痛泻要方通过调控结肠TPH1、SERT及肠道菌群改善腹泻型肠易激综合征症状Δ

孙　锐[1*]，罗　婷[1]，谢海洋[1]，张　乐[1]，文　婧[2]，黄　山[2]，吴至久[1#]（1.川北医学院附属医院中西医结合肛肠科，四川 南充　637000；2.川北医学院临床医学院，四川 南充　637000）

中图分类号　R965；R574.4　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）18-2238-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.18.09

摘　要　目的　探讨痛泻要方调控结肠色氨酸羟化酶1（TPH1）、5-羟色胺转运体（SERT）及肠道菌群对腹泻型肠易激综合征（IBS-D）大鼠症状的影响。**方法**　将42只SD大鼠随机分为对照组（7只）和造模组（35只）。造模组大鼠采用0.45 g/L的番泻叶药液[10 mL/（kg·d）]灌胃联合慢性不可预知性应激的方法建立IBS-D模型。将造模成功的35只大鼠随机分为模型组、匹维溴铵组[15 mg/（kg·d）]和痛泻要方低、中、高剂量组[3.75、7.5、15 g/（kg·d），以生药量计]，每组7只。各药物组灌胃相应药液，每天1次，连续10 d。分别于造模前、造模后给药前、末次药物干预后评估各组大鼠的一般情况和体重变化情况；分别于造模后给药前、末次药物干预后检测其腹泻指数、内脏敏感性，观察其结肠组织病理变化，检测其结肠组织中5-羟色胺（5-HT）水平及蛋白表达情况和TPH1、SERT蛋白及mRNA的表达水平，并分析大鼠粪便样品中肠道菌群的多样性及物种组成变化。**结果**　各组大鼠结肠组织均未见明显病理改变。与模型组比较，各药物组大鼠一般情况改善；痛泻要方中、高剂量组大鼠的日均体重增长量显著增加，腹泻指数、内脏敏感性和结肠组织5-HT、TPH1表达均显著降低或减少，结肠组织SERT表达显著增加（$P<0.05$或$P<0.01$）；痛泻要方低剂量组大鼠腹泻指数、结肠TPH1蛋白表达、结肠5-HT蛋白阳性率均显著降低，SERT mRNA表达显著增加（$P<0.05$）；痛泻要方的干预效果有剂量依赖趋势。与模型组比较，痛泻要方高剂量组大鼠的Chao1指数、Shannon指数均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），厚壁菌门、乳酸杆菌属等有益菌显著增加，变形菌门、大肠杆菌属-志贺氏杆菌属、*Rikenellaceae*_RC9_gut_group等致病菌显著减少（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　痛泻要方可通过抑制结肠组织中TPH1的表达并上调SERT的表达来降低5-HT水平、改善肠道菌群紊乱，从而改善IBS-D大鼠症状。

关键词　痛泻要方；腹泻型肠易激综合征；5-羟色胺；色氨酸羟化酶1；5-羟色胺转运蛋白；肠道菌群

Improvement effects of Tongxie yaofang on irritable bowel syndrome with diarrhea by regulating colonic TPH1, SERT and intestinal flora

SUN Rui[1], LUO Ting[1], XIE Haiyang[1], ZHANG Le[1], WEN Jing[2], HUANG Shan[2], WU Zhijiu[1]（1. Anorectal Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China; 2. School of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of Tongxie yaofang (TXYF) on the symptoms of rats with irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D) by regulating colonic tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), serotonin transporter (SERT) and intestinal flora. **METHODS** Forty-two SD rats were randomly divided into control group (7 rats) and modeling group (35 rats). In modeling group, rat model of IBS-D was established by intragastrical administration of 0.45 g/L senna leaf solution [10 mL/(kg·d)] combined with chronic unpredictable stimulation. Thirty-five successfully modeled rats were randomly divided into model group, pinaverium bromide group [15 mg/(kg·d)] and TXYF low-dose, medium-dose and high-dose groups [3.75, 7.5, 15 g/(kg·d), calculated by crude drug], with 7 rats in each group. Each administration group was orally administered the corresponding drug, once a day, for 10 consecutive days. The general condition and weight changes of each group of rats were compared before modeling, after modeling and before administration, after the last drug intervention; the diarrhea index and visceral sensitivity were detected, and pathological changes of colon tissue were observed after modeling and before administration, after the last drug intervention. The level and expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT), protein and mRNA expressions of TPH1 and SERT were determined in colon tissue. The diversity and structural changes of fecal intestinal flora of rats were analyzed. **RESULTS** There was no significant change in colon histopathology in each group. Compared with model group, the general condition of rats in each medication group improved. The daily body weight gain of rats was significantly increased, while diarrhea index, visceral sensitivity, the expressions of 5-HT and TPH1 in colon tissue were significantly decreased; SERT expression of colon tissue was significantly increased in TXYF medium-dose and high-

Δ**基金项目**　四川省自然科学基金项目（No.S22018）

＊**第一作者**　医师，硕士。研究方向：中西医治疗肛肠疾病。E-mail：ruisun17@163.com

＃**通信作者**　教授，博士。研究方向：中西医治疗肛肠疾病。E-mail：wzj549nc@126.com

dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). The diarrhea index, colon TPH1 protein expression and colon 5-HT protein positive rate in the TXYF low-dose group decreased while the mRNA expression of SERT increased significantly ($P<0.05$). There was a dose-dependent trend in the effect of TXYF. Compared with model group, Chao1 index and Shannon index of the rats in TXYF high-dose group were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), the beneficial bacteria such as Firmicutes and *Lactobacillus* increased significantly, while the pathogenic bacteria such as Proteobacteria, *Escherichia-Shigella* and *Rikenellaceae*_RC9_gut_group decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** TXYF can decrease the level of 5-HT and improve intestinal flora disorder by inhibiting the expression of TPH1 and up-regulating the expression of SERT in colon tissue, thus promoting the symptoms of IBS-D rats.

