

铁皮石斛对脾虚便秘小鼠肠道形态及 肠道免疫细胞数量的影响

于子真^{1,2}, 谭周进¹, 肖嫩群^{3*}

(1. 湖南中医药大学中医学院, 长沙 410208; 2. 湖南省荣军医院, 长沙 410119;
3. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

摘要: **目的** 探究铁皮石斛对脾虚便秘小鼠的肠隐窝深度、黏膜厚度、绒毛高度及淋巴细胞数的影响, 从肠道形态和肠道免疫明确铁皮石斛对脾虚便秘的疗效机制。**方法** 18 只 SPF 级 KM 小鼠随机分为正常组、模型组和治疗组。通过灌胃番泻叶水煎液 7 d, 控制饮食、饥饱失常 8 d 建立小鼠脾虚便秘模型。造模成功后, 治疗组灌胃铁皮石斛汤剂, 正常组与模型组灌胃等量无菌水, 持续 5 d。实验结束后, 采集各组小鼠回肠、空肠和盲肠约 2 cm 肠段, 分析隐窝深度、绒毛高度、黏膜厚度和淋巴细胞数。**结果** 与正常组和模型组相比, 铁皮石斛能增加小鼠空肠淋巴细胞数和回肠肠黏膜厚度($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。治疗组小鼠盲肠绒毛高度显著高于正常组($P < 0.05$), 回肠绒毛高度虽然高于正常组, 但差异不显著($P > 0.05$), 治疗组小鼠盲肠黏膜厚度和淋巴细胞数高于模型组, 二者差异显著($P < 0.05$)。**结论** 铁皮石斛通过改善脾虚便秘小鼠肠道形态, 增加黏膜淋巴细胞数来治疗脾虚便秘。

关键词: 铁皮石斛; 脾虚便秘; 绒毛高度; 隐窝深度; 黏膜厚度; 淋巴细胞数

Effects of *Dendrobium officinalis* on intestinal morphology and number of intestinal immune cells in mice with spleen-deficiency and constipation

YU Zi-Zhen^{1,2}, TAN Zhou-Jin¹, XIAO Nen-Qun^{3*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. Rongjun Hospital of Hunan Province, Changsha 410119, China;
3. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of *Dendrobium candidum* on intestinal crypt depth, mucosal thickness, villi height and lymphocyte number in mice with spleen-deficiency and constipation, and to clarify the therapeutic effect of morphology and intestinal immunity. **Methods** A total of 18 KM mice (SPF) were randomly divided into model group, normal group and treatment group. The constipation mice with spleen-deficiency were fed with Seine decoction for 7 d and restricted diet for 8 d, so as to cause their hunger and satiety disorder. After successful modeling, the treatment group was given *Dendrobium candidum* decoction by gavage for 5 d. The normal group and the model group were given the same amount of sterile water. After the experiment, the ileum, jejunum and

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(19C1399)、湖南中医药大学生物工程重点学科资助项目(校行科字[2018]3号)

Fund: Supported by the Scientific Research Project of Education Department of Hunan Province (19C1399), and Key Disciplines of Bioengineering of Hunan University of Chinese Medicine ([2018]3)

*通信作者: 肖嫩群, 高级实验师, 主要研究方向为中医药微生态学。E-mail: xiaonenqun@sohu.com

*Corresponding author: XIAO Nen-Qun, Senior Engineer, Hunan University of Chinese Medicine, No300 Xueshi Road, Hanpu Science and Education Park, Changsha 410208, China. E-mail: xiaonenqun@sohu.com

cecum segments of each group were collected about 2 cm each, and the crypt depth, villi height, mucosal thickness and lymphocyte number were measured. **Results** *Dendrobium candidum* significantly increased the number of jejunum lymphocytes and ileum intestinal mucosa thickness in mice, with significant differences compared with the normal group and model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The height of the cecal villi in the treatment group was significantly higher than that in the normal group ($P < 0.05$), and the height of the ileal villi was higher than the normal group, but there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). Meanwhile, the thickness of the cecal mucosa and the number of lymphocytes in the treatment group were significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Dendrobium candidum* can significantly improve the intestinal morphology of mice with spleen-deficiency and constipation, and can increase the number of mucosal lymphocytes, which is related to the treatment of spleen-deficiency and constipation.

