

# 加味四逆散调控短链脂肪酸代谢抑制 HMGB1/RAGE 信号通路改善慢性应激大鼠肠黏膜屏障的作用及机制

柯友兰<sup>1,2</sup>, 岳滢滢<sup>1,2\*</sup>, 王子成<sup>1,2</sup>, 尚瑶雪<sup>1,2</sup>, 周贤<sup>1,2</sup>, 陈雨<sup>1,2</sup>, 刘松林<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北时珍实验室, 武汉 430061)

**[摘要]** 目的:通过观察加味四逆散对慢性应激大鼠肠道短链脂肪酸(SCFAs)和高迁移率族蛋白B1(HMGB1)/晚期糖基化终产物受体(RAGE)信号通路的影响,探讨其改善肠黏膜屏障的作用及机制。方法:将50只雄性SD大鼠随机分为空白组,模型组,加味四逆散低、高剂量组(7.34、14.68 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和低聚果糖组(3.15 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),每组10只。除空白组外,其余各组采取慢性不可预知性应激结合孤养法制作慢性应激模型6周,造模4周后,各给药组在造模的同时给予相应药物灌胃2周,空白组和模型组给予相同体积的生理盐水。观察加味四逆散对大鼠行为学、体质量、粪便Bristol评分及粪便含水率的影响;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠盲肠组织的病理变化;气相色谱-质谱法(GC-MS)检测大鼠盲肠内容物中SCFAs的含量;免疫组化法(IHC)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠盲肠组织中HMGB1/RAGE信号通路相关蛋白表达;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠盲肠组织中闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、咬合蛋白(Occludin)和闭合蛋白-1(Claudin-1)的含量。结果:与模型组比较,加味四逆散低剂量组大鼠的糖水偏好率、旷场实验的总运动距离和穿越格子数均明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),加味四逆散低、高剂量组大鼠旷场实验静止时间和强迫游泳不动时间均明显减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );加味四逆散低、高剂量组大鼠粪便Bristol评分、粪便含水率均明显上升( $P<0.05$ )。加味四逆散低剂量组盲肠组织黏膜层结构完整,炎症细胞浸润减少;盲肠内容物中SCFAs的含量均上升,其中乙酸、丙酸、丁酸、异戊酸的含量明显上升( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );盲肠组织中HMGB1、RAGE、Toll样受体2(TLR2)、Toll样受体4(TLR4)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、核转录因子- $\kappa$ B p65亚基(NF- $\kappa$ B p65)蛋白的表达水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );盲肠组织中ZO-1、Occludin和Claudin-1的含量均显著上升( $P<0.01$ )。结论:加味四逆散能够改善慢性应激大鼠肠黏膜屏障功能,其作用机制可能与提高肠道中SCFAs含量,抑制HMGB1/RAGE信号通路有关。

**[关键词]** 加味四逆散; 慢性应激; 短链脂肪酸(SCFAs); 高迁移率族蛋白B1(HMGB1)/晚期糖基化终产物受体(RAGE)信号通路; 肠黏膜屏障

[中图分类号] R242;R574;R256.3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)09-0031-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251595

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250421.1014.008>

[网络出版日期] 2025-04-21 11:44:13



## Effect and Mechanism of Modified Sini San on Improving Intestinal Mucosal Barrier of Chronic Stress Rats via Regulating Short-chain Fatty Acid Metabolism and Inhibiting HMGB1/RAGE Signaling Pathway

KE Youlan<sup>1,2</sup>, YUE Yingying<sup>1,2\*</sup>, WANG Zicheng<sup>1,2</sup>, SHANG Yaoxue<sup>1,2</sup>, ZHOU Xian<sup>1,2</sup>,  
CHEN Yu<sup>1,2</sup>, LIU Songlin<sup>1,2\*</sup>

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430061, China)

[收稿日期] 2025-03-26

[基金项目] 湖北省卫生健康委重点项目(WJ2023Z002);湖北省自然科学基金项目(2024AFD325);湖北省中医药管理局中医药科研项目(ZY2023F132);湖北省中医药重点学科建设项目——伤寒学(鄂中医通[2023]2号);中华中医药学会青年人才托举工程项目(2024-QNRC2-B31)

[第一作者] 柯友兰,博士,医师,从事经方的临床运用与实验研究,E-mail:314326734@qq.com

[通信作者] \*岳滢滢,博士,副教授,从事经方的临床运用与实验研究,E-mail:yueyingingelais@163.com;

\*刘松林,博士,教授,从事经方防治重大疾病的临床基础研究,Tel:027-68889093,E-mail:newforest@163.com

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect and mechanism of modified Sini San in ameliorating intestinal mucosal barrier by observing its effects on short chain fatty acids (SCFAs) and high mobility group protein B1 (HMGB1)/receptor of advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways in chronic stress rats. **Methods:** The 50 male SD rats were randomly divided into control group, model group, low-dose modified Sini San group ( $7.34 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), high-dose modified Sini San group ( $14.68 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), and Fructo-oligosaccharides group ( $3.15 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), with 10 rats in each group. Except for the control group, all other groups were subjected to chronic unpredictable stress/social isolation to create a chronic stress model for 6 weeks. After 4 weeks of modeling, each treatment group was given corresponding drugs by gavage for 2 weeks while modeling. The control group and model group were given the same volume of physiological saline. The effects of Modified Sini San on behaviors, body weight, Bristol score in feces and fecal moisture content in chronic stress rats were observed. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the cecum. The content of SCFAs in the cecal contents of rats were detected by Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of HMGB1/RAGE pathway related proteins in cecal tissue. The levels of ZO-1, Occludin, and Claudin-1 in the cecal tissue were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with the model group, the sucrose preference rate, total distance traveled and the number of grid crossings in the open field test of rats in the low-dose modified Sini San group were obviously increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the immobility time in the open field test and the immobility time in the forced swimming test of rats in the low-dose and high-dose modified Sini San groups were obviously reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Meanwhile, the Bristol score and fecal moisture content of rats in the low and high dose groups of modified Sini San were obviously increased ( $P<0.05$ ). The low-dose group of modified Sini San had intact mucosal layer structure in the cecal tissue and reduced infiltration of inflammatory cells. The content of SCFAs in the cecal contents increased, with a obviously increase in the content of acetic acid, propionic acid, butyric acid, and isovaleric acid ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and the expression levels of HMGB1, RAGE, Toll-like receptor 2 (TLR2), Toll-like receptor 4 (TLR4), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and nuclear factor kappa-B p65 (NF- $\kappa$ B p65) proteins in cecal tissue were significantly decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) in low-dose group of modified Sini San. Meanwhile, the contents of ZO-1, Occludin, and Claudin-1 in the cecal tissue were obviously increased ( $P<0.01$ ) in low-dose group of modified Sini San. **Conclusion:** Modified Sini San can improve the function of intestinal mucosal barrier in chronic stress rats by increasing the content of SCFAs in the intestine and inhibiting the HMGB1/RAGE pathway.

