

· 药效与毒理学研究 ·

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

祝赫¹, 柴玉娜², 张毅靖³, 王永福³, 甘剑峰³, 周云松⁴, 唐洪梅¹(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052; 3. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405; 4. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550000)

摘要: **目的** 探讨肠激安方对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)大鼠结肠黏膜超微结构及上皮细胞闭锁小带蛋白(ZO-1)和紧密连接蛋白(CLDN1)表达的影响。**方法** 将 40 只 SPF 级新生 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、匹维溴铵组(18 mg·kg⁻¹)和肠激安方高(33.48 g·kg⁻¹)、低(16.74 g·kg⁻¹)剂量组, 共 5 组, 每组 8 只, 采用三因素(母婴分离+醋酸刺激+束缚)结合的方法, 复制 IBS-D 大鼠模型。模型复制结束后, 给予匹维溴铵和肠激安方连续灌胃 14 d。用腹部回缩反射(AWR)评价内脏高敏状态, 透射电镜(TEM)观察结肠黏膜超微结构的变化, 采用免疫组化(IHC)、实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)法分析结肠组织 ZO-1 和 CLDN1 的表达。**结果** 与模型组比较, 匹维溴铵组、肠激安方高剂量组、肠激安方低剂量组大鼠 AWR 内脏敏感性评分降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 透射电镜观察结肠黏膜超微结构的结果显示, IBS-D 模型组紧密连接不完整, 部分有断裂, 缝隙连接增宽, 给予药物干预后, 各组大鼠结肠黏膜中破坏的紧密连接结构得到一定程度的修复; 与模型组比较, 匹维溴铵组和肠激安方高、低剂量组结肠组织中 ZO-1 和 CLDN1 的 mRNA 相对含量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), ZO-1、CLDN1 的平均光密度(OD)值升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 肠激安方可改善 IBS-D 模型大鼠结肠黏膜超微结构异常, 上调结肠黏膜上皮细胞 ZO-1 和 CLDN1 的表达。

关键词: 腹泻型肠易激综合征(IBS-D); 肠激安方; 紧密连接蛋白(CLDN1); 上皮细胞闭锁小带蛋白(ZO-1); 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)07-0905-07

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.07.001

Effects of *Changji'an* Formula on Ultrastructure of Colonic Mucosa and Levels of ZO-1 and CLDN1 in Model Rats with IBS-D

ZHU He¹, CHAI Yuna², ZHANG Yijing³, WANG Yongfu³, GAN Jianfeng³, ZHOU Yunsong⁴, TANG Hongmei¹ (1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052 Henan, China; 3. The First School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 4. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550000 Guizhou, China)

Abstract: **Objective** This study intends to investigate the effects of *Changji'an* formula on ultrastructure of colonic mucosa and levels of ZO-1 and CLDN1 in model rats with IBS-D. **Methods** 40 SPF grade SD rats were randomly

收稿日期: 2021-01-21

作者简介: 祝赫, 男, 主管中药师, 博士, 研究方向: 中药新药开发与安全性评价。Email: zhuhe91655@gzucm.edu.cn。通信作者: 唐洪梅, 女, 主任中药师, 博士, 研究方向: 中药新药开发与安全性评价、合理用药与药物经济学评价。Email: tanghongmei2000@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81673842, 81703955); 广东省自然科学基金面上项目(2019A1515011745)。

divided into five groups, including the normal group, the model group, the pinaverium bromide group($18\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the high dose of *Changji'an* formula group($33.48\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the low dose of *Changji'an* formula group($16.74\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with eight rats per group. The rat model of IBS-D was established by three-factors method: maternal separation, acetic acid stimulation and restraint stress. At the end of the modeling, all medication was given by gavage and lasted for 14 successive days. After medication, AWR scores of rectal distention test were performed to evaluate the visceral sensitivity, the changes of ultrastructure of colonic mucosa were observed by TEM. Immunohistochemistry (IHC) was used to examine the expression of CLDN1 and ZO-1 in colonic tissues. The mRNA levels of CLDN1, ZO-1 in colon tissues were assessed using RT-qPCR. **Results** Compared with model group, AWR scores were decreased in pinaverium bromide group, high and low dose of *Changji'an* formula group($P<0.05$, $P<0.01$). The TEM results showed that the tight junction of IBS-D model group appeared incomplete, disrupted and widen. *Changji'an* formula alleviated the impairment of ultrastructure of colonic mucosa in IBS-D model rats on a certain degree. Compared with model group, the mRNA levels of CLDN1 and ZO-1 in rats' colonic tissue were increased after administration of high and low dose of *Changji'an* formula and pinaverium bromide($P<0.05$, $P<0.01$). The average optical density values of ZO-1 and CLDN1 with immunohistochemistry increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** *Changji'an* formula can improve the disorder ultrastructure of colonic mucosa and up-regulate levels of ZO-1 and CLDN1 in model rats with IBS-D.

