痛泻要方通过调控肠道菌群-ENS-MM串扰减轻IBS-D结肠运动亢进的机制研究Δ

彭　龙*,马佳乐,尹艺璇,步　曦,赵双梅#(天津中医药大学第二附属医院消化科,天津　300250)

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2024)13-1605-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.13.11

摘　要　目的　探讨痛泻要方通过调控肠道菌群-肠神经系统(ENS)-肌层巨噬细胞(MM)串扰减轻腹泻型肠易激综合征(IBS-D)大鼠结肠运动亢进的作用机制。**方法**　将40只新生雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、中药组[痛泻要方2.68 g/(kg·d),以生药量计]、阳性对照组[双歧杆菌乳杆菌三联活菌片0.27 g/(kg·d)],每组10只。除对照组外,其余3组大鼠均采用母子分离+慢性束缚+番泻叶致泻法复制肝郁脾虚证型IBS-D模型。造模后,各药物组大鼠灌胃相应药液,每天1次,持续2周。于造模结束时和给药后观察各组大鼠的粪便性质(稀便出现率、稀便率)、结肠运动功能(小球排出时间)、内脏敏感性[不同压力下的腹部回缩反射(AWR)评分];于给药后检测各组大鼠血清脂多糖(LPS)浓度,结肠组织中骨形态生成蛋白2(BMP2)、集落刺激因子1(CSF1)、Toll样受体4(TLR4)蛋白的表达和分布情况,以及肠道菌群的多样性、物种组成及差异。**结果**　造模结束时,除对照组外的其余3组大鼠均100%出现稀便,稀便率和各压力下的AWR评分均较对照组显著升高,小球排出时间均较对照组显著缩短($P<0.01$或$P<0.05$)。中药组和阳性对照组大鼠的稀便出现率分别为20%、80%;中药组大鼠稀便率、各压力下的AWR评分、血清LPS浓度和结肠组织肌层中CSF1、TLR4蛋白的表达均较模型组显著降低;小球排出时间,结肠组织肌层中BMP2蛋白的平均光密度,Chao 1、Shannon、Faith's PD、Simpson均较模型组显著延长或升高($P<0.01$或$P<0.05$);厚壁菌门/拟杆菌门相对丰度比值由低到高依次为中药组、对照组、阳性对照组、模型组,中药组大鼠的肠道菌群物种组成更贴近于对照组,其优势菌属包括普雷沃氏菌属、布劳特氏菌属等。**结论**　痛泻要方能通过调节肠道菌群来调控肠道菌群-ENS-MM串扰关键蛋白BMP2、CSF1的表达,从而发挥减轻IBS-D大鼠结肠运动亢进的作用。

关键词　痛泻要方;腹泻型肠易激综合征;肝郁脾虚证型;肠道菌群-ENS-MM串扰;骨形态发生蛋白2;集落刺激因子1

Mechanism of Tongxie yaofang reducing colon hypermotility in IBS-D rats by regulating gut microbiota-ENS-MM crosstalk

PENG Long, MA Jiale, YIN Yixuan, BU Xi, ZHAO Shuangmei (Dept. of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of Tongxie yaofang reducing colon hypermotility in irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D) rats by regulating gut microbiota-enteric nervous system (ENS)-muscularis macrophages (MM) crosstalk. **METHODS** Forty newborn male SD rats were randomly divided into control group, model group, TCM group [Tongxie yaofang 2.68 g/(kg·d), calculated by raw material], and positive control group [Live combined bifidobacterium and lactobacillus tablets 0.27 g/(kg·d)], with 10 rats in each group. Except for the control group, the IBS-D model of liver stagnation and spleen deficiency syndrome was induced in the other 3 groups with the method of mother-child separation+chronic restraint+Folium Sennae-induced diarrhea. After modeling, the administration groups were given relevant drug liquid intragastrically, once a day, for consecutive 2 weeks. At the end of modeling and after administration, the fecal properties (the incidence and the rate of loose stools), colonic motility (colon emptying time), and visceral sensitivity [abdominal withdrawal reflex (AWR) scores under different pressures] of rats were observed in each group. The concentration of lipopolysaccharide (LPS) in serum was detected after medication, and the expressions and distribution of bone morphogenetic protein 2 (BMP2), colony stimulating factor 1 (CSF1) and Toll-like receptor 4 (TLR4) in colon tissue were detected; the diversity, species composition and differences of gut microbiota were also determined. **RESULTS** At the end of modeling, compared with the control group, all rats of the other three groups suffered from loose stools (100%), the rate of loose stools and AWR scores at different pressures increased significantly, and colon emptying time was shortened significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). The incidences of loose stools were 20% in TCM group and 80% in the positive control group; the rate of loose stools and AWR scores at different pressures, serum concentration of LPS and protein expressions of CSF1 and TLR4 in muscle layer of colon tissue in TCM group significantly decreased, compared with the model group; colon emptying time, the average optical density of BMP2 protein in muscle layer of colon tissue, and the indexes of Chao 1, Shannon and Faith's PD and Simpson index of rats in TCM group were all prolonged or increased significantly, compared with the model group ($P<0.01$ or $P<0.05$). The relative abundance ratio of Firmicutes/

Δ**基金项目** 天津市教委科研计划项目(No.2021KJ152)

＊**第一作者** 主治医师。研究方向:中医药防治慢性脾胃病。E-mail:772699670@qq.com

＃**通信作者** 主任医师。研究方向:中医药防治功能性胃肠病。E-mail:aiwangzi312@163.com

Bacteroidetes, from low to high, was in the order of TCM group, control group, positive control group and model group; the species composition of gut microbiota in TCM group was closer to control group, with dominant bacterial genera including *Prevotella* and *Blautia*. **CONCLUSIONS** Tongxie yaofang can regulate the expressions of BMP2 and CSF1, the key proteins of gut microbiota-ENS-MM crosstalk, by changing the gut microbiota, thus alleviating the abnormal hyperfunction of colon motility in IBS-D rats.

