

· 基础研究 ·

芪黄煎剂对胃切除术后大鼠肠黏膜
上皮细胞间紧密连接的影响李子义^{1, 2} 于庆生^{1, 2} 彭 辉^{1, 2} 沈 毅^{1, 2} 张 琦^{1, 2} 余树山^{1, 2} 张万宗^{2, 3}

摘要 **目的** 探讨芪黄煎剂对胃切除术后大鼠肠黏膜上皮机械屏障紧密连接 (TJs) 形态、结构和其相关蛋白表达的影响。**方法** SD 大鼠 90 只随机分为 6 组, 空白对照组不做任何处理; 假手术组仅行腹部剖开及缝合处理, 术后不做任何处理; 模型组胃切除术后予肠内营养; 芪黄煎剂低、中、高剂量组在胃切除术后除肠内营养外, 给予低、中、高剂量 [5、10、20 g/(kg·d)] 的芪黄煎剂小肠内滴注; 每组 15 只, 干预 1 周。透射电子显微镜下观察大鼠肠黏膜上皮 TJs 的形态、结构及宽度; 激光共聚焦显微镜下观察 TJs 相关 Claudin-1、Occludin 和闭锁小带蛋白 (ZO-1) 的分布和荧光强度; 蛋白质印迹检测 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 表达水平。**结果** 空白对照组 TJs 表现出较强的连续性和完整性; 假手术组、模型组 TJs 宽度较空白对照组变窄 ($P<0.01$), 模型组 TJs 宽度较假手术组变窄 ($P<0.01$); 芪黄煎剂 3 组 TJs 宽度较模型组增宽 ($P<0.01$), 且呈剂量依赖性。与空白对照组比较, 假手术组和模型组 Claudin-1 蛋白荧光强度和表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), Occludin 和 ZO-1 蛋白荧光强度和表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, 芪黄煎剂 3 组 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 蛋白荧光强度和表达显著增加 ($P<0.01$), 且呈剂量依赖性。**结论** 芪黄煎剂能够促进胃切除大鼠肠黏膜上皮 TJs 形态和结构的修复, 调节 TJs 蛋白 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 的表达。

关键词 芪黄煎剂; 胃切除术; 肠黏膜上皮; 紧密连接; 中医; 复方

Effect of Qihuang Decoction on Tight Junction of Intestinal Epithelial Cells of Rats after the Surgery of Gastrectomy LI Zi-yi^{1, 2}, YU Qing-sheng^{1, 2}, PENG Hui^{1, 2}, SHEN Yi^{1, 2}, ZHANG Qi^{1, 2}, YU Shu-shan^{1, 2}, and ZHANG Wan-zong^{2, 3} 1 Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Heifei (230031); 2 Institute of Traditional Chinese Medicine Surgery, Anhui Academy of Chinese Medicine, Heifei (230031); 3 Department of General Surgery, the West Area of First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Heifei (230031)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of Qihuang Decoction (QHD) on the morphology, structure and related protein expression of tight junctions (TJs) in the mechanical barrier of intestinal mucosal epithelium in rats after gastrectomy. **Methods** Totally 90 SD rats were randomly divided into 6 groups, no intervention was conducted in blank control group; merely abdominal incision and suture with no postoperative intervention were conducted in sham-operated group; enteral nutrition was supplemented in model group after gastrectomy; QHD low, medium and high dose group were instilled QHD low, medium and high dose (5, 10, 20 g·kg⁻¹·d⁻¹) into small intestine in the base of enteral nutrition after gastrectomy; 15 rats in each group, the intervention duration was 1 week. The morphology, width and integrity of TJs were observed by transmission electron microscope (TEM). The distribution and fluorescence intensity of TJs related proteins Claudin-1, Occludin and zonula occludens 1 (ZO-1) were detected by immunofluorescence technique. The expression of TJs

基金项目: 十三五国家临床重点专科建设项目 (No. 财社 [2013]239 号); 国家自然科学基金面上项目 (No. 81573987); 安徽省自然科学基金面上项目 (No. 006142747013)

