

DOI: 10.13718/j.cnki.xdsk.2024.09.008

张丽芳, 姜盛铭, 马琪, 等. 白头翁汤对湿热泄泻大鼠回肠黏膜屏障功能的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(9): 85-96.

白头翁汤对湿热泄泻大鼠回肠 黏膜屏障功能的影响

张丽芳, 姜盛铭, 马琪, 杜红旭, 毕师诚, 曹立亭

西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为探究白头翁汤(Pulsatilla Decoction, PD)对湿热泄泻(Damp-heat Diarrhea, DHD)大鼠回肠黏膜屏障功能的影响, 选用 48 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组(NC)、模型组(Model)、自愈组(SH)、白头翁汤高剂量组(PD-H)、白头翁汤中剂量组(PD-M)、白头翁汤低剂量组(PD-L), 以“高糖高脂+高热高湿+肠毒性大肠杆菌”复杂因素诱导大鼠 DHD 模型, 模型建立成功后, PD 组大鼠分别以 0.752 g/mL(PD-H), 0.376 g/mL(PD-M), 0.188 g/mL(PD-L)进行灌胃治疗, SH 组和 NC 组大鼠等量生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 5 d. 试验期间, 记录大鼠体质量及采食量变化, 试验结束后, 采集血液进行血常规指标检测并测定血浆炎症细胞因子; 采集心、肝、脾、肺、肾称质量并计算脏器指数; 采集回肠组织进行病理组织学观察并检测炎症反应、黏膜屏障及色氨酸通路相关基因 mRNA 表达水平. 结果显示, 与 NC 组比较, Model 组大鼠采食量、体质量变化率降低, 心、肝、脾、肺、肾脏器指数均显著上升($p < 0.05$), 淋巴细胞数(Lymph)、单核细胞数(Mon)、平均红细胞体积(MCV)显著降低($p < 0.05$), 中性粒细胞绝对值(Gran)、淋巴细胞百分比(Lymph%)、红细胞数(RBC)、血小板数(PLT)显著升高($p < 0.05$), 血浆 IL-1 β , IL-6 水平显著上升($p < 0.05$), 回肠绒毛排列杂乱、固有层明显增厚、部分隐窝结构有消失、杯状细胞数量减少、微绒毛形成的纹状缘弥漫性缺失、乳糜管内有红细胞浸润、肠绒毛高度/隐窝深度(V/C)显著降低($p < 0.05$), 回肠 IL-1 β , IL-6 和 IFN- γ , TNF- α , IL-17 mRNA 水平显著升高($p < 0.05$), IL-4, ZO-1 mRNA 水平显著降低($p < 0.05$), TPH1, KMO, IDO-1, MUC1, MUC2 mRNA 水平显著升高($p < 0.05$); 与 Model 组比较, PD-H 组大鼠 Lymph, MCV 显著升高($p < 0.05$), PD-M 组大鼠 Lymph, Mon, PLT 均显著降低($p < 0.05$), PD-L 组大鼠 HGB 显著降低($p < 0.05$), MCV 显著升高($p < 0.05$), PD-M 大鼠肝脏指数显著降低($p < 0.05$), PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠脾脏指数均显著降低($p < 0.05$), PD-H 组、PD-L 组大鼠肺脏、肾脏指数显著降低($p < 0.05$), PD-H 组、PD-M 组肠绒毛形状完整、排列整齐、固有层厚薄不一、隐窝结构明显、杯状细胞有增多或排列整齐、纹状缘完整、乳糜管增宽内有红细胞浸润, PD-H 肠绒毛高度/隐窝深度显著上升($p < 0.05$), PD-H 组血浆 IL-1 β , IL-6 含量显著降低($p < 0.05$), PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组回肠 TPH1, KMO mRNA 表达水平显著降低($p < 0.05$), PD-H 组、PD-M 组 MUC1 mRNA 表达水平显著降低($p < 0.05$), PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组 MUC2 的 mRNA 表达水平极显著降低($p < 0.01$), PD-H 组、PD-M 组 ZO-1 mRNA 表达水平极显著升高($p < 0.01$). 表明白头翁汤可以通过改善炎症反应, 调控色氨酸代谢, 减轻黏膜屏障损伤, 维持回肠正常功能.

关键词: 湿热泄泻; 白头翁汤; 回肠组织; 黏膜屏障

收稿日期: 2023-08-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32202849); 重庆市自然科学基金项目(CSTB2022NSCQ-MSX0470); 国家生猪技术创新中心先导科技项目(NCTIP-XD/C17).

作者简介: 张丽芳, 硕士研究生, 主要从事中兽医研究.

通信作者: 马琪, 讲师.

中图分类号: S853.6

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2024)09-0085-12



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Pulsatilla Decoction on the Barrier Function of Ileal Mucosa in Rats with Damp-Heat Diarrhoea

ZHANG Lifang, JIANG Shengming, MA Qi,
DU Hongxu, BI Shicheng, CAO Liting

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: To investigate the effect of Pulsatilla Decoction (PD) on the mucosal barrier function of ileum of rats with Damp-heat Diarrhea (DHD). Forty-eight male SD rats were selected and randomly divided into blank group (NC), model group (Model), self-healing group (SH), pulsatilla high dose group (PD-H), pulsatilla medium dose group (PD-M), and pulsatilla low dose group (PD-L). The rat DHD model was induced by the complex factors of “high sugar, high fat, high heat, high humidity and enterotoxigenic *E. coli*”. After the model was successfully established, rats in the PD group were treated with 0.752 g/mL (PD-H), 0.376 g/mL (PD-M), and 0.188 g/mL (PD-L) by gavage, respectively, while the rats in the SH and NC groups were garaged with an equal amount of saline once a day for 5 d. During the test period, the changes of body weight and food intake of the rats were recorded; at the end of the test period, blood was collected for the detection of hematological indexes and determination of plasma inflammatory cytokine content. Heart, liver, spleen, lungs and kidneys were collected and weighed to calculate the organ indexes. Ileal tissues were collected for pathological and histological observation and detection of inflammatory reactions, and expression levels of the genes related to mucosal barrier and tryptophan pathway. The results showed that compared with the NC group, rats in the Model group had lower feed intake, lower growth rate of body mass, significantly higher heart, liver, spleen, lung and kidney organ indexes ($p < 0.05$), significantly lower Lymph, Mon and MCV ($p < 0.05$), significantly higher Gran, Lymph%, RBC and PLT ($p < 0.05$), significantly higher serum IL-1 β and IL-6 ($p < 0.05$), and disorganized ileal villi with significant thickening of the lamina propria ($p < 0.05$). Some of the crypt structures were disappeared, the number of cup cells was decreased, the striatal rim formed by microvilli was diffusely missing. There was erythrocyte infiltration in the celiac duct, the height of the intestinal villi/crypt depth was significantly reduced ($p < 0.05$). The mRNA levels of ileal IL-1 β , IL-6 and IFN- γ , TNF- α , and IL-17 were significantly increased ($p < 0.05$), the mRNA levels of IL-4 and ZO-1 were significantly reduced ($p < 0.05$), and the mRNA levels of TPH1, KMO, IDO-1, MUC1, MUC2 were significantly increased ($p < 0.05$). Compared with the Model group, Lymph and MCV were significantly increased in the PD-H group ($p < 0.05$), Lymph, Mon and PLT were significantly decreased in the PD-M group ($p < 0.05$), HGB was significantly decreased and MCV was significantly increased in the PD-L group ($p < 0.05$), liver index was significantly decreased in the PD-M ($p < 0.05$). The rats in PD-H, PD-M, PD-L had significantly lower spleen indices ($p < 0.05$), the rats in PD-H and PD-L had significantly lower lung and kidney indices ($p < 0.05$), intestinal villi of the rats in PD-H and PD-M were intact and neatly arranged, with varying thicknesses of the lamina propria, obvious crypts, increased or neatly arranged cup cells, intact striated rims,

