

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.23.012

柴胡疏肝散对功能性消化不良模型大鼠 十二指肠黏膜屏障和肠道菌群的影响

杨珂鸣, 贾越博, 叶丽亚·叶尔太, 刘雪娇, 王香香, 蒋凯林, 凌江红✉

上海中医药大学附属曙光医院, 上海市普安路 185 号, 201203

[摘要] **目的** 探讨柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的可能作用机制。**方法** 将 24 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、柴胡疏肝散组和益生菌组, 每组 6 只。除正常组外, 其余各组大鼠均予改良夹尾激惹法复制功能性消化不良大鼠模型。造模同时, 正常组及模型组予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃, 柴胡疏肝散组予柴胡疏肝散水煎液 9.6 g/(kg·d) 灌胃, 益生菌组予益生菌水溶液 0.945 g/(kg·d) 灌胃, 每天 2 次, 连续 4 周。4 周后检测各组大鼠胃排空率与小肠推进率, HE 染色观察大鼠胃窦及十二指肠组织病理学变化, 16s rDNA 高通量基因测序法分析大鼠的肠道菌群变化, 并且采用免疫组织化学法及蛋白免疫印迹法检测十二指肠带状闭合蛋白 1 (ZO-1) 和咬合蛋白 (Occludin) 的表达, 并对肠道菌群与 ZO-1、Occludin 蛋白表达进行 Pearson 相关性分析。**结果** 各组大鼠胃窦组织结构层次清晰, 腺体结构规整, 胃组织黏膜光滑, 未见糜烂、溃疡等病理改变。与正常组比较, 模型组十二指肠组织肠绒毛明显减少或萎缩, 杯状细胞排列紊乱, 可见嗜酸性粒细胞浸润, 大鼠胃排空率及小肠推进率、十二指肠组织中 ZO-1、Occludin 蛋白表达均降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 柴胡疏肝散组及益生菌组十二指肠组织结构层次清晰, 肠绒毛长度较长, 杯状细胞排列较为整齐, 柴胡疏肝散组未见明显嗜酸性粒细胞浸润, 大鼠胃排空率、小肠推进率及 ZO-1、Occludin 蛋白表达均升高, 益生菌组可见少量嗜酸性粒细胞浸润, 大鼠胃排空率、Occludin 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。肠道菌群 Beta 多样性分析显示, 与正常组比较, 模型组的肠道菌群整体结构出现了显著变化 ($P<0.01$)。与模型组比较, 柴胡疏肝散组和益生菌组的肠道菌群整体结构更接近正常组。物种组成分析, 与正常组比较, 模型组厚壁菌门相对丰度降低, 拟杆菌门、未分类的 *Muribaculaceae* 菌属相对丰度增加, 拟杆菌门/厚壁菌门值升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 柴胡疏肝散组和益生菌组厚壁菌门相对丰度增加, 拟杆菌门、未分类的 *Muribaculaceae* 菌属相对丰度降低, 拟杆菌门/厚壁菌门值降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。益生菌组与柴胡疏肝散组各指标组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。Pearson 相关性分析显示, 在门水平上, 厚壁菌门与 ZO-1 ($r=0.610$, $P=0.016$)、Occludin ($r=0.694$, $P=0.004$) 蛋白表达量呈正相关。拟杆菌门与 ZO-1 ($r=-0.557$, $P=0.031$)、Occludin ($r=-0.662$, $P=0.007$) 蛋白表达量呈负相关。在属水平上, 未分类的 *Muribaculaceae* 菌属与 ZO-1 ($r=-0.727$, $P=0.002$)、Occludin ($r=-0.760$, $P=0.001$) 蛋白表达量呈负相关。**结论** 柴胡疏肝散可能通过恢复肠道菌群结构, 调节厚壁菌门、拟杆菌门和未分类的 *Muribaculaceae* 菌属的丰度水平, 同时上调 ZO-1、Occludin 蛋白, 进而修复十二指肠黏膜屏障, 对功能性消化不良起到治疗作用。**[关键词]** 功能性消化不良; 柴胡疏肝散; 肠道菌群; 十二指肠; 黏膜屏障

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是临床上最常见的功能性胃肠病, 主要表现为上腹部疼痛、上腹部烧灼感、餐后饱胀和早饱感等症状^[1]。研究表明, 十二指肠屏障缺陷和低度炎症是

FD 的发病机制之一^[2], 菌群失调是其主要诱发因素^[3]; 与健康人比较, FD 患者肠道菌群紊乱, 致病菌增多^[4], 而给予益生菌治疗后可以改变菌群结构、改善临床症状^[5]。因此, 肠道菌群的结构变化对 FD 有着重要影响。菌群失调可能会引起肠黏膜屏障功能受损, 肠道通透性增加, 干扰十二指

基金项目: 国家自然科学基金 (82174309)

✉ 通讯作者: 459183870@qq.com

肠-胃反馈机制的信号,最终引发胃运动功能障碍^[6]。在此过程中,十二指肠紧密连接蛋白的表达水平,如带状闭合蛋白1(ZO-1)和咬合蛋白(Occludin)被证实与十二指肠通透性和低度炎症的严重程度相关^[7]。

功能性消化不良是中医的优势病种^[8]。临床研究表明,以疏肝理气法代表方柴胡疏肝散为主治疗本病具有良好的疗效^[9-10],其可以通过抗炎、抗氧化应激、促进胃排空等途径治疗FD^[11-12]。本研究通过复制FD大鼠模型,观察柴胡疏肝散对FD大鼠十二指肠黏膜屏障和肠道菌群的影响,并探究其防治FD的深层作用机制,为其临床治疗FD提供更充分的实验依据。本研究获得上海中医药大学动物伦理委员会批准(伦理编号:PZSHUTCM220808007)。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠24只,6~8周龄,体质量180~220 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(沪)2022-0004。饲养于上海中医药大学实验动物中心,环境湿度为55%~57%,温度为22~24℃,12 h明暗循环,可自由摄取水和食物。

1.2 药物制备

柴胡疏肝散组成:北柴胡12 g,白芍9 g,川芎9 g,枳壳9 g,陈皮12 g,香附9 g,炙甘草3 g(上海养和堂中药饮片有限公司,批号分别为2022121508、2022121908、2023021907、20210915、20221225、2022102308、2023022307)。一煎将所有药物浸泡于蒸馏水30 min后,武火煮沸并持续15 min,随后文火煎煮30 min,使用双层滤网过滤药液;二煎加入蒸馏水煎煮30 min,2次药液合并,水浴浓缩至含生药浓度0.48 g/ml的水煎液,置于4℃冰箱保存备用。双歧杆菌四联活菌片(杭州远大生物制药有限公司,批号KDJ3YSP),使用0.9%无菌生理盐水将活菌片稀释制备成益生菌水溶液,外覆锡箔纸避光,置于4℃冰箱保存,现配现用。

1.3 主要试剂及仪器

苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA蛋白裂解液、PMSF、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、凝胶聚合催化剂、TEMED、转膜缓冲液、山羊抗兔IgG(H+L)、山羊抗小鼠IgG(H+L)(上海碧云天生物科技有限公司,批号

