

· 药理 ·

参苓白术颗粒对功能性腹泻大鼠结肠黏膜 紧密连接蛋白表达的作用

李晶¹, 王垂杰^{2*}, 李玉锋², 孟高达¹, 曹晓娇¹

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110000; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110000)

[摘要] 目的:观察参苓白术颗粒对功能性腹泻模型大鼠肠黏膜紧密连接蛋白的影响,并探讨其作用机制。方法:采用高乳糖+小平台站立法建立功能性腹泻脾虚证大鼠模型,将90只大鼠随机分为正常组,模型组(高乳糖+小平板),匹维溴铵组,参苓白术颗粒高、中、低剂量组,每组15只,参苓白术颗粒高、中、低剂量分别为3.212,1.606,0.803 g·kg⁻¹,匹维溴铵给药剂量为0.0125 g·kg⁻¹;正常组与模型组灌服生理盐水,每天灌胃3次,共14 d。观察大鼠一般情况,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清中二胺氧化酶(DAO)水平、结肠黏膜肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)法检测紧密连接蛋白-1(zonula occludens-1,ZO-1),封闭蛋白-1(Claudin-1),咬合蛋白(Occludin) mRNA表达,免疫组化法检测ZO-1,Occludin蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组血清中DAO水平、结肠黏膜TNF-α含量明显升高($P < 0.01$),ZO-1,Claudin-1,Occludin mRNA表达明显降低($P < 0.01$),ZO-1,Occludin蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,参苓白术颗粒能够降低血清中DAO水平、结肠黏膜TNF-α含量($P < 0.01$),上调功能性腹泻模型大鼠结肠黏膜ZO-1,Claudin-1,Occludin mRNA表达($P < 0.01$),上调ZO-1,Occludin蛋白表达($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:参苓白术颗粒能够调节功能性腹泻大鼠结肠黏膜紧密连接蛋白表达,调节肠黏膜机械屏障,这可能是从脾论治功能性腹泻的机制之一。

[关键词] 参苓白术颗粒; 功能性腹泻大鼠; 紧密连接蛋白-1; 咬合蛋白; 封闭蛋白-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0102-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120102

Effect of Shenling Baizhu Particles on Intestinal Epithelial Tight Junctions in Rats with Functional Diarrhea

LI Jing¹, WANG Chui-jie^{2*}, LI Yu-feng², MENG Gao-da¹, CAO Xiao-jiao¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110000, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110000, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect of Shenling Baizhu particles on intestinal epithelial tight junctions in rats with functional diarrhea. **Method:** The functional diarrhea spleen deficiency syndrome model in rats was established by using high lactose + small platform standing method. the rats were divided into normal group, model group, pinaverium bromide group, Shenling Baizhu particle high, medium and low dose groups. Shenling Baizhu particle groups were administrated with Shenling Baizhu particle at doses of 3.212, 1.606, 0.803 g·kg⁻¹, respectively, and pinaverium bromide group was given pinaverium bromide of 0.0125 g·kg⁻¹; meanwhile, normal group and model group were given physiological saline intragastrically for 14 successive days. The diamine oxidase (DAO) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method; the zonula occludens-1 (ZO-1), Claudin-1, Occludin mRNA expressions

[收稿日期] 20150713(007)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531703)

[第一作者] 李晶,在读博士,从事中西医结合防治脾胃病的基础与临床研究, Tel:18802492053, E-mail:lijingjing333@sina.com

[通讯作者] *王垂杰,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事中西医结合防治脾胃病的基础与临床研究, Tel:024-31961114, E-mail:lnzyxhk@163.com

were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and ZO-1, Claudin-1 protein expressions were detected by immunohistochemistry method. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed significant increases in serum DAO and TNF- α content in colonic mucosa ($P < 0.01$), and decreases in ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA expressions ($P < 0.01$) and ZO-1, Occludin protein expression ($P < 0.01$); compared with the normal group, Shenling Baizhu particle groups showed decreases in serum DAO and TNF- α content in colonic mucosa ($P < 0.01$), and up-regulations in ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA expressions ($P < 0.01$) and ZO-1, Occludin protein expression $P < 0.05$, $P < 0.01$) in functional diarrhea model rats. **Conclusion:** Shenling Baizhu particles can regulate tight junction protein expression in colonic mucosa, and intestinal mucosal mechanical barrier, which may be one of mechanisms of treating functional diarrhea.

