

# 痛泻安肠方对腹泻型肠易激综合征小鼠内脏高敏及肠道菌群的影响\*

裴文婧<sup>1</sup> 谢春娥<sup>1</sup> 李军祥<sup>1</sup> 姜慧<sup>1</sup> 石磊<sup>1</sup> 云逸飞<sup>1</sup> 薛晓轩<sup>1</sup> 赵兴杰<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:观察痛泻安肠方对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)肝郁脾虚证小鼠内脏高敏及肠道菌群的影响。方法:30 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠用随机数字表法分为空白组、模型组及痛泻安肠方低、中、高剂量组,每组各 6 只。除空白组小鼠外,其余各组小鼠均使用束缚应激 2 周联合番泻叶灌胃 1 周复制 IBS-D 肝郁脾虚证小鼠模型。造模成功后分别给予痛泻安肠方相应剂量灌胃,连续 2 周。比较各组小鼠腹部撤退反射(AWR)评分;甲苯胺蓝染色观察小鼠结肠肥大细胞数量;ELISA 检测小鼠血清 5-羟色胺(5-HT)、降钙素基因相关肽(CGRP)、血管活性肠肽(VIP)、神经肽 Y(NPY)和 P 物质(SP)表达水平;16S rRNA 高通量测序检测各组小鼠肠道菌群种类及丰富度的变化。结果:与 IBS-D 肝郁脾虚证模型组小鼠比较,痛泻安肠方各剂量组小鼠 AWR 评分呈不同程度的降低;结肠黏膜肥大细胞浸润减少;血清 5-HT、CGRP、VIP、SP 水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。16S rRNA 测序分析发现,痛泻安肠方干预增加了 IBS-D 肝郁脾虚证小鼠肠道菌群的多样性及丰富度,增加了疣微菌门和阿克曼菌属的丰富度。结论:痛泻安肠方可以改善肝郁脾虚证 IBS-D 小鼠的内脏高敏感,调节肠道菌群失调。

**[关键词]** 肠易激综合征;痛泻安肠方;肝郁脾虚证;内脏高敏感;肠道菌群

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.01.07

[中图分类号] R574.62 [文献标志码] A

## Effect of Tongxie Anchang Decoction on visceral hypersensitivity and gut microbiota in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome mice

PEI Wenjing XIE Chune LI Junxiang JIANG Hui SHI Lei YUN Yifei  
XUE Xiaoxuan ZHAO Xingjie

(Department of Gastroenterology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078, China)

Corresponding author: ZHAO Xingjie, E-mail: havsoul@126.com

**Abstract Objective:** To observe the effect of Tongxie Anchang Decoction on visceral hypersensitivity and intestinal microecology in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome( IBS-D) mice. **Methods:** Thirty SPF-grade male C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, and Tongxie Anchang decoction low, medium and high dose groups, with 6 mice in each group. Except for the blank group, all the mice in each group were restrained and stressed for two weeks and gavaged with senna leaves for one week to replicate the IBS-D mouse model with liver depression and spleen deficiency. After successful modeling, each group was given the corresponding dose of Tongxie Anchang decoction by gavage for two weeks. The expression levels of serum 5-hydroxytryptamine(5-HT), calcitonin gene-related peptide(CGRP), vasoactive intestinal peptide(VIP), neuropeptide Y(NPY) and substance P(SP) were measured by ELISA. 16S rRNA high-throughput sequencing was used to detect changes in the species and abundance of gut microbiota in each group of mice. **Results:** Compared with the mice in the IBS-D group with liver depression and spleen deficiency evidence group, the AWR scores of the mice in each dose group of the Tongxie Anchang Decoction showed different degrees of reduction; mast cell infiltration in the colonic mucosa was reduced; serum 5-HT, CGRP, VIP and SP were all reduced to different degrees, and the differences were statistically significant( $P < 0.05$ ). 16S rRNA sequencing analysis revealed that the intervention of the Tongxie Anchang Decoction increased the diversity and abundance of gut microbiota in IBS-D mice with liver depression and spleen deficiency evidence, and increased the abundance of the Verrucomicrobiota and Akkerman-

\*基金项目:国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)项目;首都卫生发展科研专项项目(No:首发2022-1-4201)

<sup>1</sup>北京中医药大学东方医院消化科(北京,100078)  
通信作者:赵兴杰, E-mail: havsoul@126.com

sia. **Conclusion:** Tongxie Anchang Decoction can improve visceral hypersensitivity and alleviate gut microbiota dysbiosis in IBS-D mice with liver-depression and spleen-deficiency evidence.

**Key words** irritable bowel syndrome; Tongxie Anchang Decoction; liver depression and spleen deficiency; visceral hypersensitivity; gut microbiota

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种慢性功能性胃肠道疾病,可影响 9%~16%的普通人群,其中女性的发病率更高<sup>[1]</sup>。该病的主要临床表现为腹痛和排便习惯改变。根据肠道习惯改变的主要模式,罗马 IV 标准将 IBS 分为 4 个不同的亚型:便秘型 IBS (IBS-C)、腹泻型 IBS (IBS-D)、便秘和腹泻混合型 IBS (IBS-M),以及未分类的 IBS<sup>[2]</sup>。在中国,以腹泻为主的 IBS-D 发病率最高<sup>[3]</sup>。IBS-D 的发病机制复杂,目前研究认为主要与内脏高敏、胃肠动力紊乱、肠道生态失调和中枢-肠神经系统失调等多种因素密切相关<sup>[4-5]</sup>。现代医学主要采用解痉剂、止泻剂、微生物制剂、抗抑郁药等对症治疗,短期疗效较好,但也存在易复发、效果单一等缺点;加之该病患病率高,易反复发作,且多伴有焦虑抑郁等情绪障碍的特点,IBS-D 已成为临床上亟待解决的难题。

