

本文引用:黄立权,张志荣,江荣林,王坤根.四君子汤对气虚型急性胃肠功能损伤小鼠小肠Cajal间质细胞及黏膜上皮跨膜蛋白 claudin-2、occludin 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(6): 685-688.

## 四君子汤对气虚型急性胃肠功能损伤小鼠 小肠Cajal间质细胞及黏膜上皮跨膜蛋白 claudin-2、occludin表达的影响

黄立权,张志荣,江荣林\*,王坤根

(浙江中医药大学附属第一医院重症医学科,浙江 杭州 310000)

**〔摘要〕** **目的** 观察四君子汤对气虚型急性胃肠功能损伤小鼠小肠Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)及黏膜上皮跨膜蛋白 claudin-2、occludin 表达的影响。**方法** 将48只ICR小鼠随机分为正常组( $n=12$ )和实验组( $n=36$ ),实验组制备成标准气虚型急性胃肠功能损伤小鼠模型,再随机分为模型组、四君子汤组、自愈组,每组12只。正常组和模型组小鼠于造模成功后处死;四君子汤组小鼠给予四君子汤灌胃,自愈组小鼠等量生理盐水灌胃,每天1次,连续灌胃7d,禁食不禁水12h后处死。留取各组距离回盲部2cm的小肠组织,行HE染色和免疫组化,观察小鼠肠道ICC中c-kit及肠黏膜上皮跨膜蛋白 claudin-2、occludin 表达的变化。**结果** HE染色显示四君子汤治疗后小鼠肠黏膜损伤明显改善;免疫组化显示:与正常组比较,造模后实验组各组c-kit及跨膜蛋白 claudin-2、occludin 表达明显下降( $P<0.01$ )。与模型组比较,四君子汤组和自愈组c-kit及肠黏膜上皮跨膜蛋白 claudin-2、occludin 表达明显上升( $P<0.01$ );与自愈组比较,四君子汤组c-kit及肠黏膜上皮跨膜蛋白 claudin-2、occludin 表达明显上升( $P<0.01$ )。**结论** 四君子汤可通过增加c-kit、claudin-2、occludin 的表达改善肠道黏膜通透性和肠动力,以治疗气虚型急性胃肠功能损伤。

**〔关键词〕** 急性胃肠功能损伤;动物模型;跨膜蛋白;气虚型;四君子汤

**〔中图分类号〕** R285.5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.06.008

### Effects of Sijunzi Decoction on the Intestinal Mucosal Interstitial Cells of Cajal and Transmembrane Proteins Claudin-2 and Occluding Expression in Acute Gastrointestinal Impairment Mouse of Qi-deficiency

HUANG Liqun, ZHANG Zhirong, JIANG Ronglin\*, WANG Kungen

(Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou, Zhejiang 310000, China)

**〔Abstract〕** **Objective** To observe the effect of Sijunzi Decoction on the expression of interstitial cells of Cajal (ICC) and intestinal mucosal epithelial transmembrane proteins claudin-2, occludin in acute gastrointestinal impairment mouse of Qi-deficiency. **Methods** A total of 48 ICR mice were randomly divided into a normal group ( $n=12$ ) and an experimental group ( $n=36$ ). The experimental group was prepared into a standard acute gastrointestinal impairment mouse animal model of Qi-deficiency, and then randomly divided into a model group, a Sijunzi Decoction group, and a self-healing group ( $n=12$  in each group). The mice in the normal group and the model group were sacrificed after successfully modeling. Mice in the Sijunzi Decoction group were treated by gavage with Sijunzi Decoction, and mice in the self-healing group were given the equal saline, once a day, for