and erythrocyte infiltration in the widening of celiac ducts. The ratio of villus height/crypt depth (V/C) in the PD-H group was significantly increased ($p<0.05$). The levels of plasma IL-1 β and IL-6 were significantly reduced ($p<0.05$), the mRNA levels of TPH1 and KMO in the ileum of rats in the PD-H, PD-M, and PD-L groups were significantly reduced ($p<0.05$), the mRNA levels of MUC1 in the PD-H and PD-M groups were significantly reduced ($p<0.05$), the mRNA levels of MUC2 in the PD-H, PD-M, and PD-L groups were extremely significantly reduced ($p<0.01$), and the mRNA levels of ZO-1 in the PD-H and PD-M groups were extremely significantly increased ($p<0.01$). The results showed that pulsatilla decoction could improve the inflammatory response, regulate tryptophan metabolism, alleviate the mucosal barrier damage, and maintain the normal function of the ileum.

Key words: damp-heat diarrhea; Pulsatilla decoction; ileum tissue; mucosal barrier

湿热泄泻(Damp-heat Diarrhea, DHD)又称泄泻·湿热蕴结证,指机体在外源致病因子、饮食不节/洁等因素影响下湿热之邪蕴结于肠内,以热证、湿证为主的泄泻证候。相关研究显示,DHD 大鼠回肠杯状细胞的密度极显著降低、潘氏细胞的密度极显著升高^[1];DHD 仔猪回肠中大肠杆菌数量极显著上升,乳酸杆菌数量显著降低,乳酸杆菌与大肠杆菌比值极显著下降,且回肠 IL-2 mRNA 表达量显著上升,IL-4, IL-5 mRNA 表达量显著降低^[2];DHD 大鼠回肠绒毛上皮脱落、黏膜固有层出血^[3];DHD 仔猪回肠 Notch-1, Hes-1 mRNA 的表达量显著升高、Hath-1 mRNA 的表达量显著降低^[4]。

白头翁汤(Pulsatilla Decoction, PD)出自《伤寒杂病论》,是由白头翁、黄连、黄柏、秦皮组成的传统中药方剂,具有清热解毒、凉血止痢的功效,为治疗热毒痢疾的原始处方。方中以白头翁为君,清热解毒,凉血止痢;臣以黄连之苦寒,清热解毒,燥湿厚肠;黄柏泻下焦湿热,共奏燥湿止痢之效;秦皮苦寒性涩,收敛作用强,用以止血。四药并用,为热毒血痢之良方,临床上常用于治疗阿米巴痢疾、细菌性痢疾等病证。近年来,PD 治疗肠道病证的相关研究发现,PD 通过显著降低血清中 IL-2, IFN- γ , DAO, HIF-1 α 及 CD8⁺ 水平且显著提高 IL-4, IL-10, CD4⁺ 以及 CD4⁺/CD8⁺ 水平,来调节 Th1/Th2 细胞平衡和激活免疫机制^[5];PD 可显著降低小鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 水平,显著降低结肠组织中 p-mTOR/mTOR, p-P70S6K/P70S6K, p-STAT3/STAT3, COX-2 mRNA 的表达量,从而预防小鼠溃疡性结肠炎^[6]。PD 可抑制 TNF- α mRNA 的表达量从而抑制溃疡性结肠炎的炎症反应,促进肠黏膜愈合^[7];PD 可抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路,下调 P-选择素, MPO, MIF, TXB2 的水平,促进肠道黏膜的修复,减轻溃疡性结肠炎大鼠结肠炎症反应^[8-9]。

本课题组前期研究发现,PD 对 DHD 有良好的治疗效果,可以缓解 DHD 肠道组织损伤^[9]。为进一步探究 PD 对 DHD 大鼠回肠黏膜屏障功能及色氨酸代谢通路的影响,本试验建立 DHD 大鼠模型,并以不同剂量 PD 进行灌胃治疗,分析大鼠回肠组织形态变化、回肠肠道黏膜屏障损伤、肠道炎症反应及色氨酸代谢通路之间的关联,以期探索 PD 介导改善 DHD 的潜在机制提供新见解。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,7 周龄,体质量 180~200 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004],饲养于西南大学动物医学院实验室[SYXK(渝)2019-0003],造模前适应性饲养 7 d,自由采食及饮水,环境温度为 20~24 ℃。所有操作均符合西南大学动物实验伦理学要求(审批号:IACUC-20210507-06)。

1.1.2 主要试剂与仪器

大肠杆菌(南京农业大学分离鉴定的 HE 株^[10])由南京农业大学馈赠;蜂蜜(GB14963):江西华茂保健

品开发有限公司;猪油:重庆市荣昌区水口寺菜市场;56 度红星二锅头(GB/T10781.2):北京红星股份有限公司;苏木素伊红染色液(20220610):湖南比克曼生物科技有限公司;Rat IL-1 β ELISA KIT(YJ003075)及 Rat IL-6 ELISA KIT(YJ064292):上海源桔生物科技中心;TRIzol 试剂:Beyotime,上海;Prime-ScriptTM RT Master Mix(RR036A)及 TB Green $\odot$ Premix Ex TaqTM II(RR820A):宝日医生物技术(北京)有限公司;兽用全自动血液细胞分析仪(BC-2600Vet):深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;轮式切片机(KD1508A):浙江金华科迪仪器设备有限公司;全自动酶标仪(A-5082):Tecan Austria GmbH;实时荧光定量 PCR 仪(Archimed X6):杭州鲲鹏基因科技有限责任公司.

1.2 方法

1.2.1 白头翁汤的制备

白头翁、秦皮、黄连、黄柏购置于西城大药房(中国重庆荣昌)药材公司,经过西南大学动物医学院曹立亭副教授鉴定,药材信息如表 1 所示. 根据 2020 年版《中华人民共和国兽药典》关于白头翁散的配比称取白头翁 60 g、秦皮 45 g、黄连 30 g、黄柏 60 g,加 10 倍水浸泡 30 min,大火煮沸后转小火煎煮 40 min,过滤收集滤液后再加 8 倍量水继续煎煮,如此重复 2 次,合并 3 次滤液,浓缩至 0.188 g/mL 作为 PD 低浓度、0.376 g/mL 作为 PD 中浓度、0.752 g/mL 作为 PD 高浓度.

