

· 基础研究 ·

滋补脾阴方药对脾阴虚大鼠肠黏膜屏障的调控作用

孙晓霞 周雯 战丽彬

摘要 **目的** 观察脾阴虚状态下肠黏膜屏障的改变及滋补脾阴方药的调控作用。**方法** 将 SPF 级雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组(简称 C 组)6 只和模型组(简称 M 组)14 只。采用饮食不节与劳倦过度结合耗伤阴液法建立脾阴虚大鼠模型。脾阴虚造模后将 M 组随机分为脾阴虚组(简称 S 组)和滋补脾阴方药组(简称 Z 组)。每周收集粪便进行 16S rRNA 测序。采用 qPCR 技术检测空肠 Claudin-1、Occludin、ZO-1 mRNA 水平;Western Blot 法检测空肠 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达;ELISA 法检测肠道炎症因子水平。**结果** 在门水平上,S 组较 C 组厚壁菌门比例增加($P<0.05$),拟杆菌门下降($P<0.05$),Z 组较 S 组厚壁菌门减少($P<0.01$),拟杆菌门增加($P<0.01$);在属水平上,S 组较 C 组乳杆菌属和 *Paraprevotella* 属比例升高($P<0.05, P<0.01$),瘤胃球菌属和粘放线菌属下降($P<0.01, P<0.05$);Z 组比较于 S 组乳杆菌属比例明显减少($P<0.0001$),瘤胃球菌属和粘放线菌属增加($P<0.05, P<0.01$), *Paraprevotella* 属呈下降趋势($P>0.05$)。与 C 组比较,S 组空肠 Claudin-1 mRNA 和蛋白表达下降($P<0.05, P<0.01$), Occludin mRNA 和蛋白表达降低($P<0.01$), ZO-1 mRNA 和蛋白表达呈降低趋势($P>0.05$);与 S 组比较,Z 组 Claudin-1 mRNA 和蛋白水平升高($P<0.01$), Occludin mRNA 和蛋白表达增加($P<0.05$), ZO-1 mRNA 和蛋白水平呈上升趋势。S 组空肠 IFN- γ 和 IL-17 含量较 C 组增加($P<0.001$), sIgA、TGF- β 、IL-4 与 IL-10 水平下降($P<0.01, P<0.001$);Z 组较 S 组 IFN- γ 、IL-17 含量减少($P<0.001, P<0.01$), sIgA、TGF- β 、IL-4 与 IL-10 含量升高($P<0.01, P<0.001$)。**结论** 滋补脾阴方药能够调节肠道菌群中厚壁菌门、拟杆菌门、瘤胃球菌属、乳酸杆菌属与粘放线菌属比例,增加 Claudin-1、Occludin mRNA 和蛋白表达,并调节 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞分泌的细胞因子水平,改善脾阴虚大鼠肠黏膜生物屏障、机械屏障及免疫屏障的异常变化。

关键词 脾阴虚;肠黏膜屏障;滋补脾阴方药

Effect of Zibu Piyin Recipe on Intestinal Mucosal Barrier in Pi-Yin Deficiency Model Rats SUN Xiao-xia, ZHOU Wen, and ZHAN Li-bin *School of Traditional Chinese Medicine & School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Modern Research Laboratory of Spleen Visceral Manifestations Theory, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023)*

ABSTRACT Objective To observe the changes of intestinal mucosal barrier and the regulatory effect of Zibu Piyin Recipe (ZBPYR) in Pi-yin deficiency (PYD) model rats. **Methods** SPF male Wistar rats were randomly divided into a normal group (C, $n=6$) and a model group (M, $n=14$). SYD model was established by improper diet and overwork combined with exhaustion of yin fluid. After ending the PYD model, rats in Group M were randomly divided into PYD group (S) and ZBPYR group (Z). Fecal samples were collected every week for 16S rRNA sequencing. mRNA levels of Claudin-1, Occludin, and ZO-1 in the jejunum were detected by qPCR. The protein expressions of Claudin-1, Occludin, and ZO-1 in the jejunum were detected by Western Blot. The levels of intestinal inflammatory factors were detected by ELISA. **Results** Compared with Group C, the level of *Firmicutes* increased ($P<0.05$), while *Bacteroides* decreased in Group S ($P<0.05$). Compared with Group Z, the level of *Firmicutes* decreased ($P<0.01$), while

基金项目:国家重点研发计划项目(No. 2018YFC1704400);国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(No. 2013CB531704);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(No. KYCX18_1534)

作者单位:南京中医药大学中医学院·中西医结合学院,中医脾藏象现代研究实验室(南京 210023)

