

化痰通络汤对脑缺血/再灌注大鼠“肠-脑”轴的干预作用

唐三¹, 杨筱倩¹, 朱秋燕¹, 丁煌², 刘晓丹², 曾鑫冰¹, 陆展辉³, 杨芙蓉³,
王宪庆^{4*}, 黄小平^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学 血管生物学实验室, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治
湖南省重点实验室, 细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室, 长沙 410208;
3. 湖南中医药大学 中西医结合学院, 长沙 410208; 4. 常德职业技术学院, 常德 415000)

[摘要] 目的:基于“肠-脑”轴探讨化痰通络汤(HTTLD)对大鼠脑缺血再灌注后脑组织和肠道形态和功能的影响。方法:将60只SPF级雄性大鼠随机分为假手术组,模型组,HTTLD高、中、低剂量组(28.66, 14.33, 7.16 g·kg⁻¹),依达拉奉(4 g·kg⁻¹)+丁酸梭菌(5.0×10⁸ cfu·mL⁻¹)组,采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,灌胃给药HTTLD,神经功能缺损评分和2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)染色法测定脑组织损伤,小肠推进率观察脑缺血再灌注对肠道动力的影响,十二指肠黏膜的病理形态学检测评价肠黏膜细胞损伤,酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定血清D-乳酸(D-LAC),二胺氧化酶(DAO),细菌内毒素(LPS)含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测十二指肠的闭合蛋白(Occludin),紧密连接蛋白-5(Claudin-5),闭锁小带蛋白-1(ZO-1)蛋白的表达。结果:脑缺血再灌注后,大鼠出现神经功能缺损症状,与假手术组比较,模型组神经功能缺损评分显著升高(P<0.01);与模型组比较,HTTLD中、高剂量组能显著减少神经功能缺损症状,降低神经功能缺损评分(P<0.01)。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织出现明显梗死灶,脑梗死率显著升高(P<0.01);与模型组比较,各给药组脑梗死体积明显减少(P<0.01),以HTTLD高剂量组的效应最佳,且效应具有剂量依赖性。小肠推进率结果显示,与假手术组比较,模型组小肠推进率显著降低(P<0.01);与模型组比较,各给药组能显著升高小肠推进率(P<0.01),以HTTLD高剂量组效应最佳,且效应具有剂量依赖性。十二指肠黏膜组织病理学检测显示,脑缺血再灌注后十二指肠黏膜可见明显损伤,各给药组黏膜损伤情况明显减轻。与假手术组比较,模型组ZO-1, Occludin, Claudin-5蛋白表达均显著降低(P<0.01);与模型组比较,HTTLD低、中、高剂量组能不同程度上调ZO-1, Occludin, Claudin-5蛋白表达(P<0.05, P<0.01),以高剂量组的效应最为显著。与假手术组比较,模型组血清D-LAC, DAO, LPS蛋白含量均显著升高(P<0.01);与模型组比较,各给药组D-LAC, DAO含量均明显降低(P<0.05, P<0.01),HTTLD中、高剂量组明显降低LPS含量(P<0.05, P<0.01),且HTTLD高剂量组的作用最明显。结论:脑缺血再灌注后,大鼠脑组织受损,出现神经功能障碍,同时肠道黏膜损伤、肠道蠕动减弱和肠道黏膜屏障破坏。HTTLD能减少脑组织和胃肠道黏膜损伤,减轻神经功能缺损症状,提高胃肠道动力、改善肠道屏障功能、减少肠道细菌代谢产物和毒物的释放,从而发挥对脑缺血再灌注后“肠-脑”轴损伤的保护作用。

[关键词] “肠-脑”轴; 脑缺血再灌注; 化痰通络汤; 肠道动力; 肠道屏障

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)18-0032-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211702

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210719.1702.004.html>

[网络出版日期] 2021-07-20 8:55

Effect of Huatan Tongluo Decoction on Gut-Brain Axis in Rats with Cerebral Ischemia/Reperfusion

TANG San¹, YANG Xiao-qian¹, ZHU Qiu-yan¹, DING Huang², LIU Xiao-dan², ZENG Xin-bing¹,
LU Zhan-hui³, YANG Fu-rong³, WANG Xian-qing^{4*}, HUANG Xiao-ping^{1,2*}

[收稿日期] 20210421(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573875);湖南省高校创新平台开放基金项目(18K067);湖南中医药大学“十三五”一级学科基础医学建设项目(06);湖南省研究生优秀教学团队(基础医学研究生教学团队)项目([2019]370-118)

[第一作者] 唐三,在读硕士,从事心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究, E-mail:439435471@qq.com

[通信作者] *黄小平,博士,教授,硕士生导师,从事心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究, E-mail:569229858@qq.com;

