

# 芍药甘草汤调控 ASIC3/ERK 信号通路改善慢传输型便秘大鼠肠道动力的机制研究<sup>△</sup>

张紫麒<sup>1,2\*</sup>, 周鸿雲<sup>1#</sup>, 赵琼<sup>1,2</sup>, 邓媛<sup>3</sup>, 赵梦洁<sup>1</sup>, 赵辰<sup>4</sup>, 陈静仪<sup>1,2</sup> (1. 成都中医药大学附属医院儿科, 成都 610075; 2. 成都中医药大学临床医学院, 成都 611137; 3. 重庆中医药学院, 重庆 402760; 4. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)15-1852-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.15.06



**摘要** 目的 探讨芍药甘草汤调控酸敏感离子通道3(ASIC3)/胞外信号调节激酶(ERK)信号通路改善慢传输型便秘(STC)大鼠肠道动力的作用机制。方法 SD大鼠采用复方地芬诺酯灌胃构建STC模型,将造模成功大鼠随机分为模型组、芍药甘草汤组(1.5 g/mL)、乳果糖组(208.4 mg/mL,阳性对照)、联合抑制组(芍药甘草汤1.5 g/mL+盐酸阿米洛利20 μg/kg),每组12只,另取12只健康大鼠作为空白组;每天给药1次,连续干预14 d。干预完成后检测大鼠肠道传输功能、内脏敏感性,采用免疫组化染色观察大鼠结肠组织中ASIC3的表达,检测大鼠结肠组织中ASIC3、ERK1、ERK2 mRNA的表达和ASIC3、ERK1/2、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白的表达;观察大鼠结肠肠神经调节系统(ENS)-Cajal间质细胞(ICC)-平滑肌细胞(SMC)网络超微结构变化。结果 与模型组比较,芍药甘草汤组大鼠肠道推进率显著升高,内脏痛阈值显著降低,结肠组织中ASIC3阳性面积占比显著升高,结肠组织中ERK1、ERK2、ASIC3 mRNA相对表达量和p-ERK1/2、ASIC3蛋白相对表达量以及p-ERK1/2与ERK1/2比值均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );ICC、SMC形态结构明显修复,缝隙连接更加紧密。与芍药甘草汤组比较,联合抑制组大鼠肠道动力的改善效果减弱,部分指标水平差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );ICC、SMC形态结构的修复作用明显减弱。结论 芍药甘草汤可有效改善STC大鼠肠道传输功能并促进肠道修复,其作用机制可能与调控ASIC3/ERK信号通路介导ENS-ICC-SMC网络从而改善肠道动力、降低内脏敏感性有关。

**关键词** 慢传输型便秘;芍药甘草汤;酸敏感离子通道3;胞外信号调节激酶;ENS-ICC-SMC网络

## Study on the mechanism of Shaoyao gancao decoction in improving intestinal motility in rats with slow transit constipation by regulating the ASIC3/ERK signaling pathway

ZHANG Ziqi<sup>1,2</sup>, ZHOU Hongyun<sup>1</sup>, ZHAO Qiong<sup>1,2</sup>, DENG Yuan<sup>3</sup>, ZHAO Mengjie<sup>1</sup>, ZHAO Chen<sup>4</sup>, CHEN Jingyi<sup>1,2</sup> (1. Dept. of Pediatrics, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Clinical Medical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3. Chongqing College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 402760, China; 4. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the mechanism of Shaoyao gancao decoction in improving intestinal motility in rats with slow transit constipation (STC) by regulating acid-sensitive ion channel 3 (ASIC3)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. **METHODS** SD rats were used to construct an STC model by gavage with compound diphenoxylate. The successfully modeled rats were randomly divided into model group, Shaoyao gancao decoction group (1.5 g/mL), lactulose group (208.4 mg/mL, positive control), and combined inhibition group (Shaoyao gancao decoction 1.5 g/mL+amiloride hydrochloride 20 μg/kg), with 12 rats in each group. Additionally, 12 healthy rats were selected as the blank group. They were given relevant medicine once a day and continuously intervened for 14 days. After intervention, the intestinal propulsion function and visceral sensitivity of the model rats were detected. The expression of ASIC3 in the colon tissue of rats was observed by immunohistochemical staining. mRNA expressions of ASIC3, ERK1 and ERK2 as well as protein expressions of ASIC3, ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) in colon tissue of rats were detected; the ultrastructural changes of the enteric nervous system (ENS) -interstitial cell of Cajal (ICC) -smooth muscle cell (SMC) network in the rat colon

<sup>△</sup> 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82405479);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(No.QJRC2024015)

\* 第一作者 博士研究生。研究方向:小儿脾胃系统疾病的中医药防治。E-mail:727821391@qq.com

# 通信作者 主治医师,博士。研究方向:小儿肺脾系统常见病的中医防治。E-mail:echohongyun@163.com

were observed under electron microscopy. **RESULTS** Compared with the model group, the intestinal propulsion rate of the Shaoyao gancao decoction group was significantly increased, while the visceral pain threshold was significantly decreased. The proportion of the positive area of ASIC3 in the colonic tissue was significantly increased. The relative mRNA expression levels of ERK1, ERK2, and ASIC3, as well as the relative protein expression levels of p-ERK1/2 and ASIC3, and the p-ERK1/2 to ERK1/2 in the colonic tissue, were all significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Additionally, there was marked repair of the morphological structure of ICC and SMC, with closer gap junctions observed. Compared with the Shaoyao gancao decoction group, the combined inhibition group exhibited a diminished improvement in intestinal motility of rats, with statistically significant differences in the levels of some indicators ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the repairing of the morphological structure of ICC and SMC was notably attenuated. **CONCLUSIONS** Shaoyao gancao decoction can effectively improve the intestinal transmission function and promote intestinal repair in STC rats, and its mechanism may be related to regulating the balance of the ENS-ICC-SMC network mediated by the ASIC3/ERK signaling pathway, thus promoting intestinal motility and reducing visceral sensitivity.