通讯作者:战丽彬, Tel: 025-85811285, E-mail: zlbj@njucm.edu.cn

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200824. 323

the level of *Bacteroides* increased in Group S ($P < 0.01$). At the genus level, the proportions of *Lactobacillus* and *Paraprevotella* in Group S were higher than those in Group C ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And the proportions of *Ruminococcus* and *Adlercreutzia* decreased more in Group S than in Group C ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with Group S, the proportion of *Lactobacillus* significantly decreased ($P < 0.0001$), while the proportions of *Ruminococcus* and *Adlercreutzia* increased in Group Z ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The level of *Paraprevotella* had a downward trend ($P > 0.05$). Compared with Group C, jejunum Claudin-1 mRNA and protein expressions decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Occludin mRNA and protein expressions decreased ($P < 0.01$), and ZO-1 mRNA and protein expressions showed a decreasing trend in Group S. Compared with Group S, Claudin-1 mRNA and protein levels increased ($P < 0.01$), Occludin mRNA and protein expressions increased ($P < 0.05$), and ZO-1 mRNA and protein levels showed an upward trend in Group Z. Compared with Group C, the levels of IFN- γ and IL-17 in jejunum increased ($P < 0.001$), while the levels of sIgA, TGF- β , IL-4 and IL-10 decreased ($P < 0.01$, $P < 0.001$) in Group S. Compared with Group S, the levels of IFN- γ and IL-17 were reduced ($P < 0.001$, $P < 0.01$), and contents of sIgA, TGF- β , IL-4 and IL-10 increased ($P < 0.01$, $P < 0.001$) in Group Z. **Conclusion** ZBPYR improved abnormal changes of intestinal mucosal biological barrier, mechanical barrier, and immune barrier in PYD rats by regulating the proportions of intestinal flora (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Actinobacteria*), increasing mRNA and protein expressions of Claudin-1 and Occludin, and adjusting cytokines secreted by Th1/Th2 and Th17/Treg cells.

KEYWORDS Pi-yin deficiency; intestinal mucosal barrier; Zibu Piyin Recipe

肠黏膜屏障是抵御病原体进入机体的第一道防线,可维持肠道菌群的平衡状态^[1]。若脾虚运化功能失司,则会导致肠黏膜损伤^[2]。此外,肠道菌群紊乱也会影响肠黏膜屏障发挥生理功能,进而加重脾虚证。脾阴虚证是脾虚证的重要证型。脾阴由中焦水谷精微所化,与脾阳相辅相成,是脾脏功能活动的物质基础。思虑过度、饮食失节或久病虚损等因素均能伤及脾阴,导致水谷不化、营血和阴液不足或阴虚内热,出现形体消瘦、纳差、手足烦热、口干、舌红少苔、脉细数等临床表现^[3,4]。因脾阴虚为脾阴的助运化、濡养、制约阳热和宁静功能减退所致的运化失职,濡养无权,津血亏虚及阴虚内热的一种病理状态,以久病居多,病位较深,病程较长;而胃阴虚多为热病、吐泻伤津或药物所伤所致,表现为津液枯竭、肠燥、通降失职的燥热病证,以新病居多,病位较浅,病程较短^[5]。脾阴虚证也是临床常见慢性疾病如消渴、泄泻、便秘等的主要证型。清·陈修园谓:“脾为太阴,乃三阴之长。故治阴虚者,当以滋脾阴为主,脾阴足,自能灌溉诸脏腑也”^[6]。中医治疗脾阴虚证以“滋养脾阴”为根本大法。滋补脾阴方药是赵丽彬教授以《不居集》上集卷十方中资成汤为基础^[7],结合多年临床经验化裁而成,针对脾阴虚证疗效显著^[8,9]。前期研究发现滋补脾阴方药能够调节肠道黏蛋白表达、改善肠道糖代谢紊乱^[10,11],但其对于肠道屏障作用尚未明确。因此,本研究采用脾阴虚大

鼠模型,以肠黏膜屏障为切入点,探索脾阴虚状态下肠黏膜屏障变化及滋补脾阴方药的调控机制,为临床治疗脾阴虚证提供实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 20 只,6~8 周龄,体重(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2016-0011]。于南京中医药大学 SPF 级动物实验中心饲养,温度(22±3)℃,昼夜明暗交替 12 h/12 h。本实验通过南京中医药大学动物实验伦理委员会批准(No. ACU170301)。

2 药物 伤阴药由肉桂、制附子、吴茱萸按照 1:1:1 组成,购自南京中医药大学国医堂。常规水煎,伤阴药生药浓度为 1 g/mL。滋补脾阴方药组成:红参 30 g 山药 15 g 茯苓 15 g 白芍 15 g 丹参 12 g 白扁豆 15 g 莲肉 20 g 石菖蒲 10 g 远志 10 g 檀香 4.5 g 橘红 9 g 炙甘草 9 g,购自大连美罗医药公司。常规水煎,滋补脾阴方药生药浓度为 3.29 g/mL。4℃保存备用。

3 主要试剂及仪器 Claudin-1 抗体(Abcam, 批号:GR3227658-2);Occludin 多克隆抗体(Proteintech,批号:00051604);ZO-1 多克隆抗体(Thermo,批号:SL258826);RNA 提取试剂盒(康为世纪,批号:40345);反转录试剂盒(Takara,批号:

AI40832A); 高效荧光定量试剂(诺唯赞,批号:7E212H8);大鼠 sIgA、IFN- γ 及 IL-17 酶联免疫检测试剂盒(南京建成,批号:20190602);大鼠 IL-4、IL-10 及 TGF- β 酶联免疫检测试剂盒(南京建成,批号:20190603)。旋转蒸发器(瑞士步琪);PCR 扩增仪(美国 ABI);MiSeq 测序系统(美国 Illumina);超微量分光光度计(美国 Thermo);小型冷冻台式离心机(美国 Thermo),垂直电泳槽(美国 Bio-rad);蛋白湿转印系统(美国 Bio-rad);凝胶成像系统(美国 Bio-rad);荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche);多功能酶标仪(美国 Molecular Devices)。

