

杜青,李心亮,曾宏亮,等. 理中丸对脾虚型腹泻大鼠结肠黏膜屏障 IL-22-MUC2/claudin-2 信号通路的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(2): 217-224.

Du Q, Li XL, Zeng HL, et al. Effects of Lizhong pill on IL-22-MUC2/claudin-2 signaling pathway in colonic mucosal barrier in spleen-deficiency diarrhea rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 217-224.

Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2023. 02. 010

理中丸对脾虚型腹泻大鼠结肠黏膜屏障 IL-22-MUC2/claudin-2 信号通路的影响

杜青¹,李心亮¹,曾宏亮¹,徐琳本¹,谢芳一^{2*}

(1. 湖南省中医药研究院,长沙 410006;2. 长沙市第四医院,长沙 410006)

【摘要】 目的 探讨理中丸对脾虚型腹泻大鼠结肠黏膜 IL-22-MUC2/claudin-2 信号通路的调控作用。**方法** 采用番泻叶水煎液 1.2 g/mL 联合疲劳游泳建立脾虚型腹泻大鼠模型。模型大鼠随机分为模型组、蒙脱石散组 (0.9 g/kg) 和理中丸低、高剂量组 (0.81 和 3.24 g/kg), 每组 8 只;另选 8 只正常大鼠作为空白组。连续给药 14 d,造模结束后可见大鼠体重减轻,精神倦怠,眯眼聚堆、少动,大便质地偏软或者便溏,肛周污秽,提示模型复制成功。采用比色法检测血清淀粉酶和 D-木糖水平,阿利新蓝和过碘酸雪夫 (AB-PAS) 染色检测结肠黏膜形态结构,蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 检测黏蛋白 2 (MUC2) 和水通道蛋白 3/4 (AQP3、AQP4) 的表达,免疫荧光法检测结肠组织 claudin-2 蛋白表达,实时荧光定量-PCR (RT-PCR) 法检测白介素-22 (IL-22) 和肠黏膜上皮跨膜蛋白 2 (claudin-2) 基因相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值)。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠稀便率、稀便级和腹泻指数显著增加,结肠组织黏膜层上皮细胞出现不同程度的萎缩,黏膜表面结构疏松水肿,杯状细胞减少,血清淀粉酶和 D-木糖含量减少,结肠组织中 MUC2、AQP3 和 AQP4 蛋白表达量相对降低,IL-22 mRNA 表达量相对减少和 claudin-2 mRNA 表达量相对增加,claudin-2 蛋白荧光强度明显增强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,理中丸高剂量组大鼠稀便率、稀便级和腹泻指数均明显减少,结肠黏膜病理损伤明显减轻,血清淀粉酶和 D-木糖含量增加,结肠组织中 MUC2、AQP3 和 AQP4 蛋白表达量相对升高,IL-22 mRNA 表达量相对增加,claudin-2 mRNA 和 claudin-2 蛋白表达量相对减少,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 理中丸明显调节脾虚型腹泻大鼠结肠黏膜屏障结构功能,其机制可能与增加结肠 AQP3/4 表达,调控 IL-22-MUC2/claudin-2 信号通路有关。

【关键词】 理中丸;脾虚型腹泻;黏膜屏障;水通道蛋白 3/4;白介素-22;claudin-2

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 02-0217-08

Effects of Lizhong pill on IL-22-MUC2/claudin-2 signaling pathway in colonic mucosal barrier in spleen-deficiency diarrhea rats

DU Qing¹, LI Xinliang¹, ZENG Hongliang¹, XU Linben¹, XIE Fangyi^{2*}

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China. 2. the Fourth Hospital of Changsha, Changsha 410006)

Corresponding author: XIE Fangyi. E-mail: 11486564@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of Lizhong pills on the IL-22-MUC2/claudin-2 signaling pathway in the colonic mucosa of spleen-deficiency diarrhea rats. **Methods** A spleen-deficiency diarrhea rat model was established using a 1.2 g/mL decoction of senna leaf combined with fatigue swimming. Model rats were randomly divided

【基金项目】 湖南省中医药科研计划项目 (2021243)。
Funded by the Hunan Province Traditional Chinese Medicine Research Project (2021243).
【作者简介】 杜青 (1991—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理与创新药物。Email: 791166938@qq.com
【通信作者】 谢芳一 (1986—), 女, 硕士, 研究方向: 中药药理。Email: 11486564@qq.com

