

研究报告

七味白术散对糖尿病大鼠肠道屏障和 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响王翠菊¹, 苗秀明², 郭良清^{*2}, 韩晓春^{*3}, 柳琳², 钱宇洁¹, 张秀婷⁴

1 山东中医药大学第一临床医学院, 山东 济南 250014

2 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014

3 山东中医药大学健康学院, 山东 济南 250014

4 山东中医药大学中医学院, 山东 济南 250014

王翠菊, 苗秀明, 郭良清, 韩晓春, 柳琳, 钱宇洁, 张秀婷. 七味白术散对糖尿病大鼠肠道屏障和 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 313-323.

WANG Cuiju, MIAO Xiuming, GUO Liangqing, HAN Xiaochun, LIU Lin, QIAN Yujie, ZHANG Xiuting. Effects of Qiwei Baizhu San on intestinal barrier and TLR4/NF- κ B signaling pathway in diabetic rats[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 313-323.

摘要:【背景】七味白术散可用于治疗气阴两虚所致的消渴病, 尤其近些年来在改善糖尿病胰岛素抵抗方面得到广泛使用。【目的】观察七味白术散对糖尿病大鼠肠道屏障和炎症因子的影响, 并探讨其作用机制。【方法】60 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 SD 雄性大鼠随机分为空白组、模型组、二甲双胍组和七味白术散高、中、低剂量组, 每组 10 只。腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)的方法建立糖尿病大鼠模型, 空白组大鼠给予正常饮食, 模型组、二甲双胍组和七味白术散高、中、低剂量组给予高糖高脂饮食。造模成功后分别用二甲双胍和七味白术散灌胃处理, 空白组和模型组生理盐水灌胃。观察治疗前后大鼠的一般生存状况; 药物干预 4 周后, 全自动生化分析仪检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS); 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平; 采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法观察各组大鼠结肠组织病理改变, 免疫组化法观察结肠组织 occludin 蛋白的表达位置及表达水平, Western blotting 法检测回肠组织中 zonula occludens-1 (ZO-1)、occludin、Toll-like receptor 4 (TLR4)、核因子 kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)蛋白的表达。【结果】与空白组比较, 造模后的各组大鼠空腹血糖值 ≥ 11.1 mmol/L, 差异有统计学意义

资助项目: 国家自然科学基金(81703838, 81704038); 山东省自然科学基金(ZR2019MH064); 山东省重点研发计划(2019GSF108210); 山东省中医药科技发展计划(2019-0169, 2015078)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81703838, 81704038), the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019MH064), the Key Research and Development Program of Shandong Province (2019GSF108210), and the Shandong Traditional Chinese Medicine Science and Technology Development Project (2019-0169, 2015078).

*Corresponding authors. E-mail: GUO Liangqing, glq5028@163.com; HAN Xiaochun, hanxch002@163.com

Received: 2022-03-24; Accepted: 2022-09-06; Published online: 2022-09-30

($P<0.01$)。与模型组比较,七味白术散低、中剂量组大鼠 FBG 有所下降,差异无统计学意义($P>0.05$);七味白术散高剂量组和二甲双胍组大鼠 FBG 均明显下降,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,七味白术散低、中、高剂量组和二甲双胍组大鼠 FINS、LPS、IL-6、TNF- α 水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与空白组比较,模型组大鼠肠道细胞排列紊乱,肠绒毛断裂不全且间隔稀疏,杯状细胞明显减少且分布不均,同时伴有中性粒细胞渗出,occludin 蛋白平均光密度值显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,七味白术散高剂量组及二甲双胍组大鼠肠绒毛排列较为整齐,完整性较好,结肠杯状细胞数量均有不同程度的恢复,中性粒细胞渗出减少,occludin 蛋白平均光密度值均有不同程度升高($P<0.01$)。Western blotting 显示,与模型组比较,七味白术散高剂量组及二甲双胍组大鼠回肠组织 ZO-1、occludin 蛋白表达量均升高,差异有统计学意义($P<0.01$),TLR4、NF- κ B 蛋白表达量均降低,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

【结论】七味白术散可以通过上调肠道紧密连接蛋白的表达促进肠黏膜机械屏障修复,维持紧密连接的完整性,降低血清 LPS 水平,抑制 TLR4/NF- κ B 通路,减少 IL-6、TNF- α 等炎症因子的释放,从而减轻机体炎症反应,改善胰岛素抵抗。

关键词:七味白术散;胰岛素抵抗;肠道屏障;炎症;Toll 样受体 4/核因子 kappa B

Effects of Qiwei Baizhu San on intestinal barrier and TLR4/NF- κ B signaling pathway in diabetic rats

WANG Cuiju¹, MIAO Xiuming², GUO Liangqing^{*2}, HAN Xiaochun^{*3}, LIU Lin²,
QIAN Yujie¹, ZHANG Xiuting⁴