**[Keywords]** modified Sini San; chronic stress; short-chain fatty acids; high mobility group protein B1 (HMGB1)/receptor of advanced glycation end products (RAGE) signaling pathway; intestinal mucosal barrier

慢性应激是指机体在长期缓慢的社会环境及精神压力下形成的一种生理及心理障碍<sup>[1]</sup>。当今社会生活节奏逐渐加快,人们常因社会压力、不良情绪而长期处于慢性应激的状态中,使得社会和精神因素引发的疾病不断增多,严重危害社会公共健康。胃肠功能极易受到内外环境及情绪等刺激的影响,因此慢性应激已成为影响胃肠功能的重要病因之一<sup>[2]</sup>。有研究表明,50%的功能性胃肠病患者存在心理障碍,也有50%的心理障碍患者首发症状为胃肠功能紊乱,二者相互影响、恶性循环<sup>[3]</sup>,其共病机制与慢性应激触发肠道炎症,破坏肠黏膜屏障有关<sup>[4]</sup>。

中医认为肝郁日久,影响及胃,与慢性应激引起的胃肠功能紊乱在病因、症状及治疗方面显著相似<sup>[5]</sup>。加味四逆散是国医大师梅国强教授在长期临床实践基础上,以四逆散为基础方加味拟定的治疗肝胃不和证的经验方。前期研究发现,加味四逆散通过调节肠道菌群及其代谢产物,抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体激活,增强肠道屏障功能<sup>[6-7]</sup>。最新研究发现,慢性应激会降低肠道短链脂肪酸(SCFAs)的水平<sup>[8]</sup>,且与

炎症相关的肠黏膜屏障功能受损常是慢性应激导致胃肠功能紊乱的重要病理改变<sup>[9]</sup>。而益生元低聚果糖(FOS)能上调肠黏膜紧密连接蛋白的表达以维持肠黏膜屏障的完整性<sup>[10]</sup>。本实验中阳性对照组使用FOS,有助于明确加味四逆散的作用机制。

SCFAs是碳水化合物经肠道菌群厌氧发酵的主要最终产物,包含乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸等,是肠道菌群最重要的代谢产物之一。SCFAs是肠上皮细胞(IEC)的重要能量来源,可以通过不同的机制调节IEC的增殖、分化及肠内分泌细胞等亚群的功能,从而增强肠道屏障功能及宿主代谢<sup>[11]</sup>。补充SCFAs可以抑制Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)炎症信号通路的激活,减轻肠道炎症,并上调闭锁小带蛋白-1(ZO-1)和咬合蛋白(Occludin)等紧密连接蛋白的水平,改善肠道屏障功能<sup>[12]</sup>。

心理和身体应激可通过损伤相关分子模式释放内源性危险分子,诱导细胞外高迁移率族蛋白B1(HMGB1)主动分泌或被动释放,激活免疫系统,继而促进炎症反应<sup>[13-14]</sup>。HMGB1与其配体晚期糖基化终产物受体(RAGE)结合后,通过Toll样受体

(TLR)2/TLR4发出信号,激活NF- $\kappa$ B,启动NLRP3炎症小体,释放促炎细胞因子,改变肠黏膜通透性<sup>[15-16]</sup>。即慢性应激可降低肠道SCFAs水平,诱导肠黏膜HMGB1/RAGE信号通路激活,加剧肠道炎症,导致肠黏膜屏障受损,引起肠功能紊乱。因此,本研究从肠道SCFAs代谢及HMGB1/RAGE信号通路的角度,深入探讨加味四逆散对慢性应激大鼠肠黏膜屏障的保护作用。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级6周龄健康SD雄性大鼠50只,体质量170~190 g,购于湖北省疾病预防控制中心,合格证号SCXK(鄂)2020-0018。动物饲养于湖北中医药大学实验动物中心SPF级大鼠实验室,室温(24±2)℃,相对湿度(55±15)%,光照强度(225±75) lux,明暗各12 h。

**1.2 伦理** 实验经湖北中医药大学伦理委员会批准(伦理批号HUCMS00285145)。

**1.3 药物** 加味四逆散由柴胡10 g、炒枳实10 g、白芍10 g、郁金10 g、砂仁10 g、焦白术15 g、广木香10 g、黄连6 g、吴茱萸6 g、炙甘草6 g组成,上述饮片购自湖北省中医院凤凰门诊部(批号分别为20200401、2020006102、202009010、202009015、2020004105、200702、202008014、2020912102、2020912104、202009004)。经湖北中医药大学基础医学院曾祥法教授鉴定为正品,并符合2020年版《中华人民共和国药典》使用规范。FOS购自量子高科生物股份有限公司(批号2010192134, FOS总含量≥95.0%)。

**1.4 试剂** 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉四维加生物科技有限公司,货号G1120);高效液相色谱法(HPLC)级正丁醇、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)试剂盒(赛默飞世尔科技公司,货号分别为A383-4、A53225);乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸对照品(广州佳途科技股份有限公司,货号分别为CCFD200033、CCFD200222、CCFD200063、CCEM500589、CCFD200195、CCPD101342,纯度分别为99.80%、97.50%、98.10%、99.80%、99.20%、99.70%);2-乙基丁酸(上海源叶生物科技有限公司,货号B65222,纯度98%)。HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B p65、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )抗体(美国Affinity公司,货号分别为AF7020、AF7017、BF8005、AF7014);RAGE抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号16346-1-AP);TLR2、NF- $\kappa$ B、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Abcam公司,货号分别

为ab209217、ab32360、ab8245);羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号分别为E-AB-1003、E-AB-1001);ZO-1、Occludin试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号分别为CSB-E17287r、CSB-E17291r),闭合蛋白-1(Claudin-1)试剂盒(泉州睿信生物科技有限公司,货号RX302726R);2%戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,货号RC-2016-097)。

**1.5 仪器** JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机、DM2000型光学显微镜、DM750型正置荧光显微镜、DM750型成像系统(上海徕卡仪器有限公司);MJPRO-YQ-105型Agilent 8890B-5977B气相色谱-质谱联用仪(安捷伦科技有限公司);DYY-6C型电泳仪、DYCZ-40D型转膜槽(北京六一生物科技有限公司);DR-200Bs型酶标仪(美国Diatek公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 按处方准确称取各味药材置于圆底烧瓶中,用10倍纯水浸泡1 h后,采用水蒸汽蒸馏法提取8 h,收集液体即得加味四逆散挥发油及芳香水;再将上述抽滤液加无水乙醇至70%浓度,醇沉过夜,浓缩抽滤液,冷冻干燥,得到加味四逆散浸膏;最后用蒸馏水稀释浸膏,然后加入适量1%的聚山梨酯-80与挥发油、芳香水共同研磨,分别用蒸馏水配制成浓度为100%、200%的灌胃药液,生药量分别为0.56、1.12 g·mL<sup>-1</sup>,分装、灭菌,贮存于4℃冰箱内备用。根据课题组前期实验结果<sup>[17]</sup>和《药理实验方法学》<sup>[18]</sup>计算,按成人体质量70 kg临床等效剂量折算,以大鼠体表面积换算,加味四逆散低剂量组的药物使用剂量为临床成人用量的5.52倍,计算出的等效剂量为7.34 g·kg<sup>-1</sup>。因此本研究中的加味四逆散低剂量组(100%)和加味四逆散高剂量组(200%)的给药剂量分别为7.34、14.68 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。FOS参考《药理实验方法学》<sup>[18]</sup>计算,按成人体质量70 kg临床等效剂量折算,用生理盐水配置水溶液,按3.15 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的剂量灌胃,现用现配。药物干预每日1次,连续2周。所有大鼠均予以普通饲料喂养。

**2.2 动物造模与分组** 适应性喂养1周后根据体质量将50只大鼠随机分为空白组,模型组,加味四逆散低、高剂量组,低聚果糖组,每组10只。参考文献报道[19],采取慢性不可预知性应激结合孤养法制作慢性应激模型,并根据糖水偏好实验、旷场实验、强迫游泳实验等行为学进行模型评价<sup>[20]</sup>。除空

