

肠激安方对 IBS-D 大鼠肠道通透性的影响

石玉莹¹, 唐洪梅^{2*}, 吴映秀¹, 祝赫¹, 何国栋¹, 熊芬², 张毅靖¹

(1. 广州中医药大学 岭南医学研究中心, 广州 510405;

2. 广州中医药大学 第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] **目的:**观察肠激安方对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)大鼠肠道通透性的影响,探讨肠激安方治疗 IBS-D 的作用机制。**方法:**SD 雄性乳鼠,随机分为 5 组,分别为正常组,模型组,匹维溴铵组(0.018 g·kg⁻¹),肠激安高、低剂量组(33.48, 16.74 g·kg⁻¹),除正常组外,均采用“母婴分离+醋酸刺激+束缚应激”三因素结合的方法建立 IBS-D 模型。给药后,采用透射电镜观察大鼠肠黏膜超微结构;酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测大鼠血浆 D-乳酸水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠结肠紧密连接蛋白闭锁蛋白(Occludin),闭合蛋白-1(Claudin-1)的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 Occludin, Claudin-1, 紧密连接蛋白-1(ZO-1) mRNA 表达。**结果:**与正常组比较,IBS-D 模型组大鼠肠黏膜上皮细胞损伤,微绒毛排列较稀疏,紧密连接间隙增宽,有的不甚明显;血浆 D-乳酸水平明显升高($P < 0.05$),结肠中 Occludin, Claudin-1 mRNA 及蛋白表达降低($P < 0.05$),ZO-1 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。药物治疗后,与模型组比较,各给药组大鼠肠黏膜细胞损伤修复;匹维溴铵组、肠激安方高剂量组血浆 D-乳酸水平明显降低($P < 0.05$),肠激安方低剂量组血浆 D-乳酸水平有降低趋势,但不具有统计学差异。各给药组大鼠结肠中 Occludin, Claudin-1 mRNA 及蛋白表达水平,ZO-1 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$)。**结论:**肠激安方对 IBS-D 的治疗作用可能是改善肠道通透性实现的。

[关键词] 肠激安方; 腹泻型肠易激综合征(IBS-D); 肠道通透性; 紧密连接蛋白; 四君子汤; 痛泻要方

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0080-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190905

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190117.1416.023.html>

[网络出版时间] 2019-01-18 16:35

Effect of Changji'an Prescription on Intestinal Permeability of IBS-D Rats

SHI Yu-ying¹, TANG Hong-mei^{2*}, WU Ying-xiu¹, ZHU He¹, HE Guo-dong¹, XIONG Fen², ZHANG Yi-jing¹

(1. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Changji'an prescription on intestinal permeability in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) rats and explore its mechanism for treatment of IBS-D. **Method:** Male SD neonatal rats were randomly divided into five groups: normal group, model group, pinaverium bromide group (0.018 g·kg⁻¹), high-dose (33.48 g·kg⁻¹) and low-dose (16.74 g·kg⁻¹) Changji'an prescription groups. Except for the normal group, the IBS-D model was established by the combination of maternal and infant separation + acetic acid stimulation + restraint stress. After drug treatment, the ultrastructure of rat intestinal mucosa was observed by using transmission electron microscopy and the plasma D-lactate level was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of tight junction proteins Occludin and Claudin-1 were detected by Western blot. The mRNA expression levels of Occludin, Claudin-1 and zonula occluden (ZO) -1 were detected by real time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** As

[收稿日期] 20180926(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673842);广东省自然科学基金项目(2014A030313404)