分别为C0105S-2, P0010S, P0013E, ST507, P0286, P0012A-4, P0012A-5, P0021B, A0208, A0216); DAB显色剂(DAKO公司,批号K8002);4%多聚甲醛(Biosharp公司,批号BL539A);电泳缓冲液(Servicebio公司,批号G2018);PVDF膜(Merck公司,批号IPFL00005);TBS(10×)预混合粉末(Sangon Biotech公司,批号A500027-0004);Tween-20、脱脂奶粉(BBI公司,批号分别为A600560-0500, A600669-0250);E. Z. N. A.® Soil DNA Kit DNA抽提试剂盒(美国Omega公司,批号M9636020000K08V);ZO-1抗体、Occludin抗体(武汉三鹰生物技术有限公司Proteintech,批号分别为66452-1-Ig, 66378-1-Ig)。

CX31RTSF型光学显微镜,奥林巴斯(中国)有限公司;5424R型冷冻离心机,德国Eppendorf公司;JXFSTPRP-24型全自动样品快速研磨仪,上海净信实业发展有限公司;Veriti PCR仪,美国ABI公司;Mini-Protean Tetra型蛋白电泳仪及转膜仪、6450型稳压电源,美国Bio-Rad公司;TS-1型脱色摇床,江苏其林贝尔仪器制造有限公司。

1.4 动物分组、造模及给药

24只大鼠适应性饲养7天后,采用随机数字表法将其分为正常组、模型组、柴胡疏肝散组和益生菌组,每组6只。除正常组外,其余各组大鼠均采用课题组前期的改良夹尾激惹造模法^[13]复制FD模型:用长海绵夹钳轻度钳夹大鼠尾部中后1/3处,立即放开,以不破皮为度,使大鼠暴怒并和同类厮打,每次30 min,每天2次,持续4周。以胃窦组织未发生病理变化,且模型组大鼠胃排空率、小肠推进率较正常组均降低($P<0.05$),为造模成功的标准^[14]。

造模的同时给药,每天夹尾激惹结束后灌胃。正常组及模型组大鼠予生理盐水10 ml/(kg·d)灌胃,柴胡疏肝散组大鼠予柴胡疏肝散水煎液9.6 g/(kg·d)灌胃,益生菌组大鼠予益生菌水溶液0.945 g/(kg·d)灌胃。灌胃剂量是根据人与动物间体表面积^[15]折算出的等效剂量。各组均每天灌胃2次,持续干预4周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大鼠一般情况 药物干预期间,观察各组大鼠进食量、精神状态、活动力、攻击性等一般情况。

1.5.2 胃排空率与小肠推进率检测 末次给药结束后大鼠禁食不禁水24 h,采用含碳粉末的半固体营养米糊灌胃,30 min后麻醉大鼠,用外科手术线

迅速将贲门及幽门结扎，剥离胃体表面结缔组织，取出全胃，称量并记录全胃总重量、空胃重量以及灌入半固体营养米糊的重量，计算胃排空率。胃排空率=〔1-（全胃总重量-空胃重量）/半固体营养米糊重量〕×100%。剥离肠管，用直尺分别测量小肠的总长度以及碳粉末推进的长度，计算小肠推进率，小肠推进率=碳粉末推进长度/小肠总长度×100%。

1.5.3 HE 染色观察大鼠胃窦及十二指肠组织病理学变化 取各组大鼠大小约 5 mm×5 mm×3 mm 的胃窦组织及十二指肠组织各一块，PBS 洗净，置于 4% 多聚甲醛组织固定液中固定 48 h；制作石蜡包埋蜡块，制成 4 μm 切片，脱蜡后切片、用苏木素-伊红染色，乙醇梯度脱水，中性树脂封片，在光学显微镜下观察各组大鼠组织病理学变化情况并拍照。

1.5.4 肠道菌群检测 取粪便 500 mg，采用 16 s rDNA 基因扩增及高通量测序进行检测。按照 DNA 提取试剂盒说明书步骤提取大鼠粪便 DNA，采用高通量测序平台 Illumina Hiseq 测序（上海美吉生物医药科技有限公司），并采用生物信息分析的方法进行序列分析和物种注释。通过操作分类单元（OTU）聚类分析，获得各组样本在不同水平上的群落组成和结构，分析 Beta 多样性，比较样本之间的差异，采用 Venn 图表示共有和特有物种的数目。

1.5.5 免疫组织化学法检测十二指肠中 ZO-1、Occludin 表达 十二指肠石蜡切片经二甲苯透明，常规脱蜡至水。3 % H₂O₂ 室温孵育 10 min。蒸馏水冲洗，PBS 冲洗 3 次。滴加 10% 山羊血清封闭，室温孵育后滴加一抗（ZO-1、Occludin 均为 1：500），室温孵育 2 h。PBS 冲洗后，滴加二抗（不稀释），室温孵育 30 min。PBS 冲洗，DAB 显色剂显色、冲洗、复染、脱水、透明、封片，采用光学显微镜获取图像，通过 Image J 2.1.0 软件对图像进行分析。

1.5.6 蛋白免疫印迹法（Western blot）检测十二指肠组织中 ZO-1、Occludin 蛋白表达 取约 100 mg 的大鼠十二指肠组织，加入 300 μl 含 PMSF 的 RIPA 裂解液，研磨后匀浆，置于 4℃裂解 30 min，4℃、15 000 r/min 离心 15 min（离心半径 10 cm），提取上清至离心管内。随后采用 BCA 法测定组织中的蛋白含量，取 80 μl 蛋白样品加入 20 μl 蛋白上样缓冲液，变性后上样，进行 SDS-PAGE，封闭后敷上一抗（ZO-1、Occludin 均为 1：5000，GAPDH 为 1：50 000），4℃冰箱过夜。次日从冰箱取出，室温平衡 1 h 后洗去一抗，再用二抗（山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG 均为 1：1000）室温孵育 1 h。用 TBST

洗 3 次后显影，通过 Image J 2.1.0 软件对各组图像进行灰度值分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0、GraphPad Prism v. 9.0.0 对数据进行统计学处理。数据均符合正态分布、方差齐性以均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多样本均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用最小显著性差异法（LSD）检验。在 Beta 多样性分析中，采用主成分分析（PCA）、主坐标分析（PCoA）和非度量多维尺度分析（NMDS）对物种多样性进行组间比较分析，同时结合 Anosim 法来评估这种群落结构变化是否具有显著性，以 $P<0.05$ 表示具有显著差异， $R>0$ 表示组间差异大于组内差异。肠道菌群与 ZO-1、Occludin 蛋白表达相关性采用 Pearson 相关系数分析。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

造模期间，各组大鼠均无死亡。造模 4 周后正常组大鼠食欲及精神状态良好，动作自如，反应灵敏，被毛光泽，粪便软硬适中；与正常组比较，模型组大鼠出现厌食、精神状态差，且出现扎堆靠边、喜静倦动、肢体蜷缩、活动力减弱、攻击性减少、粪质稀软且水分较多，更易受惊吓；柴胡疏肝散组与益生菌组大鼠食欲减退、活动力减弱、喜扎堆蜷缩、精神状态一般，两组间比较无明显差异。取材时解剖大鼠胃部，各组均未见出血点、糜烂、溃疡、增生等病理变化。

