羊血清封闭液，室温条件下持续20 min，滴加一抗(LC3B, C-kit)于4℃条件下孵育过夜。使用PBS清洗3次后，滴加二抗并使用PBS清洗。滴加DAPI染色液，室温条件下孵育10 min。PBS清洗3次后使用抗荧光衰减封片剂封片。使用显微摄像系统对切片进行图像采集。采用Image J图像分析系统测定所采集全部图像的荧光强度和面积，并计算每张图像的平均荧光强度。

1.5 统计分析

所有数据经过SPSS 24.0软件进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组数据均数比较行方差齐性检验，组间比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 白术-木香药液中主要成分分析情况

液相-质谱检测结果经过数据库比对后发现，白术-木香经过煎煮后，药液中主要成分为去氢木

香内酯、L-苯丙氨酸、木香炔内酯、L-色氨酸、苍术苷A、吲哚乙酸和白术内酯II，峰面积分别为 2.79×10^{10} 、 2.32×10^{10} 、 1.67×10^{10} 、 1.11×10^{10} 、 1.68×10^9 、 9.72×10^8 和 3.37×10^7 。其中苍术苷A、白术内酯II是白术的成分，去氢木香内酯和木香炔内酯是木香的成分，而L-苯丙氨酸和L-色氨酸可能是白术与木香配伍后形成的物质，吲哚乙酸是色氨酸分解产物之一。结果见图1。

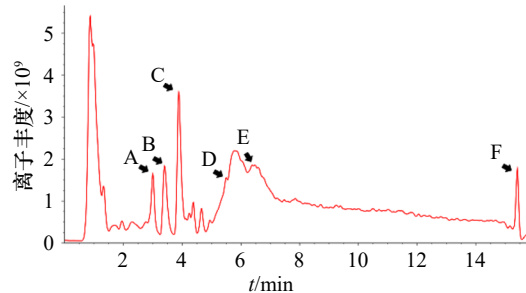


图1 白术-木香药液主要成分正离子色谱图
A-吲哚乙酸；B-L-苯丙氨酸；C-苍术苷A、L-色氨酸；D-木香炔内酯；E-去氢木香内酯；F-白术内酯II。

Fig. 1 Positive ion chromatogram of main components of *Atractylodes macrocephala* Koidz. combined with *Aucklandia lappa* Decne.

A-indoleacetic acid; B-L-phenylalanine; C-atractylloside A and L-tryptophan; D-costunolide; E-dehydrocostus olide; F-atractylenolide II.

2.2 白术-木香对各组大鼠一般状态、粪便含水量及胃肠动力的影响

观察各组大鼠实验期间的一般状态，模型组大鼠经番泻叶联合束缚应激刺激后，毛发凌乱、精神状态萎靡、食欲下降、身形消瘦、体质量下降明显；并且稀便频率增加、肛周粪便污染严重。经白术-木香或匹维溴铵治疗后，大鼠的精神状态好转，稀便频率降低、食欲恢复、体质量也恢复正常增长趋势。白术-木香水煎液剂量越大，对脾虚型IBS-D大鼠一般状态的改善效果越好，且呈剂量依赖性。结果见图2。

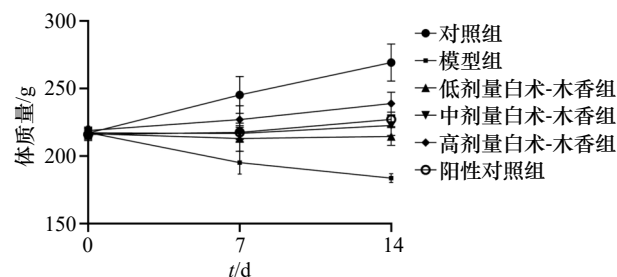


图2 各组大鼠体质量变化情况($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 2 Changes in body weight of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

与对照组比较, 模型组粪便含水量及肠道推进率显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较, 高剂量白术-木香组及阳性对照组粪便含水量显著降低 ($P<0.01$), 中、高剂量白术-木香组及阳性对照组肠道推进率显著降低 ($P<0.01$)。白术-木香的治疗可以显著改善脾虚型 IBS-D 大鼠粪便稀溏的症状, 降低肠道运输速率, 且呈剂量依赖性。为评估各组大鼠内脏敏感性, 测量 AWR 阈值。结果显示, 模型组大鼠 AWR 最小容量显著小于对照组大鼠 ($P<0.01$), 经白术-木香或匹维溴铵治疗后的大鼠 AWR 最小容量均显著大于模型组 ($P<0.01$)。说明白术-木香治疗 IBS-D 大鼠可以显著恢复大鼠的肠道敏感性, 并呈剂量依赖性。结果见图 3。