KEYWORDS Tongxie yaofang; irritable bowel syndrome with diarrhea; liver stagnation and spleen deficiency syndrome; gut microbiota-ENS-MM crosstalk; bone morphogenetic protein 2; colony stimulating factor 1

肠易激综合征（irritable bowel syndrome，IBS）是临床常见的功能性胃肠道疾病，根据患者排便习惯分为便秘型、腹泻型、混合型、不定型4种亚型。研究发现，亚洲人群IBS的患病率为9.6%，高于全球平均水平（8.8%）[1]；其中，腹泻型肠易激综合征（irritable bowel syndrome with diarrhea，IBS-D）在我国较为常见[2]。IBS-D的发病原因及病理生理机制涉及神经、内分泌、免疫等多个系统，但尚未完全阐明[3]。研究指出，胃肠道动力异常特别是结肠平滑肌收缩模式改变对IBS-D的发生尤为关键：M2表型肠肌层巨噬细胞（muscularis macrophages，MM）分泌的骨形态生成蛋白2（bone morphogenetic protein 2，BMP2）可通过调控肠神经元的功能来改变结肠平滑肌的收缩模式，MM的表型及其增殖、活化受到多种因素[包括肠道菌群病理产物脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）、肠神经系统（enteric nervous system，ENS）分泌的集落刺激因子1（colony stimulating factor 1，CSF1）等]的影响，同时MM与肠神经元间的串扰与胃肠道运动有关，并受肠道菌群驱动[4]。由此可见，肠道菌群- ENS-MM串扰可能与IBS-D结肠运动功能异常有关。

中医将IBS-D归为泄泻病。《肠易激综合征中医诊疗专家共识意见（2017）》指出，脾胃虚弱和肝失疏泄是IBS发病的重要环节，肝郁脾虚是导致IBS发生的重要病机，而传统经方痛泻要方为治疗肝郁脾虚证型IBS-D的首选方[5]。该方由白芍、炒白术、陈皮、防风组成，具有补脾柔肝、祛湿止泻的功效，临床疗效确切，其治疗作用的发挥可能与抑制细胞凋亡、调节肠道菌群、改善肠道通透性、增强肠黏膜屏障功能等有关[6]，但该药改善结肠运动功能异常的具体机制尚不明确。基于此，本研究拟基于肠道菌群-ENS-MM串扰，初步探讨痛泻要方对肝郁脾虚证型IBS-D大鼠结肠运动功能的调控机制，以期为该方治疗IBS-D提供理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本实验主要仪器包括DYY-6C型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）、ChampChemi® 610 plus型全自动化学发光/多色荧光/凝胶成像分析系统（北京赛智创业科技有限公司）、CKX43-LP型显微镜（日本Olympus公司）、FLx800型荧光分析仪（美国BioTek公司）、2100型生物分析系统[安捷伦科技（上海）有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

番泻叶、白芍、炒白术、陈皮、防风饮片由天津中医药大学第二附属医院中药饮片房提供，经该院药学部运乃茹主任药师鉴定均为真品；双歧杆菌乳杆菌三联活菌片（国药准字S19980004，批号202204271，规格0.5 g/片）购自内蒙古双奇药业股份有限公司；大鼠LPS结合蛋白酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号F3522-B）购自上海科兴生物科技有限公司；伊红染液（批号20230216）、苏木精染液（批号20230228）、鼠β微管蛋白（β-tubulin）抗体（批号TA-10）、辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔免疫球蛋白G（IgG）二抗（批号ZB-2301）、HPR标记的羊抗鼠IgG二抗（批号ZB-2305）均购自北京中杉金桥生物科技有限公司；牛血清白蛋白（批号4240GR100）购自德国BioFroxx公司；兔BMP2抗体（批号PB9687）购自美国Boster公司；兔CSF1抗体（批号ab233387）购自英国Abcam公司；鼠Toll样受体4（Toll-like receptor 4，TLR4）抗体（批号66350-1-1G）购自武汉三鹰生物技术有限公司；基因组DNA提取试剂盒（批号M5635-02）购自美国Omega Bio-Tek公司；dsDNA定量试剂盒（批号P7589）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；DNA建库试剂盒（批号20015964）购自美国Illumina公司。

1.3 实验动物

雌性SPF级SD孕鼠，孕期（18±2）d，购自北京华阜康生物科技股份有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2020-0004。所有动物均饲养于SPF级动物实验室（温度20～26 ℃，相对湿度40%～70%，通风15次/h，每12 h光照/黑暗交替），自由进食、饮水。所有实验操作均遵循天津市医学实验动物保护中心相关指导原则，实验方案经易生源基因科技（天津）有限公司实验动物伦理委员会批准（编号YSY-DWLL-2022122）。