2.2 各组大鼠胃排空率和小肠推进率比较

表 1 示，与正常组比较，模型组大鼠胃排空率及小肠推进率均降低（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，柴胡疏肝散组胃排空率、小肠推进率均升高，益生菌组胃排空率升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）；益生菌组与柴胡疏肝散组胃排空率、小肠推进率组间比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表 1 各组大鼠胃排空率、小肠推进率比较

Table 1 Comparison of gastric emptying rate and small intestinal propulsion rate of rats in each group ($\%$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胃排空率	小肠推进率
正常组	6	63.45±8.67	65.42±7.06
模型组	6	34.83±3.87 ^{a)}	44.65±4.03 ^{a)}
柴胡疏肝散组	6	63.55±7.51 ^{b)}	64.75±10.12 ^{b)}
益生菌组	6	54.08±10.98 ^{c)}	56.06±7.39

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠胃窦组织病理学情况

各组大鼠胃窦组织结构层次清晰,腺体结构规整,胃组织黏膜光滑,胃黏膜上皮细胞形状及间质大小一致,未见糜烂、溃疡等病理改变。详见图1。

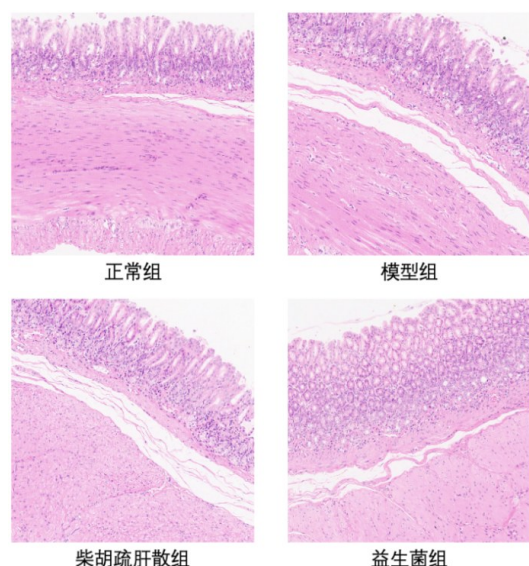


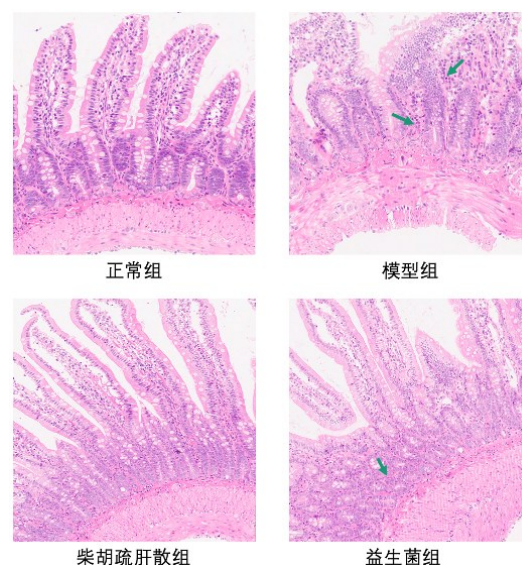
图1 各组大鼠胃窦组织病理学变化(HE染色,×200)

Figure 1 Histopathological changes in the gastric antrum of rats in each group (HE staining, ×200)

2.4 各组大鼠十二指肠组织病理学变化

正常组大鼠十二指肠组织结构完整、形态清晰,杯状细胞排列整齐,无明显损伤病变表现,腺底部可见潘氏细胞;与正常组比较,模型组肠绒毛钝化、绒毛明显减少或萎缩,杯状细胞排列紊乱,可见嗜酸性粒细胞浸润,是十二指肠微炎症的典型病理表现;与模型组比较,柴胡疏肝散组及益生菌组十二指肠组织结构层次清晰,肠绒毛长度较长,杯状细胞排列较为整齐,柴胡疏肝散组未见明显嗜

酸性粒细胞浸润,益生菌组可见少量嗜酸性粒细胞浸润,两组比较无明显差异。详见图2。



注:箭头表示嗜酸性粒细胞。

图2 各组大鼠十二指肠组织病理学变化(HE染色,×200)

Figure 2 Histopathological changes in duodenum of rats in each group (HE staining, ×200)

2.5 各组大鼠肠道菌群分析结果

2.5.1 测序结果质量分析 测序结果显示,随着16s rDNA测序量的增加,各组大鼠肠道菌群Pan/Core物种曲线逐渐趋于平缓,表明本次测序样本量已经足以覆盖所测样品中的全部物种,使用目前数据进行进一步分析合理。详见图3。

2.5.2 各组大鼠肠道菌群Beta多样性分析结果 图4(A、B、C)所示,在二维坐标上,模型组与正常组样本点分开,表明FD大鼠肠道菌群的整体结构与组成有一定变化。图4(B)PCoA分析中组间差异显著大于组内差异($R=0.190$),分组有意义