KEY WORDS: *Dendrobium candidum*; spleen-deficiency constipation; villus height; crypt depth; mucosal thickness; lymphocyte number

0 引言

便秘是一种常见的胃肠道功能紊乱疾病, 对人们的健康和生活质量造成了严重影响, 同时还可能诱发多种致命性疾病。便秘是临床常见的胃肠功能失调症, 便秘本身并无多大危害, 但长期便秘可致心脑血管疾病, 甚至诱发直肠癌。铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)是一种极其名贵、药食同源的滋阴补品, 具有独特的药用价值, 其中蕴含的多种化学成分对多种胃肠道疾病有良好的治疗作用^[1]。研究证实铁皮石斛通过增强小鼠小肠推进运动, 在一定程度上可软化大便, 对治疗胃阴虚证患者大便干燥便秘有很好的疗效^[2]。前期研究显示, 铁皮石斛通过调控肠道微生态平衡、增强机体免疫力和肠道酶活性来优化肠道环境, 改善脾虚便秘症状^[3-4]。便秘容易导致肠黏膜的屏障功能受损, 产生多种炎症因子, 从而造成肠黏膜结构病理损伤^[5]。龙承星等^[6]研究表明, 中药或方剂在改善肠绒毛脱落、减轻炎症反应、修复黏膜结构等方面有着独特的优势。铁皮石斛首次记载于《神农本草经》, 味甘, 平, 主伤中, 除痹, 下气, 补五脏虚劳羸弱, 强阴, 久服厚肠胃^[7]。肠绒毛由肠上皮和固有层突向肠腔而成, 肠绒毛高度影响肠吸收面积, 与之成正相关。绒毛高度增加, 反映上皮细胞数量增多。当肠道被病原菌入侵或发生应激反应时, 肠绒毛缩短, 导致绒毛上皮细胞减少^[8]。隐窝是小肠上皮绒毛根部下陷至固有层的管状腺, 主要产生隐窝细胞并可以补充绒毛上皮细胞。隐窝深度可以反映隐窝细胞增殖速率与成熟程度, 隐窝深度变浅, 细胞成熟率和吸收功能增强, 肠黏膜修复能力增强^[9]。绒毛高度与隐窝深度的比值可以反映肠道吸收功能, 绒毛高度与隐窝深度比值大, 小肠消化能力强, 反之则说明小肠黏膜受损, 消化和吸收功能下降^[10-11]。本研究通过病理图像分析, 研究铁皮石斛对便秘小鼠肠隐窝深度、绒毛高

度、黏膜厚度及淋巴细胞数的影响, 旨从肠道形态和肠道免疫明确铁皮石斛对脾虚便秘的疗效机制。

1 材料与方法

1.1 材料

动物 KM 小鼠从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购买, 共 18 只, SPF 级, 10 周龄, 体质量为 18~22 g, 雌、雄各半, 动物许可证编号[SCXK(湘)2015-0004]。

1.2 仪器与试剂

磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、10%甲醛、石蜡、光学显微镜、病理图像分析系统 6.0(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 药物制备

药物番泻叶(产地: 云南; 批号: 1703228)购买于湖南中医药大学第一附属医院; 铁皮石斛由湖南龙石山铁皮石斛基地有限公司提供。

番泻叶水煎液制备: 将 500 g 番泻叶用 10 倍量的沸水浸泡, 10 min 后过滤, 滤液通过 75 °C 水浴、浓缩成 1 g/mL 的生药水煎液^[3]。铁皮石斛汤剂制备: 铁皮石斛常规细粉, 加水 100 倍, 按常规方法先煮后浓缩制成 0.1 g/mL 铁皮石斛汤剂。

1.3.2 造模

造模参照文献^[3-4]进行。模型组小鼠正常饮水、喂食, 番泻叶水煎液灌胃, 2 次/d, 0.4 mL/次, 共 7 d, 建立脾虚模型; 从第 8 d 停用番泻叶水煎液, 控制饮食, 隔天饲喂 4~8 g 生米, 每天自由饮水 1 次, 0.5 h/次, 饥饱失常方法延续脾虚状态 8 d; 共 15 d 建立小鼠脾虚便秘模型。正常组给予正常饮水喂食, 以生理盐水代替番泻叶水煎液灌胃 7 d, 再饲养 8 d。