*王宪庆,硕士,副教授,从事中西医结合抗免疫性疾病研究, E-mail:316646191@qq.com

- (1. Laboratory of Vascular Biology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. Key Laboratory of Cardio-Brain Disease Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan Provincial Key Laboratory of Cell Biology and Molecular Technology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
3. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
4. Changde Vocational and Technical College, Changde 415000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Huatan Tongluo Decoction (HTTLD) on the morphology and function of brain tissues and intestine in rats with cerebral ischemia/reperfusion based on the gut-brain axis. **Method:** Sixty SPF male rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, high- ($28.66 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium- ($14.33 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low-dose ($7.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) HTTLD groups, and an edaravone ($4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) + *Clostridium butyricum* ($5.0\times 10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$) group. The model was established by focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. The drugs were administered by gavage. The brain tissue injury was determined by neurological deficit score and 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining. The effect of cerebral ischemia/reperfusion on intestinal motility was assessed by the propulsion rate of small intestine. The intestinal mucosal cell damage was evaluated by the pathomorphological examination of the duodenal mucosa. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the content of D-lactate (D-LAC), diamine oxidase (DAO), and bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) in serum. Western blot was used to detect the expression of Occludin, Claudin-5, and zonula occludens 1 (ZO-1) in the duodenum. **Result:** After cerebral ischemia/reperfusion, rats developed neurological deficit symptoms. The neurological deficit score in the model group was higher than that in the sham operation group ($P<0.01$). Compared with the model group, the high- and medium-dose HTTLD groups could relieve the symptoms of neurological deficits and lower neurological deficit scores ($P<0.01$). The results of TTC staining showed that the model group presented obvious infarcts in brain tissues compared with the sham operation group ($P<0.01$). The cerebral infarction volumes of HTTLD groups were reduced compared with that in the model group ($P<0.01$), especially the high-dose HTTLD group, and the effect was dose-dependent. Furthermore, the propulsion rate of small intestine in the model group was significantly reduced compared with that in the sham operation group ($P<0.01$). Compared with the model group, HTTLD groups could increase propulsion rates of small intestine ($P<0.01$), especially the high-dose HTTLD group, and the effect was dose-dependent. After cerebral ischemia/reperfusion, obvious duodenal mucosal damage could be observed, which was relieved after the administration of HTTLD. Western blot results showed that the protein expression of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 in the model group was reduced compared with that in the sham operation group ($P<0.01$). Compared with the model group, the HTTLD groups could up-regulate the expression of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 to varying degrees ($P<0.05$, $P<0.01$), especially the high-dose HTTLD group. ELISA showed that the serum D-LAC, DAO, and LPS of the model group were elevated compared with those in the sham operation group ($P<0.01$). Compared with the model group, the HTTLD groups showed reduced D-LAC and DAO ($P<0.05$, $P<0.01$), and the medium- and high-dose HTTLD groups showed reduced LPS ($P<0.05$, $P<0.01$), especially the high-dose HTTLD group. **Conclusion:** After cerebral ischemia/reperfusion, the rats showed damaged brain tissues, neurological dysfunction, intestinal mucosal injury, weakened intestinal motility, and destroyed the intestinal mucosal barrier. HTTLD can protect against brain-gut axis injury after cerebral ischemia/reperfusion by reducing the damage on brain tissues and gastrointestinal mucosa, relieving the symptoms of neurological deficits, promoting gastrointestinal motility, improving intestinal barrier function, and reducing the release of intestinal bacterial metabolites or poisons.

[Keywords] gut-brain axis; cerebral ischemia/reperfusion; Huatan Tongluo decoction; intestinal motility; intestinal barrier

缺血性脑卒中是一种脑血管病变引起血流中断或减少,导致脑组织缺血缺氧和变性坏死的疾病,中医理论和临床研究认为,脑梗死的病因病机是风、痰、虚、火、气、血六端作用于人体,相互影响,相互制衡而致病。现代中医学对缺血性中风的研究证明,该病与风、痰、瘀关系最为密切,风、痰、瘀彼此依存、互相转化而致病,故治疗强调治痰、祛瘀、化风^[1]。王永炎院士认为该病以本虚标实为主,急性期以内风、邪热、痰浊、血瘀、腑实等标实症状突出,同时相互转化,其核心病理为“痰瘀互阻”“痰阻瘀滞、气机升降失常”是中风病急证的主要发病机制。故痰浊瘀血贯穿于中风病的始终,同时痰、瘀作为致病因素,反过来又加重脏腑功能失调和气血津液运行障碍,推动痰、瘀再生,加速病情进展。因此,痰浊和瘀血作为缺血性中风的病理产物和致病因素,二者相互胶结,相兼为病。

现代研究证明,“肠-脑”轴是将胃肠道和脑联系起来的双向信号调节系统^[2]。中枢神经系统、自主神经系统、神经内分泌系统参与了肠与脑在生理、病理状态下的信息交流,越来越多的研究表明,肠道菌群与抑郁、自闭症、老年痴呆等诸多脑部疾病密切相关。中风后“肠-脑”轴改变,及其介导的神经-内分泌-免疫功能失调是导致胃肠道损伤的重要原因^[3]。2016年3月,一篇刊登在*Nature Medicine*的文章证明肠道菌群被抑制后脑梗死体积可降低60%,其作用机制依赖于调节性T细胞增加和白细胞介素-17(IL-17)阳性 $\gamma\delta$ T细胞的降低^[4],从而揭示了“肠-脑”轴的存在及脑缺血与肠道菌群之间具有关联性,为脑缺血的治疗提供了新的思路。这与中医整体观不谋而合,也为中医药的研究提供了新的策略与思路。

化痰通络汤(HTTLD)是以中医经典名方半夏白术天麻汤为基础加减而成,主要由半夏、天麻、茯苓、白术、胆南星、天竺黄、香附、丹参、酒大黄组成,功能以化痰通络为主,辅以息风,主治中风风痰阻络证。刘东坡^[5]发现HTTLD治疗脑梗死伴颈动脉粥样硬化(CAS)临床疗效显著。姚欣艳等^[6]研究显示HTTLD对大鼠中动脉阻塞(MCAO)大鼠的脑保护作用可能是通过抗炎反应、阻断高迁移率族蛋白I(HMGB I)/Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路而实现。且有研究表明,HTTLD中的组成药物半夏、大黄、白术、丹参等具有改善胃肠道功能、减少炎症因子释放等作用^[7-10]。因此,推测HTTLD可能通过“肠-脑”轴发挥对脑卒

中患者的保护作用。本研究以MCAO再灌注为模型,研究HTTLD对脑缺血再灌注后肠道功能状态和脑损伤的影响,探讨HTTLD对脑缺血后“肠-脑”轴的干预效应,从而为缺血性中风的研究与防治提供新的思路与靶点,有助于为HTTLD在缺血性中风的临床应用与开发提供理论依据,具有重要的潜在应用价值。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性健康SD大鼠,体质量220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004,饲养于湖南中医药大学SPF级动物实验中心,室温控制在22~26℃,实验单位使用许可证号SYXK(湘)2019-0009。本实验符合湖南中医药大学动物伦理委员会要求,伦理委员会编号LL2019100902。实验前适应性喂养3~5 d,给药前禁食12 h,自由饮水。