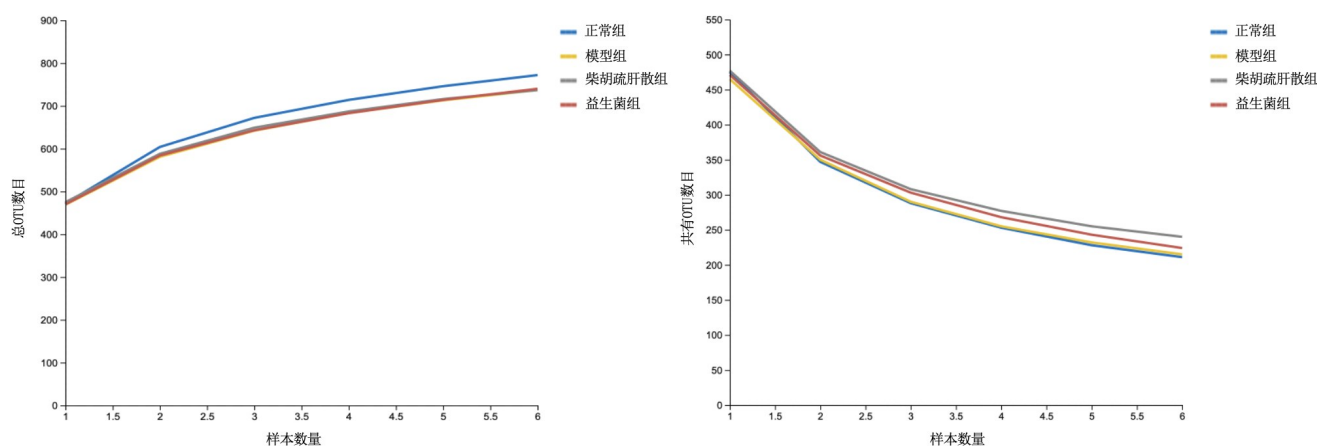


图3 各组大鼠肠道菌群Pan/Core物种曲线

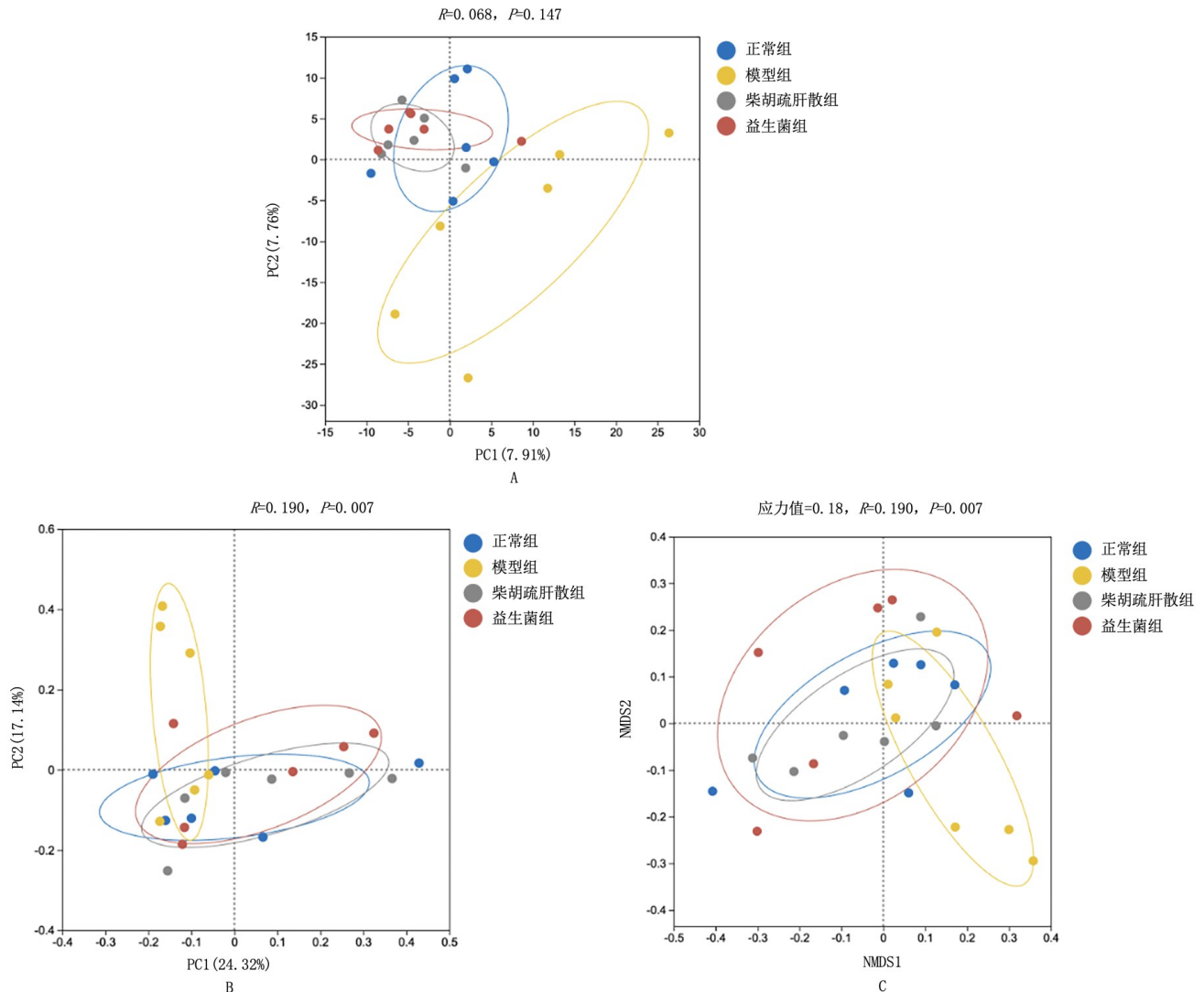
Figure 3 Intestinal flora Pan/Core species accumulation curve of rats in each group

($P<0.01$)。从图 4 (C) 同样可以看出, 柴胡疏肝散组和益生菌组样本点均具有一定的聚合趋势, 与正常组样本点较为接近。通过 Stress 值检验多维尺度分析 (NMDS) 结果的优劣, 图形具有解释意义 ($\text{Stress}<0.2$), 说明组间差异显著大于组内差异 ($R=0.190$), 分组有意义 ($P<0.01$)。与正常组比较, 模型组的肠道菌群整体结构出现了显著变化, 与模型组比较, 柴胡疏肝散组和益生菌组的肠道菌群整体结构更接近正常组, 详见图 4。

2.5.3 各组大鼠肠道菌群物种组成分析结果 所有样本中, 在门水平上共检测到细菌门 10 个, 其中厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 为各组共有的优势菌门, 约占总量的 90%。表 2

示, 与正常组比较, 模型组厚壁菌门相对丰度降低, 拟杆菌门相对丰度增加, 拟杆菌门/厚壁菌门值升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 柴胡疏肝散组和益生菌组厚壁菌门相对丰度增加, 拟杆菌门相对丰度降低, 拟杆菌门/厚壁菌门值降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。益生菌组与柴胡疏肝散组组间各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

在属水平上共检测出细菌属 10 个, 包括未分类的 *Muribaculaceae* 菌属 (*norank_f_Muribaculaceae*)、乳酸杆菌属、一种未定等级的梭菌 (*norank_f_norank_o_Clostridia_UCG-014*)、UCG-005 属、罗姆布茨菌属、未分类的毛螺菌属 (*unclassified_f_Lachnospiraceae*)、苏黎世杆菌属、普氏菌属、异杆菌属、拟



注: PC1, 主成分1; PC2, 主成分2; NMDS1, 多维尺度分析1; NMDS2, 多维尺度分析2。X轴和Y轴的刻度是相对距离, 无实际意义; 不同颜色或形状的点代表不同分组的样本, 两样本点越接近, 表明两样本物种组成越相似。

图4 各组大鼠肠道菌群Beta多样性分析OTU水平上的PCA分析、PCoA分析和NMDS分析结果

Figure 4 PCA, PCoA and NMDS analysis of beta diversity analysis of intestinal flora of rats in each group at OTU level

杆菌属。其中，未分类的 *Muribaculaceae* 菌属具有统计学意义。表 3 示，与正常组比较，模型组未分类的 *Muribaculaceae* 菌属相对丰度增加 ($P<0.01$)。与模型组比较，柴胡疏肝散组与益生菌组未分类的 *Muribaculaceae* 菌属相对丰度降低 ($P<0.01$)，而益生菌组与柴胡疏肝散组组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5.4 各组大鼠肠道菌群共有或特有物种分析结果 图 5 示，在 OTU 水平上，共有 578 个 OTU 重叠共存于所有组；在属水平上，共有 143 个菌属共

表 3 各组大鼠肠道菌群差异菌属相对丰度比较
Table 3 Comparison of the relative abundance of different bacterial genera in the intestinal flora of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	未分类的 <i>Muribaculaceae</i> 菌属
正常组	6	0.262±0.058
模型组	6	0.468±0.026 ^{a)}
柴胡疏肝散组	6	0.225±0.048 ^{b)}
益生菌组	6	0.272±0.032 ^{b)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