KEYWORDS Tongxie yaofang; irritable bowel syndrome with diarrhea; 5-hydroxytryptamine; tryptophan hydroxylase 1; serotonin transporter; intestinal flora

肠易激综合征（irritable bowel syndrome，IBS）是一组持续或间歇发作的，以腹痛、腹胀、排便习惯和（或）粪便性状改变为临床表现的功能性肠道疾病[1]。流行病学研究表明，分别有5%的亚洲人群和10%～15%的欧洲、南美洲人群患有IBS，发病率逐年升高[2]。腹泻型肠易激综合征（irritable bowel syndrome with diarrhea，IBS-D）是IBS的主要亚型之一，以反复发作的腹痛、腹泻为主要临床表现，其发病机制尚不清楚，且缺乏特效治疗方案[3]。研究表明，胃肠功能障碍、内脏超敏反应、肠道菌群紊乱、免疫炎症、心理应激和神经内分泌异常均与IBS-D的发生密切相关[4]。“微生物群-肠-脑”轴信号中断可能是IBS-D的发病机制之一[5]。5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）是该信号轴中的重要神经递质之一，其水平升高可导致胃肠活动增多、内脏敏感性增加并引发腹泻，最终导致IBS-D发生[6]。5-HT的合成、分泌、再摄取过程受色氨酸羟化酶1（tryptophan hydroxylase 1，TPH1）、5-HT转运体（serotonin transporter，SERT）的调控[7]。此外，肠道菌群及其代谢物可通过“微生物群-肠-脑”轴来调控5-HT的合成与代谢，从而影响5-HT在肠道内的表达[8]。因此，针对5-HT合成、分泌、再摄取过程与肠道菌群的干预策略成为相关研究的热点。

由于现代医学对IBS-D的治疗尚存不足，使得中医药逐渐成为IBS-D治疗领域的新希望。痛泻要方出自朱丹溪的《丹溪心法》，由炒白术、炒白芍、炒陈皮、防风组成，是中医治疗泄泻病的常用方，具有补脾柔肝、祛湿止泻的功效[9]。研究证实，痛泻要方可通过调节脑组织中5-HT的表达来改善IBS-D症状[10]。本研究拟进一步探讨痛泻要方对IBS-D大鼠结肠TPH1、SERT及肠道菌群的改善作用，以期为中医药治疗IBS-D提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Sub-Cell GT型电泳仪、Mini-PROTEAN Tetra型蛋白电泳转印仪、iMark型酶标仪、ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad公司；BX53型正置显微镜购自日本Olympus公司；LC480Ⅱ型荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪购自瑞士Roche公司。

1.2 主要药品与试剂

番泻叶饮片（批号200305）购自川北医学院附属医院中药房，经川北医学院药学系李生茂教授鉴定为真品；痛泻要方组方药材颗粒剂——炒白术（批号22025451）、炒白芍（批号：22032771）、炒陈皮（批号22030251）、防风（批号22039011）均购自北京康仁堂药业有限公司；匹维溴铵对照品（批号P854595，纯度95%）购自上海麦克林生化科技有限公司；大鼠5-HT酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号ER1463）、辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔IgG二抗（批号FNSA-0004）均购自武汉菲恩生物科技有限公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒（批号PC0020）、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）试剂盒（批号P1200）均购自北京索莱宝科技有限公司；兔源SERT多克隆抗体（批号19559-1-AP）、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）多克隆抗体（批号60004-1-Ig）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；兔源TPH1多克隆抗体（批号BA1449）购自武汉博士德生物工程有限公司；兔源5-HT多克隆抗体（批号20R-2534）购自美国FII公司；免疫组化试剂盒（批号KIT-9710）购自福州迈新生物技术开发有限公司；mirVana™ RNA分离试剂盒、TransScript®一体化第一链cDNA合成试剂盒、PerfectStart® Green定量PCR试剂盒（批号分别为AM1561、AT341-2、AQ601）均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 实验动物

SPF级成年雄性SD大鼠，体重（200±20）g，购自川北医学院动物中心[使用许可证号SYXK（川）2023-18]。所有大鼠均饲养于室温（21±2）℃、相对湿度（50±15）%、每12 h光/暗循环的动物房内，自由饮水、摄食。本研究方案经川北医学院伦理委员会审核批准（受理编号NSMC伦理动物审〔2023〕013号）。

2 方法

2.1 药液的制备

番泻叶药液的制备：取番泻叶饮片700 g，加入100 ℃沸水2 800 mL，浸泡30 min×4次，合并各浸提液并浓缩成0.45 g/L（以生药量计）的药液，于4 ℃下保存[11]。痛泻要方药液的制备：取组方药材颗粒剂炒白术30 g、炒白芍20 g、炒陈皮15 g、防风10 g（共75 g），以水为溶剂，配制成1.5 g/mL（以生药量计）的药液，于4 ℃下保存。匹维溴铵药液的配制：取匹维溴铵对照品200 mg，以水为溶剂，配制成1.5 mg/mL的药液，于4 ℃下保存。

2.2 分组、造模与给药

所有大鼠经适应性喂养1周后，随机分为造模组（35只）和对照组（7只）。造模组大鼠参照文献[12]，采用番泻叶药液灌胃联合慢性不可预知性应激的方法建立IBS-D大鼠模型，具体步骤如下：每天给予2种不同刺激且连续2 d的刺激方式不同，刺激方式包括束缚2 h、热刺激（45 ℃热水中游泳5 min）、冷刺激（5 ℃冷水中游泳3 min）、夹尾30 min、水平振荡1 h（160次/min）、拥挤饲养（同笼6只）24 h、孤养24 h；刺激后1 h，予番泻叶药液10 mL/（kg·d）灌胃1次，连续造模14 d。若大鼠出现持续腹泻、腹壁回缩反射（abdominal withdrawal reflex，AWR）评分≥2分，表明造模成功[12]。将35只造模成功的大鼠随机分为模型组、匹维溴铵组（阳性对照）和痛泻要方低、中、高剂量组，每组7只。匹维溴铵组大鼠灌胃匹维溴铵药液15 mg/（kg·d）[13]；痛泻要方低、中、高剂量组参考人与大鼠体表面积比例[14]，分别予痛泻要方药液3.75、7.5、15 g/（kg·d）（以生药量计）灌胃；模型组和对照组大鼠灌胃生理盐水10 mL/（kg·d）。每天灌胃1次，连续10 d。