4 分组、造模及干预方法 适应性喂养 3 天后,将大鼠随机分为正常组(简称 C 组)6 只和模型组(简称 M 组)14 只。采用经典复合因素,即饮食失节与劳倦过度结合耗伤阴液法建立脾阴虚大鼠模型^[10,11]。第 1~14 天为脾气虚阶段:大鼠每日游泳至力竭,同时结合饥饱饮食的方法建立脾气虚大鼠模型。第 15~24 天为脾阴虚阶段:M 组大鼠每天予 1 mL/100 g 剂量灌服伤阴药,C 组大鼠灌服等体积生理盐水。参考《中医虚证辨证参考标准》^[12]、《中医新药临床研究指导原则》^[13],综合拟定脾气虚证评定标准为消瘦、乏力、毛发无光泽、便软或溏;脾阴虚证评定标准为体重下降、易激惹、毛发枯槁无光泽、便干、肛温升高、食量时增时减、饮水量增多、游泳耐力下降。脾阴虚阶段末对大鼠进行生物学特征评价,排除不符合模型标准大鼠及死亡大鼠各 1 只,剩余 12 只模型大鼠均造模成功。第 25~38 天为滋补脾阴方药干预阶段:将 12 只造模成功大鼠随机分为脾阴虚组(简称 S 组)和滋补脾阴方药组(简称 Z 组),每组 6 只。Z 组大鼠每日灌服滋补脾阴方药 1 mL/100 g,余组灌服等体积生理盐水。

5 标本采集 每周收集各组大鼠新鲜粪便至冻存管内,于-80℃保存。滋补脾阴方药干预阶段结束后进行取材:腹腔注射 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉取血后断头处死。快速打开腹腔,分离小肠组织,用 4℃生理盐水充分清洗肠道残留物质后再用滤纸吸干,剪取约 1 cm 空肠组织 3 块于冻存管中,-80℃保存。

6 检测指标及方法

6.1 一般情况 每日检测大鼠体重、肛温、食量及饮水量,记录大鼠神态、活动度、粪便性状及被毛光泽度。

6.2 大鼠粪便 16S rRNA 测序 使用 DNA 提取试剂盒进行粪便样本总细菌 DNA 抽提,定量后进

行细菌 16S rDNA 基因 V3-V4 区 PCR 扩增,引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')及 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。扩增体系见表 1。PCR 扩增程序:98℃ 2 min;98℃ 15 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,25 个循环;72℃ 7 min。纯化 PCR 产物并进行定量。使用 Illumina MiSeq 平台和 MiSeq Reagent Kit v3 进行配对末端 2×300 bp 测序。测序委托上海派森诺生物科技有限公司进行。通过微生物生态学定量分析(QIIME, v1.8.0)处理测序数据。通过主坐标分析(PCoA)检测 β 多样性,观察样品中微生物群落的结构变化;Metastats 分析比较不同样品或组间的菌属丰度差异。

表 1 PCR 扩增体系

试剂名称	用量(μ L)
DNA 模板	2.00
Q5 反应缓冲液	5.00
dNTPs	2.00
Q5 高保真 GC 缓冲液	5.00
Q5 高保真 DNA 聚合酶(5 U/ μ L)	0.25
正向引物	1.00
反向引物	1.00
ddH ₂ O	8.75

6.3 大鼠空肠组织 Claudin-1、Occludin、ZO-1 mRNA 水平检测 采用 qPCR 技术检测。提取总 RNA 并进行逆转录,逆转录反应条件为 37℃ (15 min),85℃ (15 s),4℃ (保存)。收集 cDNA,-20℃保存。合成 cDNA 模板后采用 SYBR Green I 相对定量分析。引物序列详见表 2。qPCR 反应体系(10 μ L):cDNA 2 μ L、正向与反向引物各 0.4 μ L、灭菌水 7.2 μ L。实验条件为 95℃ 5 min 预变性;95℃ 10 s,61℃ 30 s,40 次循环;95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s。

表 2 引物序列

基因名称	引物序列	片段长度(bp)
Claudin-1	正向引物:5'-AGGTCTGGCGACATTAGTGG-3'	202
	反向引物:5'-TGGTGTGGGTAAGAGGTTG-3'	
Occludin	正向引物:5'-CCAATCATTATGCACCAAGC-3'	102
	反向引物:5'-GAATTCCTCTCCGGGTAA-3'	
ZO-1	正向引物:5'-GTATCCGATTGTTGTGTTCC-3'	270
	反向引物:5'-TCACTTGTAGCACCATCCGC-3'	
β -actin	正向引物:5'-ATGGATGACGATATCGTGTC-3'	150
	反向引物:5'-CTTCTGACCCATACCCACCA-3'	

6.4 大鼠空肠组织 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达水平检测 采用 Western Blot 技术检测。提取大鼠空肠组织总蛋白,使用超微量分光光度计测

