

# 柔肝固肠方改善慢性酒精性肝损伤大鼠肠道通透性的机制研究

姚东升 胡义扬 傅琪琳 顾宏图 徐琳 王文静 彭景华 赵瑜 冯琴

(上海中医药大学附属曙光医院,上海中医药大学肝病研究所,上海高校中医内科学 E-研究院,

肝肾疾病病证实验室,上海市中医临床重点实验室,上海,201203)

**摘要** 目的:从肠道紧密连接及黏附连接角度探讨柔肝固肠方改善慢性酒精性肝损伤大鼠肠道通透性的作用机制。方法:Lieber-DeCarli 酒精液体饲料饲养 6 周诱导大鼠慢性酒精性肝损伤模型。30 只 SD 雄性大鼠,随机分无酒精液体饲料对照组(对照组, n = 10)和酒精液体饲料造模组(n = 20),造模第 4 周将造模组大鼠随机分模型组(n = 10),柔肝固肠方组(n = 10),并开始灌胃给柔肝固肠方或蒸馏水直至 6 周末,取材前 3.5 h 各组以 10 mg/kg 的内毒素(LPS)灌胃。取材后检测:1)血清 AST、ALT 活性变化;2)通过门脉血浆内毒素含量测定判断小肠通透性变化;3)小肠组织电镜超微结构观察;4)小肠紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 蛋白与 mRNA 表达变化;5)小肠黏附连接蛋白  $\beta$ -Catenin 和 E-Cadherin 蛋白表达。结果:1)柔肝固肠方可显著降低模型大鼠显著升高的 AST 水平( $P < 0.05$ );2)柔肝固肠方可降低模型大鼠显著升高的小肠通透性,柔肝固肠方组血浆内毒素含量显著低于模型组;3)电镜结果显示柔肝固肠方可显著改善 Lieber-DeCarli 酒精饲料喂养大鼠小肠黏膜表面微绒毛局灶性减少、变短、稀疏,排列不规则,同微绒毛相连的细胞终末网变性模糊等病理改变;4)柔肝固肠方可显著升高酒精饲料喂养肝损伤大鼠小肠组织紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 蛋白与 mRNA 表达及黏附连接蛋白  $\beta$ -Catenin 和 E-Cadherin 蛋白表达。结论:柔肝固肠方通过改善肠上皮紧密连接及黏附连接改善慢性酒精性肝损伤大鼠肠道通透性改变。

**关键词** 酒精性肝损伤;柔肝固肠方;肠道通透性;紧密连接;黏附连接

## Mechanism research of Rouganguchang Decoction on improving intestinal permeability changes of rats with ethanol-induced liver injury

Yao Dongsheng, Hu Yiyang, Fu Qilin, Gu Hongtu, Xu Lin, Wang Wenjing, Peng Jinghua, Zhao Yu, Feng Qin

(Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

**Abstract Objective:** From the intestinal tight junction and adherens junction pathway to explore mechanism research of Rouganguchang Decoction on improving chronic alcoholic liver injury and intestinal permeability changes. **Methods:** The rats were given Lieber-DeCarli liquid diet daily for 6 weeks to duplicate the alcoholic liver injury model. Thirty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control liquid diet, control group (control group, n = 10) and ethanol liquid diet model group (n = 20). Model rats were randomly divided into the model group (n = 10), Rouganguchang Decoction group (n = 10) the fourth weeks. The rats were given decoction or distilled water from the fourth week to the sixth weekend. Each rat was given 10mg/kg endotoxin (LPS) by gavage 3.5h before being sacrificed. The following indexes were detected: 1) The ALT、AST activity of serum were detected by biochemical method; 2) LPS content in the portal blood was detected by biochemical method; 3) Pathological changes in intestinal tissues were observed by electron microscope; 4) The protein and mRNA expresses of ZO-1 and Occludin were detected by Western blotting and real-time PCR respectively; 5) The protein of beta-Catenin and E-Cadherin were detected by Western blotting. **Results:** 1) Compared with that of the model group rats, the activity of AST in drug group decreased significantly ( $P < 0.05$ ); 2) The plasma endotoxin levels of Rouganguchang Decoction decreased significantly compared with that of the model group rats; 3) Rouganguchang Decoction could improve the intestinal mucosa connection structure of the surface epithelial cells of model rats; 4) Compared with those of the model group rats, the protein and mRNA expressions of ZO-1 and occludin, as well as the protein expressions of beta-Catenin and E-Cadherin all increased. **Conclusion:** Rouganguchang Decoction can significantly improve chronic alcoholic liver injury and intestinal permeability changes, the mechanism of that was related to protection of intestinal epithelial tight junctions and adhesion junctions.