2.3 大鼠一般情况及体重变化情况

分别于造模前、造模后给药前、末次药物干预后观察各组大鼠的一般情况并记录其体重，计算日均体重增长量。造模后（或干预后）日均体重增长量＝[测量时体重－初始体重（或造模后给药前体重）]/造模（或药物干预）天数。

2.4 大鼠腹泻指数计算

于造模后给药前、末次药物干预后，单笼饲养大鼠，于笼底放置滤纸以收集6 h粪便，计算腹泻指数：腹泻指数＝稀便率×稀便级。式中，稀便率（%）＝大鼠的稀便粒数/大便的总粒数（干稀便的区分以滤纸上有无污迹为标准）；稀便级根据污迹直径判断，包括1级（≤1 cm）、2级（＞1～2 cm）、3级（＞2～3 cm）、4级（＞3 cm）[15]。

2.5 大鼠内脏敏感性测定

于造模后给药前、末次药物干预后，大鼠禁食、不禁水24 h，置于透明玻璃容器（20 cm×6 cm×7 cm）中，将带球囊的导尿管经石蜡油润滑后插入其肛门约5 cm，经导尿管注入生理盐水并记录大鼠AWR评分。当AWR评分为3分（即疼痛阈值，大鼠出现腹部肌肉强烈收缩并抬离桌面）时，记录此时所注液体量，以评估大鼠内脏敏感性（液体量与内脏敏感性成反比）[16]。

2.6 样本采集

内脏敏感性测定结束后，予0.1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后断颈处死大鼠，留取其结肠组织用于组织病理学检测和分子生物学分析。

2.7 大鼠结肠组织病理变化的观察

取各组大鼠结肠组织适量，经固定、取材、浸泡、脱水、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色、封片后，使用显微镜观察大鼠结肠组织的病理变化情况。

2.8 大鼠结肠组织中5-HT水平的检测

采用ELISA法检测。取各组大鼠结肠组织适量，经匀浆、裂解后，于4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，取上清液，严格按照相应试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测大鼠结肠组织中5-HT水平。

2.9 大鼠结肠组织中5-HT蛋白表达的检测

采用免疫组化法检测。取“2.7”项下各组4只大鼠结肠组织石蜡切片，经脱蜡、水化后，于95 ℃的乙二胺四乙酸抗原修复液中静置40 min，加入内源性过氧化物酶阻断剂孵育15 min；加入5-HT一抗（稀释度为1∶100），于4 ℃下孵育过夜；加入相应二抗，于室温下孵育1 h；洗涤后，以DAB工作液显色，苏木精复染，经梯度乙醇脱水后以中性树脂封片，使用显微镜观察，并使用Image J软件量化分析5-HT蛋白阳性率（5-HT阳性细胞主要集中在结肠黏膜层及肌层，胞质着色呈棕黄色，且颜色越深，分布范围越广，阳性率越高）。

2.10 大鼠结肠组织中TPH1、SERT mRNA表达的检测

采用实时荧光定量PCR法检测。取各组大鼠结肠组织适量，提取其总RNA，经浓度、纯度检测后，参照相应试剂盒说明书方法将其反转录为cDNA，再以上述cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系（共10 μL）包括：cDNA模板1 μL，Green定量PCR SuperMix试剂5 μL，正、反向引物（由上海欧易生物医学科技有限公司设计，由北京擎科新业生物科技有限公司合成，具体序列及产物长度见表1）各0.2 μL，无核酶水3.6 μL。反应条件如下：94 ℃预变性30 s；94 ℃变性5 s，60 ℃退火/延伸30 s，共45个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法以GraphPad Prism 10.0软件计算TPH1、SERT mRNA的表达水平，结果以对照组为标准进行归一化处理。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列（5′→3′）	产物长度/bp
GAPDH	正向：GCCTTCTCTTGTGACAAAGT	102
	反向：CTTGCCGTGGGTAGAGTCATA	
SERT	正向：CGTGTCTTGGTTCTATGGAAT	126
	反向：ATGATGAACAGGAGAAACAGAG	
TPH1	正向：GATGGTCAGTCTGGATGCTATG	83
	反向：GTCTCCTTGAAGTCTAGTGTGTG	

2.11 大鼠结肠组织中TPH1、SERT蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取各组大鼠结肠组织适量，加入组织裂解液200 μL，于冰上超声裂解1 h。取裂解后的组织匀浆，于4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，取上清液。采用BCA法测定蛋白浓度后，于100 ℃加热10 min使变性。取变性蛋白，经SDS-PAGE分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上，以5%脱脂奶粉室温封闭1 h；加入TPH1、SERT、GAPDH一抗（稀释度均为1∶1 000），4 ℃下孵育过夜；以TBST缓冲液洗膜5 min×3次后，加入相应二抗（稀释度为1∶5 000），室温下孵育1 h；以TBST缓冲液洗膜3 min×5次，加入ECL化学发光液显色，并置于凝胶成像系统下曝光成像。采用Image J软件进行分析，以目标蛋白与内参蛋白（GAPDH）的条带灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

2.12 大鼠肠道菌群组成分析

于末次药物干预后，取对照组、模型组、匹维溴铵组、痛泻要方高剂量组大鼠粪便样品进行16S rRNA菌群测序，具体检测由上海欧易生物医学科技有限公司完成，主要流程包括DNA提取与检测、PCR扩增及产物纯化、测序文库构建和测序。对测序结果进行质控分析后，得到代表序列及扩增序列变体（amplicon sequence variants，ASV）丰度表格；使用QIIME2软件挑选各ASV的代表序列，借助Silva数据库对代表序列进行比对注释，利用QIIME2软件进行肠道菌群生物信息学分析——（1）Alpha多样性分析：包括Chao1指数和Shannon指数，其中Chao1指数反映群落的丰富度[17]，Shannon指数反映群落的多样性[18]；上述指数数值越高，则肠道菌群的丰富度和多样性就越高。（2）Beta多样性分析：包括主坐标分析（principal coordinate analysis，PCoA）和非度量多维尺度分析（nonmetric multidimensional scaling，NMDS），从门、属水平分析各组肠道菌群的物种组成。

2.13 统计学方法

采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 10.0软件对数据进行统计分析并作图。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验；不符合正态分布的以$M(P_{25},P_{75})$表示，多组间比较采用非参数Kruskal-Wallis H检验，进一步两两比较采用Mann-Whitney U检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠一般情况及体重变化比较

