

基于TGR5及肠黏膜屏障功能探讨“疏肝健脾”疗法对肝损伤大鼠的影响及作用机制

魏伟莉, 高艺宁, 史兴华, 郑智礼, 康倩君, 邓秀兰*

(北京中医药大学 中医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨“疏肝、健脾、疏肝健脾、先疏肝再疏肝健脾、先健脾再疏肝健脾”不同治疗方法对肝郁叠加肝损伤大鼠的影响及其作用机制。方法:制造6周肝郁叠加肝损伤大鼠模型,采用束缚叠加四氯化碳(CCl_4)皮下注射法造模($5.89 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1次/3 d),同时灌胃给药。48只清洁级雄性SD大鼠用随机数字表法分为8组:正常组,模型组,双环醇组($0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),四逆散组($4.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),六君子汤组($9.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),柴芍六君子汤甲组(柴甲组;疏肝健脾, $13.57 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),柴芍六君子汤乙组(柴乙组;先疏肝,再疏肝健脾, $13.57 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),柴芍六君子汤丙组(柴丙组;先健脾,再疏肝健脾, $13.57 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组6只。光镜、电镜下观察各组大鼠肝、结肠组织切片;全自动生化分析仪检测血清肝功能生化指标;逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肝脏、结肠组织G蛋白偶联受体5(TGR5),肠黏膜闭锁连接蛋白-1(ZO-1),闭合蛋白(Occludin),紧密连接蛋白-1(Claudin-1)mRNA相对表达量;免疫组化法检测结肠增殖细胞核抗原(PCNA)阳性表达率。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清碱性磷酸酶(ALP),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆红素(TBIL),直接胆红素(DBIL)水平显著升高($P < 0.01$),肝脏组织TGR5 mRNA表达显著降低,结肠组织TGR5 mRNA表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),结肠ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA及PCNA表达显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,双环醇、柴丙组血清ALP, ALT, AST, TBIL, DBIL水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),六君子汤组、柴甲、柴乙、柴丙组肝脏组织TGR5 mRNA肝脏表达显著升高,结肠组织TGR5 mRNA的表达显著降低($P < 0.01$),双环醇组、柴甲、柴乙、柴丙组结肠ZO-1, Claudin-1 mRNA表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),双环醇组、四逆散组、柴丙组PCNA表达显著升高($P < 0.01$);与柴丙组比较,双环醇组、四逆散组肝脏TGR5, 结肠ZO-1 mRNA表达显著降低且结肠TGR5 mRNA表达显著升高($P < 0.01$),六君子汤组、柴乙组结肠PCNA表达明显降低($P < 0.05$)。结论:肝损伤状态下进行先健脾治疗能减轻肝损伤,“健脾”治疗能提高肠黏膜紧密连接蛋白含量,进而改善胃肠道功能,这与TGR5激活进而改善肠黏膜屏障功能,促进肠干细胞更新并驱动损伤后的再生有关。

[关键词] 肝病传脾; 疏肝健脾; G蛋白偶联受体5(TGR5); 闭锁连接蛋白-1(ZO-1); 闭合蛋白(Occludin); 紧密连接蛋白-1(Claudin-1); 结肠增殖细胞核抗原(PCNA)

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R256.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)01-0131-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220137

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211109.1150.004.html>

[网络出版日期] 2021-11-09 13:30

Effect and Mechanism of "Liver-Soothing and Spleen-Invigorating" Therapies Against Liver Injury in Rats: An Exploration Based on TGR5 and Intestinal Mucosal Barrier Function

WEI Wei-li, GAO Yi-ning, SHI Xing-hua, ZHENG Zhi-li, KANG Qian-jun, DENG Xiu-lan*

(School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of different treatment methods of "soothing liver, invigorating spleen, soothing liver and invigorating spleen, soothing liver first and then soothing liver and invigorating spleen, as well as invigorating spleen first and then soothing liver and invigorating spleen" on liver

[收稿日期] 20210716(015)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573963);北京中医药大学校级科研纵向发展基金项目(2180072120082)

[第一作者] 魏伟莉,在读硕士,从事中医药防治消化系统疾病研究, E-mail: 20190931129@bucm.edu.cn

[通信作者] * 邓秀兰, 硕士, 教授, 从事中医药防治消化系统疾病研究, Tel: 010-53912063, E-mail: dengxiulan@bucm.edu.cn

depression combined with liver injury in rats and their action mechanisms. **Method:** A six-week rat model of liver depression combined with liver injury was established by restraint stress and subcutaneous injection of carbon tetrachloride (CCl_4 , $5.89 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, once every three days). At the same time, the drugs were given by gavage. Forty-eight male SD rats of clean grade were randomly divided into eight groups, namely the normal group, model group, bicyclol ($0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, Sinisan ($4.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, Liu Junzitang ($9.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, Chaishao Liu Junzitang A (Chai A, soothing liver and invigorating spleen, $13.57 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, Chaishao Liu Junzitang B (Chai B, soothing liver first and then soothing liver and invigorating spleen, $13.57 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and Chaishao Liu Junzitang C (Chai C, invigorating spleen first and then soothing liver and invigorating spleen, $13.57 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, with six rats in each group. The pathological changes in liver and colon tissues of each group were observed under light microscope and electron microscope. The serum biochemical indexes of the liver were detected using an automatic biochemical analyzer. The relative mRNA expression levels of Takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5) and intestinal mucosal zona occluden-1 (ZO-1), Occludin, and Claudin-1 in the liver and colon were detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The positive expression rate of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the colon was detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with normal group, the model group exhibited significantly elevated serum alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), and direct bilirubin (DBIL) ($P < 0.01$), lowered TGR5 mRNA expression in liver tissue, up-regulated TGR5 mRNA expression in the colon tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and down-regulated ZO-1, Occludin, and tight junction protein-1 (Claudin-1) mRNA expression and PCNA in the colon tissue ($P < 0.01$). Compared with the model group, bicyclol and Chai C remarkably decreased the levels of serum ALP, ALT, AST, TBIL, and DBIL ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while Liu Junzitang, Chai A, Chai B, and Chai C significantly up-regulated the TGR5 mRNA expression in the liver and down-regulated its expression in the colon ($P < 0.01$). Bicyclol, Chai A, Chai B, and Chai C enhanced the ZO-1 and Claudin-1 mRNA expression in the colon ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Bicyclol, Sinisan, and Chai C increased PCNA expression ($P < 0.01$). The comparison with the Chai C group showed that the TGR5 mRNA expression in the liver and ZO-1 mRNA expression in the colon of the bicyclol and Sinisan groups were lower, whereas the TGR5 mRNA expression in the colon was higher ($P < 0.01$). However, the PCNA expression in the colon of the Liu Junzitang and Chai B groups declined significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** In the presence of liver injury, invigorating spleen first helps to relieve the liver injury, and the efficacy of "spleen-invigorating" therapy in increasing the intestinal mucosal tight junction proteins and improving the gastrointestinal function is related to its activation of TGR5 to improve the intestinal mucosal barrier function, promote the renewal of intestinal stem cells, and drive the regeneration after injury.