1.3.3 动物分组

动物分组 18 只小鼠适应性喂养 2 d 后, 随机分为正常组、模型组和治疗组, 每组 6 只, 雌雄各半。

1.3.4 治疗

治疗适应性喂养 2 d 后, 将小鼠随机分为 3 组: 正常组、模型组和治疗组, 6 只/组, 雌雄各半。治疗组按 3.5 g/(kg·d) 的临床等效剂量^[3-4]灌胃 0.1 g/mL 铁皮石斛汤剂灌胃, 正常组和模型组分别灌胃等量的无菌水, 每天 2 次, 每次 0.35 mL, 持续 5 d。

1.3.5 病理切片

肠组织采集实验结束时, 处死小鼠, 快速提取回肠、空肠和盲肠各约 2 cm, 用生理盐水反复冲洗, 10% 甲醛固定, 然后脱水、浸泡、包埋、切片、HE 染色, 在光学显微镜下用病理图像处理系统测量各肠段隐窝深度、绒毛高度、淋巴细胞数和黏膜厚度。

1.3.6 数据分析

统计分析用 SPSS 21.0 软件分析。数据以平均值±标准差表示, 组间比较采用单因素方差, 多组间两两比较采用 LSD 检验。 $P<0.05$ 差异显著, $P<0.01$ 差异极显著。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛对空肠绒毛高度、隐窝深度、黏膜厚度及淋巴细胞数的影响

从表 1 可以看出铁皮石斛能显著增加空场淋巴细胞

数目, 与正常组和模型组相比差异极显著($P<0.01$)。模型组小鼠经铁皮石斛治疗后, 小鼠绒毛高度、隐窝深度、肠黏膜厚度有所降低, 但 3 组小鼠之间的绒毛高度、隐窝深度、肠黏膜厚度差异不显著($P>0.05$)。

2.2 铁皮石斛对回肠绒毛高度、隐窝深度、黏膜厚度及淋巴细胞数的影响

表 2 为铁皮石斛对回肠绒毛高度、隐窝深度、黏膜厚度及淋巴细胞数的影响。从表 2 可以看出, 模型组小鼠隐窝深度和绒毛高度均高于正常组, 且绒毛高度与正常组相比差异显著($P<0.05$)。经铁皮石斛治疗后, 小鼠绒毛高度、隐窝深度有所降低, 淋巴细胞数升高, 但差异与正常组和模型组相比不显著($P>0.05$)。黏膜厚度方面, 铁皮石斛组小鼠肠黏膜厚度显著增高, 与正常组和模型组相比差异显著($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

2.3 铁皮石斛对盲肠绒毛高度、隐窝深度、黏膜厚度以及淋巴细胞数的影响

与正常组小鼠相比, 铁皮石斛组小鼠肠绒毛高度高于正常组小鼠, 差异显著($P<0.05$)。与模型组小鼠相比, 治疗组小鼠盲肠黏膜厚度和淋巴细胞数显著高于模型组($P<0.05$)。隐窝深度在各组之间差异不显著($P>0.05$), 见表 3。

表 1 各组空肠绒毛高度、隐窝深度、黏膜厚度及淋巴细胞数的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of height of jejunum villi, crypt depth, mucosal thickness and number of lymphocyte number among different groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	绒毛高度/ μm	隐窝深度/ μm	黏膜厚度/ μm	淋巴细胞数/个
正常组	417.660±49.087	252.650±65.337	463.917±71.497	75.60±24.18
模型组	416.500±38.537	270.000±36.858	468.883±77.147	106.00±19.84
铁皮石斛组	367.620±63.355	264.850±22.548	434.740±69.687	199.60±46.25** $\Delta\Delta$
<i>F</i>	1.452	1.032	1.213	4.987
<i>P</i>	0.283	0.372	0.311	0.009

注: 与正常组相比, ** $P<0.01$; 与模型组相比, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

表 2 各组回肠绒毛高度、隐窝深度、黏膜厚度及淋巴细胞数的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of height of ileum villi, crypt depth, mucosal thickness and number of lymphocyte number among different groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	绒毛高度/ μm	隐窝深度/ μm	黏膜厚度/ μm	淋巴细胞数/个
正常组	182.820±21.264	93.600±10.054	198.125±15.002	271.20±61.55
模型组	277.800±100.731*	140.175±78.541	239.300±52.882	219.00±52.62
铁皮石斛组	210.180±54.776	120.450±40.955	305.900±32.974** Δ	268.67±50.76
<i>F</i>	3.784	2.457	5.124	1.362
<i>P</i>	0.035	0.089	0.005	0.307

