

·针灸推拿·

本文引用: 杨 华, 冯 洁, 苏燕波, 段杨丽, 郑添明. 艾灸对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道损伤的改善作用及 MLCK/MLC2 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(3): 467-473.

艾灸对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道损伤的改善作用及 MLCK/MLC2 信号通路的影响

杨 华, 冯 洁*, 苏燕波, 段杨丽, 郑添明

桂林市人民医院消化内科, 广西 桂林 541002

[摘要] **目的** 探讨艾灸对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)大鼠肠道炎症及肠道损伤的改善作用及肌球蛋白轻链激酶(MLCK)/肌球蛋白调节性轻链 2(MLC2)信号通路的影响。**方法** 构建腹泻型肠易激综合征大鼠模型并将其随机分为模型组、阳性对照组(匹维溴铵组, 15 mg·kg⁻¹)、艾灸组、艾灸+MLCK/MLC2 通路激活剂 iE-DAP 组(艾灸+iE-DAP 组, 3.5 mg·kg⁻¹), 每组 12 只。另取 12 只健康大鼠作为对照组。对所有大鼠进行腹泻等级评分并检测粪便含水量; HE 染色法检测结肠组织病理变化; TUNEL 染色法检测结肠组织细胞凋亡情况; RT-qPCR 法检测结肠组织中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-10(IL-10)mRNA 表达水平; 免疫组化法检测结肠组织闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、紧密连接蛋白 1(Claudin 1)蛋白含量; Western blot 检测结肠组织 MLCK、p-MLC2 和 MLC2 蛋白表达量。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠肠黏膜完整性受损、炎症细胞浸润加重, 腹泻评分、粪便含水量、结肠组织细胞凋亡占比、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达水平、p-MLC2/MLC2 和 MLCK 蛋白表达水平升高($P<0.05$), IL-10 mRNA 表达水平以及结肠组织中 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白含量显著下降($P<0.05$); 与模型组相比, 匹维溴铵组和艾灸组大鼠结肠组织病理损伤减轻、炎症细胞浸润减少, 腹泻评分、粪便含水量、结肠组织细胞凋亡占比、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达水平、p-MLC2/MLC2 和 MLCK 蛋白表达水平降低($P<0.05$), IL-10 mRNA 表达水平以及结肠组织中 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白含量升高($P<0.05$); 与艾灸组相比, 艾灸+iE-DAP 组大鼠结肠组织病损加重、炎症细胞浸润增强, 腹泻评分、粪便含水量、细胞凋亡占比以及炎症因子表达水平明显上调, iE-DAP 增加了 p-MLC2/MLC2 和 MLCK 蛋白的表达量($P<0.05$)。**结论** 艾灸可通过抑制 MLCK/MLC2 信号通路减轻机体炎症反应、减少细胞凋亡、增强肠道屏障物理防御功能, 从而改善 IBS-D 大鼠的结肠组织病损、减轻腹泻。

[关键词] 腹泻型肠易激综合征; 艾灸; 炎症反应; 肠道损伤; 肌球蛋白轻链激酶/肌球蛋白调节性轻链 2 信号通路

[中图分类号] R245.81

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.03.011

Ameliorative effects of moxibustion on intestinal damage in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and its impact on MLCK/ MLC2 signaling pathway

YANG Hua, FENG Jie*, SU Yanbo, DUAN Yangli, ZHENG Tianming

Department of Gastroenterology, Guilin People's Hospital, Guilin, Guangxi 541002, China

[Abstract] **Objective** To explore the ameliorative effects of moxibustion on intestinal inflammation and damage in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) and its impact on the myosin light chain kinase (MLCK)/myosin regulatory light