2 方法

2.1 药液的配制

番泻叶浸泡5 h后水煎8 min，浓缩成1 g/mL（以生药量计）的药液，备用[7]。

依据《丹溪心法》，取炒白术、白芍、陈皮、防风饮片，按质量比6∶4∶3∶2混合，洗净后浸泡40 min，水煎30 min×2次，合并水煎液，浓缩成0.268 g/mL（以生药量计）的痛泻要方药液，备用[7]。

将双歧杆菌乳杆菌三联活菌片用水配制成0.027 g/mL的益生菌混悬液，备用。

2.2 分组与造模

待雌性SD孕鼠分娩后，随机选取40只新生雄性SD大鼠分为对照组、模型组、中药组、阳性对照组，每组10只。除对照组外，其余组均参照相关文献方法[8]建立肝郁脾虚证型IBS-D模型——（1）母子分离应激：于出生后第2～14天每天上午9：00－12：00，将新生大鼠与母鼠分离3 h，然后与母鼠共同饲养至第24天断奶；（2）束缚应激：断奶后，将新生大鼠单笼正常喂养，待长至8周龄时，采用束缚器于每天上午9：00－12：00对其进行制动束缚应激，连续3周；（3）叠加致泻因素：在束缚应激2周后，叠加灌胃番泻叶药液[4.5 g/（kg·d），以生药量计，剂量参考相关文献[7]]，每天1次，连续2周。对照组新生大鼠不进行上述操作，于第24天断奶，单笼正常喂养至其余3组造模结束。第12周，参照相关文献[8]及本课题组前期实验方法，通过检测大鼠粪便性质、结肠运动功能、内脏敏感性来判断肝郁脾虚证型IBS-D模型是否复制成功（由于在结肠运动功能、内脏敏感性实验中，模型组有4只大鼠因操作不当造成结肠黏膜损伤，无法进行后续检测，故并未纳入数据统计；其余组别均平行剔除4只）。

2.3 药物干预

造模后，参照相关文献[7]方法折算痛泻要方的剂量，中药组大鼠灌胃痛泻要方药液2.68 g/（kg·d）（以生药量计）；根据双歧杆菌乳杆菌三联活菌片药品说明书推荐的成人用量（6 g/d）以及人和动物体表面积折算等效剂量，阳性对照组大鼠灌胃益生菌混悬液0.27 g/（kg·d）；对照组和模型组大鼠灌胃等体积水；每天1次，持续2周。

2.4 样本采集与处理

末次给药结束前2 d，收集各组大鼠24 h粪便，于－80 ℃保存，备用。末次给药结束第2天（完成相关实验后），采集尾静脉血0.5 mL，静置2 h后，于4 ℃下以3 000 r/min离心15 min，得血清；随后，大鼠经二氧化碳麻醉后以颈椎脱臼法处死，迅速打开腹腔，截取近端结肠组织2段（每段长3 cm），其中一段用生理盐水洗净后置于冻存管中，经液氮冷冻后于－80 ℃下储存，备用；另一段置入10%中性甲醛溶液中固定，备用。

2.5 相关指标检测

2.5.1 粪便性质

分别于造模结束及末次给药结束前2 d统计各组大鼠的稀便率及稀便出现率，具体方法如下——（1）稀便率：参考相关文献[8]，将各组大鼠单笼饲养，于笼底垫置滤纸，统计其末次灌胃后6 h内的排便总数和稀便数（干稀便的区分以滤纸上有无污迹为标准），计算稀便率[稀便率（%）＝稀便数/总排便粒数（若0.5 h内无排便自动计1）×100%]。（2）稀便出现率：记录大鼠出现稀便的情况，计算稀便出现率[稀便出现率（%）＝出现稀便大鼠数/总大鼠数×100%]。

2.5.2 结肠运动功能

采用肠道转运功能实验[8]，分别于造模结束及末次给药结束前1 d，各组大鼠禁食、不禁水24 h，以2%异氟烷混合纯氧诱导麻醉后取直径为3 mm的玻璃小球沿肛门放入距肛门3 cm的肠道内，然后单笼饲养，待大鼠完全苏醒（以大鼠能自由翻身、爬起活动为标准）后开始计时，记录大鼠直肠内玻璃小球排出时间。实验期间完全禁食水。

2.5.3 内脏敏感性

分别于造模结束及末次给药结束第2天，各组大鼠禁食、不禁水12 h，进行直肠气囊扩张术（colon rectal distension，CRD），即将自制的气囊涂抹石蜡油后塞进大鼠肛门内约6 cm，然后将其放入透明塑料箱中适应5 min，用血压计向气囊内缓慢加压，记录其在20、40、60、80 mmHg（1 mmHg＝0.133 kPa）压力下的腹部回缩反射（abdominal withdrawal reflex，AWR）评分，每个压力条件平行检测3次取平均值，每次测量间隔5 min。AWR评分标准如下——0分：大鼠在接受直肠扩张时无行为学反应；1分：身体静止不动，头部运动减少；2分：大鼠腹部肌肉轻微收缩，腹部不抬离平面；3分：腹肌强烈收缩，腹部抬离平面；4级：骨盆抬起，身体呈弓形[9]。

