

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.04.23

功能性腹泻脾虚证与肠黏膜屏障关系探讨

李 晶¹, 王垂杰², 李玉锋², 孟高达¹, 曹晓娇¹

(¹ 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110000;

² 辽宁中医药大学附属医院 脾胃病科, 辽宁 沈阳 110000)

关键词: 功能性腹泻; 脾虚证; 肠黏膜屏障

中图分类号: R574.62

文献标志码: A

文章编号: 1671-038X(2015)04-0299-04

功能性腹泻是指持续或反复排稀便(至少 75% 的排便不伴有腹痛的稀便)诊断前症状出现至少 6 个月,近 3 个月符合以上诊断标准,患者缺乏能够解释腹泻症状的器质性病因,也不符合 IBS 的诊断标准^[1]。近年来功能性腹泻发病呈不断上升趋势,据统计亚洲人约 4.5% 有功能性腹泻症状。功能性腹泻发病机制复杂,往往涉及精神因素、社会因素、饮食结构、肠道微生态系统、胃肠动力及内脏感觉多个方面^[2]。从肠黏膜屏障角度探讨功能性腹泻脾虚证发病机理及中医药辨证论治功能性腹泻脾虚证的机理有待进一步研究。

1 功能性腹泻与脾虚证

中医将由消化器官发生功能或器质性病变导致的腹泻统称为泄泻,功能性腹泻属泄泻范畴。祖国医学对泄泻早有认识,认为其病因与感受外邪、饮食不节、精神因素和脾胃虚弱有关,而脾胃虚弱是泄泻的主要病因。《景岳全书·泄泻》中记载:“泄泻之本,无不由于脾胃”,“久泻无火,多因脾胃虚弱也”。《素文·脏器法时论》曰:“脾病者,虚则腹满腹鸣,飧泄食不化”。《雷氏时病论》曰:“寒气内袭于脾,脾胃受寒则阳虚,虚则不思运用,清阳之气不主上升,反而下陷而便泻”。对于泄泻病机的认识,多认为与“脾虚湿胜”有关。《素问·阴阳应象大论》曰:“湿胜则濡泻”。《李中梓医案必读》曰:“统而论之,脾土强者,自能胜湿,故曰无湿不成泻,若土虚不能制湿,则风寒与热皆得干之而为病”,可见脾胃虚弱是泄泻发生的关键病机。胃为水谷之海而脾主运化,脾健胃和则水谷腐熟而化,气化血以行营卫,若长期饮食不节,饥饱失调,或劳倦内伤,或久病体虚,或素体脾胃虚弱,中焦运化障碍,气机升降失常,不能受纳水谷、运化精微,聚水成湿,积谷为滞,湿滞内生,清浊不分,混杂而下遂成泄泻,所以泄泻病机中以脾胃虚弱

最为关键。对于泄泻的治疗,中医有利湿清热、去积补脾、温肾固涩等治法,但对于脾虚久泻等慢性腹泻则主要以健脾利湿、温肾为治疗大法。《李中梓医宗必读》曰:“土性无湿,水邪不滥,故泻皆成于土湿,湿皆本于脾虚,仓禀得职,水谷善分,虚而不培,湿淫转甚,经云:虚则补之。”中医治疗泄泻,以辨证论治为原则,将运脾化湿作为其治疗大法,针对病因,疗效显著^[3]。祖国医学对于泄泻的病因、病机、治疗等的认识有很大的指导意义。《中药新药临床研究指导原则》中医脾虚证诊断标准:主症为大便异常(溏、烂、先硬后溏或时溏时硬),食欲不振,食后或午后腹胀,神疲乏力,体倦懒言。次症为面色萎黄,喜热饮,口泛清涎,腹痛绵绵,喜温喜按,肠鸣腹胀,脘闷,恶心呕吐,久咳,痰多清稀,小便清长,舌质淡体胖或有齿痕、苔薄白,脉沉迟或细弱。脾虚证的诊断中包括脾虚泄泻和以脾虚为主的消化不良症状。功能性腹泻发病时间长,症状时轻时重,无明显腹痛,无明显器质性原因与中医的脾虚泄泻证相似。其病机是在内外因素共同作用下使脾肝肾三脏功能失调而发病,脾主运化之功能受损在功能性腹泻病机中起着重要作用,脾之功能受损则湿从内生,升降失常,水谷并走于下而为泻;病位在肠,主病之脏属脾,脾虚失运为本,湿蕴难化为标,同时与肝、肾密切相关^[4]。中医辨证分型可将功能性腹泻分为寒湿困脾型、肝郁脾虚型、脾胃虚弱型、脾肾两虚型^[5],可见脾虚始终贯穿在功能性腹泻的发病机理当中,是功能性腹泻重要的病因病机,也是辨证论治功能性腹泻的重要出发点。因此,运用“脾失健运,脾虚泄泻”理论研究探讨功能性腹泻的病因病机,同时运用“从脾论治”功能性腹泻的治疗大法探讨功能性腹泻的治疗机理,以方验证,有助于揭示功能性腹泻的发病机理,更好地指导治疗。