Keywords: Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D); *Changji'an* formula; CLDN1; ZO-1; rats

腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 是以反复发作的腹胀、腹痛、腹泻为主要症状的胃肠道功能紊乱性疾病, 属于中医泄泻、腹痛、郁证等病症范畴。其在亚洲地区的发病率为 9.5%~9.8%, 并有逐年上升的趋势^[1]。该病患病率高、病程长、易反复、治疗困难, 对患者的生活质量产生严重影响。

肠激安方由四君子汤、痛泻要方加减而来, 具有益气健脾、柔肝止泻的功效, 该方疗效确切, 是广州中医药大学第一附属医院长期用于治疗 IBS-D 的临床经验方。本课题组前期的研究^[2-3]表明, 肠激安方能够有效调节 IBS-D 模型大鼠的胃肠激素、神经递质、免疫细胞的功能, 可明显改善 IBS-D 大鼠内脏高敏感和肠道通透性。

IBS-D 的发病机制与持续的低度肠道炎症、免疫机制异常、结肠通透性增高等密切相关^[4]。目前研究^[5]发现, 低度肠道炎症可引起肠上皮细胞紧密连接结构损害, 进而造成机械屏障功能受损。紧密连接结构由多种蛋白构成, 其上皮细胞闭锁小带蛋白 (ZO-1) 和紧密连接蛋白 (CLDN1) 对维持肠正常的结构和功能起着重要的作用^[6]。因此, 本研究以 IBS-D 模型大鼠结肠黏膜超微结构、ZO-1 和 CLDN1 为研究对象, 进一步探讨肠激安方对 IBS-D 的作用机制, 为临床运用肠激安方治疗 IBS-D 提供可靠的

实验依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级哺乳期 SD 母鼠及新生 SD 大鼠, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 动物质量合格证号: 44005800006168, 动物许可证号: SCXK(粤)2013-0034。哺乳期母鼠和乳鼠同窝饲养于高压灭菌木屑垫料的大鼠专用饲养笼中。保持昼夜明暗交替 12h/12h, 噪音 $\leq 60\text{ dB}$, 饲养环境温度 $20\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相对湿度控制在 50%~70%, 实验动物自由进食进水, 饮用水为高压灭菌纯净水。动物实验地点: 广州中医药大学第一附属医院实验动物中心, 使用许可证号: SYXK(粤)2013-0092。本实验通过广州中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准, 编号: TCMF1-2017009, 按 3R 原则对实验动物给予人道关怀。

1.2 药物及试剂 肠激安方中药饮片由康美药业生产, 购于广州中医药大学第一附属医院, 经该院药检室鉴定。茯苓(批号: 170209941)、甘草(批号: 170104051)、陈皮(批号: 170202891)、石榴皮(批号: 170401211)、黄连(批号: 170210611)、白芍(批号: 170300701)、土白术(批号: 170310481)、枳壳(批号: 170312741)、延胡索(批号:

170401221)、乌梅(批号:170302701)、防风(批号:170307291)、柴胡(批号:170304921)、黄芪(批号:170308891)。肠激安水煎液制备:按处方称取药材,4 倍量水浸泡 30 min,大火煎煮 40 min,滤过,药液备用;再加 3 倍量水煎沸后小火煎煮 30 min,滤过后合并 2 次滤液;以 60 ℃浓缩至生药含量为 1.67 g·mL⁻¹。按照用药时给药剂量配成高、低两个浓度。匹维溴铵,法国 Abbott Healthcare SAS 公司,批号:6400156,用研钵研碎至粉状,蒸馏水稀释至所需浓度。