2.5.4 血清LPS浓度

取“2.4”项下各组大鼠血清样品，按相应试剂盒说明书方法操作，采用ELISA法以荧光分析仪检测其血清LPS浓度。

2.5.5 结肠组织中BMP2、CSF1、TLR4蛋白的表达及分布

采用Western blot法检测大鼠结肠组织中BMP2、CSF1、TLR4蛋白的表达情况。取“2.4”项下冻存的各组大鼠结肠组织适量，匀浆后，加入RIPA裂解液提取总蛋白，以BCA法进行蛋白定量，并于95 ℃下加热变性10 min。取变性蛋白适量，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转膜，封闭；加入BMP2、CSF1、TLR4、β-tubulin一抗（稀释度均为1∶1 000），4 ℃下孵育过夜；TBST缓冲液洗膜后，加入相应二抗（稀释度均为1∶5 000），室温下孵育1 h；加入ECL化学发光试剂，室温下反应1～2 min后成像。以β-tubulin为内参，采用Image J软件分析目的蛋白的表达水平，结果以对照组为参照进行归一化处理。

采用免疫组化法检测大鼠结肠组织中BMP2、CSF1、TLR4蛋白的分布情况。取“2.4”项下各组大鼠经固定的结肠组织，经脱水、浸蜡、包埋后，制成石蜡切片。切片经脱蜡水化后，行抗原修复、羊血清白蛋白封闭等操作，加入BMP2、CSF1、TLR4一抗（稀释度分别为1∶200、1∶500、1∶200），4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释度均为1∶100），室温下孵育20 min；以DAB显色、苏木精复染后，使用显微镜观察各蛋白的分布情况。选取包含完整结肠肌层的视野，使用Image J软件分析各蛋白阳性表达区域（棕色）的平均光密度值，以表示其表达情况。

2.5.6　粪便菌群分析

采用微生物16S rRNA高通量测序技术对粪便菌群进行分析，具体检测由苏州帕诺米克斯生物医药科技有限公司完成，主要包括以下步骤：取“2.4”项下各组大鼠的粪便样品适量，以十六烷基三甲基溴化铵法提取其总DNA，评估其浓度和完整性后，以此为模板，应用特定PCR引物（515正向引物为5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′，806反向引物为5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′）对细菌16S rRNA V4区进行扩增。取所得扩增产物25 μL，经纯化、回收、定量后，构建微生物多样性测序文库，并在MiSeq平台上以PE250策略进行测序。对测序结果进行质量评价后，使用QIIME2平台对各组大鼠粪便样品中的微生物菌群进行如下分析——（1）Alpha多样性分析：包括丰度指数Chao 1，多样性指数Shannon、Simpson，进化多样性指数Faith’s PD，均匀度指数Pielou’s evenness，覆盖度指数Good’s coverage；（2）物种组成分析：包括门水平下菌群物种组成结构、距离矩阵与主坐标分析（principal co-ordinates analysis，PCoA）；（3）物种差异分析：通过LEfSe分析[即将非参数Kruskal-Wallis、Wilcoxon秩和检验与线性判别分析（linear discriminant analysis，LDA）效应量相结合的分析手段]，以LDA效应量＞2及P＜0.05为标准[10]筛选优势菌属。

2.6　统计学方法

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布且方差齐的计量资料以$\bar{x}\pm s$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LSD-t检验；不符合正态分布或方差不齐的计量资料以$M(P_{25},P_{75})$表示，采用Kruskal-Wallis秩和检验。检验水准α=0.05。

3　结果

3.1　模型评价

造模结束时，对照组大鼠无稀便出现，其余3组大鼠均100%出现稀便，稀便率显著高于对照组（P＜0.01），小球排出时间均显著短于对照组（P＜0.01），各压力下的AWR评分均显著高于对照组（P＜0.01）。结果见表1、表2。

表1　造模结束时各组大鼠稀便出现率、稀便率、小球排出时间比较（n=6）

组别	稀便出现率/%	稀便率[$M(P_{25},P_{75})$]/%	小球排出时间（$\bar{x}\pm s$）/s
对照组	0	0	464.50±23.50
模型组	100	35.42(25.00,40.71)[a]	168.50±33.51[a]
中药组	100	33.33(31.25,40.71)[a]	139.67±29.53[a]
阳性对照组	100	38.75(33.33,40.00)[a]	155.17±42.07[a]

a：与对照组比较，P＜0.01。

3.2　痛泻要方对大鼠粪便性质、结肠运动功能、内脏敏感性的影响

与对照组比较，模型组大鼠稀便出现率为100%，稀便率显著升高，小球排出时间显著缩短，各压力下的AWR评分均显著升高（P＜0.01）。经药物干预后，与模型组比较，中药组和阳性对照组大鼠的稀便出现率分别为20%、80%，中药组大鼠稀便率和各压力下的AWR评分均显著降低，各药物组大鼠的小球排出时间均显著延长（P＜0.01或P＜0.05）。结果见表3、表4。

表2　造模结束时各组大鼠不同压力下AWR评分比较[$M(P_{25},P_{75})$，n=6，分]

组别	20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
对照组	0(0,0.25)	1.00(0.75,1.00)	2.00(1.75,2.00)	3.00(3.00,3.00)
模型组	1.50(1.00,2.00)[a]	2.00(2.00,3.00)[a]	3.50(3.00,4.00)[a]	4.00(4.00,4.00)[a]
中药组	1.00(1.00,1.00)[a]	2.00(1.75,3.25)[a]	3.50(3.00,4.00)[a]	4.00(3.75,4.00)[a]
阳性对照组	1.00(1.00,2.00)[a]	2.00(2.00,3.00)[a]	3.50(3.00,4.00)[a]	4.00(3.75,4.00)[a]

a：与对照组比较，P＜0.01。

表3　给药后各组大鼠稀便出现率、稀便率、小球排出时间比较（n=6）

组别	稀便出现率/%	稀便率[$M(P_{25},P_{75})$]/%	小球排出时间（$\bar{x}\pm s$）/s
对照组	0	0	450.33±27.19
模型组	100	35.42(31.25,40.00)[a]	144.50±30.72[a]
中药组	20	0(0,6.25)[b]	456.50±20.36[b]
阳性对照组	80	10.00(0,23.33)	238.17±30.29[c]