2.3 白术-木香对各组大鼠结肠 Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 内自噬小体形成的影响

对照组大鼠结肠上皮细胞结构正常, 线粒体形态结构正常, 部分内质网存在轻度扩张现象。细胞膜连续完整, 绒毛结构正常、排列整齐。胞间连接处可见紧密连接结构。模型组大鼠与对照组相比, 结肠上皮细胞的形态结构严重受损, 大部分结肠上皮细胞出现凋亡。线粒体出现肿胀, 内质网扩张呈囊状, 胞浆中可见自噬现象。经白术-木香或匹维溴铵治疗后, 结肠上皮细胞形态结构趋向恢复正常, 线粒体肿胀现象缓解, 内质网扩张减轻, 胞间连接处可见紧密连接结构。并且高剂量白术-木香治疗对结肠组织的病理损伤改善效果最佳, 自噬现象也显著增加。结果见图 4。

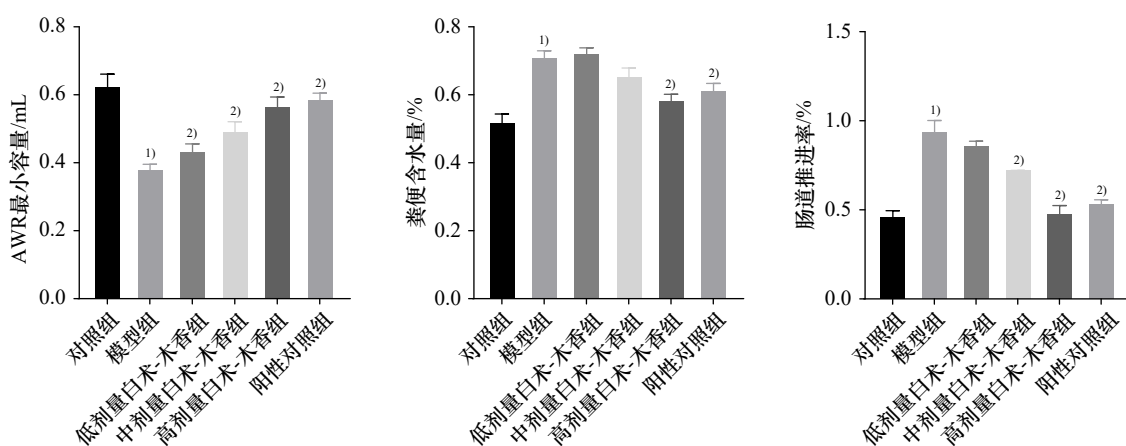


图 3 各组大鼠粪便含水量、AWR 最小容量及肠道推进率检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$) 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Detection results of fecal water content, AWR minimum capacity and intestinal propulsion rate of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

2.4 白术-木香对各组大鼠结肠自噬相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 Beclin-1 蛋白表达水平及 LC3B II/I 比值显著小于对照组 ($P<0.01$), p62 蛋白、C-kit 蛋白及 SCF 蛋白表达水平均显著大于对照组 ($P<0.01$)。与模型组比较, 白术-木香各剂量组大鼠 Beclin-1 蛋白表达水平及 LC3B II/I 比值均增加, p62 蛋白、C-kit 蛋白及 SCF 蛋白表达水平均减小, 呈剂量依赖性, 且中剂量及高剂量白术-木香组大鼠上述蛋白表达水平变化显著 ($P<0.05$)。结果见图 5。

2.5 白术-木香对各组大鼠 ICC 自噬的影响

免疫荧光染色检测结肠组织 C-kit 及 LC3B 阳性表达结果见图 6。模型组大鼠结肠组织中染色 C-kit 阳性表达统计显著大于对照组 ($P<0.01$), LC3B 阳性表达水平显著小于对照组 ($P<0.01$)。与模型组比较, 低剂量白术-木香组的 C-kit 阳性表达降低 ($P<0.05$), 中剂量及高剂量组显著降低 ($P<0.01$)。同时, 中剂量及高剂量组 LC3B 阳性表达统计显著大于模型组 ($P<0.01$)。