总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus(批号:9109)、反转录试剂盒(批号:RR047A)、SYBR green 荧光定量试剂盒(批号:RR820A)、RNase-free 水(批号:9012),日本 Takara 公司;二抗(山羊抗兔),中国北京碧云天生物技术有限公司,批号:A0208;免疫组化试剂盒(批号:SP-9001)、苏木素(批号:ZLI-9615)、浓缩型 DAB 试剂盒(批号:ZLI-9017),中国北京中杉金桥生物技术有限公司;β-actin,上海生工生物技术有限公司,批号:B661202。

1.3 主要仪器 OSE-Y40 TGrinder 电动组织研磨器,北京 TIANGEN 生化科技有限公司;T100PCR 逆转录仪、CFX96 荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-rad 公司;5804R 低温离心机,德国 Eppendorf 公司;TH4-200 倒置显微镜,日本 OLYMPUS 公司。

1.4 动物模型复制 参照文献方法^[7-8],采用母婴分离、醋酸刺激、束缚相结合的方法,复制大鼠 IBS-D 模型。取新生 SD 大鼠,从出生第 2~14 天,将乳鼠和母鼠分开,3 h·d⁻¹。第 15~27 天,将润滑后的导尿管(直径 1 mm)经肛门插入 2 cm,注入 0.087 mol·L⁻¹ 的醋酸,醋酸起始用量为 0.2 mL,每 2 d 增加 0.1 mL,从第 21 天开始保持醋酸用量为 0.5 mL,每天对大鼠进行醋酸直肠刺激 1 次。在直肠刺激结束后,立即用扎线带将大鼠上肢束缚 1 h,不限制大鼠活动,但限制上肢搔抓面部。从第 27 天起,正常饲养 2 周,不进行任何干预性操作。

1.5 腹部回缩反射(AWR)评价大鼠 IBS-D 模型 参照文献方法^[9],以 AWR 评分进行模型评价。将 8F 双腔导尿管表面均匀涂抹医用整合剂,插入大鼠肛门深约 8 cm 处,用医用胶带固定,不限制大鼠的自由活动。当大鼠适应环境后,用一次性注射器向导尿管腔内注入 1.5 mL 空气,观察大鼠在 5 min 内的活动情况。参照评分标准^[10],评分≥2 分视为模型复制成功。

1.6 分组及给药方法 按人和大鼠间体表面积折算的等效剂量比值换算临床等效用药剂量。将模型复制成功的大鼠随机分为 4 组,每组 8 只,分别为模型组、匹维溴铵组(18 mg·kg⁻¹)、肠激安方高剂量组(33.48 g 生药·kg⁻¹)、肠激安方低剂量组(16.74 g 生药·kg⁻¹),余下未行模型复制的 8 只大鼠为正常组。每天灌胃 1 次,连续 14 d。正常组和模型组给予同体积的生理盐水。

1.7 样本采集 末次给药后,禁食 24 h,10%水合氯醛麻醉大鼠,脊椎脱臼处死,取出 3 段结肠组织,分别置于 2.5%戊二醛中固定,用于透射电镜观察;置于 4%多聚甲醛中固定,用于免疫组化分析;置于液氮中速冻,转移至-80 ℃冰箱保存,用于 mRNA 的检测。

1.8 透射电镜观察结肠黏膜上皮细胞超微结构变化情况 将在 2.5%戊二醛中 4 ℃固定 24 h 的结肠黏膜切成 1 mm³大小、不超过米粒大的组织块,用 2%四氧化锇固定结肠黏膜,丙酮梯度脱水,在环氧树脂中进行包埋,然后放置于电热鼓风干燥箱中加热固化。最后使用莱卡超薄切片机切 1 μm 厚度的半薄切片进行定位,用奥林巴斯光学显微镜观察适合做电子显微镜的部位。使用莱卡超薄切片机切片,厚度 50~70 nm。2%醋酸双氧铀染色,以透射电子显微镜观察并拍照。