[Key words] Shenling Baizhu particles; functional diarrhea in rats; zonula occludens-1; Occludin; Claudin-1

功能性腹泻是指持续或反复发作的以松软(糊状)或水样便为特征的综合征,腹泻发生时不伴腹痛或腹部不适^[1]。由于发病机制复杂多样,治疗常以个体化方案为主,治疗效果不佳,易反复发作。中国医学认为功能性腹泻属于“泄泻”范畴,各种原因导致的脾虚是其重要病因病机^[2]。参苓白术颗粒选方于《太平惠民和剂局方》,具有益气健脾、和胃渗湿的功效,是治疗脾虚泄泻常用代表方剂,广泛应用于临床,疗效确切^[3]。

目前,功能性腹泻发病的分子生物学机制以及中医药的作用靶点相关研究较少,张博等^[4]认为脾虚大鼠存在肠黏膜 TFF3 因子下调以及肠黏膜屏障损伤;薛晓倩等^[5]证实脾虚湿阻证大鼠腹泻症状的改善可能与回肠黏膜紧密连接蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)的表达量变化有关。本研究拟采用功能性腹泻脾虚证大鼠模型,通过参苓白术颗粒干预治疗,观察大鼠结肠黏膜通透性, ZO-1, 封闭蛋白-1(Claudin-1), 咬合蛋白(Occludin)的改变,从而研究参苓白术颗粒治疗功能性腹泻的肠黏膜机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 90 只, 4 周龄, 体重 85 ~ 95 g, 辽宁长生生物技术有限公司提供, 动物合格证号 SCXK(辽)2010-0001。实验前 1 周适应性喂养, 室温 24 ~ 26 °C, 湿度 60% ~ 65%, 每笼 7 ~ 8 只, 正常饮水、摄食。

1.2 药物及试剂 参苓白术颗粒组成为人参 15 g, 白术(炒)15 g, 茯苓 15 g, 山药 15 g, 莲子 10 g, 白扁豆(炒)12 g, 薏苡仁(炒)10 g, 砂仁 6 g, 桔梗 6 g, 甘草 10 g, 均购自辽宁中医药大学附属医院中药房, 为康美药业股份有限公司产品, 经辽宁中医药大学中药学院伍艳玲教授鉴定均为正品, 由辽宁中医药大学附属医院中药局煎制并浓缩成粉末, 1 g 药粉中含生

药量 6.3 g。每日给药量为参苓白术颗粒高、中、低剂量组(3.212, 1.606, 0.803 g·kg⁻¹), 匹维溴铵(0.012 5 g·kg⁻¹)。匹维溴铵(法国苏威制药有限公司, 批号 H20120127), 大鼠二胺氧化酶(DAO)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20140219, 20140503); 兔抗大鼠 Claudin-1, ZO-1, Occludin 单抗, Trizol 及实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司, 批号分别为 I20518, I10824, I20602, H20708, H30106)。

1.3 仪器 ABI7500 型 qPCR 仪(美国 Thermo Fisher 仪器有限公司), Biofuge Stratos 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司), PROTEAN II xi 型 SDS-PAGE 垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司), DW-86L62 型 -80 °C 冰箱(海尔集团)。

2 方法

2.1 功能性腹泻动物模型制备 采用高乳糖饲料+小平台站立改良法建立功能性腹泻大鼠模型^[6]。按照平均每只大鼠每日 8 ~ 12 g 饲料计算造模组大鼠喂以高乳糖饲料, 正常饮水^[7]。每晚 8:00 至第 2 天早 6:00, 将大鼠放置于小平板上, 每个水槽中注水 9 cm。造模时间为 14 d。

2.2 动物分组及干预方法 造模成功大鼠共分为模型组、匹维溴铵组、参苓白术颗粒高、中、低剂量组, 每组 15 只, 正常组 15 只。正常组与模型组灌服生理盐水, 给药组灌服相应药物, 灌胃日 3 次, 共 14 d, 大鼠每 kg 体重灌胃量为 20 mL。匹维溴铵(0.208 g·L⁻¹), 参苓白术颗粒高、中、低剂量组(0.053, 0.027, 0.013 g·mL⁻¹)。