作者单位: 1. 安徽中医药大学第一附属医院普外一科 (合肥 230031); 2. 安徽省中医药科学院中医外科研究所 (合肥 230031); 3. 安徽中医药大学第一附属医院西区普外科 (合肥 230031)

通讯作者: 于庆生, Tel: 0551-62838605, E-mail: qsy6312@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20221012. 116

related proteins Claudin-1, Occludin and ZO-1 were detected by Western Blot. **Results** The TJs in blank control group showed strong continuity and integrity, while the TJs width in the sham-operated group and model group was narrower than that in blank control group ($P<0.01$). The TJs width in model group was further narrowed than sham-operated group ($P<0.01$), while the TJs width in the QHD groups was wider than model group and showed a dose-dependent manner ($P<0.01$). Compared with the blank control group, the fluorescence intensity and expression of Claudin-1 protein increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the fluorescence intensity and expression of Occludin and ZO-1 proteins decreased in sham-operated group and model group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the fluorescence intensity and expression of Claudin-1, Occludin and ZO-1 proteins in the QHD groups increased and showed a dose-dependent manner ($P<0.01$). **Conclusion** QHD can promote the recovery of shape and structure of intestinal mucosal epithelial TJs in gastrectomy rats, regulate the expression of TJs proteins Claudin-1, Occludin and ZO-1.

KEYWORDS Qihuang Decoction; gastrectomy; intestinal barrier; tight junctions; Chinese medicine; compound formula

细胞间紧密连接 (tight junctions, TJs) 是组织细胞周边顶部的一种蛋白复合物, 包括跨膜蛋白 (如咬合蛋白 Occludin、闭合蛋白 Claudins)、连接黏附分子 (junctional adhesion molecules, JAM) 以及胞质蛋白 [如闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens 1, ZO-1)、闭锁小带蛋白 2 (zonula occludens 2, ZO-2) 等]^[1]。TJs 作为肠黏膜机械屏障的核心成分, 具有保护肠黏膜屏障、防治肠道细菌及其有害微生物移位功能^[2]。笔者团队前期临床和动物实验均观察到, 健脾通里中药芪黄煎剂具有保护肠屏障、防治细菌移位作用^[3, 4], 但是否与 TJs 相关尚不明确。本研究通过建立胃切除大鼠模型, 旨在进一步探讨芪黄煎剂对 TJs 形态结果及其蛋白表达的影响。

材料与方法

1 动物 健康雄性 SD 大鼠 90 只, 6~8 周龄, 体重为 290~310 g, 购于安徽中医药大学实验动物中心, 检验合格证件号码: SCXK (皖) 2017-001。饲养于温度 22~24 °C, 湿度 40%~70% 的环境, 适应性饲养 2 周。本研究通过安徽中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会审查批准 (No. 2019AN-31)。

2 药物 肠内营养制剂能全素 (NUTRICIA, 规格: 320 g/罐, 生产批号: H20180007)。芪黄煎剂组成: 黄芪 20 g 大黄 10 g 白术 20 g 党参 20 g 枳实 10 g 厚朴 10 g 丹参 15 g 黄芩 12 g, 饮片均来自于安徽中医药大学第一附属医院中药药房, 煎煮方法参考课题组前期研究^[5], 中药溶于 500 mL 水中, 煮沸 30 min 后过滤浓缩至 1.0 g/mL, 将配制好的芪黄煎剂保存于 4 °C, 使用时予以复温至 30 °C。

3 主要试剂及仪器 BCA 蛋白定量分析试剂盒 (上海 Best Bio 公司, 批号: 20190427); 免

疫荧光所需的兔抗鼠单克隆抗体 (北京泰格有限公司, 批号: 801426); 一抗 anti-Occludin、anti-Claudins 及 anti-ZO-1 (Abcam, 批号: ab15098、ab167161、ab16803); 二抗 IgG-HRP (Abcam, 批号: ab112620); PBS 磷酸盐缓冲液 (北京中杉金桥生物科技有限公司, 批号: ZLI-9065)。史密斯医用输液泵 (浙江史密斯公司, Graseby 1200); 移液枪 (Gilson P 型移液器械有限公司, Pipetman); 透射电子显微镜 (日本日立有限公司, HT7800); 激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司, OLS5100)。