定蛋白浓度。电泳,转膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h,按照 1:1 000 加入一抗,4 ℃ 孵育过夜。次日 1×TBST 充分洗膜,加入二抗(1:2 000),TBST 充分洗膜,ECL 发光显影。

6.5 ELISA 法检测大鼠空肠组织 sIgA、IFN- γ 、TGF- β 、IL-4、IL-10 和 IL-17 含量 按照 ELISA 试剂盒说明书进行空肠 sIgA、IFN- γ 、TGF- β 、IL-4、IL-10 和 IL-17 水平测定。

7 统计学方法 使用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较进行 *t* 检验统计学分析方法。多组间比较行单因素方差统计学分析方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况(表 3~5) 在脾气虚阶段,与 C 组比较,M 组大鼠体重、饮水量和肛温下降 ($P < 0.001$, $P < 0.0001$),食量增加 ($P < 0.001$)。在脾阴虚阶段,M 组大鼠较 C 组体重和肛温降低 ($P < 0.001$),饮水量及食量增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),且 M 组大鼠毛发枯槁无光泽,易咬斗,粪便干燥。C 组大鼠神态可,活动敏捷,毛发光泽,二便正常。在滋补脾阴方药给药阶段,与 C 组比较,S 组和 Z 组体重下降(均 $P < 0.001$),Z 组体重较 S 组有增长趋势 ($P > 0.05$);Z 组较 C 组和 S 组饮水量和食量下降(均 $P < 0.0001$);3 组肛温比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 脾气虚阶段各组大鼠体重、食量、饮水量及肛温比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体重(g)	食量(g)	饮水量(mL)	肛温(℃)
C	6	283.82±24.13	24.86±1.35	44.25±4.84	34.79±0.25
M	12	217.07±19.34*	31.38±4.06*	34.23±20.785**	34.05±0.42*

注:与 C 组比较,* $P < 0.001$,** $P < 0.0001$

表 4 脾阴虚阶段各组大鼠体重、食量、饮水量及肛温比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体重(g)	食量(g)	饮水量(mL)	肛温(℃)
C	6	334.73±11.11	25.87±0.98	47.57±4.15	34.73±0.20
M	12	252.44±29.03***	29.43±3.10**	49.52±8.885*	34.09±0.32***

注:与 C 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

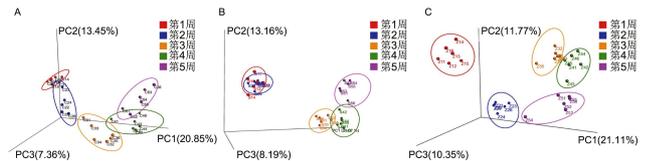
表 5 滋补脾阴方药干预阶段各组大鼠体重、食量、饮水量及肛温比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体重(g)	食量(g)	饮水量(mL)	肛温(℃)
C	6	372.17±12.76	25.88±2.17	42.69±6.18	35.07±0.12
S	6	326.36±22.38*	26.96±1.64	43.36±2.79	35.03±0.20
Z	6	339.01±28.83*	17.97±3.75** Δ	31.01±4.215** Δ	35.01±0.21

注:与 C 组比较,* $P < 0.001$,** $P < 0.0001$;与 S 组比较, Δ $P < 0.0001$

2 肠道菌群结构与组成分析

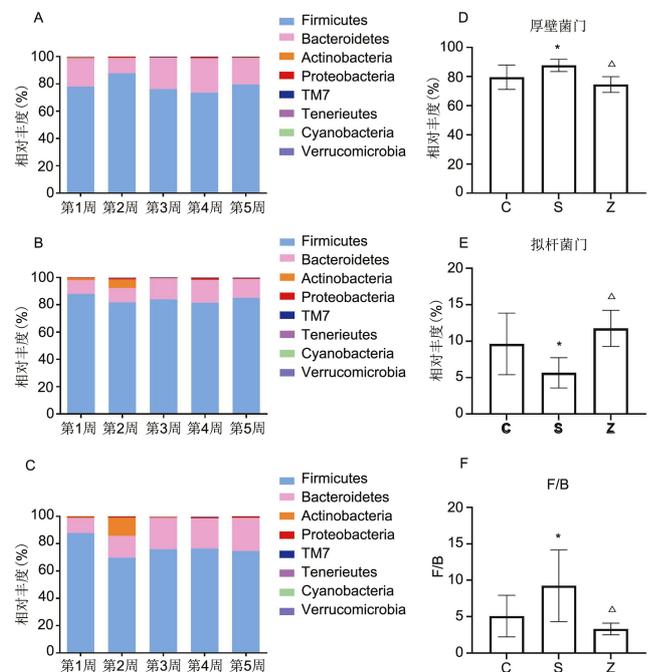
2.1 基于 UniFrac 距离的 PCoA 主坐标分析 (图 1) 第 1~5 周各样本在 PC1 水平上贡献度最大,分别为 20.85%、21.07%和 21.11%;S 组在 PC1 水平上可将脾气虚阶段(第 1~2 周)与脾阴虚阶段(第 3~5 周)明显区分;C 组和 Z 组各样本在 PC1 水平上呈连续性,无法明显区分。