表 1 白头翁汤制备药材

药材名称	入药部分	产地	编号	质量/g
白头翁	根	吉林	SUTCM-20221201	60
秦皮	皮	四川	SUTCM-20221202	45
黄连	根茎	四川	SUTCM-20221203	30
黄柏	皮	河北	SUTCM-20221204	60

1.2.2 动物分组及处理

试验前 1 d,称量每只 SD 大鼠体质量,用分层随机法将 48 只大鼠随机分为空白组(NC)、模型组(Model)、自愈组(SH)、白头翁汤高剂量组(PD-H)、白头翁汤中剂量组(PD-M)、白头翁汤低剂量组(PD-L),每组 8 只大鼠,平均体质量为(254 $\pm$ 3)g. 除 NC 外,分 3 个阶段建立 DHD 模型,分别为高糖高脂、高热高湿及攻毒阶段,全程给予 30%蜂蜜水. 高糖高脂阶段为 1~10 d,第 1,3,5,7,9 d 给予每只大鼠 4 mL 猪油,自由采食和饮用蜂蜜水,第 2,4,6,8,10 d 禁食不禁水;高热高湿阶段为 11~15 d,此阶段给予每只大鼠 2 mL 红星二锅头,自由采食饮水,每日需在自建高温湿度棚[温度(34 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,湿度(94 $\pm$ 1)%]放置 8 h;攻毒阶段为 16~18 d,Model、SH、PD-H、PD-M、PD-L 大鼠于第 16 d 及 17 d 注射浓度为 3.96 $\times$ 10¹¹ CFU/mL 大肠杆菌 0.2 mL,此阶段均自由采食及饮水. NC 饲喂方式与适应性饲养方法相同. 治疗阶段为 19~23 d,造模成功后,PD-H、PD-M、PD-L 大鼠分别灌胃不同剂量 PD 并于第 19 d 处死 Model 组大鼠. 于造模前后每日定时记录各组大鼠体质量、采食量,各组大鼠实验处理情况如表 2 所示.

表 2 大鼠分组处理情况

分组	高糖高脂	高热高湿	攻毒	PD 治疗/(g $\cdot$ mL ⁻¹)
NC	—	—	—	—
Model	+	+	+	—
SH	+	+	+	—
PD-H	+	+	+	0.752
PD-M	+	+	+	0.376
PD-L	+	+	+	0.188

1.2.3 样品采集

试验结束后,称各组大鼠体质量并将各组大鼠处死及时称质量和记录大鼠心、肝、脾、肺、肾的质量,根据各脏器质量/体质量得到大鼠各脏器指数。采集各组大鼠回肠组织取适宜长度固定于 4%中性甲醛溶液,另取一部分回肠组织保存于-80℃冰箱备用。

1.2.4 血液指标检测

采集各组大鼠 20 μL 尾尖血,加入稀释液轻轻吹打混匀,于西南大学动物医院对大鼠血常规指标进行检测。腹主动脉采集血液并分离血浆,按照 ELISA 试剂盒说明书要求测定大鼠血浆 IL-6, IL-1β。

1.2.5 回肠组织形态学观察

取固定的各组大鼠回肠组织,冲水后经 75%~100%乙醇梯度脱水并透明,浸蜡 1.5 h,重复 2 次。包埋后切片、展片,烘片后使用二甲苯浸泡脱蜡,重复 2 次再经 100%~75%乙醇梯度复水,苏木素伊红染色后 75%~100%乙醇梯度脱水,二甲苯透明后即可用中性树胶封片以备回肠组织形态学观察,并测定回肠绒毛高度和隐窝深度,计算绒毛高度和隐窝深度的比值。

1.2.6 回肠炎症反应、色氨酸代谢及肠道黏膜屏障 mRNA 表达水平测定

取-80℃储存的各组大鼠回肠组织用 TRIzol 试剂提取总 RNA,利用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒说明书(含 gDNase)反转录获得 cDNA,存于-20℃备用。使用 QuantStudio™ 7 Flex 实时荧光定量 PCR 系统和 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)进行 qPCR。RT-qPCR 反应体系为 TB Green © Premix Ex Taq™ II (2×)5 μL,上、下游引物各 0.4 μL,ROX Reference Dye (50×)0.2 μL,无酶无菌水 3 μL,DNA 模板 1 μL。以 GAPDH 作为内参基因。反应条件为 95℃预变性 30 s;95℃5 s 变性,60℃34 s 退火,反应 40 个循环 60℃1 min 延伸,95℃15 s 熔解。数据分析采用 2^{-ΔΔCt} 方法。使用的引物序列如表 3 所示。

表 3 引物序列

引物名称	序列(5'→3')	引物名称	序列(5'→3')
GAPDH-F	GACATGCCGCCTGGAGAAAC	MUC1-F	TACCTACCACACTCACGGAC
GAPDH-R	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT	MUC1-R	TCCTACAAGTTGGCCGAAG
IL-1β-F	TGTGGCAGCTACCTATGTCT	TPH-1F	CCTGCAAACAGGAATGTCT
IL-1β-R	GGGAACATCACACACTAGCA	TPH-1R	TCTGGACTGATGCTCAAAGG
IL-6-F	CCTTCCTACCCCAACTTCCA	IDO-1-F	GCACTGGAGAAGGCACTGTGTAG
IL-6-R	GAGTTGGATGGTCTTGGTCC	IDO-1-R	GATCCACGAAGTCACGCATCCTC
IL-4-F	CAAGGAACACCACGGAGAAC	MUC2-F	CGCCAATTACGCTGAACACT
IL-4-R	CTCAGTGAGTTCAGACCGCT	MUC2-R	CCTCGTTGTTCTGACAGTTGC
IL-17-F	ACTTTCCGGGTGGAGAAGAT	ZO-1-F	ACAGTACAGCCAGCCAGTTC
IL-17-R	CTTAGGGGCTAGCCTCAGGT	ZO-1-R	GGCTCAGCAGAGTTTCACCT
TNF-α-F	CTCGAGTGACAAGCCCGTAG	TNF-α-R	GGCAGCCTTGTCCTTGAAG

1.2.7 统计学分析

结果以平均值±标准差表示,用 IBM SPSS 26.0 软件分析试验数据,并使用单因素方差分析(ANOVA)组间差异,然后进行 LSD 事后检验,*p*<0.05 表示差异有统计学意义。用 Prism Grappad 9.0 作图。

2 结果与分析

2.1 PD 对 DHD 大鼠体质量和采食量的影响

如图 1a 所示,试验中高糖高脂、高热高湿、攻毒及治疗阶段大鼠采食量起伏波动:高糖高脂阶段大鼠采食量初上升后平稳,与 NC 组相比,Model 组大鼠采食量明显降低,SH 组、PD-H 组、PD-M 组、PD-L

组大鼠与 Model 组相比,差异无统计学意义;高热高湿阶段大鼠采食量先急剧下降后逐渐平稳,与 NC 组相比,Model 组大鼠采食量明显下降,SH 组、PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组与 Model 组相比,差异无统计学意义;攻毒阶段,与 NC 组相比,Model 组大鼠采食量明显降低,SH 组、PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组与 Model 组相比,差异无统计学意义;治疗阶段,与 NC 组相比,SH 组大鼠采食量明显降低,与 SH 组相比,PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠采食量明显上升,且 PD-M 组大鼠采食量高于 PD-H 组和 PD-L 组。

如图 1b 所示,试验中高糖高脂、高热高湿、攻毒及治疗阶段大鼠体质量增长率各不相同:Model 组、SH 组、PD-H 组、PD-M 组和 PD-L 组大鼠高糖高脂阶段体质量变化率分别为 6.7%,8.9%,9.0%,5.0%,7.1%,低于 NC 组的 45.6%;高热高湿阶段 Model 组、SH 组、PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠体质量变化率分别为 22.2%,28.6%,26.2%,23.8%,26.4%,低于 NC 组的 68.4%;攻毒阶段 Model 组、SH 组、PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠体质量变化率分别为 20.0%,21.5%,23.8%,17.8%,20.8%,均低于 NC 组的 76.8%;治疗阶段,PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠体质量变化率均高于 SH 组大鼠,且 4 组均低于 NC 组。