4 动物造模、分组和干预

4.1 大鼠胃切除模型造模方法 参考课题组既往造模方法^[5], 大鼠予以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 麻醉起效后, 固定大鼠, 剔除腹部毛发, 常规手术消毒铺巾, 取腹部正中切口进腹, 切除胃体部大小弯之间的前壁部分, 1-0 丝线间断缝合全层, 双层缝合浆肌层。同时, 在距 Treita 韧带处空肠前壁, 用 12 号注射器针头戳孔, 将直径 1.0 mm 硅胶导管置入空肠内, 双层荷包缝合固定, 导管尾端经腹壁戳口引出, 通过皮下隧道潜行由颈背部双侧肩胛皮肤引出, 外套弹簧保护装置固定, 用作手术后肠内滴注中药和营养液。术毕从肩胛处硅胶管缓慢注入生理盐水通畅无阻力, 大鼠术后清醒笼内正常活动, 无出血、吻合失败、感染、反流、腹泻和摄食量明显减少等症状视为造模成功^[6]。假手术组行腹部正中切开后缝合, 不行胃切除术。

4.2 动物分组 90 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为 6 个小组, 即空白对照组、假手术组、模型组、标准肠内营养 + 芪黄煎剂低剂量 (芪黄煎剂低剂量) 组、标准肠内营养 + 芪黄煎剂中剂量 (芪黄煎剂中剂量) 组、标准肠内营养 + 芪黄煎剂高剂量 (芪黄

煎剂高剂量)组,每组 15 只。按照造模评价标准^[6],模型组造模成功 13 只,芪黄煎剂低剂量组造模成功 12 只,芪黄煎剂中剂量组造模成功 13 只,芪黄煎剂高剂量组造模成功 13 只。

4.3 干预方法 参考既往干预方法^[5],空白对照组不予操作干预,正常饮食。假手术组仅行腹部剖开缝合,不加药物或营养干预,麻醉恢复后正常进食。模型组和芪黄煎剂组均行胃切除手术。模型组在胃切除术后通过连接小肠的微量注射泵在肠道滴注适量的肠内营养,将 160 g 肠内营养制剂能全素溶于 500 mL 温水中,100 mL 含 830 kJ 热量的溶液,以 120 kJ/(kg·d)的速度给予肠内营养。芪黄煎剂组在给予与模型组相同剂量的肠内营养的同时,肠内滴注不同剂量的芪黄煎剂,芪黄煎剂低、中、高剂量组分别给予芪黄煎剂 5、10、20 g/(kg·d)滴入小肠。按照动物与人体间的等效剂量换算^[7],芪黄煎剂低、中、高相当于正常人临床用量 0.5、1、2 倍。各组连续给药 1 周。

大鼠干预过程中,假手术组 1 只大鼠因切口感染死亡;模型组 2 只大鼠因术后胃穿孔死亡,1 只大鼠因术后败血症死亡;芪黄煎剂低剂量组 2 只大鼠因术后胃穿孔死亡,1 只因术后腹腔出血死亡,1 只大鼠因术后败血症而死亡;芪黄煎剂中剂量组 2 只大鼠因术后胃穿孔死亡;芪黄煎剂高剂量组 1 只大鼠因术后胃穿孔死亡,1 只大鼠因术后腹腔出血死亡。每组按照随机原则抽选存活的大鼠共 10 只,然后将其处死获取检测样本之后进行下一步结果分析处理。