注:a 为 C 组;b 为 S 组;c 为 Z 组

图 1 各组肠道菌群基于 UniFrac 距离的 PCoA 主坐标未加权分析比较

2.2 肠道菌群在门水平组成(图 2) 在门水平上,各组大鼠肠道菌群主要包括厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、TM7 门、软壁菌门(*Tenerieutes*)、蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)。脾阴虚大鼠肠道细菌中优势菌门为厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门,其中厚壁菌门占比最多。经滋补脾阴方药给药后,与 C 组



注:a,b,c 分别为 C 组、S 组及 Z 组大鼠肠道菌群第 1~5 周门水平变化情况;d,e,f 分别为滋补脾阴方药给药阶段第 5 周厚壁菌门、拟杆菌门及 F/B 水平($n=6$);与 C 组比较,* $P < 0.05$;与 S 组比较, Δ $P < 0.01$

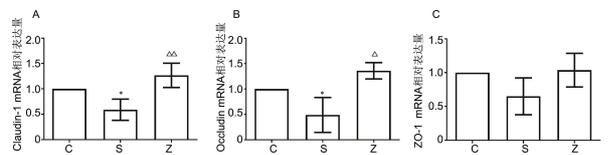
图 2 门水平肠道菌群变化

比较, S 组厚壁菌门及厚壁菌门与拟杆菌门比例 (*Firmicutes/Bacteroidetes*, F/B) 增加 (均 $P < 0.05$), 拟杆菌门水平降低 ($P < 0.05$), Z 组厚壁菌门与 F/B 较 S 组明显下降 (均 $P < 0.01$), 拟杆菌门增加 ($P < 0.01$)。

2.3 肠道菌群在属水平组成 (图 3) 在属水平上, 各组大鼠肠道菌属包括瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、颤螺菌属 (*Oscillospira*)、梭菌属 (*Clostridium*)、布劳特氏菌属 (*Blautia*)、别样棒菌属 (*Allobaculum*) 等, 其中瘤胃球菌属和乳酸杆菌丰度较高, 是脾阴虚大鼠肠道优势菌属。各样本肠道菌属 Spearman 相关系数 r 值均大于 0, 呈正相关关系; Z 组与 C 组各样本间相关性高于 S 组与 C 组。滋补脾阴方药给药后, 与 C 组比较, S 组乳杆菌属和 *Paraprevotella* 属比例升高 ($P < 0.05$,

$P < 0.01$), 瘤胃球菌属和粘放线菌属比例降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与 S 组比较, Z 组乳杆菌属比例明显减少 ($P < 0.0001$), 瘤胃球菌属与粘放线菌属比例上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), *Paraprevotella* 属有降低趋势 ($P > 0.05$); Z 组与 C 组比较乳杆菌属、瘤胃球菌属、粘放线菌属和 *Paraprevotella* 属差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

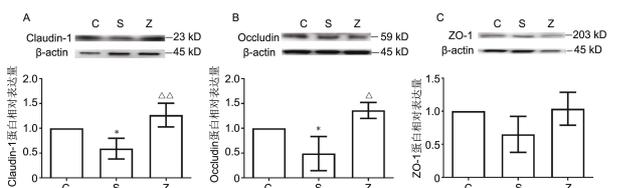
3 各组大鼠空肠 Claudin-1、Occludin、ZO-1 mRNA 水平变化 (图 4) 与 C 组比较, S 组空肠 Claudin-1 和 Occludin mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ZO-1 mRNA 水平呈降低趋势 ($P > 0.05$); 与 S 组比较, Z 组 Claudin-1 和 Occludin mRNA 水平均增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), ZO-1 mRNA 水平呈上升趋势 ($P > 0.05$)。



注: a, b, c 分别为 Claudin-1、Occludin、ZO-1 mRNA 表达水平 ($n=3$); 与 C 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 S 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 4 各组空肠 Claudin-1、Occludin、ZO-1 mRNA 水平比较

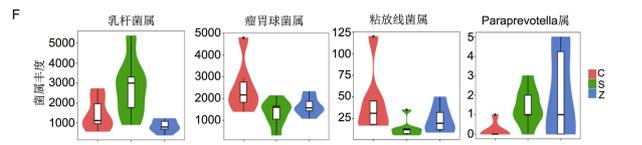
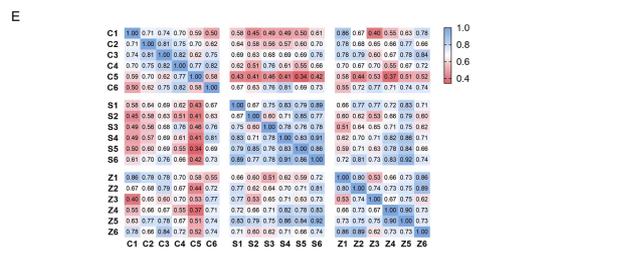
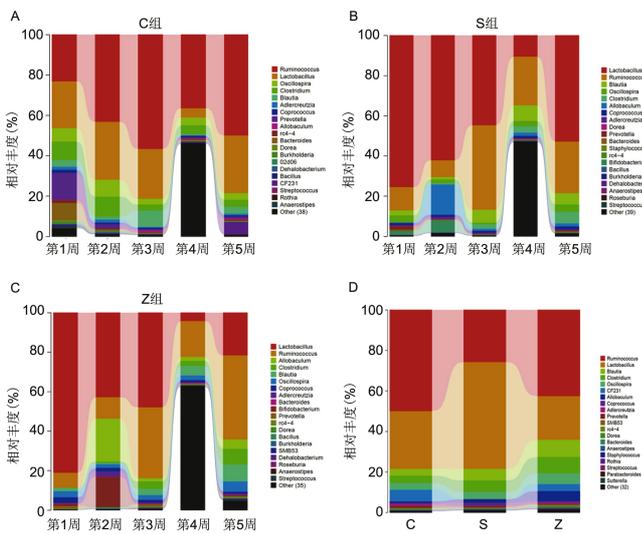
4 各组大鼠空肠 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达比较 (图 5) 与 C 组比较, S 组空肠 Claudin-1 和 Occludin 蛋白表达下降 (均 $P < 0.01$), ZO-1 蛋白水平呈降低趋势 ($P > 0.05$); 与 S 组比较, Z 组 Claudin-1 和 Occludin 蛋白表达上升 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), ZO-1 蛋白表达呈上升趋势 ($P > 0.05$)。