**KEYWORDS** slow transit constipation; Shaoyao gancao decoction; ASIC3; ERK; ENS-ICC-SMC network

功能性便秘是1~4岁中国儿童最常见的功能性胃肠病。慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是儿童功能性便秘的主要类型,主要表现为结肠蠕动减弱或消失、结肠排空延迟。STC在全球儿童中的患病率为13%~25%,且近年患病率仍在升高,其病程较长且症状易反复,严重影响患儿身心健康和<sup>[1]</sup>生活质量。现代医学治疗STC的手段相对单一,缺乏可靠且作用持久的治疗方法<sup>[2]</sup>。中医药治疗STC具有安全有效、复发率低、作用持久等优势<sup>[3]</sup>。

芍药甘草汤首载于《伤寒杂病论》,该方以养阴增液、润肠通便为治疗之法。成都中医药大学附属医院儿科赵琼教授长期在临床实践中以酸甘化阴为指导,以生白芍、生甘草为基础方,在小儿各型便秘,尤其是肠燥津亏型患儿中取得了满意疗效<sup>[4]</sup>。本课题组前期临床研究表明,以芍药甘草汤为基础的组方可明显增加肠燥津亏型便秘患儿的排便频率,改善粪便性状,缩短排便时间,远期随访疗效相对稳定,复发率低<sup>[4]</sup>,且芍药-甘草3:1配比疗效最佳<sup>[5]</sup>;同时前期实验研究提示<sup>[5]</sup>,酸敏感离子通道3(acid-sensing ion channel 3, ASIC3)在肠道也有表达,且可能通过影响肠神经调节系统(enteric nervous system, ENS),从而促进肠道平滑肌运动,改善肠道动力,其可能在芍药甘草汤治疗STC中发挥重要作用,这也与芍药甘草汤酸甘化阴的立方理论不谋而合。然而,芍药甘草汤治疗STC的作用机制尚未明确,故本研究拟采用复方地芬诺酯溶液灌胃构建STC大鼠模型,探索芍药甘草汤治疗STC的潜在机制,以期为中医药治疗STC提供新参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

JEM-1400型透射电子显微镜购自日本电子株式会社;Pannoramic 250型数字切片扫描仪购自匈牙利3DHISTECH公司;SpectraMAX Plus384型酶标仪购自

美谷分子仪器(上海)有限公司;D3024R型离心机购自大龙兴创实验仪器(北京)有限公司;HH系列-6型恒温水浴锅购自上海力辰邦西仪器科技有限公司;SD100型核酸定量仪、BT96G型梯度聚合酶链式反应(PCR)基因扩增仪均购自德国Analytik Jena公司。

### 1.2 主要药品与试剂

芍药甘草汤由生白芍、生甘草组成,这2种饮片购自四川新荷花中药饮片股份有限公司(批号分别为D2209079、2206076),经成都中医药大学药学院黄勤挽教授鉴定合格,分别为芍药*Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根和甘草*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根。

复方地芬诺酯片(批号220501,每片含盐酸地芬诺酯2.5 mg、硫酸阿托品25 μg)购自广西河丰药业有限责任公司;乳果糖口服溶液[批号366197,规格15 mL:10 g(以乳果糖计)]购自荷兰Abbott公司;盐酸阿米洛利(货号HY-B0285A,规格100 mg/瓶)购自美国MCE公司;活性炭、阿拉伯胶(批号分别为C14358027、C14362403)均购自上海麦克林生化科技股份有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;电镜固定液购自武汉谷歌生物科技有限公司;兔单克隆ASIC3抗体(批号ab302776)购自英国Abcam公司;兔单克隆胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2)抗体(批号T40071)、兔单克隆磷酸化ERK1/2(phosphorylated ERK1/2, p-ERK1/2)抗体(批号TA1015)均购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(批号GB23303)、兔抗β-肌动蛋白(β-actin)(批号GB11001)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;HRP标记的(鼠+兔)二抗(批号BA1056)购自美国BOSTER公司。

### 1.3 实验动物

本研究所用动物为4周龄SPF级SD大鼠,共60只,体重(70±10)g,雌雄各半,购自北京斯贝福有限公司,

实验动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0010。实验动物饲养于成都中医药大学温江校区药理学实验室动物饲养中心。大鼠饲养在相对湿度(55±10)%、相对湿度(25±2)°C、12 h/12 h明暗交替、每小时10~15次通风换气的环境中,以普通颗粒饲料喂养,饮用水为纯净水。所有实验程序均经四川省实验动物学会伦理委员会批准(批准号为P202303201)。