1 The First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, Shandong, China

2 Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, Shandong, China

3 Health College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, Shandong, China

4 School of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, Shandong, China

Abstract: [Background] Qiwei Baizhu San can be used to treat diabetes caused by deficiency of both qi and yin. Especially in recent years, it has been widely used in improving insulin resistance of diabetes mellitus. [Objective] To observe the effects of Qiwei Baizhu San on intestinal barrier and inflammatory factors in diabetic rats and to explore its mechanism. [Methods] Sixty SD male rats in specific pathogen free (SPF) grade were randomly divided into a normal control group, a model group, a metformin group, and high, medium, and low-dose Qiwei Baizhu San groups, with 10 rats in each group. The diabetic rat model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). Rats in the normal control group were given a normal diet, and rats in the model group, the metformin group, and the high, medium, and low-dose Qiwei Baizhu San groups were all given high-sugar and high-fat diets. After successful modeling, the metformin group and the Qiwei Baizhu San groups were treated with metformin and Qiwei Baizhu San by gavage, respectively. Normal saline was given by gavage

in the normal control group and the model group. The general living status of rats before and after treatment was observed. After 4 weeks of drug intervention, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), and lipopolysaccharide (LPS) were detected by an automatic biochemical analyzer. Interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rat serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in colon tissues of rats in each group, and immunohistochemistry was used to observe the expression position and level of occludin protein in colon tissues. Western blotting assay was used to determine the protein expressions of zonula occludens-1 (ZO-1), occludin, Toll-like receptor 4 (TLR4), and nuclear factor kappa B (NF- κ B). **[Results]** As compared with the normal control group, the FBG of rats after modeling in each group was ≥ 11.1 mmol/L ($P < 0.01$). As compared with the model group, the FBG of rats in the low and medium-dose Qiwei Baizhu San groups decreased, but the difference was statistically insignificant ($P > 0.05$). The FBG of rats in the high-dose Qiwei Baizhu San group and the metformin group decreased as compared with the model group ($P < 0.05$). As compared with the model group, the levels of FINS, LPS, IL-6, and TNF- α in the metformin group and high, medium, and low-dose Qiwei Baizhu San groups decreased ($P < 0.01$). As compared with the blank group, the intestinal cells in the model group were disorderly arranged, the intestinal villi were incompletely broken and sparsely spaced, the goblet cells were significantly reduced and unevenly distributed, accompanied by neutrophil exudation, and the average optical density of occludin protein was reduced ($P < 0.01$). As compared with the model group, the intestinal villi of the rats in the high-dose Qiwei Baizhu San group and the metformin group were more arranged neatly and completely, the number of colonic goblet cells was restored to varying degrees, the neutrophil exudation was reduced, and the average optical density of occludin protein was increased to varying degrees ($P < 0.01$). The results of Western blot showed that as compared with the model group, the protein expressions of ZO-1 and occludin in the ileum tissues of rats in the high-dose Qiwei Baizhu San group and the metformin group increased ($P < 0.01$), and the protein expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) decreased ($P < 0.01$). **[Conclusion]** Qiwei Baizhu San can up-regulate the expression of tight junction protein in the intestine, promote the repair of intestinal mucosal mechanical barrier, maintain the integrity of tight junctions, reduce the level of serum LPS, inhibit the TLR4/NF- κ B pathway, and reduce the release of IL-6, TNF- α , and other inflammatory factors, thus reducing the inflammatory reaction and improving insulin resistance of the body.

Keywords: Qiwei Baizhu San; insulin resistance; intestinal barrier; inflammation; TLR4/NF- κ B

2015–2017 年流行病学调查显示,我国 18 岁及以上人群糖尿病患病率为 11.2%^[1], 给我国医疗系统带来沉重的负担。糖尿病的发病机制复杂, 近年来研究^[2]发现肠道菌群在糖尿病的发生、发展中发挥重要作用, 尤其是肠道-慢性炎

症^[3-4]是其关键。肠道屏障损伤导致内毒素血症和炎症反应, 干扰胰岛素在体内的信号传导, 从而引发胰岛素抵抗和糖尿病^[5]。

七味白术散由人参、白术、葛根、茯苓、木香、藿香、炙甘草组成。方中配伍有补有运、

有升有降,可用于治疗气阴两虚所致的消渴病,研究发现^[6-8],七味白术散可通过调节肠道菌群减轻胰岛素抵抗,改善临床症状;同时可抑制糖尿病大鼠氧化应激反应,改善血糖水平。本研究通过观察七味白术散对糖尿病大鼠肠道屏障和 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响,阐明其改善胰岛素抵抗的作用机制,以期为糖尿病的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。许可证号为 SCXK(京)2016-0006。自由饮食饮水,室温控制在 20–24 °C,相对湿度控制在 40%–70%,12 h 光照、12 h 黑暗,昼夜循环。本研究所涉及的动物实验操作均由山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准(AWE-2019-029)。