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。

表4　给药后各组大鼠不同压力下AWR评分比较[$M(P_{25},P_{75})$，n=6，分]

组别	20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
对照组	0(0,0)	1.00(1.00,2.00)	2.00(1.75,2.25)	3.00(2.75,3.00)
模型组	2.00(1.00,2.00)[a]	3.00(2.00,3.00)[a]	3.00(2.75,4.00)[a]	4.00(4.00,4.00)[a]
中药组	0.00(0.00,1.00)[b]	1.00(1.00,1.25)[b]	2.00(1.00,2.25)[c]	3.00(2.75,3.25)[b]
阳性对照组	1.00(1.00,2.00)	2.50(1.75,3.00)	3.50(2.75,4.00)	4.00(3.75,4.00)

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。

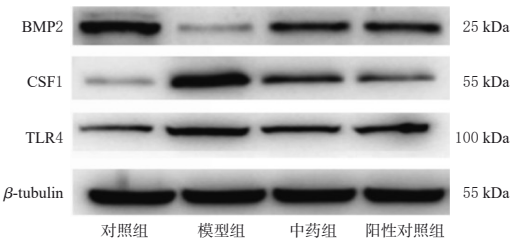
3.3　痛泻要方对大鼠血清LPS浓度的影响

与对照组[（80.37±4.97）ng/L]比较，模型组大鼠血清LPS浓度[（92.03±3.90）ng/mL]显著升高（P＜0.01）；经药物干预后，与模型组比较，中药组和阳性对照组血清LPS浓度[（80.38±4.54）、（78.53±2.72）ng/mL]均显著降低（P＜0.01）。

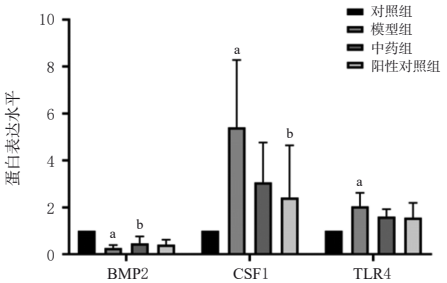
3.4　痛泻要方对大鼠结肠组织中BMP2、CSF1、TLR4蛋白表达及分布的影响

Western blot实验结果显示，与对照组比较，模型组大鼠结肠组织中BMP2蛋白的表达显著下调，CSF1、TLR4蛋白的表达显著增加（P＜0.01）；经药物干预后，与模型组比较，中药组大鼠结肠组织中BMP2蛋白的表达显著上调，阳性对照组大鼠结肠组织中CSF1蛋白的表达显著下调（P＜0.05）。结果见图1。

免疫组化实验结果显示，与对照组比较，模型组大鼠结肠组织肌层中BMP2蛋白的平均光密度显著下降，CSF1、TLR4蛋白的平均光密度显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，各药物组大鼠结肠组织肌层中BMP2蛋白的平均光密度均显著升高，CSF1、TLR4蛋白的平均光密度均显著下降（P＜0.05或P＜0.01）。结果见图2（以BMP2蛋白为例）、表5。



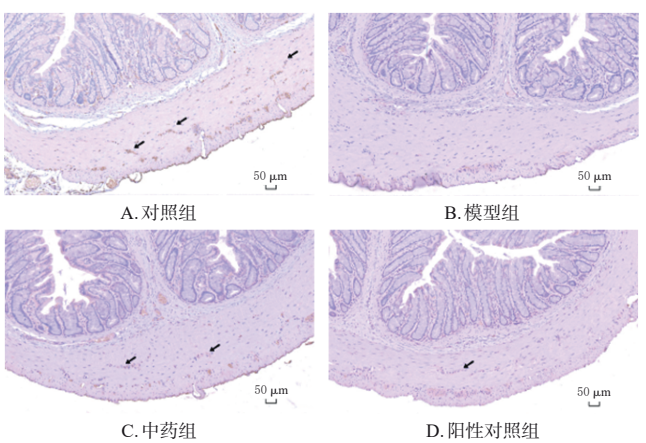
A. 电泳图



B. 柱形图($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

图1　各组大鼠结肠组织中BMP2、CSF1、TLR4蛋白表达情况比较（Western blot法）



A. 对照组　B. 模型组

C. 中药组　D. 阳性对照组

箭头：BMP2蛋白阳性表达区域。

图2　各组大鼠结肠组织肌层中BMP2蛋白分布情况的显微图（免疫组化法）

表5　各组大鼠结肠组织肌层中BMP2、CSF1、TLR4蛋白的平均光密度比较（$\bar{x}\pm s$, $n=6$）

组别	BMP2	CSF1	TLR4
对照组	0.145 0±0.026 0	0.004 4±0.003 3	0.068 7±0.008 2
模型组	0.001 4±0.000 2[a]	0.101 2±0.010 0[a]	1.100 4±0.059 2[a]
中药组	0.091 1±0.019 3[b]	0.051 4±0.005 5[b]	0.413 4±0.022 2[b]
阳性对照组	0.004 8±0.000 5[c]	0.047 0±0.006 2[b]	0.450 9±0.070 1[b]