1.9 免疫组化法检测结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的表达 取大鼠结肠组织,以 4%多聚甲醛固定充分;经过梯度乙醇、二甲苯脱水,石蜡包埋,切成厚度为 4 μm 的组织切片;贴片后,60 ℃烤片 30 min,经二甲苯、梯度乙醇水化后,置于枸橼酸盐溶液(pH=6.0)中微波抗原修复 5 min;PBS 洗涤,滴加 3% H₂O₂,室温下孵育 10 min,滴加 5% BSA 封闭液,室温下孵育 30 min,滤纸吸净残液,滴加一抗(稀释浓度参照说明书),4 ℃过夜;PBS 冲洗,滴加 HRP 标记的山羊抗兔二抗(稀释浓度参照说明书),室温孵育 30 min;PBS 洗涤,DAB 显色,10%苏木素复染,1%盐酸-酒精分化 10 s,流水冲洗 10 min。经透明后,中性树胶封片,每张切片选择 5 个不重复的视野拍照;通过 Image-Pro Plus 软件统计棕褐色阳性染色的光密度值(OD)。

1.10 RT-qPCR 法检测结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的 mRNA 相对含量 取大鼠结肠组织约 50 mg,使用自动匀浆器在冰上充分研磨,加入 500 μL RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂,根据说明书进行 RNA 反转

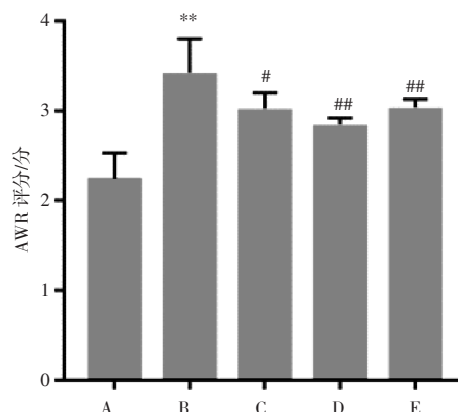
录实验, 将 cDNA 产物在 RNase-free 离心管中配置 qPCR 反应体系。引物序列由上海生工生物有限公司合成, CLDN1: (F) 5'-GTGTCCACCATTGGCATGAA-3', (R) 5'-GGCCACTAATGTCGCCAGAC-3'; ZO-1: (F) 5'-GTGCACGATCCAAGAAGTGG-3', (R) 5'-CCACTGATCGCCTGTCTGAG-3'。采用两步法 PCR 扩增程序: 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行基因表达的相对定量分析。

1.11 统计学处理方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理和分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。若数据符合正态分布、方差齐性, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 进行分析; 若数据方差不齐, 则采用 Dunnett's T_3 法检验。

2 结果

2.1 大鼠一般行为观察 正常组大鼠的毛色洁白光泽, 活泼好动, 精神状态良好。模型组大鼠精神萎靡, 肛门周围污秽, 第 7 天起开始出现腹泻, 呈黄色稀便样。模型复制结束后, 各模型复制组大鼠精神萎靡不振, 毛发散乱无光泽、扎堆在角落、静卧少动, 体质量减轻。

2.2 内脏敏感性 AWR 评分 如图 1 所示, 与正常组比较, 模型组 AWR 内脏敏感性评分明显升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 匹维溴铵组、肠激安方高剂量组、肠激安方低剂量组 AWR 评分降低($P <$



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 匹维溴铵组; D. 肠激安方高剂量组; E. 肠激安方低剂量组。与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 1 肠激安方对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)模型大鼠 AWR 评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure 1 Effect of Changji'an formula on AWR scores in model rats with IBS-D($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

0.05, $P < 0.01$)。

2.3 透射电镜观察结肠黏膜微绒毛形态与紧密连接超微结构的变化 如图 2 所示, 正常组大鼠结肠黏膜表面微绒毛分布均匀, 排列整齐, 密度均匀; 模型组微绒毛减少, 长短不一, 分布不均匀且排列散乱; 给予药物干预后, 各组大鼠结肠黏膜绒毛形态均有一定改善。正常组大鼠结肠黏膜细胞间紧密连接结构完整、连接致密; 而模型组紧密连接不完整, 部分有断裂, 缝隙连接增宽; 给予药物干预后, 各组破坏的紧密连接结构均得到了一定的修复。