**〔收稿日期〕** 2020-01-01

**〔基金项目〕** 浙江省中医药科学研究基金项目(2020ZB068);中央百千万人才工程(岐黄工程)第六批全国老中医药专家学术经验继承工作。

**〔作者简介〕** 黄立权,男,硕士,研究方向:急性胃肠功能损伤防治研究。

**〔通讯作者〕** \* 江荣林,男,教授,博士研究生导师, E-mail:jiangronglin@126.com。

continuous 7 days. They were killed after 12 days' fasting food but not water. The small intestine tissue 2 cm away from ileocecum were retained. Then HE staining and immunohistochemistry were performed to observe the changes of c-kit in intestinal ICC and intestinal mucosal epithelial transmembrane proteins claudin-2 and occludin in mice. **Results** HE staining showed that the intestinal mucosal damage was obviously improved in mice after Sijunzi Decoction treatment. Immunohistochemistry showed that compared with the normal group, the expressions of c-kit and transmembrane proteins claudin-2 and occludin in the experimental group was significantly decreased after modeling ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the expressions of c-kit and intestinal mucosal epithelial transmembrane proteins claudin-2 and occludin in the Sijunzi Decoction group and self-healing group were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with the self-healing group, the expression of c-kit and intestinal mucosal epithelial transmembrane proteins claudin-2 and occludin in the Sijunzi Decoction group were significantly increased ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Sijunzi Decoction could increase the expression of c-kit, claudin-2 and occludin to improve the intestinal mucosa permeability and intestinal motility, and has a therapeutic effect on mice with acute gastrointestinal impairment of Qi-deficiency.

[**Keywords**] acute gastrointestinal impairment; animal model; transmembrane protein; Qi-deficiency syndrome; Sijunzi Decoction

急性胃肠功能损伤(acute gastrointestinal function injury, AGI)是危重病患者的常见并发症,是常继发于创伤、烧伤、休克和其他全身性病变的一种胃肠道急性病理改变,以胃肠道黏膜损害以及运动和屏障功能障碍为主要特点。本病不是一组独立的疾病,而是多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的一部分,可导致喂养不耐受、胃潴留、呕吐、腹泻、消化道出血、麻痹性肠梗阻及腹内高压甚至引发腹腔间隔室综合征等。2012年,欧洲危重病学会对AGI重新作了定义和分级<sup>[1]</sup>,有文献指出其在ICU的发病率达62%以上<sup>[2]</sup>,临床上如果不及处理,此类危重症患者往往进展成多脏器功能衰竭,死亡率将大幅上升<sup>[3]</sup>。

AGI的发病机制目前尚未完全清楚,西医认为它是MODS的一个并发症,但笔者根据大量的临床病例发现很多危重症患者在创伤、感染、出血等急性应激情况过去后和长期卧床机械通气的患者均出现了胃肠功能损伤。从西医学角度很难解释这一现象,但中医学能很好解释这一理论:《脾胃论》有云“内伤脾胃,乃伤其气”,这类病人由于病情危重,无法自主进食而依靠全胃肠外营养,饮食不节,脾胃乃伤。脾胃气虚,脾胃升降功能失司,进而影响小肠泌清别浊和大肠通降的功能,以致出现腹胀、腹泻等症状,这与胃肠功能损伤的表现相一致。此类胃肠功能损伤患者在证型上符合中医气虚的临床表现,疾病上符合“痞满”“泄泻”病范畴。

笔者运用中医理论,建立了气虚型AGI小鼠动物模型的制作方法,并申请了发明专利(国家发明专利号:ZL201410853675.0)。团队前期研究发现四君子汤能改善气虚型AGI小鼠的肠黏膜通透性<sup>[4]</sup>,但

是仅限于镜下观察肠黏膜结构。本研究通过建立气虚型AGI小鼠模型,观察四君子汤对小鼠小肠Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)中c-kit及肠黏膜上皮跨膜蛋白claudin-2、occludin的影响,期为深入研究四君子汤治疗气虚型AGI小鼠提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康成年SPF级雌性美国癌症研究所(Institute of Cancer Research, ICR)小鼠48只,体质量18~22 g,购买于上海西普尔必凯实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2018-0006,由浙江中医药大学动物实验研究中心提供饲养,许可证号:SYXK(浙)2018-0012。饲养期间小鼠自由进食水,保证充足的饲料和饮水,适应性喂养1周后开始实验,根据数字随机表随机选取小鼠,分组实验。

### 1.2 药物

四君子汤由党参、白术、茯苓、炙甘草组成,以上饮片均购自浙江省中医院。按照此方传统比例称取中药饮片,先用清水浸泡30 min,武火转文火煎煮2次,每次45 min,合并两次滤液,最终浓缩至每mL含生药材500 mg。