注: a, b, c 分别为 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达及蛋白印迹图 ($n=3$); 与 C 组比较, * $P < 0.01$; 与 S 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

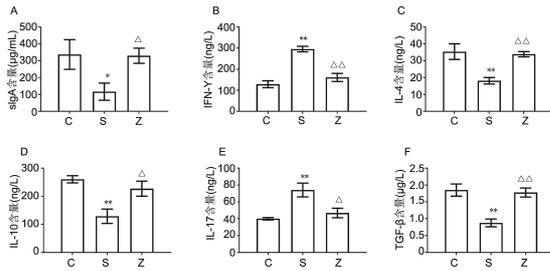
图 5 各组空肠 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白表达比较

5 各组大鼠空肠 sIgA、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-17、TGF- β 水平比较 (图 6) 与 C 组比较, S 组空肠 IFN- γ 和 IL-17 含量增加 (均为 $P < 0.001$), sIgA、TGF- β 、IL-4 与 IL-10 水平下降 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 与 S 组比较, Z 组 IFN- γ 、IL-17 含量减少 ($P < 0.001$, $P < 0.01$), sIgA、TGF- β 、IL-4 与 IL-10 含量增长 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。



注: a, b, c 分别为 C 组、S 组及 Z 组大鼠第 1~5 周肠道菌属水平变化; d 为滋补脾阴方药给药阶段第 5 周各组肠道菌属水平; e 为第 5 周在属水平各样本 Spearman 相关性热图 (方格中数字代表各样本间相关系数 r 值); f 为第 5 周 3 组菌属 *Metastats* 分析结果 ($n=6$)

图 3 属水平肠道菌群变化



注:与 C 组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$;与 S 组比较,[△] $P < 0.01$,^{△△} $P < 0.001$; $n = 3$

图 6 各组空肠 sIgA、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-17、TGF- β 水平比较

讨 论

肠黏膜屏障是抵御各种病原体侵袭的第一道防线,在生物屏障、机械屏障和免疫屏障等肠道屏障共同作用下维持肠道结构完整和机体健康稳态^[14]。肠黏膜生物屏障是指在肠道寄生的正常菌群,具有抵抗外体菌株定植,维持肠道微生态平衡的功能^[15]。随着目前核酸技术的发展,16S rRNA 高通量测序技术在肠道微生物的鉴定、分类及多样性分析中应用广泛^[16]。研究表明,肠道菌群失调与脾虚证密切相关,通过调节肠道菌群结构及多样性可能是中药治疗脾虚证的重要作用途径^[17]。因此,本研究采用 16S rRNA 技术动态检测脾阴虚大鼠肠道菌群变化情况。厚壁菌门和拟杆菌门是哺乳动物肠道细菌中的两大优势微生物,主要参与能量代谢,调节脂肪存储,与肥胖的形成关系密切^[18]。F/B 能够反映机体能量吸收与贮存能力,是评价肠道稳态的重要指标^[19]。基于本实验结果,推测脾阴虚大鼠肠道厚壁菌门丰度增加及拟杆菌门的降低,可能是影响脾阴虚大鼠体重下降的重要因素;F/B 异常升高,说明脾阴虚大鼠肠道内菌群比例失衡,肠道微生态发生紊乱。滋补脾阴方药通过下调厚壁菌门比例,上调拟杆菌门比例,进而降低 F/B 水平,改善肠道微生态失衡。在属水平,脾阴虚大鼠肠道菌群中主要优势菌属为瘤胃球菌属和乳酸杆菌。瘤胃球菌具有碳水化合物降解活性,可通过分泌纤维素酶、半纤维素酶等降解纤维物质,并有助于细胞吸收糖分,为宿主提供所需营养物质^[20,21]。乳酸杆菌属是人体肠道普遍存在的益生菌,其能够产生乳酸、乙酸和丙酸等降低肠道 pH 值,抑制致病性革兰氏阴性菌的生长^[22]。研究表明 2 型糖尿病的发生与乳酸杆菌数量增加,产丁酸细菌数量下降有关^[23]。可见,益生菌的过度增殖也会对机体造成一定损伤,肠道细菌比例的动态平衡是维持肠道微生态稳定的关键。本研究发现脾阴虚大鼠瘤胃