[收稿日期] 2024-10-14

[基金项目] 广西壮族自治区中医药管理局项目(GXZYC20230613)。

[通信作者] * 冯 洁, 女, 博士, 主任医师, E-mail: nuonuo-813@163.com。

chain 2 (MLC2) signaling pathway. **Methods** A rat model of IBS-D was established and the rats were randomly divided into a model group, a positive control group (pinaverium bromide group, $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), a moxibustion group, and a moxibustion+MLCK/MLC2 pathway activator iE-DAP group (moxibustion+iE-DAP group, $3.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 12 rats in each group. Another twelve healthy rats were selected as the control group. All rats were scored for diarrhea grade and the fecal water content was measured. HE staining was used to determine the pathological changes of colon tissue. Apoptosis in the colon tissue was examined by TUNEL staining. RT-qPCR was used to measure mRNA expression levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-10 (IL-10) in colon tissue. Immunohistochemistry was used to determine the protein levels of zonula occludens 1 (ZO-1) and tight junction protein 1 (Claudin 1) in colon tissue. Western blot was used to measure the protein expression levels of MLCK, p-MLC2, and MLC2 in colon tissue. **Results** Compared with the control group, the rats in the model group exhibited impaired intestinal mucosal integrity and aggravated inflammatory cell infiltration. The diarrhea score, fecal water content, proportions of colonic tissue apoptosis, mRNA expression levels of IL-6 and TNF- α , and protein expression levels of p-MLC2/MLC2 and MLCK increased ($P<0.05$), while the IL-10 mRNA expression level as well as the protein content of ZO-1 and Claudin-1 in colon tissue decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the rats in the pinaverium bromide group and the moxibustion group showed reduced histopathological damage and inflammatory cell infiltration in the colon tissue. The diarrhea score, fecal water content, proportion of apoptotic cells in colon tissue, mRNA expression levels of IL-6 and TNF- α , protein expression levels of p-MLC2/MLC2 and MLCK decreased ($P<0.05$), while the mRNA expression level of IL-10 and the protein content of ZO-1 and Claudin-1 in colon tissue significantly increased ($P<0.05$). Compared with the moxibustion group, the rats in the moxibustion+iE-DAP group exhibited exacerbated colon tissue damage and enhanced inflammatory cell infiltration. The diarrhea score, fecal water content, proportion of apoptotic cells and the expression levels of inflammatory factors remarkably increased, and iE-DAP increased the protein expression levels of p-MLC2/MLC2 and MLCK ($P<0.05$). **Conclusion** Moxibustion can alleviate the body's inflammatory response, reduce cell apoptosis, and enhance the physical defense function of the intestinal barrier by inhibiting the MLCK/MLC2 signaling pathway, thereby relieving colon tissue lesions and alleviating diarrhea in rats with IBS-D.

[**Keywords**] diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; moxibustion; inflammatory response; intestinal damage; myosin light chain kinase/myosin regulatory light chain 2 signaling pathway

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的消化性系统疾病,严重影响消化道系统功能。其主要症状包括反复出现的腹胀、腹痛或不适,通常伴有排便习惯的改变^[1]。根据排便习惯的异常明显变化,可将 IBS 分为不同类型,其中以腹泻为主的 IBS(diarrhea-predominant IBS, IBS-D)最为常见,其发病率逐年增加。IBS-D 的临床表现包括复发性腹痛和稀便或水样便,且符合布里斯托大便分类法的特点^[2]。IBS-D 的病因和病理生理机制复杂多样,胃肠运动异常、肠道感染和炎症、心理和情绪变化、肠道微生态改变以及肠道黏膜屏障功能受损等因素共同导致了该病的发生和发展。目前,对于 IBS-D 的机制途径仍然不明确,这大大限制了对新的治疗方法的探索。因此,亟须发现可能存在的作用机制,为靶向 IBS-D 的治疗开辟新途径。

由于 IBS-D 患者肠道稳态受到严重破坏,体内用药的肠道吸收效率明显下降^[3],因此,体外用药可能是治疗 IBS-D 的新方式。艾灸是常见的中医疗

法,作为一种“内病外治”的医术,具有通络止痛、防病保健的功效。目前已有多项研究表明,艾灸在治疗胃肠道疾病(包括肠梗阻、食管反流病、炎症性肠病)方面发挥不可替代的作用^[4-5],但艾灸治疗胃肠道疾病的多靶点、多途径的疗效机制还未明确提出。肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase,MLCK)/肌球蛋白轻链 2 (myosin light chain 2,MLC2) 信号通路是介导肠道炎症的典型通路^[6]。报告指出,通过靶向调节 MLCK/MLC2 轴,可减少炎症因子水平、增强肠道的物理防御能力,从而加强对肠道的损伤保护^[7]。本研究主要探索艾灸能否通过靶向 MLCK/MLC2 通路改善 IBS-D 模型的肠道损伤,发挥肠道保护功能,从而为 IBS-D 治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 雄性大鼠,体质量(200 ± 10) g,购自北京北方艾特生物科技有限公司,生产许可证号:SYXK(京)

2023-0071。饲养在桂林医学院 SPF 级动物实验中心(使用许可证号:SYXK 桂 2020-0005)恒温恒湿下(25 ℃、65%湿度)自由采食和饮水,每天光照、黑暗各一半时间,给予 7 d 的适应期。所有实验均经本院动物伦理委员会批准,批号:2023-109KY。

1.2 药品、主要试剂与仪器

匹维溴铵(批号:L176705,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);iE-DAP(批号:230824,北京阿斯雷尔生物技术有限公司); β -actin、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)mRNA 引物序列由北京擎科生物公司合成;反转录试剂(批号:RR036A,日本 Takara 公司);HE 染色试剂盒、TUNEL 试剂盒[批号:60524ES60,40307ES20,翌圣生物科技(上海)股份有限公司];ZO-1、Claudin-1、MLCK(批号:ab221547、ab307692、ab232949,美国 Abcam 公司);p-MLC2、MLC2(批号:#3671S、#3672S,美国 Cell Signaling Technology 公司)。

