

基于MLCK/p-MLC信号通路探讨芪附理中汤修复肠黏膜屏障改善溃疡性结肠炎的作用机制

唐俊梅, 瞿正午, 李春润, 袁玲玲, 杨旭丽, 郝彦伟*, 张怡*
(成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] 目的:探讨芪附理中汤通过调控肌球蛋白轻链激酶(MLCK)/磷酸化肌球蛋白轻链(p-MLC)信号通路,恢复溃疡性结肠炎(UC)肠黏膜屏障功能的作用机制。方法:构建脾肾阳虚型UC大鼠模型和体外肠道屏障损伤模型。体内实验观察各组大鼠体质量、疾病活动指数(DAI)评分及结肠病理形态变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测结肠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、髓过氧化物酶(MPO)含量。利用透射电子显微镜(TEM)观察大鼠结肠紧密连接(TJ)形态和结构。体外实验采用鬼笔环肽染色观察人结肠腺癌细胞系-2(Caco-2)细胞F-肌动蛋白(F-actin)形态。结合体内外实验,采用免疫组化(IHC)、免疫荧光(IF)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TJ 蛋白[(闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白-1(Claudin-1)]及 MLCK/p-MLC 信号通路关键蛋白的表达与磷酸化水平。结果:体内实验表明,与正常组比较,模型组体质量显著下降,DAI评分和组织病理学评分显著升高($P<0.01$);结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 及 MPO 水平显著升高($P<0.01$);TJ 结构破坏,ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);MLC、MLCK、p-MLC、p-MLCK 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,芪附理中汤各剂量组体质量有所增加,DAI评分和组织病理学评分明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);结肠 MPO、TNF- α 及 IL-1 β 水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);芪附理中汤+抑制剂组 TJ 蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达显著升高($P<0.01$),MLC、MLCK、p-MLC、p-MLCK 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。体外实验结果显示,与正常组比较,TNF- α 组细胞骨架结构紊乱,ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 荧光信号减弱,MLC、MLCK、p-MLC、p-MLCK 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与 TNF- α 组比较,芪附理中汤+抑制剂组恢复了 F-actin 细胞骨架的有序排列,TJ 蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达与定位恢复正常;MLC、MLCK、p-MLC、p-MLCK 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。结论:芪附理中汤可能通过抑制 MLCK/p-MLC 信号通路,稳定 TJ 结构并修复肠道屏障完整性,从而发挥改善 UC 的作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎;芪附理中汤;肠道屏障;紧密连接;肌球蛋白轻链激酶(MLCK)/肌球蛋白轻链磷酸化(p-MLC)信号通路

[中图分类号] R277;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)19-0174-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260439

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260304.1318.003>

[网络出版日期] 2026-03-04 15:32:05



Mechanism of Qifu Lizhong Decoction in Repairing Intestinal Mucosal Barrier and Improving Ulcerative Colitis via Myosin Light Chain Kinase (MLCK)/Phosphorylated Myosin Light Chain (p-MLC) Signaling Pathway

TANG Junmei, QU Zhengwu, LI Chunrun, YUAN Lingling, YANG Xuli, HAO Yanwei*, ZHANG Yi*
(Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism by which Qifu Lizhong decoction restores intestinal mucosal barrier

[收稿日期] 2025-11-03

[基金项目] 中国博士后科学基金面上项目(2025MD784212);四川省科技厅自然科学基金青年项目(2026NSFSC1853);四川省中医药管理局科学技术研究专项(25MSZX121);成都中医药大学青基进阶人才专项(QJJ2023003);成都中医药大学委校联合创新基金项目(WXLH202403086)

[第一作者] 唐俊梅,在读硕士,从事中医药防治脾胃病的基础研究,E-mail:18148047831@163.com

[通信作者] *张怡,教授,硕士生导师,从事中医药防治脾胃病的基础与临床研究,E-mail:zhangyi2288@163.com;

*郝彦伟,博士后,讲师,从事中医药防治脾胃病的基础与临床研究,E-mail:haoyw116@163.com

function in ulcerative colitis (UC) by regulating the myosin light chain kinase (MLCK)/phosphorylated myosin light chain (p-MLC) signaling pathway. **Methods:** A rat model of UC with spleen-kidney Yang deficiency syndrome and an *in vitro* intestinal barrier injury model were established. *In vivo* experiments were conducted to evaluate the body weight, disease activity index (DAI) scores, and changes in colonic pathological morphology in each group of rats. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and myeloperoxidase (MPO). Transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe the morphology and structure of tight junctions (TJ) in rat colonic epithelium. *In vitro* experiments were conducted to observe the morphology of F-actin in human colon adenocarcinoma cell line-2 (Caco-2) cells by phalloidin staining. Combining both *in vivo* and *in vitro* approaches, immunohistochemistry (IHC), immunofluorescence (IF), and Western blot were applied to detect the expression and phosphorylation levels of TJ proteins [zonula occludens-1 (ZO-1), Occludin, Claudin-1] as well as key proteins in the MLCK/p-MLC signaling pathway. **Results:** *In vivo* experiments demonstrated that, compared with the normal group, the model group exhibited significant body weight loss, elevated DAI scores and histopathological scores ($P<0.01$), increased colonic TNF- α , IL-1 β , and MPO levels ($P<0.01$). TJ structures were disrupted, and the expression of ZO-1, Occludin, and Claudin-1 was significantly reduced ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expression levels of myosin light chain (MLC), MLCK, phosphorylated (p)-MLC, and p-MLCK significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, all Qifu Lizhong decoction dose groups exhibited increased body weight, as well as significantly decreased DAI scores and histopathological scores ($P<0.05$, $P<0.01$). The colonic levels of MPO, TNF- α , and IL-1 β were significantly reduced ($P<0.05$, $P<0.01$). In the Qifu Lizhong decoction + inhibitor group, the expression of TJ proteins ZO-1, Occludin, and Claudin-1 significantly increased ($P<0.01$), while the protein expression levels of MLC, MLCK, p-MLC, and p-MLCK were significantly reduced ($P<0.01$). *In vitro* experiment results showed that, compared with the normal group, the TNF- α group exhibited disordered cytoskeletal architecture, weakened fluorescence signals of ZO-1, Occludin, and Claudin-1, and significantly elevated protein expression levels of MLC, MLCK, p-MLC, and p-MLCK ($P<0.01$). Compared with the TNF- α group, the Qifu Lizhong decoction + inhibitor group restored the ordered arrangement of the F-actin cytoskeleton, normalized the expression and localization of TJ proteins ZO-1, Occludin, and Claudin-1, and significantly decreased the protein expression levels of MLC, MLCK, p-MLC, and p-MLCK ($P<0.01$). **Conclusion:** Qifu Lizhong decoction may exert its therapeutic effects on UC by inhibiting the MLCK/p-MLC signaling pathway, thereby stabilizing TJ structure and repairing intestinal barrier integrity.