### 1.3 主要试剂与仪器

兔抗鼠c-kit抗体、兔抗鼠claudin-2抗体、兔抗鼠occludin抗体、羊抗兔二抗工作液(美国Santa Cruz CST公司);DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物试剂研究所);Olympus光学显微镜(日本Olympus公司);Nikon摄影生物光学显微镜(日本

株式会社尼康);Bio-Rad 凝胶成像系统(美国伯乐公司)。

#### 1.4 造模与分组

48 只 ICR 小鼠随机分为正常组( $n=12$ )和实验组( $n=36$ ),实验组制备成标准气虚型 AGI 小鼠模型<sup>[4]</sup>,再随机分为模型组( $n=12$ )、四君子汤组( $n=12$ )、自愈组( $n=12$ )。造模成功后,将正常组和模型组小鼠处死,留取小肠组织。自愈组给予生理盐水灌胃。四君子汤组给予四君子汤浓缩液灌胃,按照体表系数换算法,与人临床剂量等效的小鼠剂量为 5 g/(kg·d)。每日灌胃 1 次,两组小鼠连续灌胃 7 d,禁食不禁水 12 h 后颈椎脱臼处死,剖腹取小肠组织。

#### 1.5 HE 染色

颈椎脱臼处死各组小鼠后,剖腹取小肠(距回盲部 2 cm)组织标本 0.3 cm,10%甲醛固定,以不同浓度的酒精脱水,二甲苯透明,将已透明的组织置于已溶化的石蜡中,浸蜡,包埋,切成 4  $\mu\text{m}$  厚薄片,行 HE 常规染色。利用光学显微镜观察小肠黏膜的肠绒毛、肠腺、肠上皮细胞的变化。

#### 1.6 免疫组化染色

免疫组化检测采用两步法,小肠组织标本石蜡包埋,制成 4  $\mu\text{m}$  切片常规脱蜡及梯度脱水后,经 3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性,高压修复抗原后,滴加兔抗鼠 c-kit、claudin-2、occludin 抗体(稀释浓度分别为 1:50、1:100、1:100)置于湿盒,4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜。次日复温后滴加羊抗兔二抗工作液,于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱孵育 30 min。经 DAB 显色,苏木素复染,二甲苯透明封片。所有切片用滨松 NanoZoomer 2.0 RS 扫描成像,每个切片图像 400 倍放大后截取 3 个视野,采用 IPP 6.0 进行图像分析,分析结果为总光密度,取平均值为蛋白表达强度。

#### 1.7 统计学分析

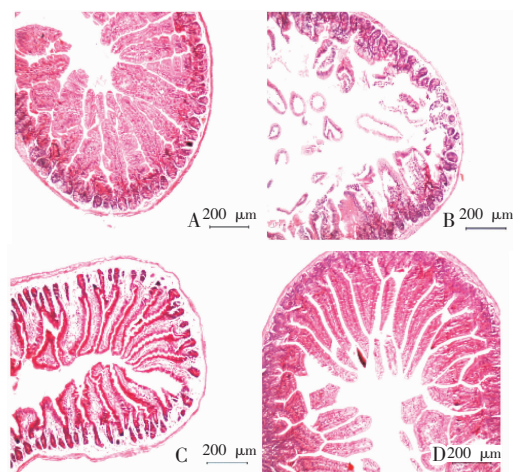
采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,符合正态或近似正态分布计量资料的描述采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两组间比较采用 LSD 法。所有的统计检验均采用双侧检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HE 染色结果

HE 染色结果显示,正常组肠黏膜结构完整,上皮细胞排列整齐,胞浆丰富,胞质红染,小肠隐窝可见,黏膜下层和固有层未见水肿,未见炎症细胞浸

润;模型组小肠黏膜局部脱落,肠腔内可见脱落黏膜碎片,黏膜上皮细胞水肿明显,局部隐窝消失,黏膜下层局部轻度水肿,可见少量炎症细胞浸润;自愈组黏膜结构尚完整,可见少量脱落,局部黏膜上皮细胞水肿,黏膜下层及固有层轻度水肿,未见明显炎症细胞浸润;四君子汤组肠黏膜结构完整,上皮细胞排列整齐,胞浆丰富,胞质红染,小肠隐窝可见,黏膜下层和固有层未见明显水肿,未见炎症细胞浸润,较模型组改善明显,相比自愈组黏膜结构较完整、黏膜下层水肿改善明显。见图 1。



