

·实验研究·

本文引用: 伍冲梅, 潘 坤, 谢果珍, 郑 淘, 惠华英. 葛根苓连汤对肠道湿热证泄泻小鼠肠道机械屏障的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(8): 1351-1359.

## 葛根苓连汤对肠道湿热证泄泻小鼠肠道机械屏障的影响

伍冲梅<sup>1</sup>, 潘 坤<sup>2</sup>, 谢果珍<sup>1</sup>, 郑 淘<sup>1</sup>, 惠华英<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208

**[摘要]** **目的** 探讨葛根苓连汤对肠道湿热证泄泻模型小鼠肠道机械屏障的作用机制。**方法** 选取 15 只 SPF 级雄性昆明小鼠, 随机分为正常组 5 只和模型组 10 只。采取“高糖高脂+高温高湿+白酒稀释液+冰水法”复制肠道湿热证泄泻小鼠模型, 造模成功的 10 只小鼠随机分为自愈组和治疗组, 每组 5 只。治疗组灌胃 5.07 g/(kg·d) 葛根苓连汤水煎液, 正常组和自愈组给予等容积无菌水, 连续灌胃 4 d 后无菌提取各组小鼠十二指肠、空肠和回肠肠段。观察各组小鼠一般状态; HE 染色观察各组肠段形态; 采用 Image J 图像处理软件测量各组绒毛长度 (villus height, VH)、隐窝深度 (crypt depth, CD), 计算 VH 与 CD 的比值 (绒隐比, V/C)、杯状细胞数目和紧密连接蛋白平均光密度值 (average optical density value, AOD); 采用二步法免疫组织化学法分析各肠段密封蛋白 1 (Claudin 1)、闭合蛋白 (Occludin) 和紧密连接蛋白-1 (zonula occluden-1, ZO-1) 的表达。**结果** 正常组小鼠毛发有光泽, 精神状态佳, 饮水量、肛温和二便均正常; 治疗组小鼠毛发洁白、精神状态良好、大便颗粒饱满、肛温恢复正常、泄泻症状消失; 自愈组小鼠毛发暗淡、肛温高、大便含水量较多、挤压不成型。与正常组相比, 自愈组十二指肠、空肠和回肠肠黏膜结构部分受损, 小肠腺出现萎缩, 出现炎症症状。与自愈组相比, 治疗组肠黏膜结构较清晰, 肠上皮细胞和固有层细胞排列紧密, 炎症情况明显改善。与正常组相比, 自愈组十二指肠 CD 升高 ( $P<0.01$ ), 十二指肠 V/C 和杯状细胞数降低 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 治疗组十二指肠 V/C 降低 ( $P<0.05$ )。与正常组相比, 自愈组空肠、回肠 VH 和 V/C 均明显降低 ( $P<0.05, P<0.01$ )。与自愈组相比, 治疗组十二指肠 CD 显著降低 ( $P<0.01$ ), 十二指肠、回肠 V/C 升高 ( $P<0.05, P<0.01$ )。十二指肠肠段, 与正常组相比, 自愈组和治疗组 Claudin 1、Occludin、ZO-1 AOD 值降低 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 与自愈组相比, 治疗组 Claudin 1、Occludin、ZO-1 AOD 值显著升高 ( $P<0.01$ )。与正常组比较, 自愈组空肠、回肠肠段 Occludin AOD 值明显降低 ( $P<0.01$ )。与自愈组比较, 治疗组空肠肠段 Claudin 1 AOD 值升高 ( $P<0.05$ ), 回肠肠段 Occludin AOD 值明显升高 ( $P<0.01$ )。**结论** 葛根苓连汤可改善肠道湿热证泄泻小鼠肠道炎症水平、促进紧密连接蛋白 Claudin1、Occludin 和 ZO-1 的表达, 其机制可能与修复肠道机械屏障功能有关。

**[关键词]** 泄泻; 肠道湿热证; 葛根苓连汤; 机械屏障; 肠道形态; 紧密连接蛋白

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.08.001

## Effects of Gegen Qinlian Decoction on the intestinal mechanical barrier in diarrhea mice with intestinal dampness-heat pattern

WU Chongmei<sup>1</sup>, PAN Kun<sup>2</sup>, XIE Guozhen<sup>1</sup>, ZHENG Tao<sup>1</sup>, HUI Huaying<sup>1\*</sup>

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effects of Gegen Qinlian Decoction on the intestinal mechanical barrier in diarrhea

**[收稿日期]** 2024-05-15

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81703985); 湖南省卫生健康委员会科研计划项目 (D202303038538)。

