

附子理中汤对腹泻型肠易激大鼠模型结肠组织中 TLR4 mRNA 表达水平的影响

武志娟, 张志敏*, 张大鹏, 谢文娟

(广州医学院第一附属医院, 广州 510120)

[摘要] 目的: 观察附子理中汤对腹泻型肠易激(D-IBS)大鼠模型结肠组织中 toll 样受体 4(TLR4)表达水平的影响。方法: 健康 SPF 级大鼠 50 只随机分为正常组、模型组、匹维溴铵组、附子理中汤高、低剂量组, 用束缚应激加大黄 ig 方法联合复制 D-IBS 大鼠模型, 造模成功后附子理中汤高、低剂量组($30, 15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、匹维溴铵($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)ig 给药, 1 次/d, 连续 14 d。采用荧光定量 PCR 方法观察该模型大鼠结肠黏膜 TLR4 mRNA 的表达情况。结果: 模型组大鼠肠黏膜的 TLR4 的表达(1.229 ± 0.172)高于正常对照组(1.109 ± 0.062)($P < 0.01$)。而附子理中汤的干预可使大鼠肠黏膜的 TLR4 的表达趋于正常, 与正常组无明显差异。附子理中汤高(1.068 ± 0.056), 低(1.067 ± 0.071)剂量组之间没有显著差异, 匹维溴铵组(1.205 ± 0.290)与正常组相比 TLR4 的表达增多($P < 0.01$)。结论: 附子理中汤可能通过增强整体机体耐受性, 降低 TLR4 的表达, 减少免疫应答, 来维持肠道的稳态。

[关键词] 附子理中汤; 腹泻型; 肠易激综合征

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0218-04

[doi] 10.11653/syfy2013150218

Expression of TLR4 mRNA in Colon Tissue of Rat Diarrhea Type Irritable Bowel Model by Fuzi Lizhong Decoction

WU Zhi-juan, ZHANG Zhi-min*, ZHANG Da-peng, XIE Wen-juan

(First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the toll like receptor (TLR) 4 mRNA expression decoction on rat diarrhea type irritable bowel syndrome (D-IBS) colon tissue model by Fuzi Lizhong (FZLZ) decoction. **Method:** SPF 50 rats were randomly divided into normal group, model group, FZLZ high and low dose group ($30, 15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), pinaverium bromide group ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). IBS rat model was made by restraint stress combined with ig rhubarb. After modeling, corresponding drugs were given at the dose, once a day for 14 days. TLR4 mRNA expression was observed through PCR method. **Result:** The expression of TLR4 in the model group (1.229 ± 0.172) was higher than that in the control group (1.109 ± 0.062) ($P < 0.01$). While the expression of TLR4 in the FZLZ decoction was similar to normal groups, there was no significant difference between the high (1.068 ± 0.056) and low (1.067 ± 0.071) dose group, pinaverium bromide group (1.205 ± 0.290) compared with the normal group TLR4 expression increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** FZLZ decoction may maintain intestinal homeostasis by enhancing the whole body tolerance, and decreaseing the expression of TLR4 and immune response.

[Key words] Fuzi Lizhong decoction; diarrhea type; irritable bowel syndrome

[收稿日期] 20121103(014)

[基金项目] 广东省中医药局资助项目(20111261)

[第一作者] 武志娟, 博士研究生, 从事中医药防治脾胃病的研究, Tel:13570381362, E-mail:westengirl@163.com

[通讯作者] * 张志敏, 主任医师, 硕士导师, 从事中医药防治脾胃病、肺病的研究

随着黏膜免疫系统的深入研究,有学者认为肠易激综合征(irritable bowel syndrome IBS)患者的发病与免疫有关,Toll样受体(toll like receptor, TLR)4介导的信号转导通路参与了肠道免疫的发生发展。TLR4是天然免疫系统中的跨膜受体,可非特异型地与病原相关分子结合,启动信号转导,最终导致核因子 $2\kappa\text{B}$ (nuclear factor $2\kappa\text{B}$, NF $2\kappa\text{B}$)激活,引发肠道炎症介质的释放^[1]。当有细菌入侵时,结肠黏膜上皮细胞迅速识别并诱导 TLR4 的产生,对肠上皮损伤的修复发挥一定的作用。

临床中,笔者应用附子理中汤加减治疗腹泻型 IBS(D-IBS)患者,发现在改善患者症状及增强免疫功能方面取得良好的效果。因此笔者用束缚应激加大黄 ig 方法联合复制 D-IBS 大鼠模型,采用荧光定量 PCR 方法观察该模型大鼠结肠黏膜 TLR4 mRNA 的表达情况,以探讨肠道免疫调控机制在 IBS 发病中的作用及附子理中汤方对肠道免疫的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级大鼠 50 只,雌雄各半,体重约 180~200 g,由南方医科大学实验动物中心提供(批号 4402100206)。