A.正常组;B.模型组;C.自愈组;D.四君子汤组

图 1 各组小鼠小肠组织 HE 染色结果( $\times 100$ )

### 2.2 各组小鼠小肠组织 c-kit、claudin-2、occludin 免疫组化结果

实验组各组 c-kit、claudin-2、occludin 表达较正常组显著下降( $P<0.01$ )。与模型组比较,四君子汤组和自愈组 c-kit、claudin-2、occludin 表达显著上升( $P<0.01$ );与自愈组比较,四君子汤组 c-kit、claudin-2、occludin 表达显著上升( $P<0.01$ )。见表 1 和图 2。

表 1 各组小鼠小肠组织 c-kit、claudin-2、occludin 阳性表达水平比较( $n=12, \bar{x}\pm s$ )

组别	c-kit( $\times 10^4$ )	claudin-2( $\times 10^4$ )	occludin( $\times 10^4$ )
正常组	2.69 $\pm$ 0.02	3.51 $\pm$ 0.01	3.66 $\pm$ 0.03
模型组	1.26 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>	1.76 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>	1.11 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>
自愈组	1.81 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	2.47 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	2.14 $\pm$ 0.06 <sup>**</sup>
四君子汤组	2.16 $\pm$ 0.02 <sup>**<math>\Delta</math></sup>	3.07 $\pm$ 0.02 <sup>**<math>\Delta</math></sup>	2.99 $\pm$ 0.03 <sup>**<math>\Delta</math></sup>

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.01$ ;与自愈组比较, <sup>$\Delta$</sup>  $P<0.01$

## 3 讨论

中医中药对于脾胃病的治疗一直具有其独特和公认的疗效<sup>[5-6]</sup>。急性胃肠功能衰竭临床辨证可分为

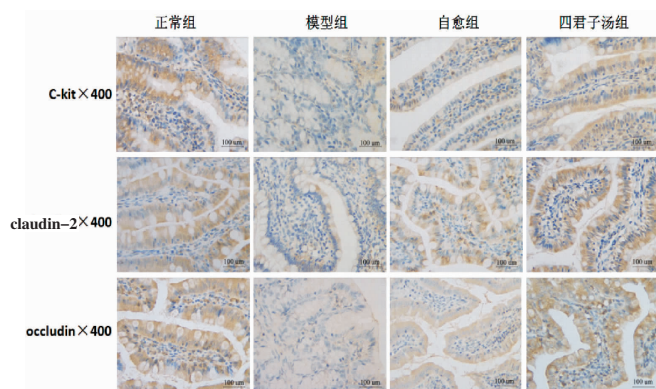


图2 各组小鼠小肠组织 c-kit、claudin-2、occludin 免疫组化染色结果

热毒型、血瘀型、气虚型、湿热型等几种常见类型<sup>[7]</sup>,其中以气虚型胃肠功能衰竭最为常见。因此,本研究取芒硝苦寒泻下的特性,使小鼠久泻而致气虚,而芒硝本身对肠黏膜无损害作用<sup>[8]</sup>,从而说明气虚是导致胃肠功能衰竭的一大原因。本实验模型选用四君子汤进行治疗,符合《太平惠民和剂局方》卷3中“荣卫气虚,脏腑怯弱。心腹胀满,全不思食,肠鸣泄泻,呕哕吐逆,大宜服之”的方义。方中人参甘温,益气补中为君;白术苦温,健脾燥湿,合人参以益气健脾为臣;茯苓甘淡,渗湿健脾为佐;炙甘草甘平,和中为使,可用于调和药材,和中益气<sup>[9]</sup>。四味皆为平和之品,温而不燥,补而不峻,故名四君子汤。