into a model, montmorillonite powder (0.9 g/kg), and Lizhong pill low-dose and high-dose groups (0.81, 3.24 g/kg), with eight rats in each group, and eight rats were selected for a blank group. The drugs were continuously administered for 14 days. After modeling, the rats had lost weight and displayed mental fatigue, squinting, less movement, soft or loose stools, and filth around the anus, indicating that the model was successfully replicated. Serum amylase and D-xylose levels were detected by colorimetry, and colonic mucosal morphology was detected by Alcian blue and periodic acid Schiff (AB-PAS) staining. A Western Blot was used to detect the expression of aquaporin 3/4 (AQP3, AQP4), and Real-time fluorescence quantitative PCR to detect the relative expression levels ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ value) of interleukin-22 (IL-22) and claudin-2 genes. An immunofluorescence method was used to detect IL-22 and claudin-2 proteins in the colon tissue. **Results** Compared with the blank group, the model group rats had significantly increased defecation rate, defecation grade, and diarrhea index. Epithelial cells in the colon tissue of the model group were atrophied to varying degrees; the mucosal surface structure was loose and edemic, and the goblet cells had decreased in number. The serum amylase and D-xylose contents and the expression of AQP3 and AQP4 proteins in the colon tissue were decreased, while the protein and mRNA expressions of IL-22 decreased, and those of claudin-2 were increased in the model group. Compared with the model group, the high-dose Lizhong pill group displayed significantly reduced loose stool rate, loose stool grade, and diarrhea index; significantly reduced pathological damage to the colon mucosa; increased serum amylase and D-xylose contents; increased expression of AQP3 and AQP4 proteins, increased IL-22 mRNA, and decreased claudin-2 mRNA and protein in the colon tissue, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** Lizhong pills significantly improved the structure and function of the colonic mucosal barrier in spleen-deficiency diarrhea rats, and the mechanism may be related to an increase in AQP3/4 expression and regulation of the IL-22-MUC2/claudin-2 signaling pathway.

【Keywords】 Lizhong pill; spleen-deficiency diarrhea; mucosal barrier; aquaporin 3/4; interleukin-22; claudin-2

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

腹泻是临床常见的消化道疾病,中医认为脾虚型腹泻是由脾气虚弱,水湿内停、水谷运化失调等多种因素引起的肠道水液代谢紊乱和胃肠道消化功能障碍,易诱发肠道炎症病变^[1]。属于中医“久泄”范畴,与现代医学功能性腹泻伴随症状尤为类似,且病情易反复发作、病程迁延不愈,严重影响患者生活质量。理中丸是由传统名方理中汤化裁而来,是一个中成药制剂,方中炮姜为君药,温中散寒、健运脾阳;党参为臣药甘温入脾、补中益气,培补后天之本;白术为佐药,健脾燥湿;使以炙甘草补脾益气、调和诸药;全方共奏温中散寒、补益脾胃之功效;临床常用于脾胃虚寒、呕吐泄泻、胸满腹痛、消化不良等,对脾虚型腹泻的治疗具有良好的效果。传统的理中丸可有效改善胃肠动力、调节胃肠激素分泌和免疫功能、缓解脾胃虚寒引起的胃黏膜炎性介质的释放以及抑制多种消化系统疾病^[2-3]。研究认为,肠道黏膜屏障结构和功能的失调是腹泻发生的重要病理生理特征^[4]。黏液是构成肠道黏膜的化学屏障,有效黏液的减少会诱导致病菌等进一步侵犯机械屏障,导致上皮细胞跨膜蛋白表达变化,引起肠道通透性的增加,致病菌移位,加重黏膜屏障损伤。白细胞介素-22 (interleukin-22, IL-22)-黏蛋白 2 (mucin 2, MUC2)/跨膜蛋白-2 (claudin-2)

信号通路参与了维持肠道黏膜屏障的完整性,在腹泻的发病过程中扮演了重要角色^[5]。目前,针对理中丸在脾虚型腹泻肠道黏膜屏障中的调节作用知之甚少。本研究通过构建脾虚型腹泻病症结合模型,基于 IL-22-MUC2/claudin-2 信号通路探讨理中丸调节脾虚型腹泻大鼠模型结肠黏膜屏障结构和功能的分子机制,为复方药物理中丸的临床运用和推广提供一定的理论依据和基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6 周龄,体重 180 ~ 220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。实验在湖南省中医药研究院实验动物中心进行【SYXK(湘)2020-0008】,允许大鼠在恒定温度、湿度和光暗循环(20 ~ 25℃, 55% ± 10%, 7:00 ~ 19:00 光照循环)下自由饮水和摄食。本实验经湖南省中医药研究院实验动物中心伦理委员会批准(2021-0113)。

1.1.2 主要试剂与仪器

理中丸(LZW)(由炮姜、党参、白术、炙甘草组成,规格:每丸 9 g,批号:220202,广东逢春制药有限公司)

公司);番泻叶饮片,湖南省中医药研究院附属医院,经过水提法提取药液,制成 1.2 g/mL 溶液;蒙脱石散(规格:每袋 3 g,批号:03211005,杭州康贝制药有限公司);黏蛋白 2 抗体(mucin 2, MUC2, 批号: EPR23479-47, Abcam);水通道蛋白 3 抗体(Aquaporin-3, AQP3, 批号: ab125219, Abcam);水通道蛋白 4(Aquaporin-4, AQP4, 批号: ab259318, Abcam);淀粉酶、D-木糖试剂盒(批号: E-BC-K006-M、E-BC-K018-S, Elabscience);IL-22、claudin-2 和 β -actin 引物(上海生物工程有限公司);claudin-2 抗体(批号: ab53032, Abcam);肌动蛋白(actin, 批号: GB12001, Servicebio);HRP 标记山羊抗大鼠(批号: GB23302, Servicebio);TRIzol(批号: 139501, ambion)。

Envision2105 型酶标仪(PE 公司, 美国);ABI7500 型实时荧光定量 PCR 仪(Thermo 公司, 美国);DYY-6C 型电泳仪(北京六一, 中国);Eclipse Ti-E 型激光共聚焦显微镜(Nikon 公司, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 脾虚型腹泻大鼠模型建立