1.2 药物 HTTLD组方药材法半夏20 g(亳州市沪谯药业有限公司,批号1905160252),天麻20 g(湖南中医药大学第一附属医院,批号YP19070502),茯苓20 g(湖南中医药大学第一附属医院,批号PR19070801),白术15 g(湖南中医药大学第一附属医院,批号CK19061604),胆南星10 g(四川百胜药业有限公司,批号180906),天竺黄10 g(亳州市沪谯药业有限公司,批号1904030462),丹参30 g(湖南中医药大学第一附属医院,批号HY19052201),香附10 g(湖南三湘中药饮片有限公司,批号2019050401),大黄15 g(湖南三湘中药饮片有限公司,批号2018102901),由湖南中医药大学左亚杰教授鉴定为正品,符合2015年版《中华人民共和国药典》规范,依达拉奉注射液(3-甲基-1-苯基-2吡唑啉-5酮,福建天泉药业股份有限公司,批号1910142),规格15 mg/支(10 mL),采用腹腔注射给药(4 mg·kg⁻¹)。

1.3 试剂 丁酸梭菌(北京北纳创联生物技术研究院,批号BNCC337239);强化梭酸培养基、氧气指示剂(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司,批号分别为20200619,20200703);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,美国Sigma公司,批号T8877-10G);水合氯醛(梯希爱化成工业发展有限公司,批号C10232288);闭锁小带蛋白-1(ZO-1)兔多克隆抗体,闭合蛋白(Occludin)兔多克隆抗体, β -肌动蛋白(β -actin)兔多克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗,HRP标记的山羊抗鼠二抗(美国Proteintech公司,批号分别为21773-1-AP,27260-

1-AP, 20536-1-AP, SA00001-2, SA00001-1); 紧密连接蛋白-5(Claudin-5)小鼠单克隆抗体(赛默飞世尔科技中国有限公司, 批号 UJ289616); RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(康为世纪生物科技有限公司, 批号分别为 CW2333S, CW2200S, CW2383S); ECL 化学发光液(环亚生物科技有限公司, 批号 GE2301); 蛋白 Marker(美国 Thermo-Fisher 公司, 批号 00806201); BCA 试剂盒(联科生物技术股份有限公司, 批号 A00755); 苏木素、伊红染色液(维世尔生物科技有限公司, 批号分别为 WB03008 B, WB03009A); D-乳酸(D-LAC)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司, 批号 2200826); 细菌内毒素(LPS)ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司, 批号 X15032943); 二胺氧化酶(DAO, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号 EXITMBXXT8)。

1.4 仪器 BSC-1300 II A2 型生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司); SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); DEN-1 型比浊仪[英国 Grant 仪器(剑桥)有限公司]; SD2350 型麦氏比浊管(美国 Pro-Lab 诊断公司); 3111 型二氧化碳培养箱[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; C-32 型日本三菱 MGC 厌氧培养罐(北京缘生化科技有限公司); TP-200D 型电子分析天平(湘仪天平仪器设备有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发器(上海雅荣生化仪器设备有限公司); RMZ135 型精密轮转切片机(德国 Leica 公司); Axios cope 5 型光学扫描显微镜+AxioCam 503 color 型显微镜摄像头(蔡司科技苏州有限公司); Heraeus Fresco21 型高速冷冻离心机(美国 Thermo-Fisher 公司); Spark 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); PowerPac™ 型电泳仪, Universal Hood II 型化学发光凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 HTTLD 的制备^[11] 给药剂量根据 60 kg 成年人每日服用 150 g 生药剂量, 按人与大鼠体表面积换算系数, 确定大鼠 HTTLD 高、中、低剂量分别为 28.66, 14.33, 7.16 g·kg⁻¹, 其中 HTTLD 中剂量相当于临床等效剂量。汤药煎煮按照中药常规煎煮法进行, 以 8 倍量水浸泡 30 min, 加热保持微沸 30 min; 通过 7 层过滤纱布, 充分过滤, 得到残渣加 6 倍量水, 进行二煎, 微沸 30 min, 合并 2 次滤液, 采用旋转蒸发器浓缩至所需生药质量浓度为 2.28 g·mL⁻¹, 作为高剂量灌胃浓度, 中剂量在高剂

量浓度基础上稀释 2 倍得到, 低剂量在中剂量基础上再稀释 2 倍得到, 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 液体培养基制备 称取强化梭酸培养基 38.0 g, 置于 1 L 烧杯中, 加入蒸馏水 800 mL, 加热搅拌至混匀, 加水定容至 1 L, 将制备好的液体培养基平均分在 3 个锥形瓶, 于 121 °C, 0.1 MPa 条件下灭菌 30 min, 冷却备用。

2.3 种子液制备 取适量丁酸梭菌接种于上述培养基中, 于 CO₂ 培养箱中厌氧缸厌氧培养 24~48 h, 采用麦氏比浊法测定菌液浊度, 换算成相应浓度单位, 待菌液浓度达到 5.0×10⁸ cfu·mL⁻¹ 可用于实验。

2.4 营养性半固体糊制备^[12] 取羧甲基纤维素 5 g 溶于 100 mL 蒸馏水中, 分别加入奶粉 8 g, 糖 4 g, 淀粉 4 g, 碳素墨水 2 mL, 配成半固体糊, 置冰箱中冷藏保存, 临用前 2 h 取出恢复至常温。

2.5 大鼠 MCAO 再灌注模型制作 依据前期方法^[13], 制作 MCAO 局灶性脑缺血再灌注模型。阻断 2 h 后, 拔出线栓进行再灌注 24 h。假手术组仅将颈总动脉(CCA), 颈外动脉(ECA), 颈内动脉(ICA)游离出来, 不做结扎、插线处理, 其他操作同模型组。

2.6 动物分组与给药 将大鼠随机分成假手术组、模型组, HTTLD 高、中、低剂量(28.66, 14.33, 7.16 g·kg⁻¹)组, 丁酸梭菌(5.0×10⁸ cfu·mL⁻¹)+依达拉奉(4 mg·kg⁻¹)组, 每组 5 只, 共 60 只大鼠(分 2 批来做, 一批用来检测血清 D-LAC, DAO, LPS 含量和小肠推进率, 另外一批行脑 TTC 染色、十二指肠苏木素-伊红(HE)染色和紧密连接蛋白检测)。各给药组于制作脑缺血模型前 2 h 开始灌胃给药, 每次给药间隔 12 h。阳性药组予以丁酸梭菌每日灌胃 2 次, 细菌制剂的制备与给药剂量参照文献^[14], 每次灌胃 0.7 mL, 每天 2 次; 依达拉奉采用腹腔注射给药, 每天 1 次; 假手术组与模型组灌胃等量生理盐水, 术后继续同前给药。