## 2 方法

### 2.1 药液和墨汁的制备

(1)芍药甘草汤:根据本课题组前期临床研究,称取生白芍18 g、生甘草6 g,第一次煎煮前先将饮片用8倍体积RO纯水浸泡30 min,加热回流收集药液,第二次以6倍体积RO纯水加热回流再次收集药液。合并2次药液,冷却后,用200目筛过滤,取滤液。滤液减压浓缩成质量浓度为1.5 g/mL的浓缩液(以生药量计),于4 °C冰箱保存备用,使用前恢复至室温。(2)复方地芬诺酯溶液:将复方地芬诺酯片研磨成细粉,用生理盐水配制质量浓度为1.5 mg/mL的混悬液,即配即用。(3)墨汁:将阿拉伯胶50 g与水400 mL混合,煮沸至澄清透明,再加活性炭25 g,混匀并煮沸3次,冷却,用水定容至500 mL,4 °C下保存,使用前放至常温并搅拌均匀。(4)乳果糖溶液:取乳果糖口服液适量,用生理盐水制成质量浓度为208.4 mg/mL的溶液,即配即用。(5)ASIC3抑制剂:取ASIC3抑制剂盐酸阿米洛利适量,以生理盐水配制质量浓度为2 μg/mL的阿米洛利溶液,避光,即配即用。

### 2.2 分组、造模与给药

大鼠适应性喂养1周后,按体重随机分为空白组(12只)和造模组(48只),雌雄各半。造模组大鼠参考相关文献<sup>[6-7]</sup>,采用复方地芬诺酯溶液灌胃[15 mg/(kg·d),每天1次,连续14 d]构建STC模型,空白组大鼠灌胃等体积生理盐水。造模后,若造模组大鼠出现体形干瘪瘦小、毛发竖立、拱背、活动减少、粪便质量减轻、粪便颗粒变细硬,大便Bristol评分较空白组显著变化,且首粒黑便排出时间较空白组显著延长,则视为STC模型复制成功。造模后,大鼠全部存活。将造模成功的大鼠随机分为模型组、芍药甘草汤组、乳果糖组(阳性对照)、联合抑制组,雌雄各半,每组12只。给药剂量以儿童临床用药剂量为基础,按人与大鼠等效剂量换算,给药剂量参考课题组前期实验用量。芍药甘草汤组、联合抑制组大鼠灌胃芍药甘草汤浓缩液(1.5 g/mL),乳果糖组大鼠灌胃乳果糖溶液(208.4 mg/mL),空白组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水;所有药物均按大鼠体重以0.01 mL/g灌胃。此外,联合抑制组大鼠以配制好的阿米洛利溶液(20 μg/kg)腹腔注射,其他各组大鼠同步腹腔注射等体

积生理盐水。灌胃和腹腔注射均为每日1次,连续干预14 d。

### 2.3 肠道传输功能检测

造模结束后大鼠立即禁食24 h,然后以墨汁灌胃(10 mL/kg),记录从灌胃结束到排出首粒带活性炭粪便所需的时间,即为首粒黑便排出时间。上述指标检测后,采用随机数字表法每组选取4只大鼠禁食、不禁水24 h,以墨汁灌胃(10 mL/kg),30 min后予以戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,颈椎脱臼处死,随后立即置于手术台上解剖,快速取出其全部肠道,在无张力的状态下测量大鼠的肠道全长及墨汁在肠道内推进的长度,并计算肠道推进率。肠道推进率(%)=黑染肠道长度/肠道全长×100%<sup>[8]</sup>。

### 2.4 内脏敏感性检测

使用自制的压力球囊及自制的透明鼠笼进行检测<sup>[9]</sup>。干预结束后,“2.3”项下部分大鼠( $n=6$ )禁食12 h后使用乙醚麻醉,将压力球囊放入大鼠肛门内约5 cm处后固定,再将大鼠放入透明鼠笼。待大鼠苏醒及适应环境后,加压球囊,分别在20、40、60、80 mmHg(1 mmHg=133.322 Pa)压力下保持30 s进行腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分。AWR评分为0分:大鼠无明显变化;1分:大鼠情绪不稳定,身体静止不动,头部偶尔扭动或上下运动;2分:大鼠腹肌轻微回缩,但未离开鼠笼底面;3分:大鼠腹肌较强烈收缩,部分抬离鼠笼底面;4分:大鼠腹肌强烈收缩,腹部呈弓形,完全抬离鼠笼底面,骨盆抬起。记录内脏痛阈值(AWR评分=3时所对应的压力值)以反映内脏敏感性,重复检测3次,每次间隔10 min。

### 2.5 大鼠结肠组织中ASIC3的表达及分布观察

采用免疫组化染色观察。“2.4”项下实验结束后,取各组大鼠( $n=6$ )部分结肠组织(剩余部分置于-80 °C保存备用)用4%多聚甲醛固定,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、蒸馏水清洗、石蜡包埋、脱蜡并水化后,进行切片;抗原修复切片,加入ASIC3抗体(稀释比例为1:100)4 °C孵育过夜,以PBS洗涤,滴加HRP标记的山羊抗兔二抗(稀释比例为1:100)孵育,再以PBS洗涤。将洗涤好的切片用DAB显色,经苏木素复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,以中性树脂胶封片。选取3个不同视野在显微镜下观察,用数字扫描浏览软件CaseViewer采集显微图像,用数据分析系统计算图像中ASIC3阳性(呈棕黄色)面积占比以反映ASIC3蛋白表达。