SD 大鼠适应性喂养 5 d,按照体重随机分为空白组(8 只)和造模组(32 只),造模组采用复合因素复制脾虚型腹泻模型^[6-7];SD 大鼠每日灌胃给予 4℃ 番泻叶水煎液(1.2 g/mL),灌胃体积为 10 mL/kg,间隔 10 h 后,置于桶中(水温为 25℃)游泳至力竭,即沉入水中 5 s 无法浮出,立即停止捞出并擦干放回笼中;持续造模 14 d。造模过程中,观察大鼠体重、一般状态、粪便质地等,造模结束后可见大鼠体重减轻,精神倦怠、眯眼聚堆、少动,大便质地偏软或者便溏,肛周污秽,提示模型复制成功。

1.2.2 分组与给药

将造模成功的大鼠按体重随机分为模型组、蒙脱石散组(0.9 g/kg)和理中丸低、高剂量组(0.81 g/kg 和 3.24 g/kg),按照临床等效剂量换算为实验动物等效剂量的 1 倍剂量和 4 倍剂量,每组 8 只;另外 8 只正常大鼠为空白组。蒙脱石散组给予蒙脱石散混悬液,理中丸低、高剂量组给予相应剂量理中丸混悬液,空白组和模型组给予等体积纯净水溶液;连续灌胃给药 7 d。

1.2.3 腹泻情况观察

给药结束后,大鼠单笼饲养,观察各组大鼠的排便情况,记录 4 h 内大鼠的排便总量和排出稀便数量,以及稀便等级(稀便污染滤纸直径(d):1 级:

d < 1 cm;2 级:d,1 ~ 2 cm;3 级:d,3 ~ 4 cm;4 级:d > 4 cm),并计算稀便率 = 稀便数/总便数 $\times$ 100%,腹泻指数 = 稀便率 $\times$ 平均稀便级。

1.2.4 样本采集

给药结束后,大鼠禁食不禁水 12 h,给予 10% D-木糖,1 h 后采用 1%戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg)腹腔麻醉,腹主动脉取血,离心(3500 r/min, 10 min)取上清,-80℃冰箱保存待用。然后,解剖分离出结肠组织,生理盐水中洗净,横向分成三段,一段保存在 4%多聚甲醛的固定液中,另外两段分别保存在冻存管中,液氮速冻,-80℃冰箱保存待用。

1.2.5 比色法检测血清淀粉酶和 D-木糖水平

按照试剂盒说明书测定大鼠血清中淀粉酶和 D-木糖的含量。

1.2.6 AB-PAS 染色检测结肠黏膜形态

结肠组织在 4%多聚甲醛的固定液中浸泡 48 h 后,通过梯度乙醇脱水,制作石蜡切片,并切成 5 μ m 厚的切片,AB-PAS 染色,用中性树脂封固。显微镜下观察结肠黏膜上皮细胞中阳性染色细胞即杯状细胞数目,计数以每 100 个上皮细胞中杯状细胞数表示,随机计数十个视野,取其平均值。

1.2.7 Western Blot 检测 MUC2 和 AQP3/4 表达

取冻存的结肠组织 0.02 g 于 EP 管,加入 1 mL RIPA 裂解液,在冰盒中匀浆,裂解 30 min 后,离心(12 000 r/min 4℃, 5 min),取上清液,核酸蛋白浓度测定仪测定总蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳,转膜至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭,加入 MUC2、AQP3 和 AQP4 一抗(1:1000),4℃过夜孵育,加入 HRP 标记二抗,ECL 法显影,Actin 用作内标,Quantity one 专业灰度分析软件进行分析。

1.2.8 免疫荧光法检测 claudin-2 蛋白表达

结肠组织在 4%多聚甲醛固定 48 h 后,石蜡包埋,制成 5 μ m 的石蜡切片,60℃烤片 12 h,切片脱蜡至水,热修复抗原,水漂洗,10%正常血清/5%BSA 封闭,滴加适当稀释的一抗 claudin-2,4℃过夜,滴加 100 μ L 抗-兔-IgG 标记荧光抗体,DAPI 工作液 37℃染核 10 min,封片,激光共聚焦显微镜下观察,阳性信号为绿色荧光,蓝色为核染信号。每张切片任选 3 个视野($\times$ 400)进行阳性细胞计数。

1.2.9 RT-PCR 法检测 IL-22 和 claudin-2 基因相对表达

取冻存的结肠组织 0.02 g,TRIzol 法提取总 RNA,逆转录为 cDNA。按照试剂盒进行 RT-PCR 检

测,反应体系:2 × SYBR GREEN PCR Master Mix 10.0 μL, ddH₂O 8.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, cDNA 0.5 μL。扩增条件为 95℃, 10 min; 95℃, 15 s; 60℃, 30 s; 40 个循环。以 GAPDH 为内参,反应结束后以 2^{-ΔΔCt} 法计算分析目的基因 IL-22 和 claudin-2 相对表达水平。引物序列: IL-22 Forward: 5'-ACAACACAGACGTTGCTC-3', Reverse: 5'-GAACAGCACTTCTTCAAGGG-3', 179 bp; claudin-2: Forward: 5'-TCCTCTGCTTTTCCTGCTC ACCT-3', Reverse: 5'-ACACATACCCAGTCAGGC-3', 153 bp; β-actin: Forward: 5'-ACATCCGTAAAG ACCTCTATGCC-3', Reverse: 5'-TACTCCTGCTTG CTGATCCAC-3', 223 bp。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行处理,计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间