[Keywords] liver disease transmitting into spleen; soothing liver and invigorating spleen; Takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5); zona occluden-1 (ZO-1); Occludin; tight junction protein-1 (Claudin-1); colonic proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

肝脏病变包括乙肝、甲肝、丙肝、肝硬化、脂肪肝、肝癌、酒精肝等多种疾病,西医在治疗方面主要是抗病毒、提高免疫力、恢复肝功能。中医则提出“先实脾”的治疗思想,如张仲景在《金匮要略·脏腑经络先后病脉证第一》中提出“夫治未病者,见肝之病,知肝传脾,当先实脾”。其中“肝病传脾”主要是指在肝损伤情况下出现脾气虚、脾失运化的临床表现,例如面色萎黄、倦怠乏力、纳呆便溏等症状,“当

先实脾”是在肝损伤情况下除了治肝还要重视脾胃的顾护,即加入健脾补脾药物,以达到疏肝健脾的效果。柴芍六君子汤作为疏肝健脾常用方剂已被证实可用于非酒精性脂肪性肝病、乙型肝炎、肝硬化、慢性胃炎等疾病的治疗中^[1-4]。

脾的运化功能体现在胃肠道消化方面,而肠黏膜屏障功能则直接反映胃肠道状况。G蛋白偶联受体5(TGR5)作为胆汁酸受体对肠道正常运行起着

重要作用,TGR5为G蛋白偶联受体(GPCR)的成员之一,于2002年被发现^[5],GPCR是人体较大的一类受体,可通过多个效应子途径将细胞外信号传导至细胞内下游级联反应。TGR5在核转录因子- κ B(NF- κ B)^[6],蛋白激酶B(Akt)^[7]和细胞外信号调节激酶(ERK)^[8]等细胞信号通路中发挥着重要作用。TGR5激动剂可能是治疗代谢性疾病,炎症和消化系统疾病的潜在药物^[9-10]。中医对于疏肝、健脾、疏肝健脾同治、先加强疏肝再疏肝健脾、先加强健脾再疏肝健脾不同疗法的比较鲜有研究,故本文将从TGR5及肠黏膜屏障功能方面探讨其不同治疗方法对肝损伤大鼠的影响及其作用机制,以期对肝病治疗能得到较好的方法。

1 材料

1.1 动物 48只雄性清洁级SD大鼠,体质量(180±20)g,动物合格证号SCXK(京)2019-0010,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供。饲养条件室温(25±0.5)℃,相对湿度(55±5)%,采用12h/12h明暗光照,自由摄食饮水。本实验经北京中医药大学动物伦理委员会批准,编号BUCM-4-2019082602-3073。

1.2 药物和试剂 四逆散(柴胡12g,白芍15g,枳壳10g,炙甘草5g),六君子汤(党参15g,茯苓10g,白术10g,炙甘草5g,半夏10g,陈皮10g,焦神曲10g,焦山楂10g,焦麦芽10g),柴芍六君子汤方由四逆散及六君子汤两方组成。所有饮片全部购自北京同仁堂医药药材有限公司,经北京中医药大学中药学院李向日教授鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》规范。各组药物加10倍量纯水浸泡2h,煎煮至沸腾,保持沸腾40min后过滤药液,滤渣加8倍量纯水再煎煮40min后过滤,2次煎煮滤液合并后文火浓缩,四逆散、六君子汤、柴芍六君子汤含生药质量浓度分别为0.21,0.45,0.66g·mL⁻¹,4℃保存备用。双环醇片(北京协和药厂,国药准字H20040467,规格25mg/片);四氯化碳(CCl₄,上海沪试化工有限公司,批号20180129);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL),直接胆红素(DBIL)(南京建成生物工程研究所,批号均为A111-2);兔抗TGR5多克隆抗体(英国Abcam公司,批号ab72608);鼠抗增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号GB11010);RNA提取液,Servicebio®RT First Strand cDNA Synthesis Kit,2×SYBR Green qPCR Master

Mix (Low ROX)(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G3013,G3330,G3321)。

1.3 仪器 CX4Pro型全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司);BX53型光学显微镜(日本Olympus公司);CFX96型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司);NanoDrop2000型超微量分光光度计(美国Thermo公司);TGL-16MS型台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);JEM-1400Flash型透射电子显微镜(日本JEOL公司);RM2245型石蜡切片机(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 将48只SD大鼠适应性喂养7d后,采用随机数字表法分为正常组、模型组、双环醇组、四逆散组(疏肝)、六君子汤组(健脾)、柴甲组(疏肝健脾)、柴乙组(先疏肝,再疏肝健脾)、柴丙组(先健脾,再疏肝健脾),每组6只。除正常组外,其余各组大鼠建立肝郁叠加肝损伤模型,参照慢性束缚方法^[11],将大鼠置于特制的束缚制动筒内,通过移动束缚制动筒内前端筒塞和后端插片逐步缩小大鼠活动空间,调节到大鼠不产生强烈反抗的最小空间。每日开始时间随机,每日束缚制动1次,持续时间从第1天的4h逐渐增至每天6h,连续42d,束缚制动期间禁食、禁水;造模期间除正常组大鼠外,各组大鼠给予新鲜配制的40%CCl₄橄榄油溶液5.89g·kg⁻¹皮下注射,1次/3d,正常组皮下注射等体积橄榄油。大鼠出现肝细胞变性、坏死,产生炎症反应,结缔组织增生;血清肝脏生化指标ALT,AST,ALP水平明显升高,提示造模成功^[12]。