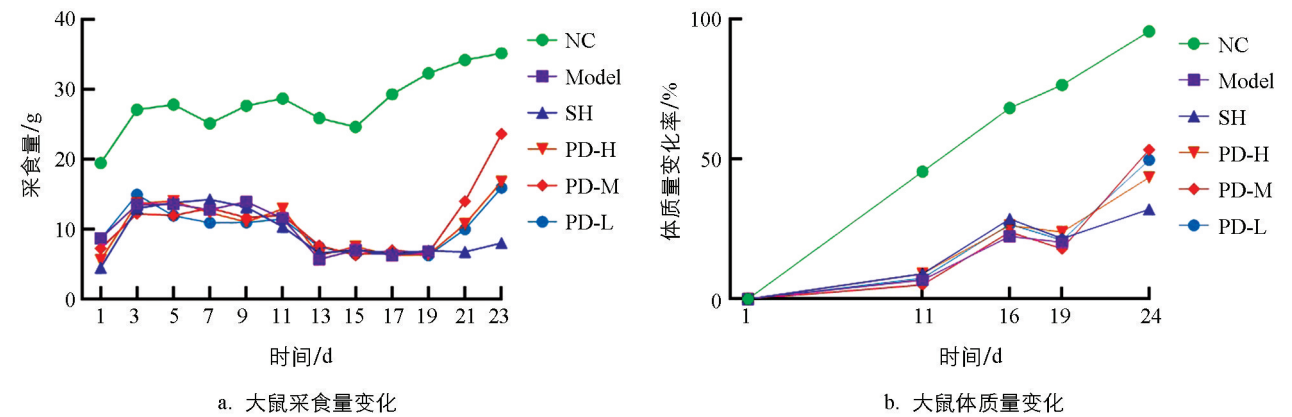


图 1 大鼠采食量与大鼠体质量变化情况

2.2 PD 对 DHD 大鼠血常规指标的影响

如表 4 所示,造模成功后,Model 组大鼠的淋巴细胞数(Lymph)、单核细胞数(Mon)、中性粒细胞绝对值(Gran)、淋巴细胞百分比(Lymph%)、红细胞数(RBC)、平均红细胞体积(MCV)、血小板数(PLT)都发生了显著变化:与 NC 组相比,Model 组大鼠 Lymph, Mon, MCV 显著降低($p<0.05$), Gran, Lymph%, RBC, PLT 显著升高($p<0.05$),而 SH 组大鼠白细胞总数(WBC)、血红蛋白数(HGB)均显著降低($p<0.05$),即 WBC, HGB 显著改变发生于 DHD 大鼠自愈恢复期.与 Model 相比,PD-H 组大鼠 Lymph, MCV 显著升高($p<0.05$);PD-M 组大鼠 Lymph, Mon, PLT 均显著降低($p<0.05$),而 HGB, MCV 显著升高($p<0.05$);PD-L 组大鼠 HGB 显著降低、MCV 显著升高($p<0.05$).

表 4 大鼠血常规指标检测结果

指标	NC	Model	SH	PD-H	PD-M	PD-L
WBC/($10^9 \cdot L^{-1}$)	13.48±1.52	16.53±5.91	9.28±1.58 *	14.03±1.42	13.73±1.60	13.60±1.33
Lymph/($10^9 \cdot L^{-1}$)	11.73±1.44	8.22±1.78 *	7.02±0.91 *	9.62±0.99 #	9.38±2.27 #	8.97±1.51
Mon/($10^9 \cdot L^{-1}$)	0.68±0.08	0.37±0.08 *	0.35±0.18 *	0.48±0.05	0.52±0.10 #	0.45±0.05
Gran/($10^9 \cdot L^{-1}$)	3.40±0.48	5.48±2.28 *	3.67±1.91	4.62±1.07	4.85±0.87	4.18±0.89
Lymph%	0.67±0.04	0.71±0.08 *	0.72±0.03	0.71±0.05	0.64±0.05	0.69±0.05
RBC/($10^{12} \cdot L^{-1}$)	7.49±0.38	8.03±0.45 *	7.90±0.32	7.56±0.71	7.94±0.46	7.61±0.25
HGB/($g \cdot L^{-1}$)	168.83±5.67	170.67±6.19	159.83±5.08 *	165.17±6.11	161.50±10.56 #	158.33±5.54 #
MCV/fL	61.55±1.35	56.42±1.59 *	56.55±1.81 *	58.85±1.74 #	59.02±0.87 #	58.12±0.82 #
PLT/($10^9 \cdot L^{-1}$)	1 101.33±262.72	1 587.17±369.83 *	1 196.00±129.39 #	1 369.50±344.79	1 259.17±172.42 #	1 332.00±239.10

注:与 NC 组比较,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$;与 Model 组比较,#表示 $p<0.05$,##表示 $p<0.01$,差异有统计学意义。

2.3 PD 对 DHD 大鼠脏器指数的影响

如表 5 所示,造模后,Model 组大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏指数与 NC 组比较均显著上升($p<0.05$).与 Model 组相比,PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠情况各异:PD-H 组、PD-L 组大鼠心脏指数有降低趋势,但差异无统计学意义;PD-M 组大鼠肝脏指数显著降低($p<0.05$),PD-H 组、PD-L 组大鼠有所降低,但差异无统计学意义,PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠脾脏指数均显著降低($p<0.05$),PD-H 组、PD-L 组大鼠肺脏、肾脏指数显著降低($p<0.05$),PD-M 组大鼠有降低趋势,但差异无统计学意义;SH 组大鼠肝脏、脾脏、肺脏指数均显著降低($p<0.05$).

表 5 大鼠脏器指数结果

脏器	NC	Model	SH	PD-H	PD-M	PD-L
心脏	0.34±0.01	0.43±0.07 [*]	0.39±0.03	0.36±0.04	0.44±0.04	0.37±0.07
肝脏	2.75±0.16	3.34±0.11 [*]	3.03±0.14 [#]	3.07±0.23	3.17±0.07 [#]	3.23±0.16
脾脏	0.18±0.02	0.35±0.06 [*]	0.25±0.02 [#]	0.25±0.03 [#]	0.32±0.02 [#]	0.25±0.05 [#]
肺脏	0.45±0.03	0.78±0.08 [*]	0.64±0.05 [#]	0.60±0.05 [#]	0.72±0.03	0.63±0.08 [#]
肾脏	0.64±0.03	0.88±0.02 [*]	0.77±0.09	0.75±0.02 [#]	0.85±0.03	0.75±0.06 [#]

注:与 NC 组比较,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$;与 Model 组比较,#表示 $p<0.05$,##表示 $p<0.01$,差异有统计学意义.

2.4 PD 对 DHD 大鼠回肠组织形态的影响

图 2a 显示,NC 组大鼠回肠在低倍镜下形态结构完整,肠绒毛致密,肠绒毛排列整齐无断裂,固有层连接紧密无增厚;高倍镜下绒毛轮廓清晰,隐窝结构清晰完整,微绒毛形成的纹状缘清晰完整,杯状细胞排列整齐,乳糜管结构清晰无异常.图 2b 显示,Model 组大鼠回肠低倍镜下结构完整,肠绒毛过于密集,肠绒毛排列较杂乱,固有层明显增厚;高倍镜下隐窝结构有消失,杯状细胞数量减少,微绒毛形成的纹状缘弥漫性缺失,乳糜管内有红细胞浸润,说明有出血.图 2c 显示,SH 组大鼠回肠低倍镜下结构紊乱,肠绒毛形状各异、排列紊乱,固有层厚薄不一;高倍镜下隐窝结构有消失,杯状细胞排列紊乱,纹状缘弥漫性缺失,乳糜管增宽内有红细胞浸润及炎性细胞,说明有出血和炎症.图 2d 显示,PD-H 组大鼠回肠低倍镜下结构完整,肠绒毛形状完整、排列整齐,固有层厚薄不一;高倍镜下隐窝结构明显,杯状细胞有增多、排列整齐,乳糜管增宽内有红细胞浸润,说明有出血.图 2e 显示,PD-M 组大鼠回肠低倍镜下结构完整,肠绒毛形状各异、排列紧密而紊乱,固有层厚薄不一;高倍镜下隐窝有消失,杯状细胞有增多、排列紊乱,乳糜管增宽内有红细胞浸润,说明有出血.图 2f 显示,PD-L 组大鼠回肠低倍镜下结构完整,肠绒毛形状各异、排列疏松而紊乱,固有层变薄;高倍镜下隐窝变短,杯状细胞排列紊乱,乳糜管增宽内有红细胞浸润,说明有出血.