2.3 指标检测

2.3.1 取材 灌胃 14 d 后, 将各组大鼠经由水合

氯醛麻醉后处死,抽取腹主动脉外周血约 5 mL,静
止 20 min 后,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清后
置 -20 ℃ 冰箱保存备用;取出各组大鼠回盲部结
肠组织约 10 cm,纵向剪开,用 0.9% 生理盐水清洗
干净,一部分吸水纸吸干后用载玻片刮取肠黏膜,加
入 0.01 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(PBS)制成匀浆,4 ℃
3 000 r·min⁻¹离心 10 min 取上清,待检测 TNF-α 水
平。一部分立即置于 4% 多聚甲醛溶液固定,常规
石蜡包埋进行免疫组织化学法检测,其余部分经液
氮速冻后存于 -80 ℃ 冰箱中备用用于 mRNA 检测。

2.3.2 血清中 DAO 及肠黏膜 TNF-α 水平的检测

采用 ELISA 法严格按照操作说明检测血清中 DAO
及肠黏膜 TNF-α 水平。

2.3.3 qPCR 检测结肠组织 ZO-1, Claudin-1, Occludin mRNA 的表达

引物序列参照 Genebank 数据库中的基因序列,采用 ABI 公司的 Primer
express software 2.0 设计,由大连宝生物公司合成,
见表 1。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,肠
组织总 RNA 采用 Trizol 一步法提取,经紫外分光光
度仪测定各总 RNA 的吸光度 A₂₆₀,并将所有样本稀
释成相同浓度,以特异性引物反转录合成 cDNA/37
℃ 1 h,95 ℃ 5 min,以 cDNA 为模板扩增基因片段。
反应条件为 93 ℃ 2 min,93 ℃ 45 s,55 ℃ 1 min,进
行 10 个循环;93 ℃ 45 s,55 ℃ 1 min 采集荧光,进
行 30 个循环。结果以循环阈值(C_t)值表示,基因
表达量以各基因 C_t 值减去内参基因 C_t 值,相对表
达量为 2^{-ΔΔC_t} × 100%。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

组别	引物序列	片段长度/bp
ZO-1	上游 5'-CCCTTACCTTTCGCCTGAAAC-3'	183
	下游 5'-CCTTCGTCTCTGAGCATCGT-3'	
Claudin-1	上游 5'-CTCACAGAGAGGGTCTGTTG-3'	166
	下游 5'-ACTGTTAGCGGCAGTTTGGT-3'	
Occludin	上游 5'-GGGGTGATTCCGATCCTGTC-3'	114
	下游 5'-TCCTCAAAGATGCCCGTTC-3'	
GAPDH	上游 5'-TGGGTTTCCCGTTGATGA-3'	252
	下游 5'-AGGGCTGCCTTCTCTTGT-3'	

2.3.4 免疫组化法分析结肠组织 ZO-1, Occludin 蛋白表达

石蜡切片常规脱蜡至水,蛋白酶消化 10 min, PBS 冲洗,一抗为兔抗大鼠 ZO-1, Occludin 抗
体 4 ℃ 过夜, PBS 冲洗,二抗 37 ℃, 30 min, PBS 冲
洗 DAB 显色、脱水、透明、树脂胶封片。每种切片随
机选取染色清晰者 5 ~ 8 张,每张切片在高倍镜下计
数 10 个视野,每组计数不少于 1 000 个细胞。由 2

位独立的无临床知识的观察者进行染色评分,细胞
中出现棕褐色颗粒为阳性细胞表达。 >75% 的细胞
染色阳性为卅, 50% ~ 75% 染色阳性为++,
10% ~ 49% 为 +, <10% 为阴性。实验均重复 3 次,
以保证可重复性。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件进
行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先行数据的正
态及方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析,
方差齐性采用 LSD-T 法检验,方差不齐采用 T₂, T₃
法检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察