### 2.6 大鼠结肠组织中ASIC3、ERK1、ERK2 mRNA表达检测

采用实时荧光定量PCR检测。取“2.5”项下部分于-80 °C保存的大鼠结肠组织( $n=6$ ),使用低温研磨仪

研磨,加入 Trizol 试剂提取结肠组织总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA。在 cDNA (2  $\mu$ L,以 DEPC 水稀释至 10 ng/ $\mu$ L)中加入 0.2  $\mu$ mol/L 基因上下游引物、10  $\mu$ L 的 SYBR Green 试剂、7.8  $\mu$ L 的 DEPC 水,混匀后离心,再进行 PCR 反应。具体程序为 95  $^{\circ}$ C,5 min;94  $^{\circ}$ C,10 s;60~66  $^{\circ}$ C,30 s;循环 40 次。以  $\beta$ -actin 为内参,采用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算各目标基因 mRNA 的相对表达量。引物序列及产物长度见表 1。

表 1 PCR 引物序列及产物长度

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
ASIC3	上游:GCTCCTCTTCCAAATCCTG	106
	下游:CTCAAACGGGGTCTCTTCT	
ERK1	上游:CCACAAAACCTTGACAGACCA	108
	下游:CAGAGAAGGAGCAGGTAGGA	
ERK2	上游:ACACGCCTTTCCTTGATTT	125
	下游:CACATCTTCTTGCAATTCT	
$\beta$ -actin	上游:TGAGGCTGGTGATAAATGG	119
	下游:CAAAGAGGGCAAGAACACA	

## 2.7 大鼠结肠组织中 ASIC3、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。取“2.5”项下部分于一 80  $^{\circ}$ C 保存的大鼠结肠组织( $n=6$ ),加入 RIPA 裂解液浸没组织并于低温组织研磨仪中研磨。收集离心后的组织匀浆上清液,采用 BCA 法调整蛋白浓度(2~3  $\mu$ g/ $\mu$ L),将蛋白变性后,进行凝胶恒压电泳、转膜。洗去膜上残留转膜液,以 5%BSA 封闭 1 h,加入 ASIC3、ERK1/2、p-ERK1/2 一抗(稀释比例均为 1:1000)和  $\beta$ -actin 抗体(稀释比例为 1:5 000)孵育过夜;TBST 漂洗膜上未结合的一抗,加入相应二抗(稀释比例为 1:2 000),室温孵育 1 h;TBST 洗膜,滴加 ECL 显影液于暗室中曝光显影,采集蛋白条带图像。采用 Image J 软件分析,以目标蛋白与内参蛋白( $\beta$ -actin)条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。

## 2.8 结肠 ENS-Cajal 间质细胞-平滑肌细胞网络超微结构观察

取“2.5”项下部分于一 80  $^{\circ}$ C 保存的大鼠结肠组织( $n=6$ ),置于 2.5%戊二醛固定液中固定过夜,以 PBS 漂洗;用 1%四氧化锇 20  $^{\circ}$ C 固定 2 h,再以 PBS 漂洗样本,完成后以梯度乙醇-丙酮脱水;脱水后包埋,于 37  $^{\circ}$ C 烤箱中过夜,再于 60  $^{\circ}$ C 烤箱中聚合 48 h。样本包埋块以超薄切片片机切片(60~90 nm),展开后捞至铜网,在室温下先后以醋酸铀、柠檬酸铅染色,室温干燥过夜。采用透射电镜观察大鼠结肠组织超微结构并采集图像。每张铜网先于 6 000 倍下观察目标区域整体结构情况,再分别采集目标区域下 Cajal 间质细胞(interstitial cell of Cajal, ICC)(6 000 倍和 30 000 倍)、平滑肌细胞(smooth muscle

cell, SMC)(6 000 倍和 30 000 倍)、缝隙连接结构(8 000 倍和 40 000 倍)图像。

## 2.9 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料满足正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验;计量资料不符合正态分布以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,多组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis  $H$  检验,进一步两两比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验。计数资料以例数或率(%)表示,采用  $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 芍药甘草汤对大鼠肠道传输功能的影响

与空白组比较,造模组大鼠排出首粒黑便时间显著延长[(124.25  $\pm$  89.58)min vs. (387.92  $\pm$  103.68)min,  $P < 0.01$ ],提示 STC 大鼠模型构建成功。

空白组、模型组、乳果糖组、芍药甘草汤组、联合抑制组大鼠肠道推进率分别为(80.22  $\pm$  8.30)%、(63.86  $\pm$  7.76)%、(65.64  $\pm$  9.72)%、(76.29  $\pm$  10.03)%、(67.00  $\pm$  9.28)%。与空白组比较,模型组大鼠肠道推进率显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,芍药甘草汤组大鼠肠道推进率显著升高( $P < 0.01$ )。

### 3.2 芍药甘草汤对大鼠内脏敏感性的影响

空白组、模型组、乳果糖组、芍药甘草汤组、联合抑制组大鼠内脏痛阈值分别为(70.00  $\pm$  9.19)、(85.00  $\pm$  17.86)、(67.78  $\pm$  5.44)、(48.33  $\pm$  5.05)、(68.89  $\pm$  9.11) mmHg。与空白组比较,模型组大鼠内脏痛阈值显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,乳果糖组和芍药甘草汤组大鼠内脏痛阈值均显著降低( $P < 0.01$ );与芍药甘草汤组比较,联合抑制组大鼠内脏痛阈值显著升高( $P < 0.05$ )。