白组合笼喂养,其余各组大鼠单笼喂养,并每天随机接受1种应激刺激:包括断水24 h、断食24 h、夹尾1 min、4 °C冰水游泳5 min、摇晃(1次/s,持续5 min)、束缚2 h、昼夜颠倒<sup>[6]</sup>。每周每种刺激不重复,造模时间共计6周。从第5周开始,加味四逆散低、高剂量组和低聚果糖组在造模的同时灌胃2周,药物用量见2.1项,空白组和模型组给予等体积的生理盐水。

**2.3 样本收集** 各组大鼠禁食12 h后,2%戊巴比妥钠(50 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉大鼠,每组编号1~7的大鼠在无菌条件下取盲肠内容物2 mL,首先用无菌镊子确定回肠与盲肠的交界处并固定住盲肠,将盲肠内容物挤至无菌冻存管中,同时取盲肠组织1~2 cm,液氮速冻后置入-80 °C冰箱冻存。每组编号8~10的大鼠经心脏行灌注固定后将整块的盲肠组织分离,在4%多聚甲醛固定液中4 °C继续固定4~6 h,备用,石蜡包埋。

## 2.4 观察指标

### 2.4.1 行为学评价

**2.4.1.1 糖水偏好实验** 正式开始前需单笼饲养,进行糖水适应。第1天每笼放置两瓶1%的蔗糖溶液,第2天每笼放置1瓶1%蔗糖溶液和1瓶超纯水,位置随机,12 h后交换水瓶位置。糖水适应结束后禁食水24 h后,每笼放置事先称好质量的1瓶1%蔗糖溶液和1瓶超纯水。1 h后交换水瓶位置,2 h后取下水瓶再次称质量,并计算大鼠的糖水偏好率。糖水偏好率=糖水消耗量/(糖水消耗量+超纯水消耗量)×100%<sup>[20]</sup>。

**2.4.1.2 旷场实验** 制备大鼠旷场实验反应箱(90 cm×90 cm×45 cm),内壁涂暗,调整旷场实验装置的摄像头,使镜头对准箱底。于暗室环境安静情况下测试,将实验动物放入旷场实验反应箱中央,应用SMART 3.0动物行为学视频采集系统(西班牙Panlab公司)记录5 min内旷场实验大鼠影像,并分析后3 min内大鼠的总运动距离、穿越格子数和静止时间。每次放入1只大鼠,单次实验结束后,用75%乙醇擦拭反应箱的内壁和底部,以清除粪便、尿液等残留物,待乙醇气味散尽后进行下一次实验,以避免大鼠之间的气味相互影响<sup>[20]</sup>。

**2.4.1.3 强迫游泳实验** 实验前1 d进行1次预游泳,时间为15 min。实验时,将大鼠放入游泳水箱中(24~26) °C,记录大鼠6 min并分析后4 min的不动时间,即大鼠在水中停止挣扎、呈漂浮状态,或仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面的时间<sup>[20]</sup>。

### 2.4.2 体质量及粪便Bristol评分、粪便含水率检测

每周同一时间将大鼠放入电子秤内测量体质量。粪便Bristol评分在末次给药结束后12 h,取材前进行。将各组大鼠放置于代谢笼中,单笼饲养,收集其12 h内的粪便,并对大鼠粪便进行Bristol评分<sup>[21]</sup>,具体分型标准为分离的硬团(1分);表面凹凸的团块(2分);干裂的香肠状(3分);光滑柔软的香肠状(4分);分散的软团块(5分);泥浆糊状(6分);水样便(7分)。然后称其湿质量,记录后将粪便置于烘干箱2 h,之后再次称重并记录。粪便含水率=(烘干前鼠粪质量-烘干后鼠粪质量)/烘干前鼠粪质量×100%。

**2.4.3 大鼠盲肠组织病理形态学观察** 盲肠组织用4%多聚甲醛固定后,用梯度乙醇脱水后石蜡包埋,将组织切成4 μm厚的切片,采用HE染色,通过显微镜观察盲肠组织病理改变。

### 2.4.4 大鼠盲肠内容物SCFAs含量测定

**2.4.4.1 SCFAs标准液配制** 取正丁醇(HPLC级)9 840 μL,依次加入适量乙酸(6 000 mg·L<sup>-1</sup>)、丙酸(3 000 mg·L<sup>-1</sup>)、丁酸(500 mg·L<sup>-1</sup>)、异丁酸(500 mg·L<sup>-1</sup>)、戊酸(500 mg·L<sup>-1</sup>)、异戊酸(1 000 mg·L<sup>-1</sup>)标准品,混匀后得到6种SCFAs的混标储备液A。取正丁醇9 990 μL,加入内标2-乙基丁酸10 μL,混匀后得到内标储备液B。用正丁醇将A溶液稀释成8个不同浓度的工作液。见表1

表1 SCFAs混标、内标梯度浓度信息

Table 1 Information of SCFAs mix acid mixed standard and internal standard gradient concentration mg·L<sup>-1</sup>

名称	1	2	3	4	5	6	7	8
乙酸	0.48	4.8	24	144	300	360	480	600
丙酸	0.24	2.4	12	72	150	180	240	300
丁酸	0.04	0.4	2	12	25	30	40	50
异丁酸	0.04	0.4	2	12	25	30	40	50
戊酸	0.04	0.4	2	12	25	30	40	50
异戊酸	0.08	0.8	4	24	50	60	80	100

**2.4.4.2 样本处理** 称取盲肠内容物样本20 mg,加入0.5%磷酸水(含B液)800 μL,冷冻研磨3 min,超声10 min(功率300 W),于4 °C离心15 min(11 480 r·min<sup>-1</sup>,离心半径9.5 cm),取上清200 μL后并加正丁醇溶剂200 μL萃取,低温超声10 min,4 °C离心5 min(13 000 r·min<sup>-1</sup>),取上清上机检测。

**2.4.4.3 气相色谱-质谱法(GC-MS)检测条件** 色谱条件:采用惠普游离脂肪酸固定相(HP FFAP)毛

细管柱(0.25 mm×30 m, 0.25 μm);载气为高纯氦气(纯度≥99.999%),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,进样口温度为 180 °C。进样量 1 μL,分流进样,分流比 10:1,溶剂延时 2.5 min。程序升温:柱温箱初始温度 80 °C,以 20 °C·min<sup>-1</sup>升温至 120 °C,以 5 °C·min<sup>-1</sup>升温至 160 °C,后运行 220 °C保持 3 min。

质谱条件:电子轰击离子源(EI),离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,传输线温度 250 °C,电子能量 70 eV。扫描模式为选择离子扫描模式。

**2.4.4.4 数据分析** 将不同浓度的A溶液按照前述相关条件进样检测,以目标分析物的色谱峰面积与内标的峰面积比值为纵坐标,以质量浓度为横坐标,绘制不同 SCFAs 的线性回归标准曲线,并根据线性方程计算出待测样品的浓度,再根据取样量计算实际含量。计算公式:样品 SCFAs 含量(mg·g<sup>-1</sup>)=(上机测定浓度×定容体积)/样本质量。