正常组大鼠精神状态良
好,毛发洁白有光泽,耳廓呈淡粉色,排便正常。造
模组大鼠倦怠嗜卧,嗜睡,扎堆,萎靡不振,眯眼,被
抓拿时反抗明显减弱,活动度降低,毛发稀疏,枯黄
散乱无光泽且易脱;耳廓色淡。大便稀溏,含水量增
加,进食量减少,体重减少。至灌胃开始 1 周后,匹
维溴铵组、参苓白术颗粒各剂量组大鼠均开始恢复,
精神状态较前及模型组好转,大便含水量减少,较成
型,进食量增加,体重增加,至灌胃 14 d,匹维溴铵
组、参苓白术颗粒高剂量组精神状态较前更加恢复,
大便基本成型,参苓白术颗粒中、低剂量组仍有稀
便、恢复较匹维溴铵组、参苓白术颗粒高剂量组差,
模型组有稀便,没有恢复,精神差,一般状态不佳。

3.2 对大鼠血清 DAO, 肠黏膜 TNF-α 水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清 DAO,肠黏膜
TNF-α 水平明显升高(P < 0.01);与模型组比较,匹
维溴铵组、参苓白术颗粒高剂量组明显降低大鼠血
清 DAO,肠黏膜 TNF-α 水平(P < 0.01),两组相比
没有显著性差异。见表 2。

表 2 参苓白术颗粒对大鼠血清 DAO,肠黏膜 TNF-α 水平的影响
($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Effects of Shenling Baizhu particle on levels of DAO in
serum and TNF-α in colonic mucosa of rats ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	血清 DAO /U·mL ⁻¹	肠黏膜 TNF-α /ng·L ⁻¹
正常	-	0.068 ± 0.005	26.78 ± 1.82
模型	-	0.087 ± 0.013 ²⁾	78.92 ± 2.25 ²⁾
参苓白术颗粒	3.212	0.069 ± 0.004 ⁴⁾	38.15 ± 1.96 ⁴⁾
	1.606	0.083 ± 0.002	55.99 ± 2.45 ⁴⁾
	0.803	0.089 ± 0.005	74.94 ± 3.34
匹维溴铵	0.012 5	0.072 ± 0.005 ⁴⁾	39.52 ± 4.91 ⁴⁾

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

3.3 对大鼠结肠组织 ZO-1, Claudin-1, Occludin mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织 ZO-1, Claudin-1, Occludin mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,匹维溴铵组明显上调

ZO-1, Claudin-1, Occludin mRNA 表达 ($P < 0.01$), 参苓白术颗粒高剂量组明显上调 ZO-1, Claudin-1, Occludin mRNA 表达 ($P < 0.01$); 参苓白术颗粒中、低剂量组也可升高 ZO-1, Occludin mRNA 表达。见表 3。

表 3 参苓白术颗粒对大鼠结肠组织 ZO-1, Claudin-1, Occludin mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ZO-1/GAPDH	Claudin-1/GAPDH	Occludin/GAPDH
正常	-	1.003 \pm 0.146	1.007 \pm 0.149	1.005 \pm 0.129
模型	-	0.462 \pm 0.337 ²⁾	0.309 \pm 0.144 ²⁾	0.376 \pm 0.214 ²⁾
参苓白术颗粒	3.212	0.834 \pm 0.896 ⁴⁾	0.752 \pm 0.156 ⁴⁾	0.799 \pm 0.112 ⁴⁾
	1.606	0.501 \pm 0.345	0.215 \pm 0.037	0.436 \pm 0.131
	0.803	0.565 \pm 0.838	0.226 \pm 0.422	0.427 \pm 0.245
匹维溴铵	0.012 5	0.872 \pm 0.604 ⁴⁾	0.720 \pm 0.132 ⁴⁾	0.871 \pm 0.114 ⁴⁾

3.4 对大鼠结肠组织 ZO-1, Occludin 蛋白表达的影响 正常组光镜下观察到 ZO-1, Occludin 蛋白均匀一致地分布于小肠上皮细胞的边缘。模型组各时间点的 ZO-1, Occludin 蛋白分布不均,染色变淡,表达明显减少或缺失。与正常组比较,模型组 ZO-1, Occludin 阳性率明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较,匹维溴铵组、参苓白术颗粒高剂量组均能使 ZO-1 表达率增加 ($P < 0.01$), 匹维溴铵组、参苓白术颗粒高中低剂量组均能使 Occludin 表达率增加 ($P < 0.05$)。见图 1, 2 和表 4。