球菌属及粘放线菌属丰度降低,乳酸杆菌属及 *Paraprevotella* 属丰度增加,肠道细菌比例失衡,可能是造成脾阴虚大鼠肠黏膜生物屏障损伤的重要因素。滋补脾阴方药能够上调瘤胃球菌属和粘放线菌属水平,改善乳酸杆菌属异常升高的状态,恢复脾阴虚大鼠肠道菌群接近正常水平。

肠上皮细胞是维持肠黏膜机械屏障的组织结构基础,而紧密连接是肠上皮细胞间重要的连接方式^[24]。紧密连接是由 Claudins、Occludin、ZO-1 及黏附连接分子等组成的一种选择性渗透屏障。Claudins 通过形成离子选择性细胞旁通道来调节紧密连接间的孔隙大小,进而影响紧密连接渗透性。Occludin 在紧密连接中普遍表达,是紧密连接的标志性蛋白之一^[25]。ZO-1 属于膜结合鸟苷酸激酶家族,在维持紧密连接体系稳定中发挥了关键作用,是评判肠道通透性的重要指标^[26]。腹泻脾虚证模型大鼠肠道 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 基因和蛋白表达下降,肠道屏障功能损伤明显^[27]。本研究结果显示脾阴虚状态下小肠 Claudin-1 和 Occludin 基因和蛋白水平下降,滋补脾阴方药能够上调肠道 Claudin-1 和 Occludin 表达,修复肠黏膜机械屏障损伤。已有研究表明紧密连接是免疫调节的效应器和重要靶点,黏膜免疫屏障能够与紧密连接、肠道菌群等相互作用,共同调节机体免疫系统发挥生理作用^[28,29]。因此,本研究对肠黏膜免疫屏障进行了进一步探索。

sIgA 是肠黏膜免疫屏障中的关键性效应因子,能够减少肠道细菌定植并刺激黏液分泌,增强肠道免疫系统功能^[30]。Th1/Th2、Th17/Treg 细胞所分泌的细胞因子相互调节,在免疫应答和炎症反应过程中也发挥重要作用^[31]。IFN- γ 是 Th1 细胞分泌的代表性促炎因子;IL-4 是典型的 Th2 型细胞因子,可促进 sIgA 分泌和体液免疫应答。目前常用 IFN- γ 、IL-4 反映 Th1/Th2 平衡状态^[32]。此外,IL-10 能够拮抗 Th1 型细胞因子,参与免疫应答的负调控过程;IL17 是 Th17 细胞分泌的效应因子,通过促进炎症细胞的募集与活化加速炎症反应;TGF- β 主要由 Treg 细胞分泌,维持 Th17/Treg 细胞动态平衡^[33,34]。脾阴虚大鼠肠道 sIgA 水平降低,促炎因子水平增加,抑炎因子水平下降,Th1/Th2、Th17/Treg 细胞因子失衡,说明脾阴虚大鼠肠道出现炎症反应。滋补脾阴方药能够下调小肠分泌的促炎因子,增加抑炎因子和 sIgA 水平,通过调节 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞因子比例改善肠黏膜免疫屏障的异常状态。

滋补脾阴方药以山药为君,性味甘平,善补脾阴,

长肌肉;白扁豆益气健脾,与山药配伍可健脾固守中州;红参补脾生津,安神益智,与扁豆共为臣药;茯苓与莲肉均可调补脾阴并安神志,莲肉合丹参交通心肾,菖蒲合远志化痰开窍,檀香、橘红芳香醒脾,白芍养阴和营,使以甘草,酸甘化阴,益气调药。诸药合用,健脾益气无内生湿邪之弊,补脾阴之弱以复阴平阳秘。