[第一作者] 石玉莹,在读硕士,从事中药新药开发与安全性评价研究,E-mail:389669268@qq.com

[通信作者] *唐洪梅,博士,教授,主任中药师,从事中药新药开发与安全性评价研究,Tel:020-86358342, E-mail:tanghongmei2000@163.com

compared with the normal group, the intestinal mucosal epithelial cells were damaged in IBS-D model group, and the microvilli arrangement was sparse and tight junction was widened, and some were not obvious, and the plasma *D*-lactate level in IBS-D rats was increased significantly ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expression levels of Occludin and Claudin-1 in the colon were decreased and the mRNA expression of ZO-1 was also decreased ($P < 0.05$). After drug treatment, as compared with the model group, all drug-administered groups can repair intestinal mucosal cell damage. Plasma *D*-lactate level in pinaverium bromide group and high-dose Changji'an prescription group was significantly decreased ($P < 0.05$) while *D*-lactate level in the low-dose group Changji'an prescription group had a tendency to decrease with no statistical difference. The mRNA and protein expression levels of Occludin and Claudin-1 and the mRNA expression of ZO-1 in the colon of rats in each administration group were higher than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The therapeutic effect of Changji'an prescription on IBS-D may be achieved by improving the intestinal permeability.

[**Key words**] Changji'an prescription; diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D); intestinal permeability; tight junction protein; Sijunzi Tang; Tongxie Yaofang

腹泻型肠易激综合症 (IBS-D) 是一种以反复发作的腹痛、腹胀、腹泻为主要症状的胃肠道紊乱性肠病,“肝郁脾虚泄泻”是其主要的中医证型之一^[1]。IBS-D 的发病机制复杂,至今尚不明确,可能与胃肠动力异常、内脏高敏、“脑-肠”轴及脑肠肽异常、黏膜屏障异常及饮食、精神因素有关^[2],内脏高敏感性是其主要生理病理学基础。近年有研究表明,其发病机制与肠道通透性升高,免疫机制的异常密切相关^[3]。

肠道黏膜屏障功能受到上皮细胞间紧密连接 (TJs) 的调节,其中闭锁蛋白 (Occludin), 闭合蛋白 (Claudin-1), 紧密连接蛋白-1 (ZO-1) 是组成肠道屏障结构很关键的紧密连接蛋白,其表达的变化可能引起肠上皮屏障通透性的增高^[4-5]。肠道通透性增加是 IBS-D 内脏高敏感性发生的关键因素^[6],但是具体作用机制未明。肠激安方由四君子汤、痛泻要方加减化裁而来,具有疏肝健脾,止痛止泻之功效,为广州中医药大学第一附属医院名老中医长期用于治疗 IBS-D 的临床验方,疗效确切。课题组前期研究发现,肠激安方能够有效调节 IBS-D 模型大鼠的胃肠激素、免疫细胞及器官等功能^[7-8],能有效地改善 IBS-D 大鼠内脏高敏,但其调节调节肠道通透性的作用机制仍不明确。因此,深入研究肠激安方对肠道通透性的影响,有利于进一步揭示肠激安方治疗 IBS-D 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级新生 SD 大鼠窝鼠,购于广州中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK (粤) 2013-0034,实验动物伦理号 TCMF1-2017009。全部动物在广州中医药大学第一附属

医院实验动物中心 SPF 级动物实验室饲养 [SYXK (粤) 2013-0092]。乳鼠与母鼠同窝饲养,昼夜节律 12:12,饲养温度 (22 ± 3) °C,湿度 55% ~ 75%,自由进食进水。

1.2 药物与试剂 肠激安方 (组方:土炒白术、白芍、茯苓、黄芪、枳壳、陈皮等 13 味中药) 药材购自康美药业股份有限公司,由广州中医药大学第一附属医院药检室何嘉仑主管中药师鉴定为正品,其煎剂由煎药室煎煮成生药质量浓度为 $1.67 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液。匹维溴铵 (法国 Abbott Healthcare SAS 公司,批号 640099),用蒸馏水配置成质量浓度为 $1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液。*D*-乳酸定量分析酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (武汉华联科生物技术有限公司,批号 RA20770);Occludin 抗体 (美国 Abcam 公司,批号 ab167161);Claudin-1 抗体 (美国 CST 公司,批号 #4933);甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Proteintech 公司,批号 10494-1-AP);预染蛋白 marker (美国 Thermo 公司,批号 26617);ECL 化学发光底物 (美国 Millipore 公司,批号 WBKLS0500);RNA 提取试剂盒,逆转录试剂盒,SYBR 染料 (日本 TaKaRa 公司,货号分别为 9767,RR036A,RR820A);RIPA 裂解液 (强),BCA 蛋白浓度测定试剂盒,苯甲基磺酰氟 (PMSF),一抗稀释液,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G(H + L) (碧云天生物技术研究,批号分别 P0013B,P0010,ST506,P0256,A0208)。