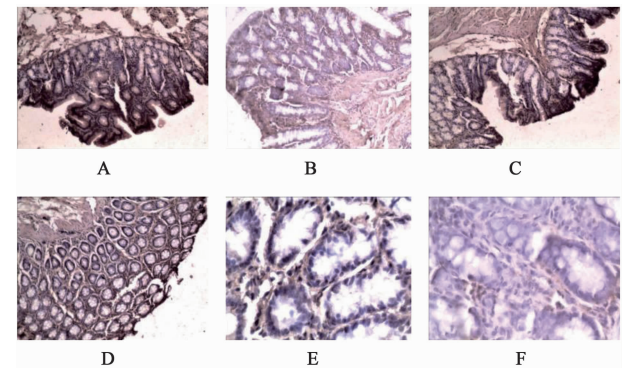
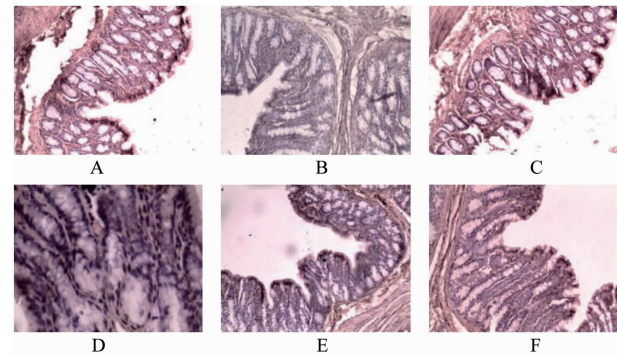


图 2 参苓白术颗粒对大鼠结肠组织 Occludin 蛋白表达影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig.2 Effects of Shenling Baizhu particle on protein expression of Occludin in rats colon tissue(IHC, $\times 200$)



A. 正常组; B. 模型组; C. 匹维溴铵组; D. 参苓白术颗粒 $3.212 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 参苓白术颗粒 $1.606 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 参苓白术颗粒 $0.803 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 参苓白术颗粒对大鼠结肠组织 ZO-1 蛋白表达影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig.1 Effects of Shenling Baizhu particle on protein expression of ZO-1 in rats colon tissue(IHC, $\times 200$)

4 讨论

功能性肠病是一组表现为肠道运动与分泌功能失调而无器质性改变的综合征,对其发病机制的研究主要集中在神经内分泌、生化介质、肌电活动及生理、情感等方面,从肠黏膜屏障角度探讨功能性肠病

发病机制是目前研究的热点。孔武明等^[8]发现,与对照组相比腹泻型 IBS 患者肠黏膜紧密连接蛋白表达减少,肠黏膜通透性增加,屏障功能损害。Piche 等^[9]发现,与健康志愿者相比,IBS 患者结肠组织的通透性明显增高,且肠黏膜紧密连接蛋白 ZO-1 的 mRNA 表达明显降低。与肠易激惹综合征相比,功能性腹泻不伴有腹痛或腹部不适,既往对于功能性腹泻的研究很少涉及功能性腹泻的病理生理学机制^[10]。因此从肠黏膜屏障角度探讨功能性腹泻发病机制可以丰富笔者对于功能性疾病的认识。

肠黏膜屏障功能包括机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障,机械和免疫屏障是非常重要的肠黏膜屏障。机械屏障的结构基础是完整的肠上皮细胞和相邻上皮细胞之间的紧密连接。紧密连接是一个狭长的带状结构,具有栅控功能及门控功能,其基本组成单位是跨膜连接蛋白,主要有 Claudin 蛋白, Occludin 蛋白, ZO 及连接黏附因子等。紧密连接作

表 4 参苓白术颗粒对大鼠结肠组织 ZO-1, Occludin 蛋白阳性表达的影响 (n = 15)