**[通信作者]** \* 惠华英, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: huihuaying2003@126.com。

mice with intestinal dampness-heat pattern. **Methods** Fifteen SPF male Kunming mice were randomized into normal group ( $n=5$ ) and model group ( $n=10$ ). The diarrhea model with intestinal dampness-heat pattern was replicated by the method of "high sugar and high fat + high temperature and high humidity + liquor dilution + ice water", and 10 successfully modeled mice were randomized into self-healing group and treatment group, with five mice in each group. The treatment group was administered with 5.07 g/(kg·d) Gegen Qinlian Decoction, and the normal group and self-healing group were given equal volumes of sterile water. The duodenum, jejunum, and ileum segments of mice in each group were aseptically extracted after 4 d of gavage. The general condition of the mice was observed; HE staining was used to observe the morphology of each intestinal segment. Image J processing software was used to measure the villus height (VH) and crypt depth (CD) in each group, and the ratio of VH to CD (V/C), the number of goblet cells, and the average optical density (AOD) value of tight junction protein were calculated. Two-step immunohistochemistry was used to analyze the expressions of Claudin 1, Occludin, and zonula occluden-1 (ZO-1). **Results** The normal group of mice had shiny hair, good mental state, normal water intake and rectal temperature, and normal stool and urine. The treatment group of mice had white hair, good mental state, full stool particles, normally recovered rectal temperature, and disappearance of diarrhea symptoms. The self-healing group of mice had dull hair, high rectal temperature, stool with high water content, and the stool did not hold shapes when squeezed. Compared with the normal group, the mucosal structure of the duodenum, jejunum, and ileum in the self-healing group was partially damaged, with atrophy of the intestinal glands and inflammatory symptoms. Compared with the self-healing group, the mucosal structure in the treatment group was clearer, with tightly arranged intestinal epithelial cells and lamina propria cells, and the inflammatory condition was significantly improved. In comparison to the normal group, the CD of the duodenum in the self-healing group was higher ( $P<0.01$ ), and the V/C and the number of goblet cells were lower ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) in the duodenum; the V/C in the treatment group was lower ( $P<0.05$ ). Compared with the normal group, the VH and V/C of the jejunum and ileum in the self-healing group were significantly reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the self-healing group, the CD of the duodenum in the treatment group was significantly lower ( $P<0.01$ ), while the V/C of the duodenum and ileum were significantly higher ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). In the duodenal segment, compared with the normal group, the AOD values of Claudin 1, Occludin, and ZO-1 proteins were lower in both the self-healing and treatment groups ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); compared with the self-healing group, the AOD value of Claudin 1, Occludin, and ZO-1 proteins in the treatment group were significantly higher ( $P<0.01$ ). Compared with the normal group, the AOD value of Occludin protein in the jejunum and ileum was significantly lower in the self-healing group ( $P<0.01$ ). Compared with the self-healing group, the AOD value of Claudin 1 protein in the jejunum was higher in the treatment group ( $P<0.05$ ), and the AOD value of Occludin protein in the ileum was significantly elevated ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Gegen Qinlian Decoction can improve the level of intestinal inflammation in diarrhea mice with intestinal dampness-heat pattern and promote the expression of tight junction proteins Claudin 1, Occludin, and ZO-1. Its mechanism may be related to its repairing function on intestinal mechanical barrier.

[**Keywords**] diarrhea; intestinal dampness-heat pattern; Gegen Qinlian Decoction; mechanical barrier; intestinal morphology; tight junction protein

肠道湿热证泄泻是泄泻中常见的中医证型,其主要由外感湿热或内伤饮食致脾失健运,湿热蕴结于肠内所引起<sup>[1-2]</sup>。临床中引起腹泻的诱因较多,包括病毒及细菌感染、肠道菌群、饮食等,对于腹泻的治疗通常使用抗生素、微生态制剂、益生菌或补充电解质等方法<sup>[3]</sup>,但症状反复出现,且抗生素的使用对身体有潜在的损害。研究发现,肠道湿热证泄泻的发病机制与肠道屏障密切相关,肠道湿热证泄泻可引起肠道屏障受损,肠道通透性增加<sup>[4]</sup>。小肠是消化吸收食物的重要场所,也是机体重要的免疫器官,肠道功能的完整性对机体健康极为重要。肠道屏障包括机械屏障、生物屏障、化学屏障和免疫屏障<sup>[5]</sup>,其中机械屏障是肠道第一防线<sup>[6]</sup>,具有选择透过性,既可

转运身体所需物质,又能有效阻止细菌、毒素和炎症介质等进入肠内<sup>[7]</sup>。机械屏障主要由上皮细胞和细胞间紧密连接构成,细胞间紧密连接包括密封蛋白1(Claudin 1)、闭合蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白-1(zonula occluden-1, ZO-1)和连接黏附蛋白分子,是机械屏障发挥作用的关键结构<sup>[8]</sup>。轮状病毒引发的湿热证泄泻可导致 Occludin、Claudin1 和 ZO-1 的蛋白表达降低、紧密连接功能丧失和肠黏膜通透性紊乱<sup>[9]</sup>。研究表明,肠道湿热证泄泻可致使新生仔猪的十二指肠、空肠和回肠的形态结构受损,增加炎症反应,给予加味葛根芩连汤治疗后湿热证泄泻得到改善<sup>[10]</sup>。本课题组前期研究证实,肠道湿热证泄泻模型小鼠存在肠道炎症反应<sup>[11]</sup>。

葛根芩连汤出自东汉著名医学家张仲景撰著的《伤寒杂病论·太阳篇》，由葛根、黄芩、黄连和炙甘草组成，为解表清里方剂，主治协热下利证<sup>[12]</sup>。方中葛根辛甘而凉，归脾、胃经，既能解表退热，又能升脾胃清阳之气而治下利，故为君药；黄连、黄芩清热燥湿、厚肠止利，故为臣药；炙甘草甘缓和中，调和诸药，为佐使药，全方共奏解肌透表、清热解毒、利湿止泻之功。葛根芩连汤在临床上常用于治疗急性肠炎、细菌性痢疾、胃肠型感冒等表证未解、里热甚者<sup>[13]</sup>。研究表明，葛根素可促进 Occludin 的表达，重建肠道机械屏障，并抑制炎症细胞因子的表达，减轻肠易激综合征泄泻大鼠的泄泻和结肠炎症反应<sup>[14]</sup>。加味葛根芩连汤可上调紧密连接蛋白 ZO-1、Claudin 1 和 Occludin 的表达，改善小鼠葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎<sup>[15]</sup>。既往研究表明，葛根芩连汤可在一定程度上改善肠道湿热证泄泻，但具体机制有待深入研究，故本研究旨在探讨葛根芩连汤对肠道湿热证泄泻模型小鼠肠道形态和细胞间紧密连接的影响，进一步明确葛根芩连汤对肠道湿热证泄泻的作用机制，为临床葛根芩连汤的临床使用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 动物来源

选取4周龄SPF级雄性昆明小鼠15只，体质量18~22 g，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[动物生产许可证号：SCXK(湘)2016-0002]，饲养于湖南中医药大学实验动物中心[实验单位使用许可证号：SYXK(湘)2019-0009]，环境室温为23~25℃，相对湿度为50%~70%。实验方案经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准(伦理批准号：SLBH202207050001)。

### 1.2 主要试剂与仪器

葛根、黄芩、黄连、炙甘草(生产批号分别为NG21050606、HH21050603、HH21042702、210402)购于湖南中医药大学第一附属医院。56度红星二锅头(北京红星股份有限公司，规格：50 mL)；4%多聚甲醛组织固定液(北京兰杰柯科技有限公司，批号：BL-539A)；PBS磷酸缓冲液(上海博湖生物科技有限公司，批号：20201119)；Claudin 1抗体、Occludin抗体、ZO-1抗体、PV9000通用二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司，批号：AF0127、DF7504、AF5145、R1510-33)。