2.2 给药 造模同时,四逆散组、六君子汤组、柴芍六君子汤(柴甲、柴乙、柴丙)组分别以4.32,9.26,13.57g·kg⁻¹灌胃给药。给药剂量参照成人(体质量60kg)的临床用量、大鼠与人的等效剂量换算及前期研究而定^[13-14],双环醇组以0.2g·kg⁻¹灌胃给药^[15]。正常组与模型组给予等体积去离子水灌胃;双环醇组、四逆散组、六君子汤组、柴甲组分别给予双环醇、四逆散、六君子汤、柴芍六君子汤灌胃,连续42d;柴乙组先给予四逆散灌胃21d后,再给予柴芍六君子汤灌胃21d;柴丙组先给予六君子汤溶液灌胃21d后,再给予柴芍六君子汤灌胃21d,1次/d。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 肝功能生化检测 全自动生化分析仪检测大鼠血清中ALP,ALT,AST,TBIL,DBIL含量。

2.3.2 组织病理观察 实验第42天,各组大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液麻醉(4mL·kg⁻¹),腹主动脉

取血,麻醉后,摘取肝脏、结肠组织,置于4%多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋、切片,常规苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察各组大鼠肝脏、结肠组织病理变化。在冰袋上取肝脏、结肠组织然后放入锡纸包裹的电镜固定液中,进行透射电镜样品制备,以乙酸双氧铀、柠檬铅双染色,漂白,透射电镜观察各组大鼠肝脏、结肠超微结构。

2.3.3 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测大鼠肝脏及结肠 TGR5, 闭锁连接蛋白-1(ZO-1), 闭合蛋白(Occludin), 紧密连接蛋白-1(Claudin-1) mRNA 相对表达量 随机取大鼠肝脏、结肠组织,充分研末后取上清液,提取总RNA。取PCR管,加入RNA 10 μL 作为模板逆转录,逆转录程序设置条件为25 $^{\circ}\text{C}$,保温5 min;42 $^{\circ}\text{C}$,保温30 min;结束后85 $^{\circ}\text{C}$ 保温5 s灭活反转录酶。PCR扩增反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共循环40次。熔解曲线65~95 $^{\circ}\text{C}$,每15 s升温0.3 $^{\circ}\text{C}$ 。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分别计算结肠及肝脏组织中TGR5的mRNA相对表达量及结肠组织中ZO-1,Occludin,Claudin-1的mRNA相对表达量。TGR5,ZO-1,Occludin引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成,Claudin-1引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物序列见表1。

2.3.4 免疫组化法检测大鼠结肠 PCNA 表达水平 采用免疫组化SABC法检测结肠PCNA蛋白表达水平,染色步骤参考说明书进行,用阳性切片作为对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)作为一抗阴性对照。PCNA结果以出现棕黄染色为阳性表达,所有标本均放大相同倍数($\times 400$),每张切片随机观察6个视野,用Image-Pro Plus 6.0软件进行定量分析,以阳性

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
TGR5	上游 TCATCGTCATCGCCAACCT	104
	下游 CCCAGCTAGTAGTAGGCTTAGAAAG	
ZO-1	上游 CGGGCTACCTTATTGAATGTCC	116
	下游 GAGCGAACTGAATGGTCTGATG	
Occludin	上游 GGATGACTACAGAGAGGAGAGCG	161
	下游 CATAGTCTCCCACCATCTCTTG	
Claudin-1	上游 GGTTCATCCTGGCTTCG	127
	下游 ATCCACAGTCCCTCGTAG	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

细胞染色的吸光度A计算PCNA表达量。

2.4 统计学分析 采用SPSS 20.0软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较数据服从正态分布,方差齐者用单因素方差分析,组间两两比较用最小显著性差异法(LSD)- t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝损伤大鼠肝功能生化指标的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中ALP,ALT,AST,TBIL,DBIL水平均显著升高,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,双环醇、柴丙组ALP,ALT,AST,DBIL,TBIL水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);四逆散组、柴甲组ALP,ALT,DBIL,TBIL水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);六君子汤组ALP,ALT,DBIL水平明显降低($P < 0.05$);柴乙组ALT,DBIL水平显著降低,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。见表2。

表2 各给药组对肝损伤大鼠血清ALP,ALT,AST,TBIL,DBIL水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of each dose group on serum ALP,ALT,AST,TBIL and DBIL levels in liver injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