几千年来,中医中药已经被广泛应用于临床实践。中药复方因其多药物、多成分、多靶点的作用特点,与疾病复杂、多变的病理生理学特点相契合,是治疗临床多种疾病的理想选择<sup>[6]</sup>。痛泻安肠方是北京中医药大学东方医院李军祥教授根据多年临床经验,针对 IBS-D 的肝郁脾虚这一关键病机,并兼顾风邪、湿邪,仿痛泻要方之义创立的经验用方,临床应用收效显著。

IBS-D 的典型肠道症状是由内脏高敏引起的,且随着患者肠道敏感性的增加,相关症状的严重程度逐渐增加<sup>[7]</sup>。导致内脏高敏感的原因复杂多样,有研究发现,肠道黏膜炎症、肠道菌群失调在 IBS 及内脏高敏感中具有重要作用<sup>[8-9]</sup>,而通过靶向调节肠道菌群可在不同程度上改善患者的内脏高敏感,从而达到治疗 IBS-D 的目的。本团队前期一项随机、单盲、阳性药对照临床试验发现,痛泻安肠方可以有效改善 IBS-D 肝郁脾虚证患者的腹痛、腹泻等症状,治疗 4 周后实验组的总有效率高达 93.3%<sup>[10]</sup>。然而,对于痛泻安肠方治疗 IBS-D 的实验研究,特别是痛泻安肠方对 IBS-D 肝郁脾虚证实验动物内脏高敏感和肠道菌群的影响目前尚不十分清楚。因此,本研究建立 IBS-D 肝郁脾虚证小鼠模型,观察痛泻安肠方对小鼠肠道内脏高敏感指标及肠道菌群的影响,旨在为痛泻安肠方的临床应用提供更多的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 30 只,体重

(20±2) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(动物许可证号:110011211111792224)。分笼饲养于北京中医药大学实验动物中心,室温(23±2)℃,相对湿度(60±5)%,12 h/12 h 白昼/黑夜交替。实验期间给予标准实验室鼠粮及自由饮用无菌水。实验方案及流程经北京中医药大学实验动物中心伦理委员会批准(No: BUCM-4-2021061003-2127)。

### 1.2 实验药物

痛泻安肠方配方颗粒组成为:炒白术 15 g、炮姜 9 g、白芍 12 g、乌梅 9 g、陈皮 6 g、蝉蜕 6 g 和黄连 6 g,给药前用蒸馏水充分溶解配制相应浓度的溶液。番泻叶颗粒使用时加蒸馏水配制成相应浓度的番泻叶水溶液。

### 1.3 模型制备及分组给药

30 只小鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组及痛泻安肠方低、中、高剂量组,每组 6 只。适应性饲养 1 周。参考相关研究报道并结合本实验要求进行造模<sup>[11]</sup>。简而言之,除空白组外,其余小鼠每日上午 9:00~11:00 于自制束缚装置内束缚刺激 2 h,连续 2 周,并且自第 2 周起开始予番泻叶水溶液(0.607 g/mL)灌胃,灌胃体积 0.01 mL/g,1 次/d,连续 1 周。造模结束后,依据人与小鼠体表面积换算给药剂量,人鼠等效剂量为 9.86 g/kg,作为实验中剂量组,低剂量组为 4.93 g/kg(中剂量的 1/2),高剂量组为 19.72 g/kg(中剂量的 2 倍)。空白组及模型组予 0.9%氯化钠溶液灌胃,灌胃体积 0.01 mL/g,1 次/d,连续 2 周。实验期间,每天观察并记录小鼠的一般状态、行为表现、饮水及进食情况等。

### 1.4 粪便性状评分

治疗结束后,将各组小鼠于代谢笼中尿便分离单只饲养 6 h,观察小鼠粪便性状,并根据 Bristol 粪便性状量表进行记录评分,完成数据统计,具体评分分级如表 1 所示。

表 1 粪便 Bristol 评分

评分/分	粪便 Bristol 分级标准
1	分离的硬团,如坚果,不容易通过
2	腊肠状,成块的,粪便表面凹凸
3	香肠状,表面干裂有缝
4	腊肠状或蛇状,光滑而柔软
5	软的团块,边缘清楚,容易通过
6	绒状便,边缘不清,或如泥浆状
7	水样粪,无固状物

### 1.5 腹部撤退反射实验

给药干预结束后,参照腹部撤退反射(AWR)实验方法,测定小鼠肠道敏感性。实验前各组小鼠禁食不禁水 18 h,将带气囊的 6F 导尿管涂抹石蜡油后插入经乙醚吸入麻醉的小鼠肛门,深度约 1.5 cm,将小鼠置于自制的直径 6 cm、长 22 cm 的限制活动装置内,使其头部不能转向后方,小鼠适应肛门内导管 15 min,待其完全平静后开始检测,缓慢向球囊内充气,气体容量由 0.25 mL 开始,每隔 5 min 分别递增至 0.35、0.50、0.65 mL (达到目标容量后持续 20 s,间隔 30 s,每一容量重复 3 次),观察小鼠腹壁对肠腔球囊扩张刺激的反应。AWR 评分标准见表 2。

表 2 AWR 评分标准

评分/分	AWR 评分标准
0	结直肠扩张刺激时小鼠情绪基本稳定
1	给予刺激时变得开始不稳定,偶尔扭动头部
2	给予刺激时腹背部肌肉轻微收缩但腹部未抬离地面
3	刺激时腹背部肌肉较强烈收缩并出现腹部抬离地面的情况
4	腹部肌肉强烈收缩,腹部呈弓形,并把腹部、会阴部抬离地面

### 1.6 样本采集

小鼠末次给药后禁食不禁水 12 h,麻醉后收集血液标本,静置 1 h,4℃,10 min,3 000 ×g 离心,收集淡黄色透亮血清,分装后 -20℃ 冷冻备用。75%乙醇消毒,打开腹腔,分离肛门至回盲部结肠,4℃预冷 PBS 冲洗,垂直于肠管将结肠分割为若干 0.5~1.0 cm 的肠段,部分结肠置于 10%中性福尔马林中固定,部分置于冻存管并于液氮中速冻后转存于 -80℃ 冰箱备用。小鼠末次给药后 4 h,于超净台内摩腹法促进小鼠排便,冰上收集小鼠粪便,每 2~3 粒置于一个冻存管中,液氮冷冻后转移到 -80℃ 冰箱保存