**2.4.5 免疫组化法(IHC)检测大鼠盲肠组织 HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF-α、NF-κB 蛋白的表达水平** 盲肠组织切片依次经二甲苯脱蜡、抗原修复后,加入一抗 HMGB1(1:50)、RAGE(1:200)、TLR2(1:500)、TLR4(1:200)、TNF-α(1:100)、NF-κB(1:100),于湿盒内 4 °C 孵育过夜后加入二抗,室温孵育 50 min,待 DAB 显色后,苏木素复染细胞核,封片。计算各蛋白表达水平。

**2.4.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠盲肠组织中 HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF-α、NF-κB p65 蛋白的表达水平** 取冻存盲肠组织,加入 10 倍体积的 RIPA 裂解液,冰浴匀浆,冰浴裂解 30 min,4 °C 离心 5 min(12 000 r·min<sup>-1</sup>,离心半径 7.5 cm),收集上清,即为盲肠组织总蛋白溶液。使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。十二烷基硫酸钠-聚

丙烯酰胺凝胶电泳分离盲肠组织蛋白,转膜后加入 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,依次加入 HMGB1(1:1 000)、RAGE(1:1 000)、TLR2(1:1 000)、TLR4(1:1 000)、TNF-α(1:500)、NF-κB p65(1:1 000)、GAPDH(1:10 000)一抗,4 °C 孵育过夜。二抗(1:3 000)孵育 1 h,加入 ECL 混合溶液,显影,将胶片进行扫描存档,ImageJ 软件处理系统分析目标带的吸光度。

**2.4.7 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠盲肠组织中 ZO-1、Occludin、Claudin-1 的含量** 取盲肠组织提取的上清液,按照说明书使用对应的 ELISA 试剂盒检测大鼠盲肠组织中 ZO-1、Occludin、Claudin-1 的含量。

**2.5 统计学处理** 使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据统计分析,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。数据呈正态分布且方差齐时,组间数据比较使用 *t* 检验;数据不满足正态或方差齐性时,采用非参数秩和检验,*P*<0.05 表明差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 加味四逆散对慢性应激大鼠行为学的影响

与空白组比较,模型组大鼠的糖水偏好率、旷场实验的总运动距离和穿越格子数均明显降低(*P*<0.05, *P*<0.01),旷场实验静止时间和强迫游泳不动时间均显著增加(*P*<0.01),提示造模成功,与前期研究及文献报道一致<sup>[7,20]</sup>。与模型组比较,加味四逆散低剂量组和低聚果糖组大鼠的糖水偏好率、旷场实验的总运动距离和穿越格子数均明显升高(*P*<0.05, *P*<0.01),旷场实验静止时间和强迫游泳不动时间均明显减少(*P*<0.05, *P*<0.01),加味四逆散高剂量组大鼠的旷场实验静止时间和强迫游泳不动时间均明显减少,差异具有统计学意义(*P*<0.05, *P*<0.01)。见表 2。

表 2 加味四逆散对慢性应激大鼠行为学的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of modified Sini San on behaviors in chronic stress rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	糖水偏好率 (n=9)/%	旷场实验(n=8)			强迫游泳不动时间 (n=9)/s
			总运动距离/cm	穿越格子数	静止时间/s	
空白组		79.04±9.35	512.84±149.26	21.38±2.97	98.02±34.23	54.11±19.32
模型组		45.78±10.24 <sup>2)</sup>	354.85±76.24 <sup>1)</sup>	16.13±3.68 <sup>2)</sup>	190.34±20.44 <sup>2)</sup>	145.22±34.64 <sup>2)</sup>
加味四逆散低剂量组	7.34	72.33±20.75 <sup>4)</sup>	480.39±96.96 <sup>3)</sup>	20.88±2.53 <sup>4)</sup>	139.75±29.00 <sup>4)</sup>	63.33±17.37 <sup>4)</sup>
加味四逆散高剂量组	14.68	59.14±17.36	405.98±125.84	18.25±2.12	133.45±28.68 <sup>4)</sup>	103.67±25.35 <sup>3)</sup>
低聚果糖组	3.15	68.75±11.52 <sup>4)</sup>	453.41±96.92 <sup>3)</sup>	21.88±2.95 <sup>4)</sup>	145.28±22.73 <sup>4)</sup>	98.67±41.35 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>*P*<0.05,<sup>2)</sup>*P*<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>*P*<0.05,<sup>4)</sup>*P*<0.01(表3、表4、表6-表9同)

**3.2 加味四逆散对慢性应激大鼠体质量、粪便 Bristol 评分、粪便含水率的影响** 与空白组比较,模

型组大鼠的体质量、粪便 Bristol 评分、粪便含水率均明显下降(*P*<0.05, *P*<0.01)。与模型组比较,加味

四逆散低、高剂量组及低聚果糖组大鼠的体质量均显著增加( $P<0.01$ )。并且加味四逆散低、高剂量组大鼠的粪便 Bristol 评分、粪便含水率均明显升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,低聚果糖组大鼠的粪便含水率明显上升显著升高,差异具有统计学意义

( $P<0.01$ )。见表3。

加味四逆散低剂量为临床等效剂量,因其对粪便性状和粪便含水率的影响明显优于高剂量组,结合行为学结果和前期研究<sup>[6]</sup>,本研究选用低剂量组大鼠开展后续实验。

表3 加味四逆散对慢性应激大鼠体质量、粪便 Bristol 评分、粪便含水率的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Effect of modified Sini San on body weight, Bristol score for fecal characteristics, fecal water content in chronic stress rats ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	体质量( $n=10$ )/g	粪便 Bristol 评分( $n=9$ )/分	粪便含水率( $n=9$ )/%
空白组		427.80±25.29	3.44±0.53	58.24±11.21
模型组		335.40±17.92 <sup>2)</sup>	2.44±0.88 <sup>1)</sup>	42.01±9.86 <sup>2)</sup>
加味四逆散低剂量组	7.34	391.80±18.98 <sup>4)</sup>	3.22±0.44 <sup>3)</sup>	56.62±4.39 <sup>3)</sup>
加味四逆散高剂量组	14.68	372.90±20.74 <sup>4)</sup>	3.11±0.33 <sup>3)</sup>	51.53±8.09 <sup>3)</sup>
低聚果糖组	3.15	384.70±25.27 <sup>4)</sup>	2.78±0.67	54.28±10.06 <sup>3)</sup>

**3.3 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠黏膜形态病理学变化的影响** 盲肠组织 HE 染色结果表明,空白组大鼠盲肠组织黏膜形成的皱襞排列整齐均匀,无断裂,肠腺、血管分布于固有层和黏膜下层内。模型组大鼠盲肠组织黏膜上皮形成的皱襞杂乱无章,且有断裂;黏膜及黏膜下层可见炎症细胞浸润;黏膜肌层不清晰,厚度不均一。与模型组比较,加味四逆散低剂量组和低聚果糖组大鼠盲肠组织黏膜层结构完整,炎性细胞浸润有所好转,无明显损伤。与空白组比较,模型组大鼠盲肠隐窝深度显著增加,隐窝密度显著降低( $P<0.01$ )。而加味四逆散低剂量组和低聚果糖组大鼠盲肠隐窝深度较模型组明显降低,隐窝密度明显增高( $P<0.05, P<0.01$ )。见图1和表4。

表4 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠隐窝深度和密度的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of modified Sini San on crypt depths and crypt densities of cecal tissue in chronic stress rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