3 讨论

IBS-D 的主要症状包括腹痛及腹泻, 发病机制尚未完全阐明, 可能与胃肠道运动异常, 肠道炎症及免疫功能改变、精神心理等多种因素有关^[13]。本研究将白术-木香水煎液用于治疗脾虚型 IBS-D 大鼠, 结果显示, 白术-木香治疗可以显著改善脾虚型 IBS-D 大鼠精神萎靡, 体质量降低的症状, 符合诊断标准中“脾虚”。同时, 脾虚型 IBS-D

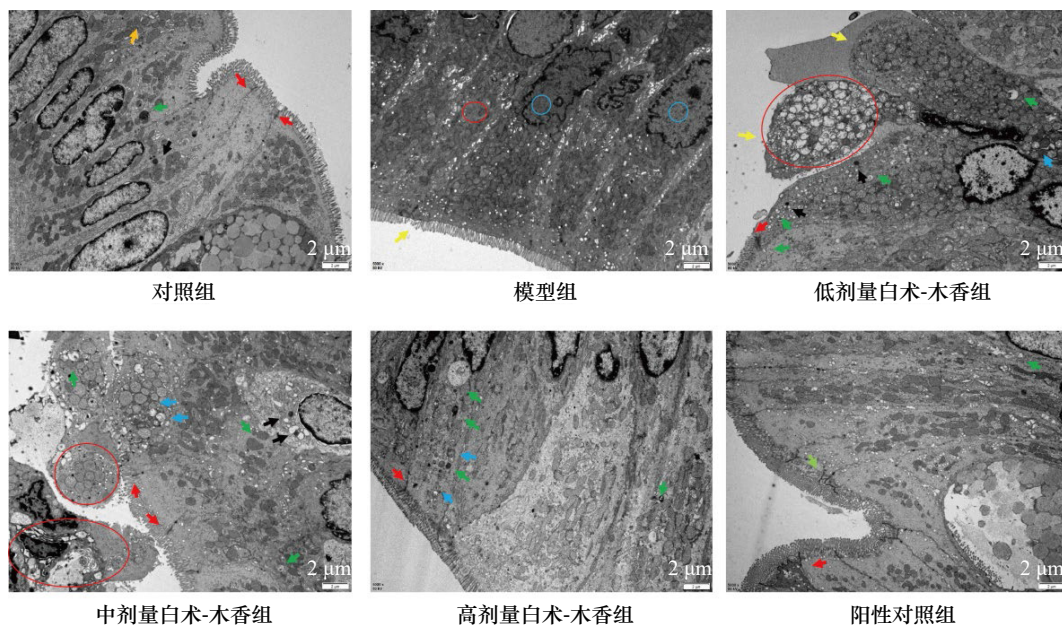


图4 透射电子显微镜观察各组大鼠结肠组织(5 000×, n=6)

紧密连接(红色箭头), 自噬情况(绿色箭头), 溶酶体(黑色箭头), 内质网轻度扩张(橙色箭头), 微绒毛消失(黄色箭头)、线粒体肿胀(蓝色箭头)、桥粒结构(青色箭头), 紧密连接结构(红色圆圈), 染色质凝集(蓝色圆圈)。

Fig. 4 Observation of colon tissue of rats by transmission electron microscopy in each group(5 000×, n=6)

Tight junctions(red arrows), autophagic vacuoles(green arrows), lysosomes(black arrows), mild dilatation of the endoplasmic reticulum(orang arrows), loss of microvilli(yellow arrows), mitochondrial swelling(blue arrows), desmosomes(cyan arrows), tight junction structures(red circles), chromatin condensation (blue circles).