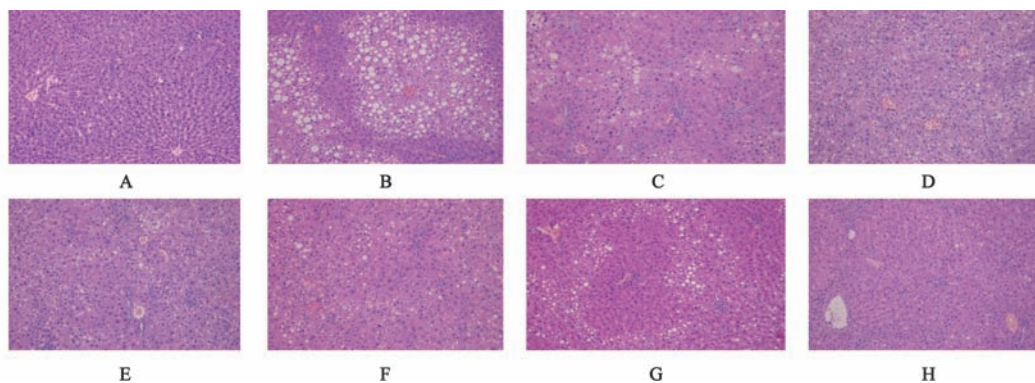
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALP/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	TBIL/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	DBIL/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常		274.85 $\pm$ 30.42	38.98 $\pm$ 9.65	114.00 $\pm$ 21.59	1.54 $\pm$ 0.23	0.44 $\pm$ 0.09
模型		569.20 $\pm$ 140.93 ²⁾	468.22 $\pm$ 78.07 ²⁾	612.95 $\pm$ 210.82 ²⁾	7.80 $\pm$ 2.64 ²⁾	4.55 $\pm$ 1.83 ²⁾
双环醇	0.2	336.22 $\pm$ 110.75 ⁴⁾	115.83 $\pm$ 13.18 ⁴⁾	380.37 $\pm$ 118.13 ⁴⁾	4.98 $\pm$ 1.94 ³⁾	2.19 $\pm$ 1.01 ⁴⁾
四逆散	4.32	378.17 $\pm$ 80.34 ⁴⁾	199.28 $\pm$ 91.90 ⁴⁾	546.15 $\pm$ 137.75	4.73 $\pm$ 1.67 ⁴⁾	2.09 $\pm$ 1.02 ⁴⁾
六君子汤	9.26	361.02 $\pm$ 119.26 ³⁾	217.87 $\pm$ 62.14 ³⁾	500.20 $\pm$ 128.04	6.94 $\pm$ 2.53	2.64 $\pm$ 1.17 ³⁾
柴甲	13.57	294.75 $\pm$ 47.45 ⁴⁾	227.08 $\pm$ 75.49 ⁴⁾	490.78 $\pm$ 140.37	5.19 $\pm$ 1.75 ³⁾	2.40 $\pm$ 1.16 ⁴⁾
柴乙	13.57	452.47 $\pm$ 115.92	217.33 $\pm$ 101.57 ⁴⁾	461.12 $\pm$ 150.21	6.04 $\pm$ 1.74	2.23 $\pm$ 0.89 ⁴⁾
柴丙	13.57	377.60 $\pm$ 121.64 ⁴⁾	162.30 $\pm$ 78.99 ⁴⁾	431.13 $\pm$ 170.28 ³⁾	5.21 $\pm$ 1.94 ⁴⁾	2.04 $\pm$ 0.77 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对肝损伤大鼠肝脏组织及结肠组织病理形态学变化的影响

3.2.1 HE染色观察肝损伤大鼠肝脏组织病理形态学变化 光镜下观察,正常组大鼠肝组织的形态学表现正常,肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐,细胞核圆居中,无明显肿胀、炎性细胞浸润及坏死;模型组大鼠肝小叶结构不清,肝细胞疏松肿胀,肝细胞索排列紊乱,其中一些肝细胞胞质呈空泡核,甚至核消失,肝脂肪变明显,并有炎性细胞浸润;双环醇、四逆散组大鼠与模型组大鼠比较,肝细胞肝

小叶结构不清、肝细胞疏松肿胀、炎性细胞浸润、脂肪变性情况稍减轻;六君子汤组大鼠肝小叶结构稍加完整,肝细胞肿胀程度减轻,炎性细胞浸润减少,脂肪泡减少;柴芍六君子汤3组中,柴甲、柴乙组与模型组、双环醇组、四逆散组、六君子汤组比较,大鼠肝小叶结构明显改善,肝细胞肿胀程度明显减轻;柴丙组与其余各给药组比较,大鼠肝小叶结构更加清晰、完整,肝细胞索排列整齐,肝细胞肿胀减轻,肝细胞的这些变质性改变都显著减轻。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 双环醇组;D. 四逆散组;E. 六君子汤组;F. 柴甲组;G. 柴乙组;H. 柴丙组(图2~4同)

图1 各给药组对肝损伤大鼠肝脏组织病理学变化的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of each dose group on histopathological changes of liver in rats with liver injury (HE,×200)

3.2.2 HE染色观察肝损伤大鼠结肠组织病理学变化 光镜观察下,正常组大鼠结肠组织黏膜有平直的腺管,上1/3见固有层稀疏的单核细胞,无充血或反应性腺管改变,亦无炎性细胞浸润;模型组大鼠结肠固有层和腺管有炎性细胞浸润,并有充血和反应性腺管改变,杯状细胞数量减少;双环醇组大鼠

结肠组织依然有炎性细胞浸润、充血;四逆散组大鼠结肠组织炎性细胞浸润、充血减少;六君子汤组大鼠结肠炎性细胞浸润、充血进一步减轻;柴甲、柴乙、柴丙组大鼠结肠组织无明显充血和炎性细胞浸润,柴丙组大鼠结肠杯状细胞数量明显增多。见图2。

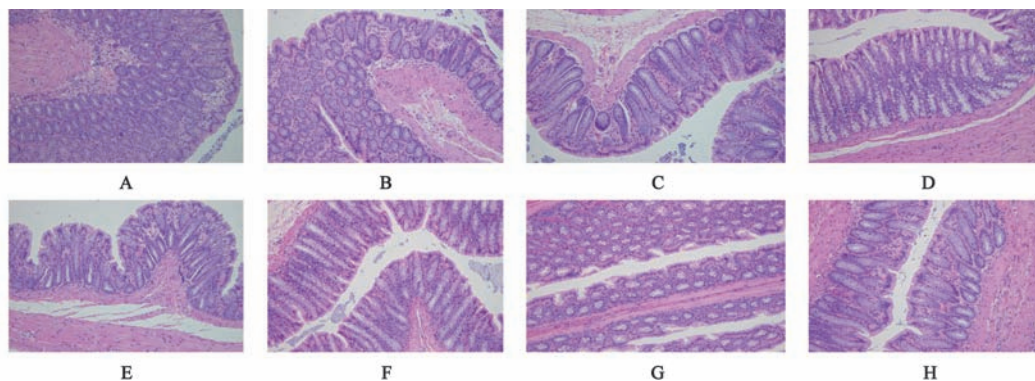


图2 各给药组对肝损伤大鼠结肠组织病理学变化的影响(HE,×200)

Fig. 2 Effect of each dose group on histopathological changes of colon in rats with liver injury (HE,×200)

3.2.3 电镜下观察肝损伤大鼠肝脏组织病理学变化 电镜下观察,正常组大鼠肝细胞内结构丰富,线粒体较多,高尔基复合体较发达,粗面内质网和滑面内质网相当发达,溶酶体、糖原丰富,基质电子