测定各组大鼠回肠绒毛高度、隐窝深度,计算绒毛高度与隐窝深度的比值^[11],结果如图 3a 所示.与 NC 组比较,Model 组的变化并不显著,但 SH 组大鼠回肠绒毛高度显著降低($p<0.05$);与 SH 组比较,PD-H 组、PD-M 组回肠绒毛高度显著升高($p<0.05$).如图 3b 所示,与 NC 组比较,Model 组大鼠回肠隐窝深度显著升高($p<0.05$);与 Model 组比较,PD-H 组、PD-M 组回肠隐窝深度显著降低($p<0.05$).如图 3c 所示,与 NC 组比较,Model 组大鼠回肠绒毛高度/隐窝深度的值显著降低($p<0.05$);与 Model 组比较,PD-H 组大鼠回肠绒毛高度/隐窝深度的值显著升高($p<0.05$).

2.5 PD 对 DHD 大鼠炎症细胞因子血浆质量浓度及 mRNA 表达量的影响

如图 4a,e 所示,与 NC 组比较,Model 组大鼠血浆 IL-1 β 质量浓度与回肠组织 IL-1 β mRNA 表达量极显著升高($p<0.01$);与 Model 组比较,PD-H 组、PD-M 组大鼠显著降低($p<0.05$),PD-L 组大鼠降低但不显著;SH 组大鼠 IL-1 β 质量浓度、mRNA 表达量均未恢复.如图 4b,f 所示,与 NC 组比较,Model 组大鼠血浆 IL-6 质量浓度与回肠组织 IL-6 mRNA 表达量均显著升高($p<0.05$);与 Model 组比较,PD-H 组大鼠血浆 IL-6 质量浓度显著降低($p<0.05$),PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠回肠组织 IL-6 mRNA 表达量均显著降低($p<0.05$).