### 3.3 芍药甘草汤对大鼠结肠组织中 ASIC3 蛋白表达的影响

空白组、模型组、乳果糖组、芍药甘草汤组、联合抑制组大鼠 ASIC3 阳性面积占比分别为(20.41  $\pm$  5.91)%、(6.71  $\pm$  4.82)%、(9.00  $\pm$  2.30)%、(16.23  $\pm$  5.10)%、(8.51  $\pm$  4.27)%。大鼠结肠组织中的 ASIC3 阳性表达呈棕黄色,主要表达在黏膜下层及肌层。与空白组比较,模型组大鼠结肠组织中 ASIC3 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,芍药甘草汤组大鼠结肠组织中 ASIC3 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01$ );与芍药甘草汤组比较,联合抑制组大鼠结肠组织中 ASIC3 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ )。结果见图 1。

### 3.4 芍药甘草汤对大鼠结肠组织中 ERK1、ERK2、ASIC3 mRNA 表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠结肠组织中 ERK1、ERK2、ASIC3 mRNA 相对表达量均显著降低( $P < 0.05$ )。

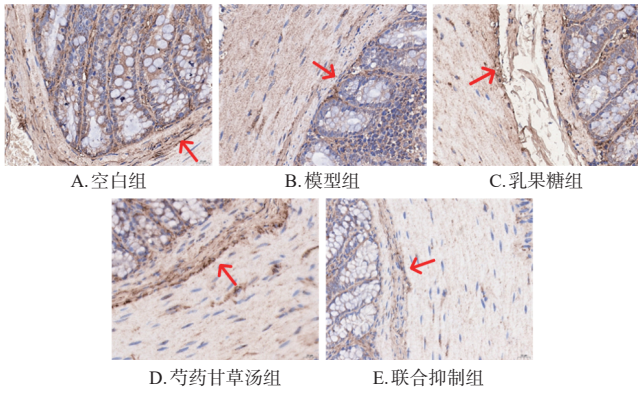


图1 各组大鼠结肠组织中ASIC3蛋白表达的免疫组化图( $\times 400$ )

或 $P < 0.01$ );与模型组比较,乳果糖组和芍药甘草汤组大鼠结肠组织中ERK1、ERK2、ASIC3 mRNA相对表达量均显著升高( $P < 0.05$ );与芍药甘草汤组比较,联合抑制组大鼠结肠组织中ERK2、ASIC3 mRNA相对表达量均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),ERK1 mRNA相对表达量有下降趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表2。

表2 各组大鼠结肠组织中ERK1、ERK2、ASIC3 mRNA相对表达量比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	ERK1 mRNA	ERK2 mRNA	ASIC3 mRNA
空白组	1.56 ± 0.45	3.80 ± 1.01	2.91 ± 0.61
模型组	1.01 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.01 ± 0.15 <sup>b</sup>
乳果糖组	1.47 ± 0.27 <sup>c</sup>	8.39 ± 0.94 <sup>d</sup>	1.83 ± 0.51 <sup>e</sup>
芍药甘草汤组	1.42 ± 0.19 <sup>f</sup>	1.31 ± 0.15 <sup>g</sup>	1.42 ± 0.23 <sup>h</sup>
联合抑制组	1.23 ± 0.16	0.43 ± 0.08 <sup>i</sup>	1.16 ± 0.11 <sup>j</sup>

a:与空白组比较, $P < 0.05$ ;b:与空白组比较, $P < 0.01$ ;c:与模型组比较, $P < 0.05$ ;d:与芍药甘草汤组比较, $P < 0.01$ ;e:与芍药甘草汤组比较, $P < 0.05$ 。

### 3.5 芍药甘草汤对大鼠结肠组织中ERK1/2、p-ERK1/2及ASIC3蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠结肠组织中p-ERK1/2、ASIC3蛋白相对表达量以及p-ERK1/2与ERK1/2比值均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );与模型组比较,乳果糖组和芍药甘草汤组大鼠结肠组织中p-ERK1/2、ASIC3蛋白相对表达量以及p-ERK1/2与ERK1/2比值均显著升高( $P < 0.01$ );与芍药甘草汤组比较,联合抑制组大鼠结肠组织中ASIC3蛋白相对表达量以及p-ERK1/2与ERK1/2比值均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见表3及图2。

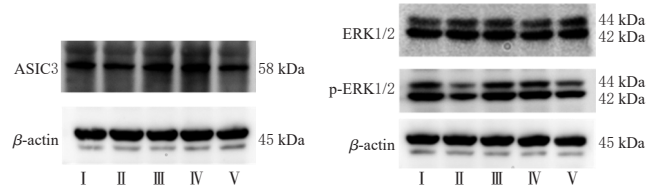
### 3.6 芍药甘草汤对大鼠结肠ENS-ICC-SMC网络超微结构的影响

与空白组比较,模型组大鼠结肠ICC和平滑肌纤维形态结构严重受损:ICC呈梭形,ICC细胞核呈不规则形,可见核固缩现象,SMC细胞核呈不规则形,两者均可

表3 各组大鼠结肠组织中ERK1/2、p-ERK1/2、ASIC3蛋白相对表达量比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	ERK1/2/ $\beta$ -actin	p-ERK1/2/ $\beta$ -actin	ASIC3/ $\beta$ -actin	p-ERK1/2与ERK1/2比值
空白组	0.98 ± 0.18	1.98 ± 0.23	1.24 ± 0.14	2.07 ± 0.31
模型组	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.11 <sup>c</sup>
乳果糖组	0.97 ± 0.15	1.54 ± 0.19 <sup>d</sup>	1.17 ± 0.08 <sup>e</sup>	1.62 ± 0.35 <sup>f</sup>
芍药甘草汤组	0.89 ± 0.12	1.53 ± 0.22 <sup>g</sup>	1.21 ± 0.05 <sup>h</sup>	1.73 ± 0.24 <sup>i</sup>
联合抑制组	0.99 ± 0.26	1.37 ± 0.47	1.01 ± 0.11 <sup>j</sup>	1.39 ± 0.23 <sup>k</sup>