注: 与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.05$; 与模型组相比, $\Delta P<0.05$ 。

表 3 各组盲肠绒毛高度、隐窝深度、黏膜厚度及淋巴细胞数的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Comparison of height of cecum villi, crypt depth, mucosal thickness and number of lymphocyte number among different groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	绒毛高度/ μm	隐窝深度/ μm	黏膜厚度/ μm	淋巴细胞数/个
正常组	101.433 \pm 14.319	31.560 \pm 12.557	103.260 \pm 25.570	81.000 \pm 26.191
模型组	112.720 \pm 19.758	40.140 \pm 18.755	147.600 \pm 38.041	102.200 \pm 40.058
铁皮石斛组	139.280 \pm 25.953 [*]	40.867 \pm 11.710	155.933 \pm 37.019 ^Δ	150.500 \pm 66.475 ^Δ
<i>F</i>	3.636	1.628	3.793	3.934
<i>P</i>	0.043	0.237	0.045	0.032

注: 与正常组相比, ^{*} $P<0.05$; 与模型组相比, ^Δ $P<0.05$ 。

3 结论与讨论

中药对肠黏膜结构的影响主要体现在修复肠上皮细胞形态和功能, 改善肠绒毛长度和隐窝深度, 提高小肠消化吸收能力。在本次实验中, 铁皮石斛组小鼠回肠和盲肠绒毛明显升高, 且盲肠绒毛高度与正常组相比差异显著($P<0.05$), 说明铁皮石斛能够在一定程度保护和促进肠绒毛修复。肠黏膜是机体内环境稳定维持的天然屏障, 其淋巴细胞在肠道淋巴组织中聚集最多, 对肠黏膜免疫具有重要作用。肠黏膜厚度变薄, 肠黏膜细胞和免疫细胞数量减少, 导致肠道分泌型免疫球蛋白 A(SIgA)分泌减少及肠道免疫屏障功能减低^[12]。石斛多糖具有增强免疫、降血糖以及强壮机体等的药理作用, 研究表明, 铁皮石斛多糖可促进小鼠外周白细胞的增长, 使细胞免疫功能、单核巨噬细胞吞噬功能、体液免疫功能和自然杀伤细胞活性明显增强^[13-14]。本研究中, 铁皮石斛使小鼠空肠、回肠及盲肠的淋巴细胞数增加($P<0.05$), 以空肠与盲肠的差异最为显著, 并且铁皮石斛能使回肠和盲肠的黏膜厚度显著增加($P<0.05$)。说明铁皮石斛通过修复肠黏膜增强机体免疫力、改善肠黏膜屏障功能来对脾虚便秘起到疗效, 这一发现可为阐明铁皮石斛治疗脾虚便秘的机制提供重要依据。

通过对肠道分段定量检测绒毛高度、淋巴细胞数、黏膜厚度、隐窝深度等黏膜形态及肠道免疫功能相关指标的变化, 揭示铁皮石斛对脾虚便秘的疗效。下一步可以通过 ELISA 检测肠道黏膜相关蛋白的变化, 更加深入阐明铁皮石斛对脾虚便秘的疗效机制。