密度均匀;模型组大鼠肝细胞线粒体肿胀,基质颗粒减少,嵴缩短,粗面内质网呈明显脱颗粒现象,糖原显著减少,脂肪空泡较多。与模型组大鼠比较,双环醇组大鼠肝细胞线粒体肿胀程度减轻,粗面内

质网脱颗粒现象减轻,但依然存在滑面内质网扩张、脂肪空泡较多的现象;四逆散组大鼠肝细胞线粒体肿胀程度减轻,滑面内质网扩张减轻,脂肪空泡减少,糖原增加;六君子汤组大鼠肝细胞线粒体肿胀程度减轻,基质颗粒较均匀,粗面内质网脱颗

粒现象减轻,也依然存在脂肪空泡较多现象;柴甲、柴乙、柴丙组鼠肝细胞结构逐渐丰富,线粒体肿胀程度明显减小,数量增多,基质增多,糖原增加,脂肪空泡明显减少,其中柴丙组大鼠肝细胞变化较为显著。见图3。

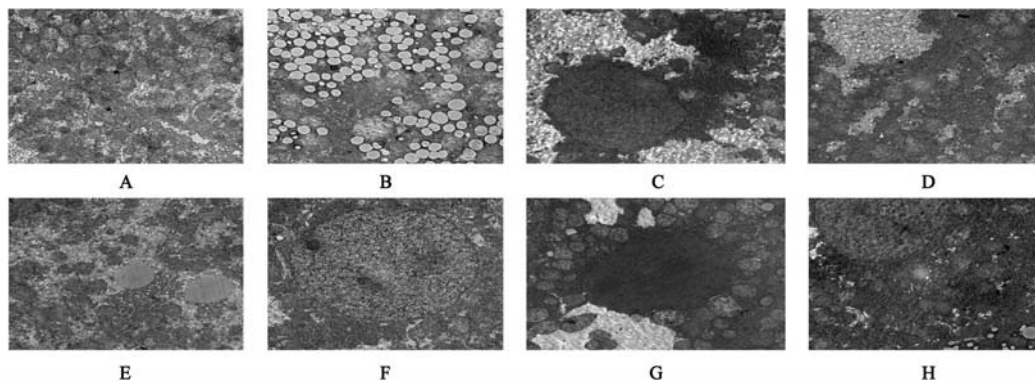


图3 各给药组对肝损伤大鼠肝脏组织病理学变化的影响(透射电镜,×1万)

Fig. 3 Effect of each dose group on histopathological changes of liver in rats with liver injury(TEM,×1万)

3.2.4 电镜下观察肝损伤大鼠结肠组织病理学变化 电镜下观察,正常组大鼠结肠微绒毛长短一致,排列整齐,无脱落,相邻细胞间均有连接复合体,胞质内富有线粒体,线粒体嵴长而丰富;模型组大鼠结肠微绒毛长短不一致,排列紊乱,有脱落现象,相邻细胞间连接复合体缺失,胞质内线粒体肿胀,颗粒脱落,线粒体嵴不明显。与模型组比较,双环醇组、四逆散组大鼠结肠微绒毛排列较整齐,脱落现象减少,细胞间连接复合体少量存在,线粒体

肿胀、颗粒脱落减轻;六君子汤组大鼠结肠微绒毛排列整齐,无脱落,细胞间连接复合体存在,线粒体肿胀、颗粒脱落进一步减轻,线粒体嵴丰富;柴甲、柴乙、柴丙组大鼠结肠微绒毛排列整齐,无脱落现象,其中柴甲、柴乙组大鼠结肠细胞间连接复合体少量存在,线粒体肿胀、颗粒脱落减轻,但线粒体数量相对柴丙组较少,线粒体嵴短而少,柴丙组大鼠结肠细胞间均存在连接复合体,且线粒体数量丰富,线粒体嵴长而多。见图4。

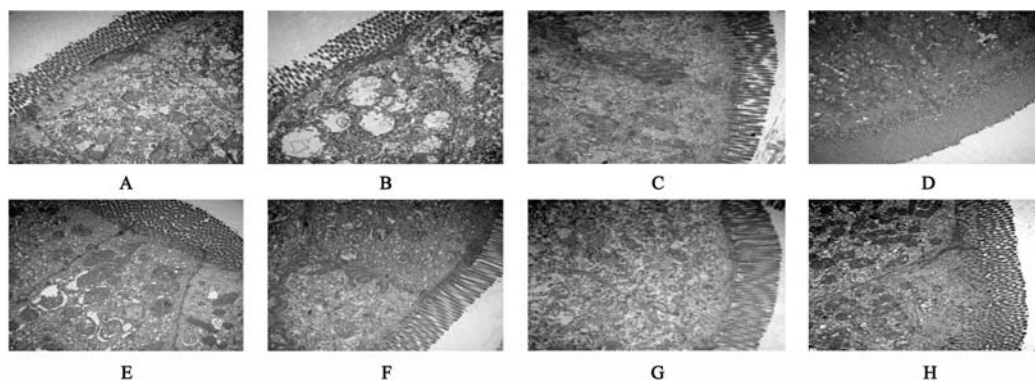


图4 各给药组对肝损伤大鼠结肠组织病理学变化的影响(透射电镜,×15 000)

Fig. 4 Effect of each dose group on histopathological changes of colon in rats with liver injury (TEM,×15 000)

3.3 对肝损伤大鼠肝脏及结肠组织中TGR5 mRNA相对表达量的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏TGR5 mRNA相对表达量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,六君子汤组、柴甲、柴乙、柴丙组大鼠肝脏TGR5 mRNA相对表达量显著升高($P<0.01$);与柴丙组比较,双环醇组、四逆散组大鼠肝脏

TGR5 mRNA相对表达量显著降低($P<0.01$)。见表3。

与正常组比较,模型组大鼠结肠TGR5 mRNA相对表达量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,双环醇组、六君子汤组、柴甲、柴乙、柴丙组大鼠结肠TGR5 mRNA相对表达量显著降低($P<0.01$);与柴