2 脾虚证肠黏膜屏障变化

2.1 脾虚证肠黏膜机械屏障变化

肠道处在机体与外界接触的第一线,是病原微生物侵入体内的主要通道,肠黏膜屏障是阻止机体

收稿日期:2014-11-28

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(No: 2013 CB531703)

通讯作者:王垂杰, E-mail:lnzyxhk@163.com

受病原微生物的感染、调节新陈代谢、维持内外环境平衡的关键,也是细胞旁路途径的第一道防线^[6-7]。不同类型的腹泻发生时,肠道黏膜屏障发生着不同的变化。牡丹等^[8]发现抗生素相关腹泻大鼠存在着肠道菌群的失调和肠黏膜 SIgA 水平的降低。曾娟^[9]发现部分腹泻型 IBS 患者结肠黏膜的紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的基因及蛋白表达水平下降,但 ZO-1 和 Occludin 蛋白的分布部位并无改变。肠黏膜屏障由三部分组成:肠道正常的微生物群形成的生物菌膜屏障,完整的肠黏膜结构组成的机械屏障,肠壁免疫细胞和肠腔中的免疫球蛋白(以 SIgA 为主)组成的免疫屏障。机械屏障是肠道最重要的一道屏障,其由完整的肠上皮细胞和相邻肠上皮细胞之间的连接构成,调控着水和溶质的跨上皮转运,紧密连接是细胞间最重要的连接方式。紧密连接主要由 4 种跨膜蛋白组成:Occludin、Claudins、Junctional adhesion molecules (JAMs) 和 tricellulin。它们与连接复合物蛋白(ZO-1、ZO-2、ZO-3、p130、7 H6、Symplekin)、细胞骨架结构(微管、中丝、微丝)共同构成紧密连接复合物^[10]。目前认为跨膜蛋白中起主要作用的是 Occludin 和 Claudin 蛋白,相邻上皮细胞通过这些蛋白质进行连接,封闭细胞间隙,而 Occludin 蛋白在调节细胞间的通透性中具有重要作用。Furuse 等^[11]的研究发现用 Occludin 转染 L-纤维母细胞(缺乏紧密链接)后,相邻细胞之间可以形成紧密链接样纤维。另一个重要的紧密连接蛋白 Claudins 聚合于细胞质膜上,其末端可与内层的蛋白如 ZO-1 和 ZO-2 等分子连接,在信号转导中发挥重要作用。跨膜蛋白 Occludin 与 Claudins 的组合是影响紧密连接通透性的主要因素,直线纤维型 Claudins 可形成广泛的网络结构,短条状 Occludin 插入到该网络中形成复杂的纤维网络,该网络结构处在动态的组装和去组装的状态,从而调节不同物质的选择性通透^[12]。连接复合物蛋白 ZO-1 属于膜相关鸟苷酸激酶家族^[13-14],有 ZO-1、ZO-2、ZO-3 三种复合体组成,通过其 PDZ 区与其他许多细胞连接蛋白 Occludin、JAMs、肌动蛋白等相互连接、相互作用^[15-16]。因此,多数情况下只要 ZO-1 受到破坏,紧密连接的功能多随之变化,故 ZO-1 常被用来作为观察各种组织紧密连接屏障功能和通透性功能的指标,如血脑屏障、肠上皮细胞^[17-18]等。相邻细胞的质膜紧密融合,质膜间的缝隙消失,在连续的细胞层中建立扩散屏障并起着封闭细胞间隙的作用,物质要穿过具有这种连接的细胞层,只有靠扩散通过细胞膜和细胞质,因此上皮细胞可以对穿过上皮细胞层的物质进行调控,有效地阻止肠腔内细