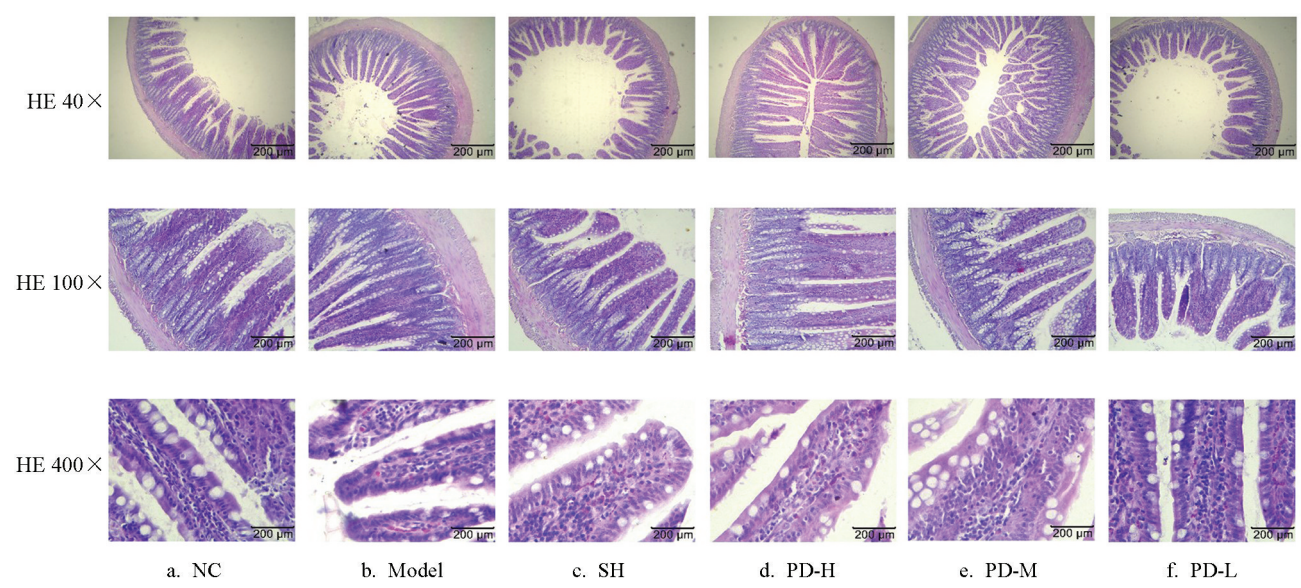


图 2 大鼠回肠组织病理变化

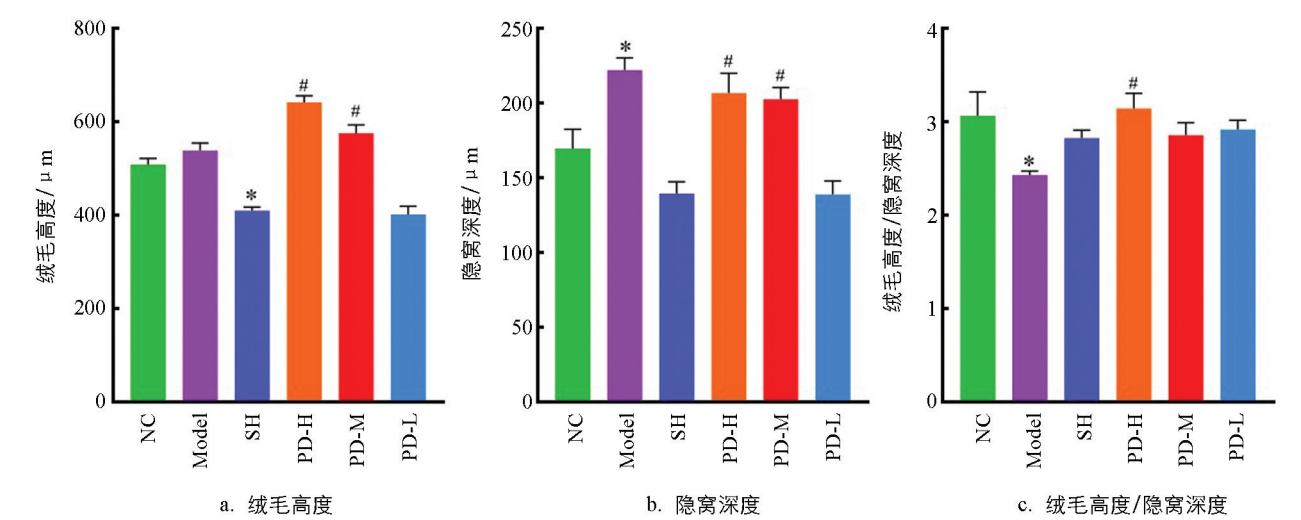


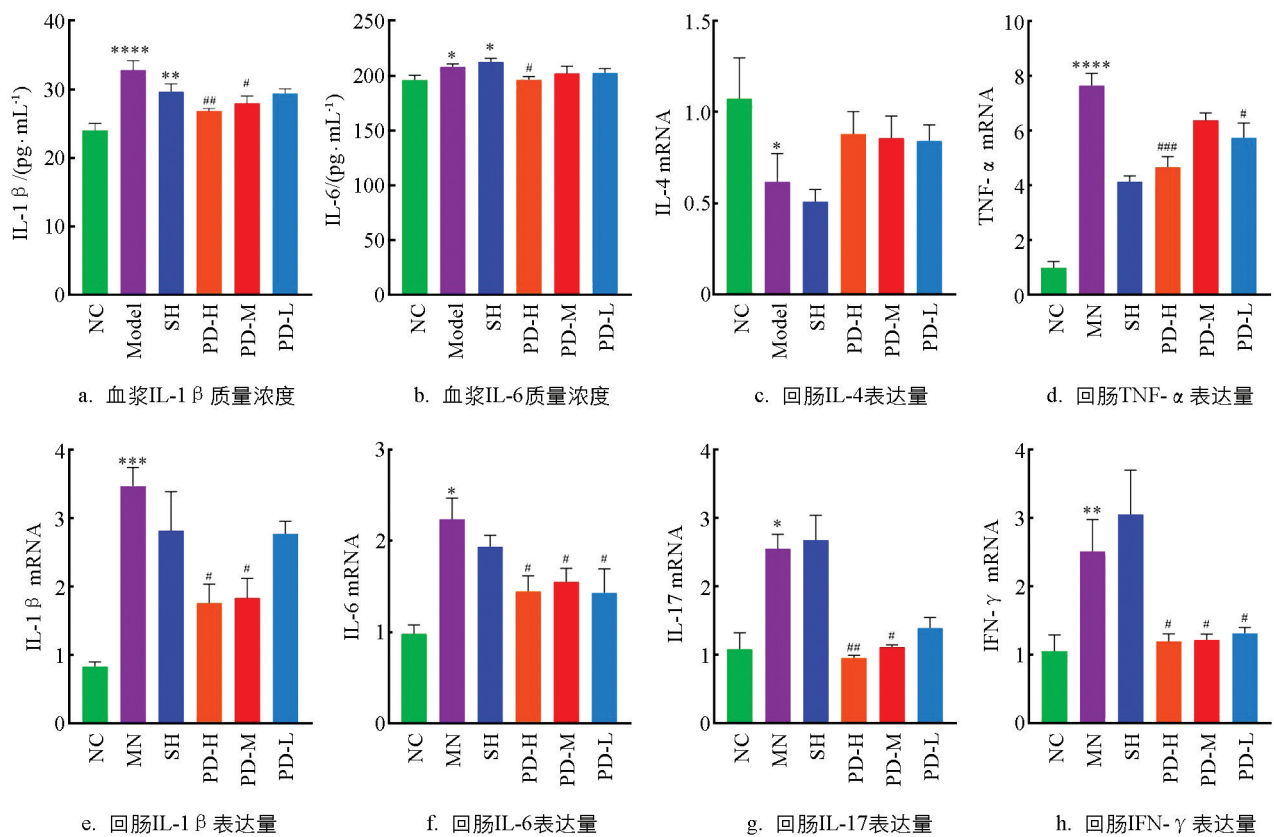
图 3 大鼠回肠组织绒毛高度与隐窝深度

如图 4c 所示,与 NC 组比较,Model 组大鼠回肠组织 IL-4 mRNA 表达量显著降低($p<0.05$);与 Model 组比较,PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠回肠 IL-4 mRNA 表达量无显著差异.如图 4g 所示,与 NC 组比较,Model 组大鼠回肠 IL-17 mRNA 表达量显著升高($p<0.05$);与 Model 组比较,PD-H 组大鼠回肠 IL-17 mRNA 表达量极显著降低($p<0.01$)、PD-M 组显著降低($p<0.05$).如图 4d 所示,与 NC 组比较,Model 组大鼠回肠组织 TNF- α mRNA 表达量显著升高($p<0.05$);与 Model 组比较,PD-H 组、PD-L 组大鼠回肠组织 TNF- α mRNA 表达量显著降低($p<0.05$).如图 4h 所示,与 NC 组比较,Model 组大鼠回肠组织 IFN- γ mRNA 表达量显著升高($p<0.05$);与 Model 组比较,PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠回肠组织 IFN- γ mRNA 表达量显著降低($p<0.05$).

2.6 PD 对 DHD 大鼠回肠色氨酸代谢相关基因表达量的影响

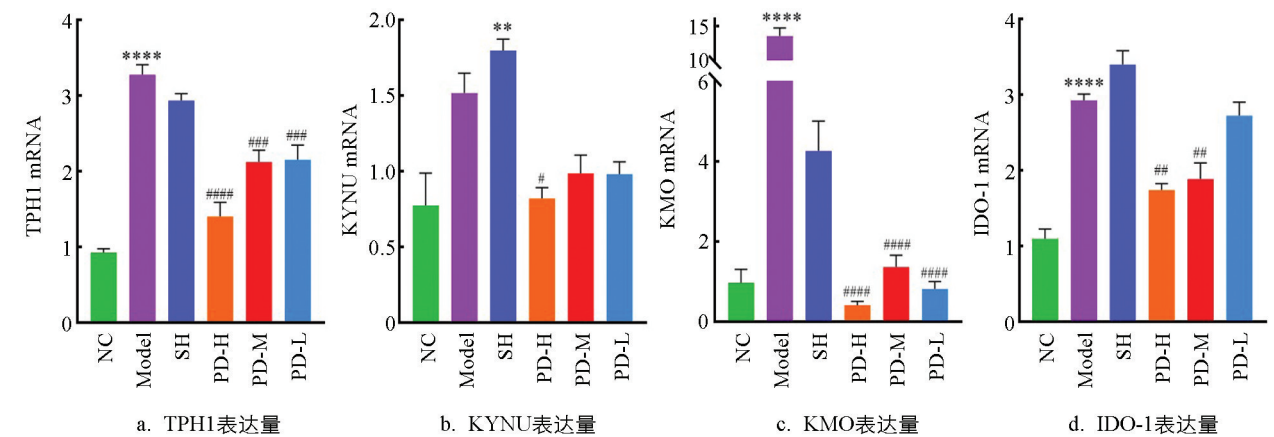
如图 5 所示,与 NC 组比较,除 KYNU 外,Model 组大鼠回肠组织 TPH1, KMO, IDO-1 mRNA 表达量均显著升高($p<0.05$).与 Model 组比较,PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组大鼠回肠组织 TPH1, KMO mRNA 水平均显著降低($p<0.05$),PD-H 组的 KYNU mRNA 水平显著降低,PD-H 组、PD-M 组大鼠回

肠组织 IDO-1 mRNA 水平显著降低($p<0.05$).