存；在科水平上，共有 67 个菌科共存。
2.6 各组大鼠十二指肠组织中 ZO-1、Occludin 蛋白表达免疫组化结果比较

图 6 示，ZO-1、Occludin 蛋白主要在十二指肠肠绒毛上皮、肠腺、纹状缘、肠隐窝等处表达。表 4 示，与正常组比较，模型组 ZO-1、Occludin 蛋白的平均光密度值降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，柴胡疏肝散组 ZO-1、Occludin 蛋白的平均光密度值升高 ($P<0.01$)，益生菌组 Occludin 蛋白的平均光密度值升高 ($P<0.05$)。益生菌组与柴胡疏肝散组组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠肠道菌群优势菌门相对丰度比较
Table 2 Comparison of the relative abundance of dominant bacterial phyla in the intestinal flora of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	厚壁菌门	拟杆菌门	拟杆菌门/厚壁菌门
正常组	6	0.673±0.105	0.317±0.115	0.496±0.250
模型组	6	0.383±0.023 ^{a)}	0.593±0.029 ^{b)}	1.554±0.163 ^{a)}
柴胡疏肝散组	6	0.690±0.159 ^{c)}	0.293±0.167 ^{d)}	0.486±0.399 ^{c)}
益生菌组	6	0.627±0.107 ^{d)}	0.353±0.124 ^{d)}	0.595±0.273 ^{c)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

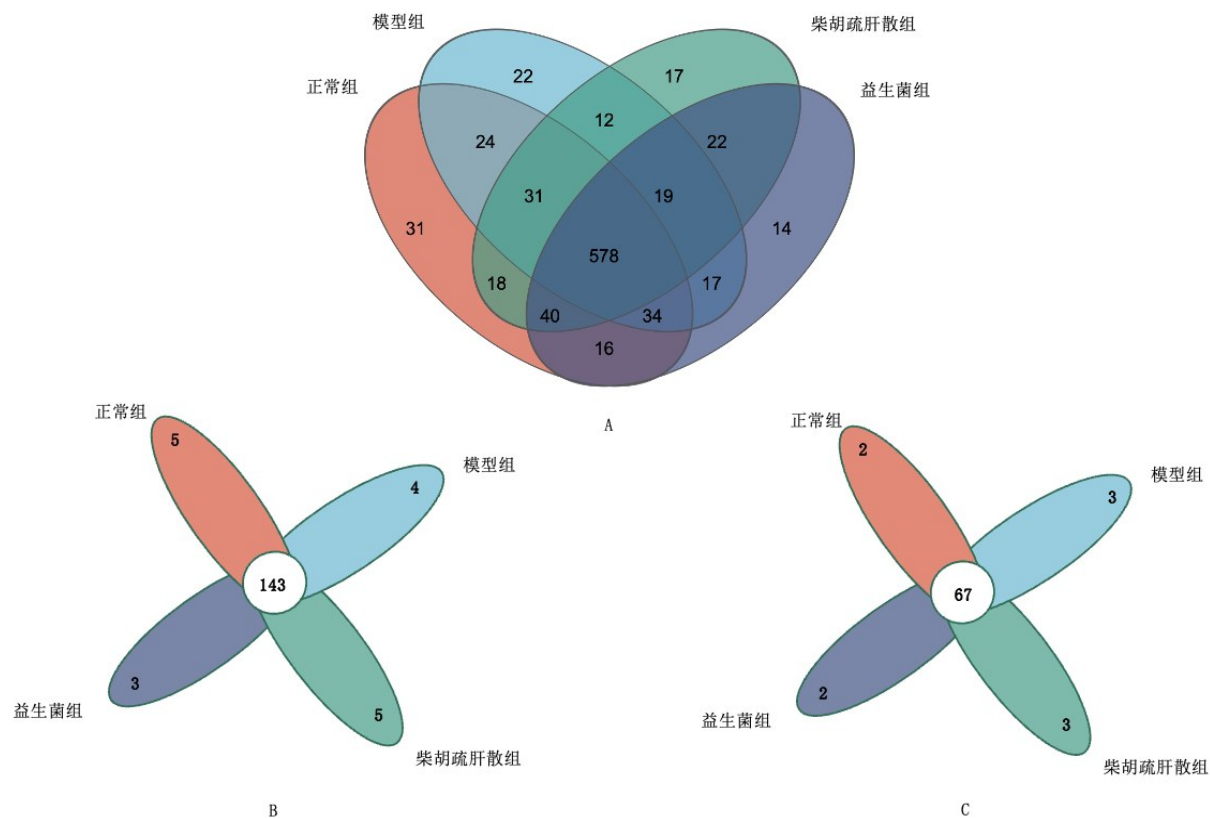
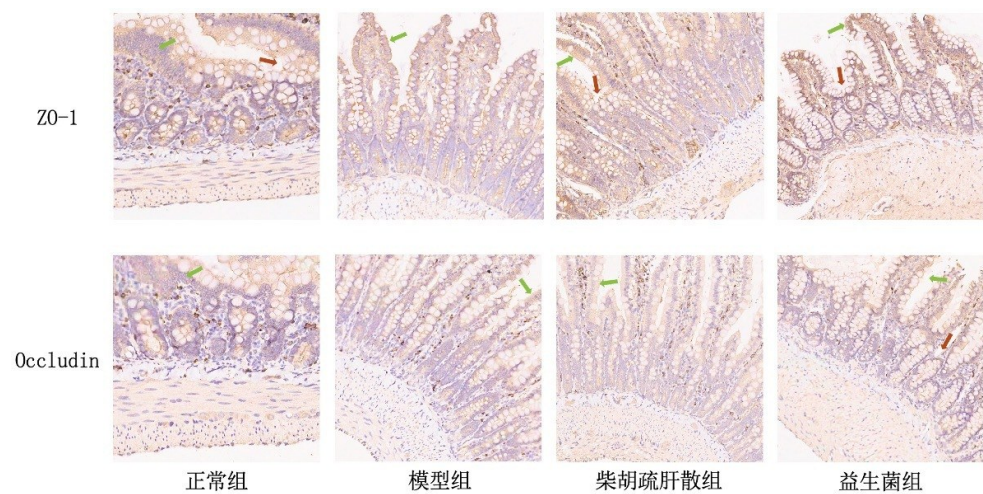


图 5 各组大鼠肠道菌群在 OTU 水平、属水平上及科水平上共有或特有物种 Venn 图
Figure 5 Venn diagram of common or unique species in the intestinal flora of rats in each group at OTU level, genus level and family level



注：ZO-1，带状闭合蛋白1；Occludin，咬合蛋白；绿色箭头：肠绒毛；红色箭头：肠隐窝；淡黄色表示弱表达，黄色表示中等表达，棕色表示强表达。

图6 各组大鼠十二指肠组织中ZO-1、Occludin蛋白表达结果（免疫组化，×200）

Figure 6 ZO-1 and Occludin protein expression in duodenal tissue of rats in each group (immunohistochemical, ×200)