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(编号:30801536);国家中医药管理局中医肝胆病重点学科资助项目

作者简介:姚东升(1987—),男,硕士,上海中医药大学附属曙光医院规范化培训基地住院医师,主要从事中医药防治慢性肝肾疾病的临床与基础研究

通信作者:冯琴,博士,副研究员,地址:上海市浦东新区张衡路 528 号曙光医院肝病研究所,邮编:201203,电话:(021)20256526, E-mail: fengqin1227@163.com

**Key Words** Alcoholic liver injury; Rouganguchang Decoction; Intestinal permeability; Intestinal tight junctions; Intestinal adhesion junctions

中图分类号:R256.43 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.006

酒精性肝病(Alcoholic Liver Disease, ALD)是由于长期大量饮酒所导致的肝脏疾病。近些年来,研究证实肠道屏障功能障碍与酒精性肝损伤关系密切,酒精所致肠道通透性改变血中内毒素升高是形成酒精性肝病“二次攻击”理论的核心要素之一<sup>[1-2]</sup>。改善酒精所致的肠道屏障损伤,减少肠源性内毒素入血,为治疗 ALD 的重要和有效途径。

“饮食所伤”是酒精性肝病中医学重要的病因学说之一,调理脾胃运化功能是中医药治疗酒精性肝病的主要治法<sup>[3]</sup>。笔者所在研究所根据健脾活血立法创立的由白术、茯苓、白芍、泽泻等组成的“健脾活血方”临床治疗酒精性肝损伤疗效显著,近 10 多年来系列研究证实其通过改善肠道通透性、抗内毒素二次攻击以及抗脂质过氧化等多途径发挥抗酒精诱导的大鼠肝损伤的作用<sup>[4-6]</sup>。前期研究提示白芍、五味子及泽泻三味药(命名为“柔肝固肠方”)是健脾活血方 8 味中药中改善小肠通透性改变的主效中药组合<sup>[7]</sup>。本研究采用 Lieber-Decarli 酒精饮料诱导的大鼠酒精性损伤模型,从肠道紧密连接及黏附连接角度探讨柔肝固肠方改善慢性酒精性肝损伤大鼠肠道通透性的作用机制。

## 1 实验材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠,SPF 级,体重 130~160 g,30 只,合格证号 SCKC-沪-2008-0016,购自上海必凯实验动物有限公司。特制笼具单笼饲养于上海中医药大学实验动物中心。特制 Richter 饲料瓶(负压饲料瓶)予大鼠自动饮用液体饲料。

1.2 药物 柔肝固肠方由白芍、五味子、泽泻组成。五味子加 70% 乙醇提取 2 次,过滤,回收乙醇;泽泻、白芍分别水提,滤液冷藏备用,临用前将三种药混合配成悬浊液。给药时配制成 10 mL/kg 鼠重的灌胃液。中药购自上海华宇药业有限公司,上海中医药大学科技中心制备。

1.3 试剂 血清丙氨酸氨基转移酶(Alanine Aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate Aminotransferase, AST)测定试剂盒购自南京建成生物制品研究所;内毒素检测试剂盒(货号 21080309C/BU0209)购自美国 ACC 公司;ZO-1 多克隆抗体(货号 SC-10804)、E-cadherin(货号 sc-7870),购自 santacruz 公司;Occludin 多克隆抗体(货

号 ab31721),购自 abcam 公司;a-tubulin 多克隆抗体(货号 2251-1),购自 EPITOMICS 公司。 $\beta$ -Catenin 抗体(货号 9582S),购自 CST 公司;柱式小量总 RNA 抽提试剂盒,购自上海华舜生物工程有限公司;cDNA 合成试剂盒,购自 Fermentas 公司;引物由 TAKARA 公司设计、上海生工生物工程技术有限公司合成。荧光定量 PCR 试剂盒,购自 TAKARA 公司产品;引物序列及片段长度如下(表 1)。