1.3 仪器 1510 型多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司);5804R 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司);ChemiDoc MP 型全能型凝胶成像系统,165-8001 型垂直板电泳槽,CFX96 型实时荧光定量聚合酶链式

反应 (Real-time PCR) 仪, T100 型逆转录仪 (美国 Bio-Rad 公司); H-7500 型透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); TS-2 型水平摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 IBS-D 模型的制备 根据预实验摸索的条件, 在参考文献[9]的基础上, 采用三因素 (母婴分离、乙酸刺激、束缚应激) 结合的方法进行 IBS-D 大鼠模型的建立。筛选 1 日龄的雄性乳鼠, 从出生第 2 天开始到第 14 天, 每天母婴分离 3 h, 从第 8 天到第 21 天, 进行乙酸刺激及束缚应激。第 8~14 天, 将润滑后的输液导管经肛门插入 2 cm, 注入 0.5% 的乙酸 0.2~0.5 mL, 每隔 2 d 增加 0.1 mL, 增加至 0.5 mL 后保持不变, 乙酸结束后用扎带束缚大鼠的前肢 1 h; 第 15~21 天, 将乙酸浓度增加为 0.75%, 其余操作同第 8~14 天。从第 29 天开始正常饲养 2 周。

2.2 动物分组与给药方法 造模成功后, 将模型大鼠随机分成模型组、匹维溴铵组、肠激安方高剂量组、肠激安方低剂量组, 每组 10 只。另设正常组 10 只。各给药组按 10 mL·kg⁻¹ 灌胃给药, 给药剂量为匹维溴铵组 (临床等效剂量, 0.018 g·kg⁻¹), 肠激安方高剂量组 (临床等效剂量 2 倍, 33.48 g·kg⁻¹), 肠激安方低剂量组 (临床等效剂量, 16.74 g·kg⁻¹)。正常组和模型组同法给予等体积生理盐水, 给药 14 d。

2.3 指标检测

2.3.1 大鼠内脏敏感性及其粪便含水量测定 内脏敏感性测定: 给药结束后, 参照文献[10]用腹部回缩反射 (AWR) 方法进行内脏敏感性的测定。将 6F 双腔导尿管一端插入 1.0 mL 注满水的注射器, 涂抹润滑油后, 小心插入大鼠肛门 6 cm, 用胶布固定大鼠尾根部及导管, 放入自制的玻璃盒中, 待大鼠适应环境安静后, 逐渐用注水的注射器往导管注水扩张肠道, 大鼠出现腹背部肌肉强烈收缩并把腹部抬高桌面 (3 分) 时, 记录注水量 (mL) 为感觉阈值, 重复 3 次, 每次间隔 5 min。粪便含水量测定: 给药结束后, 收集大鼠 4 h 内的粪便, 称湿重, 用烘箱 75 °C 烘干 4 h, 再称干重, 计算出粪便含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

2.3.2 电镜扫描观察大鼠肠黏膜超微结构 取结肠组织 1 mm³ 块置于 2.5% 戊二醛室温固定 1 h 后, 4 °C 保存。1% 锇酸处理, 用 0.1 mol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗, 再用丙酮逐级处理脱水, Epon812 环氧树脂包埋, 修块机修块定位, 超薄片机