比较用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析, *P* < 0.05 为具有统计学意义。

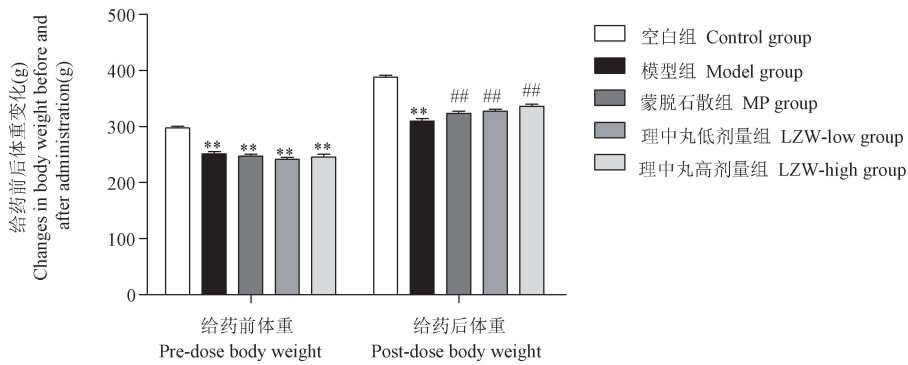
2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察

空白组大鼠精神状态良好、行为活跃、毛发光泽、大便质地正常。模型组大鼠精神倦怠,活动减少,毛色暗淡稀疏,大便稀溏不成形,体重明显减少 (*P* < 0.01)。与模型组比较,蒙脱石散组与理中丸各剂量组大鼠精神状态稍好,活动量增多,体重明显增加 (*P* < 0.05, *P* < 0.01) (见图 1)。

2.2 理中丸对脾虚型腹泻大鼠腹泻指标的影响

与空白组比,模型组大鼠稀便率、稀便级和腹泻指数显著增加;与模型组比,理中丸组高剂量组和蒙脱石散组的大鼠稀便率、稀便级和腹泻指数均明显减少 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01) (图 2)。



注:与空白组比较, ** *P* < 0.01;与模型组比较, # *P* < 0.05, ### *P* < 0.01。(下图同)
图 1 各组大鼠给药前后体重变化
Note. Compared with blank group, ** *P* < 0.01. Compared with model group, # *P* < 0.05, ### *P* < 0.01. (The same in the following figures)

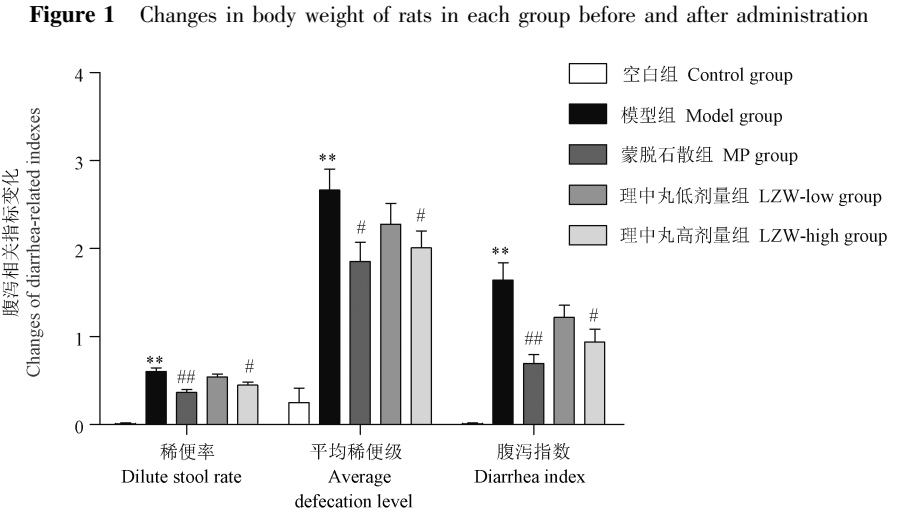


图 2 理中丸对脾虚型腹泻大鼠腹泻指标的影响
Figure 2 Effect of Tulizhong Pill on diarrhea index of rats with spleen deficiency diarrhea

2.3 理中丸对脾虚型腹泻大鼠血清中淀粉酶和 D-木糖水平影响

血清淀粉酶和 D-木糖是用来评价脾虚证的标志性指标。与空白组比较,模型组大鼠血清中淀粉

酶和 D-木糖含量明显降低,与模型组比较,理中丸可抑制脾虚腹泻大鼠血清淀粉酶和 D-木糖活性降低,具有统计学意义($P < 0.05$),蒙脱石散组无显著性差异(见图 3)。