丙组比较,双环醇组、四逆散组大鼠结肠 TGR5 mRNA 相对表达量显著升高($P<0.01$)。见表3。

表3 各给药组对肝损伤大鼠肝脏、结肠 TGR5 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of each dose group on TGR5 mRNA relative expression levels in liver and colon of liver injury rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝脏 TGR5	结肠 TGR5
模型		0.76±0.12 ²⁾	1.21±0.21 ¹⁾
双环醇	0.2	0.97±0.09 ⁶⁾	0.80±0.16 ^{4,6)}
四逆散	4.32	1.04±0.24 ⁶⁾	0.94±0.08 ⁶⁾
六君子汤	9.26	1.37±0.15 ⁴⁾	0.58±0.10 ⁴⁾
柴甲	13.57	1.26±0.13 ⁴⁾	0.47±0.09 ⁴⁾
柴乙	13.57	1.45±0.11 ⁴⁾	0.53±0.06 ⁴⁾
柴丙	13.57	1.35±0.18 ⁴⁾	0.59±0.11 ⁴⁾

注:设正常组肝脏及结肠组织中 TGR5 mRNA 相对表达量均为1;与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与柴丙组比较,⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表4,5同)。

3.4 对肝损伤大鼠结肠 ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA 相对表达量的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠 ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA 相对表达量显著下降($P<0.01$);与模型组比较,双环醇组、柴甲、柴乙、柴丙组 ZO-1, Claudin-1 mRNA 相对表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$);四逆散组 Claudin-1 mRNA 相对表达量明显升高($P<0.05$);六君子汤组 ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA 相对表达明显升高($P<0.05, P<0.01$);与柴丙组比较,双环醇组、四逆散组、六君子汤组 ZO-1 mRNA 相对表达量显著降低($P<0.01$)。上述结果表明先健脾再疏肝健脾治疗更能促进 ZO-1, Claudin-1 的 mRNA 相对表达量,进而增强肠黏膜屏障功能。见表4。

表4 各给药组对肝损伤大鼠结肠 ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of each dose group on mRNA relative expression levels of ZO-1, Occludin and Claudin-1 in colon of liver injury rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ZO-1	Occludin	Claudin-1
模型		0.04±0.02 ²⁾	0.27±0.24 ²⁾	0.15±0.11 ²⁾
双环醇	0.2	6.64±1.92 ^{4,6)}	1.55±0.69	6.19±2.18 ⁴⁾
四逆散	4.32	3.59±2.09 ⁶⁾	3.98±2.80	4.34±1.07 ³⁾
六君子汤	9.26	8.29±1.58 ^{4,6)}	5.04±0.28 ³⁾	5.74±1.63 ⁴⁾
柴甲	13.57	11.05±1.25 ⁴⁾	3.78±2.79	5.91±1.15 ⁴⁾
柴乙	13.57	10.76±3.07 ⁴⁾	3.13±2.12	4.39±2.17 ³⁾
柴丙	13.57	13.56±2.34 ⁴⁾	2.47±0.94	6.75±3.05 ⁴⁾

注:设正常组各 mRNA 相对表达量均为1。

3.5 对肝损伤大鼠结肠 PCNA 的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织 PCNA 表达量显著下降($P<0.01$);与模型组比较,双环醇组、四逆散组、柴丙组 PCNA 表达量显著升高($P<0.01$);柴甲组 PCNA 表达量明显升高($P<0.05$);与柴丙组比较,六君子汤组、柴乙组 PCNA 表达量明显降低($P<0.05$)。见表5。

表5 各给药组对肝损伤大鼠结肠 PCNA 的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of each dose group on PCNA of colon in liver injury rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PCNA
正常		0.03±0.01
模型		0.02±0.01 ²⁾
双环醇	0.2	0.03±0.01 ⁴⁾
四逆散	4.32	0.03±0.01 ⁴⁾
六君子汤	9.26	0.02±0.00 ⁵⁾
柴甲	13.57	0.03±0.01 ³⁾
柴乙	13.57	0.02±0.01 ⁵⁾
柴丙	13.57	0.04±0.01 ⁴⁾

4 讨论

张仲景在《金匱要略》中提出“夫治未病者,见肝之病,知肝传脾,当先实脾”,表明了肝病具有“肝病传脾”这一动态过程,需进行“先实脾”治疗。本实验基于 TGR5, 肠黏膜 ZO-1, Occludin, Claudin-1 及结肠 PCNA,探讨“肝病传脾”的客观依据及“疏肝健脾”不同治疗方法对肝郁叠加肝损伤大鼠的影响。

肝功能生化指标(ALP, ALT, AST, TBIL, DBIL)是评价肝功能常见指标,肝脏组织病理学观察直接反映肝脏病变严重程度。肝生化指标和组织病理观察及结肠组织病理学光镜、电镜下观察结果为“肝病传脾”提供客观依据。TGR5的激活对减轻肝损伤和维持肠道正常功能有着密切的联系,肠黏膜紧密连接蛋白 ZO-1, Occludin, Claudin-1 可反映肠道机械屏障功能的正常与否,PCNA 是存在于增殖细胞阶段性表达的蛋白质,其在细胞中的表达,可作为评价细胞增殖状态的一个指标。故 TGR5, ZO-1, Occludin, Claudin-1, PCNA 的表达可作为“肝病传脾”“疏肝健脾”生物学机制探究依据。

TGR5 在人小肠、胃、肝、肺等器官高表达^[16-17],并存在于肝窦状内皮细胞、库普弗细胞、肠神经系统神经元中^[18-19],TGR5 不仅存在于人体,在动物中,如鼠、兔也广泛表达^[20]。有研究表明在分离的库普