荧光定量 PCR 仪(型号:ABI7500,北京安麦格贸易有限公司);凝胶成像系统(型号:Axygen,广州科适特科学仪器有限公司);奥林巴斯倒置显微镜(型号:IXplore Pro, OLYMPUS 公司);LF-垂直电泳槽(型号:Mini2 型,北京龙方科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 建模 参照文献[8]建立腹泻型肠易激综合征大鼠模型。具体操作:所有大鼠吸入 3%乙醚致其麻醉,于第 1 天和第 5 天在肛门近端 8 cm 处结肠内灌注 1 mL 4%乙酸,持续 30 s,然后灌入 1 mL 磷酸盐缓冲盐水以稀释乙酸并冲洗结肠。空白组大鼠灌入同等体积的磷酸盐缓冲盐水。在第 2、3、4、6 天,每天束缚大鼠前后肢和背部 2 h。第 7 天,检测大鼠粪便评分和粪便含水量,其变化量明显异于空白组视为建模成功。

1.3.2 分组及干预 模型构建成功后,将 48 只大鼠随机分为模型组、艾灸组、匹维溴铵组、艾灸+iE-DAP 组,每组 12 只。另取 12 只正常 SD 大鼠作为对照组。参考文献[9]自制艾灸支架,固定大鼠体位。将 5 mm 艾条固定在支架上,点燃后悬挂在穴位(上巨虚、天枢)上方约 2 cm 处,每处穴位施灸 30 min,1 次/d,连续进行 14 d。其中,匹维溴铵组大鼠接受灌胃治疗(15 mg/kg)^[10],艾灸+iE-DAP 组大鼠在艾灸前,腹腔注射 3.5 mg/kg 的 iE-DAP^[11]。对照组和模型组大鼠只固定不进行艾灸。

1.4 指标检测及方法

1.4.1 粪便含水量、腹泻等级评分 分别在实验第

7、14 天记录腹泻评分,并在实验第 14 天测定粪便水分含量[(湿粪重量-干燥后重量)/湿粪重量 \times 100%]。采用布里斯托尔粪便分级方法^[12]评估腹泻。1 级:分散的小块,如坚果;2 级:香肠状,结块;3 级:香肠状,表面有裂缝;4 级:香肠或弯曲状,表面光滑;5 级:软块,质地柔软、轮廓清晰;6 级:像天鹅绒状,边缘模糊,黏稠粪便;7 级:水状,无固体。

1.4.2 结肠组织 HE 染色 各组随机取 6 只大鼠,安乐死后打开腹腔取大鼠结肠组织(距肛门约 9 cm 处病变明显的肠段),在 10%甲醛溶液中固定 24 h,依次用浓度梯度的乙醇脱水。然后将样品包埋在石蜡中,切成 5 μ m 的切片,切片经苏木精、伊红染色,室温下封片。在光学显微镜下观察大鼠结肠组织形态。

1.4.3 TUNEL 染色 取“1.4.2”切片脱蜡后,用 1% Triton X-100 在室温下渗透 15 min,并与 TUNEL 混合物在 37 ℃的黑暗环境中孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次(5 min/次)后,室温下用 DAPI 孵育 0.5 h。用倒置荧光显微镜对样品进行观察,视野下进行荧光强度对比。

1.4.4 RT-qPCR 检测结肠组织中 IL-6、TNF- α 和 IL-10 mRNA 水平 各组剩余 6 只大鼠安乐死后取结肠组织(距肛门约 9 cm 处病变明显的肠段),Trizol 提取一部分组织中总 RNA 并测定浓度,使用 Takara 试剂盒分别进行 RNA 的反转录和实时荧光定量 PCR 反应,引物序列见表 1。在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应,通过熔融曲线图确认引物是否特异。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分别计算 IL-6、TNF- α 和 IL-10 mRNA 的表达水平。其余结肠组织于-80 ℃冷冻保存。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列	长度/bp
IL-6	正向:5'-AAGCCAGACTCATTGAGGC-3'	567
	反向:5'-GTCCTTAGCCACTCCTTCTG-3'	
TNF- α	正向:5'-CTTCTCATTCTGCTCGTGG-3'	446
	反向:5'-TGATCTGAGTGTGAGGCTCTG-3'	
IL-10	正向:5'-AGCTGAAGACCCTCTGGATAC-3'	307
	反向:5'-TGGCCTTGTAGACACCTTTG-3'	
β -actin	正向:5'-GCAGGACTACGATGAGTCCG-3'	300
	反向:5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'	