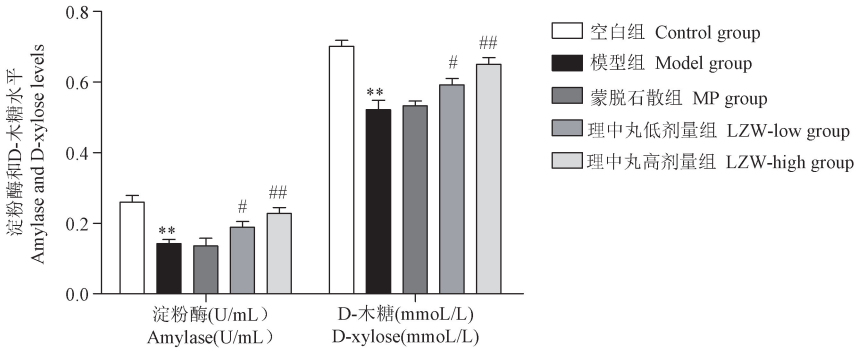


图 3 理中丸对脾虚腹泻大鼠血清淀粉酶和 D-木糖水平的影响

Figure 3 Effect of Lizhong Pills on serum amylase and D-xylose levels in spleen deficiency-diarrhea rats

2.4 理中丸对脾虚型腹泻大鼠结肠黏膜形态结构的影响

空白组大鼠结肠上皮细胞产生丰富含硫黏蛋白的酸性黏蛋白,杯状细胞密集分布于隐窝两侧,形态饱满圆润,黏液分泌丰富;模型组大鼠结肠组织黏膜层上皮细胞出现不同程度的萎缩,黏膜表面结构疏松水肿,可见炎性细胞浸润,杯状细胞减少($P < 0.01$);理中丸剂量组和蒙脱石散组大鼠结肠黏膜表面黏液表面结构明显得到改善,杯状细胞形态排列整齐,数量明显增多($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图 4)。

2.5 理中丸对脾虚型腹泻大鼠结肠中 MUC2、AQP3 和 AQP4 蛋白表达影响

与空白组比较,模型组大鼠结肠组织中 MUC2、AQP3 和 AQP4 蛋白相对灰度值明显降低,有统计

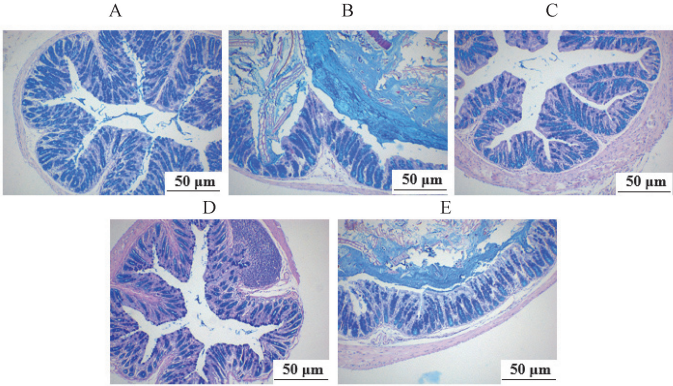
学意义($P < 0.01$);与模型组比较,蒙脱石散组和理中丸组鼠结肠组织中 MUC2、AQP3 和 AQP4 蛋白相对灰度值相明显升高,有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图 5)。

2.6 理中丸对脾虚型腹泻大鼠结肠中 claudin-2 蛋白荧光强度的影响

根据图 6 结果可知,与空白组相比较,模型组大鼠结肠组织中 claudin-2 蛋白荧光强度明显增加,有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比较,蒙脱石散组和理中丸高剂量组大鼠结肠组织中 claudin-2 蛋白荧光强度明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图 6)。

2.7 理中丸对脾虚型腹泻大鼠结肠中 IL-22 和 claudin-2 基因相对表达量的影响

与空白组比较,模型组大鼠结肠组织中 IL-22

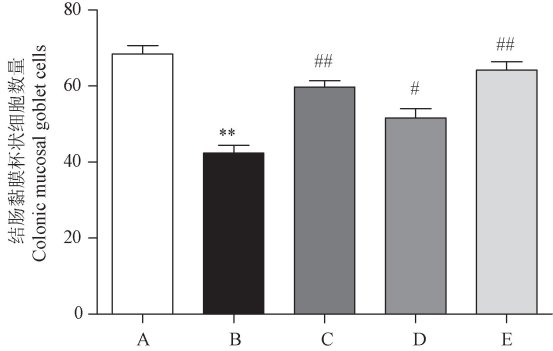


注:A:空白组;B:模型组;C:蒙脱石散组;D:理中丸低剂量组;E:理中丸高剂量组。(下同)

图 4 各组大鼠结肠黏膜形态结构和杯状细胞数量比较

Note. A. Control group. B. Model group. C. MP group. D. LZW-low group. E. LZW-high group. (The same in the following figures)

Figure 4 Comparison of the morphological structure and the number of goblet cells in the colonic mucosa of rats in each group



mRNA 相对表达量明显减少, claudin-2 mRNA 相对表达量明显增加, 有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 蒙脱石散组和理中丸高剂量组大鼠结肠组

织中 IL-22 mRNA 相对表达量明显增加, claudin-2 mRNA 相对表达量明显降低, 均有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$) (见图 7)。