5 观察指标与检测方法

5.1 透射电镜观察肠上皮 TJs 形态结构 从处死的大鼠体内取小肠组织使用蒸馏水清洗干净,先选用 2.5% 戊二醛溶液进行组织固定处理,然后经过 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 遍,每次 10~15 min。此后利用锇酸溶液进行组织固定 120 min,0.1% 磷酸盐缓冲液进行二次清洗 3 遍。再经过 50%、70% 和 90% 酒精各自进行脱水 15~20 min,90% 酒精-90% 丙酮混合液体(1:1)、90% 丙酮和 100% 丙酮 15~20 min 进一步脱水。后将样品置于丙酮包埋液混合液(2:1)中室温放置 3~4 h,丙酮和包埋液(1:2)室温过夜,然后在烤箱中 37℃ 烘烤 12 h,45℃ 烘烤 12 h,60℃ 烘烤 24 h。最后,用超微切片机制作 50~60 nm 的样品载玻片,用 3% 醋酸铀酰和硝酸铅双重染色,在透射电镜下进行观察 TJs 的分布与结构并留存图片,使用 Photoshop 对图片进行分析处理。

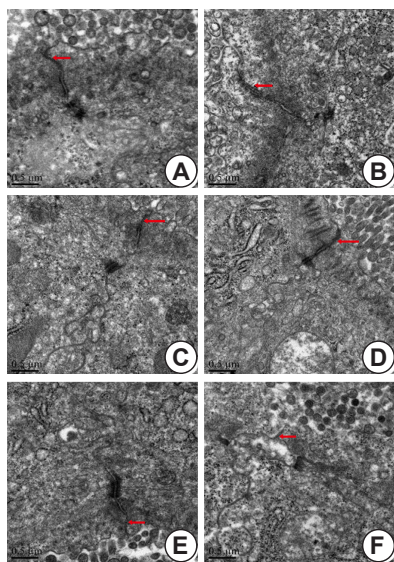
5.2 免疫荧光法观测肠上皮细胞间 TJs 蛋白 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 表达 将从处死的大鼠体内取小肠组织使用蒸馏水清洗干净后使用包埋盒进行包埋,后将包埋的标本用冰冻切片机切成 5 μm 的切片。样品在室温放置 30 min 后,用 0.3% X-Triton 通透 20 min,3% H₂O₂ 阻断 10 min,10% 山羊血清室温培养 30 min。将 1:200 稀释的一抗 ZO-1 滴加到样品中,在 4℃ 冰箱中培养过夜。然后,加入 1:100 稀释的荧光第二抗体 AF549(红色),室温孵育 60 min。另选取一片,按照上述相同的处理方式滴加 10% 的山羊血清在常温下封闭保存处理 30 min。加入稀释后的一抗 Occludin,将样品保存在 4℃ 的冰箱中,不加光照过夜。滴加经过稀释后的荧光第二抗体 AF488-羊抗兔免疫球蛋白(绿色),常温条件下孵育 60 min。添加包含抗荧光猝灭剂的 DAPI 悬浊液,避光进行细胞培养 5 min。在激光共聚焦显微镜下观测并记录处理后的材料,检查和测试 TJs 蛋白 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 的分布以及荧光表达强度并留存图片,使用 Image J 对图片进行分析处理。

5.3 Western Blot 检测小肠黏膜组织中 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 蛋白表达 取处死后大鼠的小肠黏膜组织 100 mg 清洗干净后滴加 RIPA 裂解液处理,取上清提取总蛋白,采用 BCA 试剂分析盒测定悬液内含有的蛋白总量。样品加缓冲液后煮沸 5 min,离心后于 -20℃ 保存。制备 10% 浓缩胶和 6% 分离胶,每孔加入 40 μg 蛋白样品。SDS-PAGE 电泳处理后,转移样本至 PVDF 膜中,然后加入 5 g/L 的 BSA 于常温条件下进行封闭反应处理 60 min。然后分别加入一抗 Claudin-1(1:1 000)、一抗 Occludin(1:1 000)、一抗 ZO-1(1:500)和 β-actin(1:1 000)抗体,4℃ 孵育过夜。漂洗后加入二抗 IgG-HRP(1:3 000)室温孵育 60 min。配置 ECL 显影液,移液枪将显影液吸至膜表面,于凝胶成像仪上进行曝光,应用 Alpha View SA 软件分析蛋白表达。