1.2 药物

七味白术散免煎颗粒,成分为葛根、党参、炒白术、藿香、木香、甘草和茯苓(质量比分别为 1.5:0.7:1.5:1.5:0.6:0.3:1.5),江阴天江药业有限公司,入库批号分别为:20040323、20041033、20050453、19100533、20031443、20040403 及 20060653。盐酸二甲双胍(0.5 g/片),中美上海施贵宝制药有限公司。

1.3 主要试剂和仪器

标准饲料:41.47%的碳水化合物、14.42%的脂肪、21.06%的蛋白质。高糖高脂饲料:1%胆固醇、0.5%胆酸盐、15%猪油、20%蔗糖、63.5%基础饲料。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),济南贝塔生物科技有限公司;ZO-1 单克隆抗体、occludin 单克隆抗体、TLR4 单克隆抗体、NF- κ B 单克隆抗体、 β -actin 单克隆抗体、goat anti-rabbit IgG,武汉贝因莱生物科技有限

公司;IL-6、TNF- α 酶联免疫试剂盒,上海创祥生物科技有限公司;BCA 试剂盒,金克隆(北京)生物技术有限公司。泰尔茂血糖仪,泰尔茂(中国)投资有限公司;全自动生化分析仪,宁波瑞源生物科技有限公司。

1.4 造模与分组

参照相关研究制备糖尿病大鼠模型^[9]:采用随机数字表法将大鼠分为空白组($n=10$)和造模组($n=50$)。空白组予标准大鼠饲料 4 周,造模组予高糖高脂饲料 4 周。造模组大鼠高糖高脂饲料喂养 4 周后禁食不禁水 12 h,称重,予链脲佐菌素(溶于 0.1 mol/L 的枸橼酸缓冲液中,配制成 1%的溶液,按 30 mg/kg 一次性腹腔注射),空白组注射等体积的缓冲液。造模 1 周后,大鼠禁食不禁水 8 h,采用尾静脉采血测空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L 者确定为糖尿病大鼠。50 只造模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组、二甲双胍组、七味白术散高、中、低剂量组,每组 10 只。

1.5 实验给药

按照人和动物间体表面积折算的等效剂量比值表换算,七味白术散低、中、高剂量组按照 0.578、1.157、2.314 g/(kg·d)给药,二甲双胍组剂量按双胍 0.150 g/(kg·d)给药。模型组和空白组均给予等量生理盐水灌胃。根据糖尿病饮食控制原则,所有大鼠均给予常规饲料喂养。各组大鼠均自由饮水,共灌胃 4 周。

1.6 观察指标及方法

记录大鼠一般生存情况,实验结束后,各组大鼠隔夜空腹称重,以 10%水合氯醛(0.03 g/kg)腹腔麻醉,经腹主动脉取血,分离血清,置于 -80 °C 冰箱保存备用。各组大鼠迅速取出 1.5 cm 中段结肠组织,置入 4%多聚甲醛中固定保存,用于苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和免疫组化检测。各组大鼠迅速取出回肠组织,

置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.6.1 一般状况

实验期间观察大鼠精神状态、饮食及活动情况、毛色、饮水量及尿量等。

1.6.2 空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)和空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)的测定

取大鼠血清样本, 采用全自动生化分析仪测 FBG 和 FINS。

1.6.3 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的测定

取大鼠血清样本, 采用全自动生化分析仪测 LPS; 严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作, 检测 IL-6 和 TNF- α 含量。

1.6.4 结肠组织切片病理学观察

取大鼠结肠组织于 4% 的多聚甲醛溶液中固定后, 用蒸馏水洗涤组织, 放入 70% 乙醇中过夜; 经脱水、透明、石蜡包埋、切片和封片后, 进行 HE 染色, 光学显微镜下检查大鼠回肠组织病理形态学变化。

1.6.5 免疫组化法检测结肠组织 occludin 蛋白表达

取固定后结肠组织进行石蜡包埋, 切片, 常规脱蜡, 阻断内源性过氧化物酶, 血清封闭; 滴加一抗至切片, 4°C 孵育过夜; 滴加二抗至切片, 室温孵育 1 h; 应用二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 液进行显色, 完成后自来水冲洗, 终止反应; 复染细胞核, 脱水封片; 光镜下观察大鼠骨骼肌组织中蛋白表达情况, 棕黄色为阳性染色; 通过 Image J 分析并计算各组的平均光密度值。

1.6.6 Western blotting 法检测回肠组织 ZO-1、occludin、TLR4、NF- κ B 蛋白表达量

采用蛋白免疫印迹(Western blotting)法检测各组大鼠回肠组织 ZO-1、occludin、TLR4、NF- κ B 蛋白表达量。用 RIPA 裂解液提取肠道中

的蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取 20 μg 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜至聚偏氟丙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭后, 分别滴加一抗 ZO-1 (稀释比 1:1 000)、occludin (稀释比 1:1 000)、TLR4 (稀释比 1:1 000)、NF- κ B (稀释比 1:1 000)、 β -actin (稀释比 1:1 000), 4°C 孵育, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤后添加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 二抗(稀释比 1:10 000), 室温下孵育 1 h, PBS 洗涤后使用 ECL 化学发光法显影印迹, 通过 TANON GIS 软件读取相关条带灰度值。以 β -actin 为内参计算目的蛋白条带的相对比值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。实验数据以平均数 \pm 标准差表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 各组大鼠治疗前后一般情况观察

实验结束时, 模型组大鼠死亡 2 只, 七味白术散低剂量组死亡 1 只, 其余各组大鼠无死亡。分析大鼠死亡原因: (1) 血糖过高引起各脏器功能衰竭; (2) 严重高血糖导致酮症酸中毒。

空白组大鼠精神状态好, 活动自如, 毛色白有光泽, 体型肥胖。模型组大鼠活动少, 精神萎靡, 毛色无光泽, 伴有多饮、多食和消瘦等症状。七味白术散低、中、高剂量组与模型组比较, 各用药组大鼠上述症状均有不同程度的改善。二甲双胍组大鼠精神较模型组大鼠好转毛色无光泽, 消瘦, 多饮及多食症状不明显。

2.2 各组大鼠血清 FBG、FINS 的比较

与空白组比较, 造模后的各组大鼠空腹血糖值 $\geq 11.1 \text{ mmol/L}$, 差异有统计学意义($P < 0.01$),

说明模型组及各用药组大鼠均存在不同程度的胰岛素抵抗,符合糖尿病大鼠模型条件。与模型组比较,七味白术散低、中剂量组大鼠 FBG 有所下降,但差异无统计学意义($P>0.05$);七味白术散高剂量组和二甲双胍组大鼠 FBG 均明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),而且七味白术散高剂量组与二甲双胍组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,七味白术散低、中、高剂量组和二甲双胍组大鼠 FINS 均明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$),而且七味白术散高剂量组与二甲双胍组比较差异无统计学意义

($P>0.05$)。见表 1。

2.3 各组大鼠血清 LPS、IL-6、TNF- α 水平比较

与空白组比较,糖尿病模型组及各用药组大鼠 LPS、IL-6、TNF- α 的水平均升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与糖尿病模型组比较,七味白术散低、中、高剂量组及二甲双胍组大鼠 LPS、IL-6、TNF- α 的水平均下降,差异有统计学意义($P<0.01$),而且七味白术散高剂量组与二甲双胍组比较,差异无统计学意义($P>0.05$) (表 2)。

表 1 各组大鼠 FBG、FINS 水平比较

Table 1 Comparison of FBG and FINS levels in rats of each group

组别 Group	动物数 Number of rat	FBG (mol/L)	FINS (mmol/L)
空白组 Normal control group	10	7.13 \pm 1.78	12.52 \pm 2.14
模型组 Model group	8	21.69 \pm 4.61**	28.68 \pm 2.07**
七味白术散组(低) Qiwei Baizhu San group (low)	9	17.97 \pm 1.85**	20.71 \pm 1.89***
七味白术散组(中) Qiwei Baizhu San group (medium)	10	17.51 \pm 3.18**	21.77 \pm 1.96***
七味白术散组(高) Qiwei Baizhu San group (high)	10	14.85 \pm 1.94***	20.02 \pm 1.60***
二甲双胍组 Metformin group	10	13.66 \pm 1.22***	17.90 \pm 1.07***
<i>F</i>		33.72	76.38
<i>P</i>		0.00	0.00

与空白组比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与模型组比较, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$. 下同

Compared with the blank group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; Compare with the model group, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$. The same below.

表 2 各组大鼠 LPS、IL-6、TNF- α 水平比较

Table 2 Comparison of LPS, IL-6 and TNF- α levels in rats of each group

组别 Group	动物数 Number of rat	LPS (EU/L)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
空白组 Normal control group	10	228.57 \pm 21.56	87.99 \pm 7.95	105.71 \pm 9.94
模型组 Model group	8	707.72 \pm 60.94**	187.06 \pm 11.70**	263.42 \pm 21.38**
七味白术散组(低) Qiwei Baizhu San group (low)	9	623.10 \pm 18.43***	166.32 \pm 8.07***	209.59 \pm 13.15***
七味白术散组(中) Qiwei Baizhu San group (medium)	10	506.31 \pm 31.54***	126.37 \pm 7.08***	172.28 \pm 7.73***
七味白术散组(高) Qiwei Baizhu San group (high)	10	363.53 \pm 33.31***	105.94 \pm 8.06***	133.83 \pm 12.00***
二甲双胍组 Metformin group	10	283.64 \pm 47.27***	102.82 \pm 6.98***	133.19 \pm 9.87***
<i>F</i>		224.71	144.78	155.13
<i>P</i>		0.00	0.00	0.00