造模前，各组大鼠一般状况良好，初始体重组间比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。造模后给药前，除对照组外，其余各组大鼠均出现精神萎靡、易躁易怒、易倦怠、食欲下降、反应迟钝、毛发晦暗有污渍、肛周污染严重的症状，且日均体重增长量均较对照组显著降低（$P<0.01$）。末次药物干预后，各药物组大鼠上述症状均有不同程度改善，匹维溴铵组和痛泻要方中、高剂量组大鼠的日均体重增长量均较模型组显著升高（$P<0.01$）。结果见表2。

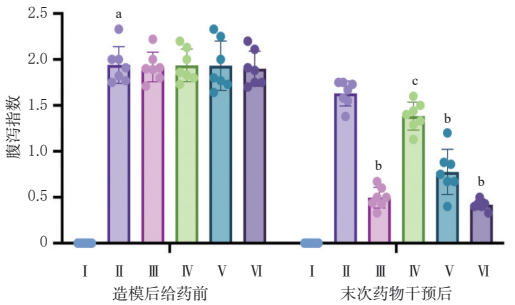
表2 各组大鼠体重及其增长量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=7$）

组别	初始体重/g	造模后日均体重增长量/(g/d)	干预后日均体重增长量/(g/d)
对照组	286.14±19.67	6.39±0.61	6.92±0.84
模型组	267.43±31.78	0.38±0.49[a]	1.87±0.36
匹维溴铵组	276.00±38.48	0.19±0.82[a]	5.34±0.63[b]
痛泻要方低剂量组	281.43±28.57	0.50±1.00[a]	2.62±0.64
痛泻要方中剂量组	274.43±42.11	0.67±1.03[a]	5.10±0.54[b]
痛泻要方高剂量组	272.57±28.76	0.29±1.04[a]	6.06±0.78[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$。

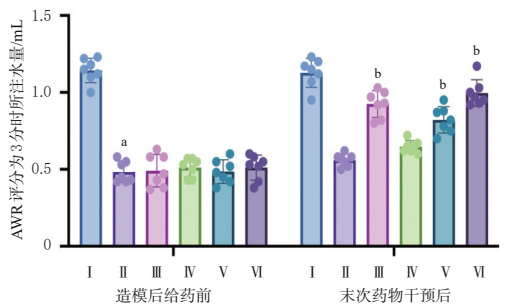
3.2 大鼠腹泻指数和内脏敏感性比较

造模前，各组大鼠均未出现腹泻情况。造模后给药前，与对照组比较，模型组大鼠的腹泻指数、内脏敏感性均显著升高（$P<0.01$）。末次药物干预后，与模型组比较，匹维溴铵组和痛泻要方各剂量组大鼠的腹泻指数、内脏敏感性（痛泻要方低剂量组除外）均显著降低（$P<0.01$或$P<0.05$）。结果见图1、图2。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：匹维溴铵组；Ⅳ：痛泻要方低剂量组；Ⅴ：痛泻要方中剂量组；Ⅵ：痛泻要方高剂量组；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，$P<0.05$。

图1 各组大鼠腹泻指数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=7$）



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：匹维溴铵组；Ⅳ：痛泻要方低剂量组；Ⅴ：痛泻要方中剂量组；Ⅵ：痛泻要方高剂量组；a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$。

图2 各组大鼠内脏敏感性比较（$\bar{x}\pm s$，$n=7$）

3.3 各组大鼠结肠组织病理变化比较

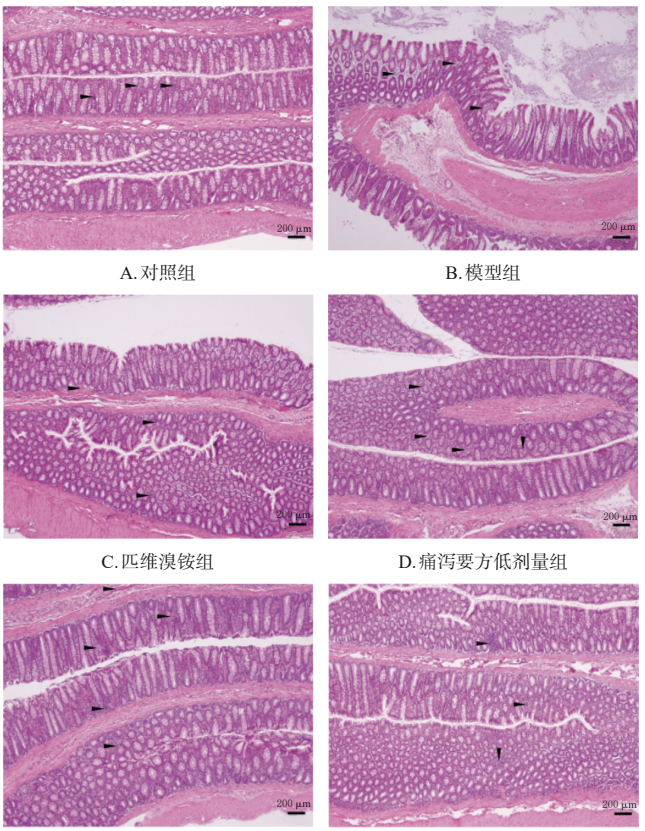
各组大鼠结肠黏膜结构完整，未见明显坏死脱落、溃疡及糜烂等，部分可见浅层肠腺体有少量炎症细胞浸润伴微血管轻度充血，黏膜下层及肌层等未见明显炎症细胞浸润等改变，符合IBS-D功能性肠道疾病的病理特征。结果见图3。

3.4 各组大鼠结肠组织中5-HT水平及蛋白表达情况比较

ELISA实验结果显示，与对照组比较，模型组大鼠结肠组织中5-HT水平均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，匹维溴铵组和痛泻要方中、高剂量组大鼠结肠组织中5-HT水平均显著降低（$P<0.01$）。免疫组化实验也得出了相似的结果：与对照组比较，模型组大鼠结肠组织中5-HT蛋白阳性区域颜色较深，分布范围有所扩大，5-HT蛋白阳性率显著增加（$P<0.01$）；与模型组比较，匹维溴铵组与痛泻要方低、中、高剂量组大鼠结肠组织中5-HT蛋白阳性区域颜色较浅，分布范围有所缩小，5-HT蛋白阳性率均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），有剂量依赖趋势。结果见图4。