表 1 引物序列及片段长度

| 基因             | 引物序列  | 片段大小  |
|----------------|---|-------|
| Zo-1           | 5'-CACCAGACCATGCTTCAGTGAGA-3'(F)<br>5'-GTTGCATGGCTGTTACAGGA-3'(R) | 151bp |
| occludin       | 5'-GTCTTGGGAGCCTTGACATCTTG-3'(F)<br>5'-GCATTGGTCCAACGTGCATC-3'(R) | 174bp |
| $\beta$ -actin | 5'-TGACGAGGCCAGACGAAGA-3'(F)<br>5'-ATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3'(R)     | 331bp |

## 2 方法

2.1 模型制备 Lieber-Decarli 酒精性大鼠肝损伤模型制备及取材方法,参照本课题组已发表文献<sup>[4]</sup>。

2.2 分组与给药 大鼠 30 只,随机分无酒精液体饲料对照组(对照组, n = 10)和酒精液体饲料造模组(造模组, n = 20),造模第 4 周将造模大鼠随机分模型组(n = 10),柔肝固肠方组(n = 10),柔肝固肠方组在给予酒精饲料的同时,灌胃给予 1 mL/100 g 体重药物,1 次/d,模型组、对照组按相同标准灌胃给予饮用水。

2.3 观察指标及方法 1)血清 AST、ALT 活性,赖氏法。2)小肠通透性通过门静脉血浆内毒素含量检测判定(鲎试剂法)。3)小肠组织电镜超微结构观察。4)小肠紧密连接蛋白 ZO-1 及 Occludin 蛋白及 mRNA 表达变化,Western Blotting(WB)和 Real-time PCR(RT-PCR)方法。5)小肠黏附连接蛋白  $\beta$ -Catenin 和 E-Cadherin 蛋白表达, WB 方法。

2.4 统计学分析 使用 SPSS 20.0 软件包进行统计学分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较使用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表明差异有统计学意义。

## 3 结果

3.1 各组大鼠死亡情况、进食量、体重变化 造模开始及结束时各组大鼠体重均无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 2);在造模过程中各组大鼠进食量无统

计学意义( $P > 0.05$ ) (见表 2),其所摄入的乙醇量和热卡也大致相等,排除了饮食及乙醇量的差异对实验结果的影响;造模第 6 周柔肝固肠方组有 1 只大鼠因灌胃不当意外死亡。

表 2 各组大鼠体重及进食量( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 鼠数 | 进食总热卡(kcal) | 造模结束体重(g)    |
|----------|----|-------------|--------------|
| 无酒精饲料对照组 | 10 | 2029 ± 85   | 256.4 ± 9.7  |
| 酒精饲料模型组  | 10 | 2000 ± 104  | 261.5 ± 14.7 |
| 柔肝固肠方组   | 9  | 1996 ± 119  | 260.8 ± 13.1 |

3.2 柔肝固肠方对慢性酒精性肝损伤大鼠血清 AST、ALT 的影响 与对照组相比,模型组血清 ALT、AST 活性显著升高;与模型组相比,柔肝固肠方组能显著降低血清 AST 活性。(见表 3)。

表 3 各组大鼠血清 ALT、AST 含量( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | AST(U/L)         | ALT(U/L)       |
|--------|----|------------------|----------------|
| 对照组    | 10 | 91.47 ± 8.52     | 14.98 ± 7.52   |
| 模型组    | 10 | 106.92 ± 15.33** | 35.65 ± 8.12** |
| 柔肝固肠方组 | 9  | 85.54 ± 12.31##  | 35.44 ± 10.94  |

注: \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , vs 对照组; ## $P < 0.01$ , vs 模型组。

3.3 柔肝固肠方对慢性酒精性肝损伤大鼠肠道通透性(门静脉血浆内毒素含量)的影响 模型组大鼠门静脉血浆内毒素含量较对照组组明显升高( $P < 0.05$ ),柔肝固肠方组门静脉血浆内毒素含量有显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) (表 4)