与 NC 组比较, * 表示 $p<0.05$, ** 表示 $p<0.01$, *** 表示 $p<0.001$, **** 表示 $p<0.0001$, 差异有统计学意义; 与 Model 组比较, # 表示 $p<0.05$, ## 表示 $p<0.01$, ### 表示 $p<0.001$, 差异有统计学意义。

图 4 大鼠炎症细胞因子血浆质量浓度及 mRNA 表达量



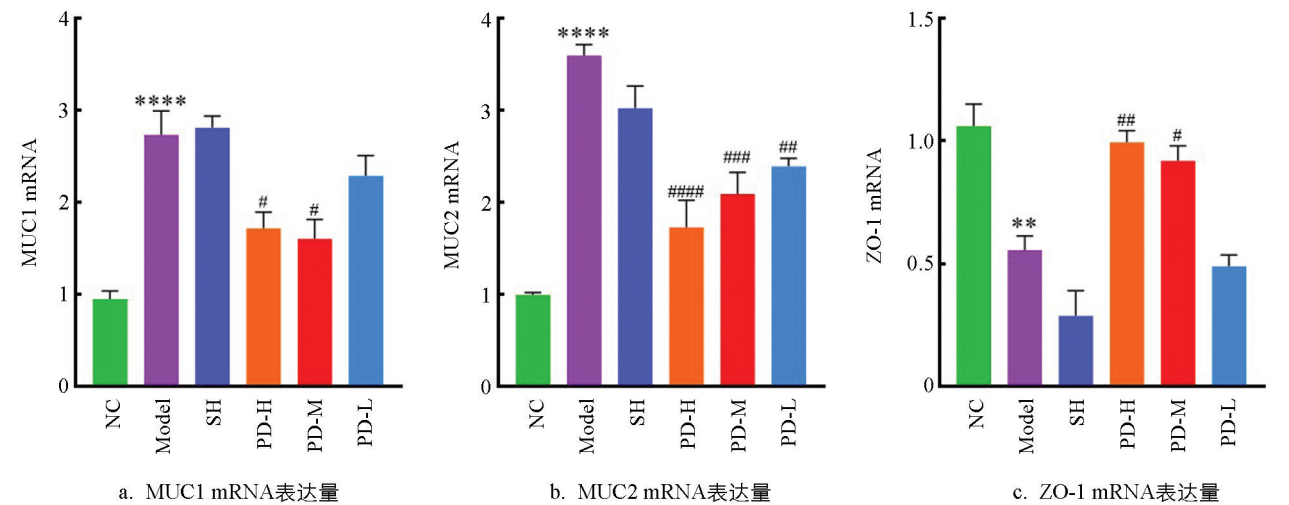
与 NC 组比较, * 表示 $p<0.05$, ** 表示 $p<0.01$, *** 表示 $p<0.001$, **** 表示 $p<0.0001$, 差异有统计学意义; 与 Model 组比较, # 表示 $p<0.05$, ## 表示 $p<0.01$, ### 表示 $p<0.001$, #### 表示 $p<0.0001$, 差异有统计学意义。

图 5 大鼠回肠组织 TPH-1,KYNU,KMO,IDO-1 mRNA 表达量

2.7 PD 对 DHD 大鼠回肠肠道黏膜屏障相关基因 mRNA 表达量的影响

如图 6 所示,与 NC 组比较,Model 组大鼠回肠组织的 MUC1, MUC2 mRNA 表达水平显著升高($p<0.05$),ZO-1 mRNA 表达水平显著降低($p<0.05$).与 Model 组比较,PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组治疗后大鼠的 MUC1, MUC2 mRNA 水平均降低,其中,PD-H 组、PD-M 组显著降低 MUC1 的 mRNA 表达水平($p<0.05$);PD-H 组、PD-M 组、PD-L 组极显著降低 MUC2 的 mRNA 表达水平($p<$

0.01); PD-H 组极显著升高 ZO-1 的 mRNA 表达水平($p<0.01$), PD-M 组显著升高 ZO-1 的 mRNA 表达水平($p<0.05$).



与 NC 组比较, * 表示 $p<0.05$, ** 表示 $p<0.01$, *** 表示 $p<0.001$, **** 表示 $p<0.0001$, 差异有统计学意义; 与 Model 组比较, # 表示 $p<0.05$, ## 表示 $p<0.01$, ### 表示 $p<0.001$, #### 表示 $p<0.0001$, 差异有统计学意义.

图 6 大鼠回肠组织 MUC1,MUC2,ZO-1 mRNA 表达量

3 讨论与结论

3.1 讨论

本试验各组大鼠血常规指标的差异说明 DHD 大鼠处于炎症阶段, Model 组、SH 组大鼠 Lymph, Mon 显著降低, 而经不同剂量的 PD 治疗后大鼠的 Lymph, Mon 显著回升或有所回升, 说明大鼠处于 DHD 阶段机体血液中淋巴细胞、单核细胞显著降低, 这无疑增加机体继发感染的风险, 降低了机体的免疫力, 而不同剂量的 PD 均不同程度地阻止了淋巴细胞、单核细胞数目的减少, 有利于维持机体的抗感染环境, 并能有效阻止炎性细胞减少. Model 组大鼠 Gran, Lymph% 显著上升而经 PD 治疗后有所减少, 说明 DHD 大鼠机体内有大量致病因子, Gran 也被称为“小吞噬细胞”, 一方面 Gran 的增多有利于吞噬病原、衰老损伤的细胞及细胞因子, 有利于增强细胞免疫反应^[12], 但另一方面 Gran 过多也不利于机体炎性稳态, 可能会损伤其他健康细胞. Model 组大鼠 RBC 显著上升、MCV 显著降低, 结合 DHD 大鼠出现的腹泻、血便等临床症状说明 DHD 大鼠腹泻情况较为严重, 机体存在脱水现象, 而经 PD 治疗后 RBC 回调或显著阻止 MCV 降低, 说明 PD 可缓解 DHD 大鼠的腹泻脱水症状. Model 组大鼠 PLT 显著升高, 结合回肠组织病理切片结果可得 DHD 大鼠回肠处有出血, 需血小板发挥止血作用, 因此, Model 组大鼠血小板数量急剧上升, PD 可显著缓解 DHD 大鼠的出血症状, 阻止血小板的急剧增多, 这有利于阻止血栓的形成从而保护 DHD 大鼠回肠.

DHD 大鼠的 IL-1 β , IL-6 mRNA 表达量显著升高, 而经 PD 治疗后 DHD 大鼠回肠组织 IL-1 β , IL-6 mRNA 表达量显著降低. Kaminsky 等^[13]研究发现 IL-1 β 通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号转导途径和其他转录因子诱导增加肠道通透性. IL-6 与其他炎症细胞因子相互作用, 引发炎症反应^[14], Guo 等^[15]研究发现 IL-6 介导的 Jak/STAT3 途径可能通过其下游 PI3 激酶/Akt 信号肽驱动杯状细胞分化, IL-6 是损伤后组织修复所必需的, 能促进隐窝中潘氏细胞的增殖从而诱导肠上皮增殖, IL-6 有助于通过经典信号传导和反式信号通路维持肠道稳态. 本研究中, DHD 大鼠回肠组织 IL-1 β , IL-6 的 mRNA 表达量显著升高, 可能会增加回肠通透性, 易引起炎性风暴, 会增加对机体的损伤^[16]. PD 治疗后, DHD 大鼠血浆 IL-1 β , IL-6 质量浓度和回肠组织 mRNA 表达量回调, 表明 PD 可能通过保护回肠的通透性、降低炎症、促进回肠上皮增生来保护回肠, 减轻回肠损伤.