弗细胞(KC)中TGR5激动剂能激动TGR5受体并降低脂多糖(LPS)诱导的白细胞介素(IL)-1 α , IL-1 β , IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达^[18], TGR5激活可降低NF- κ B抑制剂的磷酸化,进而阻止NF- κ B p65的转移,降低NF- κ B的转录活性^[21],从而保护肝损伤。TGR5的激活可促进肠道L细胞分泌GLP-1, GLP-1能减少非酒精性脂肪性肝炎啮齿动物模型中肝脏的脂肪变性、炎症和纤维化^[22-24]。体外实验表明TGR5活化强烈抑制信号转导和活化转录因子3(STAT3)信号通路,此转录因子对于肿瘤细胞周期进程、凋亡、血管形成、转移和免疫系统逃避具有重要影响^[25-27],而TGR5缺乏的小鼠更易于遭受化学诱导的肝脏癌变或肝细胞死亡^[28]。胆汁酸是仅在肝脏中由胆固醇合成的两亲性分子,而TGR5作为胆汁酸受体,在肝脏发挥保护作用的同时亦随肝肠循环进入肠道,TGR5于肠道中的定位在调节胃肠运动和分泌的肠神经元^[19]。TGR5其中一种激动剂脱氧胆酸(DCA)与TGR5在NOS-阳性神经元的定位一致,通过神经和氮代谢的机制可以抑制结肠纵肌节段的自发收缩,而在TGR5缺陷的小鼠组织中并未观察到DCA的这种抑制作用,这表明DCA抑制小鼠结肠纵肌自发收缩是通过激活TGR5实现的^[29]。有关研究表明在结肠炎相关癌症的肿瘤组织中发现了较高水平的TGR5^[30]。TGR5在结肠炎模型和克罗恩病患者炎症下呈现高水平状态^[31],而TGR5激动剂可改善结肠炎^[32]。结肠炎临床前模型中选择性TGR5激动剂体内研究表明,在小鼠中切除TGR5基因会导致以结肠细胞之间紧密连接结构的分子改变为特征的表型,表达增加,并且连蛋白-1(Zonulin-1)的亚细胞分布异常,导致肠通透性增加^[31]。

本实验研究结果显示,在大鼠肝脏生理和病理方面,模型组大鼠血清ALP,ALT,AST,TBIL,DBIL水平均显著升高,肝脏病理显示有较多炎性细胞浸润并伴有脂肪变性;各给药组中,双环醇、柴丙组大鼠肝功能显著改善。在肝脏、结肠TGR5 mRNA相对表达量方面,模型组大鼠肝脏TGR5 mRNA相对表达量显著低于各给药组,六君子汤组、柴甲、柴乙、柴丙组显著升高TGR5 mRNA表达量,其中柴丙组相较于双环醇、四逆散组,更能提升TGR5 mRNA表达量;模型组大鼠结肠TGR5 mRNA表达量高于各给药组,各给药组中,六君子汤、柴甲、柴乙、柴丙组治疗能激活TGR5,进而降低TGR5 mRNA相对表达量;其中柴丙组优于双环醇、四逆散组。

肠黏膜屏障功能可以防止有害物质(如微生物、肠腔内抗原和促炎因子)的侵入,黏膜屏障的防御包括免疫原性机制(如免疫球蛋白和黏膜的淋巴细胞)和非免疫原性机制(如选择性肠道渗透性),而上皮屏障是肠道屏障最重要的非免疫组分,其高渗透性可以导致某些肠道疾病的发生,如炎症性肠病、乳糜泻和食物过敏。结肠细胞是肠道上皮屏障中最重要的部分,上皮细胞及其紧密连接是肠黏膜机械屏障较为重要组成成分^[33],紧密连接的分子成分主要是由3个跨膜蛋白家族组成,包括Occludins, Claudins和连接黏附分子(JAMs)^[34-36]。每一种跨膜蛋白都与细胞质衔接蛋白(如ZO-1)相关,Claudins和Occludins的延伸C端与可溶性细胞骨架ZO蛋白相互作用,进而介导ZO蛋白与质膜的结合,这是形成紧密连接的必经步骤^[37]。体内研究表明,Occludin敲除(KO)小鼠与Claudin-KO小鼠相比,肠上皮紧密连接形态完整,Claudins对紧密连接的结构完整性比Occludins更有必要^[38]。本实验结果显示,模型组大鼠结肠ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA相对表达量均明显下降,各给药组中,先健脾再疏肝健脾治疗相较于双环醇、四逆散疏肝、六君子汤健脾更能提高ZO-1 mRNA相对表达量。在增殖细胞核抗原PCNA中,模型组PCNA表达量明显下降,各给药组中,柴丙组PCNA表达量平均值高于其余各给药组,并与六君子汤组、柴乙组差异有统计学意义。

本课题实验结果表明,在大鼠肝郁叠加肝损伤过程中,存在“肝病传脾”现象,具体表现为肝损伤大鼠肠道黏膜紧密连接蛋白表达量降低、肠增殖细胞核抗原减少,肠道通透性增加;TGR5相对表达量升高,肠道炎症倾向。在大鼠肝郁叠加肝损伤治疗过程中,双环醇、柴丙(先健脾再疏肝健脾)治疗优于四逆散(疏肝)、柴甲(疏肝健脾)、柴乙(先疏肝再疏肝健脾),并且柴丙(先健脾再疏肝健脾)与西药双环醇治疗效果相似,故中药治疗肝损伤要先加强健脾再疏肝健脾;根据大鼠肝脏、结肠TGR5及肠黏膜紧密连接蛋白表达情况,表明六君子汤(健脾)、柴甲(疏肝健脾)、柴乙(先疏肝再疏肝健脾)、柴丙(先健脾再疏肝健脾)治疗优于双环醇、四逆散(疏肝)治疗;根据肠增殖细胞核抗原表达情况,表明柴丙(先健脾再疏肝健脾)治疗优于六君子汤(健脾)、柴乙(先疏肝再疏肝健脾)治疗。

综上所述,肝损伤状态下中药治疗不但要“疏肝”还要“健脾”,而先加强健脾再疏肝健脾治疗更

能减轻肝损伤,其生物学机制可能与TGR5/环磷酸腺苷(cAMP)/NF- κ B抑制,进而减轻肝脏炎症有关。健脾、疏肝健脾、先加强疏肝再疏肝健脾、先加强健脾再疏肝健脾对于肠黏膜屏障功能都具有促进作用,四者之间虽无明显差异,但四者都降低了结肠TGR5表达,这表明TGR5的激活可促进肠黏膜屏障蛋白表达,进而维护肠道正常功能。本实验从胆汁酸受体TGR5角度研究了“见肝之病,知肝传脾”的动态过程,及“实脾”对TGR5激活,进而保护肝脏和肠黏膜屏障的实验依据,为临床治疗肝损伤所致的脾胃等消化疾病提供了新的指导思路,但具体生物学机制有待进一步探索。