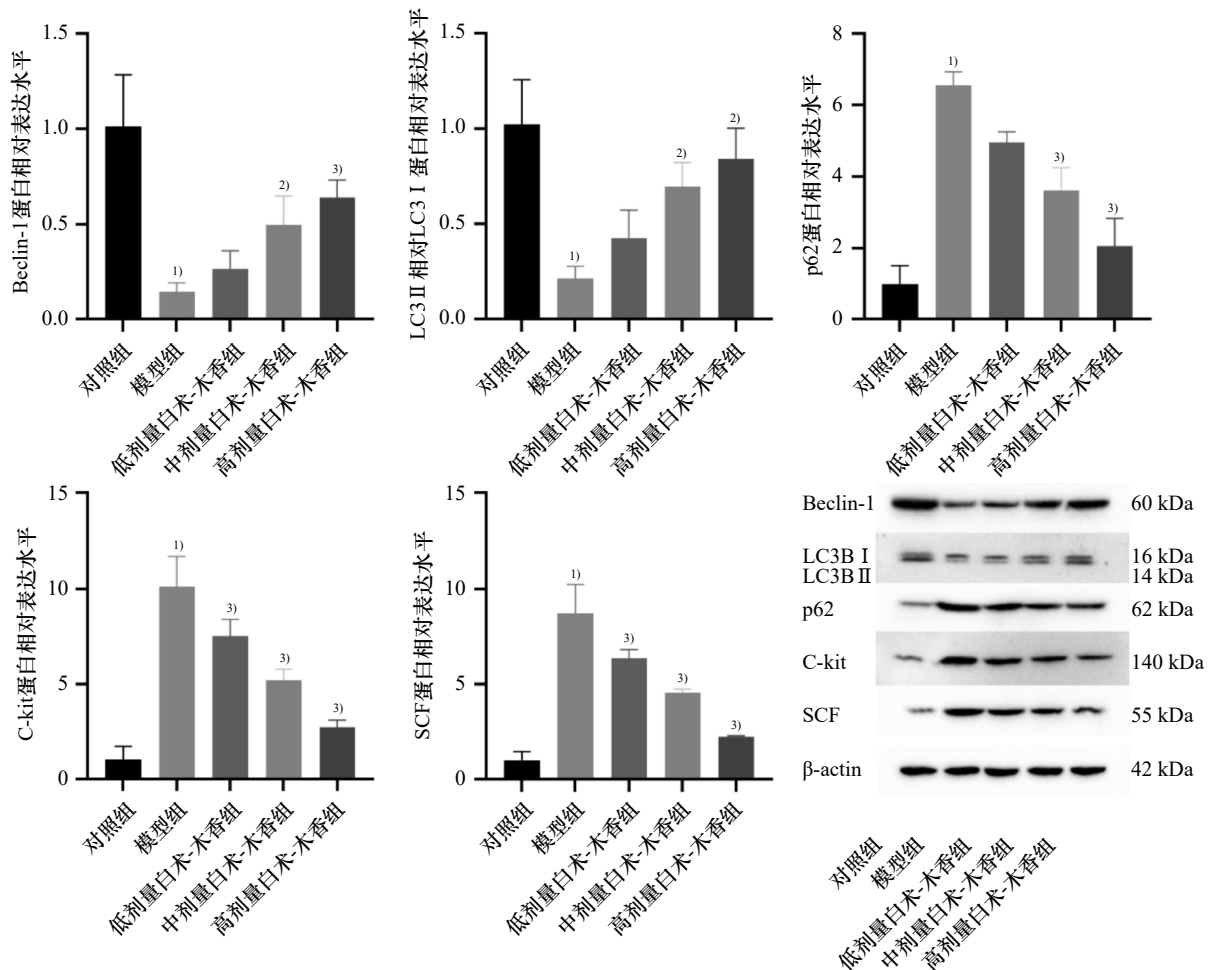


图5 各组大鼠结肠组织中自噬相关蛋白表达水平变化情况($\bar{x} \pm s$, n=6)

与对照组比较, ¹⁾P<0.01; 与模型组比较, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01。

Fig. 5 Changes in the expression levels of autophagy-related proteins in colon tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s$, n=6)

Compared with the control group, ¹⁾P<0.01; compared with the model group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01.