表4 各组大鼠十二指肠组织中ZO-1、Occludin蛋白平均光密度值比较

Table 4 Comparison of average optical density values of ZO-1 and Occludin proteins in duodenal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ZO-1	Occludin
正常组	6	0.49±0.04	0.50±0.03
模型组	6	0.28±0.08 ^{a)}	0.24±0.03 ^{a)}
柴胡疏肝散组	6	0.46±0.03 ^{b)}	0.41±0.08 ^{b)}
益生菌组	6	0.37±0.06	0.38±0.09 ^{c)}

注：ZO-1，带状闭合蛋白1；Occludin，咬合蛋白。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.7 各组大鼠十二指肠组织中ZO-1、Occludin蛋白表达免疫印记法结果比较

表5示，与正常组比较，模型组大鼠十二指肠组织中ZO-1、Occludin蛋白表达均降低（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，柴胡疏肝散组ZO-1、Occludin蛋白表达均升高（ $P<0.01$ ），益生菌组Occludin蛋白表达升高（ $P<0.05$ ）而ZO-1蛋白表达无统计学意义（ $P>0.05$ ）；益生菌组与柴胡疏肝散组间比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。各组大鼠十二指肠组织中ZO-1、Occludin蛋白表达电泳图见图7。

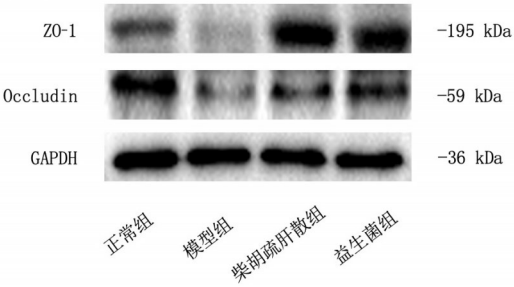
2.8 肠道菌群变化与ZO-1、Occludin蛋白表达的相关性分析结果

Pearson相关性分析显示，在门水平上，厚壁菌门与ZO-1（ $r=0.610$ ， $P=0.016$ ）、Occludin（ $r=0.694$ ， $P=0.004$ ）蛋白表达量呈正相关。拟杆菌

表5 各组大鼠十二指肠组织ZO-1、Occludin蛋白表达比较
Table 5 Comparison of ZO-1 and Occludin protein expression in duodenal tissue of rats in each group/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ZO-1	Occludin
正常组	6	0.94±0.17	0.98±0.10
模型组	6	0.50±0.15 ^{a)}	0.49±0.03 ^{a)}
柴胡疏肝散组	6	0.99±0.13 ^{b)}	0.84±0.07 ^{b)}
益生菌组	6	0.78±0.11	0.70±0.19 ^{c)}

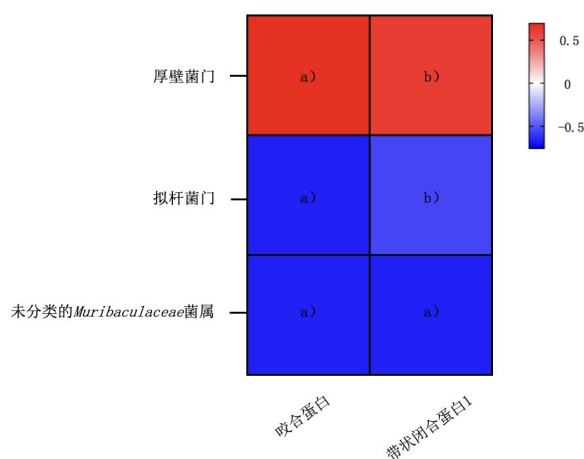
注：ZO-1，带状闭合蛋白1；Occludin，咬合蛋白。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。



注：ZO-1，带状闭合蛋白1；Occludin，咬合蛋白。
图7 各组大鼠十二指肠组织中ZO-1、Occludin蛋白表达电泳图

Figure 7 Electropherogram of ZO-1 and Occludin protein expression in duodenal tissue of rats in each group

门与ZO-1（ $r=-0.557$ ， $P=0.031$ ）、Occludin（ $r=-0.662$ ， $P=0.007$ ）蛋白表达量呈负相关。在属水平上，未分类的Muribaculaceae菌属与ZO-1（ $r=-0.727$ ， $P=0.002$ ）、Occludin（ $r=-0.760$ ， $P=0.001$ ）蛋白表达量呈负相关。详见图8。



注: a) $P < 0.01$, b) $P < 0.05$, 红色代表正相关, 蓝色代表负相关, 数据为相关系数。

图 8 肠道菌群变化与 ZO-1、Occludin 蛋白表达的相关性热图

Figure 8 Heatmap of correlation between intestinal flora changes and ZO-1 and Occludin protein expression

3 讨论

中医学将 FD 归为“痞满”“胃脘痛”范畴, 其病位在胃, 多涉及肝、脾二脏, 病机为本虚标实, 虚实夹杂, 情志失调、饮食不节是主要病因^[16]。情志不畅伤肝, 肝气郁结疏泄失职, 乘脾犯胃, 除有精神情绪异常外, 常出现纳呆、腹胀、脘腹痛等消化不良症状, 分别与 FD 的精神心理失衡和消化不良的临床表现相符。叶桂《临证指南医案》曰: “肝为起病之源, 胃为传病之所”, “凡醒胃必先制肝”, 因此治胃可从肝论治。肝的疏泄功能正常, 肝气疏泄得以条达, 则胃气得以通降, 木郁土壅得以疏解, 全身气机调畅。因此疏肝理气、和胃消痞为治疗 FD 的关键^[17]。柴胡疏肝散由四逆散加陈皮、香附、川芎, 枳壳代枳实而成, 方中柴胡疏肝理气为君药; 香附、川芎理气疏肝、活血止痛, 助柴胡以解肝郁, 二药相合, 增其行气止痛之功, 为臣药; 陈皮、枳壳理气行滞, 芍药、炙甘草柔肝养血、缓急止痛, 为佐药; 炙甘草兼调和诸药, 亦为使药。诸药相合, 共奏疏肝行气、活血止痛之功。本课题组前期研究显示, 柴胡疏肝散可以通过促进胃肠 Cajal 间质细胞 (ICC) 的增殖分化^[18]、抑制 FD 大鼠 ICCs 线粒体过度自噬^[19]、调节线粒体途径的细胞凋亡^[20]、改善内质网应激^[21]等方式促进胃排空, 发挥促胃动力作用。本研究结果表明, 模型组大鼠较正常组大鼠胃排空率及小肠推进率均降低, 提示模型大鼠胃肠动力较差, 柴胡疏肝散干预后胃排空率和小肠推进率升高, 且与益生菌组比较

差异无统计学意义, 提示柴胡疏肝散增强了胃肠动力, 且效果并不劣于益生菌水溶液。各组大鼠胃窦组织结构未见病理改变, 说明 FD 大鼠造模成功, 出现胃功能性改变。