1.2 药品 生大黄(*Rheum officinale* Baill, 产地甘肃)2 kg 以开水浸泡 2 h,将浸出液过滤后经低温旋蒸浓缩成 200% 的溶液,含生药 $2.0\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,过滤备用。附子理中汤方,方由党参 10 g,白术 10 g,干姜 3 g,淡附片 6 g,炙甘草 3 g 组成(广东一方药业有限公司制备颗粒剂,批号 1104072)。用生理盐水搅拌均匀后成质量浓度为 $1.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (高剂量), $0.75\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (低剂量)的药液,备用。匹维溴铵片(法国苏威制药,批号 20110621)。

1.3 试剂及仪器 TRIZOL(Invitrogen 公司,批号 24404),4 种脱氧核糖核酸(dNTPs)和逆转录酶(Oligo DT)(德国 QIAGEN 公司,批号 BK3802), $5\times$ 定量 PCR buffer 和 Taq DNA 聚合酶(美国 ABI 公司,批号 BK1508),全自动 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),GDS7600 DF-23B 凝胶扫描系统(英国 UVP 公司),3900 台式高通量 DNA 合成仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 造模与给药 大鼠随机分为正常对照组、模型组、匹维溴铵组、附子理中汤低剂量组、附子理中汤高剂量组,每组 10 只。造模方法采用束缚应激加大黄泻下法复制腹泻型大鼠模型^[2]。取清洁健康 SPF 大鼠,造模前禁食不禁水 24 h,随机选取 10 只大鼠作为正常对照组,雌雄各半,全程只予以生理盐水 ig

(剂量亦按 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),不施加任何干预措施。其余各组大鼠分别予以 200% 生大黄溶液 ig(按 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),每日 1 次。各组造模均持续 2 周。期间模型组编号为 4 的大鼠死亡。2 周后在 ig 完生大黄溶液 1 h 后用宽透明胶带束缚大鼠的肩部、前肢及胸部,限制大鼠用前肢搔抓头面部,但不限制其活动,束缚时间为 1 h。之后分别按组给药,方法如下。正常组:每日只予以生理盐水 ig(按 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$);模型组予以生理盐水 ig(按 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$);附子理中汤高剂量组($30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ig $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$);附子理中汤低剂量组 $15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $0.75\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ig $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$);匹维溴铵($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组:予以匹维溴铵($1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ig(按 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

2.2 标本处理 末次给药 24 h 后将大鼠断头处死,于距肛门 3 cm 的结肠处,取一段长约 1 cm 标本。用生理盐水洗净内容物,后放入中性甲醛固定,固定 24 h。将标本放入自动脱水机中自动脱水,石蜡包埋,连续切片,备用。

2.3 引物设计合成 GenBank 上查找目的基因 mRNA 序列,在 CDS 区设计特异性引物,采用 Primer express 2.0 软件,各指标序列如下。TLR4: Sense primer: 5'-GATTGCTCAGACATGGCAGTTTC-3'; Anti-sense primer: 5'-CTGCTAAGAAGCGGATACAATTTC-3'; Product Size: 117 bp。GAPDH: Sense primer: 5'-CTCCCATTCCTCCACCTTTG-3'; Antisense primer: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'; Product Size: 110 bp。

2.4 总 RNA 提取 ①将组织研磨成匀浆,加入 Trizol 充分振荡混匀,加入氯仿 0.2 mL,盖紧盖子,用力摇动 15 s, $15\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2~3 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液至新的 1.5 mL Eppendorf 管。②加与上清液等体积的异丙醇, $15\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育样品 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清液。③75% 乙醇(含 DEPC 水)洗涤沉淀 1 次, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃乙醇。④空气或真空干燥 5~10 min(不要完全干燥),加 DEPC 处理水溶解 RNA, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。若长期保存,加入 2.5 倍体积乙醇,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.5 逆转录反应 ①取 4 μL RNA 模板做逆转录反应,仪器为 ABI 9700 仪,反应体系如下: $5\times$ 逆转录 buffer 4 μL , 下游引物($10\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , dNTPs($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , MMLV($200\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , DEPC 水 10.1 μL , RNA 模板 4 μL , 总体积: 20 μL 。逆转录 buffer 成分: $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl ($\text{pH } 8.0$), $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 ,