6 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计软件。计量数据均以用 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐选择单因素方差分析和 *t* 检验进行统计学数据处理分析,方差不齐采用非参数检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠肠黏膜上皮 TJs 比较(图 1,表 1) 透射电镜下观察,空白对照组 TJs 表现出较强的连续性和完整性;而假手术组、模型组和芪黄煎剂组大鼠 TJs 均有损伤。与空白对照组比较,假手术组和模型



注: A 为空白对照组; B 为假手术组; C 为模型组; D~F 为芪黄煎剂低、中、高剂量组; 红色箭头所指为 TJs 的分布处

图 1 各组大鼠肠黏膜上皮 TJs 的结构比较

(铅铀染色, $\times 20\,000$)

表 1 各组大鼠肠黏膜上皮 TJs 宽度比较 (μm , $\bar{x} \pm s$)

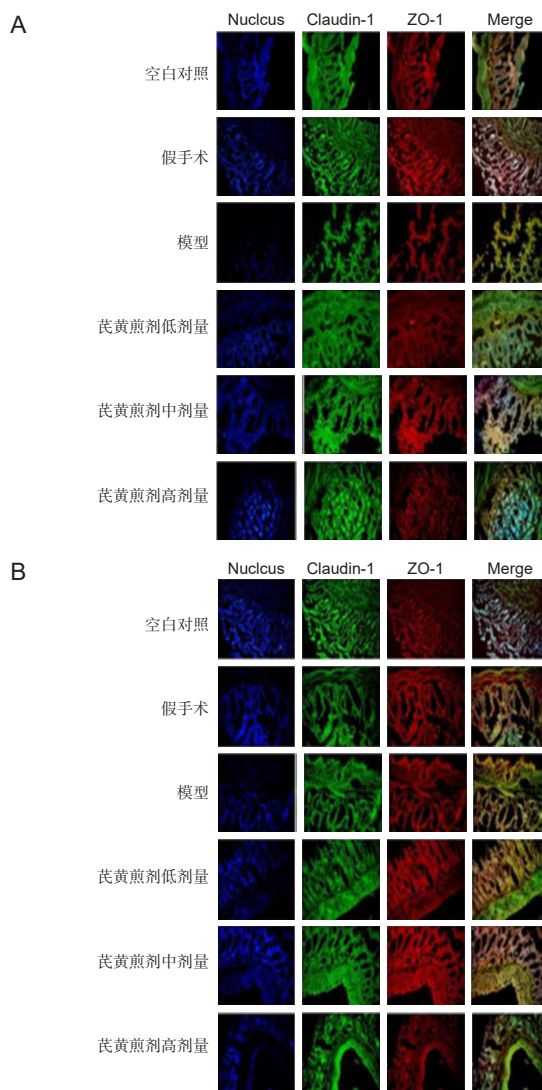
组别	<i>n</i>	TJs 宽度
空白对照	10	0.785 ± 0.011
假手术	10	$0.573 \pm 0.021^*$
模型	10	$0.198 \pm 0.007^{*\Delta}$
芪黄煎剂低剂量	10	$0.305 \pm 0.016^\Delta$
芪黄煎剂中剂量	10	$0.371 \pm 0.005^\Delta$
芪黄煎剂高剂量	10	$0.397 \pm 0.018^\Delta$

注: 与空白对照组比较, $^*P<0.01$; 与假手术组比较, $^\Delta P<0.01$; 与模型组比较, $^\Delta P<0.01$

组 TJs 宽度变窄 ($P<0.01$)。与假手术组比较, 模型组 TJs 宽度变窄 ($P<0.01$)。与模型组比较, 芪黄煎剂组 TJs 宽度增加 ($P<0.01$), 且呈剂量依赖性。

2 各组大鼠肠黏膜上皮 TJs 蛋白荧光强度比较 (图 2, 表 2) 激光共聚焦显微镜下观察, 空白对照组 Claudin-1 蛋白荧光强度最低, Occludin 和 ZO-1 蛋白荧光强度最高。与空白对照组比较, 假手术组和模型组 Claudin-1 蛋白荧光强度升高, Occludin 和 ZO-1 蛋白荧光强度降低 ($P<0.01$)。与假手术组比较, 模型组 Claudin-1 蛋白荧光强度升高, Occludin 和 ZO-1 蛋白荧光强度降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 芪黄煎剂组 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 蛋白荧光强度增强 ($P<0.01$), 且荧光强度呈剂量依赖性。