PRX-280C型人工气候箱(江苏天翎仪器有限公

司)；BCD220WP3CX型超低温冰箱(合肥美菱股份有限公司)；徕卡RM2235型轮转石蜡切片机[徕卡显微系统(上海)有限公司]；金迪YD-A生物组织摊片机(浙江省金华科迪仪器有限公司)；Motic BA410研究型显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

### 1.3 葛根芩连汤水煎液的制备

葛根芩连汤制备过程<sup>[1]</sup>：先将葛根加水浸泡30 min，再将黄芩、黄连和炙甘草浸泡30 min，葛根武火煮沸后转文火继续煎煮20 min，加入剩余药味，沸腾后继续煎煮30 min，三层纱布过滤；往滤渣中继续加水200 mL，大火煮沸后转小火煎煮30 min过滤，合并两次所得滤液，小火浓缩得到含生药量为0.25 g/mL的水煎液，4℃冰箱保存备用。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模及给药

小鼠适应性饲养3 d后随机分为正常组5只和模型组10只。模型组采用“高糖高脂+高温高湿+白酒+冰水法”复制肠道湿热证泄泻小鼠模型。15 d后出现饮水量增加、肛温升高、毛发变暗、精神状态差、小便短黄、粪便黄褐臭秽，则提示造模成功<sup>[16]</sup>。造模成功后，模型组小鼠分为治疗组和自愈组，每组5只。根据课题组前期研究结果，治疗组小鼠每天给药剂量为5.07 g/kg<sup>[17]</sup>，灌胃葛根芩连汤水煎液体积为20 mL/(kg·d)，2次/d，连续治疗4 d。正常组和自愈组给予等量无菌蒸馏水。

### 2.2 小鼠一般状态观察

根据《泄泻中医诊疗专家共识意见(2017)》<sup>[16]</sup>中肠道湿热证泄泻症状，每天观察小鼠的大便性状、饮水量、体质量、肛温、小便、毛发、精神状态、活动程度等情况。

### 2.3 HE染色法检测小鼠肠道形态

无菌条件下采集各组小鼠十二指肠、空肠和回肠的肠段，每个肠段约3 cm，放入4%多聚甲醛中固定。十二指肠、空肠和回肠组织用乙醇和二甲苯脱水，石蜡包埋，切成4 μm厚薄片，采用HE染色在光学显微镜下观察各肠段的病理变化。并用Image J Pro Plus 6.0图像处理软件测量各组绒毛长度(villus height, VH)、隐窝深度(crypt depth, CD)，计算VH与CD的比值(绒毛隐比, V/C)和杯状细胞数，每个样本随机测量5组读数取平均值。VH为小肠固有层和上皮共同凸向肠腔形成的长度，CD为小肠

上皮在绒毛根部下陷至固有层而形成的管状腺的距离。

#### 2.4 二步法免疫组织化学法检测 Claudin1、Occludin 和 ZO-1 蛋白表达情况

首先将各组织石蜡切片进行脱蜡和水化,然后用 3%过氧化氢去离子水孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次,每次 2 min。接着分别滴加一抗 Claudin 1(1:200)、Occludin(1:200)和 ZO-1(1:200), 4℃过夜, PBS 冲洗。随后,滴加 Polymer Helper 室温孵育 20 min, PBS 洗涤。再滴加二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体,室温孵育 20 min,用 PBS 冲洗。DAB 溶液显色,最后用自来水充分冲洗、苏木素复染、脱水、透明、封片。使用显微镜观察并拍摄 IHC 染色的结果,运用 Image J 软件计算紧密连接蛋白 Claudin 1、Occludin 和 ZO-1 的平均光密度(average optical density, AOD)值,在 200 倍视野下每组选取 5 个样本测定 AOD 值。AOD 值包含表达面积和表达浓度信息,在选定的面积一定时,AOD 值越大,表示紧密连接蛋白 Claudin1、Occludin 和 ZO-1 的表达越强,表示其相对表达量越高。

#### 2.5 统计学分析

各组所得数据采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,利用 SPSS 26.0 进行组间差异分析。服从正态分布的数据组间比较采用单因素方差分析,非正态分布采用 *Kruskal-Wallis H* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 小鼠一般状态观察

治疗前,正常组小鼠精神状态良好,活泼灵敏,饮水量、肛温和二便均正常,模型组小鼠出现毛发暗淡无光泽,活动减少,爪甲抓握力差,大便稀黄,肛门污秽,饮水量增加。治疗 4 d 后,治疗组小鼠毛发洁白有光泽,活跃好动,精神状态佳,大便颗粒饱满,肛温恢复正常,泄泻症状消失;自愈组小鼠大便含水量较多,挤压不成型。

#### 3.2 各组小鼠肠道形态的情况比较

3.2.1 各组小鼠十二指肠形态的情况比较 正常组微绒毛边缘整齐,黏膜结构完整,肠上皮细胞紧密有序排列。自愈组肠黏膜结构部分受损,浅层黏膜部分坏死,肠上皮细胞数目减少,小肠腺伴有一定程度萎缩,绒毛顶端脱落,肌层可见部分炎症细胞浸润,中央乳糜管扩张。与治疗组相比,治疗组小鼠肠黏膜结构较清晰,肠上皮细胞和固有层细胞排列紧密,绒毛顶端部分坏死脱落,肌层炎症消退。详见图 1。

与正常组相比,自愈组 CD 升高( $P < 0.01$ ),V/C 和杯状细胞数降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );治疗组 V/C 降低( $P < 0.05$ )。与自愈组相比,治疗组 CD 显著降低( $P < 0.01$ ),V/C 显著升高( $P < 0.01$ );各组间的 VH 无统计学意义( $P > 0.05$ )。详见表 1。