2.4 各组大鼠结肠组织切片病理学观察

与空白组比较, 糖尿病模型组大鼠可观察到肠道细胞排列紊乱, 肠绒毛断裂不全且间隔稀疏, 杯状细胞明显减少且分布不均, 同时伴有中性粒细胞渗出, 说明糖尿病大鼠结肠组织受损, 可能存在炎症反应; 与糖尿病模型组相比, 七味白术散高剂量组及二甲双胍大鼠的肠绒毛排列较为整齐, 完整性较好, 结肠杯状细胞数量均有不同程度的恢复, 中性粒细胞渗出减少(图 1)。

2.5 各组大鼠结肠组织 occludin 蛋白的定位表达水平

Occludin 蛋白定位于细胞膜, 与空白组比较, 糖尿病模型组大鼠 occludin 蛋白的平均光密度值显著降低($P<0.05$), 而且 occludin 蛋白分布零星, 存在多处断裂, 连续性和完整性较差。与糖尿病模型组比较, 七味白术散高剂量组及二甲双胍大鼠的 occludin 蛋白平均光密度值更高($P<0.05$), occludin 蛋白分布的连续性和完整

性均有所改善(图 2 和表 3)。

2.6 各组大鼠回肠组织 ZO-1、occludin、TLR4、NF- κ B 蛋白表达量比较

与空白组比较, 糖尿病模型组及各用药组大鼠肠道组织 ZO-1、occludin 蛋白表达量均降低, 差异有统计学意义($P<0.01$), TLR4、NF- κ B 蛋白表达量均升高, 差异有统计学意义($P<0.01$); 与糖尿病模型组比较, 七味白术散高剂量组及二甲双胍组大鼠回肠组织 ZO-1、occludin 蛋白表达量均升高, 差异有统计学意义($P<0.01$), TLR4、NF- κ B 蛋白表达量均降低, 差异有统计学意义($P<0.01$) (图 3 和表 4)。

3 讨论与结论

3.1 LPS 始动的 TLR4/NF- κ B 信号通路是糖尿病发病的重要机制

糖尿病是一种以低水平炎症状态为特征的代谢性疾病, 这种炎症反应以增加炎症因子释

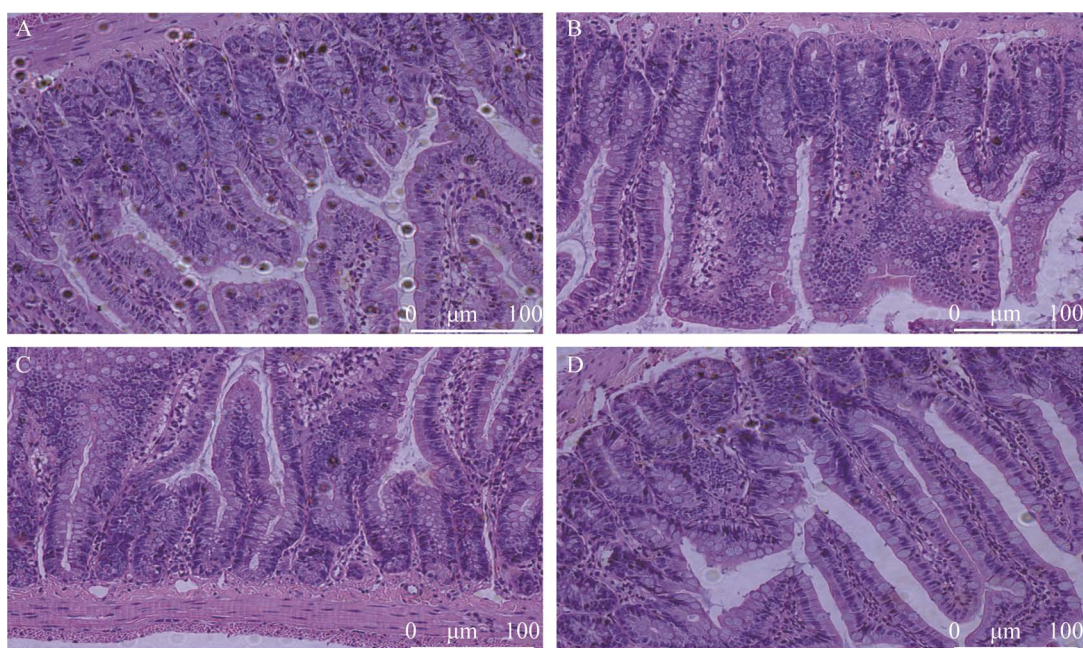


图 1 大鼠结肠组织 HE 染色切片 A: 空白组. B: 模型组. C: 七味白术散组(高). D: 二甲双胍组
Figure 1 HE staining sections of colon tissues of rats. A: Blank group. B: Model group. C: Qiwei Baizhu San group (high). D: Metformin group.