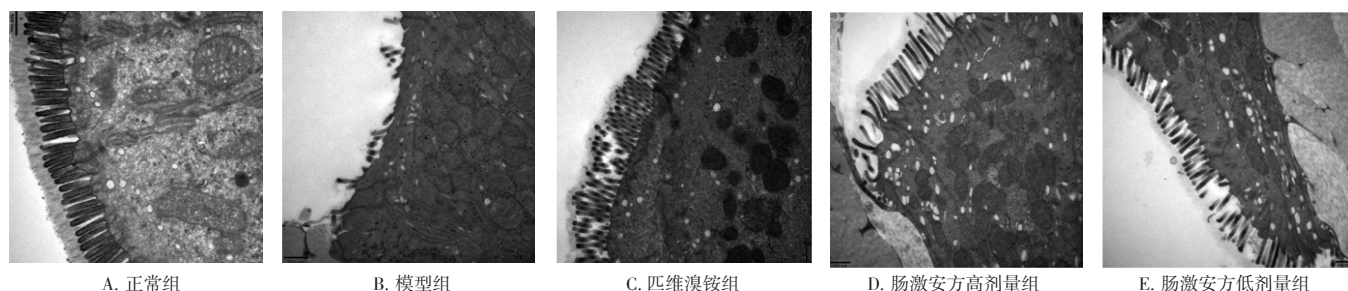


图 2 肠激安方对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)模型大鼠结肠黏膜超微结构的影响($\times 2000$)

Figure 2 Effect of Changji'an formula on ultrastructure of colonic mucosa in model rats with IBS-D($\times 2000$)

2.4 免疫组化法检测 IBS-D 大鼠结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的表达 如图 3、4 所示, 显微镜下观察结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的表达, 结肠上皮棕黄色为 CLDN-1 和 ZO-1 阳性表达, 多分布于细胞膜。与正常组比较, 模型组结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的表达降低; 与模型组比较, 给予药物干预后, 匹维溴

铵组、肠激安方高剂量组、肠激安方低剂量组的结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的表达均升高。如表 1 所示, 与正常组比较, 模型组的 ZO-1 和 CLDN1 的 IOD 值均降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 匹维溴铵组、肠激安方高剂量组、肠激安方低剂量组 ZO-1、CLDN1 的 IOD 值均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

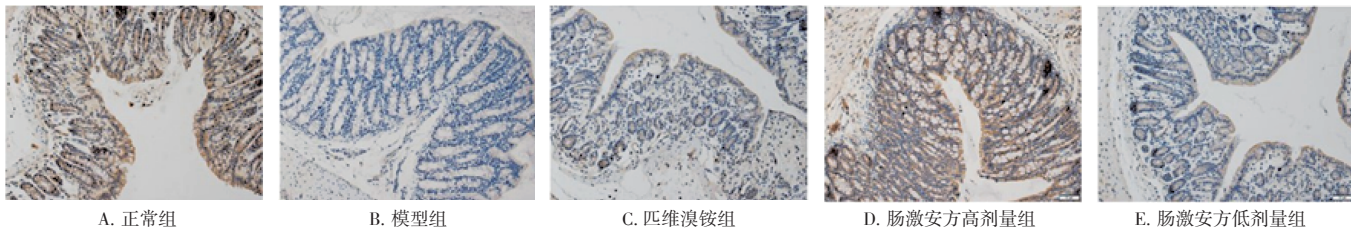


图 3 肠激安方对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)模型大鼠结肠组织中 ZO-1 表达的影响($\times 200$)

Figure 3 Effect of *Changji'an* formula on ZO-1 expression in colonic tissue of IBS-D model rats($\times 200$)

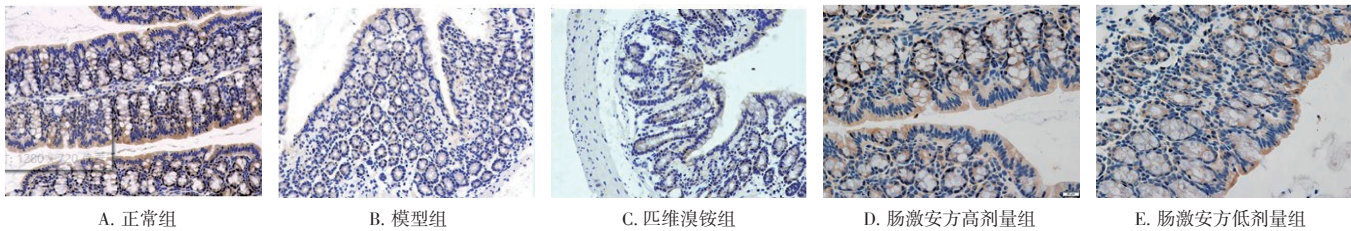


图 4 肠激安方对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)模型大鼠结肠组织中 CLDN1 表达的影响($\times 200$)