### 1.7 甲苯胺蓝染色观察结肠肥大细胞

取 10%中性福尔马林固定的结肠标本,常规脱水,石蜡包埋,切成 4 μm 薄片,脱蜡后 1%甲苯胺蓝染色 1 min,加 1%盐酸乙醇分化,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。显微镜下观察并计数肥大细胞数量。

### 1.8 ELISA

严格按照试剂盒说明书检测步骤 1.6 中得到的小鼠血清中 5-羟色胺(5-HT)、降钙素基因相关肽(CGRP)、血管活性肠肽(VIP)、血清神经肽 Y(NPY)和 P 物质(SP)的表达水平。本实验所用试剂盒由上海酶联生物科技有限公司和武汉华美生

物工程有限公司提供。

### 1.9 16S rRNA 高通量测序及数据分析

对空白组、模型组、痛泻安肠方中剂量组(最佳剂量)小鼠粪便样本进行 16S rRNA 基因 V3-V4 区高通量测序。使用 EZNA Soil DNA 试剂盒(Omega Biotek,美国)从 200 mg 粪便中提取 DNA,并在 NanoDrop 2000 紫外可见分光光度计(Thermo Fisher Scientific,美国)上通过 1%琼脂糖凝胶电泳测量 DNA 质量。使用 Multiskan GO 酶标仪(Thermo Fisher Scientific,美国)对所提取的 DNA 浓度及纯度进行定量检测,同时通过琼脂糖凝胶电泳对 DNA 的完整性进行检测。选用引物 338F/806R(5'-ACTCCTACGAGAGGCAGCAG-3'/5'-GGACTACAGG-3'),进行 PCR 扩增,混样与纯化后使用 NEXT Flex 快速 DNA 测序试剂盒(Bio Scientific,美国)进行 Miseq 文库构建,Qubit 3.0 对文库浓度进行定量及检测,在 Illumina MiSeq 平台(Illumina,美国)上测序。

使用 Usearch(7.0 版)对 SILVA 数据库(123 版)以 70%的置信度阈值将序列聚类为相似度阈值为 97%的操作分类单元(OTU)。使用 Mothur(版本 v. 1.30.1)进行 Alpha 多样性估计器计算。实施了维恩图以显示唯一和共享的 OTU。根据 Bray-Curtis 距离,使用每个样品 OTU 的代表性序列进行主坐标分析(PCoA)。基于分类水平的群落组成信息,使用 R 包(版本 2.15.3)可视化微生物分布。使用 Wilcoxon 秩和检验(两组)或 Kruskal-Wallis H 检验(3 组)确定主要细菌群落差异。

### 1.10 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行分析,数据以  $\bar{X} \pm S$  表示,单组实验前后数据满足正态性,采用配对 *t* 检验;多组数据之间满足方差齐性,采用 One Way ANOVA 分析以及 LSD 进行组间两两比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠一般状况

空白组小鼠精神状态良好,动作较为灵活,毛色光泽,不喜扎堆,进食及饮水量正常,二便正常,粪便多呈腊肠状或蛇状,干湿适中。造模组小鼠出现毛发枯燥凌乱无光泽,少动喜聚集,灌胃时出现抵抗加剧,饮食及饮水减少,大便质地稀溏。痛泻安肠方低、中、高剂量组小鼠精神状态较模型组均有明显改善,小鼠毛发较为整齐,恢复光泽,时喜扎堆,饮食及饮水量较模型组增多,粪便质地较为成形,部分呈腊肠状或蛇状。

### 2.2 小鼠粪便性状变化

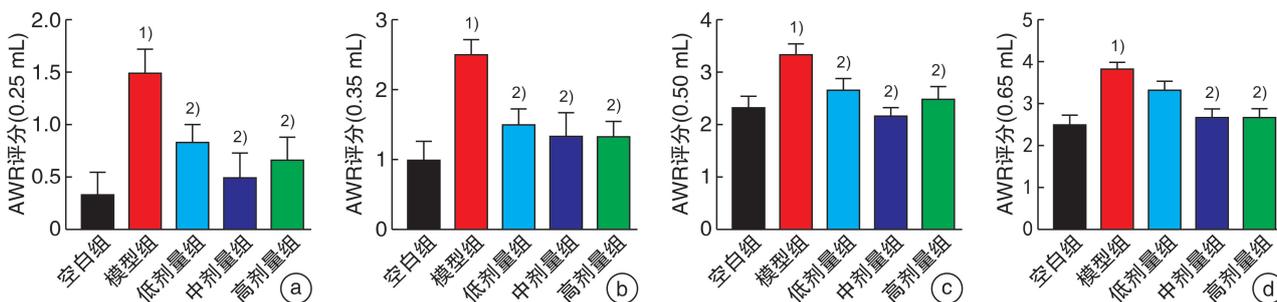
与空白组小鼠相比,模型组小鼠 Bristol 粪便性状评分显著升高( $P < 0.05$ );与模型组小鼠相比,痛泻安肠方中剂量及高剂量组小鼠 Bristol 粪

便性状评分显著降低( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 各组小鼠 Bristol 粪便性状评分比较

组别	数量/只	粪便性状/分
空白组	6	4.00±0.63
模型组	6	5.00±0.63 <sup>1)</sup>
低剂量组	6	4.67±0.52
中剂量组	6	4.00±0.63 <sup>2)</sup>
高剂量组	6	4.39±0.64 <sup>2)</sup>