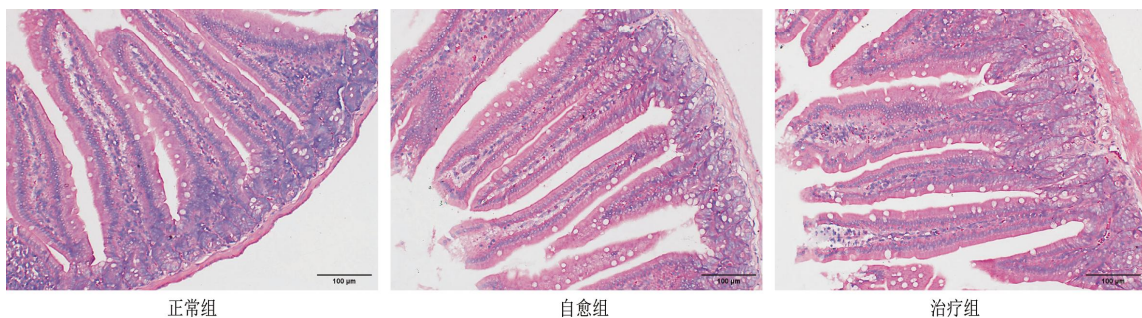


图 1 各组小鼠十二指肠 HE 染色( $\times 200$ , 标尺: 100  $\mu\text{m}$ )

Fig.1 Mouse duodenal HE staining in each group ( $\times 200$ , bar: 100  $\mu\text{m}$ )

表 1 各组小鼠十二指肠 VH、CD、V/C 和杯状细胞的情况比较

Table 1 Comparison of duodenal VH, CD, V/C and goblet cells in each group

组别	十二指肠 VH/ $\mu\text{m}$	十二指肠 CD/ $\mu\text{m}$	十二指肠 V/C	十二指肠杯状细胞数/个
正常组	395.883 $\pm$ 68.704	71.106 $\pm$ 7.514	5.546 $\pm$ 0.554	37.000 $\pm$ 3.000
自愈组	330.840 $\pm$ 88.892	109.501 $\pm$ 18.380**	3.003 $\pm$ 0.629**	29.800 $\pm$ 3.701*
治疗组	349.818 $\pm$ 76.803	73.706 $\pm$ 12.930 <sup>##</sup>	4.714 $\pm$ 0.252 <sup>##</sup>	33.400 $\pm$ 6.189

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与自愈组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

3.2.2 各组小鼠空肠形态的情况比较 正常组空肠黏膜结构完好,绒毛长而完整,固有层细胞和上皮细胞排列紧密,形态结构规则。与正常组比较,自愈组肠黏膜出现断裂,绒毛部分受损,微绒毛边缘参差不齐,肠上皮细胞减少较为严重,且固有层分离水肿及出现炎症症状;与自愈组对比,治疗组肠黏膜结构清晰,固有层结构完整,肠绒毛部分松脱,空肠炎症得到改善。详见图2。

与正常组相比,自愈组 VH 和 V/C 均明显降低 ( $P<0.01$ )。与自愈组相比,治疗组 VH、CD、V/C 和杯状细胞数差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。详见表2。

3.2.3 各组小鼠回肠形态的情况比较 正常组小鼠回肠黏膜结构清晰,上皮细胞排列紧密,形态规则,杯状细胞较多,微绒毛排列紧密整齐;自愈组小鼠黏膜显著变薄、坏死,部分脱落,部分黏膜皱襞消失,小

肠腺萎缩,肌层淋巴细胞增多,脱落的绒毛中炎性细胞聚集;与自愈组比较,治疗组可见一定程度的改善,上皮细胞排列紧密,肠黏膜和小肠腺恢复完整,微绒毛排列整齐,炎症得到一定程度减轻。详见图3。

与正常组相比,自愈组、治疗组 VH、V/C 均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),治疗组 CD 降低 ( $P<0.05$ )。与自愈组相比,治疗组 V/C 升高 ( $P<0.05$ )。各组间杯状细胞数差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。详见表3。

### 3.3 各组小鼠各肠段紧密连接蛋白的表达水平比较

#### 3.3.1 各组小鼠各肠段 Claudin 1 的表达水平比较

十二指肠肠段,与正常组相比,自愈组和治疗组 AOD 值降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与自愈组相比,治疗组 AOD 值显著升高 ( $P<0.01$ )。空肠肠段,与自愈组相比,治疗组 AOD 值升高 ( $P<0.05$ )。回肠肠段,各组之间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。详见图4、表4。



图2 各组小鼠空肠 HE 染色( $\times 200$ ,标尺:100  $\mu\text{m}$ )

Fig.2 Staining of jejunal HE in each group ( $\times 200$ , bar: 100  $\mu\text{m}$ )

表2 各组小鼠空肠 VH、CD、V/C 和杯状细胞的情况比较

Table 2 Comparison of jejunal VH, CD, V/C and goblet cells in each group

组别	空肠 VH/ $\mu\text{m}$	空肠 CD/ $\mu\text{m}$	空肠 V/C	空肠杯状细胞数/个
正常组	306.569 $\pm$ 17.396	71.451 $\pm$ 14.659	4.353 $\pm$ 0.194	46.400 $\pm$ 7.893
自愈组	221.404 $\pm$ 4.330**	77.914 $\pm$ 3.765	2.843 $\pm$ 0.028**	35.400 $\pm$ 7.162
治疗组	252.851 $\pm$ 6.649	74.265 $\pm$ 3.765	3.404 $\pm$ 0.020	45.200 $\pm$ 11.904

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ 。

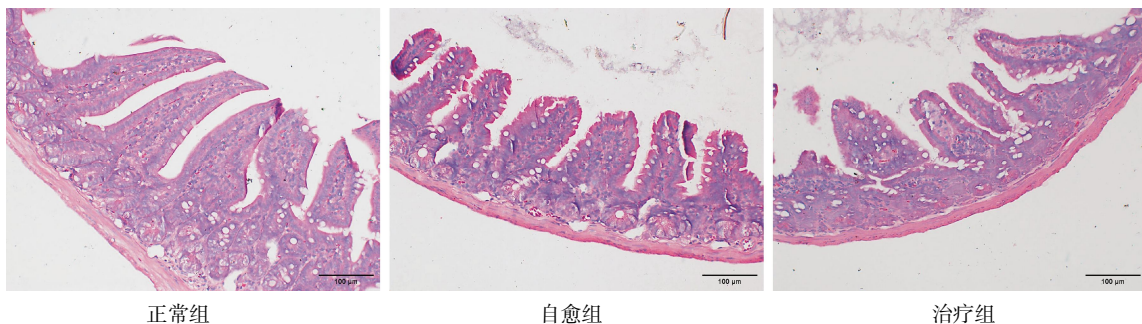


图3 各组小鼠回肠 HE 染色( $\times 200$ ,标尺:100  $\mu\text{m}$ )