1.4.5 结肠组织 ZO-1、Claudin 1 蛋白表达检测 对“1.4.2”石蜡切片脱蜡后,高温高压下使用柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复,置于 3% H₂O₂ 中室温孵育 1 h。分别添加 ZO-1、Claudin 1 一抗在 37 ℃环境下孵育

1 h, 添加二抗孵育 30 min, PBS 冲洗后滴加 DAB 显色剂, 苏木素复染, 脱水, 封片, 于光镜下进行观察。以棕褐色颗粒为阳性表达, 取平均光密度值进行比较。

1.4.6 结肠组织 MLCK、p-MLC2 和 MLC2 蛋白表达检测 取“1.4.4”中冻存的结肠组织加入预冷的蛋白裂解液充分反应, 离心取上清, 提取并定量总蛋白。蛋白经变性处理, SDS-PAGE 法分离总蛋白然后将其转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后分别与 MLCK、p-MLC2 和 MLC2 一抗在 4 °C 下孵育过夜, 之后 TBST 洗膜后添加二抗, 室温孵育 1 h, 再次洗膜。可视化处理后, 凝胶成像仪采集图像并进行灰度分析。

1.5 统计学分析

所有分析均使用 SPSS 24.0 进行。所有数据经分析均符合正态分布并以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠腹泻评分、粪便含水量变化

与对照组相比(第 1 天), 其余处理组大鼠腹泻评分显著增大, 提示模型构建成功。与模型组相比, 匹维溴铵组和艾灸组大鼠第 7、14 天腹泻评分明显减小、粪便含水量明显降低($P<0.05$); 第 7、14 天, 与艾灸组相比, 艾灸+iE-DAP 组大鼠腹泻评分明显增大、粪便含水量明显升高($P<0.05$); 与第 7 天相比, 第 14 天艾灸组大鼠腹泻评分明显减小($P<0.05$)。详见表 2。

2.2 HE 染色观察各组大鼠结肠组织病理变化

对照组肠上皮细胞排列集聚有序、肠黏膜结构完整; 模型组肠上皮细胞散乱无序、大量炎症细胞浸润, 肠黏膜完整性受损; 匹维溴铵组和艾灸组大鼠肠上皮细胞完整性、有序性得到恢复, 炎症细胞浸润减少、间质间隙变小、肠黏膜完整性得到改善; 艾灸+

表 2 各组大鼠腹泻评分、粪便含水量的改变($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Changes in diarrhea score and fecal water content in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	腹泻评分/分			粪便含水量/%
	第 1 天	第 7 天	第 14 天	
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	58.33±5.60
模型组	6.47±0.12 [#]	6.43±0.17 [#]	6.54±0.20 [#]	72.14±7.10 [#]
匹维溴铵组	6.50±0.20 [#]	4.25±0.37 [#]	3.83±0.32 [#]	62.25±5.86 [#]
艾灸组	6.65±0.10 [#]	4.83±0.41 [#]	4.17±0.39 [#]	64.00±5.23 [#]
艾灸+iE-DAP 组	6.58±0.15 [#]	5.41±0.50 [#]	5.17±0.52 [#]	70.50±7.01 [#]

注: 与对照组相比, [#] $P<0.05$; 与模型组相比, ^{*} $P<0.05$; 与艾灸组相比, ^{*} $P<0.05$; 与第 7 天相比, [⊙] $P<0.05$ 。

iE-DAP 组大鼠组织黏膜下层可见水肿、间质间隙明显增大、肠黏膜完整性受损。详见图 1。

2.3 各组大鼠结肠组织细胞凋亡检测

与对照组相比, 模型组大鼠结肠组织凋亡细胞占比明显升高($P<0.05$); 与模型组相比, 匹维溴铵组和艾灸组大鼠结肠组织凋亡细胞占比显著降低($P<0.05$); 与艾灸组相比, 艾灸+iE-DAP 组大鼠结肠组织凋亡细胞占比明显升高($P<0.05$)。详见图 2、表 3。

2.4 各组大鼠结肠组织 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白含量变化

与对照组比较, 模型组大鼠结肠组织中 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白含量降低($P<0.05$); 与模型组相比, 匹维溴铵组和艾灸组大鼠结肠组织中 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白含量升高($P<0.05$); 与艾灸组相比, 艾灸+iE-DAP 组大鼠结肠组织中 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白含量降低($P<0.05$)。详见图 3、表 4。

2.5 各组大鼠结肠组织中 IL-6、TNF- α 和 IL-10 mRNA 表达水平变化

与对照组相比, 模型组大鼠结肠组织中 IL-6 和 TNF- α mRNA 表达水平显著上调, IL-10 mRNA 表达水平下调($P<0.05$); 与模型组相比, 匹维溴铵组和艾灸组大鼠结肠组织中 IL-6 和 TNF- α mRNA 表达水平显著下调, IL-10 mRNA 表达水平上调($P<$