与空白组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。



a~d:分别为 0.25、0.35、0.50 和 0.65 mL 气体压力水平下 AWR 评分。与空白组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠不同气体压力下 AWR 评分柱状图

### 2.4 痛泻安肠方对肝郁脾虚证 IBS-D 小鼠结肠组织肥大细胞浸润的影响

本研究通过甲苯胺蓝染色探索痛泻安肠方对结肠组织肥大细胞的浸润情况,与空白组相比,模型组小鼠结肠黏膜肥大细胞浸润明显增多( $P < 0.05$ ),经痛泻安肠方治疗之后,肥大细胞浸润明显减少( $P < 0.05$ )。见图 2。

### 2.5 痛泻安肠方对 IBS-D 小鼠血清 5-HT、CGRP 的影响

神经内分泌递质可以通过激活肠道感觉神经末梢进而参与调节肠道内脏痛感知。ELISA 检测了血清 5-HT 和 CGRP 的水平,以确定痛泻安肠方是否通过调节神经内分泌递质的表达进而调控小鼠内脏高敏感状态。如图 3 所示,束缚应激联合番泻叶灌胃可明显上调小鼠血清 5-HT 和 CGRP 水平,但经过不同剂量痛泻安肠方治疗后,5-HT 和 CGRP 水平显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.6 痛泻安肠方对肝郁脾虚证 IBS-D 小鼠血清 SP 和 VIP 的影响

通过 ELISA 检测血清 SP 和 VIP 的水平,如图 4 所示,与空白组相比,造模后小鼠血清 SP 及 VIP 水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在使用不同剂量痛泻安肠方灌胃 2 周后,小鼠血清 SP 及 VIP 较模型组显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 痛泻安肠方对肝郁脾虚证 IBS-D 小鼠 AWR 评分的影响

与空白组比较,模型组小鼠在 0.25、0.35、0.50、0.65 mL 气体压力水平下 AWR 评分均增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,痛泻安肠方中剂量及高剂量组小鼠 0.25、0.35、0.50、0.65 mL 气体压力水平下 AWR 评分也均降低( $P < 0.05$ ),痛泻安肠方低剂量组小鼠 0.25、0.35、0.50 mL 气体压力水平下 AWR 评分显著降低( $P < 0.05$ ),当气体压力上升到 0.65 mL 时,低剂量组 AWR 评分较模型组降低,但差异无统计学意义。见图 1。

### 2.7 痛泻安肠方对肝郁脾虚证 IBS-D 小鼠肠道菌群的影响

**2.7.1  $\alpha$ 多样性分析**  $\alpha$ 多样性可以反映肠道菌群中物种的丰富度和多样性信息,其中 Shannon 指数用以反映物种的多样性,Ace 指数和 Chao 指数用以反映物种的丰富度。如图 5 所示,与空白组相比,肝郁脾虚证 IBS-D 小鼠肠道菌群 Shannon 指数降低,而痛泻安肠方治疗之后,虽然差异无统计学意义,但可以看到菌群多样性有一定的上升趋势。同样造模后小鼠肠道菌群 Chao 指数较空白组下降,虽然差异无统计学意义,但治疗后物种丰富度有一定程度的上升趋势。

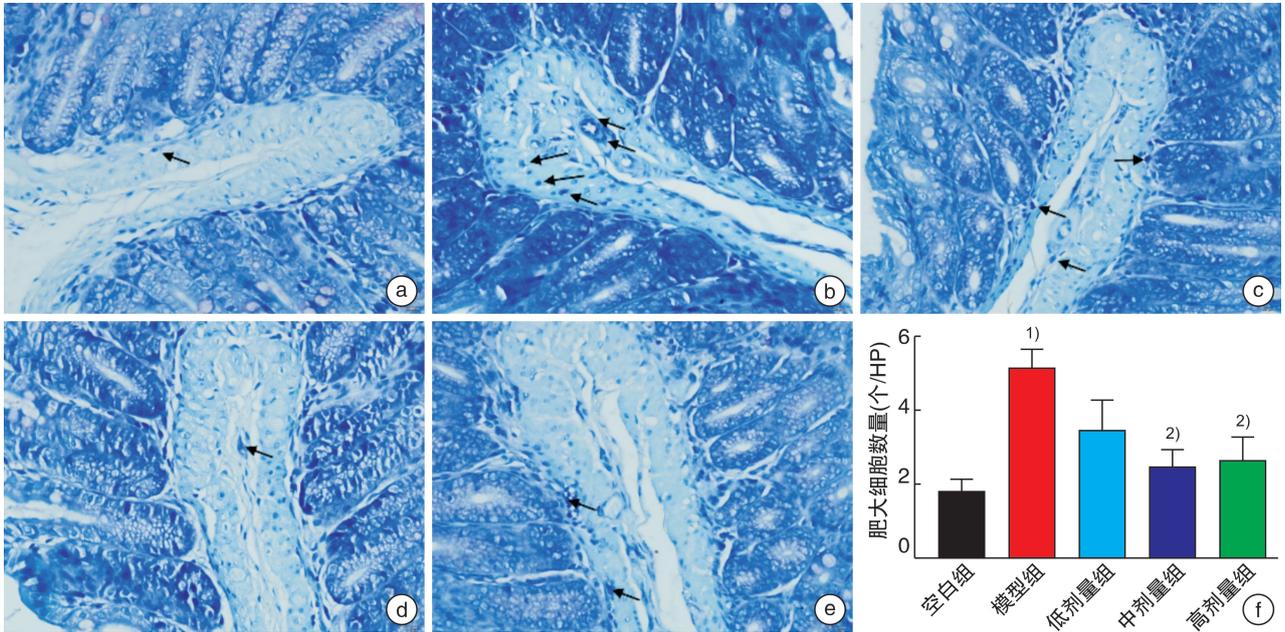
**2.7.2  $\beta$ 多样性分析**  $\beta$ 多样性是对不同样本微生物群落的多样性进行组间比较分析。如图 6 所示,空白组、模型组和痛泻安肠方组肠道微生物的组成明显分离,表明 3 个组别肠道菌群多样性发生了改变。