[Keywords] ulcerative colitis; Qifu Lizhong decoction; intestinal barrier; tight junction; myosin light chain kinase (MLCK)/phosphorylated myosin light chain (p-MLC) signaling pathway

溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性非特异性炎症性肠病,以反复腹痛、腹泻、黏液脓血便为主要表现,严重影响患者生活质量。全球UC发病率与患病率持续升高,其中欧洲、北美患病率最高^[1-2]。此外,亚洲等新兴工业化国家患病人群亦快速增加,已构成严峻的公共卫生挑战^[1]。UC病因尚未完全明确,普遍认为其发病与肠黏膜屏障功能障碍、免疫反应、遗传及环境因素密切相关^[3-6]。当前治疗以氨基水杨酸类、糖皮质激素、免疫抑制剂等为主。然而,约30%的UC患者对5-氨基水杨酸类药物反应不佳,生物制剂价格昂贵,且长期用药存在不良反应^[7-8]。因此,阐明UC分子机制,并寻找安全有效、成本可控的新型治疗策略已成为该领域亟待解决的重要临床问题。

肠黏膜屏障是防御肠腔内病原体和有害物质的第一道防线,其完整性受损是UC发生发展的核心环节^[9-10]。其中,由肠上皮细胞间紧密连接(TJ)构成的机械屏障至关重要^[11]。TJ是由跨膜蛋白[闭合蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白(Claudins)等]和胞质蛋白[闭锁小带蛋白-1(ZO-1)等]组成的动态

复合体,精密调控细胞旁路通透性,对维持屏障稳态至关重要^[12-13]。在UC病理状态下,TJ结构与功能受损导致肠道通透性增加,使得肠腔内抗原及有害物质侵入黏膜下层,从而触发并放大炎症级联反应^[14-15]。肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化是调控TJ通透性的关键分子事件^[16]。炎症刺激下肌球蛋白轻链激酶(MLCK)激活,促进磷酸化,驱动细胞骨架收缩,导致TJ解离和屏障受损^[17]。研究表明,MLCK/磷酸化(p)-MLC信号通路在UC肠道屏障功能障碍中发挥关键作用^[18-19]。因此,调控MLCK/p-MLC信号通路以稳定TJ结构、修复肠道屏障是治疗UC的重要策略。

芪附理中汤由经典名方“附子理中汤”化裁而成,具有温补脾肾、固涩止泻的功效。课题组前期研究发现,芪附理中汤可改善UC患者临床症状^[20];控制UC模型大鼠疾病症状与肠道炎症反应,并修复肠黏膜屏障损伤^[21-22]。然而,其作用机制是否通过抑制MLCK/p-MLC信号通路以稳定TJ结构尚不明确。本文拟通过构建体内外UC模型,探究芪附理中汤修复肠道屏障完整性的作用是否依赖于对

MLCK/p-MLC信号通路的调控,旨在为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物和细胞 SPF级雄性SD大鼠70只,8周龄,体质量(200±20)g,购自成都达硕实验动物有限公司,动物生产合格证号SCXK(川)2025-0030,统一饲养于成都中医药大学脏腑病证实验室。环境温度约为23℃,相对湿度约为50%,自由饮食饮水,实施12h明暗交替循环照明。人类结肠癌细胞系2(Caco-2)细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号CL-0050),细胞传至第3代后用于后续实验。

1.2 伦理 所有动物实验方案均获成都中医药大学附属医院动物伦理委员会批准,批准号2020-20。

1.3 药物和试剂 芪附理中汤由生黄芪20g(批号220701)、白附片10g(批号220705)、党参15g(批号220801)、干姜10g(批号211203)、仙鹤草20g(批号220201)、地榆炭15g(批号220301)、麸炒白术15g(批号220401)、炙甘草15g(批号220501)组成。所有饮片购自四川国强中药饮片生产有限公司,并经成都中医药大学药学院陈江副教授鉴定,符合2025年版《中华人民共和国药典》药品标准。汤剂的制备方法同以前的描述^[21],将白附片于6L蒸馏水中浸泡0.5h后,先煎1h,后加入其余药材共同煎煮1h。过滤药液,减压浓缩,于4℃储存备用。

肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,苏州近岸蛋白质科技股份有限公司,批号CG90);1-(5-碘萘-1-磺酰基)-1H-六氢-1,4-二氮杂卓盐酸盐(ML7 HCl,美国Selleck公司,批号S8388);苏木素-伊红(HE)染色液(珠海贝索生物公司,批号BA4025);细胞增殖活性检测(CCK-8)试剂盒(上海和元李记生物,批号AC11L054);最低必需培养基(MEM)、鬼笔环肽(Phalloidin)(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G4550-500ML、G1041);青霉素-链霉素和胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号分别为SV30010、11011-8611);2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)5%水溶液(美国Sigma公司,批号P2297); β -肌动蛋白(β -actin)、Claudin-1、Occludin、ZO-1、MLC、MLCK、p-MLC、p-MLCK、山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)、花青素3(Cy3)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号分别是AF7018、AF0127、DF7504、AF5145、DF7911、AF5314、AF8618、AF5445、S0006、S0011);TNF- α 、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、髓过氧化物酶(MPO)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉

华美生物工程有限公司,批号分别为CSB-E11987r、CSB-E08055r、CSB-E08722r);戊巴比妥钠(德国Merck公司,批号230816);美沙拉嗪肠溶片(葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司,批号H20171358,规格25mg/片)。

1.4 仪器 RM2016型转轮式切片机(德国徕卡公司);BMJ-A型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);3DHISTECH型数字病理全景切片扫描仪(济南丹吉尔电子有限公司);WD-9405A型脱色摇床(北京六一仪器厂);JY200C型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);3001型酶标仪(美国赛默飞公司);5200Multi型荧光图像分析系统(上海天能科技有限公司);BVE-4型垂直电泳槽(武汉赛维尔生物科技有限公司);BX51型荧光显微镜(日本Olympus公司);JEM-1400FLASH型透射电镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 动物实验验证

2.1.1 分组、造模及给药 大鼠适应性喂养1周后,随机分为正常组与造模组。除正常组外,其余大鼠每日灌胃大黄水提物(0.3g·kg⁻¹),连续14d以建立“脾肾阳虚”证模型^[22]。造模期间,每日观察并记录大鼠的一般状态,当大鼠普遍出现精神萎靡、蜷缩扎堆、活动减少及大便溏薄等符合脾肾阳虚证候的典型表现时,即判定为证候模型复制成功^[23]。第15天禁食24h,将大鼠麻醉后,经肛门插入导管7~8cm,缓慢注入2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)溶液(100mg·kg⁻¹溶于0.25mL 50%乙醇)以诱导UC模型。通过体质量下降、腹泻、便血等症状确认UC模型成功建立。根据人与动物体表面积折算^[22],芪附理中汤的大鼠等效给药剂量为10.8g·kg⁻¹,芪附理中汤低、中、高剂量组分别为等效剂量的1/2、1倍和2倍,即5.4、10.8、21.6g·kg⁻¹。阳性对照药美沙拉嗪的给药剂量为0.27g·kg⁻¹。将UC造模成功的大鼠随机分为6组($n=6$):正常组,模型组,美沙拉嗪组,芪附理中汤低、中、高剂量组。在后续机制验证实验中,另增设抑制剂组(ML-7)和芪附理中汤+抑制剂组,其中抑制剂采用腹腔注射给药(3mg·kg⁻¹)。

2.1.2 标本采集 实验结束后,腹腔注射2%戊巴比妥钠(45mg·kg⁻¹)麻醉,抽取大鼠腹主动脉血,4℃静置1~2h后,3500r·min⁻¹离心12min(离心半径8cm),分离血清,冻存于-80℃冰箱用于检测。游离肛门至盲肠末端肠管,取病变明显组织置于

4%多聚甲醛固定液中固定;另在离体1 min内于冰上用手术刀切取1 mm³组织块,用预冷的电镜固定液固定。

2.1.3 含药血清的制备 将30只SD雄性大鼠随机分为空白组和芪附理中汤组($n=15$)。依据临床用量和体表面积法换算:芪附理中汤成人(70 kg)日用生药120 g,折合为1.71 g·kg⁻¹,依据人-大鼠换算系数6.3^[24],计算得出大鼠的临床等效剂量为10.77 g·kg⁻¹。综合考虑给药便利性与实验稳定性,本研究最终选用10 g·kg⁻¹作为大鼠灌胃剂量。实验期间,芪附理中汤组按10 g·kg⁻¹生药量灌胃,空白组给予等体积蒸馏水,灌胃容量为10 mL·kg⁻¹,每日1次,连续7 d。末次灌胃前禁食12 h,灌胃2 h后腹主动脉取血。血样在37℃静置2 h后,3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径8 cm)分离血清,56℃灭活30 min并滤过除菌后,于-80℃保存备用。