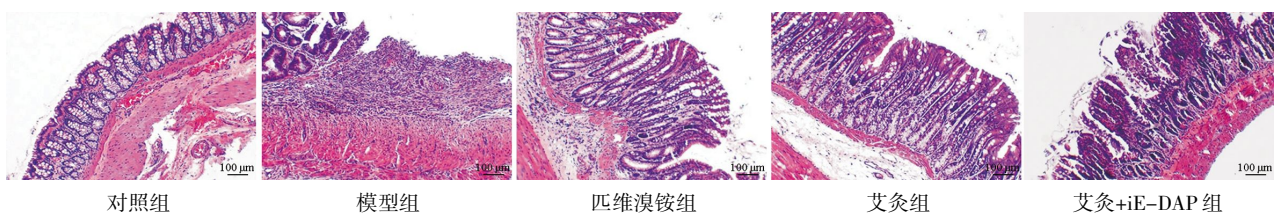


图 1 各组大鼠结肠组织 HE 染色($\times 100$)

Fig.1 HE staining of colon tissue in each group of rats ($\times 100$)

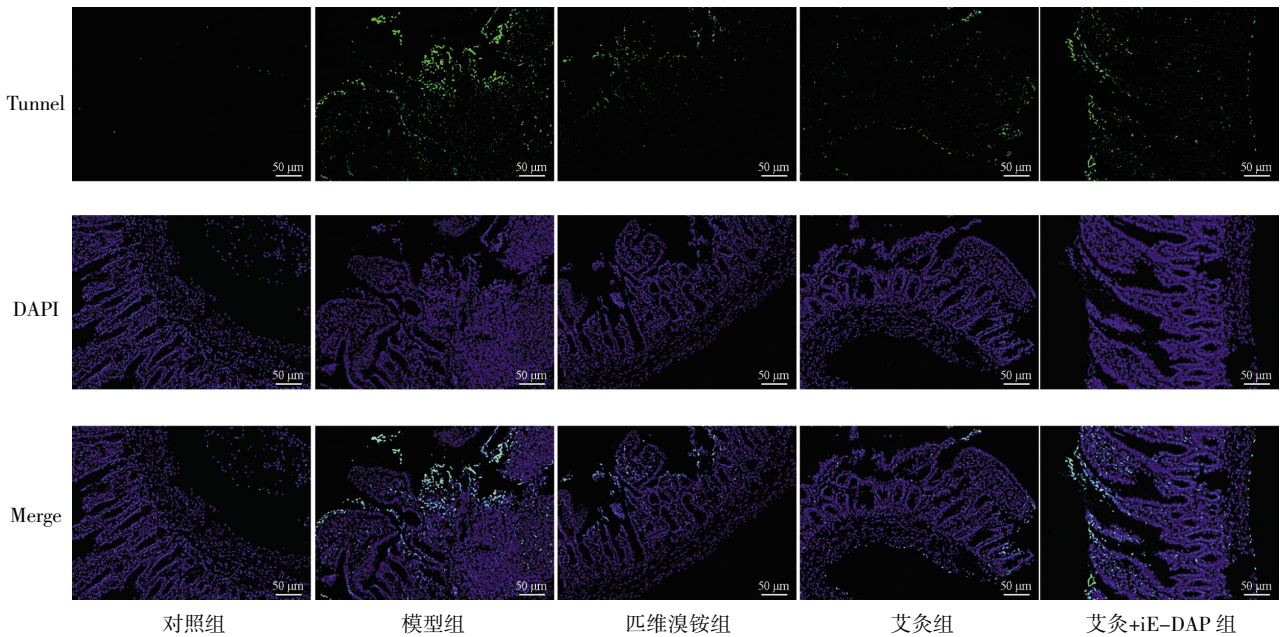


图2 各组大鼠结肠组织 TUNEL 染色(×200)

Fig.2 TUNEL staining of colon tissue in each group of rats (×200)

表3 各组大鼠结肠组织细胞凋亡的改变($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Changes of apoptosis in colon tissue cells in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	细胞凋亡占比/%
对照组	2.10±0.11
模型组	30.41±2.89 [#]
匹维溴铵组	13.21±1.47 [*]
艾灸组	14.47±1.50 [*]
艾灸+iE-DAP组	26.32±2.61 [*]

注:与对照组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与艾灸组相比,^{*} $P<0.05$ 。

0.05);与艾灸组相比,艾灸+iE-DAP组大鼠结肠组织中 IL-6 和 TNF- α mRNA 表达水平上调,IL-10 mRNA 表达水平下调($P<0.05$)。详见表5。