综上,脾阴虚状态下肠黏膜生物屏障、机械屏障与免疫屏障受损,为丰富脾阴虚证科学内涵提供了一定的生物学基础。滋补脾阴方药对于改善脾阴虚大鼠肠黏膜屏障损伤效果显著,提示中医学从“滋补脾阴”立法论治脾阴虚证的作用机制可能与改善肠道菌群比例失衡,增加紧密连接蛋白表达及调节 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞分泌的炎症因子水平,进而调节肠黏膜屏障密切相关。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Radeva MY, Waschke J. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier[J]. *Acta Physiologica*, 2018, 222(1): e12860.
- [2] 张博. 脾虚大鼠肠黏膜屏障功能变化及四君子汤对其影响的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2014.
- [3] 隋华, 战丽彬, 黄一卓. 脾阴学说发展中医文献源流探析[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(1): 39-42.
- [4] 战丽彬, 刘瑜, 黄一卓, 等. 脾阴虚证古代医案选析[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(9): 2132-2134.
- [5] 周向阳, 王荣林. 当定位分治脾阴虚和胃阴虚[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(10): 2955-2957.
- [6] 清·张锡纯. 医学衷中参西录[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2016: 9.
- [7] 清·吴澄. 不居集[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 91.
- [8] 梁丽娜, 战丽彬, 胡守玉, 等. 滋补脾阴方药调节下丘脑中自噬及内质网应激改善脾阴虚糖尿病认知功能障碍机制研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2015, 17(6): 1189-1193.
- [9] 梁丽娜, 战丽彬, 胡守玉, 等. 滋补脾阴方药调节自噬增加内质网应激改善脾阴虚糖尿病认知功能障碍机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(10): 3205-3207.
- [10] 侯圣林, 战丽彬, 孙晓霞. 滋补脾阴方药对脾阴虚大鼠空肠组织黏蛋白表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(8): 51-53.
- [11] 孙晓霞, 战丽彬, 侯圣林, 等. 滋补脾阴方药对脾阴虚大鼠空肠葡萄糖转运蛋白 1、葡萄糖转运蛋白 5 表达的影响[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2018, 20(5): 660-665.
- [12] 沈自尹, 王文健. 中医证辨证参考标准[J]. *中西医结合杂志*, 1986, 6(10): 598.
- [13] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 362.
- [14] Ren ZH, Guo CY, Yu SY, et al. Progress in myco-toxins affecting intestinal mucosal barrier function [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2777.
- [15] Lee WJ, Ser KH, Chong K, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy for diabetes treatment in non-morbidly obese patients: efficacy and change of insulin secretion[J]. *Surgery*, 2010, 147(5): 664-669.
- [16] McGovern E, Kenny DA, McCabe MS, et al. 16S rRNA sequencing reveals relationship between potent cellulolytic genera and feed efficiency in the rumen of bulls [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9(8): 1842-1856.
- [17] 孟良艳, 陈秀琴, 石达友, 等. 四君子汤对脾虚大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(12): 2029-2035.
- [18] Li PH, Niu Q, Wei QT, et al. Microbial shifts in the porcine distal gut in response to diets supplemented with *Enterococcus Faecalis* as alternatives to antibiotics[J]. *Sci Reports*, 2017, 7: 41395.
- [19] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [20] 卢明, 刘蕾, 刘婧, 等. 肠道微生物菌群分型的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2020, 32(3): 345-351.
- [21] Wang J, Fan H, Han Y, et al. Characterization of the microbial communities along the gastrointestinal tract of sheep by 454 pyrosequencing analysis [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2017, 30(1): 100-110.
- [22] Hampe CS, Roth CL. Probiotic strains and mechanistic insights for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Endocrine*, 2017, 58(2): 207.
- [23] Arora T, Bäckhed F. The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives[J]. *J Int Med*, 2016, 280(4): 339-349.
- [24] 孔婧, 王晓素, 周秉舵, 等. 清下化痰方改善重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障功能及对 p38MAPK/ATF2 信号通路的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(11): 1372-1377.
- [25] Kirschner N, Houdek P, Fromm M, et al. Tight junctions form a barrier in human epidermis [J]. *Eur J Cell Biol*, 2010, 89(11): 839-842.
- [26] Umeda K, Ikenouchi J, Katahiratayama S, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where

claudins are polymerized in tight-junction strand formation[J]. Cell, 2006, 126(4): 741-754.

[27] 吴秀, 周联, 罗霞, 等. 四君子汤多糖对脾虚小鼠肠道菌群及免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 12-14.

[28] Zuo L, Kuo WT, Turner JR. Tight junctions as targets and effectors of mucosal immune homeostasis[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020, 10(2): 327-340.

[29] Cani PD. Metabolism in 2013: The gut microbiota manages host metabolism[J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 10(2): 74-76.

[30] Brandtzaeg P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation[J]. Immunol Investig, 2010, 39(5): 303-355.

[31] Salehi M, Bagherpour B, Shayghannejad V, et al. Th1, Th2 and Th17 cytokine profile in patients with multiple sclerosis following treatment with rapamycin[J]. Ir J Immunol, 2016, 13(2): 141-147.

[32] 张海军, 董晓蕾, 蔺萃, 等. 不同体质类型支原体肺炎患儿临床表现及 Th1/Th2 免疫应答特点[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(1): 27-30.

[33] Singh RP, Hasan S, Sharma S, et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity[J]. Autoimmunity Rev, 2014, 13(12): 1174-1181.

[34] Rungoe C. Changes in medical treatment and surgery rates in inflammatory bowel disease: A nationwide cohort study 1979-2011[J]. Gut, 2014, 63(10): 1607.

(收稿: 2020-05-24 在线: 2020-09-16)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶

欢迎订阅 2020 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀教授担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2002—2017 年 15 次被评为“百种中国杰出学术期刊”;2012—2017 年连续评为“中国最具国际影响力学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”,2018 年共计 22 篇论文入选“F5000 中国精品科技期刊顶尖学术论文”;2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目;2018 年入选“中文科技期刊精品建设计划”。本刊被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中西医结合期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,128 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:30.00 元/期。全年定价:360.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003-5370,国内统一刊号:CN 11-2787/R,国内邮发代号:2-52,国外代号:M640。国内外公开发售,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827,62876547,62876548;传真:010-62876547-815;E-mail: cjim@cjim.cn;网址: http://www.cjim.cn。