2.7 标本采集 于缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 一批大鼠麻醉后行腹主动脉采血, 再取小肠做小肠推进率检测。另外一批大鼠断头取脑行脑 TTC 染色; 自幽门下端 5 cm 处, 再取部分十二指肠多聚甲醛固定用于 HE 染色, 部分十二指肠置于冻存管, 过液氮, 于 -80 °C 冰箱保存用于紧密连接蛋白检测。

2.8 指标检测

2.8.1 神经功能缺损评分 于缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 采用 LONGA 评分法^[15]测定神经功能缺损评分。0 分, 无明显神经功能缺失症状; 1 分, 轻度局灶性神经功能障碍(不能完全伸展左侧前肢); 2 分, 中度局

灶性功能障碍(行走时向左侧旋转);3分,重度神经功能障碍(行走时向左侧倾倒);4分,极重度神经功能障碍(不能自发行走或意识丧失)。

2.8.2 TTC染色法测定脑梗死率 根据前期研究方法^[16],于缺血2 h再灌注24 h后,麻醉大鼠,迅速断头取脑,去除小脑、脑干,置-20℃冷冻15 min后,沿冠状面将脑组织连续切成5片,每片厚2 mm,立即将脑片放入2% TTC缓冲液中,置37℃水浴避光染色20~30 min,染色完毕后,置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h后,拍照记录。正常脑组织染色为玫瑰红色,梗死灶为苍白色。用Image-pro plus 6.0图像分析软件测量梗死灶面积。根据公式 $V=t(A_1+A_2+\dots+A_n)$ 计算梗死灶体积,其中 t 为切片厚度, A 为梗死面积, $n=5$ 。梗死体积百分比即为梗死区体积与正常侧大脑半球体积比值。

2.8.3 小肠推进率检测肠道动力评价 大鼠取材前30 min给予半固体糊(10 mL·kg⁻¹)灌胃处理^[12],于缺血2 h再灌注24 h后,麻醉处死大鼠后剖开腹部,结扎胃贲门和幽门,迅速取出小肠,轻轻剥离后,平铺于蓝色手术铺巾上,测量幽门至回盲肠部全长,既代表小肠总长度 L ,幽门至黑色半固体糊前沿的距离为炭末推进距离 L_0 。小肠推进率(%)= $L_0/L \times 100\%$ 。

2.8.4 HE染色观察各组大鼠十二指肠黏膜组织病理学改变 缺血2 h再灌注24 h后,自幽门下端5 cm处,取部分十二指肠行HE染色,观察组织病理变化,取出固定好的十二指肠组织,采用梯度乙醇脱水2 h,二甲苯透明,包埋。连续石蜡切片,厚度为5 μm,烤片,常规HE染色,中性树胶封片,于200倍镜下进行组织形态观察,选取典型视野拍照。

2.8.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定对各组大鼠十二指肠紧密连接蛋白表达的影响 缺血2 h再灌注24 h后,自幽门下端5 cm处,取十二指肠组织50 mg,加入预冷的RIPA裂解液1 mL提总蛋白,于冰上匀浆30~50次,充分混匀静置30 min后4℃条件下12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,用BCA试剂盒测定总蛋白含量。每个样本取蛋白80 μg,100℃水浴10 min变性后,于110 V恒压电泳90 min,200 mA转膜2 h,5%脱脂牛奶封闭2 h,再分别与ZO-1兔多克隆抗体(1:5 000),Occludin兔多克隆抗体(1:2 000),Claudin-5小鼠单克隆抗体(1:500),β-actin兔多克隆抗体(1:8 000)孵育,4℃静置过夜,然后分别加山羊抗兔二抗(1:8 000),山羊抗鼠二抗(1:8 000),于37℃孵育1 h后,TBST洗

膜3次,每次10 min,加ECL化学发光剂于凝胶成像仪中显影。用Image Lab图像分析软件测定蛋白相对表达量。

2.8.6 ELISA测定血清D-LAC,DAO及LPS含量 缺血2 h再灌注24 h后,采用腹主动脉采血的方法,采血5 mL,于-4℃低温离心,3 000 r·min⁻¹,离心15 min,离心后提取上清液置于-80℃冰箱保存,按照D-LAC,DAO,LPS ELISA分析试剂盒说明书提供的方法进行检测。

2.9 统计学分析 数据采用SPSS 24.0统计软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各药物组计量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐者用Dunnett's T3检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分的影响 神经功能缺损评分结果表明,假手术组无脑组织损伤,评分为0。与假手术组比较,模型组神经功能缺损评分显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,HTTLD高、中剂量组与依达拉奉+丁酸梭菌组评分显著降低($P < 0.01$);各药物组间比较,HTTLD高、中剂量组降低神经功能缺损评分的效应明显强于低剂量组($P < 0.05, P < 0.01$)。见表1。

表1 HTTLD对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of HTTLD on score of neurological deficit in rats with cerebral ischemia/reperfusion ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	神经功能缺损 评分/分
假手术		0
模型		3.2±0.45 ²⁾
HTTLD	7.16	2.8±0.45 ⁸⁾
	14.33	2.0±0.71 ^{4,5)}
	28.66	1.8±0.45 ^{4,6)}
依达拉奉+丁酸梭菌 ⁹⁾	0.004+5.0×10 ⁸⁾	2.2±0.45 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与HTTLD低剂量组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与HTTLD高剂量组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$;⁹⁾表示剂量单位为cfu·mL⁻¹(表2~5同)。

3.2 对脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积的影响 TTC染色结果表明,假手术组无梗死灶形成,脑梗死率为0。与假手术组比较,模型组出现明显梗死灶,脑梗死率显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,HTTLD低、中、高剂量组及依达拉奉+丁酸梭菌组