2.6 各组大鼠结肠组织 MLCK、p-MLC2 和 MLC2 蛋白表达变化

与对照组相比,模型组大鼠结肠组织中 p-MLC2/MLC2 和 MLCK 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与模型组相比,匹维溴铵组和艾灸组大鼠结肠组织中 p-MLC2/MLC2 和 MLCK 蛋白表达水平降低($P<0.05$);与艾灸组相比,艾灸+iE-DAP组大鼠结肠组织中 p-MLC2/MLC2 和 MLCK 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图4、表6。

3 讨论

IBS-D 是一种临床常见的肠道功能障碍疾病,主要由肠道运动性的改变、内脏敏感性的增加和肠道感染等因素引起。目前,可用于治疗 IBS-D 的

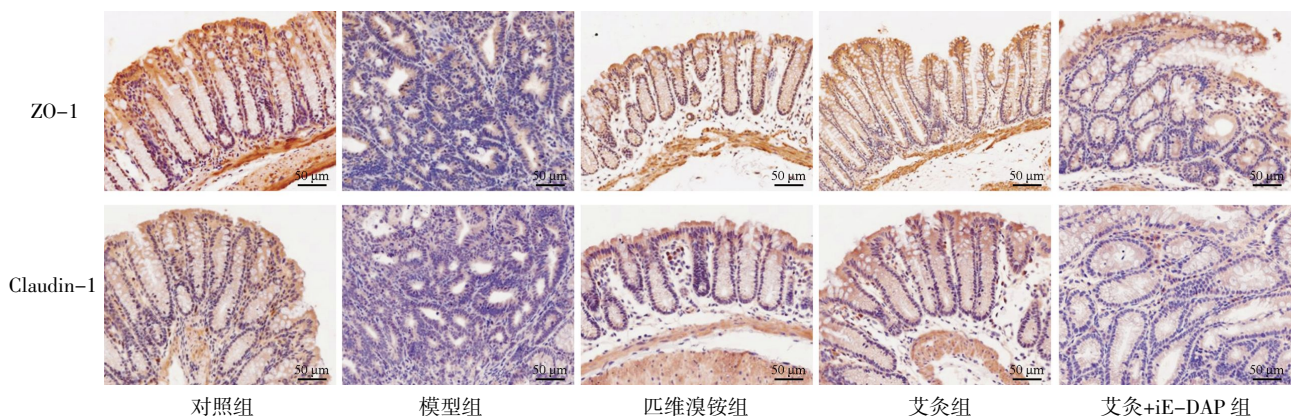


图3 各组大鼠结肠组织 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白表达(×200)

Fig.3 Protein expressions of ZO-1 and Claudin-1 in colon tissue in each group of rats (×200)

表 4 各组大鼠结肠组织 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白表达的改变($\bar{x}\pm s, n=6$, 平均光密度)

Table 4 Changes in the protein expressions of ZO-1 and Claudin-1 in colon tissue in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$, average optical density)

组别	ZO-1	Claudin-1
对照组	6.21±0.61	5.33±0.50
模型组	1.47±0.15 [#]	2.12±0.18 [#]
匹维溴铵组	5.12±0.47 [*]	4.61±0.45 [*]
艾灸组	5.07±0.50 [*]	4.54±0.42 [*]
艾灸+iE-DAP 组	2.32±0.21 [§]	2.87±0.25 [§]

注:与对照组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与艾灸组相比,[§] $P<0.05$ 。

表 5 各组大鼠结肠组织 IL-6、TNF- α 和 IL-10 mRNA 表达水平的改变($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Changes in the expression levels of IL-6, TNF- α , and IL-10 mRNA in colon tissue in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	IL-6	TNF- α	IL-10
对照组	1.02±0.07	0.98±0.05	0.99±0.10
模型组	2.04±0.18 [#]	2.21±0.20 [#]	0.35±0.03 [#]
匹维溴铵组	1.17±0.11 [*]	1.28±0.13 [*]	0.90±0.09 [*]
艾灸组	1.20±0.10 [*]	1.34±0.15 [*]	0.87±0.08 [*]
艾灸+iE-DAP 组	1.85±0.17 [§]	1.91±0.18 [§]	0.40±0.04 [§]