**2.7.3 门水平的差异** 为了评估不同群体中细菌群落的整体组成,我们进一步对有丰富度差异的群落进行了分析,如图 7 所示,在门水平上,与空白组相比,模型组拟杆菌门(Bacteroidota)丰富度降低,而厚壁菌门(Firmicutes)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)、Patescibacteria、变形菌门(Proteobacteria)以及脱硫杆菌门(Desulfobacterota)丰富度增加,经痛泻安肠方治疗 2 周后,厚壁菌门、Patesci-

bacteria、变形菌门以及脱硫杆菌门丰富度降低,而益生菌疣微菌门进一步升高( $P < 0.05$ ),对 IBS-D 产生保护作用。

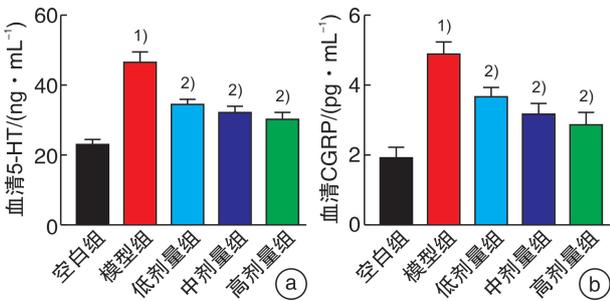
**2.7.4 属水平的差异** 如图 8 所示,属水平分析发现,与空白组相比,肝郁脾虚证 IBS-D 模型小鼠

阿克曼菌(*Akkermansia*)明显升高,而普雷沃氏菌属(*prevotellaceae\_UCG-001*)明显降低,在痛泻安肠方治疗 2 周后,优势均属阿克曼菌丰富度进一步升高,普雷沃氏菌属降低。



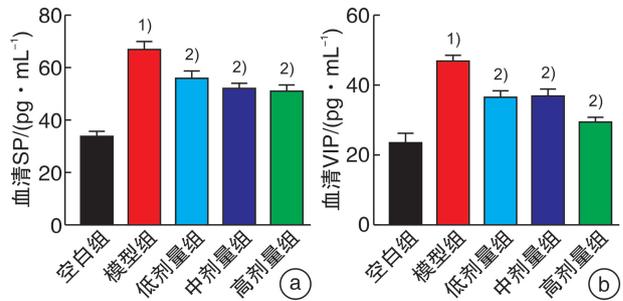
a: 空白组  $\times 400$ ; b: 模型组  $\times 400$ ; c: 低剂量组  $\times 400$ ; d: 中剂量组  $\times 400$ ; e: 高剂量组  $\times 400$ ; f: 肥大细胞数量对比。黑色箭头所示为阳性肥大细胞。与空白组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠的结肠组织肥大细胞浸润情况



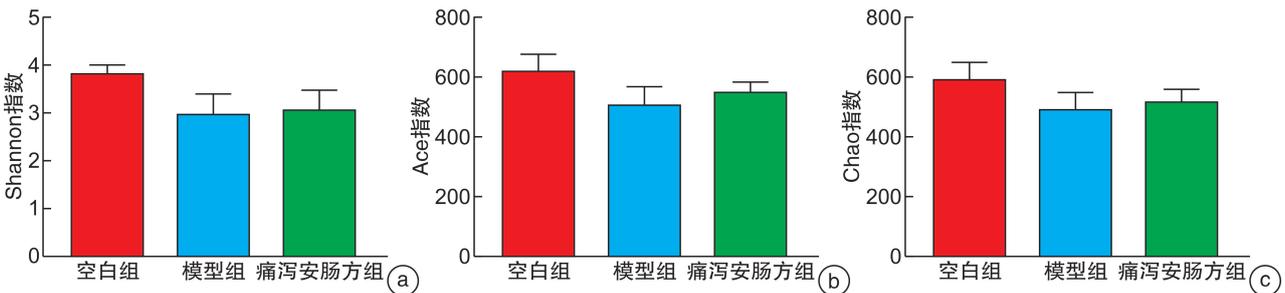
a: 血清 5-HT 的变化; b: 血清 CGRP 的变化; 与空白组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 血清 5-HT 和 CGRP 的表达比较



a: 血清 SP 的变化; b: 血清 VIP 的变化。与空白组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 血清 SP 和 VIP 的表达比较



a: Shannon 指数; b: Ace 指数; c: Chao 指数。

图 5 各组小鼠肠道菌群  $\alpha$  多样性分析

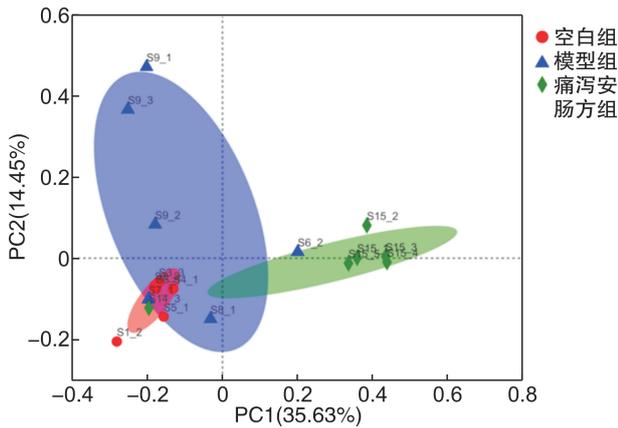
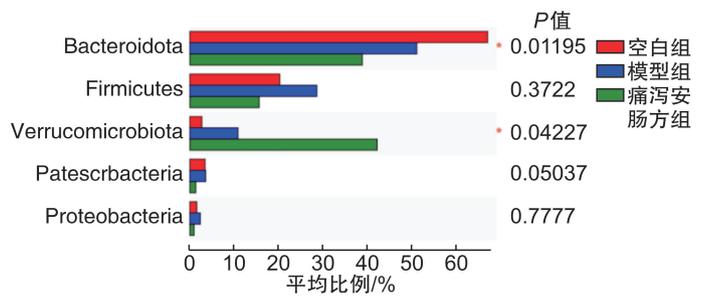
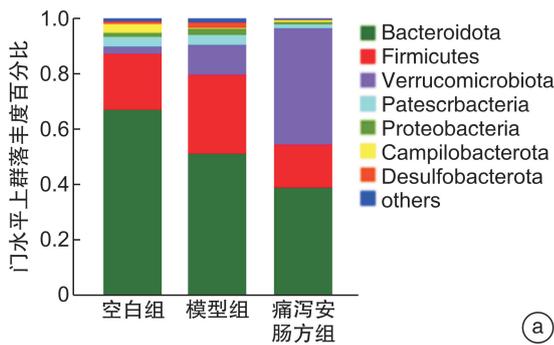