均能明显减少梗死体积,脑梗死率显著下降($P < 0.01$)。各给药组间比较,HTTLD高剂量组减轻脑梗死体积的效应明显强于中、低剂量组与依达拉奉+丁酸梭菌组($P < 0.05, P < 0.01$),且脑梗死率随中药剂量浓度增加而明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见图1,表2。

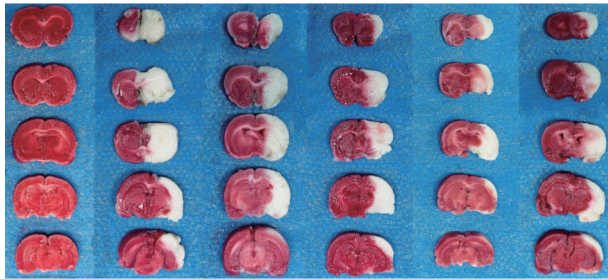


图1 HTTLD对脑缺血再灌注大鼠脑组织TTC染色的影响
Fig. 1 Effect of HTTLD on TTC staining in brain tissue of rats with cerebral ischemia/reperfusion

表2 HTTLD对脑缺血再灌注大鼠脑梗死率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 2 Effect of HTTLD on cerebral infarction rate in rats with cerebral ischemia/reperfusion ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	脑梗死率/%
假手术		0
模型		41.72±0.78 ²⁾
HTTLD	7.16	37.98±1.94 ^{4,8)}
	14.33	35.48±1.68 ^{4,5,8)}
	28.66	29.53±1.65 ^{4,6)}
依达拉奉+丁酸梭菌 ⁹⁾	0.004+5.0×10 ⁸⁾	32.13±1.80 ^{4,6,8)}

3.3 对脑缺血再灌注大鼠小肠推进率的影响 与假手术组比较,模型组大鼠的小肠推进率显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,HTTLD低、中、高剂量组及依达拉奉+丁酸梭菌组均能显著提高小肠推进率,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。各给药组间比较,HTTLD高剂量组对小肠推进率的促进作用显著强于中、低剂量组与依达拉奉+丁酸梭菌组($P < 0.01$),且小肠推进率随HTTLD浓度增加而增加。见表3。

3.4 对脑缺血再灌注大鼠十二指肠黏膜形态改变的影响 正常大鼠十二指肠组织黏膜层、黏膜下层与肌层,层次分明,小肠绒毛排列整齐,中央乳糜管清晰可见。与假手术组比较,模型组大鼠十二指肠黏膜可见部分充血与少量炎症细胞,小肠绒毛部分

表3 HTTLD对脑缺血再灌注大鼠小肠推进率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 3 Effect of HTTLD on rat small intestine propulsion rate after cerebral ischemia/reperfusion ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	小肠推进率/%
假手术		51.26±3.68
模型		31.14±1.59 ²⁾
HTTLD	7.16	35.09±1.18 ^{4,8)}
	14.33	38.64±1.64 ^{4,5,8)}
	28.66	45.14±1.83 ^{4,6)}
依达拉奉+丁酸梭菌 ⁹⁾	0.004+5.0×10 ⁸⁾	40.53±1.90 ^{4,6,8)}

脱落,上皮层和固有层层次不清。与模型组比较,HTTLD低剂量组小肠绒毛脱落情况较模型组减少,但排列仍不整齐,可见有轻微充血及少量炎症细胞;HTTLD中、高剂量组十二指肠组织小肠绒毛排列较模型组整齐,中剂量组仍有少许固有层增宽,可见少量炎症细胞,高剂量组与依达拉奉+丁酸梭菌组的充血情况明显好转,炎症细胞减少,固有层宽度恢复,绒毛排列整齐。见图2。

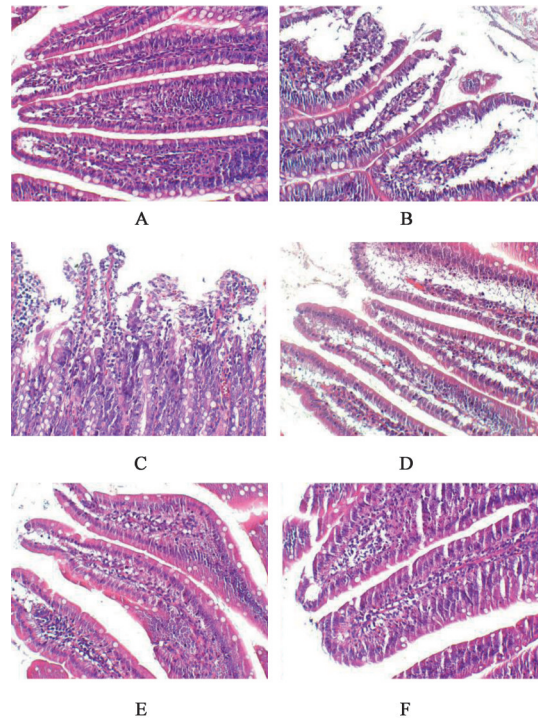


图2 HTTLD对脑缺血再灌注大鼠十二指肠黏膜形态改变的影响(HE, ×200)
Fig. 2 Effect of HTTLD on morphological changes of duodenal mucosa in rats with cerebral ischemia/reperfusion (HE, ×200)

3.5 对脑缺血再灌注大鼠十二指肠组织ZO-1, Occludin, Claudin-5蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组ZO-1, Occludin, Claudin-5蛋白表达均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,HTTLD低、中、

高剂量组及依达拉奉+丁酸梭菌组能明显上调ZO-1蛋白表达($P<0.05, P<0.01$), HTTLD中、高剂量组及依达拉奉+丁酸梭菌组能明显上调Occludin蛋白表达($P<0.05, P<0.01$), HTTLD低、高剂量组能显著上调Claudin-5蛋白表达($P<0.01$)。各给药组间比较,高剂量组对ZO-1, Occludin, Claudin-5蛋白表达上调的作用均明显强于中、低剂量组与依达拉奉+丁酸梭菌组($P<0.05, P<0.01$), 且HTTLD上调Occludin蛋白表达的作用随药物浓度增加而增加($P<0.05, P<0.01$)。见图3, 表4。