2.2 细胞实验验证

2.2.1 细胞培养与分化 Caco-2采用含20%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素的MEM培养基,在37℃、5%CO₂培养箱中培养。细胞传代至第3代后,将细胞接种于Transwell小室,培养并诱导分化21 d,通过检测碱性磷酸酶活力确认单层屏障成熟。

2.2.2 模型建立、分组与给药 参照文献[25]的方法,采用TNF-α(200 μg·L⁻¹)刺激细胞24 h,建立肠上皮屏障损伤体外模型。本研究通过检测到模型组的酚红透过率相较于正常组显著升高,且光学显微镜下细胞连接疏松,来确认模型已成功建立^[25]。实验分为以下4组:正常组,给予含10%空白大鼠血清的培养基;TNF-α组,给予含10%空白血清的培养基,并用TNF-α(200 μg·L⁻¹)刺激24 h;芪附理中汤组,给予含10%芪附理中汤含药血清的培养基,并用TNF-α刺激;芪附理中汤+抑制剂组,在芪附理中汤组的基础上,加入MLCK抑制剂ML-7(10 μmol·L⁻¹)。

2.2.3 含药血清细胞增殖抑制测定与保护浓度筛选 为确定芪附理中汤含药血清的安全有效工作浓度,采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测细胞活力。Caco-2细胞分化成熟后,以100 μL细胞悬液的形式接种于96孔板中,加入不同浓度的含药血清或200 μg·L⁻¹ TNF-α,于37℃、5%CO₂,饱和湿度条件下培养24 h。随后向每孔加入CCK-8溶液10 μL,于37℃培养1 h。使用ELISA测定每孔450 nm波长下的吸光度 A 。

2.2.4 酚红透过率检测 Caco-2细胞处理结束后,弃去Transwell小室上下层培养基,用磷酸盐缓冲液

(PBS)清洗2次。在上室加入含50 mg·L⁻¹酚红的汉克斯平衡盐溶液(HBSS)缓冲液0.5 mL,下室加入HBSS缓冲液1.5 mL。置于37℃培养箱孵育1 h后,从下室吸取100 μL液体至96孔板中,使用酶标仪在560 nm波长下测定 A ,以反映酚红的透过量^[26]。

2.3 检测指标与方法

2.3.1 疾病活动指数(DAI)和组织病理观察的评估 实验期间,于每天给药前称定并记录各组大鼠体质量,观察其粪便性状和隐血程度,计算DAI评分。见表1。DAI=(体质量评分+大便性状评分+大便隐血评分)/3^[27]。将结肠组织用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片后,用苏木素-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察。根据炎症细胞浸润深度、黏膜损伤深度和隐窝结构破坏程度计算组织病理学评分^[28]。见表2。

表1 疾病活动指数(DAI)评分标准表

Table 1 Disease activity index (DAI) scoring criteria table			
体质量下降率/%	大便质地	便血情况	得分/分
无	正常	隐血阴性	0
<5	介于两者之间	介于两者之间	1
5~10(含10)	黏液样软便	隐血阳性	2
10~15(含15)	介于两者之间	介于两者之间	3
>15	稀便	肉眼血便	4

表2 组织病理学评分标准表

Table 2 Histopathological Scoring Criteria Table				
分值	炎症程度	病变深度	隐窝的破坏程度	病变范围/%
0	无	无	无	-
1	轻	黏膜下层	基底1/3隐窝破坏	1~25
2	重	肌层	基底2/3隐窝破坏	26~50
3	-	浆膜层	仅有完整表面上皮	51~75
4	-	-	全部隐窝和上皮破坏	76~100

2.3.2 透射电镜观察大鼠结肠组织超微结构 结肠组织用生理盐水冲洗,切块后固定于4℃、2.5%戊二醛中2 h,浸洗0.1 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液30 min,1%锇酸固定液固定2 h。乙醇梯度脱水(30%、50%、70%、90%、100%乙醇各10 min,100%乙醇3次),环氧丙烷置换10 min,Epon 812浸透包埋后切半超薄切片(50~70 nm),美兰染色定位,醋酸铀、柠檬酸铅染色后,用透射电子显微镜观察肠上皮细胞超微结构。

2.3.3 ELISA检测大鼠结肠组织TNF-α、MPO、IL-1β含量 大鼠结肠TNF-α、MPO、IL-1β含量测定按照ELISA试剂盒的操作说明进行,每个样品设定

3个复孔,通过标准曲线计算样品含量,结果取平均值进行统计分析。

2.3.4 免疫组化法(IHC)检测大鼠结肠组织中ZO-1、Occludin和Claudin-1的表达 石蜡包埋组织经4 μm切片、脱蜡、水化后,进行柠檬酸钠抗原修复。随后,用3%过氧化氢(H₂O₂)阻断内源性过氧化物酶,正常血清封闭。切片与一抗ZO-1(1:200)、Occludin(1:200)和Claudin-1(1:200)在4℃孵育过夜,再与HRP标记山羊抗兔IgG二抗(1:200)室温孵育1h。二氨基联苯胺显色,苏木素复染核,中性树胶封片。以PBS替代一抗作为阴性对照。显微镜下观察并采集图像。

2.3.5 Phalloidin染色观察Caco-2细胞骨架形态 将细胞爬片用4%多聚甲醛固定,0.5%Triton X-100破膜。加入Phalloidin工作液,室温避光孵育10min。复染DAPI后,用抗荧光淬灭剂封片。在荧光显微镜下观察F-肌动蛋白(F-actin)细胞骨架形态并采集图像

2.3.6 免疫荧光法(IF)检测大鼠结肠组织和细胞ZO-1、Occludin和Claudin-1的表达 将处理好的细胞和结肠组织切片用5%BSA封闭30min,随后与适当的一抗ZO-1(1:100)、Occludin(1:100)、Claudin-1(1:100)在4℃下孵育过夜。PBS洗涤后,孵育荧光CY3标记山羊抗兔二抗(1:200)和DAPI。使用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)复染描绘核结构,并用甘油基抗褪色介质封片。使用荧光显微镜捕获图像。

2.3.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠结肠组织和Caco-2细胞中MLCK/p-MLC信号通路相

关蛋白的表达 收集Caco-2细胞及结肠组织样本,提取总蛋白后采用聚氨基丙烯酸正丁酯(BCA)法进行蛋白浓度定量。将蛋白样品分离并调整浓度后,置于电泳槽中进行电泳分离。随后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,使用5%脱脂牛奶室温封闭2h。封闭结束后,将膜与一抗ZO-1、Occludin、Claudin-1、MLC、MLCK(1:1000),p-MLC、p-MLCK(1:500),β-actin(1:5000)于4℃条件下孵育过夜。去除一抗后,采用TBST缓冲液洗涤膜3次,随后与HRP标记山羊抗兔IgG二抗(1:5000)室温孵育2h。经TBST充分洗涤后,使用增强化学发光ECL化学发光试剂显影,并通过化学发光成像系统采集图像,最后采用Image J软件分析灰度值。

2.4 统计分析 采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),然后进行Tukey多重比较检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 芪附理中汤对UC大鼠一般状况与结肠病理损伤的影响 与正常组比较,模型组大鼠在造模后出现显著的体质量下降、腹泻、便血等症状,DAI评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,芪附理中汤各剂量组及美沙拉嗪组大鼠体质量显著升高($P<0.01$),DAI评分均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表3。HE染色结果显示,与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜结构严重破坏,腺体排列紊乱,并伴有大量炎症细胞浸润,且组织病理学评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,芪附理中汤各剂量组病理损伤显著减轻,组织病理学评分显著降低($P<0.01$)。见图1。

表3 芪附理中汤对UC大鼠体质量、DAI评分及组织病理学评分的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Qifu Lizhong decoction on body weight, DAI score, and histopathological score in UC rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