Figure 4 Effect of *Changji'an* formula on CLDN1 expression in colonic tissue of IBS-D model rats($\times 200$)

表 1 各组免疫组化平均光密度(IOD)值($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 The average optical density of the immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ZO-1	CLDN1
正常组	—	267.89 ± 25.3	154.17 ± 15.21
模型组	—	$148.04 \pm 17.9^{**}$	$74.81 \pm 7.32^{**}$
匹维溴铵组	$18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$200.78 \pm 26.2^{\#}$	$100.80 \pm 14.58^{\# \#}$
肠激安方高剂量组	33.48	$190.76 \pm 17.1^{\# \#}$	$110.70 \pm 10.21^{\# \#}$
肠激安方低剂量组	16.74	$180.83 \pm 16.8^{\# \#}$	$90.84 \pm 11.36^{\#}$

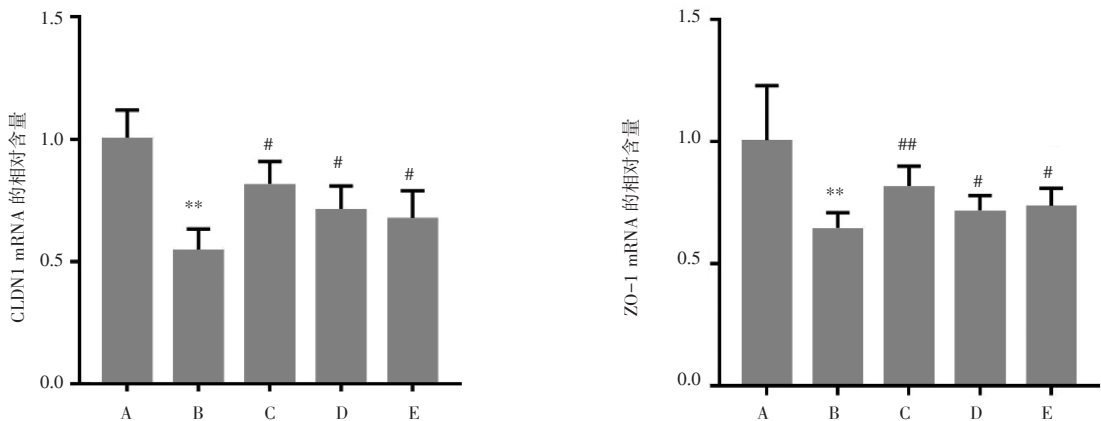
注:与正常组比较, $^{**}P < 0.01$;与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\# \#}P < 0.01$

2.5 RT-qPCR 法检测 IBS-D 模型大鼠结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的 mRNA 相对含量 如图 5 所示,与正常组比较,模型组大鼠结肠组织中 CLDN1 和

ZO-1 的 mRNA 相对含量均明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,匹维溴铵组、肠激安方高剂量组、肠激安方低剂量组结肠组织中 CLDN1、ZO-1 的 mRNA 相对含量均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论

根据腹泻型肠易激综合征(IBS-D)的临床表现,可归属于中医“腹痛”“腹胀”“腹泻”“郁证”的范畴中。目前西医对 IBS-D 多采用对症治疗,使用的药物主要包括解痉药、5-HT 相关制剂、止泻药、肠道微生物调节剂等,可较为迅速地缓解 IBS-D 的症状,但远期疗效不理想,易反复。IBS-D 属于应用中医药方案治疗的优势病种之一^[11],辨证治疗 IBS-D 具



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 匹维溴铵组; D. 肠激安方高剂量组; E. 肠激安方低剂量组。与正常组比较, $^{**}P < 0.01$;与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\# \#}P < 0.01$