3.6 对脑缺血再灌注大鼠血清D-LAC, DAO, LPS含量的影响 与假手术组比较,模型组D-LAC, DAO, LPS含量均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,HTTLD低、中、高剂量组及依达拉奉+丁酸梭菌组均能明显降低D-LAC, DAO含量($P<0.05, P<0.01$), HTTLD中、高剂量组及依达拉奉+丁酸梭菌组能明显降低LPS含量($P<0.05, P<0.01$)。且

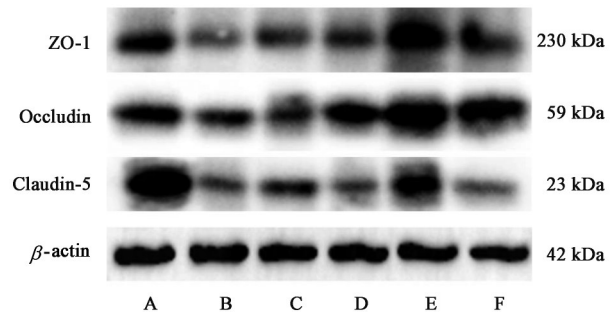


图3 脑缺血再灌注大鼠十二指肠组织ZO-1, Occludin, Claudin-5蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of ZO-1, Occludin, Claudin-5 protein expression in duodenal tissue of rats with cerebral ischemia/reperfusion

HTTLD高剂量组对D-LAC蛋白下调的作用明显强于中、低剂量组及依达拉奉+丁酸梭菌组($P<0.05, P<0.01$), 对DAO, LPS蛋白下调的作用明显强于低剂量组($P<0.05, P<0.01$), 差异有明显统计学意义。见表5。

表4 HTTLD对脑缺血再灌注大鼠十二指肠组织ZO-1, Occludin, Claudin-5蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of HTTLD on expression of ZO-1, Occludin and Claudin-5 proteins in duodenum tissue of rats with cerebral ischemia/reperfusion ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	ZO-1/ β -actin	Occludin/ β -actin	Claudin-5/ β -actin
假手术		0.63±0.10	0.89±0.06	1.19±0.11
模型		0.17±0.03 ²⁾	0.49±0.03 ²⁾	0.18±0.03 ²⁾
HTTLD	7.16	0.29±0.06 ^{3,8)}	0.29±0.04 ⁸⁾	0.37±0.05 ^{4,8)}
	14.33	0.33±0.06 ^{3,8)}	0.58±0.04 ^{3,6,8)}	0.19±0.03 ⁸⁾
	28.66	1.10±0.16 ^{4,6)}	1.13±0.09 ^{4,6)}	0.49±0.05 ^{4,6)}
依达拉奉+丁酸梭菌 ⁹⁾	0.004+5.0×10 ⁸⁾	0.45±0.08 ^{4,5,8)}	1.03±0.11 ^{4,6,7)}	0.20±0.03 ^{6,8)}

表5 HTTLD对脑缺血再灌注大鼠血清D-LAC, DAO, LPS含量的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of HTTLD on content of serum D-LAC, DAO and LPS in rats with cerebral ischemia/reperfusion ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	D-LAC/ $\mu mol\cdot L^{-1}$	DAO/ $\mu g\cdot L^{-1}$	LPS/ $\mu g\cdot L^{-1}$
假手术		3.33±0.59	2.78±0.63	2.54±0.58
模型		6.51±1.16 ²⁾	6.38±0.76 ²⁾	3.93±0.44 ²⁾
HTTLD	7.16	5.27±0.60 ^{3,8)}	5.13±0.76 ^{3,8)}	3.34±0.18 ⁷⁾
	14.33	5.14±0.92 ^{3,7)}	4.40±0.97 ⁴⁾	3.18±0.53 ³⁾
	28.66	3.73±0.36 ^{4,6)}	3.43±0.44 ^{4,6)}	2.62±0.68 ^{4,5)}
依达拉奉+丁酸梭菌 ⁹⁾	0.004+5.0×10 ⁸⁾	4.91±1.06 ^{4,7)}	4.29±0.86 ⁴⁾	2.94±0.23 ⁴⁾

4 讨论

中医理论认为,中风后脑窍血脉痹阻,气机不畅、升降失调,则胃肠失于通降。轻则腹中胀闷,纳呆食少,大便干结;重则口干口臭,面红心烦,腹胀腹痛,大便干结,或可扪及腹中有燥屎数枚,或可并现呕血、黑便等胃肠出血,从而导致新的病理产物形成痰湿,水饮、瘀血等。这些新产生的病理产物

作为致病因素,可上扰清窍,导致脑的生理功能发生失调,从而改变脑部病变或加重脑部损伤;胃肠气机失调,浊气上逆于脑,进而导致脑髓受损。由此可见,脑与肠在生理上相互为用,病理上互相影响,联系紧密。现代研究也表明,中枢神经系统、自主神经系统、神经内分泌系统参与了肠与脑在生理、病理状态下的信息交流^[3],肠道通过神经信号、

内分泌信号、免疫信号以及肠道微生物信号上传并调节大脑功能^[17]。

缺血性卒中后,胃肠道动力障碍是中风后的常见表现,其主要原因是颅内压升高造成自主神经功能障碍,交感神经活动增加以及副交感神经张力下降,胃肠道蠕动和腺体分泌受抑制;急性脑损伤后继发的炎症反应亢进也可能导致胃肠收缩力降低,肠道水肿加剧以及炎症因子增多^[18]。胃肠道动力障碍既导致肠内消化物不吸收又可引起肠道细菌异常增殖。中风后肠道微生物群的组成改变,胃肠道蠕动减弱导致有害代谢产物的局部积累,炎症反应亢进,均能影响肠道屏障功能,造成肠道黏膜受损,增加了消化道溃疡、出血的发生率^[19]。另外,急性缺血性脑损伤通过影响自主神经系统的传出减少肠运动,通过肠神经系统增加肠黏膜通透性,最终导致细菌移位、感染及脓毒症^[20]。