表 4 各组大鼠门静脉血浆内毒素含量( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 鼠数 | 内毒素(Eu/mL)    |
|---------|----|---------------|
| 对照组     | 10 | 0.21 ± 0.18   |
| 酒精饲料模型组 | 10 | 1.40 ± 1.06*  |
| 柔肝固肠方组  | 9  | 0.36 ± 0.37## |

注: \* $P < 0.05$ , vs 对照组; ## $P < 0.01$ , # $P < 0.05$ , vs 模型组。

3.4 柔肝固肠方对慢性酒精性肝损伤大鼠小肠组织超微结构的影响 对照组小肠黏膜超微结构未见明显改变。模型组大鼠小肠黏膜表面微绒毛局灶性减少、变短、稀疏,排列不规则。同微绒毛相连的细胞终末网变性模糊。柔肝固肠方小肠黏膜表面上皮细胞间各种连接结构较为清晰,微绒毛局灶性稀疏、减少等有所改善,上皮细胞变性程度轻微。(图 1)

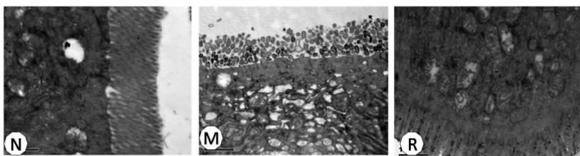


图 1 小肠电镜超微结构变化(11500 倍)

注: N 对照组, M 模型组, R 柔肝固肠方组。

3.5 柔肝固肠方对慢性酒精性肝损伤大鼠小肠紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 蛋白及 mRNA 表达的影响 与对照组相比,模型组小肠 ZO-1、Occludin 蛋白表达显著降低;柔肝固肠方组 ZO-1 蛋白表达较模型组均显著升高。(图 2)

与对照组相比,模型组小肠组织 ZO-1 mRNA 表达无显著变化, Occludin mRNA 表达显著降低,柔肝固肠方组 ZO-1、Occludin mRNA 表达均显著升高。(表 5)

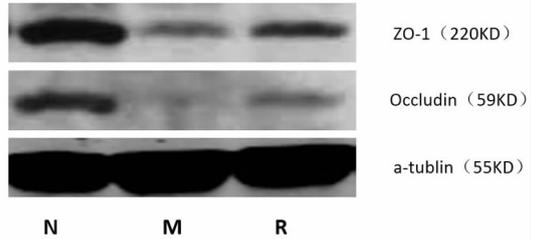


图 2 各组小肠 ZO-1、Occludin 蛋白表达情况

注: N: 对照组, M: 模型组, R: 柔肝固肠方组。

表 5 各组大鼠小肠组织 ZO-1、Occludin mRNA 表达( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | ZO-1 mRNA 相对荧光值 | Occludin mRNA 相对荧光值 |
|--------|----|-----------------|---------------------|
| 对照组    | 3  | 1.53 ± 0.16     | 0.93 ± 0.08         |
| 模型组    | 3  | 1.17 ± 0.14     | 0.64 ± 0.07**       |
| 柔肝固肠方组 | 3  | 2.54 ± 0.19#    | 0.91 ± 0.19#        |

注: \*\* $P < 0.01$ , vs 对照组; ## $P < 0.01$ , # $P < 0.05$ , vs 模型组。

3.6 柔肝固肠方对小肠黏附连接蛋白  $\beta$ -Catenin、E-Catenin 影响 与对照组相比,模型组小肠  $\beta$ -Catenin、E-Catenin 蛋白表达均显著降低;柔肝固肠方组较模型组均显著升高。(图 3)