3.5 各组大鼠结肠组织中TPH1、SERT mRNA及蛋白表达情况比较

与对照组比较，模型组大鼠结肠组织中SERT mRNA及蛋白的表达水平均显著降低，TPH1 mRNA及蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，匹维溴铵组和痛泻要方低、中、高剂量组大鼠结肠组织



A. 对照组　B. 模型组

C. 匹维溴铵组　D. 痛泻要方低剂量组

E. 痛泻要方中剂量组　F. 痛泻要方高剂量组

黑色箭头：炎症细胞浸润。

图3　各组大鼠结肠组织病理变化显微图（HE染色）

中SERT mRNA及蛋白（痛泻要方低剂量组除外）的表达水平均显著升高，TPH1 mRNA（痛泻要方低剂量组除外）及蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.01$或$P<0.05$），有剂量依赖趋势。结果见图5。

3.6　各组大鼠肠道菌群的变化

3.6.1　肠道菌群Alpha多样性分析

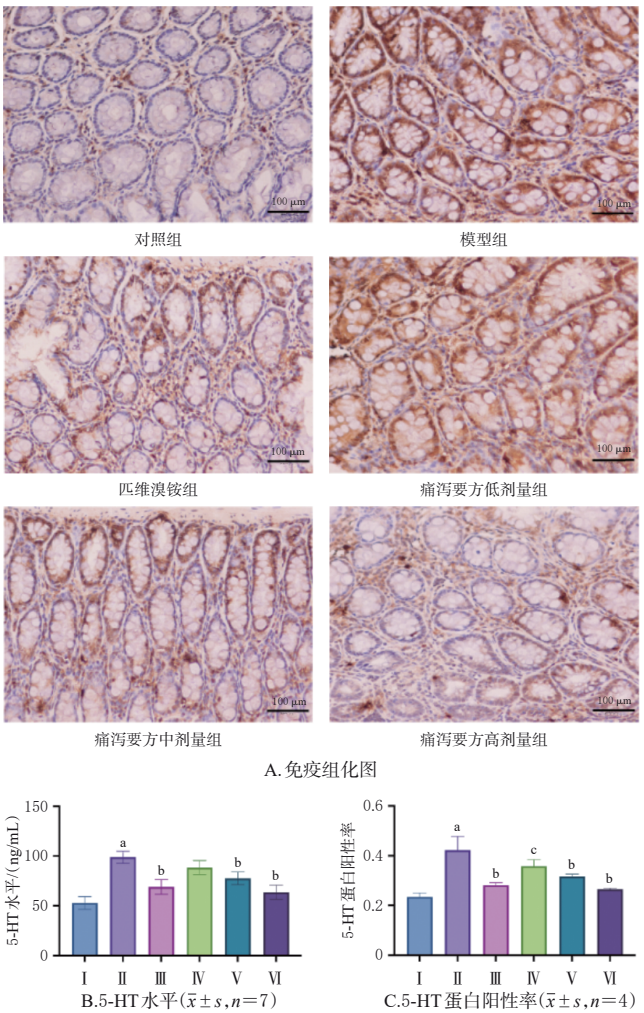
与对照组比较，模型组大鼠的Chao1指数、Shannon指数均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，匹维溴铵组和痛泻要方高剂量组大鼠的Chao1指数、Shannon指数均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），提示匹维溴铵和痛泻要方均能改善IBS-D大鼠肠道菌群的多样性，维持肠道稳定。结果见图6A、6B。

3.6.2　肠道菌群Beta多样性分析

各组大鼠的肠道菌群结构存在差异（$P<0.05$）：PCoA与NMDS结果显示，模型组与对照组相距甚远，且无相交区域，提示IBS-D大鼠肠道菌群结构改变明显。匹维溴铵组、痛泻要方高剂量组介于对照组与模型组之间，表明匹维溴铵和痛泻要方均能改善IBS-D大鼠肠道菌群的群落结构及组成。结果见图6C、6D。

3.6.3　肠道菌群物种组成结构分析

门水平优势菌种主要为厚壁菌门Firmicutes、拟杆菌门Bacteroidota、变形菌门Proteobacteria、放线菌门Actinobacteriota，结果见图7。与对照组比较，模型组大鼠肠道菌群中厚壁菌门相对丰度显著下降、变形菌门相对



A. 免疫组化图

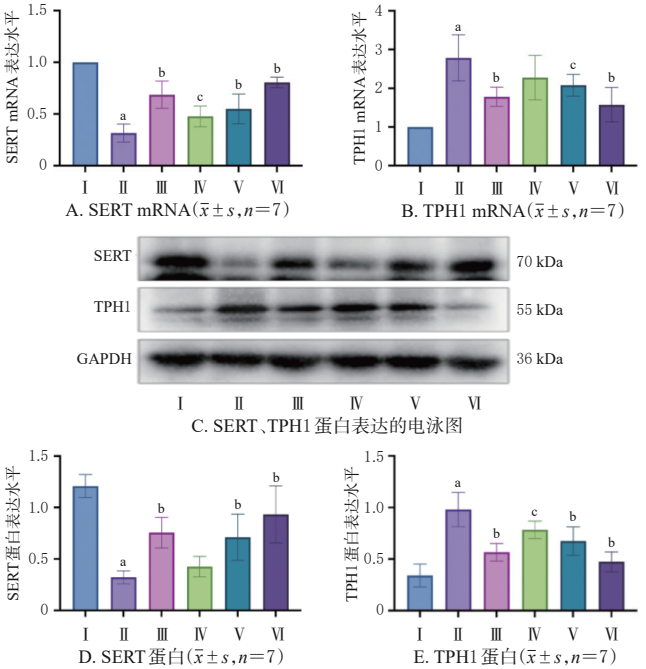
B. 5-HT水平（$\bar{x}\pm s$，$n=7$）　C. 5-HT蛋白阳性率（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：匹维溴铵组；Ⅳ：痛泻要方低剂量组；Ⅴ：痛泻要方中剂量组；Ⅵ：痛泻要方高剂量组；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，$P<0.05$。