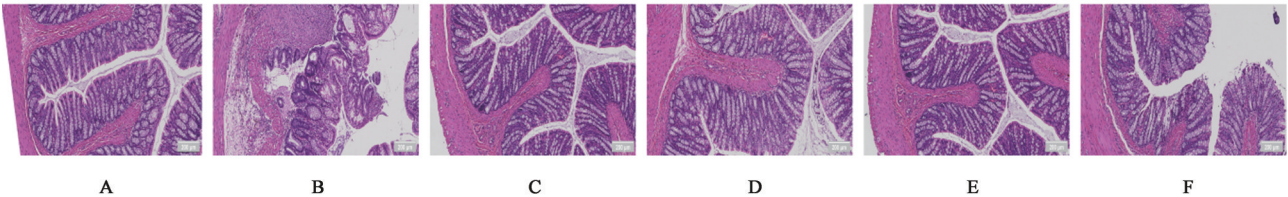
组别	剂量/g·kg ⁻¹	体质量/g	DAI评分/分	组织病理学评分/分
正常组		302.60±75.33	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组		240.20±25.83 ¹⁾	2.03±1.67 ¹⁾	11.84±0.58 ¹⁾
芪附理中汤低剂量组	5.4	274.00±42.54 ³⁾	1.42±1.39 ²⁾	7.45±0.42 ³⁾
芪附理中汤中剂量组	10.8	279.40±50.47 ³⁾	1.19±1.30 ³⁾	5.60±0.66 ³⁾
芪附理中汤高剂量组	21.6	275.00±45.81 ³⁾	1.36±1.34 ³⁾	6.54±0.47 ³⁾
美沙拉嗪组	0.27	270.90±42.66 ³⁾	1.28±1.38 ³⁾	7.23±0.31 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表4同)

3.2 芪附理中汤对UC大鼠结肠组织炎症因子的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织中性粒细胞标志物MPO及促炎因子TNF-α、IL-1β水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,芪附理中汤各剂量组MPO、TNF-α、IL-1β水平明显降低($P<0.05$,

$P<0.01$)。见表4。

3.3 芪附理中汤对UC大鼠肠道屏障完整性的影响 透射电镜观察发现,模型组肠上皮细胞间TJ结构模糊、间隙增宽,微绒毛脱落;与模型组比较,芪附理中汤组的TJ结构清晰,微绒毛排列相



注:A.正常组;B.模型组;C.芪附理中汤低剂量组;D.芪附理中汤中剂量组;E.芪附理中汤高剂量组;F.美沙拉嗪组(图2、图3同)
图1 芪附理中汤对UC大鼠结肠组织病理学改变的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Qifu Lizhong decoction on histopathological changes in colonic tissue of UC rats (HE,×200)

表4 芪附理中汤对UC大鼠结肠炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Qifu Lizhong decoction on inflammatory factors in colons of UC rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	MPO/ μ g·L ⁻¹
正常组		20.13±4.23	91.14±2.78	22.29±2.10
模型组		30.07±2.81 ¹⁾	281.60±5.87 ¹⁾	32.14±3.12 ¹⁾
芪附理中汤低剂量组	5.4	23.69±3.51 ²⁾	220.30±4.90 ³⁾	27.47±2.36 ²⁾
芪附理中汤中剂量组	10.8	22.29±3.09 ³⁾	184.40±4.46 ³⁾	25.37±3.40 ³⁾
芪附理中汤高剂量组	21.6	23.90±3.49 ²⁾	202.50±6.34 ³⁾	26.30±2.06 ³⁾
美沙拉嗪组	0.27	24.29±1.53 ²⁾	200.40±6.91 ³⁾	27.18±2.39 ²⁾

对规整。见图2。IHC结果显示,模型组结肠 TJ 蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 表达显著减弱且分布断续;经芪附理中汤干预后,上述蛋白的表达显著恢复。见图3。上述结果中,芪附理中汤

中剂量组治疗效果最明显。基于芪附理中汤中剂量组在改善结肠组织病理、抗炎、保护屏障方面的显著效果,后续机制研究选取该剂量组进行观察。

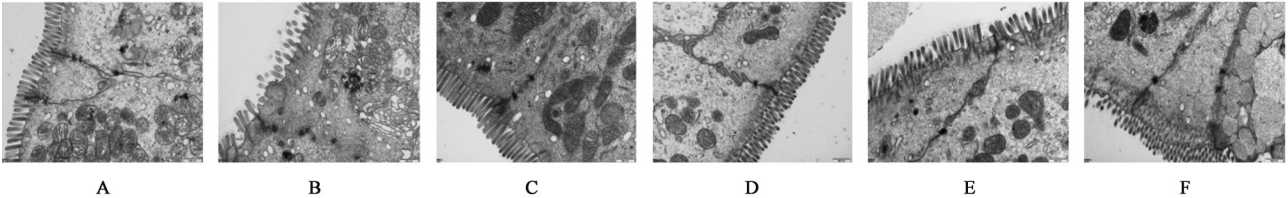


图2 芪附理中汤对UC大鼠结肠 TJ 的影响(透射电镜,×10 000)

Fig. 2 Effect of Qifu Lizhong decoction on TJ in colon of UC rats (TEM,×10 000)

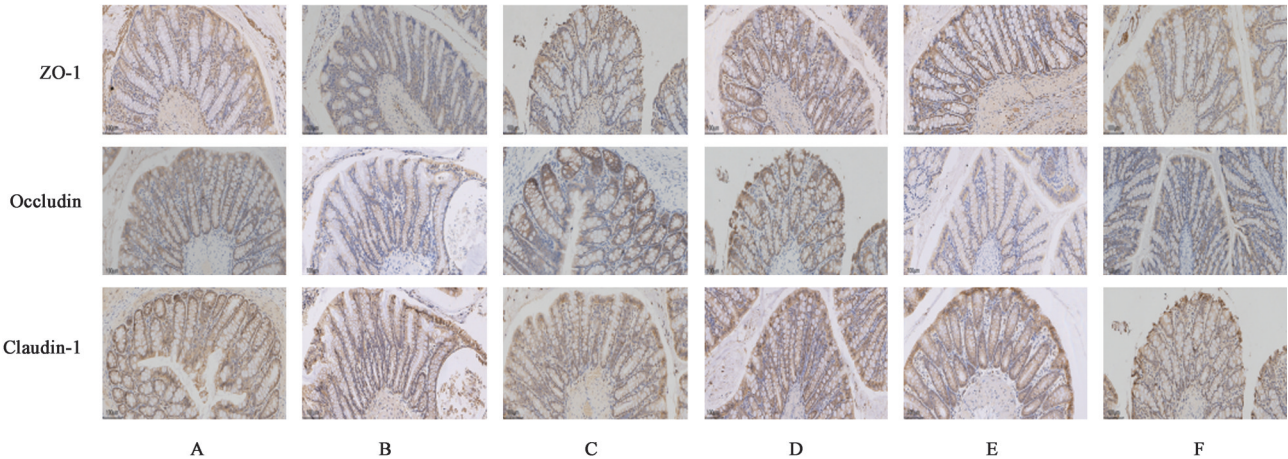


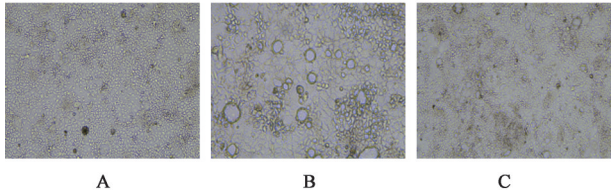
图3 芪附理中汤对UC大鼠结肠 ZO-1、Occludin、Claudin-1 表达的影响(IHC,×400)

Fig. 3 Effect of Qifu Lizhong decoction on expression of ZO-1, Occludin and Claudin-1 in colon of UC rats (IHC,×400)