切片, 乙酸油、硝酸铝双重染色, 透射电镜观察肠黏膜上皮细胞的超微结构变化。

2.3.3 ELISA 检测大鼠血浆 D-乳酸水平 测定血浆 D-乳酸含量步骤严格按试剂盒说明书的要求进行。

2.3.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠结肠 Occludin, Claudin-1 蛋白的表达 取冻存结肠组织 40 mg, 加入蛋白裂解液制备蛋白样品, BCA 法测蛋白浓度。取总蛋白 40 μg 70 °C 加热 10 min 后上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿转至 PVDF 膜, 5% TBST 脱脂奶粉封闭, 室温振荡 1 h, 加入 Occludin (1:2 万), Claudin-1 (1:1 000), GAPDH (1:5 000) 一抗 4 °C 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000), 室温孵育 1 h, 滴加 ECL 化学发光液, 曝光, 拍照, 采用 Image J 软件对条带进行灰度值分析, 计算相对表达量。

2.3.5 Real-time PCR 测定大鼠结肠 Occludin, Claudin-1, ZO-1 mRNA 的表达 取冻存组织, 称取 20 mg 加入裂解液 600 μL 匀浆处理, 用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。测定浓度之后, 开始逆转录 RNA 为 cDNA。以总 RNA 质量 500 ng 为统一上样量, 计算所需总 RNA 体积, 按照说明书 10 μL 体系加入 dH₂O, 样品, 预混合 Mix, 混匀离心。置于逆转录仪, 进行逆转录 (转录条件为 37 °C, 15 min, 85 °C, 5 s), 得到的 cDNA 保存于 -20 °C 保存。取 cDNA 2 μL 模板, 加入配置好的反应液 (SYBR Premix Ex Taq II 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL, dH₂O 8.5 μL) 进行 PCR 扩增反应, PCR 扩增条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 39 个循环。扩增结果用 C_t 值表示, 通过 2^{-ΔΔC_t} 法计算基因的相对表达量。所有引物序列由上海生工生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
GAPDH	上游 5'-AGACAGCCGCATCTTCTGT-3'	207
	下游 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'	
Occludin	上游 5'-GAGGGTACACAGACCCAGA-3'	161
	下游: 5'-CAGGATTGCGCTGACTATGA-3'	
Claudin-1	上游 5'-GTGTCCACCATGGCATGAA-3'	120
	下游: 5'-GGCCACTAATGTCGCCAGAC-3'	
ZO-1	上游 5'-GTGCACGATCCAAGAAGTGG-3'	124
	下游 5'-CCACTGATCGCCTGTCTGAG-3'	

2.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 进行数据统计和分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若数据符合正态分布,方差齐性,多组数据采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 进行分析,若数据方差不齐,则采 Dunnett's T3 法检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 IBS-D 大鼠内脏敏感性及粪便含水量的影响 与正常组比较,模型组内脏感觉阈值降低 ($P < 0.05$),内脏敏感性升高;粪便含水量明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组内脏感觉阈值升高 ($P < 0.05$),内脏敏感性降低;粪便含水量降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 肠激安方对 IBS-D 大鼠内脏敏感性及其粪便含水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Changji'an prescription on visceral sensitivity and fecal water content in IBS-D rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	感觉阈值/mL	粪便含水量/%
正常	-	0.47 ± 0.04	58.14 ± 3.62
模型	-	0.32 ± 0.08 ¹⁾	72.61 ± 2.30 ¹⁾
匹维溴铵	0.018	0.46 ± 0.07 ²⁾	63.97 ± 1.46 ²⁾
肠激安方	33.48	0.50 ± 0.03 ²⁾	64.54 ± 3.20 ²⁾
	16.74	0.48 ± 0.08 ²⁾	61.72 ± 2.67 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 5 同)。