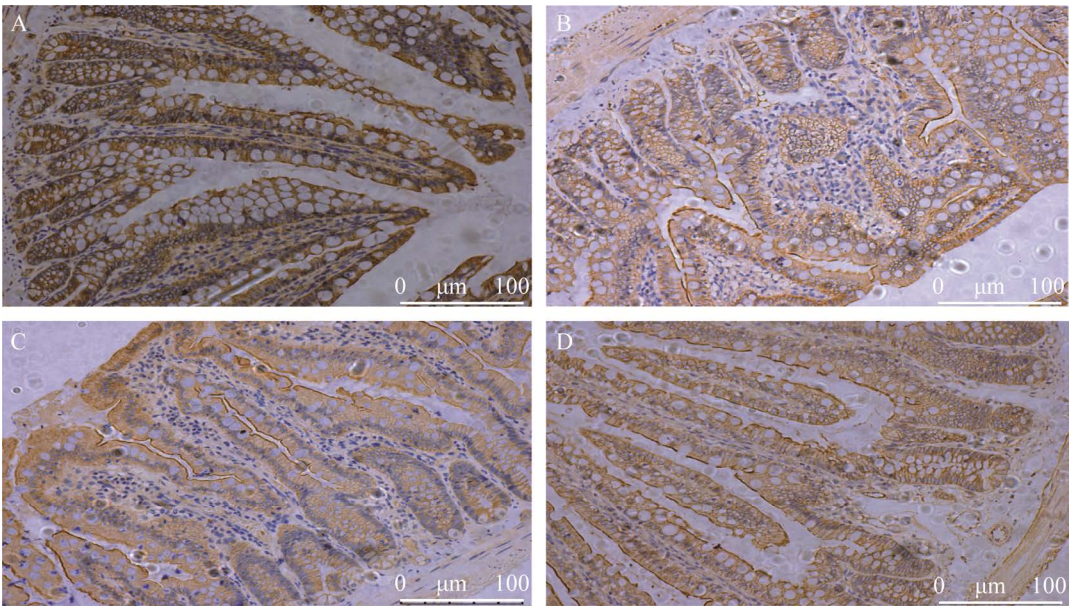


图 2 各组大鼠结肠蛋白免疫组化结果 A: 空白组. B: 模型组. C: 七味白术散组(高). D: 二甲双胍组
Figure 2 Immunohistochemical results of protein in colon of rats in each group. A: Blank group. B: Model group. C: Qiwei Baizhu San group (high). D: Metformin group.

放和炎症细胞浸润为特点。LPS 来源于革兰阴性菌细胞壁外层，是一种重要的炎症刺激物，被认为是引起低水平炎症的始动因素。Burcelin 等研究提示，LPS 是连接肠道菌群、内毒素血症及慢性炎症的关键桥梁，是导致糖尿病发生

的重要机制^[10]。循环中的 LPS 在 CD14 协助下与 CD14-Toll 样受体结合，激活 TLR-4，进而激活转录因子 NF-κB，启动炎症因子如 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 等的表达，引起一系列非特异

表 3 各组大鼠结肠组织中 occludin 蛋白平均光密度值比较

Table 3 Expression of average optical density values of occludin protein in colon tissue of rats in each group

组别 Group	大鼠数 Number of rat	Occludin
空白组 Normal control group	10	0.52±0.01
模型组 Model group	8	0.26±0.03*
七味白术散(高) Qiwei Baizhu San group (high)	10	0.37±0.02*#
二甲双胍组 Metformin group	10	0.33±0.01*#
P		0.00

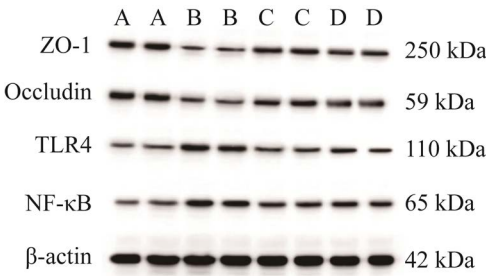


图 3 Western blotting 检测大鼠肠道组织 ZO-1、occludin、TLR4、NF-κB 蛋白表达 A: 空白组. B: 模型组. C: 七味白术散组(高). D: 二甲双胍组
Figure 3 Western blotting was used to detect the expression of ZO-1, occludin, TLR4 and NF-κB in rat intestinal tissue. A: Blank group. B: Model group. C: Qiwei Baizhu powder group (high). D: Metformin group.