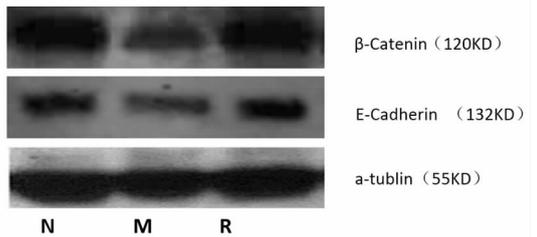


图 3 各组小肠  $\beta$ -Catenin、E-Catenin 蛋白表达情况

注: N: 对照组, M: 模型组, R: 柔肝固肠方组

### 4 讨论

ALD 发病原因明确,为过量摄入乙醇所致。乙醇所致血中内毒素升高是形成酒精性肝病(ALD)“二次攻击”理论的要素之一。乙醇导致肠道黏膜屏障的破坏,形成肠渗漏被认为是乙醇诱导的内毒素血症的主要原因,因此通过改善肠道屏障功能抑制内毒素升高是 ALD 治疗学上的重要策略<sup>[2]</sup>。

柔肝固肠方是临床治疗 ALD 有效经验方健脾

活血方中改善小肠通透性改变的主效应中药组合<sup>[7]</sup>,研究证实其可减轻酒精性肝损伤,且其改善小肠通透性有优于健脾活血方的趋势。但其通过何种机制改善肠道屏障功能尚不明了,有必要进一步深入研究。

肠道屏障功能是指能防止肠腔内有害物质如细菌及毒素等穿过肠黏膜进入体内其他组织器官和血液循环的结构和功能,主要由肠道黏膜的机械屏障、免疫屏障、化学屏障和生物屏障四部分组成<sup>[8]</sup>。机械屏障是最重要的部分,小肠上皮机械屏障功能主要由上皮细胞细胞间连接复合物包括紧密连接和黏附连接提供<sup>[9]</sup>。其中紧密连接是调节细胞间通透性的细胞间连接复合物中最重要的组分,是防御异物入血的第一道防线<sup>[10]</sup>。紧密连接<sup>[10-11]</sup>是由超过 50 种蛋白质组成的结构复杂的复合体,通过连接与细胞骨架结构连接的复合物蛋白构成紧密连接复合物来吻合封闭细胞间隙。紧密连接胞内蛋白主要是 ZO-1 蛋白,其起到桥梁的作用。一方面,ZO-1 自身的 C 末端同肌动蛋白骨架系统相连接,另一方面,ZO-1 通过鸟苷酸激酶样(GUK)结构域的保守序列,与紧密连接的跨膜蛋白蛋白如 Occludins 蛋白的 C 末端连接。最终,将 Occludin 蛋白和肌动蛋白骨架系统连接在一起,构成稳定的连接系统。Occludin 蛋白是主要集中于紧密连接纤维内相对分子质量约为 65 000 的 II 型跨膜蛋白,其蛋白的胞外环型结构及跨膜结构主要参与肠壁通透性的调节。紧密连接蛋白的破坏会导致肠道通透性增高,使大分子物质,如内毒素、病原体等从肠腔进入血液。黏附连接<sup>[12]</sup>为肠道机械屏障的另一重要组成部分。一般于上皮细胞顶侧面的紧密连接下方形成粘合带(Adhesion Belt)。在粘合带处相邻细胞的间隙约 15 ~ 20 nm。间隙中的粘分子为 E-钙粘蛋白(E-cadherin)。粘合带处的质膜下方有与质膜平行排列的肌动蛋白束,钙粘蛋白通过附着  $\beta$ -连锁蛋白( $\beta$ -catenin)等连锁蛋白、粘着斑蛋白(Vinculin)、 $\alpha$ -辅肌动蛋白( $\alpha$ -actinin)和片珠蛋白(Plakoslobin)与肌动蛋白束相结合。于是,相邻细胞中的肌动蛋白丝束通过钙粘蛋白和附着蛋白编织成了一个广泛的网络,把相邻细胞联合在一起。近来研究发现乙醇代谢产物乙醛可通过介导 E-cadherin 与  $\beta$ -catenin 的酪氨酸磷酸化而且破坏黏附连接蛋白。

本研究运用 Lieber-Decarli 酒精饲料喂养大鼠 6 周诱导慢性酒精性肝损伤模型,并参照文献方法<sup>[5]</sup>,于动物处死前 3.5 h 给予内毒素灌胃,取材后测定