注:与对照组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与艾灸组相比,[§] $P<0.05$ 。

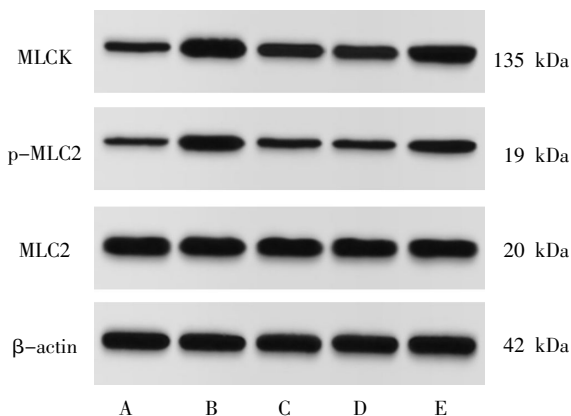


图 4 各组大鼠结肠组织 MLCK、p-MLC2 和 MLC2 蛋白条带图

Fig.4 MLCK, p-MLC2, and MLC2 protein bands in colon tissue in each group of rats

注:A:对照组;B:模型组;C:匹维溴铵组;D:艾灸组;E:艾灸+iE-DAP 组。

物包括止泻药、益生菌等,但疗效不佳。传统中医理论认为,IBS-D 属于中医学“腹泻病”范畴。艾灸是一种内病外治的传统疗法,通过作用于身体穴位疏通

表 6 各组结肠组织 MLCK、p-MLC2 和 MLC2 蛋白表达水平的改变($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Changes in the protein expression levels of MLCK, p-MLC2, and MLC2 in colon tissue of each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	MLCK/ β -actin	p-MLC2/MLC2
对照组	0.45±0.04	0.27±0.03
模型组	1.27±0.13 [#]	0.91±0.08 [#]
匹维溴铵组	0.82±0.10 [*]	0.40±0.04 [*]
艾灸组	0.85±0.11 [*]	0.39±0.04 [*]
艾灸+iE-DAP 组	1.16±0.13 [§]	0.86±0.08 [§]

注:与对照组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与艾灸组相比,[§] $P<0.05$ 。

经络、改善体内循环,达到防病治病的疗效^[13]。相关临床研究显示,艾灸可一定程度上减轻 IBS-D 患者的炎症水平,改善胃肠功能和生活质量^[14]。本研究通过艾灸法治疗 IBS-D 模型大鼠,结果显示大鼠腹泻评分明显减小、粪便含水量明显降低,这说明艾灸对治疗腹泻有显著的效果。

既往研究显示,IBS-D 患者肠组织发生强烈的炎症反应^[15]。IL-6 和 TNF- α 是重要的促炎因子,可导致肠道炎症的恶性进程,对肠道组织造成损害;IL-10 在调节肠道的炎症方面通过作用于巨噬细胞发挥抗炎效应^[16]。ZHANG 等^[17]报道指出,IBS-D 模型大鼠结肠炎症细胞浸润、血清和结肠组织中炎症因子水平显著升高。本研究结果显示,艾灸组大鼠结肠组织中 IL-6 和 TNF- α mRNA 表达水平显著下调,IL-10 mRNA 表达水平显著上调,结果与储浩然等^[18]的研究一致,这表明艾灸通过降低炎症因子水平进而有效降低机体炎症反应。

MLCK/MLC2 通路不仅是介导肠道炎症的典型通路,还影响肠黏膜机械屏障的结构和功能^[19]。紧密连接(tight junctions, TJs)是肠上皮细胞之间的重要蛋白质复合物,是肠黏膜屏障的结构基础^[20]。TJs 的改变和渗透性的增加参与了 IBS-D 的发生和发展,其中免疫系统释放的促炎细胞因子(TNF- α)通过重塑和下调 TJs 的相关蛋白直接增加肠道的渗透性。TNF- α 通过上调 MLCK 破坏肠道屏障功能,从而导致 MLC2 磷酸化;随后磷酸化的 MLC2 通过激活 ATP 酶加强对肌动蛋白和肌球蛋白纤维机械收缩所需的代谢能量供应,导致紧密连接蛋白(Claudin-1 和 ZO-1)生成减少、细胞膜间隙增大,导致上皮细胞通透性增加^[21]。XIE 等^[8]的报告指出,白术油通过抑制 MLCK/MLC2 通路活性、提高 ZO-1 和 Occludin 的蛋白表达量,从而增强大鼠肠道物理屏障,减轻 IBS-

D症状。本研究结果显示,艾灸可显著降低大鼠结肠组织中TNF- α mRNA表达水平以及p-MLC2/MLC2和MLCK蛋白的表达量,同时Claudin-1和ZO-1蛋白含量明显提高,提示艾灸可通过抑制MLCK/MLC2通路活性,改善结肠通透性。为了验证该猜测,本研究在给予大鼠艾灸治疗的基础上腹腔注射MLCK/MLC2通路激活剂,进一步发现IBS-D大鼠腹泻评分和粪便含水量增加,IL-6、TNF- α mRNA表达水平上调,Claudin-1和ZO-1蛋白含量降低,结肠组织细胞凋亡增加,这些指标的变化更加验证了艾灸对IBS-D大鼠的治疗作用是通过调控MLCK/MLC2通路实现的。