表 4 各组大鼠 ZO-1、occludin、TLR4、NF- κ B 蛋白表达量比较Table 4 Expression of ZO-1, occludin, TLR4 and NF- κ B in rats of each group

组别 Group	动物数 Number of rat	ZO-1	Occludin	TLR4	NF- κ B
空白组 Normal control group	10	0.60 \pm 0.01	0.68 \pm 0.03	0.31 \pm 0.01	0.31 \pm 0.02
模型组 Model group	8	0.32 \pm 0.01**	0.41 \pm 0.01**	0.56 \pm 0.01**	0.60 \pm 0.01**
七味白术散(高) Qiwei Baizhu San group (high)	10	0.53 \pm 0.01***	0.56 \pm 0.02***	0.36 \pm 0.02***	0.46 \pm 0.01***
二甲双胍组 Metformin group	10	0.45 \pm 0.03***	0.52 \pm 0.01***	0.46 \pm 0.03***	0.53 \pm 0.03***
<i>F</i>		185.65	96.81	133.95	148.60
<i>P</i>		0.00	0.00	0.00	0.00

性炎症反应, 导致胰岛素抵抗的发生^[11]。本研究结果提示, 与空白组对比, 糖尿病大鼠 LPS、IL-6、TNF- α 的水平均升高, 肠道组织 TLR4、NF- κ B 蛋白表达量均增加。

3.2 肠道屏障功能与糖尿病的发生密切相关

肠道屏障主要由肠道上皮细胞和上皮细胞间紧密连接蛋白组成。细胞间紧密连接的结构成分可分为整合膜蛋白(occludin、claudins)、连接复合蛋白(ZO-1、ZO-2 和 ZO-3)和细胞骨架结构(微管、中间丝和微丝), 其中 occludin 和 ZO-1 因分布广泛, 常用作检测肠道屏障功能和上皮通透性的重要标志物^[12]。正常情况下, 完整的肠道屏障允许营养物质有效跨细胞运输, 同时防止细菌产物通过屏障吸收入血。但在高脂饮食、肠道菌群紊乱和肠道炎症的诱导下, 肠上皮间隙过多积累的脂肪可以破坏肠上皮间的 occludin 和 ZO-1 紧密连接结构, 导致 LPS 大量入血^[13]。本研究结果显示, 与空白组比较, 糖尿病大鼠肠道组织 ZO-1、occludin 蛋白表达量降低。

3.3 七味白术散能下调 TLR4/NF- κ B 信号通路, 保护肠道屏障功能

糖尿病属于中医学“消渴病”范畴, 关于消

渴产生的原因, 《景岳全书》^[14]说: “消渴病, 其为病之肇端, 皆膏粱肥甘之变, 皆富贵人病之而贫贱者少有也”。说明饮食不节可致消渴。从消渴产生的疾病机理来看, 虽然消渴与五脏虚损均有关系, 但脾虚在消渴的发病中占有重要位置。《灵枢·五变篇》云: “五脏皆柔弱者, 善病消瘴”; 《灵枢·本脏篇》曰: “脾脆, 则善病消瘴易伤”^[15]。赵献可《医贯·消渴论》^[16]: “脾胃既虚, 则不能敷布津液故渴”。七味白术散治脾胃久虚, 呕吐泄泻, 频作不止, 精液苦竭, 烦渴躁, 但欲饮水, 乳食不进, 羸瘦困劣, 被清代医家列为治疗消渴病的常用方^[17]。多项研究证实, 七味白术散可调整肠道微生态, 减轻胰岛素抵抗^[6-8], 降低血糖水平及改善临床症状^[18]。七味白术散干预后, 糖尿病大鼠 LPS、IL-6、TNF- α 的水平降低, TLR4、NF- κ B 蛋白表达量降低, 结肠组织 ZO-1、occludin 蛋白表达量增加。说明七味白术散通过上调肠道紧密连接蛋白(ZO-1, occludin)的表达, 修复肠道屏障功能, 阻止过多的 LPS 入血, 下调 TLR4/NF- κ B 信号通路, 减少 IL-6、TNF- α 等炎症因子的释放, 从而减轻机体炎症反应, 降低血糖水平。

3.4 小结

糖尿病的发生发展与营养过剩、肠生态失衡、氧化应激、炎症及前炎症反应、线粒体功能障碍等有关,但这些研究往往局限于传统的肝脏、胰腺、骨骼肌、脂肪等单一组织中,对整个个体复杂系统的结构和功能重视不足。对于中药作用机制的探讨,不能局限于单一组织或通路,而应把握全局,从机体健康变化的整体出发。随着研究的不断深入,肠道微生态、脑肠肽、脑肠互动已经成为糖尿病发病机制研究的热点。七味白术散是否通过更深层次调控肠道微生态、肠道屏障功能及炎症反应,从而达到改善胰岛素抵抗,降低血糖水平的目的,将在后期研究中进行深入探讨。