3.4 芪附理中汤含药血清对体外肠道屏障的影响 酚红透过率结果显示,与正常组A比较,TNF- α 组

A显著升高($P<0.01$)。显微镜下观察结果显示,TNF- α 组细胞连接疏松,形态不规则,失去了致密的“鹅卵石”

样结构。CCK-8检测结果表明,与正常组比较,TNF- α 模型组细胞活力显著下降($P<0.01$);与TNF- α 组比较,10%浓度的芪附理中汤含药血清对Caco-2细胞未表现出增殖抑制作用,因此被确定为最大无毒浓度;10%芪附理中汤含药血清能显著恢复细胞活力至正常水平,差异有统计学($P<0.01$),因此选择该浓度进行后续干预。形态学观察结果显示,经10%芪附理中汤含药血清处理后,Caco-2细胞生长状态良好,单层完整性得到有效维持。此外,Phalloidin染色显示,TNF- α 组细胞骨架F-actin解聚、紊乱,形成应力纤维;芪附理中汤含药血清处理后可显著维持F-actin的正常网状结构。见图4、图5、表5。



注:A.正常组;B.TNF- α 组;C.芪附理中汤组(图5同)
图4 芪附理中汤对Caco-2细胞形态学的影响(倒置显微镜,×200)
Fig. 4 Effect of Qifu Lizhong decoction on morphology of Caco-2 cells (inverted microscope, ×200)

3.5 芪附理中汤对UC大鼠MLCK/p-MLC信号通路的影响 为探究芪附理中汤修复肠道屏障的潜在机制,采用IF和Western blot对结肠组织中TJ蛋白进行检测。结果显示,与正常组比较,模型组结肠组织中ZO-1、Occludin和Claudin-1的荧光信号减弱且分布断续,蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,芪附理中汤组干预后,ZO-1、Occludin和Claudin-1在细胞连接处的连续线性分布明显恢复,并且蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与芪附理中汤比较,芪附理中汤+抑制剂组TJ蛋白的恢复效果表现出协同增强效应,提示芪附理中汤的屏障保护作用与MLCK信号通路密切相关。为验证这一推测,本研究检

表6 芪附理中汤对UC大鼠结肠MLCK/p-MLC信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of Qifu Lizhong decoction on expression of MLCK/p-MLC signaling pathway-related proteins in colonic tissues of UC rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量	ZO-1 / β -actin	Occludin / β -actin	Claudin-1 / β -actin	MLC / β -actin	MLCK / β -actin	p-MLC / β -actin	p-MLCK / β -actin
正常组		1.00±0.14	1.00±0.11	1.00±0.17	1.00±0.22	1.00±0.31	1.00±0.54	1.00±0.36
模型组		0.47±0.02 ¹⁾	0.59±0.06 ²⁾	0.29±0.03 ²⁾	5.99±1.65 ²⁾	5.12±0.51 ²⁾	7.45±1.08 ²⁾	6.60±0.92 ²⁾
芪附理中汤组	10.8 g·kg ⁻¹	0.90±0.05 ³⁾	0.92±0.04 ⁴⁾	0.64±0.08 ³⁾	2.44±0.69 ³⁾	1.61±0.32 ⁴⁾	2.20±0.83 ⁴⁾	2.47±1.53 ⁴⁾
抑制剂组	10 μ mol·L ⁻¹	0.89±0.06 ³⁾	0.83±0.10 ³⁾	0.56±0.08	5.26±1.46	2.82±0.16 ⁴⁾	4.41±0.95 ⁴⁾	5.12±1.06
芪附理中汤+抑制剂组	10.8 g·kg ⁻¹ + 10 μ mol·L ⁻¹	1.13±0.30 ⁴⁾	1.02±0.06 ⁴⁾	0.73±0.19 ⁴⁾	1.06±0.45 ⁴⁾	1.21±0.28 ⁴⁾	1.25±0.63 ⁴⁾	1.14±0.58 ⁴⁾

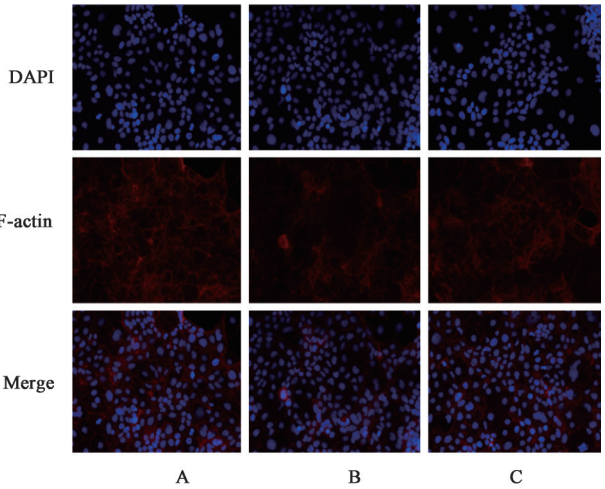


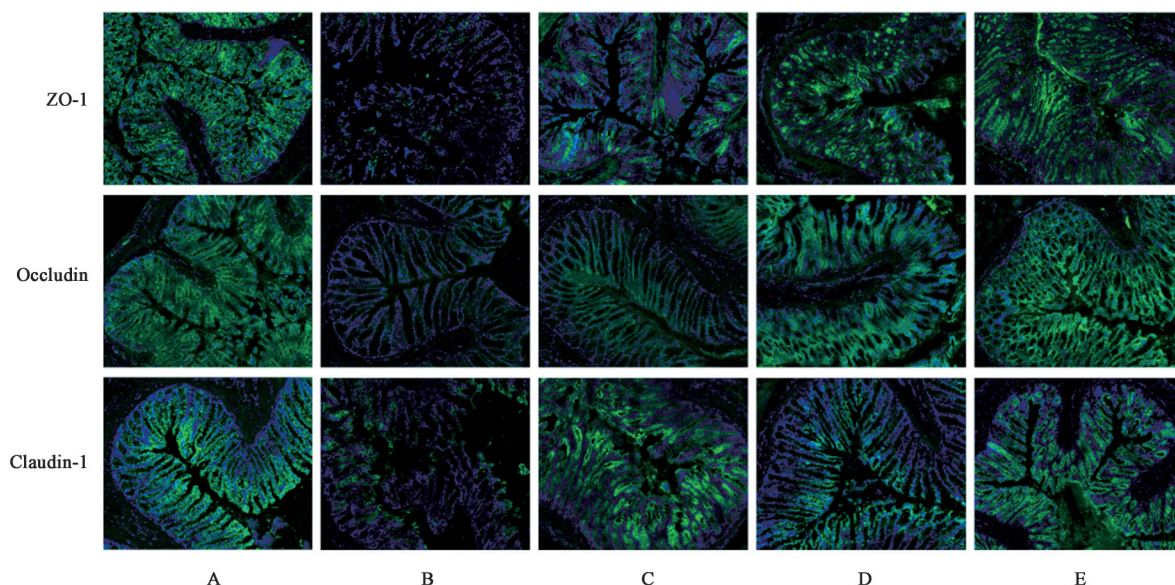
图5 芪附理中汤对Caco-2细胞F-actin的影响(鬼笔环肽,×200)
Fig. 5 Effect of Qifu Lizhong decoction on F-actin in Caco-2 cells (Phalloidin, ×200)

表5 芪附理中汤含药血清对Caco-2细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 5 Effect of serum containing ingredients of Qifu Lizhong decoction on viability of Caco-2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	体积分数/%	细胞活力/%
正常组		100.00±0.00
TNF- α 组		54.42±7.07 ²⁾
芪附理中汤组	5	89.03±4.38 ⁴⁾
	10	92.70±4.61 ⁴⁾
	15	82.15±6.21 ¹⁾
	20	76.37±3.76 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$;与TNF- α 组比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表6、表7同)