菌、毒素及炎性递质等物质的旁细胞转运,维持肠黏膜上皮屏障功能的完整^[19],这也是紧密连接的一个重要生理功能。紧密连接的另一个重要功能是对其所围绕的细胞造成膜质的区域性差异,将细胞分为不同的液性空间,即所谓的紧密连接线^[20],可限制细胞的不同液性空间脂质和完整膜蛋白的自由扩散,使这些区域可进行专一的功能活动,如离子的定向转运和大分子物质的吸收^[21]等。总之紧密连接能维持上皮层两侧的物质成分差异、保证营养物质吸收、防止肠腔内有毒物质从肠腔渗漏到周围组织中,保证了机体的选择性吸收机制^[22],保证了肠黏膜机械屏障功能的正常发挥^[23],紧密连接的破坏可导致机体水电解质及某些大分子物质代谢障碍、渗透压改变、肠黏膜屏障功能障碍,从而导致腹泻的发生。

许多临床与实验研究显示脾虚证胃肠黏膜机械屏障发生改变。王孟清等^[24]发现脾虚泄泻大鼠小肠黏膜超微结构明显受损,微绒毛变稀疏及消失脱落,绒毛顶部上皮细胞结构变形,细胞间间隙增宽,内质网、线粒体不同程度改变,胞浆内出现空泡。李茹柳^[25]发现透射电镜下脾虚证溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜未见细胞连接复合体,上皮包膜缺损,细胞器减少,细胞质液化溶解,线粒体肿胀其内基质较淡,肠上皮细胞紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin 发生改变,经白术黄芪方治疗后大鼠结肠黏膜上皮表面的微绒毛基本完整,细胞间可见连接复合体,细胞间隙未见增宽,细胞内线粒体较丰富,形态较规整。薛晓倩^[26]发现脾虚湿阻证模型组大鼠回肠黏膜 Zo-1 mRNA 表达减少,健脾化湿液各剂量组表达均依次增加,提示化湿液对肠上皮屏障的保护作用主要通过提高肠道 Zo-1 mRNA 而实现。

2.2 脾虚证肠黏膜免疫屏障变化

肠黏膜免疫屏障是区别于动物整体免疫系统的局部免疫,主要是由摄取、递呈、处理抗原的诱导部位免疫细胞和发生免疫反应的效应部位免疫细胞共同发挥免疫功能构成的独立免疫体系。其在抗原的刺激下产生局部的免疫反应,中和抗原物质,以避免机体本身受到损害。肠黏膜免疫系统分为体液免疫和细胞免疫。体液免疫是通过浆细胞分泌 IgA 抗体,并与抗原发生特异性结合来清除抗原;细胞免疫则是通过效应 T 细胞使靶细胞溶解死亡。IgA 有两种类型,即血清型和分泌型,其中分泌型免疫球蛋白 A(secreted immunoglobulin A)SIgA 是胃肠道和黏膜表面主要免疫球蛋白,对消化道黏膜防御起着重要作用,是抵御病菌在肠道黏膜粘附和定植的第一道防线^[27-30]。细胞免疫与体液免疫紧密联系,

肠黏膜固有层中初始 T 细胞活化为大量的 Th 细胞,Th 细胞可分为 Th1 和 Th2 两个功能亚群,Th 细胞的活性对整个免疫应答具有调节作用。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 和 IL-12 等细胞因子,促进细胞免疫应答;Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10 等细胞因子,促进体液免疫应答。Cazac 等^[31]通过敲除 TGF- β 受体基因证明了 TGF- β 在 B 细胞产生 IgA 中的重要作用。Th2 还通过 IL-5、IL-6 间接地调节肠黏膜 IgA 的表达。Th1 细胞产生的 IFN- γ ,可抑制 Th2 增殖和功能,而 Th2 产生的 IL-10 可抑制 Th1 分泌 IL-2 和 IFN- γ ,同时 INF- γ 、IL-10 也在一定程度上影响紧密连接蛋白的表达,保证小肠上皮完整。因此,肠黏膜免疫与 Th 细胞的成熟与分化是分不开的,T 淋巴细胞亚群在免疫调节中既互相促进又互相制约,起着十分微妙的作用。