Fig.3 HE staining of ileum in each group of mice ( $\times 200$ , bar: 100  $\mu\text{m}$ )

表 3 各组小鼠回肠 VH、CD、V/C 和杯状细胞的情况比较

Table 3 Comparison of ileal VH, CD, V/C and goblet cells in each group

组别	回肠 VH/ $\mu\text{m}$	回肠 CD/ $\mu\text{m}$	回肠 V/C	回肠杯状细胞数/个
正常组	280.027 $\pm$ 8.230	98.851 $\pm$ 14.745	2.864 $\pm$ 0.277	53.500 $\pm$ 8.226
自愈组	143.050 $\pm$ 2.151*	85.619 $\pm$ 12.019	1.691 $\pm$ 0.181**	36.500 $\pm$ 11.475
治疗组	160.607 $\pm$ 13.096*	78.396 $\pm$ 8.446*	2.040 $\pm$ 0.189***	37.250 $\pm$ 11.529

注:与正常组比较,\* $P$ <0.05,\*\* $P$ <0.01;与自愈组比较,\* $P$ <0.05。

表 4 各肠段 Claudin 1 的 AOD 值比较

Table 4 Comparison of AOD values of Claudin 1 in each intestinal segment

组别	十二指肠	空肠	回肠
正常组	0.535 $\pm$ 0.033	0.483 $\pm$ 0.023	0.600 $\pm$ 0.033
自愈组	0.429 $\pm$ 0.031**	0.439 $\pm$ 0.024	0.566 $\pm$ 0.016
治疗组	0.489 $\pm$ 0.028***	0.535 $\pm$ 0.102*	0.605 $\pm$ 0.046

注:与正常组比较,\* $P$ <0.05,\*\* $P$ <0.01;与自愈组比较,\* $P$ <0.05,\*\*\* $P$ <0.01。

3.3.2 各组小鼠各肠段 Occludin 蛋白的表达水平比较 十二指肠肠段,与正常组比较,自愈组和治疗组 AOD 值显著降低( $P$ <0.01);与自愈组比较,治疗组 AOD 值显著升高( $P$ <0.01)。与正常组比较,自愈

组空肠、回肠肠段 AOD 值明显降低( $P$ <0.01);与自愈组比较,治疗组回肠肠段 AOD 值明显升高( $P$ <0.01)。详见图 5、表 5。

### 3.3.3 各组小鼠各肠段 ZO-1 蛋白的表达水平比较

十二指肠肠段,与正常组比较,自愈组和治疗组 AOD 值显著降低( $P$ <0.01);与自愈组比较,治疗组 AOD 值显著升高( $P$ <0.01)。详见图 6、表 6。

## 4 讨论

随着生活方式改变,肠道湿热证泄泻的发病率呈增长趋势<sup>[7]</sup>。中医学认为肠道湿热证泄泻的发病机制为湿热伤及中焦,津为热迫而下注<sup>[8]</sup>,其临床表现为腹痛腹泻、泻下急迫、便稀臭秽,其发展和恶化

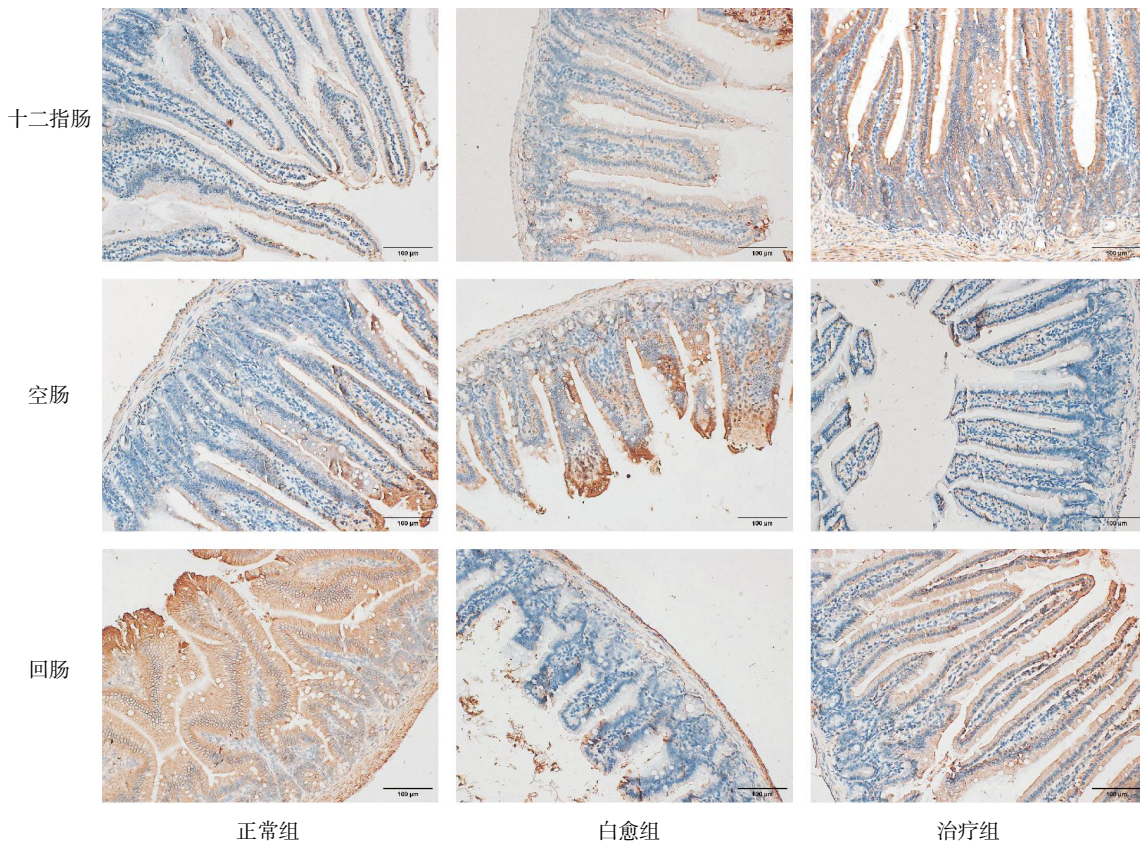


图 4 各组小鼠各肠段 Claudin 1 的表达水平比较(二步法免疫组织化学,×200,标尺:100  $\mu\text{m}$ )