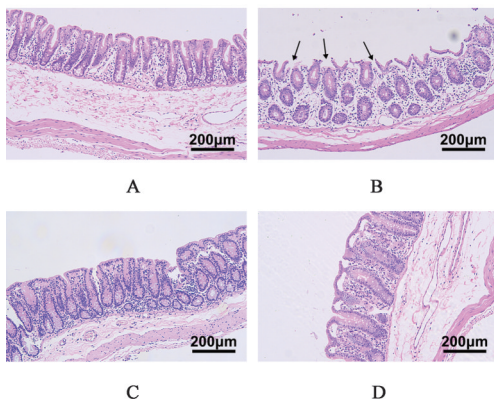
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	盲肠隐窝深度/mm	盲肠隐窝密度/个/ $\text{mm}^2$
空白组		0.28±0.02	55.34±2.93
模型组		0.34±0.02 <sup>2)</sup>	41.47±1.78 <sup>2)</sup>
加味四逆散低剂量组	7.34	0.29±0.02 <sup>3)</sup>	51.04±1.75 <sup>4)</sup>
低聚果糖组	3.15	0.30±0.02 <sup>3)</sup>	54.16±4.48 <sup>3)</sup>

**3.4 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠内容物中 SCFAs 含量的影响** SCFAs 的标准曲线见表5,所有指标的 $R^2$ 均 $>0.99$ ,满足线性要求。与空白组比较,模型组中的乙酸、丙酸、异丁酸、戊酸和异戊酸的含量均明显下降( $P<0.05, P<0.01$ ),丁酸的含量有下降趋势,但差异无统计学意义。经过加味四逆散的治疗后,乙酸、丙酸、丁酸和异戊酸的含量明显上升( $P<0.05, P<0.01$ )。异丁酸和戊酸的含量有上升趋势,但差异无统计学意义。而低聚果糖则可以显著上调丙酸的含量( $P<0.01$ )。见表6。

表5 不同 SCFAs 的标准曲线

Table 5 Standard curves of different SCFAs

SCFAs	标准曲线	$R^2$	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
乙酸	$Y=0.3776X-0.0032$	0.996	4.8~600
丙酸	$Y=0.1285X-0.0018$	0.995	2.4~300
丁酸	$Y=0.2745X-0.0023$	0.998	2.4~300
异丁酸	$Y=0.1790X-0.0043$	0.994	1.2~150
戊酸	$Y=0.3484X-0.0041$	0.997	0.4~50
异戊酸	$Y=0.3428X-0.0063$	0.997	0.8~100



注:A.空白组;B.模型组;C.加味四逆散低剂量组;D.低聚果糖组(图2和图3同)

图1 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠组织病理学改变的影响(HE,  $\times 100$ )

Fig. 1 Effect of modified Sini San on pathological changes of cecal tissue in chronic stress rats (HE,  $\times 100$ )

表 6 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠内容物中 SCFAs 含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	乙酸	丙酸	丁酸	异丁酸	戊酸	异戊酸
空白组		3.66±0.49	2.46±0.22	2.03±0.19	0.08±0.01	0.20±0.04	0.07±0.01
模型组		2.64±0.13 <sup>2)</sup>	1.42±0.22 <sup>2)</sup>	1.64±0.57	0.07±0.01 <sup>1)</sup>	0.16±0.01 <sup>1)</sup>	0.04±0.01 <sup>2)</sup>
加味四逆散低剂量组	7.34	3.25±0.22 <sup>4)</sup>	1.85±0.26 <sup>3)</sup>	2.39±0.09 <sup>3)</sup>	0.08±0.02	0.20±0.04	0.06±0.01 <sup>3)</sup>
低聚果糖组	3.15	2.49±0.33	2.18±0.28 <sup>4)</sup>	1.25±0.17	0.06±0.01	0.11±0.03 <sup>3)</sup>	0.05±0.01

3.5 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠组织中 HMGB1/RAGE 信号通路相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠盲肠组织中 HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 蛋白表达明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。与模型组比较,加味四逆散

低剂量组 HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$  的表达明显减少( $P<0.05$ ),而 NF- $\kappa$ B 蛋白虽有降低趋势但差异无统计学意义;低聚果糖组 HMGB1、TLR4、TNF- $\alpha$  蛋白的表达水平明显降低( $P<0.05$ )。见表 7、图 2。

表 7 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠 HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	HMGB1	RAGE	TLR2	TLR4	TNF- $\alpha$	NF- $\kappa$ B
空白组		3.63±0.79	11.26±1.13	1.31±0.17	1.80±0.09	3.35±1.04	3.83±1.22
模型组		7.20±1.12 <sup>1)</sup>	14.28±0.41 <sup>1)</sup>	4.95±2.01 <sup>1)</sup>	5.22±0.78 <sup>2)</sup>	7.28±0.36 <sup>2)</sup>	9.09±1.45 <sup>2)</sup>
加味四逆散低剂量组	7.34	4.50±0.90 <sup>3)</sup>	12.31±0.69 <sup>3)</sup>	1.70±0.12 <sup>3)</sup>	3.32±0.27 <sup>3)</sup>	4.73±1.27 <sup>3)</sup>	5.84±1.45
低聚果糖组	3.15	4.84±0.75 <sup>3)</sup>	13.01±1.50	2.12±0.84	3.83±0.25 <sup>3)</sup>	4.96±1.34 <sup>3)</sup>	6.97±0.53

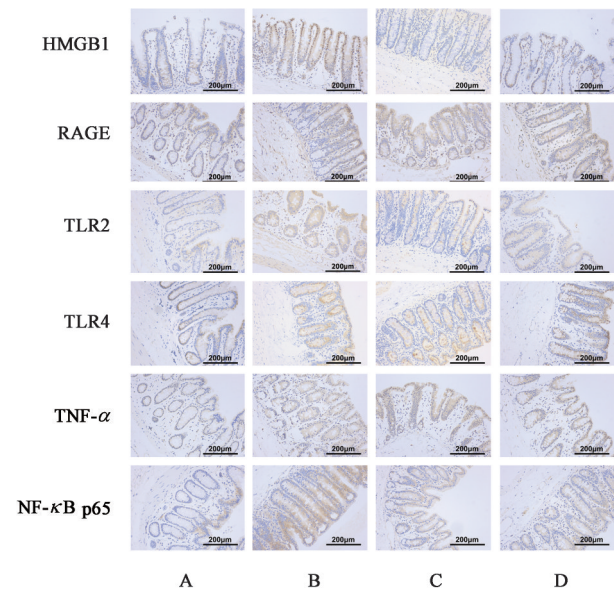


图 2 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠 HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 表达的影响 (免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of modified Sini San on expression of HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B in cecal tissue of chronic stress rats (IHC,  $\times 200$ )

3.6 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠组织中 HMGB1/RAGE 信号通路相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠盲肠组织中 HMGB1、

RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,加味四逆散低剂量组和低聚果糖组大鼠盲肠组织中 HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65 水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见图 3、表 8。

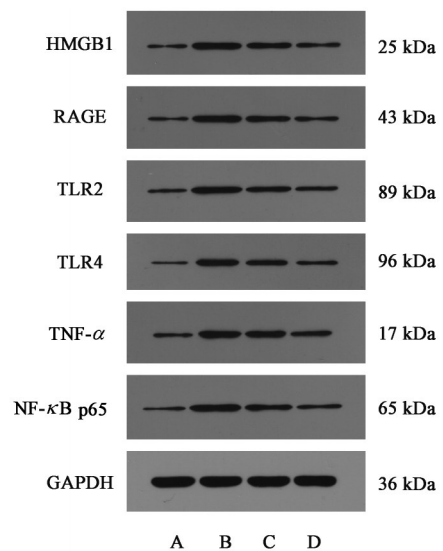


图 3 各组大鼠盲肠组织 HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65 expression in rat cecal tissue of each group