研究发现脾虚证肠黏膜免疫屏障也有所改变。赵宁等^[32]观察到利血平所致脾虚大鼠空肠中 TGF- β 的表达较正常组降低,TNF- α 的表达较正常组显著升高,四君子汤可以通过增加空肠内 TGF- β 表达、降低 TNF- α 表达,对利血平脾虚大鼠黏膜免疫功能发挥一定的调节作用。吴秀等^[33]发现脾虚大鼠肠道 SIgA 含量降低,经四君子汤多糖治疗后接近正常水平,四君子汤多糖对脾虚小鼠肠道菌群及免疫功能有一定的恢复作用。杨利桃等^[34]发现脾虚大鼠十二指肠细胞黏膜受损,肠绒毛长度、宽度、隐窝深度都显著减少,盲肠和回肠 SIgA 减低,四君子汤能提高 SIgA 含量,提高肠黏膜防御功能。杨冬花等^[35]发现,脾虚模型大鼠血清 INF- γ 明显降低,IL-4 明显升高,经四君子汤治疗后,INF- γ 上升,IL-4 则下降。

3 功能性腹泻与肠黏膜屏障

脾虚证肠道的屏障功能发生着不同程度的损伤。腹泻时各种原因导致肠道内正常菌群减少,损害肠黏膜生物屏障功能,肠杆菌、外源性致病菌及真菌等过度生长,这些细菌可产生细菌蛋白酶或毒素等代谢产物,破坏肠上皮细胞微绒毛膜蛋白并抑制蛋白质合成,通过改变肠道上皮细胞的生化反应使肠上皮细胞机械屏障受损。同时腹泻时免疫屏障受损使肠道黏膜 SIgA 与肠道中的革兰氏阴性杆菌亲和力和黏附力减弱,黏附和定植毒素细菌的作用减弱^[36],可能发生更加严重的临床症状。经过进一步的研究发现中医药防治脾虚证存在多组分、多靶点的作用机制,目前研究涉及消化酶、能量代谢相关酶、胃肠道激素、肠道黏膜病理、免疫功能及细胞间信号转导等方面。同时随着分子生物学技术的不断发展,发现某些健脾益气中药作用靶点可能是肠黏膜的生物、

免疫、机械屏障^[37-38]。功能性腹泻发病原因涉及多方面,目前的研究多以临床研究为主,对于从肠黏膜屏障角度探讨功能性腹泻脾虚证发病机制的研究甚少,选择相应适合中医功能性腹泻脾虚证的动物模型,探讨其是否具有肠黏膜机械及生物、免疫屏障的变化,同时用经典的健脾利湿中药加以干预,以方验证,可以从分子生物学角度探讨功能性腹泻脾虚证机理及健脾中药作用机制。

4 结语

总之,功能性腹泻脾虚证的病机属于脾失健运,脾虚泄泻,从脾论治功能性腹泻具有重要的理论价值及很好的疗效,脾虚证肠黏膜的屏障功能发生了不同程度的变化,从肠黏膜屏障角度探讨功能性腹泻脾虚证是对于脾虚证研究的拓展,也是对于从脾论治功能性胃肠病靶点的探讨。

参考文献

[1] 孙 菁,袁耀宗.功能性胃肠病罗马Ⅲ标准解读:功能性肠病[J].临床消化病杂志,2006,18(5):264-265.

[2] 祝德军.功能性胃肠病辨证论治[M].北京:人民卫生出版社,2007:307-313.

[3] 周仲瑛.中医内科学[M].北京:中国中医药出版社,2007:237-237.

[4] 崔文海,徐根山,姜庆贺.中医“运脾化湿法”在功能性腹泻患者中的应用研究[J].中国医学创新,2013,10(28):36-38.

[5] 罗祥忠.功能性腹泻的中医药辨证论治效果与分析[J].中国卫生产业,2011,8(11):88-88.

[6] TERRY S, NIE M, MATTER K, et al. Rho signaling and tight junction functions[J]. Physiology(Bethesda), 2010, 25:16-26.

[7] 白爱平.炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制[J].世界华人消化杂志,2008,16:3187-3191.

[8] 杜 丹,方立超,陈丙波,等.乳酸杆菌和低聚异麦芽糖对抗生素相关腹泻大鼠肠黏膜 sIgA 的影响[J].放射免疫学杂志,2005,18(1):37-40.

[9] 曾 娟.肠易激综合征肠黏膜屏障功能的研究[D].山东大学,2008.

[10] VISSER J, ROZING J, SAPONE A, et al. Tight junctions, intestinal permeability and auto-immunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1165:195-205.

[11] 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, 141:1539-1550.