a:与空白组比较, $P < 0.01$ ;b:与空白组比较, $P < 0.05$ ;c:与模型组比较, $P < 0.01$ ;d:与芍药甘草汤组比较, $P < 0.01$ ;e:与芍药甘草汤组比较, $P < 0.05$ 。



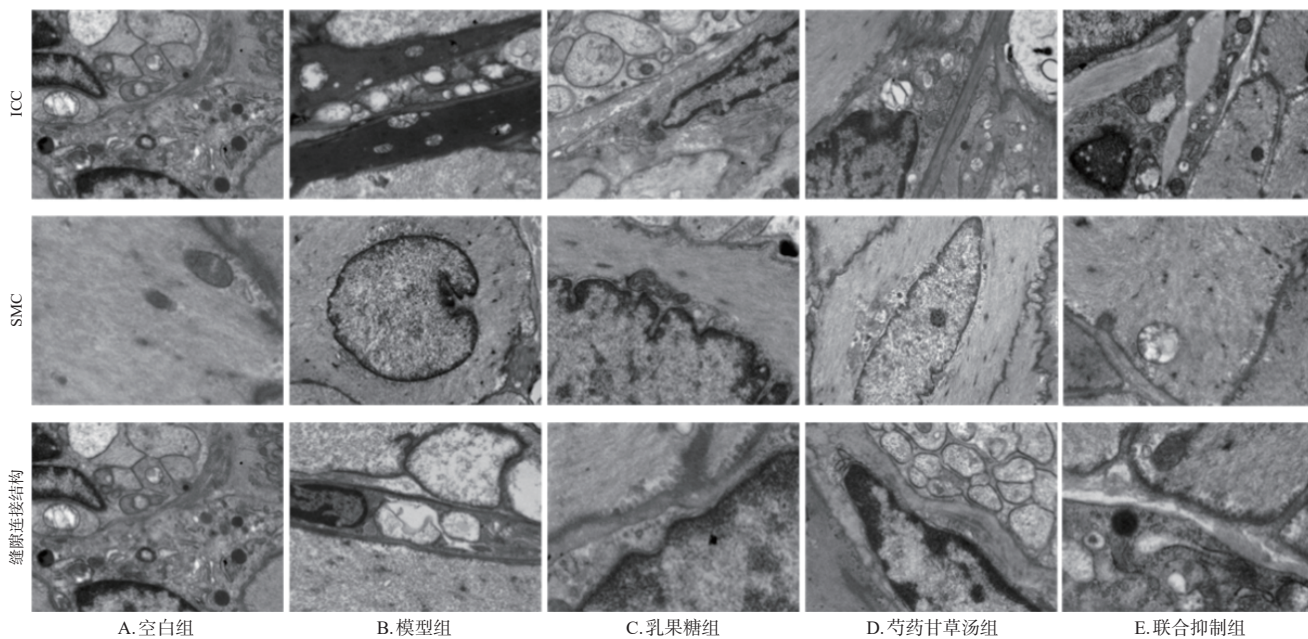
I:空白组;II:模型组;III:乳果糖组;IV:芍药甘草汤组;V:联合抑制组。

图2 各组大鼠结肠组织中ERK1/2、p-ERK1/2、ASIC3蛋白表达的电泳图

见线粒体明显肿胀,基质溶解,线粒体嵴溶解,呈明显空泡化样变性;细胞间缝隙明显增宽(空白组细胞间隙约为0.05  $\mu\text{m}$ ,模型组细胞间隙约为0.15  $\mu\text{m}$ )。与模型组比较,芍药甘草汤组大鼠结肠ICC和平滑肌纤维形态结构明显修复:ICC呈梭形,ICC细胞核呈椭圆形,SMC细胞核呈锯齿状,两者细胞核染色质均匀,线粒体轻度肿胀,基质部分溶解,仅有少许空泡化样变性;细胞间缝隙连接较为紧密(芍药甘草汤组细胞间隙约为0.07  $\mu\text{m}$ )。与芍药甘草汤组比较,联合抑制组大鼠结肠ICC和平滑肌纤维形态结构的修复作用明显减弱:ICC呈星形,ICC细胞核皱缩,线粒体嵴溶解断裂,基质颗粒减少,内质网轻度或明显扩张,细胞膜不连续,SMC细胞核呈纺锤形,ICC细胞核呈类圆形,染色质分布较均匀,核膜连续完整,细胞内线粒体肿胀较明显,嵴结构减少,基质稀淡,两者线粒体均肿胀;细胞间缝隙连接较模型组更紧密而较芍药甘草汤组稍松散(联合抑制组细胞间隙约为0.10  $\mu\text{m}$ )。结果见图3。