表8 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠组织中HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of Modified Sini San on expression of HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65 protein in cecal tissue of chronic stress rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	HMGB1/GAPDH	RAGE/GAPDH	TLR2/GAPDH	TLR4/GAPDH	TNF- $\alpha$ /GAPDH	NF- $\kappa$ B p65/GAPDH
空白组		0.37±0.09	0.37±0.11	0.46±0.11	0.38±0.08	0.33±0.15	0.37±0.06
模型组		1.03±0.10 <sup>2)</sup>	1.05±0.08 <sup>2)</sup>	1.04±0.08 <sup>2)</sup>	0.98±0.10 <sup>2)</sup>	1.01±0.05 <sup>2)</sup>	1.07±0.10 <sup>2)</sup>
加味四逆散低剂量组	7.34	0.82±0.04 <sup>4)</sup>	0.79±0.10 <sup>4)</sup>	0.80±0.08 <sup>4)</sup>	0.79±0.11 <sup>3)</sup>	0.83±0.08 <sup>4)</sup>	0.87±0.10 <sup>4)</sup>
低聚果糖组	3.15	0.58±0.08 <sup>4)</sup>	0.60±0.11 <sup>4)</sup>	0.62±0.12 <sup>4)</sup>	0.63±0.10 <sup>4)</sup>	0.64±0.05 <sup>4)</sup>	0.62±0.07 <sup>4)</sup>

3.7 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠组织中ZO-1、Occludin、Claudin-1含量的影响 与空白组比较,模型组大鼠盲肠组织中ZO-1、Occludin、Claudin-1的含量显著降低,差异具有统计学意义

( $P<0.01$ )。与模型组比较,加味四逆散低剂量组和低聚果糖组大鼠盲肠组织中ZO-1、Occludin、Claudin-1的含量显著升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。见表9。

表9 加味四逆散对慢性应激大鼠盲肠组织中ZO-1、Occludin、Claudin-1含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 9 Effect of Modified Sini San on contents of ZO-1、Occludin、Claudin-1 in cecal tissue of chronic stress rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ ) ng·g<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ZO-1	Occludin	Claudin-1
空白组		245.54±9.36	203.29±9.56	179.92±12.09
模型组		51.02±6.70 <sup>2)</sup>	32.18±5.86 <sup>2)</sup>	37.67±5.20 <sup>2)</sup>
加味四逆散低剂量组	7.34	128.12±4.43 <sup>4)</sup>	98.37±8.79 <sup>4)</sup>	79.96±8.18 <sup>4)</sup>
低聚果糖组	3.15	157.81±6.74 <sup>4)</sup>	147.32±10.54 <sup>4)</sup>	111.18±6.76 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

过度的慢性应激会显著破坏体内稳态,导致不同程度的生理、心理和胃肠道功能障碍<sup>[8]</sup>。慢性应激致胃肠功能紊乱多表现为腹胀、腹痛、便秘等消化系统症状及抑郁、低落等精神症状。中医认为本病的发生与情志因素密切相关,情志不畅,肝气横逆犯胃,致气机阻滞,胃失和降,即肝郁犯胃。《黄帝内经·灵枢·本输》云:“大肠、小肠,皆属于胃,是足阳明也”<sup>[21]</sup>,肝气郁滞,疏泄失常,亦可引起肠腑功能失职,临床中多表现为纳呆脘痞、恶心欲吐、腹痛腹胀、便秘及精神抑郁、胸闷太息等症状。故肝郁犯胃的症状与慢性应激致胃肠功能紊乱的表现极为相似。在本研究中,慢性应激模型大鼠的糖水偏好率、旷场实验的总运动距离和穿越格子数较空白组均显著降低,旷场实验静止时间和强迫游泳不动时间较空白组均显著增加,提示造模成功<sup>[7,20]</sup>。粪便Bristol评分与粪便含水率可综合反映大鼠的排便频率、排便形态与肠道功能<sup>[22]</sup>,其中Bristol评分1~3分代表便秘,4~5分是理想便形,6~7分表示腹泻。粪便含水率为粪便中所含有水分的比例,含水率较高表示便溏,含水率较低表示大便干结。本研究中模型组大鼠体质量明显下降,粪便Bristol评分明显升高,粪便含水率显著降低,表明粪便形态偏干,这与之前的报道一致<sup>[23]</sup>。此外,光镜下盲肠黏

膜受损、升高的盲肠隐窝深度和下降的盲肠隐窝密度可以解释这一结果。而经加味四逆散治疗可改善慢性应激大鼠行为学,修复盲肠黏膜损伤,维持肠黏膜屏障功能,增加慢性应激大鼠的体质量。考虑加味四逆散低剂量为临床等效剂量,其对粪便性状和含水率的影响明显优于高剂量组<sup>[6]</sup>,故本研究选用加味四逆散低剂量组大鼠开展后续实验。

加味四逆散为国医大师梅国强教授治疗肝胃不和证的经验方,方中柴胡疏肝解郁,调达肝气,为君药。枳实宽中行气,消痞导滞;白芍养血滋肝,柔肝止痛,二药为臣。郁金疏肝解郁,理气止痛;砂仁行气化湿,醒脾调胃;木香行气止痛。焦白术健脾以和胃,土旺则能健运。黄连配吴茱萸,和胃降逆,燥湿止泻;炙甘草缓急止痛,调和诸药。全方体现了调肝和胃、疏利肠腑、协调纳运、恢复升降的配伍特点,治疗胃肠功能紊乱临床疗效显著。

作为肠道菌群的重要代谢产物,SCFAs可以激活IEC表面受体,发挥抑制肠道炎症、维持肠黏膜屏障功能的作用<sup>[11]</sup>。其中乙酸、丙酸、丁酸占SCFAs总量的95%左右,三者比例大致为3:1:1<sup>[24]</sup>。乙酸含量最高,可以维持肠道屏障的完整性<sup>[24]</sup>。丙酸具有抗炎抗菌的作用,可阻止肠道病原体的入侵<sup>[25]</sup>。丁酸可激活IEC膜表面的G蛋白偶联受体,经膜蛋白进入细胞,通过三羧酸循环为IEC提供能量,促进

其生长增殖及分化并维持肠道屏障的完整性<sup>[24,26]</sup>。

肠黏膜屏障是一种高度选择性的功能性屏障系统,可以阻止致病微生物和内毒素等有害物质通过肠黏膜,同时选择性地吸收肠道中的营养物质<sup>[27]</sup>。正常情况下,肠黏膜屏障分为机械屏障、生物屏障、化学屏障和免疫屏障。不同屏障之间的相互作用促使肠道保持渗透性平衡,这种功能状态称为肠黏膜通透性。紧密连接(TJ)是肠黏膜通透性改变的关键。常见的TJ有ZO-1、Occludin、Claudins,其中ZO-1是膜外周蛋白,主要参与肠道屏障信号传导、上皮细胞极性形成、细胞增殖与分化和免疫调节等过程<sup>[28]</sup>。Occludin是膜紧密连接蛋白,参与紧密连接形成的信号调节、细胞极性的维持及细胞间黏附性的调节<sup>[28-29]</sup>。Claudin蛋白家族参与紧密连接的屏障功能和跨膜转运功能<sup>[30]</sup>。研究表明长期处于慢性应激的状态下,肠道ZO-1、Occludin、Claudins蛋白的表达量下降,肠黏膜屏障的结构受损,肠道通透性增加<sup>[31]</sup>。本研究发现加味四逆散可以通过上调慢性应激大鼠盲肠ZO-1、Occludin、Claudins蛋白的表达,保护肠黏膜屏障的功能。