Fig.4 Comparison of Claudin 1 expression levels in each intestinal segment of mice in different groups (two-step immunohistochemistry, ×200, bar: 100  $\mu\text{m}$ )

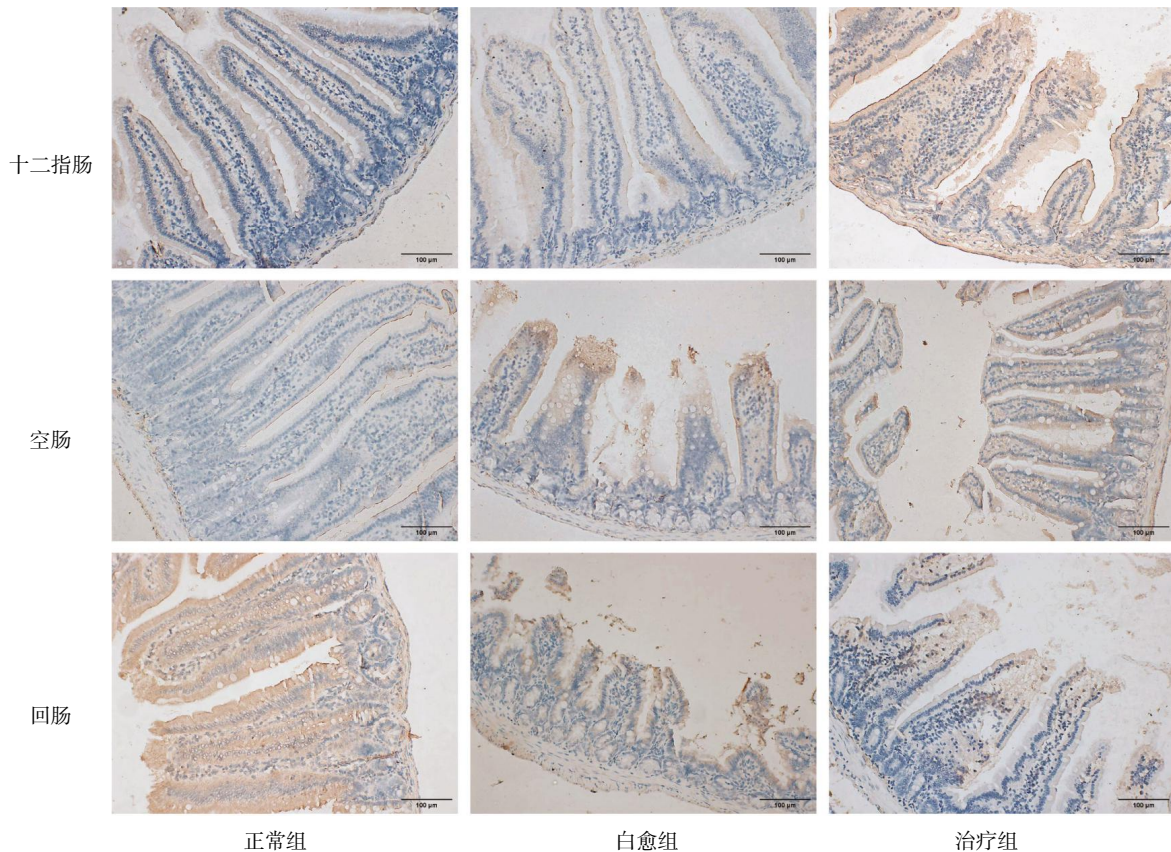


图5 各组小鼠各肠段 Occludin 的表达水平比较(二步法免疫组织化学,×200,标尺:100 μm)

Fig.5 Comparison of the expression levels of Occludin in each intestinal segment of mice in different groups (two-step immunohistochemistry, ×200, bar: 100 μm)

表5 各肠段 Occludin 的 AOD 值比较

Table 5 Comparison of AOD values of Occludin in each intestinal segment

组别	十二指肠	空肠	回肠
正常组	0.486±0.015	0.379±0.003	0.508±0.078
自愈组	0.337±0.011**	0.313±0.010**	0.391±0.013**
治疗组	0.404±0.046**#	0.348±0.013	0.523±0.064#

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与自愈组比较,# $P<0.01$ 。

的主要原因之一为肠道屏障受损<sup>[19]</sup>。葛根芩连汤为解表清里的经典方剂,临床主要用于治疗湿热泄泻等胃肠道疾病<sup>[20]</sup>。

肠道机械屏障是肠道屏障的一个重要组成部分,而肠道形态是评估肠道屏障完整性的重要指标,指标包括 VH、CD、V/C 和杯状细胞数<sup>[21]</sup>。肠绒毛作为肠黏膜的重要组成部分,不但吸收营养物质、帮助物质运输,还能通过蠕动排出定植肠道内的有害物质。VH 增加,有利于增强肠道物质吸收功能。CD 反映小肠上皮细胞的成熟程度,CD 越浅表明肠上皮细胞成熟率越高,分泌功能增强<sup>[22]</sup>。V/C 值可用于评

价肠绒毛的萎缩程度及肠道功能状态,V/C 值增加意味着肠黏膜吸收功能增强<sup>[23]</sup>。在 HE 染色中,杯状细胞为空泡状,其主要功能是分泌黏蛋白,维持肠道屏障稳态及发挥润滑作用<sup>[24]</sup>。杯状细胞能分泌黏蛋白形成肠道黏液层,保护肠上皮,在肠黏膜损伤后的重建过程中起重要作用<sup>[25]</sup>。本研究中发现,采用葛根芩连汤对肠道湿热证泄泻小鼠进行干预后,由肠道 HE 染色图片可以看出,治疗组小鼠肠道微绒毛恢复到排列整齐状态,炎性浸润程度降低,且治疗后的小鼠肠道十二指肠和回肠的 V/C 值较自愈组增加,十二指肠的 CD 变浅。本研究结果提示,葛根芩连汤对肠道湿热证泄泻小鼠十二指肠、空肠和回肠的肠道形态具有一定改善作用,可促进肠道吸收、屏障和免疫功能的恢复。