FD 的发生包含多种生理病理因素, 既往研究显示, FD 患者十二指肠黏膜屏障功能存在受损的迹象^[22], 而益生菌可使肠道 ZO-1 基因和蛋白的表达上调^[23], 恢复肠道黏膜屏障功能^[24]。十二指肠肥大细胞和嗜酸性粒细胞浸润被认为是十二指肠微炎症的特征之一, 嗜酸性粒细胞脱颗粒可诱导肠道黏膜屏障破坏, 使十二指肠黏膜通透性增加^[25]。本研究结果表明, 模型组大鼠较正常组大鼠出现嗜酸性粒细胞浸润, 即十二指肠微炎症表现, 柴胡疏肝散组未见明显嗜酸性粒细胞浸润, 益生菌组可见少量嗜酸性粒细胞浸润, 说明给予柴胡疏肝散和益生菌能缓解十二指肠微炎症状态。

肠道菌群的紊乱是 FD 的主要发病机制之一, FD 患者的肠道微生物群丰度及群落组成结构与健康人有所区别^[26-28]。本研究探讨了柴胡疏肝散及益生菌对 FD 大鼠肠道菌群的影响, Beta 多样性分析结果表明, 给予柴胡疏肝散及益生菌治疗后, 在门水平上, 模型组大鼠较正常组大鼠厚壁菌门相对丰度降低, 拟杆菌门相对丰度增加, 予柴胡疏肝散与益生菌干预后增加了厚壁菌门的相对丰度, 同时降低了拟杆菌门的相对丰度; 在属水平上, 模型组大鼠较正常组大鼠未分类的 *Muribaculaceae* 菌属相对丰度增加, 予柴胡疏肝散与益生菌干预后, 未分类的 *Muribaculaceae* 菌属相对丰度降低, 提示柴胡疏肝散可以调整厚壁菌门和拟杆菌门的比值, 降低未分类的 *Muribaculaceae* 菌属相对丰度, 从而维持菌群稳态。

肠道黏膜屏障的损伤^[29-30]与 FD 的发生密切相关, 肠道细菌-上皮细胞相互作用被认为是影响胃肠道上皮通透性的关键因素^[31], 肠道菌群及其代谢产物已被证明可以通过多种机制减少局部炎症、改善肠道屏障通透性^[32-33], 如上调 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达改善上皮屏障功能^[34]。本研究结果发现, FD 大鼠十二指肠组织中 ZO-1、Occludin 的蛋白表达较正常组降低, 表明大鼠存在十二指肠黏膜屏障障碍, 而柴胡疏肝散可以通过调节 ZO-1、Occludin 蛋白表达来改善十二指肠黏膜屏障, 其疗效与益生菌相似。为进一步说明肠道菌群与十二指肠黏膜屏障的关系, 本研究进行了肠道菌群与 ZO-1、Occludin 蛋白表达相关性分析, 发现厚壁菌门与

ZO-1、Occludin 蛋白表达量呈正相关,提示厚壁菌门相对丰度升高与改善肠黏膜屏障密切相关;而拟杆菌门、未分类的 *Muribaculaceae* 菌属与 ZO-1、Occludin 蛋白表达量呈负相关,提示拟杆菌门、未分类的 *Muribaculaceae* 菌属的丰度增加,可能会降低肠黏膜屏障完整性。

综上所述,柴胡疏肝散治疗 FD 的作用机制可能与改善肠道菌群结构,从而修复十二指肠黏膜屏障相关。且差异菌群中厚壁菌门、拟杆菌门丰度水平与十二指肠紧密连接蛋白表达具有明显相关性,对于维持十二指肠黏膜屏障具有重要作用。本研究仍存在一些不足之处,由于十二指肠菌群密度较低,且依靠目前技术手段提取小肠局部菌群有一定困难,因此,本实验仍采用粪便样本进行肠道微生物群的相关研究。后续研究可以继续结合宏基因组学等技术,为临床治疗提供更充分的实验基础。

参考文献

- [1] DROSSMAN DA, HASLER WL. Rome IV-functional GI disorders: disorders of gut-brain interaction[J]. Gastroenterology, 2016, 150(6): 1257-1261.
- [2] POWELL N, WALKER MM, TALLEY NJ. Gastrointestinal eosinophils in health, disease and functional disorders [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(3): 146-156.
- [3] FORD AC, MAHADEVA S, CARBONE MF, et al. Functional dyspepsia [J]. Lancet, 2020, 396(10263): 1689-1702.
- [4] ZHENG YF, LIANG SP, ZHONG ZS, et al. Duodenal microbiota makes an important impact in functional dyspepsia [J]. Microb Pathog, 2022, 162: 105297. doi: 10.1016/j.micpath. 2021. 105297.
- [5] IGARASHI M, NAKAE H, MATSUOKA T, et al. Alteration in the gastric microbiota and its restoration by probiotics in patients with functional dyspepsia [J]. BMJ Open Gastroenterol, 2017, 4(1): e000144.
- [6] MACCIONI L, GAO B, LECLERCQ S, et al. Intestinal permeability, microbial translocation, changes in duodenal and fecal microbiota, and their associations with alcoholic liver disease progression in humans [J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1782157.
- [7] VANHEEL H, VICARIO M, VANUYTSEL T, et al. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia [J]. Gut, 2014, 63(2): 262-271.
- [8] 卢小芳, 张声生. 中医药治疗功能性消化不良研究进展 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2023, 31(6): 405-410.
- [9] 曹海芳, 张瑜, 魏胜泰, 等. 柴胡疏肝散加减治疗慢性胆囊炎胆石症及胆囊功能和炎症因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 63-67.
- [10] YANG N, JIANG XH, QIU XL, et al. Modified chaihushugan powder for functional dyspepsia: meta-analysis for randomized controlled trial [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 791724. doi: 10.1155/2013/791724.
- [11] 李莉, 贾庆玲, 王煜姣, 等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃组织线粒体功能及线粒体自噬的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23): 26-34.
- [12] TAN RQ, ZHANG Z, JU J, et al. Effect of Chaihushugan powder-contained serum on glutamate-induced autophagy of interstitial cells of cajal in the rat gastric antrum [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 7318616. doi: 10.1155/2019/7318616.
- [13] 王煜姣, 凌江红, 张钰琴, 等. 复合病因造模法制备功能性消化不良大鼠模型 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(2): 210-214.
- [14] 郭海军, 林洁, 李国成, 等. 功能性消化不良的动物模型研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(3): 141-142.
- [15] 徐叔云, 汴如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.
- [16] 世界中医药学会联合会消化病专业委员会. 痞满中医临床实践指南 (2018) [J]. 中医杂志, 2019, 60(17): 1520-1530.
- [17] 张声生, 赵静怡, 赵鲁卿. 近 20 年调肝理脾法治疗功能性消化不良研究述评 [J]. 中医杂志, 2020, 61(22): 1948-1952.
- [18] 邓静, 凌江红, 曾丽君, 等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃 Cajal 间质细胞增殖及其超微结构的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(4): 1410-1417.
- [19] 曾丽君, 凌江红, 邓静, 等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃窦肌间 Cajal 间质细胞自噬的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(5): 1041-1044.
- [20] 上官鑫超. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃平滑肌细胞凋亡和 NF- κ B 蛋白表达的影响 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [21] 徐宽, 凌江红, 周洲, 等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠内质网应激相关分子 IRE1 和 TRAF2 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(4): 516-520.
- [22] KOMORI K, IHARA E, MINODA Y, et al. The altered mucosal barrier function in the duodenum plays a role in the pathogenesis of functional dyspepsia [J]. Dig Dis Sci, 2019, 64(11): 3228-3239.
- [23] UKENA SN, SINGH A, DRINGENBERG U, et al.

- Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity [J]. *PLoS One*, 2007, 2(12):e1308.
- [24] PATEL RM, MYERS LS, KURUNDKAR AR, et al. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(2):626–635.
- [25] WAUTERS L, TALLEY NJ, WALKER MM, et al. Novel concepts in the pathophysiology and treatment of functional dyspepsia [J]. *Gut*, 2020, 69(3):591–600.
- [26] 韩娟, 荣培晶, 王宏才, 等. 基于脑肠互动学说探析针刺治疗功能性消化不良[J]. 中医杂志, 2021, 62(10): 845–849.
- [27] NAKAE H, TSUDA A, MATSUOKA T, et al. Gastric microbiota in the functional dyspepsia patients treated with probiotic yogurt [J]. *BMJ Open Gastroenterol*, 2016, 3(1):e000109.
- [28] FUKUI A, TAKAGI T, NAITO Y, et al. Higher levels of streptococcus in upper gastrointestinal mucosa associated with symptoms in patients with functional dyspepsia [J]. *Digestion*, 2020, 101(1):38–45.
- [29] 王丹, 张红星, 荣培晶, 等. 电针对功能性消化不良大鼠十二指肠紧密连接蛋白及浆细胞的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(16):1439–1443.
- [30] 李娟娟, 王凤云, 唐旭东, 等. 肠道菌群失调与功能性消化不良的相关性研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(1):77–81.
- [31] WILLEMSSEN LE, KOETSIER MA, VAN DEVENTER SJ, et al. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts [J]. *Gut*, 2003, 52(10):1442–1447.
- [32] JAKOBSSON HE, RODRÍGUEZ-PIÑEIRO AM, SCHÜTTE A, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier [J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(2):164–177.
- [33] MA X, FAN PX, LI LS, et al. Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions [J]. *J Anim Sci*, 2012, 90(Suppl 4):266–268.
- [34] ENGEVIK MA, YACYSHYN MB, ENGEVIK KA, et al. Human *Clostridium difficile* infection: altered mucus production and composition [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308(6):G510–G524.

Effects of *Chaihu Shugan Powder* (柴胡疏肝散) on Duodenal Mucosal Barrier and Intestinal Flora in Functional Dyspepsia Model Rats

YANG Keming, JIA Yuebo, YELIYA Yeertai, LIU Xuejiao, WANG Xiangxiang, JIANG Kailin, LING Jianghong
Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201213

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Chaihu Shugan Powder* (柴胡疏肝散, CSP) in the treatment of functional dyspepsia (FD). **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a CSP group and a probiotic group, with six rats in each group. The tail-clamping provocation method was used in all groups except for the normal group to replicate the FD rat model. Simultaneously, the normal group and the model group were given 10 ml/(kg·d) of saline by gavage, while the CSP group and the probiotic group were given 9.6 g/(kg·d) of CSP aqueous decoction and 0.945 g/(kg·d) of probiotic aqueous solution by gavage, respectively, twice daily for four weeks. After four weeks, the gastric emptying and small intestinal propulsion rates were detected in each group of rats. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes in the gastric sinusoids and duodenum of the rats. The changes in the intestinal flora were analyzed by 16s rDNA high-throughput gene sequencing, and the expressions of the duodenal zona occludin 1 (ZO-1) and Occludin were detected by immunohistochemistry and western blotting. Pearson correlation analysis was performed on intestinal flora and ZO-1 and Occludin protein expression. **Results** The gastric antrum tissue structure was clear in all groups, and the gland structure was regular, with smooth gastric tissue mucosa and no pathological changes such as erosion and ulcer. Compared to those in the normal group, the intestinal villi in the duodenal tissue in the model group were significantly reduced or atrophied, and the goblet cells were arranged in disorder, with eosinophilic infiltration; the gastric emptying rate and small intestinal propulsion rate, as well as ZO-1 and Occludin protein expression in duodenal tissue significantly decreased ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the duodenal tissue structure was clear, and the length intestinal villi was longer, with goblet cells neatly arranged in the CSP group and the probiotic group; no obvious eosinophil infiltration was found, and the gastric emptying rate and small intestinal propulsion rate as well

as ZO-1 and Occludin protein expression significantly increased in the CSP group; a small amount of eosinophil infiltration was found, and the gastric emptying rate and Occludin protein expression significantly increased in the probiotic group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Beta diversity analysis of intestinal flora showed that the overall structure of intestinal flora in the model group changed significantly compared to that in the normal group ($P < 0.01$). The overall structure of the intestinal flora in the CSP group and the probiotic group was closer to the normal group than the model group. Species composition analysis showed that the relative abundance of the *Firmicutes* decreased, while the relative abundance of the *Bacteroidetes* and *norank_f_Muribaculaceae* increased, and the *Bacteroidetes/Firmicutes* value increased in the model group than those in the normal group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the relative abundance of the *Firmicutes* increased, while the relative abundance of the *Bacteroidetes* and *norank_f_Muribaculaceae*, as well as the *Bacteroidetes/Firmicutes* value decreased in the CSP group and the probiotic group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no statistically significant difference in each indicator between the probiotic group and the CSP group ($P > 0.05$). Pearson correlation analysis showed that at the phylum level, *Firmicutes* was positively correlated with ZO-1 ($r = 0.610$, $P = 0.016$) and Occludin ($r = 0.694$, $P = 0.004$) protein expression. *Bacteroidetes* was negatively correlated with ZO-1 ($r = -0.557$, $P = 0.031$) and Occludin ($r = -0.662$, $P = 0.007$) protein expression. At the genus level, *norank_f_Muribaculaceae* was negatively correlated with ZO-1 ($r = -0.727$, $P = 0.002$) and Occludin ($r = -0.760$, $P = 0.001$) protein expression. **Conclusion** CSP can restore the structure of intestinal flora, regulate the abundance levels of *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *norank_f_Muribaculaceae*, up-regulate ZO-1 and Occludin proteins, and thus repairing the duodenal mucosal barrier, and playing a therapeutic role in FD rats.

Keywords functional dyspepsia; *Chaihu Shugan Powder* (柴胡疏肝散); intestinal flora; duodenum; mucosal barrier

(收稿日期: 2023-07-25; 修回日期: 2023-09-14)

[编辑: 王利芬]

广告

《中医杂志(英文版)》欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志(英文版)》] (ISSN 0255-2922, CN 11-2167/R, 双月刊) 由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志(英文版)》自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中的中国传统医学综合性学术期刊之一。

《中医杂志(英文版)》主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究, 思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journaltcm.com> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。电话: 010-64089190。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。