图 6 各组小鼠肠道菌群  $\beta$  多样性分析

### 3 讨论

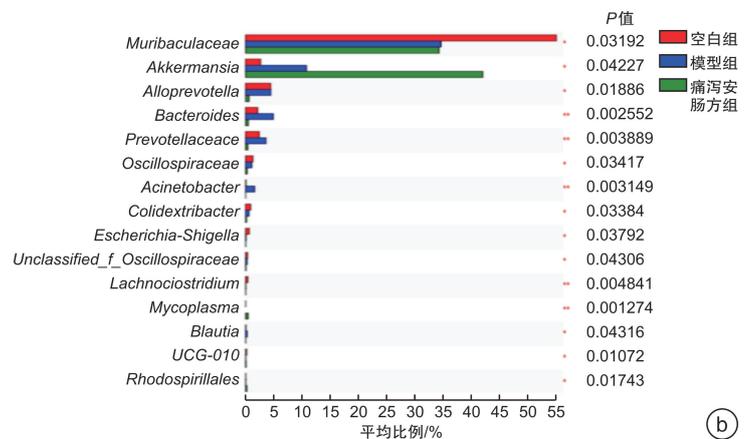
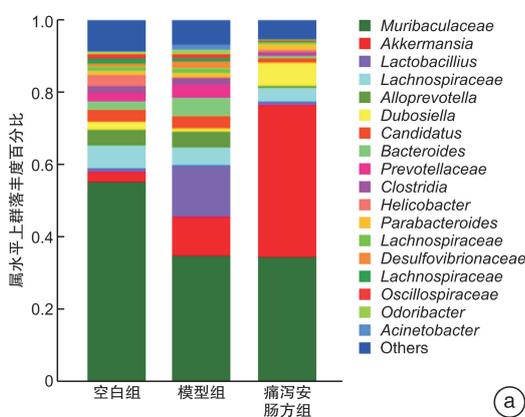
内脏高敏感性即内脏组织对各种刺激的感受性明显增强,内脏痛阈明显降低,目前其被认为是 IBS-D 的生物学标志,且是核心发病机制<sup>[12]</sup>。近年来引起 IBS-D 患者内脏高敏感性的相关研究受到

了医学界的广泛关注<sup>[13]</sup>。本研究采用番泻叶灌胃联合束缚刺激方式造模,造模周期共 2 周,造模后小鼠出现不同程度的毛发疏松,毛色枯焦无光,乏力,倦怠,喜扎堆,弓背等一般状态改变;伴随情绪不稳,灌胃抵抗,易怒,兴奋程度减低,饮食饮水量减少,大便不成形,便质稀溏、AWR 明显等变化,说明该造模方法成功复制了 IBS-D 肝郁脾虚证小鼠模型。AWR 评分是 IBS-D 小鼠内脏敏感性的直接评价指标。小鼠 AWR 评分随着直肠球囊充气压力的升高逐渐增加,经治疗之后,痛泻安肠方低剂量组小鼠在 0.25、0.35、0.50 mL 气体压力水平下 AWR 评分均显著减少,但在气体压力上升到 0.65 mL 时,小鼠 AWR 评分虽较模型组下降,但差异无统计学意义。其余中剂量及高剂量组小鼠在不同气体压力水平下 AWR 评分均显著降低,表明痛泻安肠方中剂量及高剂量能明显缓解 IBS-D 小鼠的内脏高敏感,并且以中剂量组效果最好。



a: 门水平肠道菌群组成柱状图; b: 门水平肠道菌群 Kruskal-Wallis H 差异检验图。

图 7 各组小鼠肠道菌群门水平差异分析



a: 属水平肠道菌群组成柱状图; b: 属水平肠道菌群 Kruskal-Wallis H 差异检验图。

图 8 各组小鼠肠道菌群属水平差异分析

肥大细胞广泛分布于胃肠道,是一种炎症-免疫细胞,当机体受到不同程度刺激时,肥大细胞迅速活化,释放组胺、肝素和神经生长因子及其他调

节免疫反应和神经元敏化的递质,参与调节肠道的免疫状态,调控肠道疼痛敏感性<sup>[14]</sup>。柯少雄等<sup>[15]</sup>对比了 25 例 IBS 患者与 13 例正常受试者结肠黏