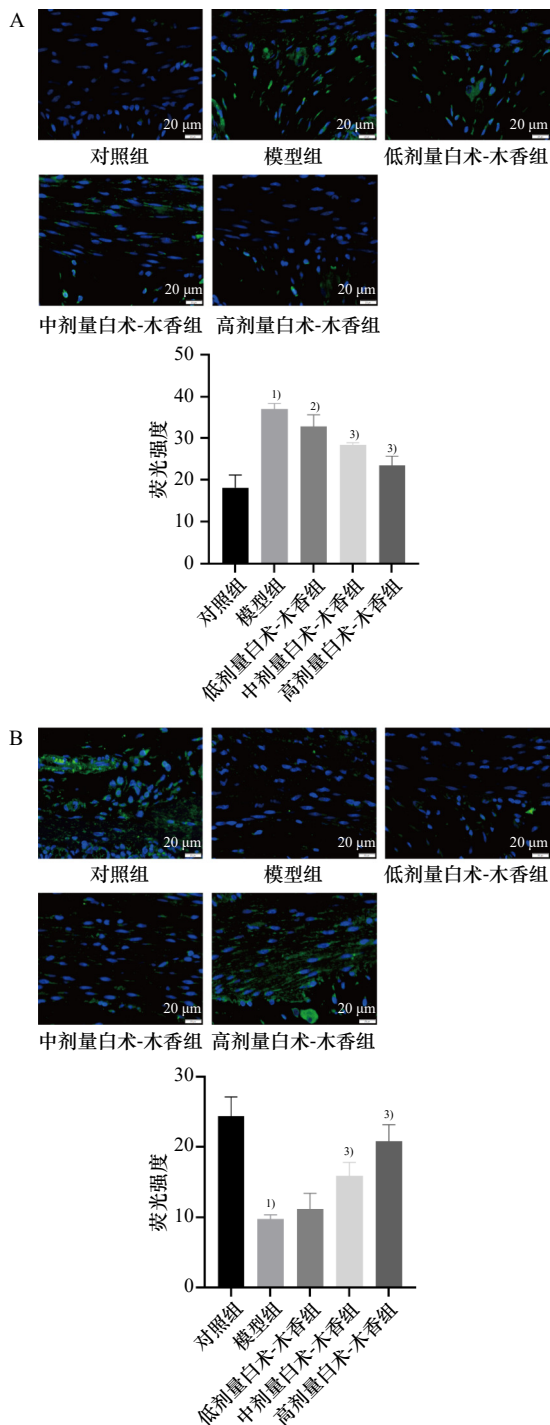


图6 免疫荧光染色检测各组大鼠结肠组织中 C-kit 及 LC3B 阳性表达 (40×, $\bar{x} \pm s, n=6$)

A-免疫荧光染色检测 C-kit; B-免疫荧光染色检测 LC3B; 蓝色荧光 (DAPI) 染色-细胞核, 绿色-目的蛋白阳性表达。与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Detection of C-kit and LC3B positive expression in colon tissue of rats in each group by immunofluorescence staining (20μm, 40×, $\bar{x} \pm s, n=6$)

A-C-kit was detected by immunofluorescence staining; B-LC3B was detected by immunofluorescence staining; blue fluorescence (DAPI) staining-nucleus; green-the positive expression of target protein. Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

模型组大鼠的粪便含水量及肠道运输速率大于对照组, AWR 最小容量低于对照组, 动物出现腹泻症状, 同时肠道蠕动加快, 内脏敏感性提高, 符合诊断标准中“腹泻型”, 由此说明脾虚型 IBS-D 模型大鼠构建成功, 与郭军雄等^[14] 使用痛泻要方治疗肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠肠道高敏感性的结果基本一致。而白术-木香治疗组大鼠粪便含水量、肠道运输速率及内脏敏感性均低于模型组, 且呈剂量依赖性。本研究结果还显示, 高剂量白术-木香水煎液对脾虚型 IBS-D 大鼠的治疗效果与阳性药匹维溴铵基本一致, 匹维溴铵是治疗 IBS 的常用药, 主要通过干预钙离子缓解胃肠道紊乱现象, 从而恢复肠道功能, 缺点是作用时间短, 经常出现停药复发的现象^[15-16]。结合液相-质谱的结果, 白术-木香水煎液中存在去氢木香内酯、木香烃内酯等木香的有效成分, 苍术苷 A 和白术内酯 II 等白术有效成分, 这些成分都有可能是白术-木香水煎液抑制脾虚型 IBS-D 大鼠肠道炎症, 恢复肠道稳态的关键。同时本研究还发现白术-木香水煎液中含有了如苯丙氨酸、色氨酸等氨基酸以及吡啶乙酸等氨基酸分解产物, 推测是白术与木香中有效成分相互反应的结果, 这些氨基酸以及分解产物对胃肠道运动异常、高敏感性与高炎症反应均有良好的缓解作用^[17-19], 因为氨基酸的代谢属于机体必要环节, 具有调节肠道微生物稳态的能力, 相较于钙离子调控风险更小, 在药效基本一致的情况下, 白术-木香在治疗 IBS 方面可能具有取代匹维溴铵的潜力。