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，$P<0.05$。

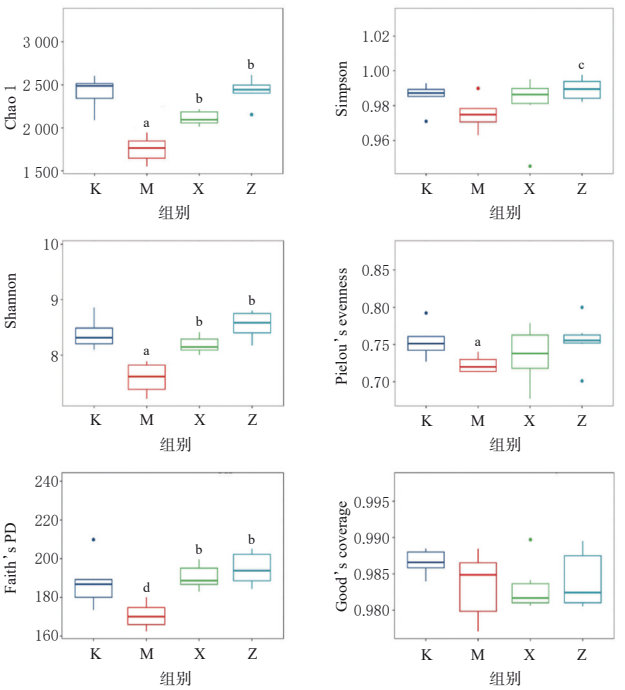
3.5　痛泻要方对大鼠粪便菌群的影响

3.5.1　测序结果质量分析

经过DADA2序列去噪后，共获得875 554条去噪序列，平均单个样本产生36 481条去噪序列。在97%的相似度水平下对序列进行聚类分析，所得稀释曲线显示，曲线随测序量的增加而趋于平缓，各样本的操作分类单元（operational taxonomic units，OUTS）不会随测序量的增加而增加，表明本研究所有样本序列充分，现有测序量能够覆盖样本中的绝大部分物种，所得数据可用于后续分析。

3.5.2　肠道菌群的Alpha多样性

与对照组比较，模型组大鼠的Chao 1、Shannon、Pielou's evenness、Faith's PD均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组比较，各药物组大鼠的Chao 1、Shannon、Faith's PD和中药组大鼠的Simpson均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；而各组大鼠的Good's coverage比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图3。



K：对照组；M：模型组；X：阳性对照组；Z：中药组；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：与对照组比较，$P<0.05$。

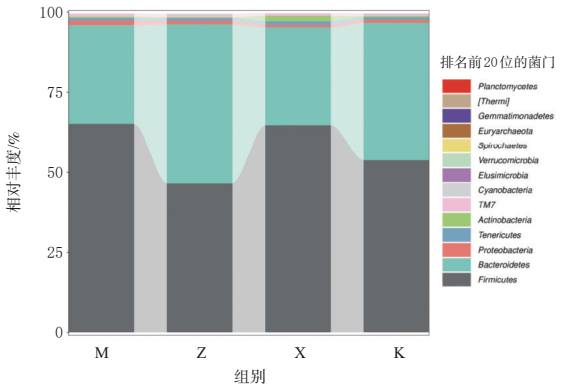
图3　各组大鼠肠道菌群Alpha多样性比较[$M(P_{25},P_{75})$, $n=6$]

3.5.3　肠道菌群的物种组成

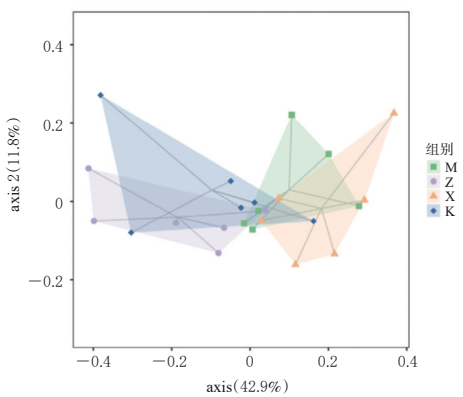
（1）门水平下菌群物种组成分析结果（图4A）显示，各组大鼠肠道菌群的物种组成均有所改变，其中厚壁菌门Firmicutes/拟杆菌门Bacteroidetes相对丰度比值的变化最为明显，该比值由低到高依次为中药组、对照组、阳性对照组、模型组。（2）PCoA结果（图4B）显示，模型组大鼠的肠道菌群物种组成与对照组差异明显，中药组更贴近于对照组，而阳性对照组更贴近于模型组。

3.5.4　肠道菌群的物种差异

由LEfSe分析的多级物种层级树图（图5）可见，在属水平下，对照组大鼠的优势菌属为罗氏菌属*Rothia*、葡萄糖菌属*Staphylococcus*、韦荣氏球菌属*Veillonella*、杆菌属*Aggregatibacter*；模型组大鼠的优势菌属为*Dorea*、*Erysipelotrichaceae.p_75_a5*、*Akkermansia*；阳性对照组大鼠的优势菌属为双歧杆菌属*Bifidobacterium*、拟杆菌属*Bacteroides*、*Turicibacter*、梭菌属*Clostridium*、*Roseburia*；中药组大鼠的优势菌属为普雷沃氏菌属*Prevotella*、布劳特氏菌属*Blautia*、*Phascolarctobacterium*。