图4　各组大鼠结肠组织中5-HT水平及蛋白表达情况比较

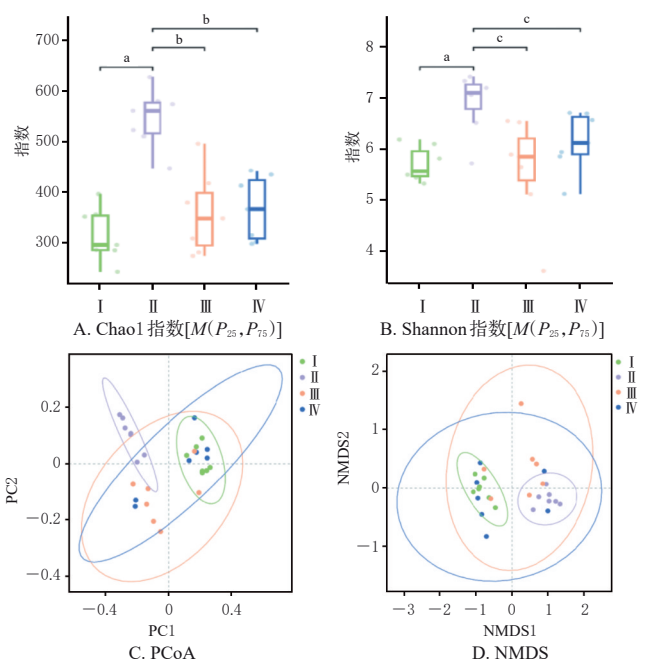
丰度显著上升（$P<0.01$），拟杆菌门相对丰度有上升的趋势；与模型组比较，匹维溴铵组、痛泻要方高剂量组大鼠肠道菌群中厚壁菌门相对丰度显著上升、变形菌门相对丰度显著下降（$P<0.01$或$P<0.05$），拟杆菌门相对丰度有下降趋势但不明显（图略）。

属水平优势菌种主要为乳酸杆菌属*Lactobacillus*、普雷沃菌属*Prevotella*、大肠杆菌属*Escherichia*-志贺氏杆菌属*Shigella*、拟杆菌属*Bacteroides*、*Muribaculaceae*等，结果见图8。与对照组比较，模型组大鼠肠道菌群中乳酸杆菌属、*Muribaculaceae*相对丰度显著下降，大肠杆菌属-志贺氏杆菌属、*Rikenellaceae*_RC9_gut_group相对丰度显著上升（$P<0.01$）；与模型组比较，匹维溴铵组和痛泻要方高剂量组大鼠肠道菌群中乳酸杆菌属相对丰度显著上升，大肠杆菌属-志贺氏杆菌属相对丰度显著下降（$P<0.01$或$P<0.05$），痛泻要方高剂量组大鼠肠道菌群中*Rikenellaceae*_RC9_gut_group丰度显著下降（$P<0.05$）（图略）。



Ⅰ:对照组;Ⅱ:模型组;Ⅲ:匹维溴铵组;Ⅳ:痛泻要方低剂量组;Ⅴ:痛泻要方中剂量组;Ⅵ:痛泻要方高剂量组;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,$P<0.05$。

图5　各组大鼠结肠组织中SERT、TPH1 mRNA及蛋白表达情况比较



Ⅰ:对照组;Ⅱ:模型组;Ⅲ:匹维溴铵组;Ⅳ:痛泻要方高剂量组;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,$P<0.05$。

图6　各组大鼠肠道菌群的多样性变化(n=7)

4　讨论

IBS-D是常见的功能性肠道疾病,根据症状,中医将其归为"腹痛""泄泻"等范畴,以舒肝健脾、祛湿止泻为主要治则[19]。痛泻要方具有补脾柔肝、祛湿止泻功效,可通过抗炎、调节免疫、改善肠道高敏性、调节情志、修

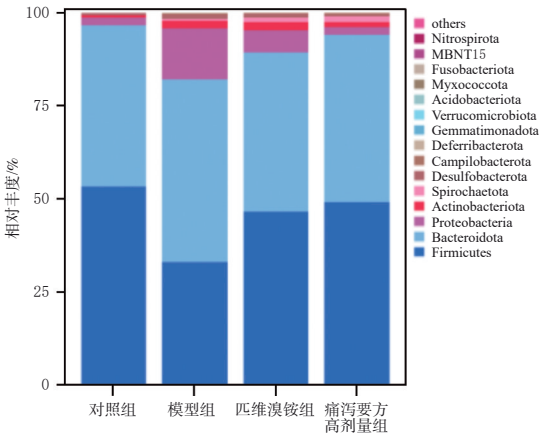


图7　各组大鼠肠道菌群门水平物种差异

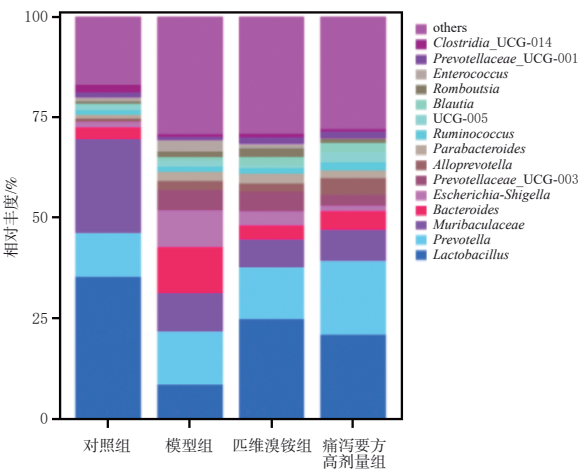


图8　各组大鼠肠道菌群属水平物种差异

复细胞屏障等途径来发挥治疗作用[20]。

本研究结果显示,痛泻要方可通过调控5-HT蛋白表达和改善IBS-D大鼠菌群失调来缓解疾病症状。5-HT是重要的脑肠肽之一,在胃肠道和大脑中均具有关键作用,是"微生物群-肠-脑"轴信号转导的关键调节因子[21]。研究表明,IBS-D的发病与5-HT水平异常关系密切[22]。肠道中5-HT水平升高会造成肠道运动和知觉的剧烈变化,诱导内脏高敏性,缩短小肠转运时间并增强空肠中液体的分泌,从而引起腹泻[23]。因此,调控5-HT表达是治疗IBS-D的一种重要手段。在本研究中,造模后,模型组大鼠的日均体重增长量均较对照组显著降低;同时,该组大鼠性情改变,腹泻指数和内脏敏感性均较对照组显著升高,虽未观察到大鼠结肠组织器质性病理变化,但是5-HT水平及蛋白表达均较对照组显著升高,提示IBS-D模型制备成功。经痛泻要方干预后,IBS-D大鼠结肠组织中5-HT水平及蛋白表达均较模型组有所降低,精神状态改善,日均体重增长量较模型组有所升高,腹泻指数和内脏敏感性均较模型组有所降低。以上结果表明,痛泻要方可通过调控5-HT的表达来改善大鼠的IBS-D症状。