3.2 对 IBS-D 大鼠肠黏膜超微结构的影响 正常组大鼠肠黏膜上皮细胞形态正常,细胞质内细胞器完好;微绒毛排列紧密整齐,长度一致,紧密连接完整,清晰可见。模型组大鼠上皮细胞损伤,微绒毛排列较稀疏,分布不均,长短不一;紧密连接间隙增宽,有的不甚明显。匹维溴铵组,肠激安高、低剂量组上皮细胞完整,微绒毛排列较整齐,紧密连接完整,较清晰。见图 1。

3.3 对 IBS-D 大鼠血浆 D-乳酸水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血浆 D-乳酸水平升高 ($P < 0.05$),提示肠道通透性升高。与模型组比较,匹维溴铵组及肠激安高剂量组大鼠血浆 D-乳酸水平降低 ($P < 0.05$),肠激安低剂量组大鼠血浆 D-乳酸水平有降低的趋势,但不具有统计学差异。见表 3。

3.4 对 IBS-D 大鼠结肠 Occludin, Claudin-1 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠中 Occludin, Claudin-1 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$)。给药治疗后,与模型组比较,各给药组大鼠结肠中

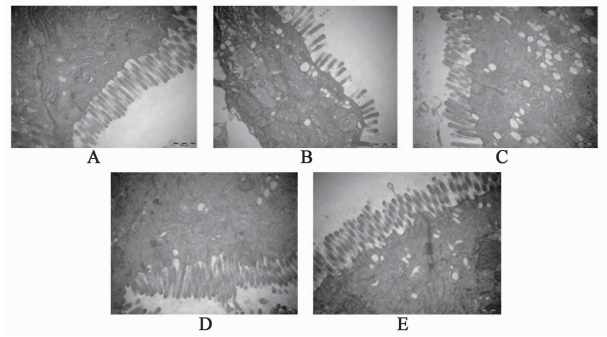


图 1 肠激安方对 IBS-D 大鼠肠黏膜超微结构的影响(电镜扫描, $\times 40000$)

Fig. 1 Effect of Changji'an prescription on ultrastructure of intestinal mucosa in IBS-D rats (SEM, $\times 40000$)

表 3 肠激安方对 IBS-D 大鼠血浆 D-乳酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Changji'an prescription on plasma D-Lactate level in IBS-D rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	D-乳酸/ $\mu g \cdot L^{-1}$
正常	-	311.56 ± 50.62
模型	-	430.67 ± 89.04 ¹⁾
匹维溴铵	0.018	344.79 ± 34.20 ²⁾
肠激安方	33.48	336.00 ± 53.92 ²⁾
	16.74	396.50 ± 34.20

Occludin, Claudin-1 蛋白表达量升高 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 4。

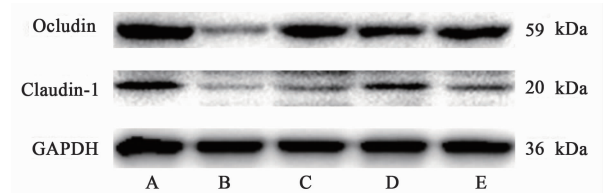


图 2 大鼠结肠 Occludin, Claudin-1 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Occludin and Claudin-1 protein expression in colon of rats

3.5 肠激安方对 IBS-D 大鼠结肠 Occludin, Claudin-1, ZO-1 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠中 Occludin, Claudin-1, ZO-1 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$);给药治疗后,与模型组比较,各给药组大鼠结肠中 Occludin, Claudin-1, ZO-1 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。见表 5。

4 讨论

肠道通透性升高是导致 IBS-D 发生的潜在因素^[11-12]。有研究证明,通透性升高的 IBS-D 病人的

表 4 肠激安方对 IBS-D 大鼠结肠 Occludin, Claudin-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Changji'an prescription on expression of Occludin and Claudin-1 protein in colon of IBS-D rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Occludin/GAPDH	Claudin-1/GAPDH
正常	-	1.35 ± 0.03	1.14 ± 0.07
模型	-	0.58 ± 0.06 ¹⁾	0.65 ± 0.11 ¹⁾
匹维溴铵	0.018	1.00 ± 0.20 ²⁾	0.99 ± 0.01 ²⁾
肠激安方	33.48	0.96 ± 0.08 ²⁾	1.05 ± 0.03 ²⁾
	16.74	1.02 ± 0.13 ²⁾	1.02 ± 0.08 ²⁾