有研究表明,SCFAs可以通过减轻肠道炎症、增加TJ蛋白的含量改善肠黏膜屏障的功能<sup>[12]</sup>。例如,乙酸和丁酸可降低白细胞介素-6(IL-6)和TNF- $\alpha$ 等炎症因子的水平,上调Occludin、ZO-1等蛋白的表达,降低肠黏膜通透性,保护肠黏膜机械屏障<sup>[32-33]</sup>。丙酸可促进IEC迁移,抑制NLRP3炎症小体和TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路的激活,上调Occludin、ZO-1及Claudin-1的表达,降低肠黏膜通透性,改善肠黏膜屏障功能<sup>[34]</sup>。研究表明,HMGB1作为免疫系统的核心细胞因子,负责细胞应激反应的信息传递,募集炎症细胞,刺激巨噬细胞和内皮细胞。RAGE作为一种跨膜蛋白,广泛表达于巨噬细胞、单核细胞等多种细胞膜上, HMGB1与RAGE具有高亲和力,二者结合可释放促炎细胞因子<sup>[15-16]</sup>。TLR2和TLR4是高度保守的蛋白质,可引发对内源性或外源性刺激的先天免疫反应。RAGE与TLR合作可通过细胞外信号,调节NF- $\kappa$ B信号通路激活,放大炎症传导<sup>[35]</sup>。而慢性应激可诱导HMGB1从细胞中释放,与RAGE结合,并经TLR2/TLR4发出信号,激活NF- $\kappa$ B信号通路,上调TNF- $\alpha$ 等促炎因子的表达,减少紧密连接蛋白的合成,破坏肠上皮屏障的完整性,最终导致肠黏膜通透性升高<sup>[36-38]</sup>。NF- $\kappa$ B控制许多炎症基因的表达,其活性主要由磷酸化

基p65激活<sup>[39]</sup>。NF- $\kappa$ B p65参与细胞增殖、免疫及炎症等多种过程,调控多种炎症基因的转录,诱导炎症细胞因子的表达<sup>[40]</sup>。研究发现,IEC过表达的NF- $\kappa$ B p65影响ZO-1和Occludin等TJ蛋白的结构,进而破坏肠道屏障<sup>[38]</sup>。TNF- $\alpha$ 作为一种巨噬细胞炎症因子,可活化炎症细胞并浸润到炎症部位<sup>[41]</sup>。有研究发现TNF- $\alpha$ 可直接降低Occludin和ZO-1的含量,增加肠黏膜通透性,破坏上皮细胞屏障<sup>[37]</sup>。本研究结果显示,加味四逆散可明显增加慢性大鼠盲肠内容物中乙酸、丙酸、丁酸等SCFAs的水平,下调HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65表达,抑制肠黏膜炎症,上调ZO-1、Occludin、Claudin-1等TJ蛋白的含量,增强肠黏膜屏障功能。

综上所述,加味四逆散能够改善慢性应激大鼠肠黏膜屏障功能,其作用机制可能与提高肠道中SCFAs(乙酸、丙酸、丁酸、异戊酸)的含量,抑制HMGB1/RAGE信号通路,下调NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 的表达,增加ZO-1、Occludin、Claudin-1等TJ蛋白的水平有关。本研究基于肠道SCFAs代谢和HMGB1/RAGE信号通路,阐释加味四逆散对慢性应激大鼠肠黏膜屏障的潜在作用及机制。但仍需进一步研究加味四逆散对肠黏膜屏障细胞层面的作用,如运用单细胞多组学测序技术揭示细胞群体差异和细胞进化关系;并且后期需对本方进行药效成分分离,完成成分靶向机制的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 陈宁宁. 慢性应激抑制免疫功能促结肠癌演进及痛泻要方调控的效应研究[D]. 成都:成都中医药大学,2022.  
CHEN N N. Effects of chronic stress on inhibiting immune function and promoting the evolution of colon cancer and regulating Tongxie Yaofang [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2022.
- [2] 王辰,王建安. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2019: 502-508.  
WANG C, WANG J A. Internal medicine [M]. People's Medical Publishing House, 2019: 502-508.
- [3] BLACK C J, DROSSMAN D A, TALLEY N J, et al. Functional gastrointestinal disorders: Advances in understanding and management [J]. Lancet, 2020, 396 (10263):1664-1674.
- [4] 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.
- [5] 岳滢滢,许乐思,陈雨,等. 基于肠道菌群从慢性应激致胃肠功能紊乱探讨肝郁犯胃证的研究思路[J]. 中华中医药杂志