TPH1是5-HT合成的关键限速酶,存在于肠嗜铬细胞中,负责催化色氨酸转化为5-HT,后者合成之后释放

于肠黏膜固有层和突触间隙，并通过作用于肠神经纤维和平滑肌中的5-HT受体来发挥肠蠕动、脑肠肽分泌、血管舒张、感觉调节等功能[24]。研究指出，人体内95%的5-HT位于肠道中，主要被高选择性的SERT从间质间隙中去除，从而终止5-HT的生理功能[25]。因此，SERT、TPH1的表达可反映肠道内5-HT合成、分泌、再摄取情况。本研究发现，经痛泻要方干预后，IBS-D大鼠结肠中SERT蛋白及mRNA的表达均有所上调，TPH1蛋白及mRNA的表达均有所下调，且有剂量依赖趋势。以上结果表明，痛泻要方可能通过上调SERT的表达和下调TPH1的表达来降低结肠组织中5-HT水平，从而改善IBS-D模型大鼠的相关症状。

肠道菌群作为体内的微生物群体，主要由厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门细菌等组成，其组成的改变可能会导致IBS-D的发生[26]。在本研究中，IBS-D大鼠肠道菌群多样性及丰富度均明显增加，较对照组大鼠存在明显差异，与既往研究结果一致[27]。在门和属水平，模型组大鼠的厚壁菌门、乳酸杆菌属、*Muribaculaceae*的相对丰度较对照组显著下降，变形菌门、大肠杆菌属-志贺氏杆菌属的相对丰度较对照组显著增加。研究指出，厚壁菌门、乳酸杆菌属、*Muribaculaceae*均属于有益菌，可通过抗炎、改善代谢紊乱等维持肠道微生物稳态[28—29]；大肠杆菌属-志贺氏杆菌属、变形菌门等属于条件致病菌，会增加肠道炎症及肠黏膜通透性，破坏肠道微平衡[30—31]。经痛泻要方干预后，上述致病菌减少、有益菌增加，表明痛泻要方可通过改善肠道微生物紊乱而缓解IBS-D大鼠症状。此外，*Rikenellaceae*_RC9_gut_group是与精神疾病相关的细菌[32]，IBS-D大鼠肠道中*Rikenellaceae*_RC9_gut_group增加，可能与大鼠焦虑抑郁状态有关。经痛泻要方干预后，大鼠肠道菌群中*Rikenellaceae*_RC9_gut_group减少，不排除与痛泻要方缓解大鼠焦虑有关，但仍需相关研究予以证实。

研究指出，5-HT可通过“微生物群-肠-脑”轴反向调节IBS-D肠道菌群[8]。此外，肠道微生物群在调节宿主5-HT的表达中也起着关键作用。色氨酸是大量微生物与宿主代谢物的生物合成前体，5-HT是色氨酸代谢物，可通过TPH1激活生成，因此肠道微生物群可通过影响该酶的活性来调节5-HT的合成[33]。研究表明，致病菌（如大肠杆菌）可生成色氨酸，从而增加5-HT的合成[34]，进而下调肠道中SERT的活性[35]，增加5-HT的水平；有益细菌（如乳酸菌）会降解色氨酸，从而减少中枢和肠道5-HT的产生[36]。在本研究中，IBS-D大鼠肠道菌群紊乱，有益菌减少、致病菌增加，同时结肠TPH1、5-HT蛋白表达显著上调，SERT蛋白表达显著下调，提示肠道菌群紊乱可影响5-HT合成，进而影响IBS-D的发生发展。

综上所述，痛泻要方可通过抑制TPH1的表达、促进SERT的表达、调控5-HT水平、改善肠道菌群失调来改善IBS-D大鼠症状。然而，5-HT、肠道菌群参与IBS-D发病的机制复杂，加之痛泻要方成分多样，故该方对IBS-D的干预作用机制仍需进一步探讨。

参考文献

[1] DROSSMAN D A, HASLER W L. Rome Ⅳ-functional GI disorders: disorders of gut-brain interaction[J]. Gastroenterology, 2016, 150(6): 1257-1261.

[2] LI J C, CUI H T, CAI Y Z, et al. Tong-xie-yao-fang regulates 5-HT level in diarrhea predominant irritable bowel syndrome through gut microbiota modulation[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1110.

[3] ZHANG F, XIANG W, LI C Y, et al. Economic burden of irritable bowel syndrome in China[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(47): 10450-10460.

[4] FORD A C, LACY B E, TALLEY N J. Irritable bowel syndrome[J]. N Engl J Med, 2017, 376(26): 2566-2578.

[5] CHEN M J, RUAN G C, CHEN L, et al. Neurotransmitter and intestinal interactions: focus on the microbiota-gut-brain axis in irritable bowel syndrome[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 817100.

[6] MOORE N A, SARGENT B J, MANNING D D, et al. Partial agonism of 5-HT_3 receptors: a novel approach to the symptomatic treatment of IBS-D[J]. ACS Chem Neurosci, 2013, 4(1): 43-47.

[7] FRANCESCANGELI J, KARAMCHANDANI K, POWELL M, et al. The serotonin syndrome: from molecular mechanisms to clinical practice[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2288.

[8] 李潇潇，卢圣锋，朱冰梅，等. 5-HT与肠道菌群及其在肠-脑相关疾病中的作用研究进展[J]. 中国康复医学杂志，2019，34(1)：116-119.
LI X X, LU S F, ZHU B M, et al. Research progress on 5-HT and intestinal flora and its role in gut-brain related diseases[J]. Chin J Rehabilitat Med, 2019, 34(1): 116-119.