10 mmol·L⁻¹ DTT。②反应条件 37 ℃ 1 h, 然后 95 ℃ 3 min。

2.6 PCR 反应 待测样本和阳性标准品按以下反应体系进行: 5 × SYBR Green I PCR buffer 10 μL, 上游引物 F (10 μmol·L⁻¹) 1 μL, 下游引物 R (10 μmol·L⁻¹) 1 μL, dNTPs (10 mmol·L⁻¹) 1 μL, Taq 酶 (3 U·μL⁻¹) 1 μL, cDNA 5 μL, ddH₂O 31 μL, 总体积: 50 μL。PCR buffer 成分: 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol·L⁻¹ KCl, 2 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 反应条件: 93 ℃ 3 min, 然后 93 ℃ 30 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 共 40 循环, 在 ABI 7500 全自动荧光定量 PCR 仪完成。反应结束后, 由电脑自动分析并计算结果。结果按表格中 Quantity 列下的数值 (即拷贝数) 分析, 用 B 表示, 即 B = 拷贝数/μL cDNA。考虑到各个样本总 RNA 浓度的差异, 最终计算结果按下列公式换算:

$$A = B_1 (\text{目的基因}) / B_2 (\text{内参基因})$$

A 值为统计时最终需要的数值

2.7 统计学方法 采用 SPSS 11.0 软件包进行数据处理, 所有数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用两因素析因设计的方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般状态及腹泻率、腹泻指数的影响 模型组于造模期出现贴边畏怯、活动及饮食减少, 排便明显增多, 毛发晦暗, 精神萎靡, 肛门口粪便污染, 甚至脱肛。模型组在造模 24 h 内, 均排出含水分较多的湿软便, 48 h 以内腹泻率达到 100%, 排出淡黄色稀便, 并持续至造模结束。空白对照组大鼠精神、活动良好、毛色光滑, 肛门口清洁, 大便正常, 成干燥颗粒状, 腹泻率为 0。与正常组大鼠体重增长率呈直线上升相比, 模型组体重增长缓慢 (见表 1)。与正常组相比, 模型组腹泻率与腹泻指数均显著增加 (见表 2)。

表 1 造模前后大鼠体重比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) g

组别	造模前体重	造模后体重
正常	222.8 ± 18.3	294.3 ± 54.5
模型	223.8 ± 26.0	263.1 ± 38.4 ¹⁾

注: 与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 腹泻率及腹泻指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

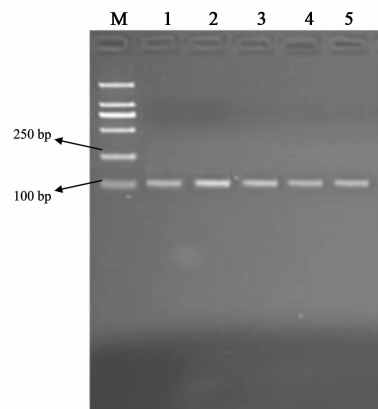
组别	腹泻率/%	腹泻指数
正常	0	0
模型	100	1.29 ± 0.05 ¹⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 大鼠结肠黏膜病理 正常组与模型组两组大

鼠结肠 HE 染色均未见异常病理改变。两组大鼠结肠结构完整, 未见糜烂、溃疡形成及肠道肿瘤等明显异常。黏膜层上皮细胞呈单层柱状, 固有层内见大量由上皮下陷而成的大肠腺, 呈长单管状, 固有层可见黏膜肌层, 黏膜下层疏松, 其外为肌层, 肌层为内环、外纵两层平滑肌组成, 内环肌较规则, 外纵行肌局部增厚形成结肠带。

3.3 对 D-IBS 模型大鼠结肠黏膜 mRNA 表达水平的影响 模型组大鼠肠黏膜的 TLR4 的表达高于正常对照组, 有统计学差异 ($P < 0.01$)。而附子理中汤干预可使大鼠肠黏膜的 TLR4 的表达趋于正常, 与正常组无明显差异。附子理中汤高、低剂量组之间没有显著差异, 匹维溴铵组与正常组相比 TLR4 的表达增多, 有统计学差异 ($P < 0.01$)。见表 3, 图 1。



M. maker; 1. 正常组; 2. 模型组; 3. 匹维溴铵 30 mg·kg⁻¹ 组; 4. 附子理中 30 g·kg⁻¹ 组; 5. 附子理中 15 g·kg⁻¹ 组

图 1 各组大鼠结肠黏膜 TLR4 mRNA 表达

表 3 大鼠结肠黏膜 TLR4 mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TLR4
正常	-	10	1.109 ± 0.062
模型	-	9	1.229 ± 0.172 ¹⁾
匹维溴铵	0.03	10	1.205 ± 0.290 ¹⁾
附子理中汤	15	10	1.067 ± 0.071 ²⁾
	30	10	1.068 ± 0.056 ²⁾

注: 与正常组相比¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

TLRs 是模式识别受体家族成员, 因其胞外段与一种果蝇蛋白 Toll 同源而得名。是新近发现的先天免疫系统中的细胞跨膜受体及模式识别受体之一, 在炎症反应、细胞信号转导及细胞凋亡中起重要作用。在人体免疫系统中, 不同吞噬细胞如嗜中性粒细胞和树突细胞等通过来自 TLR 的信号而辨别出