机械屏障主要由肠上皮细胞和细胞间紧密连接组成,为肠道抵抗外界环境的首要防线,能有效阻止病原体的侵袭和有害物质的进入<sup>[26]</sup>。细胞间紧密连接蛋白是肠黏膜上皮细胞的关键结构,在调控肠道黏膜通透性和维持细胞内环境稳定中起到重要

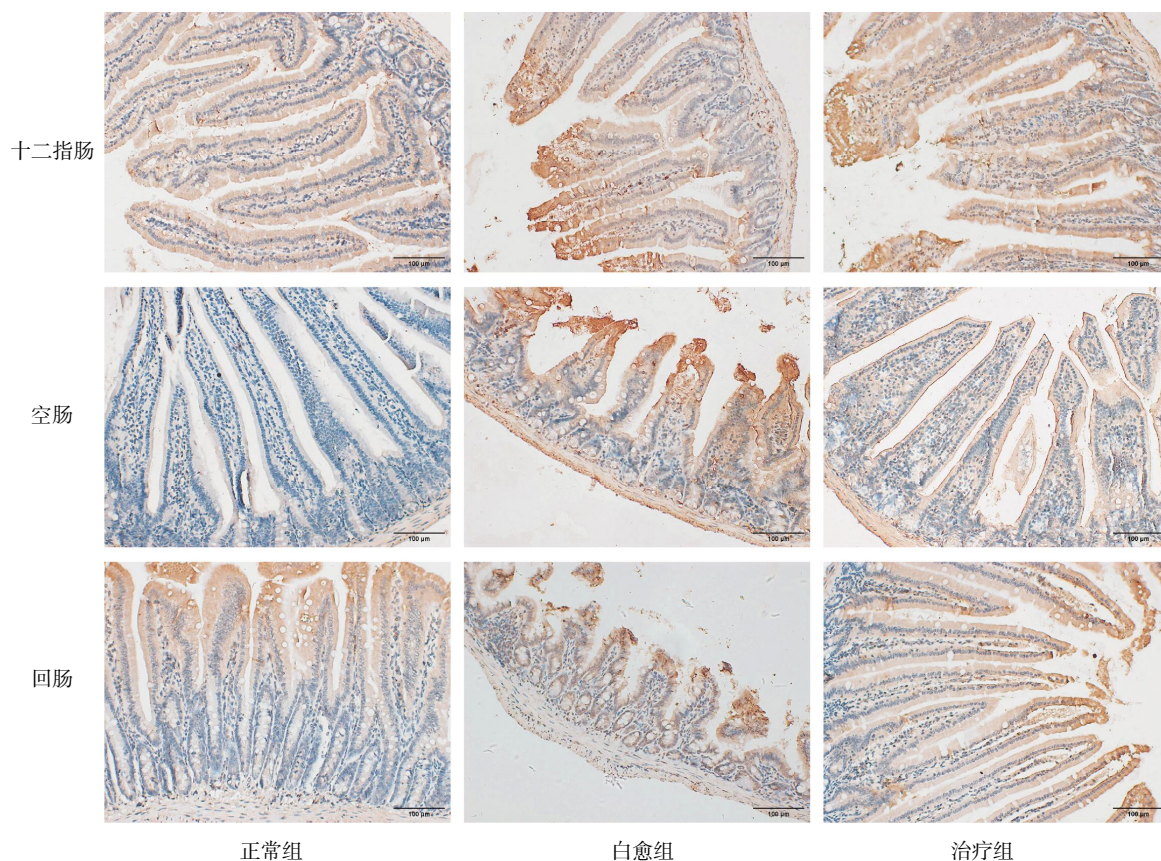


图 6 各组小鼠各肠段 ZO-1 的表达水平比较(二步法免疫组织化学,  $\times 200$ , 标尺:  $100 \mu\text{m}$ )

Fig.6 Comparison of the expression levels of ZO-1 in each intestinal segment of mice in each group (two-step immunohistochemistry,  $\times 200$ , bar:  $100 \mu\text{m}$ )

表 6 各肠段 ZO-1 的 AOD 值比较

Table 6 Comparison of AOD values of ZO-1 in each intestinal segment

组别	十二指肠	空肠	回肠
正常组	$0.525 \pm 0.027$	$0.534 \pm 0.008$	$0.541 \pm 0.037$
自愈组	$0.395 \pm 0.012^{**}$	$0.474 \pm 0.026$	$0.523 \pm 0.048$
治疗组	$0.463 \pm 0.045^{***\#}$	$0.506 \pm 0.023$	$0.529 \pm 0.068$

注:与正常组比较,  $**P < 0.01$ ;与自愈组比较,  $\#P < 0.01$ 。

作用<sup>[27]</sup>。Claudin 1 和 Occludin 属于跨膜蛋白, ZO-1 为胞质蛋白,可与一些跨膜蛋白结合发挥选择性屏障保护作用<sup>[28]</sup>。ZO-1 蛋白表达减少,将导致其他紧密连接蛋白的表达下调,使得紧密连接结构完整性遭到破坏,引起肠黏膜屏障功能下降<sup>[29]</sup>。Occludin 的缺乏,会导致肠黏膜屏障功能障碍,肠道通透性增加,引起腹泻<sup>[4]</sup>。本研究分析了正常组、自愈组和治疗组小鼠肠道中 Claudin 1、Occludin 和 ZO-1 的蛋白表达情况,其中二步法免疫组织化学结果显示肠道湿热型泄泻致使自愈组小鼠十二指肠组织中 Claudin 1、Occludin、ZO-1 及空肠和回肠段 Occludin 的表达减少,肠道机械屏障遭受破坏。采用葛根芩

连汤治疗后,小鼠十二指肠中 Claudin 1、Occludin、ZO-1 的 AOD 值,空肠中 Claudin 1 的 AOD 值以及回肠中 Occludin 的 AOD 值均增加,提示蛋白表达上调,说明葛根芩连汤可能通过调控肠道紧密连接蛋白促进受损伤的肠道机械屏障修复。