[9] 王栩芮，傅文斌，孙弋淇，等. 痛泄要方缓解肝郁脾虚证腹泻型肠易激综合征患者内脏高敏的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28(9)：97-102.
WANG X R, FU W B, SUN Y Q, et al. Clinical efficacy of Tongxie yaofang on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) patients with liver depression and spleen deficiency[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(9): 97-102.

[10] 孙羽中. 痛泻要方调控IBS肝郁脾虚证大鼠海马、皮质、下丘脑TPH和SERT的实验研究[D]. 太原：山西中医药大学，2018.
SUN Y Z. Experimental study on treatment of TPH and SERT in hippocampus, cortex and hypothalamus of rats with IBS deficiency of spleen and deficiency syndrome by Tongxie yaofang[D]. Taiyuan: Shangxi University of Chinese Medicine, 2018.

[11] 仝理，吴立斌，李难，等. 基于5-羟色胺信号通路探讨艾灸治疗腹泻型肠易激综合征的机制[J]. 针刺研究，2020，45(7)：535-540.
TONG L, WU L B, LI N, et al. Moxibustion relieves abdominal hypersensitivity and diarrhea by regulating

colonic 5-hydroxytryptamine signaling pathway in rats with diarrhea type irritable bowel syndrome[J]. Acupunct Res,2020,45(7):535-540.

[12] HOU Y J, ZHAO Y, JIANG H L, et al. Maintenance of intestinal homeostasis in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by electroacupuncture through submucosal enteric glial cell-derived S-nitrosoglutathione[J]. Front Physiol,2022,13:917579.

[13] 张扬雨. 匹维溴铵与安肠汤干预IBS-D大鼠模型的血清代谢组学对比研究[D]. 南宁:广西中医药大学,2023.
ZHANG Y Y. Comparative serum metabolomic study of pinaverium bromide and Anchang decoction intervention in rat model of IBS-D[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine,2023.

[14] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2011:135-136.
CHEN Q. Research methods in pharmacology of Chinese materia medica[M]. 3rd edition. Beijing: People's Medical Publishing House,2011:135-136.

[15] LI X M, REN K Y, HONG X J, et al. Ameliorating effects of electroacupuncture on the low-grade intestinal inflammation in rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2022, 37(10):1963-1974.

[16] 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.

[17] CHAO A, BUNGE J. Estimating the number of species in a stochastic abundance model[J]. Biometrics, 2002, 58(3):531-539.

[18] HILL T C J, WALSH K A, HARRIS J A, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. FEMS Microbiol Ecol,2003,43(1):1-11.

[19] 柯水芳,陆敏. 腹泻型肠易激综合征中医药治疗研究进展[J]. 光明中医,2017,32(4):612-614.
KE S F, LU M. Research progress of Chinese medicine in the treatment of diarrhea predominant irritable bowel syndrome[J]. Guangming J Chin Med,2017,32(4):612-614.

[20] 赵清玉,张淼,赵文静,等. 痛泻要方物质基础及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(8):237-245.
ZHAO Q Y, ZHANG M, ZHAO W J, et al. Material basis and pharmacological action of Tongxie yaofang: a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(8):237-245.

[21] MARGOLIS K G, CRYAN J F, MAYER E A. The microbiota-gut-brain axis: from motility to mood[J]. Gastroenterology,2021,160(5):1486-1501.

[22] BONETTO S, FAGOONEE S, BATTAGLIA E, et al. Recent advances in the treatment of irritable bowel syndrome[J]. Pol Arch Intern Med,2021,131(7/8):709-715.

[23] KATSUMATA R, SHIOTANI A, MURAO T, et al. The TPH1 rs211105 gene polymorphism affects abdominal symptoms and quality of life of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. J Clin Biochem Nutr, 2018, 62(3):270-276.

[24] GERSHON M D, TACK J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders[J]. Gastroenterology, 2007, 132(1):397-414.

[25] CROWELL M D. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome[J]. Br J Pharmacol,2004,141(8):1285-1293.

[26] LEE S M, KIM N, YOON H, et al. Compositional and functional changes in the gut microbiota in irritable bowel syndrome patients[J]. Gut Liver,2021,15(2):253-261.

[27] ZHUANG X J, TIAN Z Y, LI L, et al. Fecal microbiota alterations associated with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. Front Microbiol,2018,9:1600.

[28] SHANG L J, LIU H B, YU H T, et al. Core altered microorganisms in colitis mouse model: a comprehensive time-point and fecal microbiota transplantation analysis[J]. Antibiotics,2021,10(6):643.

[29] YE X, HUANG D, DONG Z X, et al. FXR signaling-mediated bile acid metabolism is critical for alleviation of cholesterol gallstones by *Lactobacillus* strains[J]. Microbiol Spectr,2022,10(5):e0051822.

[30] LIANG H Y, SONG H, ZHANG X J, et al. Metformin attenuated sepsis-related liver injury by modulating gut microbiota[J]. Emerg Microbes Infect,2022,11(1):815-828.

[31] RIZZATTI G, LOPETUSO L R, GIBIINO G, et al. Proteobacteria: a common factor in human diseases[J]. Biomed Res Int,2017,2017:9351507.

[32] ZHANG X M, CHEN S B, ZHANG M, et al. Effects of fermented milk containing *Lacticaseibacillus paracasei* strain Shirota on constipation in patients with depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Nutrients,2021,13(7):2238.

[33] CHAVES FILHO A J M, LIMA C N C, VASCONCELOS S M M, et al. IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: a potential pathophysiological link between depression and obesity[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,2018,80(Pt C):234-249.

[34] AGUS A, PLANCHAIS J, SOKOL H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease[J]. Cell Host Microbe,2018,23(6):716-724.

[35] ESMAILI A, NAZIR S F, BORTHAKUR A, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection inhibits intestinal serotonin transporter function and expression[J]. Gastroenterology,2009,137(6):2074-2083.

[36] ROAGER H M, LICHT T R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):3294.

（收稿日期:2024-03-09　修回日期:2024-07-10）
（编辑:舒安琴）