REFERENCES

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南[J]. 2020年版. 中华内分泌代谢杂志, 2021, 37(4): 311-398.
Chinese Diabetes Society. Chinese medical association. Guideline for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus in China[J]. 2020 Edition. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2021, 37(4): 311-398 (in Chinese).
- [2] ANHÊ FF, VARIN TV, LE BARZ M, DESJARDINS Y, LEVY E, ROY D, MARETTE A. Gut microbiota dysbiosis in obesity-linked metabolic diseases and prebiotic potential of polyphenol-rich extracts[J]. Current Obesity Reports, 2015, 4(4): 389-400.
- [3] 韩煦, 姚政, 李俊燕, 陆灏. 肠道免疫-慢性炎症与胰岛素抵抗及中医药治疗研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2620-2623.
HAN X, YAO Z, LI JY, LU H. Research progress on intestinal immunity-chronic inflammation, insulin resistance and traditional Chinese medicine treatment[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(6): 2620-2623 (in Chinese).
- [4] 赵凡, 李春保. 肠道菌 *Akkermansia muciniphila* 的特性及其与机体健康的关系[J]. 微生物学通报, 2017, 44(6): 1458-1463.
ZHAO F, LI CB. Characteristics of intestinal bacterium *Akkermansia muciniphila* and the association with host health[J]. Microbiology China, 2017, 44(6): 1458-1463 (in Chinese).
- [5] CARICILLI AM, SAAD MJA. The role of gut microbiota on insulin resistance[J]. Nutrients, 2013, 5(3): 829-851.
- [6] 林伟英. 七味白术散加减辅助治疗气阴两虚型糖尿病的效果分析[J]. 糖尿病新世界, 2022, 25(2): 96-98, 110.
LIN WY. Analysis of the effect of qiweibaizhu powder modified and subtracted as an adjuvant treatment on diabetes with deficiency of both qi and Yin[J]. Diabetes New World, 2022, 25(2): 96-98, 110 (in Chinese).
- [7] 刘玲, 陆西宛, 何珂, 朱丽华. 七味白术散对脾虚湿困型肥胖症患者糖脂代谢及肠道菌群的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(23): 2082-2086.
LIU L, LU XW, HE K, ZHU LH. Effects of Qiwei Baizhu Powder on glucose and lipid metabolism and intestinal flora in obesity patients of spleen deficiency and dampness disturbing type[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 61(23): 2082-2086 (in Chinese).
- [8] 杨庆堂, 华新宇, 周淑娟. 七味白术散加减对糖尿病模型大鼠氧化应激的干预作用[J]. 中医学报, 2019, 34(11): 2408-2411.
YANG QT, HUA XY, ZHOU SJ. Effect of Qiwei Baizhu Powder on oxidative stress in diabetic rats[J]. Acta Chinese Medicine, 2019, 34(11): 2408-2411 (in Chinese).
- [9] 王航利, 张梦迪, 黄绳武. 益气补阴方对气阴两虚证糖尿病大鼠的降血糖作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(8): 912-917.
WANG HL, ZHANG MD, HUANG SW. Hypoglycemic effect of Yiqi Buyin formula on diabetic rats with qi and Yin deficiency[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2020, 31(8): 912-917 (in Chinese).
- [10] BURCELIN R, GARIDOU L, POMIÉ C. Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic diseases[J]. Seminars in Immunology, 2012, 24(1): 67-74.
- [11] MOHAMMAD S, THIEMERMANN C. Role of

- metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 11: 594150.
- [12] PARADIS T, BÈGUE H, BASMACIYAN L, DALLE F, BON F. Tight junctions as a key for pathogens invasion in intestinal epithelial cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(5): 2506.
- [13] HU SW, WANG JH, WANG JF, YANG HC, YAN XJ, SU L. Fucoidan from *Acaudina molpadioides* improves insulin resistance by altering gut microbiota dysfunction[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 57: 59-67.
- [14] 张介宾. 景岳全书[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1994: 226.
- ZHANG JB. *Jing Yue's Complete Works*[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 1994: 226 (in Chinese).
- [15] 田代华. 灵枢经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 80-82.
- TIAN DH. *Lingshu Scripture*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 80-82 (in Chinese).
- [16] 赵献可. 医贯[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 64.
- ZHANG XK. *Yiguan*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982: 64 (in Chinese).
- [17] 吴谦. 医宗金鉴[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1962: 9.
- WU Q. *Yizong Jinjian*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1962: 9 (in Chinese).
- [18] 牛延峰. 七味白术散加减辅助治疗 84 例 2 型糖尿病的疗效分析[J]. *中医临床研究*, 2014, 6(31): 59-60.
- NIU YF. An effective analysis of treating 84 cases of diabetes II with Qiwei Baizhu San[J]. *Clinical Journal of Chinese Medicine*, 2014, 6(31): 59-60 (in Chinese).