图 5 肠激安方对腹泻型肠易激综合征(IBS-D)模型大鼠结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的 mRNA 相对含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure 5 Effect of *Changji'an* formula on mRNA levels of CLDN1 and ZO-1 in colonic tissues of IBS-D model rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

有独特优势。

肠激安方中白术、白芍补脾燥湿，柔肝缓急止痛共为君药；黄芪、茯苓、枳壳、石榴皮行气止痛为臣药；佐以延胡索、黄连、乌梅、防风清利湿热，止痛止泻；使以陈皮、甘草、柴胡理气燥湿。全方具有疏肝健脾，清利湿热，行气止痛，涩肠止泻的功效，是广州中医药大学第一附属医院长期用于临床治疗 IBS-D 的验方，疗效确切。

虽然关于 IBS-D 模型建立方法的报道日益增多，但其模型的复制仍然存在一定的局限性，主要原因是由于 IBS-D 的病因非常复杂，发病机制尚不明确。目前，以模拟一个或者一种致病因素或症状的方式来复制 IBS-D 模型的方法较多^[12-13]。本课题组在前期研究^[7-8]的基础上，充分考虑到 IBS-D 的特点，通过母子分离、醋酸灌肠和束缚应激三因素相结合的方法成功复制了病症集合的 IBS-D 大鼠模型。该法可靠且重复性较好，复制的模型是较为经典的 IBS-D 模型。

近期我们发现^[14]，肠激安方可改善 IBS-D 模型大鼠的肠道通透性。肠道超微结构异常会导致肠道屏障功能的受损，进而引发肠道通透性的改变^[15]。本研究在此基础上，进一步探讨肠激安方改善结肠黏膜超微结构的作用机制，寻找肠激安方的作用靶点。紧密连接蛋白与微绒毛是肠黏膜上皮细胞的标志性结构，对调控上皮细胞通透性，维持细胞内环境稳定起到重要的作用^[16]。正常生理状态时，电镜下观察超微结构，可见结肠黏膜微绒毛排列整齐，是肠上皮细胞发挥吸收和防御功能的重要保障^[17]。结肠上皮细胞的紧密连接表现为连续的融合点，线条清晰，边缘光滑，相邻细胞膜呈现出绳索样结构^[18]。本实验电镜结果显示，正常组大鼠结肠黏膜表面微绒毛分布均匀，排列整齐，密度均匀。模型组细胞表面微绒毛减少，长短不一，分布不均匀且排列散乱；细胞紧密连接结构不完整，部分断裂，连接疏松。给予肠激安方干预后，各组结肠黏膜绒毛形态及紧密连接结构均有一定的修复。结果提示，肠激安方对 IBS-D 模型大鼠的结肠黏膜超微结构的破坏具有一定的改善作用。

ZO 蛋白(zonula occludens protein)广泛分布于肠道、血管内皮等组织器官中，是构成上皮细胞紧密连接的重要结构蛋白，对物质跨上皮转运、细胞增殖分化等过程具有重要调节作用^[19]。ZO 蛋白属于膜

相关鸟苷酸激酶家族，包含 ZO-1、ZO-2、ZO-3 三个异构体，三者以异聚体形式组成复合体。ZO-1 的 N 端有 3 个 PDZ 结构域、1 个 SH3 结构域以及 1 个 GUK 结构域，其中 PDZ 可与 Claudin、Occludin、JAMs 等跨膜蛋白相连，而 ZO-1 的 C 末端可连接细胞骨架蛋白，从而形成稳定的紧密连接结构复合体^[20]。CLDN1 是组成细胞间紧密连接的结构蛋白，也是维持紧密连接渗透性的主要蛋白，可以与其他紧密连接蛋白共同维持紧密连接的功能^[16]。本研究的免疫组化和 RT-qPCR 结果显示，与正常组比较，模型组的结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的表达水平降低；给予肠激安方干预后，结肠组织中 CLDN1 和 ZO-1 的表达水平有所升高。结果提示，肠激安方可能通过对 CLDN1 和 ZO-1 的调控，从而改善 IBS-D 模型大鼠的结肠黏膜超微结构。