[12] KASAPKARA C S, TUMER L, OKUR I, et al. A novel mutation of the claudin 16 gene in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and Nephrocalcinosis mimickingrickets[J]. Genet Couns, 2011, 22:187-

- 192.
- [13] FANNING A S, JAMESON B J, JESAITIS L A, et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273:297—297.
- [14] FANNING A S, MA T Y, ANDERSON J M. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1[J]. *FASEB J*, 2002, 16:1835—1835.
- [15] UMEDA K, IKENOUCHI J, KATAHIRA-TAYAMA S, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation[J]. *Cell*, 2006, 126:741—741.
- [16] MORRIS A P, TAWIL A, BERKOVA Z, et al. Junctional adhesion molecules (JAMs) are differentially expressed in fibroblasts and co-localize with ZO-1 to adherens-like junctions[J]. *Cell Commun Adhes*, 2006, 13:233—233.
- [17] 鲍 欢, 包仕尧. 缺氧后血脑屏障紧密连接变化的分子机制[J]. *国外医学脑血管疾病分册*, 2005, 13(8): 604—604.
- [18] 高志光, 秦环龙. 肠上皮细胞紧密连接的生物学功能及在肠屏障中的作用[J]. *肠外与肠内营养*, 2005, 12(5):299—299.
- [19] FÖRSTER C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease[J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130:55—70.
- [20] TSUKITA S, FURUSE M, ITOH M, et al. Multi-functional strands in tight junctions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2:285—293.
- [21] SCHNEEBERGER E E, LYNCH R D. The tight junction: a multifunctional complex[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286:C1213—C1228.
- [22] 成令忠. 组织学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 1106—1107.
- [23] NUSRAT A, PARKOS C A, VERKADE P, et al. Tight junctions are membrane microdomains[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113:1771—1781.
- [24] 王孟清, 欧正武, 吴明贞. 健运冲剂促脾虚泄泻模型大鼠受损肠黏膜修复的研究[J]. *中国中西医结合脾胃杂志*, 1999, 7(4):217—2180.
- [25] 李茹柳. 紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1 在大鼠溃疡性结肠炎的表达[J]. *广州中医药大学学报*, 2008, 25(1):83—87.
- [26] 薛晓倩. 藿香正气液对湿阻证大鼠回肠黏膜 ZO-1 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(16):224—227.
- [27] PULIMOOD A B, MATHAN M M, MATHAN V I. Quantitative and ultrastructural analysis of rectal mucosal mast cells in acute infectious diarrhea[J]. *Dig Dis Sci*, 1998, 43:2111—2116.
- [28] KEREN D F, BROWN J E, MCDONALD R A, et al. Secretory immunoglobulin A response to Shiga toxin in rabbits: kinetics of the initial mucosal immune response and inhibition of toxicity in vitro and in vivo [J]. *Infect Immun*, 1989, 57:1885—1889.
- [29] MACPHERSON A J, HUNZIKER L, MCCOY K, et al. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms [J]. *Microbes Infect*, 2001, 3:1021—1035.
- [30] SAINI M S, LIBERATI D M, DIEBEL L N. Sequential changes in mucosal immunity after hemorrhagic shock[J]. *Am Surg*, 2001, 67:797—801.
- [31] CAZAC B B, ROES J. TGF- β receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo[J]. *Immunity*, 2000, 13:443—451.
- [32] 赵 宁, 张皖东, 贾红伟, 等. 四君子汤对利血平所致脾虚大鼠肠道黏膜 TGF- β 、TNF- α 表达的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2007, 13(1):44—44.
- [33] 吴 秀, 周 联, 罗 霞, 等. 四君子汤多糖对脾虚小鼠肠道菌群及免疫功能的影响[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(2):12—14.
- [34] 杨利桃, 李悦山, 周 毅, 等. 加味四君子汤对脾虚泄泻大鼠肠道菌群及 SIgA 的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2011, 45(12):85—87.
- [35] 杨冬花, 李家邦, 郑爱华. 脾气虚证模型大鼠 Th1/Th2 细胞因子的失衡及四君子汤的干预作用[J]. *中国医师杂志*, 2004, 6(2):181—182.
- [36] BRANDTZAEG P, HALSTENEEN T S, KETT K, et al. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial phocytes[J]. *Gastroenterology*, 1989, 97:1562—1584.
- [37] 舒 静, 王 怡, 张晓云. 黄芪注射液拮抗高糖腹膜透析液对腹膜间皮细胞紧密连接的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2007, 21(4):50—53.
- [38] 李秋霞. 白术黄芪方、白术 AMPs-II、黄芪注射液对 Caco-2 单层细胞屏障影响的实验研究[D]. 广州中医药大学, 2006.