AGI 是危重病患者的常见并发症,以胃肠道黏膜损害以及运动和屏障功能障碍为主要特点。ICC 作为胃肠起搏细胞,主要参与胃肠基本电节律调控和神经递质信号转导,在胃肠运动机制中有重要作用,c-kit 是 ICC 的特异性受体,可通过标记 c-kit 抗体来识别 ICC<sup>[10-12]</sup>。肠黏膜屏障是一个复杂的半透屏障,主要由机械屏障、化学屏障、免疫屏障与生物屏障共同构成,机械屏障由肠道上皮细胞和他们之间的紧密连接构成,是维持肠黏膜屏障功能的主要因素,闭合蛋白 claudins 对维持上皮细胞极性调节胃肠功能的通透性发挥着重要作用<sup>[13]</sup>。因此,本试验对小鼠小肠组织中 c-kit 及 claudin-2、occludin 的表达进行测定,以研究四君子汤对气虚型 AGI 小鼠的治疗作用。

HE 染色结果显示:四君子汤对于急性胃肠损伤小鼠的胃肠道动力和肠黏膜通透性增有明显改善作用。免疫组化结果显示:与正常组比较,实验组各组 c-kit、claudin-2、occludin 表达明显下降

( $P < 0.01$ )。与模型组比较,四君子汤组与自愈组 c-kit、claudin-2、occludin 表达显著上升( $P < 0.01$ );与自愈组比较,四君子汤组 c-kit、claudin-2、occludin 表达显著上升( $P < 0.01$ )。结果表明,四君子汤可以促进 c-kit 及 claudin-2、occludin 的表达,增加 ICC 数量,维持肠黏膜的完整性。综上所述,四君子汤能明显改善气虚型 AGI 小鼠的胃肠道动力和肠黏膜通透性,为中医药治疗气虚型 AGI 提供了一定的实验依据。但实验目前尚处于初期阶段,团队后期将对其具体机制作进一步研究。

## 参考文献

- [1] BLASER A R, MALBRAIN M L N G, STARKOPF J, et al. Gastrointestinal function in intensive care patients: terminology, definitions and management. recommendations of the ESICM working group on abdominal problems[J]. Intensive Care Medicine, 2012, 38(3):384-394.
- [2] MUTLU G M, MUTLU E A, FACTOR P. GI complications in patients receiving mechanical ventilation[J]. Chest, 2001, 119(4): 1222-1241.
- [3] REINTAM A, PARM P, KITUS R, et al. Correction: gastrointestinal failure score in critically ill patients: a prospective observational study[J]. Critical Care, 2008, 12(6):435.
- [4] HUANG L Q, SHEN W, QIU T, et al. Establishment of mouse model of qi-deficiency gastrointestinal failure[J]. Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents, 2019,33(1):237-244.
- [5] 池绍龙.四君子汤在中医内科疾病脾胃气虚证中的应用[J].中国医药指南, 2015, 13(3):213-214.
- [6] 潘大洲.对中医内科疾病脾胃虚证给予四君子汤治疗的效果分析[J].中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(2):186.
- [7] 赵 胜,廖小明,钟小兰.简谈中西医对重症急性胃肠功能损伤的认识和中医治则[J].贵阳中医学院学报, 2006, 28(6):7-8.
- [8] 江明性.药理学[M].3 版.北京:人民卫生出版社, 1989, 261.
- [9] 刘 琳,李 岩.四君子汤对胃肠道药理作用的研究进展[J].医学综述, 2019, 5(25):990-994.
- [10] 肖清平,洪燕秋,耿学斯,等.肠润方对功能性便秘大鼠结肠 Cajal 间质细胞及 c-kit/SCF 信号通路的影响[J].中医药通报, 2020, 19(2): 57-62.
- [11] SANDERS K M. Interstitial cells of cajal at the clinical and scientific interface[J]. The Journal of Physiology, 2006, 576(3): 683-687.
- [12] LINOS, HORIGUCHI K. Interstitial cells of cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract[J]. Acta Histochemica ET Cytochemica, 2006, 39(6): 145-153.
- [13] 李思宇,王庆松.慢性脑低灌注对大鼠回肠黏膜 Occludin 及 Claudin-2 表达的影响[J].中国组织工程研究, 2020, 24(32):5186-5191.