病原体及“自己”^[3]。TLRs 是启动天然免疫防御反应的关键因素,并且因为 TLRs 信号可以促使树突状细胞成熟,从而参与特异性免疫应答的启动,将天然免疫和特异性免疫联系起来。

黏膜免疫系统的第一道防线-肠黏膜上皮,不但能区分和识别致病菌和共生菌,而且能启动适当的免疫应答。在机体正常情况下,肠黏膜上皮细胞(IEC)对肠道共生菌耐受状态,维持肠道内环境的稳定。有关实验已证实肠黏膜上皮针对肠腔细菌呈“耐受”或“非耐受”状态,主要依赖于 Toll 样受体(TLRs)介导的信号转导通路。正常人体的肠道黏膜上皮细胞(IEC)仅在基底侧面表达少量的 TLR3 和 TLR5,肠腔面表达少量的 TLR2 和 TLR4^[4-5]。Hornef 等^[6]发现 TLR4 还可表达于 IEC 胞质的高尔基体附近。而在固有层的巨噬细胞和树突状细胞的表面也只表达了微量的 TLRs^[7]。这些研究均提示低表达的 TLRs 可降低共生菌群与 TLRs 的接触概率,维持肠道稳态。

国内有学者^[8]通过对 Rome III 诊断为 IBS 患者及健康对照组进行研究时发现,感染在 IBS 腹泻型患者发病中发挥了重要作用,且 IBS 腹泻型患者肠黏膜 TLR2 及 TLR4 的表达均高于健康对照组。推测 TLR 在 IBS 的发病中有可能起一定的作用,肠黏膜受到细菌毒素的攻击,引发传导炎症信号,造成肠黏膜炎性反应。尚需要进一步的研究证实。

本实验研究的结果显示模型组大鼠肠黏膜的 TLR4 的表达高于正常对照组,这证实了在肠道应激期肠黏膜启动了免疫应答。而通过附子理中汤的干预后,不论高、低剂量组均可使大鼠肠黏膜的 TLR4 的表达趋于正常,与模型组相比有显著差异,而匹维溴铵组与模型组相比没有显著差异。附子理中汤中干姜有温中祛寒、扶阳抑阴的作用;人参补中益气、培补后天之本,使气旺而阳复;炒白术有燥湿健脾、健运中州之功效;甘草补脾益气,调和诸药;附子温中散寒;可用于脾胃阳虚之重证,或脾肾阳虚者。脾肾乃人的先后天之本,故全方有扶正固本,培补元气之功。刘渡舟先生认为,“理中汤根本是治中焦下利,现在方中加个附子,就是中焦下利也治,下焦下利也治”。有学者^[9]用附子理中汤在干预脾阳虚的

能量物质代谢实验中也进一步证实了其“温阳健脾”的功效内涵。

因此本实验推测附子理中汤的药物组成可能通过温阳健脾的功效增强整体机体耐受性,降低 TLR4 的表达,减少免疫应答,来维持肠道的稳态。其具体机制还须进一步的研究来论证。

[参考文献]

- [1] 陈胜,邹开芳,杨天. Toll 样受体 2、4、9 在大鼠结肠炎模型结肠组织中的表达及意义[J]. 胃肠病学, 2007, 12(6):339.
- [2] 徐海珍,谢建群,吴大正,等. 温中健脾方对腹泻型肠易激综合征大鼠下丘脑及结肠黏膜 5-HT 表达的影响[J]. 上海中医药大学学报,2009,23(3):29.
- [3] 杨翠萍,杨晓金,田真真,等. 槐定碱对急性肺损伤小鼠肺组织 SOD,MDA 及 TLR4 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):180.
- [4] Hou L, Sasaki H, Stashenko P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection[J]. Infect Immun, 2000, 68(8):4681.
- [5] Maria T Abreu, Puja Vora, Emmanuelle Faure, et al. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide[J]. J Exp Med, 2001, 167(3):1609.
- [6] Hornef M W, Frisan T, Vandewalle A, et al. Toll-like receptor 4 resides in the golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells[J]. J Exp Med, 2002,195(5):559.
- [7] Hausmann M, S Kiessling, S Mestermann, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation[J]. Gastroenterology, 2002, 122(7):1987.
- [8] 王雪梅,刘玉兰. 肠易激综合征腹泻型患者结肠黏膜 Toll 样受体 2 和 4 的表达[J]. 中华消化杂志, 2009, 29(2):105.
- [9] 唐汉庆. 附子理中汤对脾阳虚证大鼠血糖、甘油三酯及总胆固醇的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):230.

[责任编辑 聂淑琴]