肠道运动异常是 IBS-D 的重要病理机制之一。IBS-D 会使得能够控制胃肠道平滑肌运动的 ICC 数量增加, ICC 会引起胃肠蠕动加快, 粪便含水量增加且稀便率更高^[20]。ICC 是结肠慢波的起搏细胞, 对胃肠动力具有调控作用^[21]。ICC 的生长和发育依赖于干细胞因子/酪氨酸激酶受体 (SCF/C-kit) 信号调节系统, 并通过上调神经传递对其信号作出反应^[12]。C-kit 主要表达于 ICC 中, 是可以反映 ICC 的变化及存在的生物学标志物。SCF 是 C-kit 的天然配体, SCF 及 C-kit 共同参与维持 ICC 表型和发育功能。研究显示, IBS 内脏高敏感性与 ICC 中的 SCF/C-kit 信号通路参与调节肠道运动有关^[22]。

内脏高敏感性会使得内脏疼痛的阈值降低, 对生理性刺激产生不适感的反应强烈, 是 IBS 的

基础病理机制之一。研究发现，自噬作为一种细胞内稳态机制，参与胃肠道的发病机制及内脏高敏感性的形成^[23]。对于 IBS-D 来说，促进自噬可以升高疼痛阈值，降低肠道对疼痛的敏感性^[24]。徐卓妮^[25]的研究证明，疏肝健脾方通过调节自噬平衡，维持肠道稳态从而发挥治疗 IBS-D 的作用。夏利显等^[26]的实验结果显示，痛泻要方可能通过诱导细胞自噬，降低内脏高敏感性而发挥治疗 IBS-D 的效果。本研究结果显示，模型组大鼠结肠组织 SCF 及 C-kit 表达水平显著高于对照组，而白术-木香组大鼠结肠组织中 SCF 及 C-kit 表达水平低于模型组，说明脾虚型 IBS-D 模型大鼠结肠组织中 ICC 数量增加，经白术-木香治疗后 ICC 数量趋于减少。同时，模型组大鼠 ICC 自噬水平低于对照组，白术-木香组大鼠 ICC 自噬水平高于模型组，说明白术-木香煎液通过促进自噬缓解了脾虚型 IBS-D 大鼠结肠高敏感性疼痛状况，与王晓鹏等^[27]使用枳实-白术调节线粒体自噬改善慢传输型便秘大鼠结肠动力障碍的结果相似，同时研究发现去氢木香内酯和木香炔内酯均有调节细胞自噬的能力^[28-29]，而去氢木香内酯、木香炔内酯、苯丙氨酸和色氨酸在与自噬相关的脾虚型 IBS 研究中还未见报道，这可能是笔者所在团队接下来的研究重点。

综上所述，白术-木香可能是通过诱导 ICC 自噬，从而降低脾虚型 IBS-D 大鼠肠道高敏感性及运输速率，最终改善腹泻症状。较高剂量的白术-木香具有治疗脾虚型 IBS-D 的作用，具体机制及临床疗效仍待进一步探究。

REFERENCES

[1] 郑雪, 智沐君, 赵俐黎, 等. 基于 5-HT 通道探讨天灸法治疗内脏高敏感性肠易激综合征小鼠的机制[J]. 中国针灸, 2022, 42(7): 773-778.
ZHENG X, ZHI M J, ZHAO L L, et al. Effect mechanism of blistering moxibustion on visceral hypersensitivity of irritable bowel syndrome in mice based on 5-HT signal pathway[J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2022, 42(7): 773-778.

[2] 孙晗, 武侠. 成人肠易激综合征患者肠道菌群特征与不同分型患者生活质量和精神症状的相关性[J]. 中华消化病与影像杂志(电子版), 2023, 13(6): 461-465.

[3] SEBASTIÁN DOMINGO J J. Irritable bowel syndrome[J]. Med Clínica Engl Ed, 2022, 158(2): 76-81.

[4] 刘倩, 韩博宇, 苏晓兰, 等. 三种脾肾阳虚证腹泻型肠易激综合征大鼠模型的比较[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(8): 959-965.

LIU Q, HAN B Y, SU X L, et al. Comparison of three types of diarrhea predominant IBS rat model with pi-Shen Yang deficiency syndrome[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2021, 41(8): 959-965.