综上所述,葛根芩连汤可改善肠道湿热证泄泻小鼠的肠道炎症状态,调控紧密连接蛋白 Claudin 1、Occludin 和 ZO-1 的表达水平。本研究从肠道形态和紧密连接蛋白的角度探讨了葛根芩连汤对肠道湿热证泄泻的作用机制,明确了葛根芩连汤对肠道机械屏障的作用。肠道湿热证泄泻的治疗具有多靶点、多方面等特点,后续将从化学屏障、免疫屏障等方面进一步扩展研究范围,提供更加充实的实验依据阐释葛根芩连汤的疗效机制。

## 参考文献

- [1] 李琪,孙悦,丁成华,等. 泄泻湿证患者肠道菌群特征分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(1): 108-113.
- [2] 肖嫩群,何云山,张晨阳,等. 葛根芩连汤对肠道湿热证泄泻小



- 鼠肠道微生物的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(10): 1140-1144.
- [3] 褚拴变. 自拟葛根止泻汤联合蒙脱石散治疗湿热型小儿腹泻的临床观察[J]. 中国民间疗法, 2020, 28(14): 68-69.
- [4] YAN Z X, ZHANG K, ZHANG K, et al. Integrated 16S rDNA gene sequencing and untargeted metabolomics analyses to investigate the gut microbial composition and plasma metabolic phenotype in calves with dampness-heat diarrhea[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 703051.
- [5] 张安琪, 吴玉琦, 姚海强, 等. 基于肠道屏障探讨“脾主为卫”在溃疡性结肠炎发病与治疗中的作用机制[J]. 世界中医药, 2024, 19(10): 1455-1459.
- [6] 王晓杰. 山奈酚对脱氧雪腐镰刀菌烯醇致肠道屏障损伤的预防作用及机制[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [7] 戚运, 陈苏宁. 大黄素改善肠屏障机制研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊, 1-10[2024-07-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240219.1129.006.html>.
- [8] USUDA H, OKAMOTO T, WADA K. Leaky gut: Effect of dietary fiber and fats on microbiome and intestinal barrier[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(14): 7613.
- [9] SHEN J, CHEN J J, ZHANG B M, et al. Baicalin is curative against rotavirus damp heat diarrhea by tuning colonic mucosal barrier and lung immune function[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2020, 65(8): 2234-2245.
- [10] 刘晓曦, 马云飞, 李焕荣, 等. 加味葛根芩连汤对湿热泄泻仔猪肠道炎症和损伤修复的作用[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(1): 238-247.
- [11] 惠华英, 何云山, 吴仪, 等. 肠道湿热证泄泻小鼠模型的研制及葛根芩连汤疗效[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(9): 1380-1385.
- [12] 吴淑洋, 杨晓琴, 成威键, 等. 葛根芩连汤成分间自组装纳米粒改善伊立替康所致肠毒性作用研究[J]. 中草药, 2024, 55(12): 3987-3997.
- [13] 伍冲梅, 谢果珍, 郑淘, 等. 葛根芩连汤的应用及其对肠道屏障影响的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(12): 1540-1546.
- [14] WANG Q S, WANG Y L, ZHANG W Y, et al. Puerarin from *Pueraria lobata* alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome-diarrhea[J]. *Food & Function*, 2021, 12(5): 2211-2224.
- [15] WANG Y F, ZHANG J Q, ZHANG B H, et al. Modified Gegen Qinlian Decoction ameliorated ulcerative colitis by attenuating inflammation and oxidative stress and enhancing intestinal barrier function in vivo and in vitro[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 313: 116538.
- [16] 中华中医药学会脾胃病分会. 泄泻中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中医杂志, 2017, 58(14): 1256-1260.
- [17] 姜盛铭, 马琪, 廖哈禹, 等. 湿热泄泻相关动物模型的建立与比较[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(12): 2597-2605.
- [18] 蔡元丽. 影响肠道屏障功能的因素及营养调控措施[J]. 齐鲁工业大学学报, 2019, 33(1): 41-47.
- [19] 舒雁, 惠华英, 谭周进. 葛根芩连汤对泄泻肠道湿热证小鼠肠道双糖酶活性的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(11): 1254-1258.
- [20] WU Y H, WANG D, YANG X Q, et al. Traditional Chinese medicine Gegen Qinlian Decoction ameliorates irinotecan chemotherapy-induced gut toxicity in mice[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2019, 109: 2252-2261.
- [21] CUI Y, SUN W J, LI Q M, et al. Effects of caulis spatholobi polysaccharide on immunity, intestinal mucosal barrier function, and intestinal microbiota in cyclophosphamide-induced immunosuppressive chickens[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 833842.
- [22] 路万平, 肖传斌, 杨国庆, 等. 板蓝根多糖对缺乳仔鼠十二指肠形态学的影响[J]. 河南科学, 2019, 37(10): 1595-1598.
- [23] JUNG K, SAIF L J. Goblet cell depletion in small intestinal villous and crypt epithelium of conventional nursing and weaned pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Research in Veterinary Science*, 2017, 110: 12-15.
- [24] 陈泉泉, 杨舒展, 陈浩祥, 等. 白术多糖对脂多糖处理下雏鹅十二指肠肠道屏障功能的调节作用[J]. 动物营养学报, 2024, 36(2): 981-994.
- [25] ZHANG J, YU Q Z, JIANG D L, et al. Epithelial Gasdermin D shapes the host-microbial interface by driving mucus layer formation[J]. *Science Immunology*, 2022, 7(68): eabk2092.
- [26] WANG K, WU L Y, DOU C Z, et al. Research advance in intestinal mucosal barrier and pathogenesis of Crohn's disease[J]. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, 2016: 9686238.
- [27] ZHOU Q Q, COSTINEAN S, CROCE C M, et al. MicroRNA 29 targets nuclear factor- $\kappa$ B-repressing factor and Claudin 1 to increase intestinal permeability[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 158-169.e8.
- [28] MONACO A, OVRYN B, AXIS J, et al. The epithelial cell leak pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(14): 7677.
- [29] 祝赫, 柴玉娜, 张毅靖, 等. 肠激安方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠黏膜超微结构及ZO-1、CLDN1表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(7): 905-911.