3 各组大鼠肠黏膜上皮细胞 TJs 蛋白表达 (图 3, 表 3) 与空白对照组比较, 假手术组和模型组 Claudin-1 蛋白表达增加, Occludin 和 ZO-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与假手术组比较, 模型组



注: A 和 B 均为激光共聚焦显微镜观察监测的数据结果

图 2 各组小肠黏膜上皮 TJs 蛋白的荧光表现程度的比较 (免疫荧光, $\times 400$)

Claudin-1 蛋白表达增加 ($P<0.05$), Occludin 和 ZO-1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 芪黄煎剂组 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 蛋白表达增加 ($P<0.01$), 且呈剂量依赖性。

讨 论

笔者长期临床观察发现, 胃癌根治性切除术后主要有两组典型的症候群, 一组是神疲、气短、乏力、懒言、面色苍白、舌淡、苔白、脉细弱等“气血虚弱”之表现; 另一组是腹胀、腹痛、呕吐、肛门停止排气排便等“腑实气滞”之表现。因此, 笔者认为胃癌根治性切除术后中医证候脾虚腑实, 治以健脾通里。健脾药物借鉴补中益气汤, 选用黄芪、白术、党参为主药; 通里药物吸收大承气汤之方义, 选用大黄、枳实、

表 2 各组大鼠小肠黏膜上皮 TJs 蛋白荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Claudin-1	Occludin	ZO-1
空白对照	10	48.9 ± 8.7	95.2 ± 13.1	88.7 ± 9.8
假手术	10	59.3 ± 9.5*	82.4 ± 14.7*	76.5 ± 12.1*
模型	10	65.6 ± 8.7* [△]	49.8 ± 12.1* [△]	45.9 ± 10.8* [△]
芪黄煎剂低剂量	10	73.9 ± 7.3 [▲]	57.3 ± 13.4 [▲]	53.2 ± 8.9 [▲]
芪黄煎剂中剂量	10	81.3 ± 6.3 [▲]	66.5 ± 10.4 [▲]	59.7 ± 12.1 [▲]
芪黄煎剂高剂量	10	98.3 ± 10.3 [▲]	77.6 ± 13.1 [▲]	66.9 ± 18.8 [▲]

注：与空白对照组比较，* $P < 0.01$ ；与假手术组比较，[△] $P < 0.01$ ；与模型组比较，[▲] $P < 0.01$

表 3 各组大鼠小肠黏膜上皮 TJs 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Claudin-1	Occludin	ZO-1
空白对照	10	0.572 ± 0.043	0.877 ± 0.045	0.998 ± 0.027
假手术	10	0.627 ± 0.055*	0.811 ± 0.039*	0.893 ± 0.038*
模型	10	0.699 ± 0.064* [△]	0.393 ± 0.019* [△]	0.331 ± 0.015* [△]
芪黄煎剂低剂量	10	0.892 ± 0.049 [▲]	0.552 ± 0.008 [▲]	0.537 ± 0.007 [▲]
芪黄煎剂中剂量	10	1.048 ± 0.066 [▲]	0.706 ± 0.022 [▲]	0.688 ± 0.009 [▲]
芪黄煎剂高剂量	10	1.311 ± 0.042 [▲]	0.735 ± 0.033 [▲]	0.765 ± 0.013 [▲]

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ；与假手术组比较，[△] $P < 0.01$ ；与模型组比较，[▲] $P < 0.01$