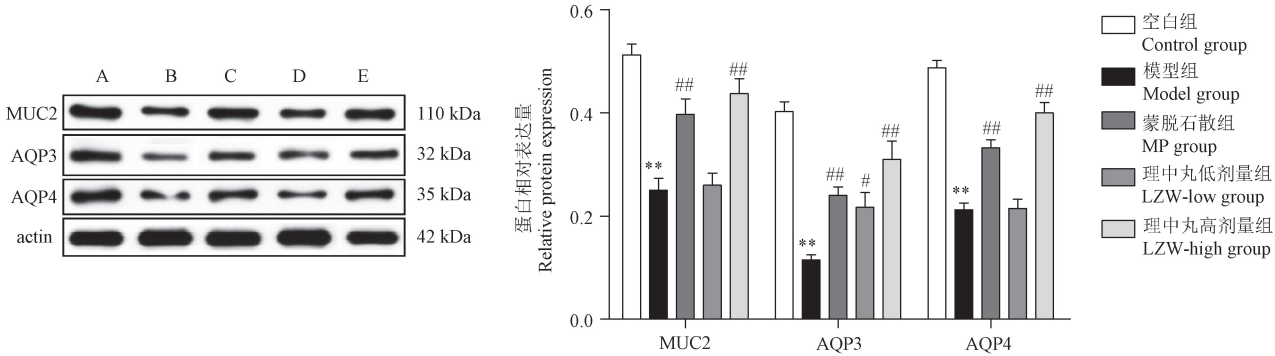


图 5 各组大鼠结肠中 MUC2、AQP3 和 AQP4 蛋白条带和相对表达量

Figure 5 Protein bands and relative expressions of MUC2, AQP3 and AQP4 in the colon of rats in each group

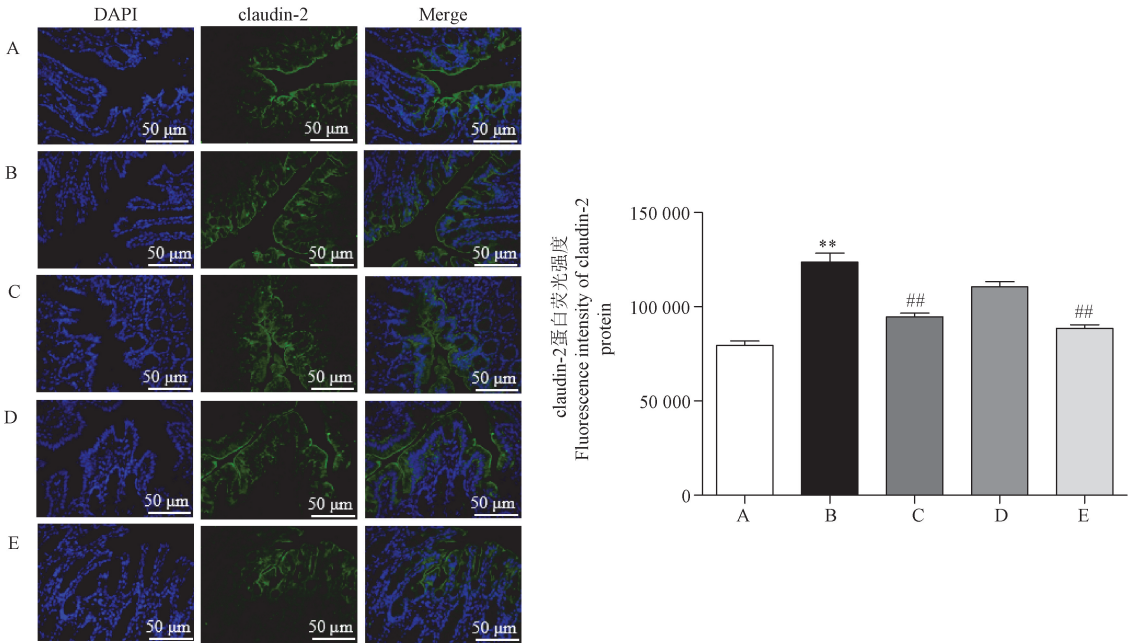


图 6 各组大鼠结肠中 claudin-2 蛋白荧光和相对阳性表达率 (100×)

Figure 6 Fluorescence and relative positive expression rate of claudin-2 protein in colon of rats in each group (100×)

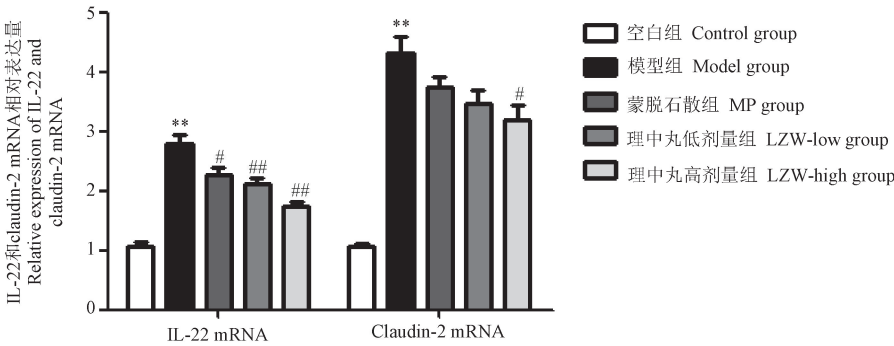


图 7 各组大鼠结肠中 IL-22 和 claudin-2 mRNA 相对表达量

Figure 7 Relative expression of IL-22 and claudin-2 mRNA in colon of rats in each group