测了该通路关键蛋白的磷酸化水平。Western blot分析表明,与正常组比较,模型组大鼠结肠组织中p-MLC和p-MLCK蛋白水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,芪附理中汤组及芪附理中汤+抑制剂组p-MLC、p-MLCK蛋白表达显著降低($P<0.01$),且联合用药组的抑制作用更显著。见表6、图6、图7。



注:A.正常组;B.模型组;C.芪附理中汤组;D.抑制剂组;E.芪附理中汤+抑制剂组(图7同)
图6 芪附理中汤对UC大鼠结肠ZO-1、Occludin、Claudin-1表达的影响(IF,×400)
Fig. 6 Effect of Qifu Lizhong decoction on expression of ZO-1, Occludin and Claudin-1 in colon of UC rats (IF,×400)

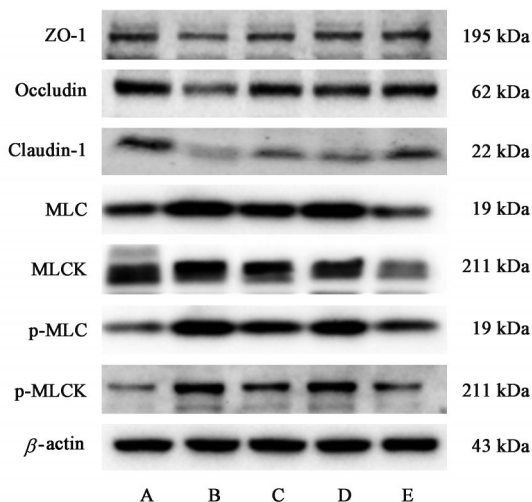
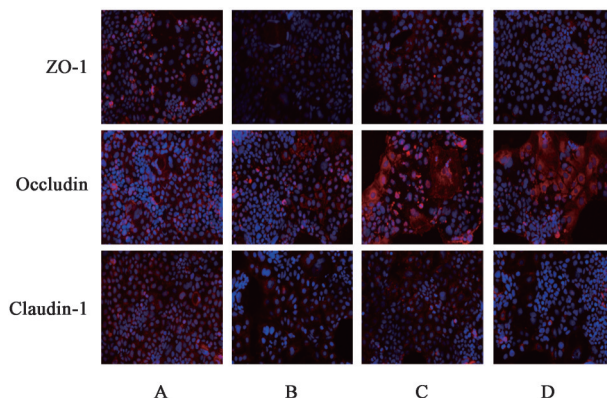


图7 UC大鼠结肠MLCK/p-MLC信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of MLCK/p-MLC signaling pathway-related proteins expression in colonic tissues of UC rats

体外实验结果一致,与正常组比较,TNF- α 组ZO-1、Occludin和Claudin-1荧光信号减弱,p-MLC、p-MLCK蛋白表达显著升高($P<0.01$);与TNF- α 组比较,芪附理中汤+抑制剂组TJ蛋白ZO-1、Occludin和Claudin-1的表达与定位恢复正常,p-MLC、p-MLCK蛋白表达显著降低($P<0.01$),差异具有统计学意义。综上所述,芪附理中汤通过抑制MLCK/p-MLC信号通路,稳定TJ蛋白的表达与定位,从而修复受损的肠道屏障。见图8、表7、图9。

4 讨论

UC作为炎症性肠病的一个亚型,其核心病理



注:A.正常组;B.TNF- α 组;C.芪附理中汤+抑制剂组;D.芪附理中汤组(图9同)
图8 芪附理中汤含药血清对Caco-2细胞ZO-1、Occludin、Claudin-1表达的影响(IF,×400)
Fig. 8 Effect of Qifu Lizhong decoction-containing serum on expression of ZO-1, Occludin and Claudin-1 in Caco-2 cells (IF,×400)

特征为结肠黏膜和黏膜下层的慢性炎症^[1]。近年来,UC全球发病率持续上升,并且存在向结肠炎相关癌症发展的潜在风险^[2]。当前临床治疗以氨基水杨酸制剂、免疫抑制剂、糖皮质激素等为主,部分患者应答不佳^[29]。因此,亟需阐明UC的发病机制、探索安全有效的新型治疗方案。越来越多的证据表明,肠黏膜屏障结构和功能的破坏是UC发病的关键环节之一^[30]。其中,由肠上皮细胞及TJ构成的机械屏障受损是UC进展的重要因素^[30-31]。因此,修复受损的肠道屏障是UC治疗的重要靶点。UC属于中医“久痢”范畴,慢性持续型UC常见的中医证候

表 7 芪附理中汤对 Caco-2 细胞 MLCK/p-MLC 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Qifu Lizhong decoction on expression of MLCK/p-MLC signaling pathway-related proteins in Caco-2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)					
组别	浓度	MLC/ β -actin	MLCK/ β -actin	p-MLC/ β -actin	p-MLCK/ β -actin
正常组		1.00 $\pm$ 0.78	1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.65
TNF- α 组		4.75 $\pm$ 0.31 ²⁾	5.31 $\pm$ 0.32 ²⁾	5.35 $\pm$ 0.27 ²⁾	8.24 $\pm$ 0.82 ²⁾
芪附理中汤+抑制剂组	10% 含药血清+10 μ mol $\cdot$ L ⁻¹	1.72 $\pm$ 0.72 ⁴⁾	1.56 $\pm$ 0.38 ⁴⁾	1.47 $\pm$ 0.46 ⁴⁾	2.74 $\pm$ 1.36 ⁴⁾
芪附理中汤组	10% 含药血清	2.18 $\pm$ 0.75 ⁴⁾	4.07 $\pm$ 0.62 ³⁾	2.65 $\pm$ 0.50 ⁴⁾	3.63 $\pm$ 1.72 ⁴⁾

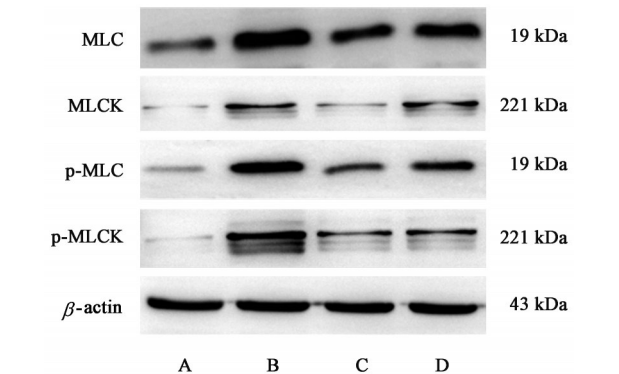


图 9 Caco-2 细胞 MLCK/p-MLC 信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 9 Electrophoresis of MLCK/p-MLC signaling pathway-related proteins expression in Caco-2 cells

为脾肾阳虚证^[32]。正如《景岳全书》言：“其病本则不在广肠而在脾肾”。芪附理中汤是本团队在经典名方“附子理中汤”基础上加黄芪、仙鹤草、地榆炭化裁而成。方中附子温补肾阳；干姜温中散寒；黄芪、党参、炒白术益气健脾、培补中土；地榆炭、仙鹤草敛疮止血，解毒止痢；炙甘草补脾益气、缓急止痛。诸药合用，共奏温补脾肾、固涩止泻之效。附子理中汤加味现已广泛用于 UC 的临床治疗^[33]。此外，现代药理学研究表明，芪附理中汤核心成分在 UC 的治疗中发挥多种作用机制。如党参多糖可以调节肠道微生物群和短链脂肪酸(SCFA)/G 蛋白偶联受体(GPR)/NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)途径缓解 UC^[34]；白术多糖通过调节 17 型辅助性 T 细胞(Th17)/调节性 T 细胞(Treg)细胞的平衡以减轻 UC^[35]。本研究证实，该方能显著改善脾肾阳虚型 UC 大鼠的一般状况、降低 DAI 评分、减轻结肠组织的病理损伤，并下调炎症因子水平。这些结果表明，芪附理中汤具有多维度的治疗作用，契合中医药整体调节特点，也为其传统功效提供了实验依据。然而，其具体作用机制还有待进一步验证。