[5] 张文静. 中药复方治疗腹泻型肠易激综合征的 Meta 分析及用药规律挖掘[D]. 西宁: 青海大学, 2022.
ZHANG W J. Meta-analysis and medication rules of traditional Chinese medicine compound treatment for diarrhea-type irritable bowel syndrome[D]. Xining: Qinghai University, 2022.

[6] 张全文, 冯硕, 夏世信. 参苓白术散治疗腹泻型肠易激综合征对症状、脑肠肽、IFN- γ 、IL-8 水平的影响[J]. 中药材, 2023, 46(4): 1030-1033.

[7] 张远哲, 黎豫川, 杨元凤, 等. 香砂六君子汤对脾虚型 IBS-D 大鼠肠道菌群及其代谢产物 SCFAs 的调节作用[J]. 中成药, 2024, 46(1): 272-277.

[8] 杜娟, 郭哲阳, 杨文亚, 等. 敦煌固本方对脾虚型肠易激综合征大鼠结肠黏膜肥大细胞、类胰蛋白酶以及 5-羟色胺的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2693-2696.
DU J, GUO Z Y, YANG W Y, et al. Effects of Dunhuang Guben Formula on colonic mast cells, trypsin and 5-HT in rats with spleen deficiency irritable bowel syndrome[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(6): 2693-2696.

[9] 杨清瑞, 胡泽玉, 杜晓泉, 等. 腹泻型肠易激综合征中医病证结合动物模型研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(12): 1981-1984.
YANG Q R, HU Z Y, DU X Q, et al. Review on disease and traditional Chinese medicine syndrome combined with animal model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2021, 27(12): 1981-1984.

[10] 陈小芬, 张馨月, 张涛, 等. 基于脑-肠轴的疏肝健脾方对 IBS-D 大鼠结肠-下丘脑-垂体 CREB、NGF、BDNF 的影响[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(2): 317-323.
CHEN X F, ZHANG X Y, ZHANG T, et al. Effects of Shugan Jianpi decoction on CREB, NGF and BDNF in colon hypothalamus pituitary of IBS-D rats based on brain-gut axis[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(2): 317-323.

[11] 贺雪云. 基于钙信号研究腹泻型肠易激综合征大鼠内脏高敏感和胃肠动力障碍的发生机制[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
HE X Y. Based on calcium signaling to study the mechanism involved visceral hypersensitivity and gastrointestinal motility disorders in IBS-D rats[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022.

[12] AL-CHAER E D, KAWASAKI M, PASRICHA P J. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276-1285.

[13] WANG X J, CARLSON P, CHEDID V, et al. Differential mRNA expression in ileal mucosal biopsies of patients with diarrhea- or constipation-predominant irritable bowel syndrome[J]. Clin Transl Gastroenterol, 2021, 12(4): e00329.

[14] 郭军雄, 马丽, 葛生虎, 等. 痛泻要方对肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征大鼠肠道高敏感性的治疗作用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(10): 1283-1288.
GUO J X, MA L, GE S H, et al. Therapeutic effects of Tongxie Yaofang decoction on intestinal hypersensitivity of diarrhea