肠道屏障(ITB)包括肠黏膜机械屏障、生物屏障、免疫屏障和化学屏障组成^[21]。肠黏膜上皮细胞与细胞间紧密连接是构成肠黏膜机械屏障的组织结构基础^[22]。紧密连接(TJs)是肠上皮细胞间的主要连接方式,主要由 Occludin, Claudins, 连接黏附分子(JAM)组成,通过ZO相互作用与肌动蛋白的细胞骨架相连^[23],形成环绕细胞的物理屏障,进而分离生物体内的不同区室并调节他们之间的物质交换,维持上皮细胞层两侧物质成分的差异^[24]。紧密连接蛋白与肌动蛋白细胞骨架的相互作用对于维持TJs结构至关重要,并可以调节TJs屏障完整性的细胞骨架^[25]。研究表明,紧密连接蛋白的表达减少会破坏TJs的完整性,进而改变ITB的通透性^[26]。

DAO是一种主要分布在小肠,是黏膜上皮绒毛中的一种酶,其在胺类代谢中发挥关键作用,本身具有较高的细胞毒性作用^[27]。正常情况下,DAO在血中成分很少,当肠道黏膜屏障受损时,DAO可伴随肠上皮细胞核损伤和修复而表达升高^[28],因此,DAO是一种反映肠上皮细胞屏障的良好指标^[29]。D-LAC是多种肠道细菌的共同代谢产物,正常情况下,其不能够通过肠道进入血液,当肠屏障功能受损时D-LAC可通过肠道发生移位,因此可作为一种反映肠上皮细胞屏障功能的良好指标^[30]。内毒素,是多种革兰阴性菌细胞壁的主要构成物质,当肠屏障功能正常情况下,内毒素无法通过肠道进入血液,但在肠道屏障功能受损情况下,内毒素可以通过肠道进入血,并通过其有效毒性成分,引发感染性休克、败血症、多器官功能衰竭^[28-29,31-32]等症状,因

而内毒素也是一种反映肠屏障功能的常用指标。

HTTLD是以中医经典名方半夏白术天麻汤为基础加减而成,半夏白术天麻汤出自清·程钟龄《医学心语》。方中半夏、天麻为君,半夏可燥湿化痰,且能降逆和胃止呕,为治痰之要药,天麻入肝经,祛风止痛。白术、茯苓二者同为臣药,白术健脾燥湿,茯苓健脾利湿,与白术相须为用,以治生痰之源,使脾健运则湿痰去;天竺黄清热豁痰,凉心定惊;胆南星清热化痰、熄风定惊;丹参活血化瘀;香附乃气病之主药,治血者必先行气,治痰先治气,气顺痰自灭,血行痰自消;大黄有攻积滞、清湿热、泻火、凉血、祛瘀、解毒等功效。全方共奏息风化痰、活血通络之功效,切中中风病“痰、瘀”病机。

本研究结果显示,脑缺血再灌注后,大鼠神经功能出现缺损症状,脑梗死灶明显。HTTLD高、中、低剂量组能显著减轻神经功能缺损症状,缩小脑梗死体积,以高剂量组效应明显,且脑梗死率随药物浓度的升高而显著降低。说明HTTLD具有抗脑缺血再灌注大鼠脑组织损伤的作用,且效应存在剂量依赖性。

肠道动力和肠道形态学检测结果表明,脑缺血再灌注后,大鼠的小肠推进率显著降低,可见十二指肠绒毛脱落,黏膜各层次不清,且有炎性细胞浸润与充血。HTTLD低、中、高剂量组能增强小肠推进率,减少肠黏膜损伤、减轻肠道充血,且小肠推进率随HTTLD浓度增加而增加。说明,脑缺血再灌注可以引起肠道动力与肠道黏膜损伤,HTTLD能减轻脑缺血再灌注后的肠道黏膜损伤,增强肠道黏膜的修复,改善肠道动力、促进胃肠道蠕动,且效应具有剂量依赖性。

紧密连接蛋白研究结果显示,ZO-1, Occludin, Claudin-5 3种蛋白在正常大鼠肠黏膜上皮细胞上均有表达,脑缺血再灌注后,其表达均显著减少,同时血清D-LAC,DAO,LPS含量增加,表明紧密连接蛋白表达降低是引起ITB通透性增加的重要原因,且脑缺血再灌注可以引起ITB增加和肠道细胞毒素以及细菌代谢产物释放入血。HTTLD高、中、低剂量组均能显著上调小肠黏膜ZO-1蛋白表达,中、高剂量组及依达拉奉+丁酸梭菌组能显著上调Occludin蛋白表达,低、高剂量组能显著上调Claudin-5蛋白表达;同时HTTLD高、中、低剂量组均能降低血清D-LAC,DAO含量,HTTLD高、中剂量组能降低血清LPS含量,且高剂量的效应更加明显,Occludin蛋白表达上调随HTTLD浓度增加而显著增加。说明

HTTLD可以维持脑缺血再灌注后肠道屏障的完整性,减少肠道毒物和细菌代谢产物D-LAC,DAO,LPS的释放,其作用与上调肠道黏膜紧密连接蛋白ZO-1,Occludin,Claudin-5表达有关,且对Occludin蛋白表达上调的促进作用具有剂量依赖性,这对于更好的维持脑缺血后紧密连接的稳定性和ITB的通透性具有重要意义。

综上所述,脑缺血再灌注后,大鼠脑组织损伤、出现神经功能障碍,同时有肠黏膜充血、炎症、胃肠道蠕动减弱等改变,并出现肠上皮细胞通透性增加,肠道细胞毒素以及细菌代谢产物通过TJs进入体循环。HTTLD能够对抗脑缺血再灌注脑组织损伤、降低脑梗死率,增强小肠推进率,提高胃肠道蠕动,减轻十二指肠黏膜损伤、增强上皮紧密连接蛋白表达减少肠黏膜通透性和肠道有害物质入血的作用。由此可见,HTTLD在脑缺血再灌注后肠-脑损伤中发挥了重要作用,但其机制是否与脑缺血后神经、内分泌、免疫信号的介导以及肠道微生物的紊乱^[17,33]是否有关,有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 邱厚道,吴永贵,刘江华. 脑梗死急性期中医辨证分型与颈动脉粥样硬化的关系探讨[J]. 湖北中医药大学学报,2014,16(4):77-79.