肠道黏膜机械屏障的完整性是维持机体内环境稳定、抵御外邪侵袭的关键^[16]。该屏障功能的核心结构基础是肠上皮细胞间的 TJ 复合物，其主要由 Occludin、Claudins 及 ZO-1 等构成^[31]。TJ 结构的完整性对于调控细胞旁路通透性至关重要。多项研究表

明，TJ 的破坏可能导致肠道黏膜屏障结构和功能损伤，进而增加肠道通透性并加剧炎症反应^[36-38]。本研究验证了芪附理中汤对肠黏膜机械屏障的修复作用。在超微结构层面，透射电镜结果直观显示芪附理中汤能够维持 TJ 复合体的超微结构，保护上皮细胞微绒毛的正常形态。在分子层面，芪附理中汤显著上调了构成 TJ 核心蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达，并恢复了其在细胞连接处连续、线性的正常分布。上述证据共同表明，修复受损的肠道机械屏障是芪附理中汤发挥治疗作用的重要机制之一，也为其中医“固涩”的功效提供了现代生物学解释。

为进一步探究芪附理中汤修复屏障的深层分子机制，本研究聚焦于调控 TJ 通透性的 MLCK/p-MLC 信号通路。先前的研究表明，MLCK/p-MLC 信号通路在炎症等因素诱导的上皮屏障功能障碍中发挥重要作用^[39]。TJ 蛋白分子结构的解聚和重排是肠道黏膜屏障损伤的重要原因之一，其中 p-MLC 在肠道屏障损伤中起着关键作用^[30]。MLC 磷酸化可驱动 F-actin 应力纤维收缩，导致 TJ 复合物解体 and 屏障功能障碍^[40-41]。抑制 MLC 磷酸化，可以修复肠上皮屏障，缓解 UC 病理损伤^[17,42]。而 MLCK 是一种钙调蛋白依赖性激酶，可以介导 MLC 发生磷酸化^[43]。与以往研究一致，本研究发现，在 UC 模型大鼠结肠组织及 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞中，p-MLCK 和 p-MLC 水平均显著上调，与屏障功能受损状态相符。而芪附理中汤干预能有效抑制 MLCK 及 MLC 的磷酸化水平。此外，芪附理中汤与 MLCK 特异性抑制剂 ML-7 联合应用时，对 TJ 蛋白的恢复作用表现出协同增强效应。这一结果提示，MLCK/p-MLC 信号通路是芪附理中汤发挥屏障保护作用的一个重要靶点。通过抑制该通路，芪附理中汤可以阻止肌动蛋白骨架的过度收缩，从而稳定 TJ 蛋白复合物，以发挥对肠道屏障的保护作用。

本研究采用了贴近临床的病证结合模型，并结合体内外实验揭示了机制，但仍存在证候评价指标需客观化等局限。综上所述，本研究证实芪附理中汤能有效改善实验性 UC，其机制可能与靶向抑制 MLCK/

p-MLC信号通路,进而稳定TJ结构、修复肠道屏障完整性有关。这揭示了其“固涩止泻”功效的现代生物学内涵,为临床应用奠定了药理学基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LE BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2023, 402(10401): 571-584.
- [2] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies[J]. *Lancet*, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [3] MAUDUIT A, MAS E, SOLÀ-TAPIAS N, et al. Main genetic factors associated with inflammatory bowel diseases and their consequences on intestinal permeability: Involvement in gut inflammation[J]. *J Gastroenterol*, 2025, 60(11): 1323-1338.
- [4] CHHIBBA T, GROS B, KING J A, et al. Environmental risk factors of inflammatory bowel disease: Toward a strategy of preventative health[J]. *J Crohns Colitis*, 2025, 19(4): jjaf042.
- [5] GRÄNNÖ O, BERGEMALM D, SALOMON B, et al. Preclinical protein signatures of Crohn's disease and ulcerative colitis: A nested case-control study within large population-based cohorts[J]. *Gastroenterology*, 2025, 168(4): 741-753.
- [6] CHEN J, DAN L, YUAN S, et al. Dietary antioxidant capacity, genetic susceptibility and polymorphism, and inflammatory bowel disease risk in a prospective cohort[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2025, 23(9): 1623-1632. e16.
- [7] DANESE S, ALLEGRETTI J R, SCHREIBER S, et al. Anti-TL1A antibody, afimkibart, in moderately-to-severely active ulcerative colitis (TUSCANY-2): A multicentre, double-blind, treat-through, multi-dose, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2025, 10(10): 882-895.
- [8] VUYYURU S K, SHABAN N, YUAN Y, et al. Medical therapy for acute severe ulcerative colitis: A systematic review with meta-analysis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2025, 23(13): 2376-2398.
- [9] HUO J, WU Z, SUN W, et al. Protective effects of natural polysaccharides on intestinal barrier injury: A review[J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(3): 711-735.
- [10] RATH T, ATREYA R, BODENSCHATZ J, et al. Intestinal barrier healing is superior to endoscopic and histologic remission for predicting major adverse outcomes in inflammatory bowel disease: The prospective ERICA trial[J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(2): 241-255.
- [11] 李宇, 欧阳芳欣, 张贺, 等. 6-姜酚与6-姜烯酚改善肠道紧密连接损伤作用研究进展[J]. *食品科学*, 2024, 45(24): 282-92.
- LI Y, OUYANG F X, ZHANG H, et al. Research progress on alleviatory effects of 6-Gingerol and 6-Shogaol on intestinal tight junction damage[J]. *Food Sci*, 2024, 45(24): 282-292.
- [12] BERKES J, VISWANATHAN V K, SAVKOVIC S D, et al. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: Effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation[J]. *Gut*,

- 2003, 52(3): 439-451.
- [13] MINER-WILLIAMS W M, MOUGHAN P J. Intestinal barrier dysfunction: Implications for chronic inflammatory conditions of the bowel[J]. *Nutr Res Rev*, 2016, 29(1): 40-59.
- [14] ZHANG J, JIANG F, XIA W, et al. 7-ketodeoxycholic acid promotes colonic mucosal healing by inducing calcium release from endoplasmic reticulum via the TGR5-IP3R pathway[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(42): e07953.
- [15] GODÍNEZ-MÉNDEZ L A, VEGA-MAGAÑA A N, PEÑA-RODRÍGUEZ M, et al. Galactooligosaccharides promote gut barrier integrity and exert anti-inflammatory effects in DSS-induced colitis through microbiota modulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(16): 7968.
- [16] ZHOU R, CUI Y, WANG W, et al. The deubiquitinase USP2 preserves intestinal barrier through the TRAF6/NF- κ B/MLCK/MLC signaling in ulcerative colitis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 162: 115099.
- [17] HUANG S, FU Y, XU B, et al. Wogonoside alleviates colitis by improving intestinal epithelial barrier function via the MLCK/pMLC2 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153179.
- [18] 刘翠英, 施家希, 黄娟, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎小鼠紧密连接及MLCK/MLC通路的影响[J]. *中药材*, 2018, 41(9): 2180-2184.
- LIU C Y, SHI J X, HUANG J, et al. Effects of Shenling-Baizhu-San on the tight junction and MLCK/MLC pathway in mice with ulcerative colitis[J]. *J Chin Med Mater*, 2018, 41(9): 2180-2184.
- [19] 吴丽娟, 陈分乔, 刘坛娥, 等. 血根碱调节MLCK-MLC信号通路对脓毒症大鼠肠上皮屏障的保护作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2025, 41(8): 1847-1852.
- WU L J, CHEN F Q, LIU T E, et al. Protective effect of sanguinarine on intestinal epithelial barrier in septic rats through modulation of MLCK-MLC signaling pathway[J]. *Chin J Immunol*, 2025, 41(8): 1847-1852.
- [20] 李水芹, 王飞, 李雪萍, 等. 附子理中汤外用治疗溃疡性结肠炎[J]. *江西中医学院学报*, 2012, 24(5): 38-39.
- LI S Q, WANG F, LI X P, et al. Fuzi Lizhong Tang external application for ulcerative colitis[J]. *J Jiangxi Univ Chin Med*, 2012, 24(5): 38-39.
- [21] 刘青松, 郝彦伟, 张怡, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨加味附子理中汤治疗阳虚型溃疡性结肠炎的作用机制[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(5): 32-38.
- LIU Q S, HAO Y W, ZHANG Y, et al. Mechanism of Jiawei Fuzi Lizhong decoction in the treatment of ulcerative colitis with yangxu based on network pharmacology and experimental verification[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2022, 38(5): 32-38.
- [22] 郝彦伟, 张怡, 周雪雷, 等. 基于mTOR/p-S6K1探讨加味附子理中汤干预UC大鼠肠黏膜炎症反应的效应机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(13): 59-65.
- HAO Y W, ZHANG Y, ZHOU X L, et al. Exploring mechanism of modified Fuzi Lizhongtang in intervening inflammatory response of intestinal mucosa in rats with ulcerative colitis based on mTOR/p-S6K1[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26