参考文献

- [1] 邓陈哲. 铁皮石斛多糖对便秘小鼠肠道细菌多样性及相关酶活性的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(15): 1875-1877.
DENG CZ. Effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on intestinal bacterial diversity and related enzyme activities in mice with constipation [J]. Chin J Clin Pharm, 2018, 34(15): 1875-1877.
- [2] 甘江华, 黄琦璠, 彭代银, 等. 3 种石斛对脾阴虚型大鼠便秘的治疗作用及其机制初步研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2600-2606.
GAN JH, HUANG YY, PENG DY, et al. Effects of three *Dendrobium* species on constipation in spleen yin deficiency rats [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2019, 44(12): 2600-2606.
- [3] 赵兴兵, 吴维佳, 肖嫩群, 等. 超微铁皮石斛对脾虚便秘小鼠肠道细菌分子多样性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(1): 170-174.
ZHAO XB, WU WJ, XIAO NQ, et al. Effect of ultra-micro powder *Dendrobium officinale* on the molecular diversity of intestinal bacteria in mice with spleen-deficiency constipation [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2015, 21(1): 170-174.
- [4] 龙承星, 贺璐, 郭艳芳, 等. 铁皮石斛多糖对脾虚便秘小鼠免疫、肠道微生物及酶活性的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(6): 1020-1024, 1034.
LONG CX, HE L, GUO YF, et al. Effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on immune, intestinal microbial and enzyme activities in mice with spleen deficiency and constipation [J]. Res Dev Nat Prod, 2017, 29(6): 1020-1024, 1034.
- [5] 肖嫩群, 郑涛, 彭买姣, 等. 铁皮石斛对脾虚便秘小鼠肠道黏膜结构的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(9): 1018-1020, 1030.
XIAO NQ, ZHENG T, PENG MJ, et al. Effect of *Dendrobium officinale* on intestinal mucosal structure in mice with spleen deficiency and constipation [J]. Chin J Microecol, 2020, 32(9): 1018-1020, 1030.
- [6] 龙承星, 郭艳芳, 刘娅薇, 等. 中药对肠道黏膜免疫保护的影响及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(35): 3115-3122.
LONG CX, GUO YF, LIU YW, et al. Immunoprotective effect of traditional Chinese medicine on intestinal mucosa [J]. World Chin J Digestol, 2017, 25(35): 3115-3122.
- [7] 张帮磊, 杨豪男, 沈晓静, 等. 铁皮石斛化学成分及其药理功效研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(54): 3-8.
ZHANG BL, YANG HN, SHEN XJ, et al. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Dendrobium officinale* [J]. Elect J Clin Med Liter, 2019, 6(54): 3-8.
- [8] TANG R, LI QQ, WANG D, et al. The protective effect of *Dendrobium officinale* polysaccharides on photoaging fibroblasts by scavenging reactive oxygen species and promoting the expression of TGF- β 1 [J]. Tradit Med Res, 2018, 3(3): 131-139.
- [9] 庞晨, 张秀玲. 铁皮石斛抑制上皮源性恶性肿瘤的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2020, 34(4): 362-367.
PANG C, ZHANG XL. Research progress of *Dendrobium officinale* on inhibiting epithelial malignant tumor [J]. J Pract Oncol 2020, 34(4): 362-367.
- [10] 邵青玲, 杨艳君, 杜秀平. 多糖对断奶仔猪肠道菌群、绒毛形态和免疫

- 功能的影响[J]. 中国饲料, 2020, (8): 46-50.
SHAO QL, YANG YJ, DU XP. Effects of polysaccharides on intestinal flora, villi morphology and immune function of weaned piglets [J]. Chin Feed, 2020, (8): 46-50.
- [11] 徐婷婷. 鼓槌石斛肠粘膜免疫活性多糖的筛选及其理化性质和结构组成的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2017.
XU TT. Screening of immunoreactive polysaccharides in the intestinal mucosa of *Dendrobium tympanum* and their physicochemical properties and structural composition [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017.
- [12] 苑洁, 刘佳, 王雨, 等. 贵州鲜铁皮石斛粉对小鼠免疫功能的影响[J]. 微量元素与健康研究, 2020, 37(6): 3-6.
YUAN J, LIU J, WANG Y, *et al.* Effects of dendrobium candidum powder on immune function in mice [J]. Microel Health Stud, 2020, 37(6): 3-6.
- [13] 张珊珊, 童微, 胡婕伦, 等. 铁皮石斛多糖不同分级组分对小鼠免疫调节及肠道健康的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 14-21.
ZHAGN SS, TONG W, HU JL, *et al.* Effects of different fractions of *Dendrobium officinale* polysaccharides on immune regulation and intestinal health in mice [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2019, 19(12): 14-21.
- [14] 谢果珍, 惠华英, 于子真, 等. 铁皮石斛多糖对肠道微生态的影响研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(11): 2603-2605.
XIE GZ, HUI HY, YU ZZ, *et al.* Effect of dendrobium officinale polysaccharides on intestinal microecology [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(11): 2603-2605.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



于子真, 主管技师, 主要研究方向为中医药微生物学。

E-mail: 475777732@qq.com

肖嫩群, 高级实验师, 主要研究方向为中医药微生物学。

E-mail: xiaoneiqun@sohu.com