- predominant irritable bowel syndrome rats with liver-stagnation and spleen-deficiency pattern[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39(10): 1283-1288.
- [15] 冯南, 林鸿千, 郭义锦, 等. 参苓白术颗粒联合匹维溴铵对腹泻型肠易激综合征患者免疫功能和肠道菌群及脑肠肽的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2024, 32(3): 244-250.
FENG N, LIN H Q, GUO Y J, et al. Effects of Shenling Baizhu Granule combined with pivilium bromide on immune function, intestinal flora and brain intestinal peptide in irritable bowel syndrome with predominant diarrhea[J]. *Chin J Integr Tradit West Med Dig*, 2024, 32(3): 244-250.
- [16] 陈辉杰, 余晓红, 杨陈翔. 氟哌噻吨美利曲辛片联合匹维溴铵片与双歧杆菌三联活菌胶囊治疗腹泻型肠易激综合征的效果[J]. *临床合理用药*, 2024, 17(3): 82-85.
- [17] 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.
QIU Y C, HAN H W, ZHANG J W, et al. Exploring the mechanism of acupuncture and moxibustion inhibiting intestinal inflammatory reaction in IBS-D model rats based on metabolomics technology[J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2024, 17(3): 384-392.
- [18] 孙羽中, 潘伟娟, 窦志芳. 探讨肠易激综合征与色氨酸羟化酶和 5-羟色胺转运体之间联系[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(1): 83-86.
SUN Y Z, PAN W J, DOU Z F. Discussion of the association among irritable bowel syndrome and tryptophan hydroxylase and serotonin transporter[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2019, 21(1): 83-86.
- [19] 韩春明, 左琨, 王攀, 等. 高血压患者肠道代谢产物吲哚乙酸与肠道菌群失调的关系[J]. *中国心血管病研究*, 2021, 19(4): 324-329.
HAN C M, ZUO K, WANG P, et al. Relationship between intestinal flora and indole acetic acid in hypertensive patients[J]. *Chin J Cardiovasc Res*, 2021, 19(4): 324-329.
- [20] 王阳, 鲍晓蕾, 郎轶萱, 等. 实验性腹泻型肠易激综合征模型大鼠 Cajal 间质细胞改变对胃肠动力及 VIP 和 CGRP 水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(6): 1293-1296.
- [21] 郭心怡, 刘长兴, 黄雅慧. 针灸干预 SCF/c-kit 通路调控 Cajal 间质细胞治疗糖尿病胃轻瘫的研究进展[J]. *中国临床研究*, 2022, 35(7): 957-961,966.
GUO X Y, LIU C X, HUANG Y H. Research progress of acupuncture intervention on SCF/c-kit pathway regulating Cajal interstitial cells in treatment of diabetic gastroparesis[J]. *Chin J Clin Res*, 2022, 35(7): 957-961,966.
- [22] KONKIN D J, SUDDARDS C. Students' experiences of role, relationships and learning in two clerkship models[J]. *Med Educ*, 2017, 51(5): 490-497.
- [23] THEIN W, PO W W, CHOI W S, et al. Autophagy and digestive disorders: Advances in understanding and therapeutic approaches[J]. *Biomol Ther(Seoul)*, 2021, 29(4): 353-364.
- [24] 吴皓萌, 唐旭东, 王凤云, 等. 自噬对腹泻型肠易激综合征内脏高敏感性形成的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(12): 6261-6264.
WU H M, TANG X D, WANG F Y, et al. Mechanism of autophagy on the formation of visceral hypersensitivity in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(12): 6261-6264.
- [25] 徐卓妮. 从肠上皮细胞凋亡/自噬维持肠屏障完整参与 IBS-D 及疏肝健脾方药干预研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2019.
XU Z N. Study on Shugan Jianpi decoction for IBS-D mediated intestinal epithelial cells apoptosis/autophagy to maintain intestinal barrier[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2019.
- [26] 夏利显, 周娇俐, 梅丽俊, 等. 痛泻要方通过 PI3K-AKT 通路诱导细胞自噬治疗腹泻型肠易激综合征的机制[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(3): 468-471,504.
XIA L X, ZHOU J L, MEI L J, et al. The mechanism of Tongxie Yaofang in the treatment of diarrheal irritable bowel syndrome by inducing autophagy through PI3K-AKT pathway[J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2021, 16(3): 468-471,504.
- [27] 王晓鹏, 杨会举, 孙明明, 等. 枳实-白术调节 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬改善慢传输型便秘大鼠结肠动力障碍[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(13): 45-53.
WANG X P, YANG H J, SUN M M, et al. Aurantii Fructus Immaturus, Atractylodis Macrocephalae Rhizoma, and their combination treat colonic motility disorders in rats with slow transit constipation via PINK1/parkin signaling pathway-mediated mitophagy[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(13): 45-53.
- [28] 李征, 蔡晓航, 李钢, 等. 去氢木香内酯通过 PI3K/Akt/mTOR 通路对鼻咽癌细胞自噬和凋亡的影响及机制[J]. *广东药科大学学报*, 2023, 39(1): 100-105.
LI Z, CAI X H, LI G, et al. Effects and mechanism of dehydrocostuslactone on autophagy and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells via PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2023, 39(1): 100-105.
- [29] 刘丹, 刘明, 金良友, 等. 木香羟内酯抗肿瘤活性研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2023, 28(10): 1168-1176.
LIU D, LIU M, JIN L Y, et al. Research progress on the antitumor activity of costunolide[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2023, 28(10): 1168-1176.

收稿日期: 2023-10-20
(本文责编: 曹粤锋)