膜肥大细胞数量及活化情况(肥大细胞脱颗粒),发现 IBS 患者肠黏膜肥大细胞数量及脱颗粒率明显较正常受试者升高。进一步机制研究发现,肠道肥大细胞脱颗粒率与泰氏菌的丰富度呈正相关,由此推测 IBS 患者肠道菌群的变化可能通过促进肥大细胞脱颗粒,进而激活肠道局部免疫炎症反应导致 IBS 的发生,可见肥大细胞已经成为治疗 IBS-D 的潜在靶点。针对肥大细胞的疗法,例如肥大细胞稳定剂(色甘酸和酮替芬)以及组胺和血清素受体的拮抗剂,已在 IBS 的治疗中取得了良好疗效<sup>[16]</sup>。越来越多的研究发现,中医药可以通过调节肥大细胞改善 IBS-D 内脏高敏感。任杰等<sup>[17]</sup>的研究发现,肠康方能显著改善 IBS-D 大鼠结肠黏膜肥大细胞的数量,进而调控 5-HT 信号系统,以改善大鼠肠道高敏感,发挥治疗 IBS-D 的作用。本研究采用甲苯胺蓝染色检测了各组小鼠结肠组织肥大细胞的表达,结果显示不同剂量的痛泻安肠方可以明显减轻 IBS-D 肝郁脾虚证小鼠的肥大细胞浸润,且中剂量效果最明显,提示痛泻安肠方可能通过调控肥大细胞进而发挥治疗 IBS-D 肝郁脾虚证的作用。

血清神经内分泌递质又称作脑肠肽,作为在胃肠和神经系统双重分布的激素,不仅可以参与中枢神经系统、肠神经系统以及胃肠道效应细胞之间的信号传递,实现脑-肠轴之间的互动,而且可以直接作用于胃肠道,参与调节胃肠道的内脏高敏反应,影响 IBS-D 的发生、发展。参与 IBS-D 的血清神经内分泌递质包括 5-HT、CGRP、VIP 和 SP 等<sup>[18]</sup>,这些神经内分泌递质水平变化通过调节内脏高敏感性及胃肠道动力进而参与 IBS-D 的发病机制。5-HT 是由肠嗜铬细胞合成分泌的一种重要的神经递质,其不仅可以调节 IBS-D 内脏敏感性,而且可以影响肠道免疫,调控胃肠动力以及调节患者精神心理状况,其调节内脏高敏感基于调节胃肠分泌和蠕动的作用<sup>[19]</sup>。CGRP 是一种强大的内源性血管扩张物质,能够介导痛觉的产生及痛觉过敏,在内脏疼痛的调节中起重要作用,还能参与肠道黏膜肥大细胞的募集<sup>[20]</sup>。SP 广泛分布于中枢神经系统及胃肠道,其不仅可以促进肠道平滑肌的收缩,加速胃肠蠕动,而且可以参与痛觉传递,诱发内脏高敏,与 IBS-D 的发生密切相关<sup>[21]</sup>。VIP 可以抑制胃肠道平滑肌的收缩,促进小肠中水电解质的分泌,导致腹痛腹泻等 IBS-D 的症状<sup>[22]</sup>。众多临床及基础研究均证实,IBS-D 存在神经内分泌递质水平异常,其中 5-HT、CGRP、VIP、SP 明显升高<sup>[23-25]</sup>。与这些研究相一致,在本实验中,肝郁脾虚证 IBS-D 小鼠 5-HT、CGRP、VIP、SP 明显升高,痛泻安肠方治疗可以使上述因子的水平呈不同程度降低,表明痛泻安肠方可以通过调节血清神经内分泌递质发挥治疗肝郁脾虚证 IBS-D 的作用。

肠道菌群是定居于人体肠道内数量庞大、种类繁多的微生物菌落,其中有益菌和致病菌相互制衡,相互影响,共同维持肠道微生态的平衡,对宿主的新陈代谢做出了重要的贡献。大量证据表明肠道菌群失调与 IBS-D 的发生、发展密切相关<sup>[26-28]</sup>,IBS-D 患者与正常人相比肠道菌群丰富度和多样性降低,其中,厚壁菌门、梭杆菌门和放线菌门显著减少,变形杆菌门显著增加<sup>[29]</sup>。越来越多的研究证实,肠道菌群失调会引起或加重内脏高敏感<sup>[9]</sup>。对内脏高敏感 IBS 大鼠模型的研究表明,梭菌属的丰富度与大鼠内脏的高敏反应是呈正相关的,灌胃梭菌属可以明显增加母体分离大鼠的内脏高敏感性<sup>[30]</sup>。将 IBS-D 患者粪便菌群移植到无菌小鼠肠道,发现小鼠除了胃肠动力加快、肠道屏障功能受损等症状外,还出现了焦虑样行为的心理症状,进一步说明了肠道菌群与内脏高敏的相关性<sup>[31]</sup>。因此,为了探索痛泻安肠方对 IBS-D 肝郁脾虚证小鼠肠道菌群的影响,本研究采用 16S rRNA 高通量测序技术检测空白组、IBS-D 肝郁脾虚证模型组及痛泻安肠方中剂量组小鼠肠道菌群的组成及变化。研究结果提示,痛泻安肠方可以增加 IBS-D 肝郁脾虚证小鼠肠道菌群的生物多样性,影响菌群的结构组成。进一步对小鼠粪便肠道菌群有丰富度差异的群落进行分析,发现在门水平上,痛泻安肠方治疗可以增加小鼠粪便疣微菌门的丰富度,在属水平上,痛泻安肠方明显上调了阿克曼菌的丰富度。阿克曼菌属于疣微菌门,是一种肠道益生菌,可以参与调节肠道的免疫反应及炎症反应,维持肠道的屏障功能<sup>[32]</sup>。可见调节肠道菌群可能是痛泻安肠方治疗 IBS-D 的潜在机制之一。

综上所述,痛泻安肠方对于 IBS-D 肝郁脾虚证小鼠内脏高敏感性、菌群多样性及组成结构等均具有作用,提示改善内脏高敏感、调节肠道菌群可能是痛泻安肠方治疗 IBS-D 的重要机制,为 IBS-D 的临床防治提供了新思路。然而参与 IBS-D 发病的肠道菌群结构组成复杂,目前尚未完全检测与阐释,且肠道菌群与内脏高敏感的具体机制及作用靶点尚未完全阐明,因此仍需进一步研究验证。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突。

#### 参考文献

- [1] Bonetto S, Fagoonee S, Battaglia E, et al. Recent advances in the treatment of irritable bowel syndrome [J]. *Pol Arch Intern Med*, 2021, 131(8): 709-715.
- [2] Goodoory VC, Houghton LA, Black CJ, et al. Characteristics of, and natural history among, individuals with Rome IV functional bowel disorders [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2022, 34(5): 1-11.
- [3] Xiao L, Liu Q, Luo M, et al. Gut Microbiota-Derived Metabolites in Irritable Bowel Syndrome [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11(9): 1-11.