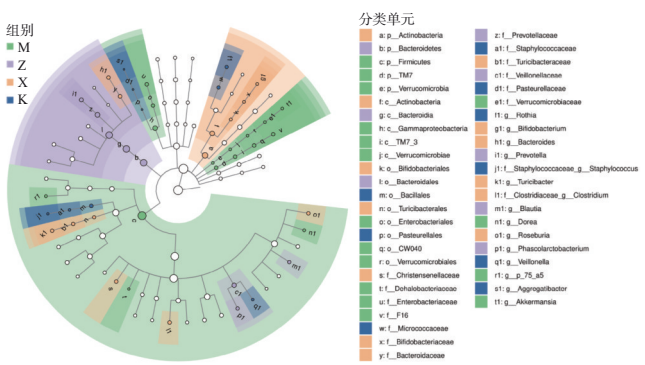
A.门水平下菌群物种组成分析



B. PCoA

K:对照组;M:模型组;X:阳性对照组;Z:中药组。

图4　各组大鼠肠道菌群的物种组成比较



K:对照组;M:模型组;X:阳性对照组;Z:中药组。

图5　各组大鼠肠道菌群的物种差异分析

4　讨论

痛泻要方最早载于《丹溪心法》,由白芍、炒白术、陈皮、防风组成,具有补脾柔肝、祛湿止泻之功。《医方考》将“痛泻”病机归为“泻责之脾,痛责之肝;肝责之实,脾责之虚,脾虚肝实,故令痛泻”。既往研究多着重于内脏敏感性,将“泻”归为致“痛”的原因[11],但从中医病机上分析,痛泻已成,则脾虚已存,故不能单纯认为痛泻要方的微观机制仅为疏肝止痛,还应包括健脾止泻。该方如何影响结肠平滑肌收缩功能,即如何健脾止“泻”的机制尚未明确。研究指出,肠道菌群-ENS-MM串扰可能参与了肠道运动功能的调节[4],因此本课题组推测,肠道菌群-MM-ENS串扰可能是痛泻要方治疗IBS-D的潜在靶点。双歧杆菌乳杆菌三联活菌片是临床常用的益生菌制剂,可通过调节肠道菌群而缓解IBS-D患者的部分症状[12],故本研究将其作为阳性对照药物。

肠道运动功能紊乱、大便质地改变、内脏敏感性升高是IBS-D的重要特征[8]。本研究结果显示,造模结束时,除对照组外,其余各组大鼠肠道运动亢进,大便溏薄,内脏敏感性明显升高,提示造模成功。经痛泻要方干预2周后,IBS-D大鼠的上述指标得以明显改善,提示该方干预有效。

肠道的收缩蠕动由肠组织固有肌层的环形平滑肌和纵行平滑肌协调收缩、松弛产生,且蠕动收缩的模式和频率受ENS的调控[13]。MM是一种存在于浆膜层、固有肌层的巨噬细胞。学者在体外拉伸诱导结肠环收缩实验中发现,MM耗竭后,小鼠结肠的收缩速度变快,频率升高;通过进一步的分析发现,MM可通过分泌BMP2而作用于肠神经元,从而发挥调控肠道蠕动的作用;同时该研究还指出,肠神经元分泌的CSF1能特异性促进MM的增殖、分化和存活[4]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组大鼠结肠组织中BMP2蛋白的表达显著下调,CSF1蛋白的表达显著上调,表明BMP2蛋白的下调可能影响了肠神经元对肠道运动的调节活性,阻止了结肠抑制性神经元的分化[14],并最终导致结肠运动亢进;而CSF1虽然能够促进MM的增殖、分化和存活[4],但是其促炎作用可引起肠道促炎因子表达水平升高,使MM趋于M1表型,从而导致M2表型MM分泌的BMP2减少[15]。本研究结果显示,痛泻要方能逆转IBS-D大鼠结肠组织中BMP2蛋白的表达,这可能是痛泻要方改善IBS-D结肠运动功能的核心机制。

本研究结果显示,与对照组比较,模型组大鼠肠道菌群结构发生显著改变,其厚壁菌门/拟杆菌门相对丰度比值升高,血清菌群病理产物LPS浓度显著升高,结肠组织中LPS炎症相关受体TLR4蛋白的表达显著上调,提示IBS-D大鼠存在肠道菌群紊乱,并引起LPS分泌增加,促进结肠炎症环境形成,与相关研究结果基本一致[16]。研究指出,LPS可通过TLR4蛋白来激活先天性免疫系统,从而引发炎症反应并诱导巨噬细胞M1极化,抑制M2极化,引起BMP2蛋白表达下调,从而导致结肠运动功能亢进[17]。而痛泻要方和双歧杆菌乳杆菌三联活菌片均能改变IBS-D大鼠的肠道菌群结构,不同程度地降低厚壁菌门/拟杆菌门相对丰度比值,并能显著降低血清LPS浓度,下调结肠组织中TLR4蛋白的表达,从而减轻炎症反应。这提示痛泻要方促进MM中BMP2蛋白的表达可能是通过调节肠道菌群、减轻肠道炎症来实现的。同时,中药组与阳性对照组的优势菌属有所不同,这可能是痛泻要方降低内脏敏感性、改善大便质地效果更佳的原因。例如,中药组大鼠优势菌属中的普雷沃氏菌属,其代谢产物次黄嘌呤可参与结肠黏膜、屏障功能的修复,对肠道菌群物种组成和粪便特征恢复有利[18]。