表 5 肠激安方对 IBS-D 大鼠结肠 Occludin, Claudin-1, ZO-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Changji'an prescription on expression of Occludin, Claudin-1 and ZO-1 mRNA in colon of IBS-D rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Occludin	Claudin-1	ZO-1
正常	-	1.1541 ± 0.14	1.0980 ± 0.24	1.1586 ± 0.15
模型	-	0.6783 ± 0.10 ¹⁾	0.5900 ± 0.07 ¹⁾	0.7167 ± 0.12 ¹⁾
匹维溴铵	0.018	0.9865 ± 0.14 ²⁾	0.9917 ± 0.23 ²⁾	1.0300 ± 0.21 ²⁾
肠激安方	33.48	1.1906 ± 0.22 ²⁾	1.1271 ± 0.15 ²⁾	1.0850 ± 0.34 ²⁾
	16.74	0.9729 ± 0.07 ²⁾	1.1680 ± 0.29 ²⁾	1.1050 ± 0.16 ²⁾

功能性肠病症状严重指数 (functional bowel disorder severity index, FBDSI) 较正常人高, 对实验伤害性疼痛刺激的内脏和热超敏反应也较正常人敏感, 证明肠道通透性升高可能导致 IBS 症状加重和内脏敏感性升高^[5]。当肠道通透性升高时, 肠道中细菌产生的大量 D-乳酸通过受损黏膜进入血液循环^[13], 使 D-乳酸水平升高。王玉玉等^[14] 研究显示小鼠处于慢性应激环境时, 血浆 D-乳酸水平升高, 肠道通透性升高。

肠道上皮屏障是由上皮细胞刷状缘的严密的脂质双分子层以及细胞侧缘一连串的细胞连接 (紧密连接、黏附连接) 构成的。TJs 是最重要的细胞连接^[15], 其有助于维持上皮细胞的结构完整性, 控制分子和离子的转运, 并调节肠上皮屏障的通透性^[16-17]。Occludin 是一种关键的紧密连接蛋白, 与细胞内信号通路相互作用, 调节和维持肠道通透性^[18]。Claudin-1 作为紧密连接蛋白家族代表性成员, 其表达异常会引起屏障功能紊乱, 导致紧密连接功能失调和组织渗透性的增加。ZO-1 是一种外周膜蛋白, 可与 Occludin, Claudin-1 蛋白相互作用, 进而与肌动蛋白 (MLC) 间接作用, 从而维持紧密连接

的稳定性和通透性^[19]。

有研究报道, IBS-D 患者回肠末端黏膜或升结肠黏膜可见部分细胞间紧密连接间隙增宽, 示踪剂有不同程度的外渗现象^[20]。同时, 开始有肠黏膜紧密连接蛋白异常的报道。YU 等^[21] 研究证实, PI-IBS 模型动物肠黏膜上皮屏障损伤, Occludin, Claudin-1, ZO-1 表达降低。孔武明等^[22] 研究发现 IBS 患者肠黏膜 Claudin-1 表达下降, 使肠黏膜紧密连接通透性增加, 水和电解质渗出增多, 导致腹泻。这些报道使“IBS 患者无器质性病变”的认识受到了质疑。

与以上报道一致, 本实验研究结果显示, IBS-D 模型组大鼠肠黏膜上皮细胞超微结构受损, D-乳酸水平升高, Occludin, Claudin-1 mRNA 及蛋白表达降低, ZO-1 mRNA 表达降低而肠激安方可调节其表达, 修复黏膜损伤, 提示肠激安方治疗 IBS-D 可能是通过改善肠道通透性实现的, 这与调节 D-乳酸, Occludin, Claudin-1, ZO-1 的表达, 保护肠黏膜屏障功能有关。

综上, 本研究发现 IBS-D 大鼠肠黏膜超微结构受损, 血浆 D-乳酸, 结肠中 Occludin, Claudin-1, ZO-1 均异常表达, 表明 IBS-D 的发病机制可能与肠道通透性有关, 而肠激安方可能通过调节其表达改善 IBS-D 的症状。

[参考文献]

[1] 沈淑华, 黄宣, 吕宾, 等. 腹泻型肠易激综合征证型及证候要素的文献研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1538-1540.