门静脉血浆血内毒素含量以评价肠道通透性。结果显示模型大鼠门静脉血浆内毒素含量较无酒精饲料对照大鼠显著升高,说明该模型中肠渗漏发生,存在肠道屏障受损。小肠组织电镜超微结构也显示酒精饲料喂养大鼠出现小肠黏膜表面微绒毛局灶性减少、变短、稀疏,排列不规则,同微绒毛相连的细胞终末网变性模糊等病理改变。同时,WB 研究结果显示模型大鼠小肠组织紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 及黏附连接蛋白  $\beta$ -Catenin、E-cadherin 蛋白表达均显著低于无酒精饲料对照大鼠,提示小肠上皮紧密连接与黏附连接的破坏是该慢性酒精性肝损伤模型肠道通透性升高的主要原因。经中药柔肝固肠方治疗后,模型大鼠血清 AST 显著降低同时伴有肠道通透性关键指标——血浆门静脉内毒素含量的显著降低及小肠黏膜超微结构的好转,提示改善肠通透性抑制内毒素血症是该方有效治疗酒精性肝损伤的重要机制之一。进一步检测该方对小肠上皮紧密连接与黏附连接关键蛋白的影响,结果显示无论紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 还是黏附连接蛋白  $\beta$ -Catenin、E-cadherin 经过柔肝固肠方治疗后蛋白表达均较模型组显著升高,提示缓解慢性酒精摄入导致的肠上皮细胞紧密连接及黏附连接破坏是该方修复肠道黏膜机械屏障、改善肠道通透性的主要机制。

综上所述,柔肝固肠方可通过修复肠上皮细胞紧密连接及黏附连接而改善酒精性肠道通透性改变起到防治 ALD 的作用。这为该方临床运用与新药开发提供科学依据同时,也为从“肝-肠轴”角度开展中医药防治酒精性肝病的研究提供可借鉴的思路与方法。

#### 参考文献

- [1] Rehm J, Mathers C, Popova S, et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders[J]. Lancet, 2009, 373: 2223 - 2233.
- [2] Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease[J]. Hepatology, 2009, 50: 638 - 644.
- [3] 胡义扬, 彭景华, 冯琴. 中医药治疗酒精性和非酒精性脂肪肝的重要靶位-肠道[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(9): 1269 - 1272.
- [4] 方志红, 胡义扬, 崔剑巍, 等. 酒精性肝损伤与肠内毒素渗漏的关系及健脾理气活血方的干预作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(9): 813 - 817.
- [5] 胡义扬, 方志红, 崔剑巍, 等. 酒精性肝损伤与小肠通透性改变的关系及中药的干预作用[J]. 科学技术与工程, 2005, 5(22): 1770 - 1771.

明显加重。

如前所述,测定肝糖原的方法很多,其中蒽酮法受试剂、温度、方法稳定性差等因素的影响,结果重现性不好,而且使用试剂多,溶液配制和操作过程复杂。氧化酶法检测肝糖原含量的方法优于蒽酮法。其操作简便,结果稳定、重复性好,适合不同动物模型肝糖原含量的检测。但是若不用缓冲液调整水解液的 pH 值,直接用碱中和则往往会出现中和不足或过量的问题,很难掌握好中和点<sup>[13]</sup>。而且蒽酮法与氧化酶法均不适合肝糖原原位检测。PAS 染色法<sup>[5]</sup>是目前采用较多的肝糖原原位染色检测,常规 PAS 染色法采用乙醇-醋酸-氯仿固定液(卡诺固定液),能较好地保存糖原,但有使糖原流动到细胞一侧甚至漏出现象,一般认为是由于固定剂把细胞内的糖原推向固定剂对组织浸透的方向而造成<sup>[14]</sup>,与本实验中常规 PAS 染色肝糖原偏向肝细胞一侧并减少的显示结果一致。近期我们采用糖原染液试剂盒,简化实验流程,肝组织不采用卡诺固定液固定直接冰冻切片,成功原位检测肝组织糖原表达位置与水平,肝糖原均匀分布于整个肝细胞,肝糖原阳性染色明显强于常规 PAS 染色。大鼠皮下注射 CCl<sub>4</sub> 后可使肝细胞产生化学性损伤,因此肝细胞对葡萄糖的摄取减少,肝糖原的合成亦相应减少。本研究结果提示 CCl<sub>4</sub> 染毒 2 周后大鼠体重明显减轻、ALT 与 AST 活性明显升高, TBil 含量明显增加, Alb 含量明显降低, HE 染色可见肝细胞脂肪变、气球样变化明显,提示 CCl<sub>4</sub> 染毒成功诱导大鼠急性肝损伤。常规 PAS 染色与改良 PAS 染色均提示,模型组大鼠肝糖原面积较正常组大鼠明显减少。由于以往操作方法经常出现实验结果不理想,为此本实验取材于急性肝损伤的大鼠肝脏,参照常规 PAS 染色法,对实验中肝糖原染色方法的固定作了探索性的