Table 4 Effects of Shenling Baizhu particle on protein expression of ZO-1, Occludin in rats colon tissue (n = 15)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ZO-1 蛋白			Occludin 蛋白		
		- ~ +	+ ~ 卅	强阳性率/%	- ~ +	+ ~ 卅	强阳性率/%
正常	-	2	13	86.7	1	14	93.3
模型	-	11	4	26.6 ¹⁾	13	2	13.3 ¹⁾
参苓白术颗粒	3.212	4	11	73.3 ³⁾	4	11	73.3 ⁴⁾
	1.606	7	8	53.3	6	9	60.0 ³⁾
	0.803	10	5	33.3	9	6	40.0 ³⁾
匹维溴铵	0.012 5	3	12	80.0 ³⁾	2	13	86.6 ⁴⁾

为动态的通透性屏障,既能阻止潜在的有害物质或病原体进入机体,又能允许营养物质、离子和水进入体内。同时肠上皮细胞是高度极化的上皮细胞,以紧密连接为界分为基底膜和顶侧两部分,维护肠黏膜的硬度和不可通透性。因此各种原因导致肠道黏膜上皮紧密连接的破坏在消化系统乃至全身疾病中占有重要地位。DAO 是一种具有高度活性的细胞内酶,存在于肠黏膜上层绒毛细胞胞浆中,当肠黏膜细胞受损后 DAO 进入肠淋巴管和血流,导致血浆 DAO 活性增高,DAO 可以检测肠黏膜通透性的变化,反映肠黏膜屏障障碍^[11]。解基良等^[12]发现双歧杆菌可以显著降低血浆中 DAO 活性,降低黏膜通透性,从而对肠道其保护作用。解基良等发现腹膜炎模型组肠组织 DAO 活性下降,血中 DAO 活性上升,承气方可以降低血中 DAO 活性,升高肠组织中 DAO 活性,维持肠黏膜层、基底膜纤维结构于正常。

笔者成功复制了功能性腹泻大鼠脾虚证模型,同时发现功能性腹泻模型大鼠存在肠黏膜机械屏障的变化,表现为血清中 DAO 活性增加,肠道通透性增大,结肠黏膜紧密连接蛋白 ZO-1, Occludin 的 mRNA 和蛋白表达均下降, Claudin-1 mRNA 表达下降,尤其在单纯高乳糖饲料喂养和高乳糖 + 小平板站立的对比中,无论从一般状态还是从 DAO, TNF-α 的水平, ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA 的表达上看,高乳糖 + 小平板站立组更加严重的损伤了肠黏膜,与单纯高乳糖组有明显差异。参苓白术颗粒能通过上调 ZO-1, Occludin, Claudin-1 的 mRNA 表达,上调 ZO-1, Occludin 的蛋白表达以增强功能性腹泻模型大鼠结肠黏膜机械屏障作用,从而改善症状。同时笔者发现功能性腹泻大鼠结肠黏膜 TNF-α 含量增加,参苓白术颗粒中高剂量组能降低其含量。TNF-α 是由 TH1 细胞分泌的具有广谱生理和病理学效应的细胞因子,已被证实是炎症性肠病时引起

肠黏膜屏障功能损伤的重要启动因子, TNF-α 能下调肠上皮紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-1 和 ZO-1 表达,增加肠上皮细胞通透性,通过改变紧密连接的结构和功能而导致肠黏膜上皮屏障受损^[13-14]。因此这可能是功能性腹泻大鼠肠黏膜机械屏障损伤的机制之一,但其反应过程、量效关系以及参苓白术颗粒是否通过影响 TNF-α 浓度而影响紧密连接蛋白的表达则需进一步实验验证。