〔利益冲突〕 本文不存在任何利益冲突。

〔参考文献〕

- 〔1〕 黄妙珍,傅珍春,谢军军,等. 柴芍六君子汤对非酒精性脂肪性肝病大鼠ADP和TNF- α 基因表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2013,31(3):607-609,712.
- 〔2〕 田广俊,芮玩珠,陈培琼,等. 柴芍六君子汤联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎(肝郁脾虚证)30例临床观察[J]. 广州中医药大学学报,2009,26(3):218-220,224.
- 〔3〕 柏林. 柴芍六君子汤加减治疗肝郁脾虚型慢性萎缩性胃炎的临床疗效[J]. 中国现代药物应用,2021,15(2):10-12.
- 〔4〕 胡阳. 评价柴芍六君子汤加减治疗肝郁脾虚型慢性萎缩性胃炎疗效[J]. 临床医药文献电子杂志,2020,7(40):156.
- 〔5〕 MARUYAMA T, MIYAMOTO Y, NAKAMURA T, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002,298(5):714-719.
- 〔6〕 MENG Z, LIU N, FU X, et al. Insufficient bile acid signaling impairs liver repair in CYP27 mice [J]. J Hepatol,2011,55(4):885-95.
- 〔7〕 KIDA T, TSUBOSAKA Y, HORI M, et al. Bile acid receptor TGR5 agonism induces NO production and reduces monocyte adhesion in vascular endothelial cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33 (7) : 1663-1669.
- 〔8〕 MASYUK A, HUANG B, RADTKE B, et al. Ciliary subcellular localization of TGR5 determines the cholangiocyte functional response to bile acid signaling [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 304(11):G1013-G1024.
- 〔9〕 KUMAR D, RAJAGOPAL S, MAHAVADI S, et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427 (3) : 600-605.
- 〔10〕 BROEDERS E, NASCIMENTO E, HAVEKES B, et al. The bile acid chenodeoxycholic acid increases human brown adipose tissue activity [J]. Cell Metab, 2015,22(3):418-426.
- 〔11〕 严灿,徐志伟,吴丽丽,等. 建立中医情志致病动物模型的思考[J]. 中国临床康复,2006,10(3):155-157.
- 〔12〕 洪维,赵锦燕,张泽修,等. 复方片仔癀肝保片对大鼠四氯化碳诱导慢性肝损伤的治疗作用[J]. 福建中医药,2014,45(5):53-60.
- 〔13〕 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004(9):1069-1072.
- 〔14〕 郑智礼,史兴华,于瀚,等.《金匱要略》“当先实脾”对肝损伤大鼠肝细胞凋亡的干预作用[J]. 环球中医药,2020,13(2):199-206.
- 〔15〕 李烨,李燕,刘耕陶. 双环醇对实验性肝纤维化的防护作用及分子机制[J]. 中华医学杂志,2004,84(24):44-49.
- 〔16〕 TIWARI A, MAITI P. TGR5: an emerging bile acid G-protein-coupled receptor target for the potential treatment of metabolic disorders [J]. Drug Discov Today,2009,14:523-530.
- 〔17〕 KEITEL V, REINEHR R, GATSIOS P, et al. The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells [J]. Hepatology, 2007,45(3):695-704.
- 〔18〕 KEITEL V, DONNER M, WINANDY S, et al. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008,372(1):78-84.
- 〔19〕 POOLE D, GODFREY C, CATTARUZZA F, et al. Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system [J]. Neurogastroenterol Motil, 2010, 22 (7) : 814-825,e227-e228.
- 〔20〕 KAWAMATA Y, FUJII R, HOSOYA M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids[J]. J Biol Chem,2003,278(11):9435-9440.
- 〔21〕 POLS T, NOMURA M, HARACH T, et al. TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading [J]. Cell Metab,2011,14(6):747-757.
- 〔22〕 DING X, SAXENA N, LIN S, et al. Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice [J].

- Hepatology, 2006, 43(1): 173-181.
- [23] TREVASKIS J, GRIFFIN P, WITTMER C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonism improves metabolic, biochemical, and histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302 (8) : G762-G772.
- [24] MELLIS J, FU P, SHARMA S, et al. Glp-1 analog, liraglutide, ameliorates hepatic steatosis and cardiac hypertrophy in C57BL/6J mice fed a western diet [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302 (2): G225-G235.
- [25] YU H, JOVE R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2) : 97-105.
- [26] YU H, KORTYLEWSKI M, PARDOLL D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(1): 41-51.
- [27] HUANG C, XIE K. Crosstalk of Sp1 and STAT3 signaling in pancreatic cancer pathogenesis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2012, 23: 25-35.
- [28] CHEN W, YU D, FORMAN B, et al. Deficiency of G-protein-coupled bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) enhances chemically induced liver carcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2013, 57(2): 656-666.
- [29] ALEMI F, POOLE D, CHIU J, et al. The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(1): 145-154.
- [30] LIU L, YANG M, DONG W, et al. Gut dysbiosis and abnormal bile acid metabolism in colitis-associated cancer [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2021, doi: 10.1016/S0016-5085(19)38620-2.
- [31] CIPRIANI S, MENCARELLI A, CHINI M, et al. The bile acid receptor GpBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (10) : e25637.
- [32] SAKANAKA T, INOUE T, YORIFUJI N, et al. The effects of a TGR5 agonist and a dipeptidyl peptidase IV inhibitor on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 30 (1) : 60-65.
- [33] 吕永慧. 肠黏膜屏障与肠内营养 [M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2008: 42-48.
- [34] FURUSE M, HIRASE T, ITOH M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions [J]. *J Cell Biol*, 1993, 123: 1777-1788.
- [35] FURUSE M, FUJITA K, HIIRAGI T, et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(7): 1539-1550.
- [36] MARTIN-PADURA I, LOSTAGLIO S, SCHNEEMANN M, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration [J]. *J Cell Biol*, 1998, 142(1): 117-127.
- [37] 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]. *J Cell Biol*, 1999, 147(6): 1351-1363.
- [38] SAITOU M, FURUSE M, SASAKI H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(12): 4131-4142.

[责任编辑 孙丛丛]