- (13):59-65.
- [23] 刘金响,史英,刘海涛,等.大鼠溃疡性结肠炎中医证候动物模型研究进展[J].安徽中医药大学学报,2020,39(2):93-96.
LIU J X, SHI Y, LIU H T, et al. Research progress on animal models of traditional Chinese medicine syndromes in rat ulcerative colitis[J]. J Anhui Univ Chin Med, 2020, 39(2):93-96.
- [24] 罗朝磊,渠景连.基于博来霉素诱导的A549细胞衰老探讨补阳还五汤改善特发性肺纤维化的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2026,32(5):11-20.
LUO C L, QU J L. Investigating mechanism of Buyang Huanwu decoction to improve idiopathic pulmonary fibrosis based on bleomycin induced senescence of A549 cells[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, 32(5):11-20.
- [25] 张金卫,卢月,钟晓琴,等.羧甲基茯苓多糖对肿瘤坏死因子- α 调控体外Caco-2细胞系生物学特性的影响[J].中国免疫学杂志,2016,32(5):665-668.
ZHANG J W, LU Y, ZHONG X Q, et al. Effect of carboxymethylpachymaran on tumor necrosis factor alpha's control in vitro Caco-2 cell biological characteristics[J]. Chin J Immunol, 2016, 32(5):665-668.
- [26] ZHANG J, LU Y, WEI J, et al. Protective effect of carboxymethylpachymaran on TNF- α -induced damage in Caco-2 cell monolayers[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 93(Pt A):506-511.
- [27] 揣强,翟文静,贾苏杰,等.基于Nrf2/SLC7A11/GPX4通路探究泄浊解毒方通过抑制铁死亡和缓解肠黏膜损伤治疗溃疡性结肠炎的机制[J].中国实验方剂学杂志,2026,32(1):160-169.
CHUAI Q, ZHAI W J, JIA S J, et al. Based on Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway, mechanism of Xiezhuo Jiedu prescription in of treatment of ulcerative colitis by inhibiting ferroptosis and alleviating intestinal mucosal injury was studied[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, 32(1):160-169.
- [28] 潘鸣月,刘富彬,谭雪君,等.清补凉汤通过调节Th1/Th2/Th17/Treg细胞平衡和肠道菌群对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J].中药新药与临床药理,2025,36(7):1106-1113.
PAN M Y, LIU F B, TAN X J, et al. Therapeutic effects of Qingbuliang decoction on ulcerative colitis in mice via modulating Th1/Th2/Th17/Treg cell balance and gut microbiota[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2025, 36(7):1106-1113.
- [29] LAHARIE D. Towards therapeutic choices in ulcerative colitis[J]. Lancet, 2017, 390(10090):98-99.
- [30] LI X, LI Q, XIONG B, et al. Discoidin domain receptor 1(DDR1) promote intestinal barrier disruption in ulcerative colitis through tight junction proteins degradation and epithelium apoptosis[J]. Pharmacol Res, 2022, 183:106368.
- [31] LIU A L, LV H, WANG H Y, et al. Probiotics reduce the severity of DSS-induced colitis in aged mice by enhancing intestinal barrier function and modulating gut microbiota[J]. Gero Sci, 2025, doi: 10.1007/s11357-025-01900-6.
- [32] 李军祥,唐旭东,王化虹,等.溃疡性结肠炎中医诊疗指南(2023)[J].中医杂志,2024,65(7):763-768.
LI J X, TANG X D, WANG H H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of ulcerative colitis in traditional Chinese medicine (2023)[J]. J Tradit Chin Med, 2024, 65(7):763-768.
- [33] 谷金华,李文文,代洪生,等.附子理中丸联合美沙拉嗪通过影响AMPK/NF- κ B信号通路治疗脾肾阳虚型溃疡性结肠炎[J].中药药理与临床,2025,41(9):89-93.
GU J H, LI W W, DAI H S, et al. Fuzi Lizhong pills combined with mesalazine treats spleen-kidney Yang deficiency-pattern ulcerative colitis by modulating the AMPK/NF- κ B signalling pathway[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2025, 41(9):89-93.
- [34] ZHOU J, YANG Q, WEI W, et al. *Codonopsis pilosula* polysaccharide alleviates ulcerative colitis by modulating gut microbiota and SCFA/GPR/NLRP3 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 337(Pt 2):118928.
- [35] YANG M, ZHANG Q, TAHA R, et al. Polysaccharide from *Atractylodes macrocephala* Koidz. ameliorates DSS-induced colitis in mice by regulating the Th17/Treg cell balance[J]. Front Immunol, 2022, 13:1021695.
- [36] DONG Y, FAN H, ZHANG Z, et al. Berberine ameliorates DSS-induced intestinal mucosal barrier dysfunction through microbiota-dependence and Wnt/ β -catenin pathway[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(4):1381-1397.
- [37] LI T, HU G, FU S, et al. Phillyrin ameliorates DSS-induced colitis in mice via modulating the gut microbiota and inhibiting the NF- κ B/MLCK pathway[J]. Microbiol Spectr, 2025, 13(2):e0200624.
- [38] KOTLA N G, ISA I L M, RASALA S, et al. Modulation of gut barrier functions in ulcerative colitis by hyaluronic acid system [J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(4):e2103189.
- [39] ZHONG J, YU R, ZHOU Q, et al. Naringenin prevents TNF- α -induced gut-vascular barrier disruption associated with inhibiting the NF- κ B-mediated MLCK/p-MLC and NLRP3 pathways[J]. Food Funct, 2021, 12(6):2715-2725.
- [40] XIE Y, LUO Z, PENG W, et al. Inhibition of UTX/KDM6A improves recovery of spinal cord injury by attenuating BSCB permeability and macrophage infiltration through the MLCK/p-MLC pathway[J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1):259.
- [41] TURNER J R, RILL B K, CARLSON S L, et al. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation[J]. Am J Physiol, 1997, 273(4):C1378-C1385.
- [42] WANG J, ZHAO H, LV K, et al. Pterostilbene ameliorates DSS-induced intestinal epithelial barrier loss in mice via suppression of the NF- κ B-mediated MLCK-MLC signaling pathway[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(13):3871-3878.
- [43] FANG X, BOGDANOV V, DAVIS J P, et al. Molecular insights into the MLCK activation by CaM[J]. J Chem Inf Model, 2023, 63(23):7487-7498.

[责任编辑 孙丛丛]