- [4] Camilleri M. Diagnosis and Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A Review [J]. *JAMA*, 2021, 325(9):865-877.
- [5] Ancona A, Petito C, Iavarone I, et al. The gut-brain axis in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease [J]. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(3):298-305.
- [6] Chen Y, Chu F, Lin J, et al. The mechanisms of action of WeiChangAn Pill(WCAP) treat diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome( IBS-D) using network pharmacology approach and in vivo studies [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275(7):1-11.
- [7] Simrén M, Tornblom H, Palsson OS, et al. Visceral hypersensitivity is associated with GI symptom severity in functional GI disorders; consistent findings from five different patient cohorts [J]. *Gut*, 2018, 67(2):255-262.
- [8] Wang C, Fang X. Inflammation and Overlap of Irritable Bowel Syndrome and Functional Dyspepsia [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2021, 27(2):153-164.
- [9] Gu X, Song LJ, Li LX, et al. *Fusobacterium nucleatum* Causes Microbial Dysbiosis and Exacerbates Visceral Hypersensitivity in a Colonization-Independent Manner [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11(6):1-15.
- [10] 王喜红, 薛晓轩, 裴文婧, 等. 痛泻安肠方治疗肝郁脾虚证腹泻型肠易激综合症的随机对照临床研究 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2019, 27(12):887-892.
- [11] 芮晓薇, 郑思慧, 赵方敏, 等. 痛泻要方对肝郁脾虚证 IBS-D 大鼠 SCF/c-Kit 信号系统的影响 [J]. *浙江中医杂志*, 2021, 56(7):472-474.
- [12] Simren M, Tornblom H, Palsson OS, et al. Cumulative Effects of Psychologic Distress, Visceral Hypersensitivity, and Abnormal Transit on Patient-reported Outcomes in Irritable Bowel Syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(2):391-402.
- [13] 赵艳钧, 杨勤. 肠易激综合征内脏高敏感的调控机制研究进展 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2020, 25(3):407-410.
- [14] Uranga JA, Martínez V, Abalo R. Mast Cell Regulation and Irritable Bowel Syndrome: Effects of Food Components with Potential Nutraceutical Use [J]. *Molecules*, 2020, 25(18):1-30.
- [15] 柯少雄, 杨长青, 陈俊杰, 等. 肠易激综合征患者肠道菌群特征及其与肠黏膜肥大细胞活化的关系 [J]. *山东医药*, 2020, 60(2):31-34.
- [16] Zhang L, Song J, Hou X. Mast Cells and Irritable Bowel Syndrome: From the Bench to the Bedside [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2016, 22(2):181-192.
- [17] 任杰, 樊欣钰, 范志巍, 等. 肠康方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠肥大细胞的影响 [J]. *中医药信息*, 2020, 37(3):35-39.
- [18] 臧希, 窦志芳. 脑肠肽与肠易激综合征相关性研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(12):110-115.
- [19] 苏海霞, 付兆媛, 高永泽, 等. 5-羟色胺与腹泻型肠易激综合征相关性及其中医药调控研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2022, 22(11):1-9.
- [20] Sun H, Ma Y, An S, et al. Altered gene expression signatures by calcitonin gene-related peptide promoted mast cell activity in the colon of stress-induced visceral hyperalgesia mice [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2021, 33(6):1-12.
- [21] 杨焱麟, 陈敏, 周彦妮, 等. P 物质与肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征关系及中医药调控的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(9):82-85.
- [22] 张艳霞, 赵蓉, 吕双然, 等. 腹泻型肠易激综合征中医证候分布与 VIP、SP、5-HT 动态变化的相关性分析 [J]. *河北中医药学报*, 2022, 37(1):17-20.
- [23] 顾浩然, 徐陆周. 白石温脾汤治疗腹泻型肠易激综合征 30 例临床观察 [J]. *湖南中医杂志*, 2022, 38(3):13-17.
- [24] 杜光信, 冯群虎, 胡建文, 等. 半夏泻心汤加减治疗肠易激综合征患者腹痛的疗效及对血清 5-HT、VIP、SP 水平的影响 [J]. *中国肛肠病杂志*, 2022, 42(8):44-47.
- [25] 王科凯, 杨焱麟, 周彦妮, 等. 痛泻要方拆方对腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽的影响研究 [J]. *中国全科医学*, 2022, 22(9):1-7.
- [26] 戴莉莉, 姜正艳, 孙志广. 肠易激综合征与肠道菌群的相关研究进展 [J]. *中国临床研究*, 2021, 34(9):1261-1264.
- [27] Sciaivilla P, Strati F, Di Paola M, et al. Gut microbiota profiles and characterization of cultivable fungal isolates in IBS patients [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(8):3277-3288.
- [28] Peng Y, Zhang S, Liu Z, et al. Gut microbiota and Chinese medicine syndrome: altered fecal microbiotas in spleen(Pi)-deficient patients [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 40(1):137-143.
- [29] Mei L, Zhou J, Su Y, et al. Gut microbiota composition and functional prediction in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *BMC gastroenterol*, 2021, 21(1):1-12.
- [30] Zhou XY, Li M, Li X, et al. Visceral hypersensitive rats share common dysbiosis features with irritable bowel syndrome patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(22):5211-5227.
- [31] De Palma G, Lynch MD, Lu J, et al. Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(379):1-14.
- [32] Cani PD, Depommier C, Derrien M, et al. *Akkermansia muciniphila*: paradigm for next-generation beneficial microorganisms [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(10):625-637.

(收稿日期:2022-10-08)