[2] COLLINS S M, SURETTE M, BERCIK P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain[J]. Nat Rev Microbiol, 2012,10(11):735-742.

[3] MAYER E A, TILLISCH K. The brain-gut axis in abdominal pain syndromes[J]. Annu Rev Med, 2011, 62:381-396.

[4] BENAKIS C, BREA D, CABALLERO S, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells [J]. Nat Med, 2016,22(5):516-523.

[5] 刘东坡. 化痰通络汤对脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块、血脂及不稳定标志物MMP-9、TIMP-1水平的影响[J]. 中医学报,2017,32(12):2472-2476.

[6] 姚欣艳,王迎春,高晓峰,等. 化痰通络汤对MCAO大鼠脑保护作用及HMGB1-TLR4-NF- κ B信号通路的影响[J]. 中国中医急症,2017,26(9):1536-1540.

[7] 陈尚瑜,郑曙云. 大黄对肠道屏障功能调节和保护作用的研究进展[J]. 感染、炎症、修复,2011,12(2):124-126.

[8] 周晓亮. 复方丹参制剂对心血管和胃肠道药理作用的临床分析[J]. 中国医药指南,2011,9(29):

343-344.

[9] 王郁金,周永学,苏衍进. 半夏泻心汤治疗胃肠疾病临床应用[J]. 吉林中医药,2014,34(2):132-134.

[10] 王雪梅,严光俊,刘冲. 半夏泄心汤加减治疗脾胃湿热型慢性萎缩性胃炎患者的临床效果[J]. 世界中医药,2019,14(2):412-416.

[11] 徐萌,岳仁宋,杨茂艺,等. 半夏泻心汤对糖尿病胃轻瘫大鼠肠道菌群及炎症因子的影响[J]. 中草药,2018,49(13):3056-3061.

[12] 郁保生,张国山,石晓理,等. 小柴胡汤对功能性消化不良大鼠血管活性肠肽、胃排空及小肠推进率的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):251-254.

[13] 刘晓丹,杨筱倩,唐三,等. 冰片对黄芪甲苷和三七总皂苷配伍有效成分在脑缺血/再灌注模型大鼠脑组织分布的影响[J]. 中草药,2019,50(7):1649-1656.

[14] SUN J, WANG F, LING Z, et al. Clostridium butyricum attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulation of gut microbiota[J]. Brain Res, 2016,1642:180-188.

[15] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989,20(1):84-91.

[16] 唐三,丁煌,杨筱倩,等. 冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障转运蛋白的影响[J]. 中草药,2019,50(18):4389-4397.

[17] ROGERS G B, KEATING D J, YOUNG R L, et al. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways [J]. Mol Psychiatry, 2016,21(6):738-748.

[18] OLSEN A B, HETZ R A, XUE H, et al. Effects of traumatic brain injury on intestinal contractility [J]. Neurogastroenterol Motil, 2013,25(7):593.

[19] YARANDI S S, PETERSON D A, TREISMAN G J, et al. Modulatory effects of Gut microbiota on the central nervous system: how gut could play a role in neuropsychiatric health and diseases [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2016,22(2):201-212.

[20] TASCILAR N, IRKORUCU O, TASCILAR O, et al. Bacterial translocation in experimental stroke: what happens to the gut barrier?[J]. Bratisl Lek Listy, 2010, 111(4):194-199.

[21] 刘霞,胡舒宁,刘密,等. 针灸调控肠道菌群的研究进展与思考[J]. 世界中医药,2019,14(3):527-530.

[22] SAITOH Y, SUZUKI H, TANI K, et al. Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin [J]. Science, 2015,347(6223):775-778.

[23] YAN H, AJUWON K M. Butyrate modifies intestinal

- barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6):e0179586.
- [24] GONZALEZ-MARISCAL L, BETANZOS A, NAVA P, et al. Tight junction proteins[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003, 81(1):1-44.
- [25] CHEN R, WU P, CAI Z, et al. Puerariae Lobatae Radix with Chuanxiong Rhizoma for treatment of cerebral ischemic stroke by remodeling gut microbiota to regulate the brain-gut barriers[J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 65:101-114.
- [26] OSHIMA T, MIWA H. Gastrointestinal mucosal barrier function and diseases[J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(8):768-778.
- [27] JUNYUAN Z, HUI X, CHUNLAN H, et al. Quercetin protects against intestinal barrier disruption and inflammation in acute necrotizing pancreatitis through TLR4/MyD88/p38 MAPK and ERS inhibition [J]. *Pancreatology*, 2018, 18(7):742-752.
- [28] WANG Y, LIANG K, KONG W. Intestinal trefoil factor 3 alleviates the intestinal barrier function through reducing the expression of TLR4 in rats with nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Arch Med Res*, 2019, 50(1):2-9.
- [29] WANG Z E, WU D, ZHENG L W, et al. Effects of glutamine on intestinal mucus barrier after burn injury [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11):3833-3846.
- [30] 丁春龙,王玉海,杨理坤,等. 血清D-乳酸、细菌内毒素及二胺氧化酶在创伤性颅脑损伤后肠道黏膜屏障功能评估中的作用[J]. *中华神经外科杂志*, 2019(12):1258-1259-1260-1261.
- [31] WU X X, HUANG X L, CHEN R R, et al. Paeoniflorin prevents intestinal barrier disruption and inhibits lipopolysaccharide (LPS) -induced inflammation in Caco-2 cell monolayers [J]. *Inflammation*, 2019, 42(6):2215-2225.
- [32] 王文炎,梁凤霞. 基于脾胃理论探讨“肠道微生物菌群为后天之本”[J]. *世界中医药*, 2020, 15(20):3062-3064.
- [33] MAYER E A. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(8):453-466.

[责任编辑 周冰冰]