综上所述,艾灸可能通过抑制MLCK/MLC2通路相关蛋白的表达,降低机体炎性反应、抑制结肠组织细胞凋亡、增强肠道的紧密连接从而改善IBS-D大鼠结肠组织病损。这提示艾灸可作为体外治疗IBS-D的一种有效方式。但关于IBS-D的病理机制较为复杂,后续将从更多的检测指标以及可能作用的通路提高关于艾灸治疗IBS-D的认识。

参考文献

- [1] HUANG K Y, WANG F Y, LV M, et al. Irritable bowel syndrome: Epidemiology, overlap disorders, pathophysiology and treatment[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2023, 29(26): 4120-4135.
- [2] ALTOMARE A, DI ROSA C, IMPERIA E, et al. Diarrhea predominant-irritable bowel syndrome (IBS-D): Effects of different nutritional patterns on intestinal dysbiosis and symptoms[J]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1506.
- [3] WECHSLER E V, SHAH E D. Diarrhea-predominant and constipation-predominant irritable bowel syndrome: Current prescription drug treatment options[J]. *Drugs*, 2021, 81(17): 1953-1968.
- [4] WANG Z Q, XU M W, SHI Z, et al. Mild moxibustion for irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D): A randomized controlled trial[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 289: 115064.
- [5] SHEN J C, QI Q, HAN D, et al. Moxibustion improves experimental colitis in rats with Crohn's disease by regulating bile acid enterohepatic circulation and intestinal farnesoid X receptor[J]. *Journal of Integrative Medicine*, 2023, 21(2): 194-204.
- [6] WANG J, XUE X Y, ZHAO X T, et al. Forsythiaside A alleviates acute lung injury by inhibiting inflammation and epithelial barrier damages in lung and colon through PPAR- γ /RXR- α complex[J]. *Journal of Advanced Research*, 2024, 60: 183-200.
- [7] HUANG S W, FU Y J, XU B, et al. Wogonoside alleviates colitis by improving intestinal epithelial barrier function via the MLCK/pMLC2 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153179.
- [8] XIE Y, ZHAN X, TU J Y, et al. Atractylodes oil alleviates diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by regulating intestinal inflammation and intestinal barrier via SCF/c-kit and MLCK/MLC2 pathways[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 272: 113925.
- [9] 何雨霞, 储浩然, 全理, 等. 温和灸“上巨虚”“天枢”穴对肠易激综合征大鼠Orexin及Ox1R表达影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(11): 88-91.
- [10] WEI Y Y, FAN Y M, HUANG S J, et al. Baizhu Shaoyao decoction restores the intestinal barrier and brain-gut axis balance to alleviate diarrhea-predominant irritable bowel syndrome via FoxO1/FoxO3a[J]. *Phytomedicine*, 2024, 122: 155163.
- [11] 孙兵, 陶韬. 柴胡皂苷A调节MLCK/MLC2信号通路对SAP大鼠肠损伤的影响[J]. *国际检验医学杂志*, 2024, 45(4): 462-466.
- [12] TANG H Y, CHEN X Q, WANG H, et al. Acupuncture relieves the visceral pain of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats by regulating P2X4 expression[J]. *American Journal of Translational Research*, 2022, 14(8): 5563-5573.
- [13] LU S, WANG B, WANG J, et al. Moxibustion for the treatment of cancer and its complications: Efficacies and mechanisms[J]. *Integrative Cancer Therapies*, 2022, 22(1): 1-18.
- [14] 应旭卿, 姚群, 史裔立. 黄芪建中汤联合艾灸对腹泻型肠易激综合征患者临床症状、炎症反应以及胃肠激素的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2024, 51(8): 102-105.
- [15] 邹玲, 阮静茹, 陈进雨, 等. 艾灸通过调节腹泻型肠易激综合征大鼠结肠组织miR-345-3p/miR-216a-5p表达抑制炎症反应[J]. *针刺研究*, 2023, 48(3): 226-232.
- [16] YORK A G, SKADOW M H, OH J, et al. IL-10 constrains sphingolipid metabolism to limit inflammation[J]. *Nature*, 2024, 627(8004): 628-635.
- [17] ZHANG S H, TIAN D M, XIA Z X, et al. Chang-Kang-Fang alleviates diarrhea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) through inhibiting TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 330: 118236.
- [18] 储浩然, 王宇, 全理, 等. 艾灸对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(8): 633-639.
- [19] DU L W, ZHU L L, LU X Z, et al. Inhibition of the MLCK/MLC2 pathway protects against intestinal heat stroke-induced injury in rats[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2023, 116: 103655.
- [20] HOROWITZ A, CHANEZ-PAREDES S D, HAEST X, et al. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2023, 20(7): 417-432.
- [21] CHEN T, YIN X L, KANG N, et al. Chang'an II decoction (II)-containing serum ameliorates tumor necrosis factor- α -induced intestinal epithelial barrier dysfunction via MLCK-MLC signaling pathway in rats[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2020, 26(10): 745-753.