综上所述，痛泻要方能通过改变肠道菌群物种组成，降低血清LPS浓度和抑制ENS过表达CSF1蛋白，减轻肠道炎症，从而恢复MM中BMP2蛋白的正常表达，减轻结肠运动功能亢进，即通过调节肠道菌群来调控肠道菌群-ENS-MM串扰关键蛋白BMP2、CSF1的表达，从而发挥减轻IBS-D大鼠结肠运动亢进的作用。但肠道菌群-ENS-MM串扰受许多因素影响，需进一步探讨MM的表型变化、肠道菌群其他代谢物的动态变化以及肠神经元兴奋性改变等机制在痛泻要方治疗IBS-D中的作用。

参考文献

[1] SPERBER A D, DUMITRASCU D, FUKUDO S, et al. The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a Rome foundation working team literature review[J]. Gut, 2017, 66(6): 1075-1082.

[2] 熊理守，陈旻湖，陈惠新，等. 社区人群中肠易激综合征的症状学特征[J]. 胃肠病学，2004，9(5)：277-279.
XIONG L S, CHEN M H, CHEN H X, et al. Symptomatologic characteristics of irritable bowel syndrome in community population[J]. Chin J Gastroenterol, 2004, 9(5): 277-279.

[3] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组，中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 2020年中国肠易激综合征专家共识意见[J]. 中华消化杂志，2020，40(12)：803-818.
Collaborative Group of Gastrointestinal Functional Diseases, Chinese Society of Gastroenterology, Gastrointestinal Dynamics Group, Chinese Society of Gastroenterology. Chinese expert consensus of irritable bowel syndrome in 2020[J]. Chin J Dig, 2020, 6(12): 803-818.

[4] MULLER P A, KOSCSÓ B, RAJANI G M, et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility[J]. Cell, 2014, 158(5): 1210.

[5] 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)：1614-1620.
ZHANG S S, WEI W, YANG J Q. Consensus opinion of Chinese medicine diagnosis and treatment experts on irritable bowel syndrome: 2017[J]. J Tradit Chin Med, 2017, 58(18): 1614-1620.

[6] 李夏，王凤云，吴皓萌，等. 基于脑-肠互动功能探讨痛泻要方治疗腹泻性肠易激综合征机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(20)：229-234.
LI X, WANG F Y, WU H M, et al. Research progress on mechanism of Tongxie yaofang in treating diarrhea-predominate irritable bowel syndrome based on brain-gut interaction function[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(20): 229-234.

[7] 张北华，王微，王凤云，等. 痛泻要方干预腹泻型肠易激综合征肝郁脾虚证模型大鼠的效应评价[J]. 中华中医药杂志，2018，33(10)：4341-4346.
ZHANG B H, WANG W, WANG F Y, et al. Effects of Tongxie yaofang in treating IBS-D rats with syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(10): 4341-4346.

[8] 赵迎盼，唐旭东，卞兆祥，等. IBS-D肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的建立与评价的初步研究[J]. 中国中西医结合杂志，2013，33(11)：1507-1514.
ZHAO Y P, TANG X D, BIAN Z X, et al. Preliminary study of establishing and assessing IBS-D model rats of gan stagnation and pi deficiency syndrome[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2013, 33(11): 1507-1514.

[9] 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.

[10] LI Y F, GONG X L, CHEN S X, et al. Deviations in the gut microbiota of neonates affected by maternal group B *Streptococcus* colonization[J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1): 140.

[11] 程健，余莹，何君君. 腹泻型肠易激综合征中医“肝郁脾虚”本质的探讨与思考[J]. 中华中医药杂志，2020，35(11)：5698-5703.
CHENG J, YU Y, HE J J. Discussion and consideration on the essence of ‘stagnation of liver qi and spleen deficiency’ in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(11): 5698-5703.

[12] STAUDACHER H M, WHELAN K. Altered gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome and its modification by diet: probiotics, prebiotics and the low FODMAP diet[J]. Proc Nutr Soc, 2016, 75(3): 306-318.

[13] FURNESS J B. The enteric nervous system and neurogastroenterology[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(5): 286-294.

[14] REGO S L, RAGHAVAN S, ZAKHEM E, et al. Enteric neural differentiation in innervated, physiologically functional, smooth muscle constructs is modulated by bone morphogenic protein 2 secreted by sphincteric smooth muscle cells[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(4): 1251-1261.

[15] SCHNEIDER K M, BLANK N, ALVAREZ Y, et al. The enteric nervous system relays psychological stress to intestinal inflammation[J]. Cell, 2023, 186(13): 2823-2838.e20.

[16] XIAO L, LIU Q, LUO M, et al. Gut microbiota-derived metabolites in irritable bowel syndrome[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 729346.

[17] MOSSER D M, HAMIDZADEH K, GONCALVES R. Macrophages and the maintenance of homeostasis[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(3): 579-587.

[18] ZHAO Y, WU J F, LI J V, et al. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice[J]. J Proteome Res, 2013, 12(6): 2987-2999.

（收稿日期：2023-12-04　修回日期：2024-04-24）
（编辑：张元媛）