改进,即采用肝组织冰冻切片,无须卡诺固定液固定,大大节省实验流程与时间,同时,更好的保留肝组织糖原,本实验结果表明改良 PAS 染色法切实可行,肝糖原阳性染色面积更符合急性肝损伤的程度。

#### 参考文献

- [1] 戚什铎,王友赤. 诊断学[M]. 4版,北京:人民卫生出版社,1995:406.
- [2] 刘文斌,陈永亮,卢灿荣,等. 肝糖原贮备对热缺血再灌注大鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 消化外科,2006,5(6):447-450.
- [3] 高珊,童英,熊晓燕,等. 蒽酮法与试剂盒法测定糖原含量的比较研究[J]. 首都公共卫生,2011,5(1):38-40.
- [4] 柳占彪,张少卓,李玉红,等. 应用氧化酶法对高糖高脂动物模型肝糖原含量的测定[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(1):34-36.
- [5] 王媛,邓锋,肖咏丽,等. 肝脏组织 PAS 染色方法的探讨[J]. 疾病预防控制通报,2012,27(1):5-6.
- [6] 龚峻梅,朴英杰,陈素云. 急性 CCl<sub>4</sub> 肝损伤的研究进展[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,2002,22(3):308-310.
- [7] 陈雪龙. 实验性肝损伤动物模型的研究进展[J]. 实验动物科学,2008,25(3):47-59.
- [8] 黄正明,杨新波,曹文斌,等. 化学性及免疫性肝损伤模型的方法学研究[J]. 解放军药学报,2005,21(1):42-46.
- [9] 雷扬,周爱民,郭涛,等. 痰热清注射液对急性肝损伤大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志,2013,38(8):1226-1230.
- [10] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版)[S]. 胃肠病学和肝病杂志,2010,19(6):483-487.
- [11] 陈成伟. 药物与中毒性肝病[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:11.
- [12] 汪涛,姜华,陆国才,等. 四氯化碳肝脏毒性机制的研究进展[J]. 毒理学杂志,2007,21(4):338-339.
- [13] 柳占彪,张少卓,李玉红,等. 应用氧化酶法对高糖高脂动物模型肝糖原含量的测定[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(1):34-36.
- [14] 陈小萍,吴钦穗. PAS 组织化学染色的几点体会[J]. 福建医药杂志,2006,28(6):178-179.

(2014-12-26 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 177 页)

- [6] Jing-hua Peng, Yi-yang Hu, Yang Cheng, et al. Effect of JIANPI HUOXUE decoction on inflammatory cytokine secretion pathway in rat liver with lipopolysaccharide challenge[J]. World Journal of Gastroenterology, 2008, 14(12):1851-1857.
- [7] 傅琪琳,胡义扬,冯琴,等. 基于均匀设计的健脾活血方改善酒精性肠渗漏的主效应中药分析[J]. 中西医结合学报,2011,9(11):1234-1241.
- [8] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9:799-809.
- [9] Sta-Lenert S, Das S, Batra SK, et al. Muc17 protects intestinal epithelial cells from enteroinvasive E. coli infection by promoting epithelial

barrier integrity[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 300:G1144-G1155.

- [10] Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286:C1213-C1228.
- [11] Förster C. Tight junctions, and the modulation of barrier function in disease[J]. Histochem Cell Biol, 2008, 130(1):55-70.
- [12] Elamin E, Masclee A, Dekker J, et al. Ethanol disrupts intestinal epithelial tight junction integrity through intracellular calcium-mediated Rho/ROCK activation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014, 306(8):677-685.

(2014-12-26 收稿 责任编辑:洪志强)