《黄帝内经》曰:“正气存内,邪不可干”。正气是人体对一切内外致病因素的抵抗与修复能力,正气包括先天元气和后天营卫之气。营主要指的是水谷之精气,它有营养人体的作用,《素问》有“营者水谷之精气也”。营气赖脾而生,脾胃是人体气血生化之源,脾运化水谷精微,产生维持生命活动的物质基础,维持着五脏、六腑、四肢百骸和皮毛筋骨等脏腑组织器官生理功能。《灵枢·痹论》说:“营者,水谷之精气也,和调于五脏,洒陈于六腑,乃能入于脉也,故循脉上下,贯五脏,络六腑也”。而卫气主要是水谷中的悍气,主要作用是抵御外邪。营只有在卫的防御保护下才能执行其正常的功能,同时卫需要得到营不断的补充,才能产生抵御邪气的能力,《素问》:“阴在内阳之守也,阳在外阴之使也”。无论是正气的产生还是卫气的防御功能都离不开脾之建运,正所谓“内伤脾胃,百病由生”。脾的抵御能力是脾主运化、主统血、主四肢肌肉、主升清能力的总称。脾的功能包含了消化、内分泌、神经、血液等多个系统的功能,脾失健运包括了消化吸收、细胞膜结构和功能的异常、物质能量代谢、信号转导途径、以及免疫、神经内分泌等的异常。姚永莉等^[15]发现透射电镜下脾虚大鼠胃黏膜上皮细胞脱落坏死,腺体萎缩,肠黏膜微绒毛排列稀疏紊乱,健脾治疗后则可逆转上述改变,改善大鼠消化吸收功能。刘玉晖等^[16]发现参苓白术散低、中、高剂量组均可以使炎

症性肠病小鼠结肠黏膜 Claudin 蛋白表达量升高, Occluding, Claudin, ZO-1 和 JAM mRNA 表达增加。

参苓白术颗粒能够上调功能性腹泻大鼠结肠紧密连接蛋白表达从而改善大鼠肠道屏障功能, 提高大鼠消化吸收能力, 改善脾虚症候。《灵枢·师传》: “脾者主为卫, 使之迎粮, 视唇好恶, 以知吉凶”。从脾论治对肠道屏障保护作用是脾的防御功能在肠道的体现, 是脾之卫功能的延伸拓展。

[参考文献]

[1] 孙菁, 袁耀宗. 功能性胃肠病罗马Ⅲ标准解读: 功能性肠病[J]. 临床消化病杂志, 2006, 18(5): 264-265.

[2] 李晶, 王垂杰, 李玉锋, 等. 功能性腹泻脾虚证与肠黏膜屏障关系探讨[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 23(4): 299-301.

[3] 郭荣春, 王娟. 李培教授运用七味白术散治疗功能性腹泻经验[J]. 云南中医药杂志, 2014, 35(1): 3-4.

[4] 张博, 窦逾常, 王垂杰. 四君子汤对脾虚大鼠肠黏膜蛋白表达及 TFF3 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(5): 715-717.

[5] 薛晓倩, 黄学宽, 高宁. 藿香正气液对湿阻证大鼠回肠黏膜 ZO-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 224-227.

[6] 白世敬, 李峰, 唐旭东. 功能性腹泻脾虚证动物模型制作方法[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(1): 86-88.

[7] Nieto N, Mesa M D, Lopez-Pedrosa J M, et al. Contribution of polyunsaturated fatty acids to intestinal repair in protein-energy malnutrition[J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(6): 1485-1496.

[8] 孔武明, 李光, 龚均. 紧密连接蛋白 claudin-1 在肠易激综合征患者肠黏膜中的表达及意义[J]. 山东医药, 2008, 48(2): 27-29.

[9] Piche T, Barbara G, Aubert P, et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators[J]. Gut, 2009, 58(6): 196-201.

[10] 刘新光. 解读功能性肠病罗马Ⅲ诊断标准[J]. 中国实用内科杂志, 2006, 26(21): 1691-1693.

[11] 谢凯元, 吕小萍. 口服酪酸梭菌活菌片对肝硬化患者肠道通透性的影响[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(11): 1314-1315.

[12] 解基良, 张志尧, 吴咸中. 承气方剂对肠屏障功能保护作用的实验研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2002, 8(3): 189-191.

[13] Inagaki-Ohara K, Dewi F N, Hisaeda H, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes sustain the epithelial barrier function against Eimeria vermiformis infection [J]. Infect Immun, 2006, 74(9): 5292-5301.

[14] Gunzel D, Florian P, Richter J F, et al. Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 290(6): 1496-1507.

[15] 姚永莉, 宋于刚, 赵彤, 等. 大鼠脾虚模型胃肠黏膜形态学研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 2000, 8(1): 8-10.

[16] 刘玉晖, 胡婕, 易文凤, 等. 参苓白术散治疗炎症性肠病与肠上皮细胞紧密连接的关系探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 130-133.

[责任编辑 周冰冰]