3 讨论

脾胃失和则水谷运化不利,易致腹胀、泄泻等,淀粉酶是参与体内消化功能的重要酶类,可反映消化酶分泌情况;D-木糖是一种戊糖,可用于评价肠道的吸收功能,常用来反映机体脾虚证的病理表现^[8]。本研究发现理中丸可明显调节模型大鼠血清中淀粉酶活性和 D-木糖水平,表明其可有效改善肠道的吸收能力以及腹泻大鼠脾虚症状。蒙脱石散作为一种吸附类止泻药,可以有效与消化道中黏液结合,显著增强黏液的内聚力和黏弹性。文献调研发现,蒙脱石散作为阳性对照能显著改善脾阳虚泄模型小鼠体重、腹泻率以及结肠组织和胃病理损伤情况;提高脾虚泄泻模型大鼠消化吸收,降低血清 IL-2、IL-12、TNF- α 含量,减轻机体炎症状态^[9-10]。因此,本研究选用蒙脱石散作为阳性对照,以揭示理中丸治疗脾虚型腹泻的作用机制。

肠道是机体主要的消化吸收器官,而结肠除了具有这些功能外,还与水液代谢、便秘腹泻发生机制密切相关^[11]。结肠富含杯状细胞,是构成肠道黏膜屏障的重要组成部分,可有效阻止内毒素和有害微生物等转运,吸收营养物质并感测免疫。水通道蛋白(AQPs)是一类负责水分子跨膜转运的特异性蛋白,在维持肠道细胞内外水液平衡和肠道黏膜功能发挥重要作用。AQP3 广泛表达于结肠黏膜上皮细胞质膜,可转运水分子、甘油和尿素等,通过调控肠腔与血液中水液转运以调节结肠中粪便的含水量^[12]。AQP4 是存在于结肠黏膜细胞基底膜外侧的高效转运蛋白,其低表达可导致粪便含水量增加。肠道中 AQPs 表达紊乱会导致结肠中水的转运状态由吸收态变为大量的分泌态,黏膜屏障功能失调,还可能参与黏膜免疫机制,诱导腹泻的产生^[13]。有文献报道,脾虚型腹泻大鼠结肠黏膜出现明显的炎症反应,黏膜 AQP3/4 表达下调,黏膜屏障受损^[9,14]。本研究通过 AB-PAS 和 Western Blot 检测发现,理中丸可明显改善脾虚型腹泻模型大鼠结肠黏膜损伤和功能蛋白 AQP3/4 的表达。

肠道黏膜化学屏障是肠道黏膜屏障组成的第一部分,主要由上皮细胞分泌的黏液中杯状细胞组成,杯状细胞分泌的高度糖基化蛋白 MUC2 在肠黏膜上皮细胞表面凭借其“分子筛”样的作用使细菌与上皮分离,保护肠道正常结构功能,防止腹泻^[15]。肠道淋巴细胞分泌的 IL-22 是 IL-10 超家族的单体

细胞因子,主要用于支持和维护肠道黏膜的完整性^[16]。当肠道黏膜被破坏时,IL-22 的表达及相关信号通路激活以维持肠道微生物与上皮细胞之间的防御屏障机制^[17]。IL-22 在杯状细胞的分化成熟和黏蛋白表达中起到重要作用,IL-22 缺陷的小鼠 MUC2 出现异常表达且杯状细胞增殖抑制,造成腹泻的易感性^[18]。肠道黏膜机械屏障是肠道屏障中最重要的部分,主要由上皮紧密连接中跨膜蛋白(claudin-2 等)和胞质支架蛋白构成。claudin-2 与孔隙形成有关,表达上调可能会增加细胞旁通透性,影响紧密连接的结构和功能,导致黏膜屏障结构功能紊乱。有研究发现,IL-22 低表达可通过增强肠道黏膜内 claudin-2 的含量,增加肠上皮紧密连接的通透性,同时上调上皮细胞钠离子通道作用,驱动腹泻^[19]。

本研究通过 RT-PCR 考察了结肠黏膜中 IL-22/claudin-2 mRNA 的表达变化,同时,采用免疫荧光双重验证 claudin-2 蛋白的表达情况,发现理中丸可明显抑制脾虚腹泻型大鼠结肠黏膜 IL-22/claudin-2 信号通路的激活,减少黏膜屏障的损伤。综上所述,本研究证实理中丸具有保护脾虚型腹泻大鼠结肠黏膜屏障结构功能,其机制可能与调节 AQP3/4 的表达和 IL-22-MUC2/claudin-2 信号通路有关。但是,肠道黏膜屏障的完整性不仅局限在化学屏障和机械屏障,更受到免疫屏障和生物屏障的影响,后续将进一步探索,为揭示理中丸治疗脾虚型腹泻的发病机制研究奠定更丰富的实验基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Shi K, Qu L, Lin X, et al. Deep-fried atractylodis rhizoma protects against spleen deficiency-induced diarrhea through regulating intestinal inflammatory response and gut microbiota [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 124.
- [2] 汪颖钰, 岳瑶函, 黄建伟, 等. 理中丸在脾胃虚寒型肠内营养相关性腹泻中疗效观察 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(12): 118-120.
Wang YJ, Yue YH, Huang JW, et al. Clinical efficacy observation of Lizhong pill on treating enteral nutrition related diarrhea with spleen and stomach deficiency cold type [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2016, 18(12): 118-120.
- [3] 宋厚盼, 陈小娟, 曾梅艳, 等. 理中汤调控 Raf/MEK/ERK 信号通路抗大鼠胃溃疡的效应与机制 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(9): 1291-1298.
Song HP, Chen XJ, Zeng MY, et al. Effect of Li-Zhong-Tang on gastric ulcer in rats based on Raf/MEK/ERK signaling pathway and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021, 37(9): 1291-1298.