## 4 讨论

STC是一类以结肠传输减慢为特点的顽固性便秘,其病理机制十分复杂,现代研究认为与肠神经系统、水液代谢、肠道动力及肠道菌群等密切相关<sup>[1-2]</sup>。研究表明,中医药治疗小儿STC疗效明确,安全可靠,远期疗效相对良好<sup>[3]</sup>。芍药甘草汤是酸甘化阴的代表方剂,该方首载于《伤寒杂病论》,原方由白芍和甘草各4两组成,后世医家则提到该方临床治疗便秘疗效显著,适用于肠燥津亏便秘。《名医别录》指出白芍有通顺血脉、利膀胱大小肠之效,《本经疏证》也记载:“芍药能入脾开结,芍药



注:图中ICC的放大倍数为 $\times 30\ 000$ ;SMC的放大倍数为 $\times 8\ 000$ ;间隙连接结构的放大倍数为 $\times 40\ 000$ 。

图3 各组大鼠结肠组织ENS-ICC-SMC网络超微结构图

合甘草以破肠胃之结。”赵琼教授恪守《素问·至真要大论》中“燥者濡之”的治疗原则,结合长期临床经验,提出以“酸甘化阴”为指导,酸甘相配、养阴增液、润肠通便,以芍药甘草汤为基础,在临床上取得了良好的疗效。本课题组前期临床研究表明,以该方为基础治疗小儿STC效果显著,同时也对本方重要的单体成分芍药苷改善STC症状的效应进行了相关研究,证实了其有效性<sup>[4]</sup>。

ENS、ICC、SMC共同组成ENS-ICC-SMC网络,其被认为是肠道动力的基本单位,是完成排便功能的关键;ICC与肠神经末梢呈突触样连接,与SMC呈缝隙连接,形成ENS-ICC-SMC网络结构;ENS与中枢神经系统、自主神经系统共同调节胃肠道功能,同时,ENS具有完整的反射结构,通过消化道神经丛中的感觉、运动及中间神经元调控肠内感受、平滑肌运动及消化道内外分泌等<sup>[9-10]</sup>。ICC是介于ENS和SMC之间的非神经间质细胞,在肠道内广泛分布,传导慢波运动,将信号传递至SMC以此调控平滑肌运动。肠道平滑肌是肠道运动的效应器,呈内环外纵的双层结构,是肠道收缩和舒张功能正常的基础,也是维持肠道完整性的重要组成部分。ENS与ICC之间及ICC与SMC之间分别通过突触连接和缝隙连接互相传递信息,构成了肠道运动的基础单位。研究表明,便秘模型动物中ENS-ICC-SMC网络结构和功能的稳定平衡是维系肠道动力正常的关键<sup>[11]</sup>。STC患者及模型动物中ICC多表现为数量减少或消失、体积缩小、分布不规则、超微结构损伤<sup>[12]</sup>。SMC在STC患者和模型动物中也被发现存在明显异常,包括收缩力减弱、张力下降、厚度变薄、数量减少、形态异常、结构破

坏等<sup>[13]</sup>。Zhu等<sup>[9]</sup>研究表明,芍药甘草汤通过增加SMC和ICC数量,抑制ICC凋亡,激活干细胞因子/干细胞因子受体信号通路,从而保护ENS-ICC-SMC网络。总之,芍药甘草汤通过影响ENS-ICC-SMC网络在STC的治疗中起到重要作用,但其作用机制仍缺乏相对系统的研究。

ASICs是一类非电压依赖性离子通道,其中ASIC3是ASICs家族在结肠中表达最多的亚型。已有研究提示,ASIC3可被酸性环境激活,介导酸感知和机械感知,对情绪、痛觉、酸味觉等具有重要作用,参与调节胃肠动力、疼痛感知、血压等<sup>[14-15]</sup>。研究证实,ASIC3在胃肠道黏膜也有表达,且可通过影响ENS从而促进肠道平滑肌运动,改善肠道动力<sup>[16]</sup>。有研究报道,移植了便秘患儿粪便菌液的大鼠肠道组织中ASIC3表达显著下调,内脏敏感性降低,肠道推进率下降,结肠传输时间延长<sup>[17]</sup>。Yuan等<sup>[18]</sup>研究报道,ASIC3抑制剂能调节肠易激综合征小鼠的肠道蠕动并降低其内脏敏感性。有研究报道,芍药甘草汤或其成分可通过干预ASICs发挥镇痛及修复损伤的作用,其中ERK信号通路可能是其干预的关键通路<sup>[19-20]</sup>。有研究显示,在野生型小鼠的滑膜细胞中,酸性和炎症条件均能激活ASIC3;单独酸性条件下,p-ERK减少;酸性和炎症条件共存时,p-ERK增加,抑制细胞增殖<sup>[21]</sup>,故ASIC3在不同条件下调控p-ERK的效果不同。另有研究表明,缺氧和ASIC3过表达可通过激活丝裂原活化蛋白激酶通路影响髓核细胞<sup>[20]</sup>。由此推测,芍药甘草汤可能通过调控肠道ASIC3/ERK信号通路作用于ENS-ICC-SMC网络,介导STC大鼠肠道动力及内脏敏感性,从而治疗STC。