[2] 彭珊, 赵钢, 李春艳. 肠易激综合征的发病机制研究进展[J]. 中国医药导报, 2016, 13(6): 54-57.

[3] 刘瑶, 焦豪妍, 刘伟. 广藿香油对感染后肠易激综合征大鼠肠黏膜屏障的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 142-146.

[4] Bertiaux-Vandaële N, Youmba S B, Belmonte L, et al. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype [J]. Am J Gastroenterol, 2011, 106(12): 2165-2173.

[5] 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(2): 196-201.

[6] ZHOU Q, ZHANG B, Verne G N. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome [J]. Pain, 2009, 146(1): 41-46.

- [7] 唐洪梅,黄樱华,李得堂,等. 肠激安方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 T 淋巴细胞和 5-羟色胺的影响[J]. 广州中医药大学学报,2009,26(2):164-168.
- [8] 柴玉娜,黄育生,唐洪梅,等. 疏肝健脾法肠激安方对 IBS-D 大鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(21):93-98.
- [9] 张庆业,廖小红,范丽霞,等. 肝郁脾虚泄泻大鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验动物学报,2014,22(3):21-23.
- [10] 苏敏. 肠安 II 号方对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导炎症后肠易激综合征(PI-IBS)大鼠肠黏膜免疫屏障的作用机制研究[D]. 北京:中国中医科学院,2014.
- [11] Camilleri M, Gorman H. Intestinal permeability and irritable bowel syndrome[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2007,19(7):545-552.
- [12] HOU Q, HUANG Y, ZHU S, et al. MiR-144 increases intestinal permeability in IBS-D rats by targeting OCLN and ZO1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6):2256-2268.
- [13] 邓明,李国亮,童端,等. 丙氨酰谷氨酰胺对重型颅脑损伤患者肠黏膜通透性和血浆二胺氧化酶的研究[J]. 检验医学与临床,2018,15(4):485-487,491.
- [14] 王玉玉,张军,郑鹏远,等. 双歧杆菌、酪酸梭菌及谷氨酰胺对慢性应激模型小鼠肠黏膜屏障的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2014,49(2):153-157.
- [15] XIAO L, RAO J N, CAO S, et al. Long noncoding RNA SPRY4-IT1 regulates intestinal epithelial barrier function by modulating the expression levels of tight junction proteins[J]. *Mol Biol Cell*, 2016,27(4):617-626.
- [16] Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease [J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(1):55-70.
- [17] Turner J R. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(6):1901-1909.
- [18] Pope J L, Bhat A A, Sharma A, et al. Claudin-1 regulates intestinal epithelial homeostasis through the modulation of Notch-signalling [J]. *Gut*, 2014, 63(4):622-634.
- [19] Gonzalez J E, DiGeronimo R J, Arthur D E, et al. Remodeling of the tight junction during recovery from exposure to hydrogen peroxide in kidney epithelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(11):1561-1569.
- [20] 孔武明,龚均,董蕾,等. 肠易激综合征患者肠道屏障——紧密连接改变的示踪电镜观察[J]. 南方医科大学学报,2007,27(8):1167-1169,1172.
- [21] YU Y B, ZHAO D Y, QI Q Q, et al. BDNF modulates intestinal barrier integrity through regulating the expression of tight junction proteins [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2016, 29(3):1-11.
- [22] 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, 27(8):27-29.

[责任编辑 周冰冰]