- 志, 2021, 36(12): 6971-6974.
- YUE Y Y, XU L S, CHEN Y, et al. Exploration on the research idea of liver Qi depression invading stomach syndrome based on gut microbiota from chronic stress to gastrointestinal dysfunction [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(12): 6971-6974.
- [ 6 ] YUE Y Y, CHEN Y, LIU H, et al. Shugan Hewei decoction alleviates cecum mucosal injury and improves depressive-and anxiety-like behaviors in chronic stress model rats by regulating cecal microbiota and inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12(12): 766474.
- [ 7 ] YUE Y Y, KE Y L, ZHENG J P, et al. Microbiota-derived tryptophan metabolism and AMPK/mTOR pathway mediate antidepressant-like effect of Shugan Hewei decoction [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15(9): 1466336.
- [ 8 ] HUANG Y J, TSAI M S, PANYOD S, et al. Garlic essential oil ameliorates depression-like behaviors in unpredictable chronic mild stress by modulating the brain NLRP3 inflammasome pathway and influencing the gut barrier and microbiota [J]. *Food Funct*, 2023, 14(15): 6998-7010.
- [ 9 ] MADISON A A, BAILEY M T. Stressed to the core: Inflammation and intestinal permeability link stress-related gut microbiota shifts to mental health outcomes [J]. *Biol Psychiatry*, 2024, 95(4): 339-347.
- [ 10 ] CAO W, LI R W, CHIN Y, et al. Transcriptome analysis reveals the protective role of fructo-oligosaccharide in colonic mucosal barriers in exercise-induced stressed mice [J]. *Food Funct*, 2021, 12(10): 4484-4495.
- [ 11 ] MCCOUBREY L E, FERRARO F, SEGOBIN N, et al. Poly (*D, L*-lactide-co-glycolide) particles are metabolised by the gut microbiome and elevate short chain fatty acids [J]. *J Control Release*, 2024, 369(5): 163-178.
- [ 12 ] ZHANG K, CHEN L, YANG J, et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids ameliorate methamphetamine-induced depression-and anxiety-like behaviors in a Sigmar-1 receptor-dependent manner [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(12): 4801-4822.
- [ 13 ] WU H, BAO H, LIU C, et al. Extracellular nucleosomes accelerate microglial inflammation via C-Type lectin receptor 2D and Toll-like receptor 9 in mPFC of mice with chronic stress [J]. *Front Immunol*, 2022, 13(6): 854202.
- [ 14 ] YU Y, TANG D, KANG R. Oxidative stress-mediated HMGB1 biology [J]. *Front Physiol*, 2015, 6(6): 93.
- [ 15 ] 尚立芝, 李耀洋, 季书, 等. 二陈汤加味通过 HMGB1/RAGE/NF- $\kappa$ B 信号通路对 COPD 大鼠细支气管炎的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(6): 44-54.
- SHANG L Z, LI Y Y, JI S, et al. Effect of modified Erchentang on bronchioles of rats with chronic obstructive pulmonary disease by HMGB1/RAGE/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(6): 44-54.
- [ 16 ] ALI B M, AL-MOKADDEN A K, SELIM H M R M, et al. Pinocembrin's protective effect against acute pancreatitis in a rat model: The correlation between TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 and miR-34a-5p/SIRT1/Nrf2/HO-1 pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 176(7): 116854.
- [ 17 ] 陈新, 牟雄军, 刘昊, 等. 加味四逆散对抑郁模型大鼠肝损伤的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(18): 18-23.
- CHEN X, MOU X J, LIU H, et al. Protective effect of modified Sinisan on depression-induced liver injury in rat [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(18): 18-23.
- [ 18 ] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1136.
- WEI W, WU X M, LI Y J. *Experimental Methodology of Pharmacology* [M]. 4<sup>th</sup> ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010: 1136.
- [ 19 ] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 93(3): 358-364.
- [ 20 ] 雷雨, 刘伟, 包黎. 橙皮苷对慢性应激抑郁模型大鼠海马组织 Akt/mTOR 信号通路调节机制的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(12): 2548-2553.
- LEI Y, LIU W, BAO Li. Study on mechanism of hesperidin regulating Akt/mTOR signaling pathway in hippocampus of chronic stress depression model rats [J]. *Chin J Immunol*, 2024, 40(12): 2548-2553.
- [ 21 ] 灵枢经 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 6.
- Miraculous Pivot [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012: 6.
- [ 22 ] 陈涛, 林彩霞, 王成, 等. 霍山石斛对腹泻型肠易激综合征小鼠肠道菌群多样性的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 2024, 36(8): 869-875.
- CHEN T, LIN C X, WANG C, et al. Effect of *Dendrobium huoshanense* on the diversity of gut microbiota in mice with diarrhea induced irritable bowel syndrome [J]. *Chin J Microecol*, 2024, 36(8): 869-875.
- [ 23 ] 邹仁英, 朱慧越, 许梦舒, 等. “精神益生菌”对慢性应激诱导的抑郁和便秘症状的缓解及机制研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(3): 1-9.
- ZOU R Y, ZHU H Y, XU M S, et al. Effect and mechanism of psychobiotics in regulating chronic stress induced depression and constipation [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(3): 1-9.
- [ 24 ] 李新科, 杨雪, 张萱, 等. 短链脂肪酸对肠道屏障保护作用的研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2024, 36(8): 4861-4871.
- LI X K, YANG X, ZHANG X, et al. Research progress on protective effects of short chain fatty acids on intestinal barrier [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2024, 36(8): 4861-4871.
- [ 25 ] MARKOWIAK-KOPEC P, ŚLIZEWSKA K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome [J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 1107.
- [ 26 ] 刘帅, 李红霞, 董秀山. 短链脂肪酸对肠道动力影响的研究

- 进展[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(12):1476-1482.
- LIU S, LI H X, DONG X S. Progress in research on the effect of short-chain fatty acids on intestinal motility [J]. *Chin J Microecol*, 2021, 33(12):1476-1482.
- [27] 许雅青, 吴月滢, 李小雅, 等. 健脾类中药修复肠黏膜屏障损伤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14): 235-241.
- XU Y Q, WU Y Y, LI X Y, et al. Efficacy of spleen-invigorating Chinese medicinals in repairing intestinal mucosal barrier injury: A review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2021, 27(14):235-241.
- [28] KUO W T, ODENWALD M A, TURNER J R, et al. Tight junction proteins Occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2022, 1514(1):21-33.
- [29] 代鑫, 王莹, 任鑫悦, 等. 芍药苷对溃疡性结肠炎小鼠氧化应激的影响及机制[J]. 中国药房, 2025, 36(4):427-433.
- DAI X, WANG Y, REN X Y, et al. Effects and mechanism of paeoniflorin on oxidative stress of ulcerative colitis mice [J]. *China Pharmacy*, 2025, 36(4):427-433.
- [30] SCALISE A A, KAKOGIANNOS N, ZANARDI F, et al. The blood-brain and gut-vascular barriers: From the perspective of claudins [J]. *Tissue Barriers*, 2021, 9(3):1926190.
- [31] 王波. 慢性应激对结肠屏障功能的影响[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2019.
- WANG B. The effect of chronic stress on colon barrier function [D]. Hangzhou: Zhejiang SCI-Tech University, 2019.
- [32] SALERI R, BORGHETTI P, RAVANETTI F, et al. Effects of different short-chain fatty acids (SCFA) on gene expression of proteins involved in barrier function in IPEC-J2 [J]. *Porcine Health Manag*, 2022, 8(1):21.
- [33] 潘秀娟, 万有仓. 短链脂肪酸治疗幼鼠肠道屏障系统功能免疫炎性的机制研究[J]. 解剖科学进展, 2024, 30(6): 654-657.
- PAN X J, WAN Y C. Study on the mechanism of short chain fatty acids on the function of intestinal barrier system and the regulation of immunity in young rats [J]. *Prog Anat Sci*, 2024, 30(6):654-657.
- [34] YANG R, HU X, XIE X, et al. Propionic acid targets the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway and inhibits LPS-induced intestinal barrier dysfunction: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11(9):573475.
- [35] LI B, YUAN L, LIU P, et al. Moxibustion attenuates inflammation in intestinal mucosal by regulating RAGE-mediated TLR4-NF- $\kappa$ B p65 signaling pathway in vivo and in vitro [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(6):4278.
- [36] CHEN R, KANG R, TANG D. The mechanism of HMGB1 secretion and release [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(2):91-102.
- [37] TANG D, KANG R, ZEH H J, et al. The multifunctional protein HMGB1: 50 years of discovery [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(12):824-841.
- [38] ZHANG Z, ZHANG L, ZHANG Q, et al. HO-1/CO maintains intestinal barrier integrity through NF- $\kappa$ B/MLCK pathway in intestinal HO-1<sup>-/-</sup> mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021(1):6620873.
- [39] 刘中唐, 梁永林, 朱向东, 等. 基于TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路探讨大黄糖络丸对2型糖尿病大鼠肠道炎症损伤的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2025, 32(2):91-98.
- LIU Z T, LIANG Y L, ZHU X D, et al. Effects of Dahuang Tangluo pill on intestinal inflammatory injury in type 2 diabetes rats based on TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2025, 32(2):91-98.
- [40] 王亮, 杨芳, 回斯美, 等. 芍药苷抑制肌球蛋白轻链激酶缓解肠上皮细胞屏障功能紊乱 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(11):1541-1545.
- WANG L, YANG F, HUI S M, et al. Paeoniflorin alleviates TNF- $\alpha$  induced intestinal barrier dysfunction by inhibition of MLCK [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2017, 33(11):1541-1545.
- [41] 陈亮, 顾庆华, 景姗, 等. 健脾化滞方对脾虚湿热型轻中度溃疡性结肠炎患者肠道菌群及血清炎症因子的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(6):680-687.
- CHEN L, GU Q H, JING S, et al. Effect of Jianpi Huazhi recipe on intestinal microflora and serum inflammatory factors in mild-moderate ulcerative colitis patients with pi deficiency and dampness-heat syndrome [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2023, 43(6):680-687.

[责任编辑 王鑫]