本研究结果显示,经芍药甘草汤干预后,STC大鼠肠道推进率显著升高,内脏敏感性显著降低;实时荧光定量PCR、Western blot 检测结果显示,芍药甘草汤的干预能显著上调STC大鼠结肠组织中ERK1/2表达,促进ASIC3、ERK1、ERK2 mRNA和蛋白表达;透射电镜观察结果发现,模型组大鼠结肠ENS-ICC-SMC网络超微结构损伤严重:ICC呈梭形,细胞核不规则且可见核固缩,SMC细胞核也不规则,两者线粒体明显肿胀和空泡化,细胞间隙增宽,而经芍药甘草汤干预后,以上损伤可见明显修复。ASIC3抑制剂的引入明显抑制了芍药甘草汤对STC大鼠以上机制的调控作用,表明芍药甘草汤通过调控ASIC3信号通路改善了模型大鼠的便秘情况。

综上所述,芍药甘草汤可能通过调控ASIC3/ERK信号通路介导ENS-ICC-SMC网络来改善STC大鼠肠道动力,降低内脏敏感性,进而发挥酸甘化阴、增液通便的效应,其中ASIC3可能是芍药甘草汤发挥治疗作用的关键因子。

### 参考文献

- [1] NURKO S, SAPS M. Treating constipation with prucalopride: one size does not fit all[J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(6):1214-1216.
- [2] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组,中华医学会消化病学分会功能性胃肠病协作组. 中国慢性便秘专家共识意见(2019,广州)[J]. *中华消化杂志*, 2019, 39(9): 577-598.
- [3] 黄业保,肖倩,刘春强. 中医药治疗慢传输型便秘的临床研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2020, 32(8):1579-1582.
- [4] 万仕方. 芍药甘草汤加味治疗儿童功能性便秘燥津亏证的临床观察[D]. 成都:成都中医药大学,2023.
- [5] DENG Y, ZHAO Q, ZHOU H Y, et al. Activation of ASIC3/ERK pathway by paeoniflorin improves intestinal fluid metabolism and visceral sensitivity in slow transit constipated rats[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2024, 40(6): 561-574.
- [6] ZHAN Y, WEN Y, ZHANG L L, et al. Paeoniflorin improved constipation in the loperamide-induced rat model via TGR5/TRPA1 signaling-mediated 5-hydroxytryptamine secretion[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:6076293.
- [7] 宋攀. 中药高位保留灌肠对STC大鼠结肠ICC与血清VIP的影响研究[D]. 南充:川北医学院,2017.
- [8] CHEN Q, ZHANG H, SUN C Y, et al. Evaluation of two laboratory model methods for diarrheal irritable bowel syndrome[J]. *Mol Med*, 2023, 29(1):5.
- [9] ZHU G Y, JIA D D, YANG Y, et al. The effect of Shao-yao gancao decoction on sphincter of Oddi dysfunction in hypercholesterolemic rabbits via protecting the enteric nervous system-Interstitial cells of Cajal-smooth muscle cells network[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14:4615-4628.
- [10] 朱飞叶. 芍药甘草汤对慢传输型便秘大鼠的作用及其对肠神经递质及SCF/c-kit信号途径的作用机制研究[D]. 杭州:浙江中医药大学,2014.
- [11] HOLLAND A M, BON-FRAUCHES A C, KESZTHELYI D, et al. The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(10): 4713-4733.
- [12] 朱佳慧,钱阳阳,廖专. 肠道Cajal间质细胞与慢性便秘发生和治疗的关系[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(8): 1531-1536.
- [13] 鲍旭,吴万春. 慢传输型便秘发病机制的研究[J]. *国际消化病杂志*, 2013, 33(6):399-401.
- [14] ZHANG L, ZHENG L M, YANG X Y, et al. Pathology and physiology of acid-sensitive ion channels in the digestive system[J]. *Int J Mol Med*, 2022, 50(1):94.
- [15] HUGHES P A, BRIERLEY S M, YOUNG R L, et al. Localization and comparative analysis of acid-sensing ion channel (ASIC1, 2, and 3) mRNA expression in mouse colonic sensory neurons within thoracolumbar dorsal root Ganglia[J]. *J Comp Neurol*, 2007, 500(5):863-875.
- [16] 叶宇龙,梁坚,周宇. 酸敏感离子通道与消化系统疾病关系的研究进展[J]. *海南医学*, 2022, 33(15):2021-2024.
- [17] 赵军梅,蔡洁,朱克然,等. 功能性便秘患儿肠道菌群对大鼠酸敏感离子通道3表达的影响及在肠道动力中的作用[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2019, 34(19):1485-1489.
- [18] YUAN L P, XIAO H Y, LI H, et al. APETx2 regulates intestinal motility and visceral sensitivity in post-infectious irritable bowel syndrome mice through 5-HT signalling pathway[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(5):712-717.
- [19] 文钱. 电针大肠俞募穴对STC大鼠胃肠传输功能及ENS-ICC-SMC网络形态学影响的研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2019.
- [20] WANG D, ZHU H, CHENG W, et al. Effects of hypoxia and ASIC3 on nucleus pulposus cells: from cell behavior to molecular mechanism[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117:109061.
- [21] GONG W Y, KOLKER S J, USACHEV Y, et al. Acid-sensing ion channel 3 decreases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases and induces synoviocyte cell death by increasing intracellular calcium[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(3):R121.

(收稿日期:2025-03-21 修回日期:2025-07-20)

(编辑:舒安琴)