本研究中,DHD 大鼠的 IL-4 表达量显著降低,IL-17,IFN- γ ,TNF- α mRNA 表达量显著升高.研究表明,回肠组织 IL-4 mRNA 的表达量可反映出回肠黏膜炎症的变化趋势,IL-4 不仅能促进淋巴细胞分化、使其增殖能力增强,还可促进体液免疫增强,刺激 B 细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞的活化^[17],而且 IL-4 具有一定的免疫抑制作用. Lee 等^[18]研究发现,IL-17 缺乏会降低 DSS 诱导的肠黏膜损伤期间维持屏障功能的能力,IFN- γ ,TNF- α 影响上皮通透性^[19],增加肠道通透性,从而进一步暴露于管腔内容物,并引发免疫反应和肠道炎症^[20],经 PD 治疗后,上述肠道炎症反应相关基因不同程度回调,表明 PD 有利于阻止 DHD 大鼠回肠上皮通透性的增加,维持回肠黏膜屏障功能.

色氨酸代谢在炎症性肠炎中特别容易受到干扰^[21],KYNU(犬尿素酶)、TPH1(色氨酸羟化酶 1)、KMO(犬尿氨酸 3-单加氧酶)、IDO-1(吲哚胺 2,3-双加氧酶)是色氨酸代谢相关通路的关键因子. Model 组大鼠回肠组织 TPH-1, KYNU, KMO, IDO-1 的 mRNA 水平显著升高,表明 DHD 大鼠色氨酸代谢的 2 条途径即 5 羟色胺途径与犬尿氨酸都显著加强,色氨酸代谢通路被过度激活,经不同剂量的 PD 治疗后 TPH-1, KYNU, KMO, IDO-1 的 mRNA 水平极显著或显著降低,表明 PD 可调节回肠组织色氨酸代谢.

MUC1, MUC2, ZO-1 为紧密连接蛋白,是回肠黏膜屏障的重要组成部分^[22],黏蛋白构成黏液层内层,由上皮细胞分泌,是凝胶状分泌物的关键成分,具有调节组织黏膜屏障、参与细胞信号传导以介导机体免疫等生物学功能^[23],紧密连接蛋白 ZO-1 是肠黏膜免疫的关键蛋白,其基因表达量常被用于肠机械屏障功能的关键性检测标识^[24]. 结合回肠组织形态学观察结果,Model 组、SH 组大鼠的回肠组织病理损伤严重,MUC1, MUC2 的 mRNA 表达量急剧上升,ZO-1 mRNA 的表达量显著下降,PD 可显著降低肠黏膜损伤,PD 组大鼠的 MUC1, MUC2 的 mRNA 表达量显著降低或降低,ZO-1 mRNA 表达量显著上升.

3.2 结论

本研究以“高糖高脂+高热高湿+肠毒性大肠杆菌”为诱导条件建立 DHD 大鼠模型,并以不同剂量的 PD 进行灌胃治疗. 结果表明,经 PD 灌胃治疗后,大鼠回肠形态结构有所恢复,隐窝病变缓解. PD 可以减轻大鼠 IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF α , IFN- γ 等促炎因子的生成,促进抑炎因子 IL-4 的生成来调节回肠炎症反应. PD 可以降低 TPH-1, KYNU, KMO, IDO-1 的表达量从而阻止色氨酸代谢通路过度激活以调节色氨酸代谢,有效缓解 DHD 引起的肠道代谢紊乱. 同时,PD 阻止 MUC1, MUC2 升高、ZO-1 降低从而使大鼠回肠黏膜屏障趋于稳态.

参考文献:

- [1] 陈宝霞,任建明,周轲,等. 肠道湿热泄泻和寒湿泄泻“同病异治”的物质基础研究 [J]. 中国实验动物学报,2023,31(4): 417-427.
- [2] 陶未来,刘佳,刘琼丹,等. 术苦芩总多糖对湿热泄泻仔猪肠道菌群和免疫功能的影响 [J]. 畜牧兽医学报,2022,53(3): 913-924.
- [3] 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): 246-255.
- [4] 林春发,郝永峰,刘娟. 术苦芩多糖对湿热泄泻仔猪小肠 Notch 信号通路干预的探究 [J]. 中国兽医学报,2020,40(1): 172-178.
- [5] 代汝伟,高志远,刘秀丽,等. 加味白头翁汤治疗热毒炽盛型溃疡性结肠炎的疗效 [J]. 西北药学杂志,2022,37(4): 157-161.
- [6] 何琼姿,韦鹏,刘欢欢,等. 白头翁汤对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 mTORC1-STAT3-COX-2 信号通路的影响 [J]. 南京中医药大学学报,2023,39(1): 50-56.
- [7] 谭朝晖,刘荣火,邹立华,等. 白头翁汤对溃疡性结肠炎黏膜愈合的影响及部分机制研究 [J]. 中国中医药信息杂志,2016,23(7): 30-34.
- [8] 钟宇,郑学宝,叶华,等. 白头翁汤对溃疡性结肠炎大鼠的疗效及免疫机制的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2019,

25(12): 15-21.

- [9] 马琪. 基于代谢组学和网络药理学的白头翁汤治疗湿热泄泻的作用机制研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2018.
- [10] 樵明玉. 郁金散及其组方药物消除鸡源多重耐药大肠杆菌耐药性的作用研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [11] 王佳丽, 单安山, 刘天阳, 等. 女贞子 CO₂ 超临界萃取物对断奶仔猪小肠绒毛、盲肠菌群及血常规的影响 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(12): 10-15.
- [12] 王中原. 血常规指标和炎症因子水平与慢性阻塞性肺疾病继发真菌感染的关系 [J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(9): 1073-1077.
- [13] KAMINSKY L W, AL-SADI R, MA T Y. IL-1 β and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 767456.
- [14] 王玉娇, 韩艳珺, 夏红, 等. IL-6/JAK2/STAT3 信号通路在小儿轮状病毒性肠炎中的表达与机制 [J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(19): 3021-3024.
- [15] GUO Y X, WANG B Y, WANG T T, et al. Biological Characteristics of IL-6 and Related Intestinal Diseases [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(1): 204-219.
- [16] 闫志强, 翟少钦, 付文贵, 等. 女黄扶正颗粒对大鼠体液免疫功能和抗氧化力的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(10): 74-78.
- [17] IWASZKO M, BIAŁY S, BOGUNIA-KUBIK K. Significance of Interleukin(IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3000.
- [18] LEE J S, TATO C M, JOYCE-SHAIKH B, et al. IL -23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability [J]. *Immunity*, 2015, 43(4): 727-738.
- [19] SAFDARI B K, SIA T C, WATTCHOW D A, et al. Effects of Pro-Inflammatory Cytokines, Lipopolysaccharide and COX-2 Mediators on Human Colonic Neuromuscular Function and Epithelial Permeability [J]. *Cytokine*, 2016, 83: 231-238.
- [20] MICHIELAN A, D'INCÀ R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut [J/OL]. *Mediators of Inflammation*, 2015, 2015: 628157.
- [21] WNOROWSKI A, WNOROWSKA S, KURZEPA J, et al. Alterations in Kynurenine and NAD⁺ Salvage Pathways during the Successful Treatment of Inflammatory Bowel Disease Suggest HCAR3 and NNMT as Potential Drug Targets [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24): 13497.
- [22] 刘雅清, 徐航宇, 王敦方, 等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响及肠黏膜屏障的保护作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(7): 11-19.
- [23] 刘梦琪, 周小明, 张维宁. 黏蛋白的结构与功能及其在肿瘤诊断治疗中的应用前景 [J/OL]. 江苏大学学报(医学版), 2023, 33(3): 270-276.
- [24] 赵婵娟, 何先林, 鄢行安, 等. 苓术止泻口服液对脾虚泄泻大鼠结肠黏膜形态、通透性及紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 mRNA 表达的影响 [J]. 中国兽医杂志, 2021, 57(8): 78-82, 90.

责任编辑 苏荣艳