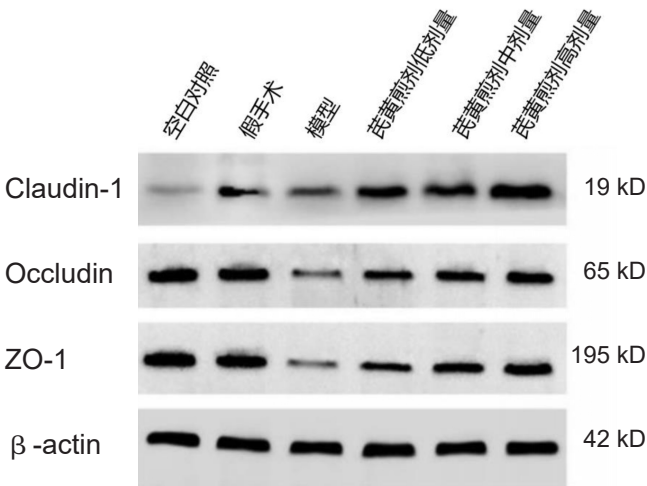


图 3 各组的小肠黏膜上皮细胞 TJs 蛋白表达

厚朴为主药，从而组成了适用于消化道术后健脾通里方剂芪黄煎剂，研究证实具有较好疗效^[8-10]。芪黄煎剂为攻补兼施之方，方中以黄芪、白术、党参补中益气，补益脾胃而生血；以大黄、枳实、厚朴通便泻热，软坚润燥，行气散结；辅以黄芩清热解毒、丹参活血化瘀。研究发现，芪黄煎剂能通过增强胃癌胃切除术后患者分泌胃动素、血管活性肠肽、生长抑素等激素的分泌来促进早期胃肠运动^[9, 10]，并能增强患者免疫功能^[8]。上述研究提示健脾通里中药可能具有保护肠黏膜屏障的作用，进一步临床研究证实上述假设，即芪黄煎剂能够减少胃癌根治性切除术后病人的肠黏膜通透性，防治内毒素移位^[3]。此后动物实验进一步证实芪黄煎剂有保护肠屏障和防治肠道细菌移位作

用^[11]。近期，笔者将芪黄煎剂保护肠屏障聚焦于保护肠黏膜免疫屏障机制研究，发现芪黄煎剂能通过提高小肠集合淋巴小结、固有层淋巴细胞、黏膜上皮内淋巴细胞的功能来促进肠黏膜免疫屏障的恢复^[8]，但对机械屏障的保护作用，尚未深入研究。

人体在胃切除术的应激状况下会产生大量的炎症细胞因子和炎症介质，如肿瘤坏死因子- α 、 γ -干扰素等，这些因子会引起肠黏膜机械屏障功能出现障碍，从而导致肠道内毒素穿过肠黏膜机械屏障进入血液循环到达全身^[11-13]。血清中内毒素含量是内毒素移位的重要指标^[14]。正常功能的肠黏膜机械屏障肠发挥着阻止内毒素移位的作用^[15]。黏膜机械屏障主要包括肠黏膜上皮细胞以及上皮细胞之间的 TJs 两个部分^[16]。TJs 是上皮细胞间的多蛋白、多功能的细胞旁通路，具有允许腔内营养物质、离子和水被动运输的能力，同时防止病原体进入下层组织，在机械屏障中起到关键性的作用^[2]。本实验结果表明，胃切除术后 TJs 相较于未手术的宽度明显变窄 ($P < 0.01$)，证实胃切除手术会损害上皮细胞 TJs 结构的连续性及完整性。芪黄煎剂组紧密连接的宽度相较模型组明显增宽 ($P < 0.01$)，且随着药物剂量的增大，宽度增加，表明了芪黄煎剂具有促进胃切除术后机体内肠黏膜上皮细胞间的 TJs 结构复原的功能，且这种功能的强弱与药物剂量大小正相关。此外，芪黄煎剂组的 TJs 宽度无法复原至假手术组原先的 TJs 宽度，说明胃切除手术对 TJs 造成难以短期内修复的损伤。

TJs 结构主要由跨膜蛋白 Occludin、Claudins-1

和胞质蛋白 ZO-1 等多种生物活性蛋白一同构成^[17]。TJs 蛋白的减少或破坏会导致肠黏膜通透性的改变^[18], 引起肠黏膜机械屏障的功能障碍^[2]。本实验结果表明, 胃切除术后大鼠芪黄煎剂组 Occludin、Claudins-1 和 ZO-1 蛋白荧光强度较模型组增强 ($P<0.01$), 且随着剂量的增大, TJs 蛋白的荧光强度也有着相应的增强, 说明芪黄煎剂能促进 TJs 蛋白 Occludin、Claudins-1 和 ZO-1 在结构位置的表达。Western Blot 结果进一步证实芪黄煎剂可提高 Occludin、Claudins-1 和 ZO-1 蛋白的表达 ($P<0.05$)。