本实验从结肠黏膜超微结构以及紧密连接蛋白的角度，探讨了肠激安方治疗 IBS-D 的机制，但也存在一定的不足之处：IBS-D 发病机制复杂，涉及多方面因素，本实验尚未涉及到神经、免疫方面的研究；另外由于动物实验的局限性，所得结论需要临床试验的进一步验证。本实验的阳性对照药是匹维溴铵，匹维溴铵是可以选择性作用于胃肠道平滑肌的钙通道阻滞剂，被广泛应用于 IBS-D 的治疗，它在一定程度上可以迅速缓解腹痛及改善大便性状，但远期效果不理想^[21]。

综上所述，肠激安方可改善 IBS-D 模型大鼠的结肠黏膜超微结构异常，这可能与调控 CLDN1 和 ZO-1 的表达有关。本研究可为该方应用于临床治疗 IBS-D 提供实验依据和理论支持。

参考文献：

- [1] SPERBER A D, DUMITRASCU D, FUKUDO S, et al. The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a Rome Foundation working team literature review[J]. Gut, 2017, 66(6): 1075-1082.
- [2] 祝赫, 石玉莹, 吴映秀, 等. 肠激安方对 IBS-D 模型大鼠脾虚泄泻及 miRNA-29a 表达的影响[J]. 环球中医药, 2020, 13(8): 1309-1315.
- [3] 唐洪梅, 涂星, 柴玉娜, 等. 两种亚型肠易激综合征中氨基酸神经递质及其受体变化[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(30): 4559-4565.
- [4] DROSSMAN D A. Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features, and Rome IV[J]. Gastroenterology, 2016, 150(6): 1262-1279.

- [5] 周小平, 李学良. 肠易激综合征内脏高敏感的研究进展[J]. 胃肠病学, 2014, 19(2): 117-120.
- [6] HOU Q, ZHU S, ZHANG C, et al. Berberine improves intestinal epithelial tight junctions by upregulating A20 expression in IBS-D mice[J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2019, 118: 109206.
- [7] 张庆业, 廖小红, 范丽霞, 等. 肝郁脾虚泄泻大鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 20-23.
- [8] 唐洪梅, 李得堂, 黄樱华, 等. 腹泻型肠易激综合征大鼠模型的建立及敏感性评估的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(5): 693-695.
- [9] BRADESI S, SCHWETZ I, ENNES H S, et al. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2005, 289(1): G42-G53.
- [10] ALCHAER E D, KAWASAKI M, PASRICHA P J. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [11] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 肠易激综合征中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3): 227-232.
- [12] 张北华, 王微, 王凤云, 等. 腹泻型肠易激综合征大鼠模型不同造模方法的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(5): 1092-1095.
- [13] 张薇, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 肠易激综合征内脏高敏动物模型的研究现状[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5655-5658.
- [14] 祝赫, 石玉莹, 吴映秀, 等. 肠激安方对IBS-D模型大鼠脾虚泄泻及miRNA-29a表达的影响[J]. 环球中医药, 2020, 13(8): 1309-1315.
- [15] MARTÍNEZ C, LOBO B, PIGRAU M, et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: An organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier[J]. *Gut*, 2012, 62(8): 1-9.
- [16] ZHOU Q Q, COSTINEAN S, CROCE C M, et al. MicroRNA 29 targets nuclear factor- κ B-repressing factor and claudin 1 to increase intestinal permeability[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 158-169.
- [17] WANG H, LI X, WANG C, et al. Abnormal ultrastructure of intestinal epithelial barrier in mice with alcoholic steatohepatitis[J]. *Alcohol*, 2014, 48(8): 787-793.
- [18] CHENG P, YAO J, WANG C, et al. Molecular and cellular mechanisms of tight junction dysfunction in the irritable bowel syndrome[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 3257-3264.
- [19] KAZUAKI U, JUNICHI I, SAYAKA K T, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 741-754.
- [20] ITOH M, FURUSE M, MORITA K, et al. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins[J]. *Journal of Cell Biology*, 1999, 147(6): 1351-1363.
- [21] MARTÍNEZ-VÁZQUEZ M A, VÁZQUEZ-ELIZONDO G, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ J A, et al. Effect of antispasmodic agents, alone or in combination, in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis[J]. *Revista de Gastroenterología de México*, 2012, 77(2): 82-90.

(编辑: 修春)