- [4] Martinez C, Lobo B, Pigrau M, et al. Diarrhoea-dominant irritable bowel syndrome; an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier [J]. Gut, 2013, 62(8):1160-1168.
- [5] Tsai PY, Zhang B, He WQ, et al. IL-22 upregulates epithelial claudin-2 to drive diarrhea and enteric pathogen clearance [J]. Cell Host Microbe, 2017, 21(6): 671-681.
- [6] 张毅靖, 甘剑峰, 王永福, 等. 健脾祛湿膏对脾虚腹泻大鼠结肠 P38 MAPK 信号通路相关蛋白及细胞因子的影响 [J]. 中药材, 2021, 44(1): 186-189.
Zhang YJ, Gan JF, Wang YF, et al. Effects of Jianpi Qushi Ointment on P38 MAPK signaling pathway-related proteins and cytokines in colon of rats with diarrhea due to spleen deficiency [J]. Chin Materia Med, 2021, 44(1): 186-189.
- [7] 胡琳琳. 复合因素塑造劳倦过度脾虚证动物模型的实验研究 [D]. 西安: 西北大学; 2005.
Hu LL. Experimental study on animal model of overwork and spleen deficiency syndrome by complex factors [D]. Xi'an: Northwest University; 2005.
- [8] 马潇, 康安, 徐珊, 等. 麸炒苍术不同提取物对小鼠脾虚泄泻的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(3): 292-297.
Ma X, Kang A, Xu S, et al. Effect of bran stir-baked atractylodis rhizoma water extract, ethanol extract and CH₂Cl₂ active parts on spleen-deficiency diarrhea in mice [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2018, 34(3): 292-297.
- [9] 陈文文, 钟恋, 卢烽, 等. 基于肠道菌群的灶心土温脾止泻药效及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(1): 118-124.
Chen WW, Zhong L, Lu F, et al. Study on the efficacy and mechanism of Zaoxintu, warming spleen and antidiarrheal based on intestinal flora [J]. Pharmacol Clinic Tradit Chin Med, 2022, 38(1): 118-124.
- [10] 周轲, 牛淳, 刘文娟, 等. 电针百会穴对脾虚泄泻模型大鼠影响的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(3): 947-955.
Zhou K, Niu C, Liu WJ, et al. Study on the effect of electric acupuncture at Baihui acupoint on rats with spleen-deficiency diarrhea [J]. Acta Vet Zootechnica Sin, 2022, 53(3): 947-955.
- [11] 许静. 基于肠道菌群与 TLR4/NF- κ B 通路研究苍术苷 A 对脾虚泄泻小鼠的药效机制 [D]. 武汉: 湖北中医药大学; 2022.
- Xu J. Study on the effect-mechanism of atractyloside A on spleen deficiency diarrhea mice based on intestinal flora and TLR4/NF- κ B signal pathway [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine; 2022.
- [12] Karashi N, Kon R, Iizasz T, et al. Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(6): 957-962.
- [13] Camilleri M, Carlson P, Chedid V, et al. Aquaporin expression in colonic mucosal biopsies from irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Clin Transl Gastroenterol, 2019, 10(4): e00019.
- [14] 范晓艳, 何峰, 韩昭, 等. 温针灸对消化不良性腹泻大鼠结肠黏膜水通道蛋白 3、4 表达的影响研究 [J]. 针灸临床杂志, 2021, 37(11): 63-68.
Fan XY, He F, Han Z, et al. Effects of warm acupuncture on the expression of aquaporin 3 and 4 in colonic mucosa of rats with dyspepsia diarrhea [J]. J Clin Acupuncture and Moxibustion, 2021, 37(11): 63-68.
- [15] Sun SD, Yang Y, Lin XJ, et al. Qiweibaizhu decoction treats diarrheal juvenile rats by modulating the gut microbiota, short-chain fatty acids, and the mucus barrier [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 8873294.
- [16] Cui L, Guan XN, Ding WB, et al. Scutellaria baicalensis Georgi polysaccharide ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by improving intestinal barrier function and modulating gut microbiota [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 166: 1035-1045.
- [17] 高闯, 杜晓博, 王丹丹, 等. 白细胞介素 22 与炎症性肠病的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2018, 31(11): 1196-1200.
Gao C, Du XB, Wang DD, et al. Research progress of interleukin-22 and inflammatory bowel disease [J]. J Postgraduate Med, 2018, 31(11): 1196-1200.
- [18] Turner JE, Stockinger B, Helmby H. IL-22 mediates goblet cell hyperplasia and worm expulsion in intestinal helminth infection [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(10): e1003698.
- [19] Tsai P, Zhang B, He W, et al. IL-22 upregulates epithelial claudin-2 to drive diarrhea and enteric pathogen clearance [J]. Cell Host Microbe, 2017, 21(6): 671-681.

[收稿日期] 2022-09-09