本研究证实芪黄煎剂可通过调节肠黏膜上皮细胞 TJs 蛋白及其结构、功能, 有效的保护肠黏膜机械屏障, 并通过肠屏障保护及其细菌、内毒素移位的防治。未来, 课题组将进一步探索芪黄煎剂调节肠黏膜上皮细胞 TJs 蛋白及其结构、功能的机制, 为芪黄煎剂保护胃切除术后肠黏膜屏障提供更多的理论基础。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Otani T, Furuse M. Tight Junction structure and function revisited[J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(12): 805–817.
- [2] Paradis T, Bègue H, Basmaciyan L, et al. Tight junctions as a key for pathogens invasion in intestinal epithelial cells[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2506.
- [3] 于庆生, 侯勇, 张福忠, 等. 胃癌术后早期小肠内滴注中药改善细胞免疫功能和肠黏膜通透性临床研究[J]. 安徽中医学院学报, 2006, 18(1): 7–11.
- [4] 于庆生, 张琦, 潘晋方, 等. 中药芪黄煎剂对大鼠胃癌术后早期免疫功能和肠黏膜屏障的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2009, 15(2): 163–166.
- [5] 袁以洋, 于庆生, 潘晋方, 等. 芪黄煎剂对胃切除大鼠小肠黏膜上皮内和固有层 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(1): 34–38.
- [6] Puzio I, Muszyński S, Dobrowolski P, et al. Alterations in small intestine and liver morphology, immunolocalization of leptin, ghrelin and nesfatin-1 as well as immunoexpression of tight junction proteins in intestinal mucosa after gastrectomy in rat model[J]. J Clin Med, 2021, 10(2): 272.
- [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069–1072.
- [8] 于庆生, 陈子义, 唐雄荣. 芪黄煎剂对胃癌切除后早期淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1996, 4(2): 13–15.
- [9] 刘远成, 于庆生. 胃癌术后早期小肠内滴注健脾通里中药对胃肠动力的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 14(6): 538–541.
- [10] 于庆生, 潘晋方, 喻宗繁, 等. 胃癌术后早期小肠内滴注芪黄煎剂对胃动素、血管活性肠肽、生长抑素的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2008, 4(3): 13–15.
- [11] 于庆生, 袁以洋, 刘举达, 等. 芪黄煎剂对大鼠胃切除后肠黏膜免疫屏障的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(11): 1358–1363.
- [12] Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: the role of tight junctions[J]. Anim Sci J, 2020, 91(1): e13357.
- [13] Wang J, Ghosh SS, Ghosh S. Curcumin improves intestinal barrier function: modulation of intracellular signaling, and organization of tight junctions[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2017, 312(4): C438–C445.
- [14] 徐中, 张旭彤, 任彦彦, 等. 健胃清肠合剂对不完全性肠梗阻模型大鼠肠黏膜机械屏障功能的影响[J]. 甘肃中医药大学学报, 2021, 38(1): 11–15.
- [15] 张培培, 杨欣, 梁国强, 等. 加味白头翁汤通过 p38 MAPK-MLCK 信号通路影响溃疡性结肠炎模型大鼠肠黏膜紧密连接蛋白[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5719–5726.
- [16] 张杰, 郑红梅, 陈栋, 等. 重症急性胰腺炎患者血清 IL-6 水平与内毒素移位及肠黏膜紧密连接蛋白表达关系的研究[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(6): 1074–1079.
- [17] Awad WA, Hess C, Hess M. Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens[J]. Toxins (Basel), 2017, 9(2): 60.
- [18] Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279(5): G851–G857.

(收稿: 2021-09-07 在线: 2022-10-31)

责任编辑: 邱禹